

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

NATHLY XAVIER DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DO EFEITO NEUROTÓXICO DA PROTEÍNA PRION EM
LINHAGENS CELULARES E SUA MODULAÇÃO PELAS CO-CHAPERONAS
CHIP/ Stub1 E ST11.**

CURITIBA

2017

NATHLY XAVIER DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DO EFEITO NEUROTÓXICO DA PROTEÍNA PRION EM
LINHAGENS CELULARES E SUA MODULAÇÃO PELAS CO-CHAPERONAS
CHIP/ Stub1 E STI1**

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

2017

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Santos, Nathly Xavier dos

Avaliação do efeito neurotóxico da proteína prion em linhagens celulares e sua modulação pelas co-chaperonas CHIP/stub 1 STI1. / Nathly Xavier dos Santos. – Curitiba, 2017.

60 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. Proteínas. 2. Prions. 3. Glicoproteínas. 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.) 574.2



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

**“AVALIAÇÃO DO EFEITO NEUROTÓXICO DA PROTEÍNA PRION EM
LINHAGENS CELULARES E SUA MODULAÇÃO PELAS CO-CHAPERONAS
CHIP/ Stub1 E STI1”**

por

Nathly Xavier dos Santos

**Dissertação 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

Profa. Dra. Adriana Frohlich Mercadante – Presidente

Luiza H. Gremski

Profa. Dra. Luiza Helena Gremski

Juliana F. de Moura

Profa. Dra. Juliana Ferreira de Moura

Curitiba, 10 de março de 2017.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a **Deus**, por me iluminar e me dar forças, por me oferecer ferramentas e me possibilitar um espaço para desenvolver este trabalho.

A Luciane e Joney, meus pais, que estão sempre ao meu lado, me apoiando, e confiando em minhas escolhas. muito obrigada, e saibam que vocês são motivadores de minhas conquistas.

Ao meu noivo, **Edgar**, pelo companherismo e paciência em meus experimentos.

À minha orientadora, professora **Adriana**, pela qual tenho profunda admiração, muito obrigada por me aceitar em seu laboratório, acreditar em mim e possibilitar o desenvolvimento deste projeto

As minhas amigas de laboratório, **Bruna, Camila, Carla, Larissa, Sze, Zaine** muito obrigada por toda ajuda, pela agradável companhia, amizade e pelos conselhos.

Agradeço especialmente a **Bruna e Larissa**, pela imensurável ajuda, disponibilidade, apoio e amizade.

A todos o **alunos do Laboratório de Neurobiologia**, que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho.

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

***“A mente que se abre a novas
ideias, jamais retorna ao seu
tamanho original”***

(Albert Einstein)

LISTA FIGURAS

FIGURA 1- DESENHO ESQUEMÁTICO DA PROTEÍNA PRION CELULAR E SUA LOCALIZAÇÃO NA MEMBRANA CELULAR.....	19
FIGURA 2- ESQUEMA DE ROTAS A QUAL LEVAM A FORMAÇÃO DE PrPs CITOSÓLICOS.....	22
FIGURA 3- ESQUEMAS DOS DOMÍNIOS DE CHIP.....	24
FIGURA 4- DOMÍNIOS ESTRUTURAIS DE STI-1.....	26
FIGURA 5: VETORES DE EXPRESSÃO.....	30
FIGURA 6- REAÇÃO DE REDUÇÃO DO MTT À FORMAZAN PELA ENZIMA SUCCINATO DESIDROGENASE MITOCONDRIAL.....	32
FIGURA 7- PrP NO CITOSOL MOSTROU SER CITOTÓXICO EM LINHAGENS CELULARES NEURAIS.....	36
FIGURA 8- REVERSÃO DA NEUROTOXICIDADE PELAS CO- CHAPERONAS CHIP E STI-1 PELO MÉTODO MTT	37
FIGURA 9- ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR ATRAVÉS DO MÉTODO DE VERMELHO NEUTRO.....	38
FIGURA 10- A EXPRESSÃO DAS DIFERENTES PROTEÍNAS NÃO ALTERA O NUMERO DE CÉLULAS.....	39
FIGURA 11- CURVA DOSE-RESPOSTA COM CHIP E STI1.....	40
FIGURA 12- OS MUTANTES DAS CO-CHAPERONAS CHIP E STI-1 FORAM CAPAZES DE REVERTER A NEUROTOXICIDADE DA CytPrP.....	41

FIGURA 13- AS CO-CHAPERONAS JUNTAS NÃO LEVAM A UMA MAIOR PROTEÇÃO NEURAL.....	42
FIGURA 14- EFEITO NEUROTÓXICO DE cytPrP E NEUROPROTETOR DE CHIP E STI1 PARECEM NÃO SER INFLUENCIADAS PELA VIA PROTEASSOMO.....	43
FIGURA 15- NEUROPROTEÇÃO DE CHIP E STI-1 PARECE NÃO ESTAR RELACIONADAS COM A VIA LISOSSOMA.....	44

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- ENCEFALOPATIAS ESPONGIFORMES TRANSMISSÍVEIS.....	18
--	----

LISTA DE SIGLAS

- CF10- Célula neuronal imortalizada de camundongo nocaute deficiente para PrP^C
- CHIP– *C-terminus of HSC70-interacting protein*
- CytPrP- Proteína prion citosólica
- DMEM- Dulbecco's Modified Eagle Medium
- DMSO- Dimetilsulfóxido
- DNA– Ácido desoxiribonucléico
- ER– retículo endoplasmático
- ERAD– degradação associada ao retículo endoplasmático
- GFP– *green fluorescent protein* – proteína verde fluorescente
- GPI– glicofosfatidilinositol
- HEK293T– células de rim embrionário humano 293T
- Hop– Hsp70/Hsp90 *organizing protein*
- HSc– *heat shock cognate protein Hsp* – *heat shock protein*
- IgG– Imunoglobulina do tipo G
- MEM– meio mínimo essencial
- Nm- nanômetro
- N2a- Neuro-2a/ neuroblastoma de camundongo
- PBS– tampão salina fosfato
- PrP– proteína príon
- PrP^C– Proteína príon celular
- PrP^{Sc}– Proteína príon *scrapie*
- SFB– soro fetal bovino
- SH-SY5Y- neuroblastoma humano
- 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*
- UPS- Sistema ubiquitina-proteassoma
- WB– *Western blotting*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 ENCEFALOPATIA ESPONGIFORME TRANSMISSÍVEIS (TSE).....	17
2.2 PRIONS.....	18
2.3 BIOGÊNESE DE PRIONS.....	20
2.4 PRP CITOSÓLICOS E POSSÍVEIS PAPÉIS NEUROPROTETOR E/OU NEUROTÓXICO.....	22
2.5 CHIP/ STUB1.....	23
2.6 STI-1/HOP.....	25
3 OBJETIVO GERAL	27
4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
5 MATERIAIS E MÉTODOS	28
5.1 CULTURA DE CÉLULAS.....	28
5.2 PLASMÍDEOS.....	29
5.3 TRANSFEÇÃO E CO- TRANSFEÇÃO DOS PLASMÍDEOS EM DIFERENTES LINHAG ENS CELULARES.....	30
5.4 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO COLORIMÉTRICO (MTT).....	31
5.5 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE PELO USO DO VERMELHO NEUTRO	32
5.6 PROLIFERAÇÃO CELULAR PELO MÉTODO DE CRISTAL VIOLETA.....	32
5.7 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR COM INIBIDOR DE PROTEASSOMA MG132.....	33
5.8 VIABILIDADE CELULAR POR INIBIÇÃO DA VIA LISOSSOMAL.....	33
5.9 ANÁLISE DE DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
6 RESULTADOS	35
6.1 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR PELA TÉCNICA DE MTT....	35

6.2 VIABILIDADE CELULAR PELO USO DO VERMELHO NEUTRO.....	37
6.3 ENSAIO DE COLORAÇÃO POR CRISTAL VIOLETA.....	38
6.4 CURVA DOSE-RESPOSTA DAS CO- CHAPERONAS CHIP E STI-1.....	39
6.5 VIABILIDADE CELULAR COM MUTANTES DE DELEÇÃO DE CHIP E DE STI-1.....	40
6.6 ANÁLISE DE UM POSSÍVEL SINERGISMO DE CHIP E STI-1.....	41
6.7 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR UTILIZANDO INIBIDOR DE PROTEASSOMA MG132.....	42
6.8 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR UTILIZANDO INIBIDOR DE LISSOSSOMO.....	43
7 DISCUSSÃO.....	45
7.1 EFEITO NEUROTÓXICO DE CYTPRP POR DIFERENTES ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR.....	45
7.2. REVERSÃO DO EFEITO TÓXICO POR CHIP E STI1.....	46
8 CONCLUSÃO.....	49
REFERÊNCIAS.....	50

RESUMO

A proteína prion celular (PrP^C) é uma glicoproteína extracelular, ancorada na membrana plasmática por uma molécula de glicofosfatidilinositol (GPI). A conversão de PrP^C em uma isoforma patológica (PrP^{Sc}), a partir de modificações estruturais, é responsável pelo desenvolvimento das encefalopatias espongiformes transmissíveis (TSEs) ou doenças priônicas.

Vários trabalhos indicam que formas citosólicas de PrP podem ser formadas durante erros na sua biossíntese. Os prions citosólicos (CytPrP) são gerados por meio de duas vias: ERAD (*ER-associated Degradation*) e ineficiência do peptídeo sinal. Alguns estudos demonstram que estas formas de prions citosólicos exercem função neurotóxica, contribuindo para a manifestação das doenças priônicas.

Trabalhos anteriores do nosso grupo, foram capazes de identificar uma interação entre PrP^C e CHIP/Stub1. CHIP/Stub1 é uma proteína citoplasmática a qual funciona como um co-chaperona molecular e apresenta atividade ubiquitina E3-ligase, participando do controle de qualidade das proteínas desde o dobramento até a fase de degradação. Ainda, CHIP/Stub1 é homóloga à proteína STI1/Hop, uma co-chaperona e um ligante bem estabelecido de PrP^C.

O objetivo desse trabalho foi avaliar em diferentes linhagens celulares se o efeito neurotóxico de PrP citosólico, já descrito para algumas células, era capaz de ser modulado através dessas co-chaperonas. Em nossos resultados mostramos por diferentes ensaios de viabilidade celular, tais como MTT, vermelho neutro, que CytPrP reduziu de 30-50% a viabilidade celular de três linhagens neuronais testadas: N2a, SH-SY5Y e CF10. Esse mesmo efeito não foi observado para linhagem renal HEK293T. A expressão das co-chaperonas CHIP e STI-1 foi capaz de reverter a toxicidade do CytPrP em todas linhagens neuronais. Nossos resultados ainda mostraram que mutantes de CHIP e STI-1 com domínios deletados também foram capazes de reverter o efeito neurotóxico causado pela CytPrP.

Ensaio utilizando o inibidor MG132 e hidroxicloroquina sugerem que essa reversão do efeito neurotóxico de CytPrP por CHIP e STI-1 parece não ser dependente da via de degradação por proteossomo, nem por lisossoma. Assim, um mecanismo através do qual as co-chaperonas exercem seu efeito de proteção da neuroxicidade ainda está sendo investigado.

Os dados obtidos nesse trabalho poderão contribuir para elucidar os possíveis mecanismos da neurotoxicidade de prions, permitindo um auxílio futuro no desenvolvimento de alvos terapêuticos relacionadas a doenças priônicas.

Palavras-chave: PrP citosólico. Neurotoxicidade. CHIP/Stub1. STI1. Prion.

ABSTRACT

The cellular prion protein (PrP^C) is an extracellular glycoprotein, anchored to the plasma membrane by a glycosphosphatidylinositol (GPI) molecule. The conversion of PrP^C to a pathological isoform (PrP^{Sc}), through structural modifications, is responsible for the development of transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) or prion diseases.

Several data indicate that cytosolic forms of PrP can be formed during errors in its biosynthesis. Cytosolic prions (CytPrP) are generated by two pathways: ERAD (ER-associated Degradation) and signal peptide inefficiency. Some studies have shown that these forms of cytosolic prions exert neurotoxic function, contributing to the manifestation of prion diseases.

Previous work by our group was able to identify an interaction between PrP^C and CHIP/Stub1. CHIP/Stub1 is a cytoplasmic protein, identified as a co-chaperone with E3 ligase activity, participating in the quality control of proteins, from folding to the degradation phase. Still, CHIP/Stub1 is homologous to STI1 (stress - inducible protein 1), a co-chaperone and a well-established PrP^C bind protein.

The objective of this work was to evaluate in different cell lines whether the neurotoxic effect of cytosolic PrP, already described for some cells, was able to be modulated through these co-chaperones. In our results we showed by different cell viability assays, such as MTT, neutral red, that CytPrP reduced from 30% to 50% the cell viability of three tested neuronal lines: N2a, SH-SY5Y and CF10. This same effect was not observed for HEK293T renal lineage. Our results also show that CHIP and STI-1 mutants with deleted domains were also capable of reversing the neurotoxic effect caused by CytPrP in all neuronal lines.

Assays using the proteasome inhibitor MG132 and Hydroxychloroquine suggest that this reversal of the neurotoxic effect does not appear to be dependent of the proteasome or lysosomal degradation pathways. Thus, a mechanism through which co-chaperones exert their protective effect of CytPrP neurotoxicity is still being investigated.

The data obtained in this work may contribute to elucidate possible mechanisms of neurotoxicity of prions, allowing future aid in the development of therapeutic targets related to prion diseases.

Keywords: cytosolic PrP. Neurotoxicity. CHIP/Stub1. STI1. Prion

1 INTRODUÇÃO

A proteína prion celular (PrP^C) é uma glicoproteína abundante do sistema nervoso central (SNC), de aproximadamente 32-35 kDa e que está ancorada na membrana plasmática por meio de uma molécula de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (MEYER *et al.*, 1986; STAHL, PRUSINER, 1991). Modificações em sua estrutura resultam em uma isoforma patológica (PrP^{Sc}), insolúvel e resistente a proteases que é fundamental para o desenvolvimento das encefalopatias espongiformes transmissíveis (TSEs) ou doenças priônicas (PRUSINER, 1998). Estas desordens neurodegenerativas podem ser de origem hereditária, infecciosa ou esporádica como, por exemplo, a insônia Familiar Fatal, a doença da vaca louca e a doença de Creutzfeldt-Jakob respectivamente (PRUSINER, 1998; LINDEN *et al.*, 2008).

Geralmente, a manifestação das doenças priônicas é atribuída ao acúmulo anormal da isoforma patológica, PrP^{Sc} (PRUSINER, 1998). Entretanto, camundongos nocautes para PrP^C foram capazes de se desenvolver normalmente ao serem inoculados com a forma *scrapie* (PrP^{Sc}) (BUELER *et al.*, 1993). Outros mecanismos, portanto, estão envolvidos na manifestação das doenças priônicas.

Durante sua biosíntese, PrP^C é traduzida e translocada para o ER simultaneamente. No retículo endoplasmático, PrP^C recebe a âncora de GPI em sua região C-terminal e sofre modificações pós-traducionais, como a formação de uma ponte dissulfeto e adições de oligossacarídeos em dois sítios. Em seguida, PrP^C transita para o Golgi, onde irá sofrer outros processos de maturação, e, pela via de secreção, é estabelecida na superfície extracelular da membrana plasmática (CHAKRABARTI *et al.*, 2009). Entretanto, em alguns casos, erros na biosíntese ocorrem e resultam em formas citosólicas da proteína prion. Os prions citosólicos são gerados por meio de duas vias: ERAD (*ER-associated Degradation*) e ineficiência do peptídeo sinal (MIESBAUER *et al.*, 2009). Alguns estudos demonstram que estas formas de prions citosólicos exercem função neurotóxica, contribuindo para a manifestação das doenças priônicas (MA *et al.*, 2002; MIESBAUER *et al.*, 2009; FIORITI *et al.*, 2005). Porém, interessante, há estudos que apontam na direção contrária e mostram que estas formas de prion exercem papel neuroprotetor (RESELLI, *et al.*, 2010; ROUCOU, *et al.*, 2003).

O efeito neurotóxico de CytPrP foi verificado usando várias abordagens, como células em cultura e modelos de animais transgênicos. Em estudos realizados por Rane *et al.* (2004), foi observado que uma melhor eficiência na sequência sinal de PrP, resultou em uma diminuição de PrP degradado pelo proteassomo. Sugerindo que a translocação ineficiente no ER pode gerar uma forma citotóxica, sujeita a agregação de PrP em determinadas células como MDCK e N2a (RANE *et al.*, 2004).

Estudos feitos com linhagens celulares, como N2a, indicaram que a inibição do proteassomo pode resultar em um acúmulo de moléculas de CytPrP citotóxico. Além disso, acumulação de PrP na presença de inibidores de proteassomo são tóxicos em células N2a, mas não em algumas linhagens de neuroblastomas humanos, sugerindo que o CytPrP somente é tóxico em determinados tipos de células neuronais (ROUCOU, *et al.*, 2003).

Com relação aos possíveis efeitos neuroprotetores de PrP citosólicos, trabalhos realizados por Bounhar e colaboradores, sugerem que PrP citosólicos protegem neurônios humanos contra a ação pró-apoptótica da proteína Bax (BOUNHAR *et al.*, 2001) Outros trabalhos similares colaboraram com esses achados (RESELLI, *et al.*, 2010).

Prions citosólicos são alvos de degradação por meio do sistema ubiquitina-proteassomo (YEDIDIA *et al.*, 2001) e sua toxicidade pode ser modulada pela superexpressão de HSP70 (ZHANG *et al.*, 2012), evidenciando a participação das chaperonas moleculares nas doenças priônicas. Diversos estudos mostram que a co-chaperona CHIP/Stub1 tem papel importante no contexto das doenças neurodegenerativas. CHIP/Stub1 é uma proteína citoplasmática com uma massa molecular de 35kDa que funciona como um co-chaperona molecular e apresenta atividade ubiquitina E3-ligase, participando do controle de qualidade das proteínas desde o dobramento até a fase de degradação. Esta proteína associada com complexos de diferentes chaperonas é capaz de monitorar o processo de dobramento, bem como diferentes vias de degradação da proteína tais como proteassoma e autofagia (BALLINGER, *et al.*, 1999; DICKEY, *et al.*, 2007; SUN *et al.*, 2014). Além do mais mostrou-se diminuir, por meio de degradação via UPS, os níveis do peptídeo A β 42 (KUMAR, P *et al.*, 2007), Ataxina-1 (AL-RAMAHI *et al.*, 2006) e LRRK2 (DING; GOLDBERG, 2009), proteínas envolvidas nas doenças de Alzheimer, Huntington e Parkinson respectivamente. Recentemente, nosso grupo

de pesquisa, utilizando as técnicas de duplo-híbrido em leveduras, pull-down e imunoprecipitação, foi capaz de identificar a interação entre PrP^C e CHIP/Stub1 (GIMENEZ *et al.*, 2015). Logo, é possível que CHIP/Stub1 possa ter participação nas doenças priônicas também.

A proteína STI1 (*Stress-inducible protein 1*), outra co-chaperona e homóloga a CHIP/Stub1, também interage com PrP^C e está envolvida em processos de neuritogênese e neuroproteção (ZANATA *et al.*, 2002; CHIARINI *et al.*, 2002; LIMA *et al.*, 2007). Em estudo realizado por Muller e colaboradores (MULLER *et al.*, 2013), foi visto que a fosforilação da região C-terminal de Hsp70 e Hsp90 impede a ligação de CHIP/Stub1 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 CHIP/Stub1, promovendo assim a degradação de proteínas alvo, através do proteossoma (KUNDRAT; REGAN, 2010; MULLER *et al.*, 2013). Portanto, possivelmente um mecanismo semelhante esteja envolvido no controle de qualidade de PrP^C, uma vez que tanto STI1, quanto Stub1/CHIP interagem com PrP^C.

Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar em diferentes linhagens celulares se o efeito neurotóxico de PrP citosólico (CytPrP), já descrito para algumas células, era capaz de ser modulado por CHIP/Stub1 e STI1, através da superexpressão dessas co-chaperonas. Os dados obtidos poderão contribuir para elucidar os possíveis mecanismos da neurotoxicidade de prions, permitindo um auxílio futuro no desenvolvimento de alvos terapêuticos relacionadas a doenças priônicas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ENCEFALOPATIA ESPONGIFORME TRANSMISSÍVEIS (TSE)

Encefalopatias espongiformes transmissíveis (TSE), também conhecidas por doenças priônicas, formam um conjunto de doenças degenerativas do sistema nervoso relacionadas a conversão da proteína prion celular (PrP^C) em sua forma infectante (PrP^{Sc}), pelo dobramento incorreto desta proteína (MCKINLEY *et al.*, 1982; PRUSINER, 1982). O termo transmissível é devido ao agente causador dessas encefalopatias que são os príons, os quais podem ser adquiridos por infecção, hereditariamente, ou esporadicamente. Prions são partículas proteicas, de caráter infeccioso e desprovido de material genético.

O interesse inicial em torno dos príons aconteceu devido ao envolvimento direto em algumas doenças que não possuíam etiologias conhecidas. São doenças raras, com incidência mundial de aproximadamente 1 caso para cada 1 milhão de pessoas (ANVISA, 2004). O corrente espectro das doenças que compõem o grupo das encefalopatias espongiformes, no homem, é subdividido quanto aos sintomas clínicos associado aos aspectos neuropatológicos, incluindo: kuru, doença de Creutzfeldt-Jacob (TABRIZI, 1996), doença de Gerstmann-Sträussler-Scheinker e insônia familiar fatal (DEARMOND; PRUSINER, 1995). Nas outras espécies: scrapie, que acomete ovinos e mais raramente caprinos; encefalopatia espongiforme bovina (BSE) ou doença da vaca louca; encefalopatia espongiforme de alguns animais de zoológico (KIRKWOOD *et al.*, 1990; WILESMITH *et al.*, 1992; DENNY *et al.*, 1992; CUNNINGHAM *et al.*, 1993); doença emaciante crônica e encefalopatia espongiforme felina (PEARSON *et al.*, 1992; FRASER *et al.*, 1994; WILL *et al.*, 1996). A TABELA 1 apresenta, de forma resumida, alguns aspectos dessas doenças.

Atualmente, o envolvimento dos príons na etiologia de doenças neurodegenerativas, em animais e humanos, já se encontra bem esclarecido, tendo todas elas em comum o acúmulo de uma proteína prion que é resistente ao tratamento com proteases, denominada PrP^{Sc}. Os sinais e sintomas mais freqüentes são demência rapidamente progressiva associada a tremores musculares de extremidades (GAJDUSEK, 1996; PRUSINER, 1996; ANVISA, 2004).

TABELA 1. ENCEFALOPATIAS ESPONGIFORMES TRANSMISSÍVEIS.

Doença	Hospedeiro	Etiologia
Esporádica		
Doença de Creutzfeldt-Jakob	Humanos	Conversão esporádica da PrP
Genética		
Doença de Creutzfeldt-Jakob familiar	Humanos	Mutações no gene da PrP
Gerstmann Sträussler Scheinker	Humanos	Mutações no gene da PrP
Insônia Familiar Fatal	Humanos	Mutações no gene da PrP
Adquirida		
Doença de Creutzfeldt-Jakob iatrogênica	Humanos	Contato com extratos teciduais, instrumentos neurocirúrgicos contaminados
Kuru	Humanos	Infecção através de rituais e antropofagia
Doença de Creutzfeldt-Jakob variável	Humanos	Infecção provavelmente pela ingestão de carne bovina contaminada
Encefalopatia Espongiforme Bovina	Bovino	Ingestão de ração contendo restos de animais infectados

(Tabela adaptada AGUZZI *et al.*, 2013)

2.2 PRIONS

A proteína prion celular (PrP^C), é encontrada predominantemente como uma glicoproteína extracelular de 32-35 kDa, ancorada na membrana através de uma molécula de glicofosfatidilinositol (GPI). PrP^C pode ser encontrada nas formas não glicosilada, mono e di-glicosilada, sendo que a forma madura, encontrada na membrana celular, é a di-glicosilada (MEYER *et al.*, 1986). Os domínios que fazem parte de PrP^C estão ilustrados na FIGURA1.

FIGURA 1-DESENHO ESQUEMÁTICO DA PROTEÍNA PRION CELULAR E SUA LOCALIZAÇÃO NA MEMBRANA CELULAR.

A.



B.



Nota: **(A)**: Durante o trajeto da proteína através do retículo endoplasmático, a porção N-terminal (peptídeo sinalizador: SP) é removida juntamente com a porção C-terminal (rosa: GSP), sendo esta última substituída por uma âncora de GPI. A região em verde entre os aminoácidos 51 e 91, representa as seqüências de oito aminoácidos que se repetem cinco vezes (octarepeats) ; em marrom (HC), representa o núcleo hidrofóbico. E os retângulos cor de laranja (H1, H2 e H3) representam regiões de estrutura α -hélice. **(B)** PrP^c é incorporado no lado externo da membrana plasmática através de sua âncora de GPI. A proteína madura possui um domínio C-terminal e novelada em α -hélices e β -folha antiparalela (representadas em azul e verde respectivamente); o domínio N-terminal é desordenado, compreendendo quase metade da cadeia polipeptídica (representado em vermelho e cinza). As esferas alaranjadas representam os oligossacarídeos. FONTE: Adaptado de LINDEN *et al.*, 2008; Adaptado de PINHEIRO, 2006).

A proteína prion (PrP) é encontrada em duas isoformas sendo uma normal (PrP^c) e a outra patológica conhecida como *scrapie* (PrP^{Sc}) (CAUGHEY; CHESEBRO, 1997). Sua forma normal apresenta predominantemente estrutura em alfa-hélice, com a capacidade de ser convertida a PrP^{Sc}, o qual possui maior quantidade de folhas- β , formando agregados compactos, insolúveis a detergentes e resistentes a proteinases, podendo se acumular nas células (MCKINLEY *et al.*, 1982; PRUSINER, 1982). O termo *prion* é usado para designar as partículas infecciosas protéicas, que são exclusivamente compostas por PrP^{Sc} e desprovidas de material genético.

PrP^c é encontrada em grandes quantidades no sistema nervoso como córtex, hipotálamo, hipocampo e bulbo olfatório (BENDHEIM *et al.*, 1992; HORIUCHI *et al.*, 1995; LEMAIRE *et al.*, 2000; Revisado por LIDEN *et al.*, 2008; MEYER *et al.*, 1986). E em menor quantidade em outros órgãos como coração, pulmão, rim e testículos (COSTA, 2007).

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). Alguns estudos sugerem funções como: adesão, diferenciação, sinalização celular, crescimento de neuritos, excitabilidade neuronal, e neuroproteção (MARTINS *et al.*, 2002; ZANATA *et al.*, 2002; CHIARINI *et al.*, 2002; LIMA *et al.*, 2007; BIASINI *et al.*, 2012). Algumas evidências apontam que a conversão de PrP^C para a forma PrP^{Sc} implica em um aumento da função neurotóxica. 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 das 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 príons (BÜELER *et al.*, 1993; BÜELER *et al.*, 1992), e 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, e, realmente, funções novas têm sido atribuídas à proteína, tais como: memória, processos de neuritogênese, neuroproteção, adesão celular, entre outros (revisado por LINDEN *et al.*, 2008). Muitas destas funções foram elucidadas com a descoberta de ligantes de PrP^C (Revisado por LINDEN *et al.*, 2008).

2.3 BIOGÊNESE DE PRIONS

Vários estudos sobre as doenças causadas por príons têm procurado esclarecer como alterações na biosíntese 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 rugoso (ER), onde o peptídeo sinal N- terminal (SP) é clivado, e a âncora GPI é adicionada simultaneamente com a remoção de uma sequência sinal de C- terminal (ORSI; SITIA, 2007).

Ainda no retículo endoplasmático, o PrP acaba sofrendo diversas modificações pós traducionais, tais como adição de oligossacarídeos em dois sítios,

resultando em uma mistura de moléculas mono, di e não-glicosiladas, e a formação de uma única ponte dissulfeto (CHAKRABARTI *et al.*, 2009).

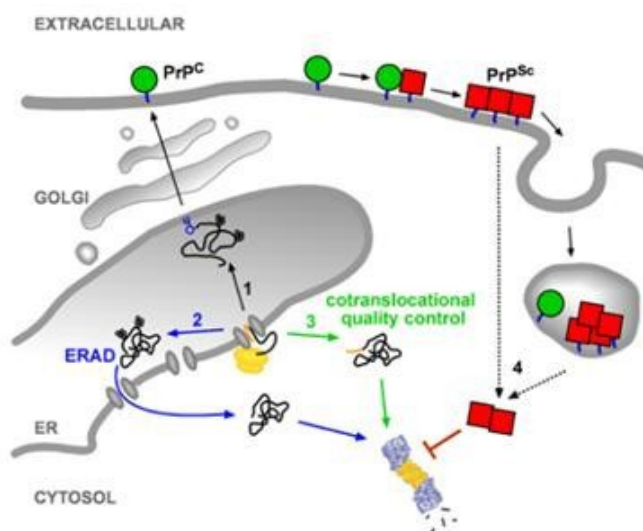
Ao transitar no complexo de Golgi, PrP^C recebe glicosilações adicionais sendo exportada para a camada extracelular da membrana plasmática (CAMPANA; SARNATARO; ZURZOLO, 2005). PrP^C maduro pode ser endocitado e reciclado para superfície celular ou enviado para degradação por lisossomos (CHAKRABARTI *et al.*, 2009).

Parte das moléculas de PrP recém-sintetizadas podem ser reconhecidas como proteínas mal dobradas pelo controle de qualidade do retículo endoplasmático e ser direcionada a uma via de degradação associada ao retículo endoplasmático (ERAD). Durante o processo de ERAD, ocorre um transporte retrógrado da proteína que esta mal dobrada do lúmen do retículo endoplasmático para o citosol. Nesse local, a proteína é ubiquitinada por enzimas presentes no local, e degradada pelo proteassomo (RESELLI *et al.*, 2010; revisado por VEMBAR e BORDSKY, 2008). A FIGURA 2 apresenta um esquema do tráfego de PrP.

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).

Em células infectadas por PrP^{Sc}, este último pode translocar da membrana ou de compartimentos endocíticos para o citoplasma, onde interfere na atividade do proteassomo (MIESBAUER *et al.*, 2010).

FIGURA 2- ESQUEMA DE ROTAS A QUAL LEVAM A FORMAÇÃO DE PrPs CITOSÓLICOS.



Nota. 1. É proposto que PrP^C (círculo verde) siga a mesma via biosintética que as outras proteínas ancoradas por GPI, sendo direcionada do ER (retículo endoplasmático) para o Golgi e deste para a membrana plasmática. 2. Uma via de degradação associada ao retículo endoplasmático (ERAD) é capaz de realizar a retrotranslocação das formas de PrP mal dobradas presentes no ER para o citosol, onde são ubiquitinadas e degradadas pelo proteassomo. 3. Uma parte de população de PrP recém-traduzida falha em ser translocada ao lúmen do ER, ficando no citosol onde podem seguir para degradação pelo proteassomo. 4. Nas células infectadas por prions, há a conversão de PrP^C para PrP^{Sc} (quadrado vermelho), o qual pode ser internalizado, em compartimentos endocíticos para o citosol e interferir na atividade proteassomal. FONTE: MIESBAUER *et al.*, 2010.

2.4 PrP CITOSÓLICOS E POSSÍVEIS PAPÉIS NEUROPROTETOR E/OU NEUROTÓXICO

As vias pelas quais a proteína prion aparece no citosol ainda se encontra de forma especulativa e controversa (MA; LINDQUIST, 2001, 2002; YEDIDIA *et al.*, 2001; DRISALDI *et al.*, 2003; HEGDE e RANE, 2003; ROUCOU *et al.*, 2003). Como já mencionado, PrP citosólico (CytPrP) pode ser formado por duas vias. 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). Essa via implica no transporte retrógrado do lúmen do ER para o citosol, remoção dos oligossacarídeos pelas N-glicanases e degradação pelo proteassomo (RESELLI *et al.*, 2010). Várias evidências na literatura indicam que PrP^C sofre ubiquitinação e que é degradado via proteassomo (YEDIDIA *et al.*, 2001; MA e LINDQUIST, 2001). Estudos também demonstraram que em condições que favoreciam o dobramento aberrante de PrP,

tais como mutações e/ou redução da função do proteassomo, 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 em LINDEN *et al.*, 2008). Há inclusive evidências na literatura que mostram um efeito neuroprotetor dessa forma de PrP em algumas células (ROUCOU *et al.*, 2003; RESTELLI *et al.*, 2010).

O efeito neurotóxico de PrP citosólico foi verificado usando várias abordagens, como células em cultura e modelos de animais transgênicos. Em estudos realizados por Rane *et al.* (2004), foi observado que uma melhor eficiência na sequência sinal de PrP, resultou em uma diminuição de PrP degradado pelo proteassomo. Sugerindo que a translocação ineficiente no ER pode gerar uma forma citotóxica, sujeita a agregação de PrP em determinadas células como MDCK e N2a (RANE *et al.*, 2004).

Estudos feitos em linhagens celulares, como N2a, indicaram que a inibição do proteassomo pode resultar em um acúmulo de moléculas de PrP citotóxico no citosol. Além disso, acumulação de CytPrP na presença de inibidores de proteassomo são tóxicos em células N2a, mas não em algumas linhagens de neuroblastomas humanos, sugerindo que o CytPrP somente é tóxico em determinados tipos de células neuronais (ROUCOU *et al.*, 2003).

Com relação aos possíveis efeitos neuroprotetores de PrP citosólicos, trabalhos realizados por Bounhar (2001), sugerem que PrP citosólicos protegem neurônios humanos contra a ação pró-apoptótica da proteína Bax (BOUNHAR *et al.*, 2001). Outros trabalhos similares corroboraram com esses achados (RESTELLI, 2010; FIORITTI, 2005).

2.5 CHIP/ STUB1

CHIP (*C-terminus of Hsc70-interacting protein*), também conhecida como Stub1 (*STIP1 homology and U-Box containing protein1*), é uma proteína citoplasmática com massa molecular de 35kDa que funciona como um co-chaperona

molecular e apresenta atividade ubiquitina E3-ligase, participando do controle de qualidade das proteínas desde o dobramento até a fase de degradação (BALLINGER *et al.*, 1999; DICKEY *et al.*, 2007; SUN *et al.*, 2014). CHIP, associada a complexos de diferentes chaperonas, é capaz de monitorar o processo de dobramento, bem como de diferentes vias de degradação de proteínas clientes, tais como proteassoma e autofagia (GOLDBERG, 2003; KOROLCHUK *et al.*, 2010).

A região N-terminal de CHIP/Stub1 possui três domínios de repetições de tetratricopeptídeos (TPR) que são responsáveis por interações com Hsp70/90 e outras chaperonas moleculares. A região C-terminal contém o domínio U-box, que é o sítio da sua atividade ubiquitina E3 ligase, determinando a especificidade para ubiquinação do substrato (HATAKEYAMA *et al.*, 2001). E por fim um domínio central que contém resíduos carregados, situado entre os domínios TPR e U-box.

FIGURA 3: ESQUEMAS DOS DOMÍNIOS DE CHIP



Nota **(A)** Domínio de repetições de tetratricopeptídeos (TPR) ilustrado em cor Azul presente na região N-terminal, e o domínio U-box representado em cor laranja na região C-terminal. **(B)** Diagrama esquemático comparando os domínios estruturais de Stub1/CHIP entre várias espécies. FONTE: Revisado por PAUL e GOSH, 2014

Várias proteínas que apresentam domínios TPRs, participam de interações com proteínas chaperonas moleculares, incluindo a Hsp70, Hsp90 e Hsc70, sendo

importantes para o correto dobramento de proteínas recém-sintetizadas e degradação de proteínas-alvo, via ubiquitina- proteassomo (CONNELL *et al.*, 2001; HATAKEYAMA *et al.*, 2001).

2.6 STI-1/HOP

Ainda sobre CHIP/Stub1, sabe-se que esta é homóloga à proteína STI1 (*stress-inducible protein 1*) originalmente descrita como uma proteína capaz de se associar e modular a atividade de proteínas Hsp70 e Hsp90 (HOP- Hsp70/Hsp90 Organizing protein) (SONG e MASON, 2005), cujo transcrito contém 2079 pares de bases que codificam para uma sequência de 543 aminoácidos, resultando em uma proteína de 66kDa.

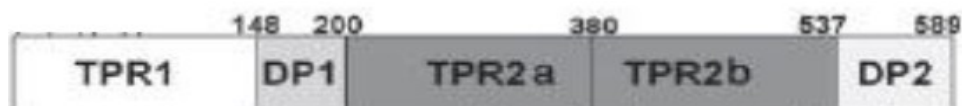
STI1/Hop também é uma co-chaperona que contém domínios TPR e interage com a região C-terminal de Hsp70 e Hsp 90. Estes domínios TPRs são formados por sequências repetidas de 34 aminoácidos degenerados, presentes em um grande número de proteínas (YOUNG *et al.*, 2004). As proteínas que apresentam domínios TPR participam no controle do ciclo celular, transcrição, auxiliam na conformação proteica, transporte, translocação, tradução de sinal, metabolismo de glicose, e liberação de neurotransmissor (BLATCH *et al.*, 1999). Estudos revelaram que STI-1 humana contém 9 motivos TPR arranjados em 3 domínios, os quais foram denominados TPR1, TPR2A, TPR2B (SCHEUFLER *et al.*, 2000; VAN DER *et al.*, 2000). Além destes domínios, a STI-1 contém regiões menores onde são encontrados resíduos de aspartato e prolina adjacentes a TPR1 (DP1) e TPR2B (DP2). Estes domínios estão envolvidos na regulação da atividade de HSP70 e HSP90 e na ativação de receptores esteróides.

Além disso, assim como CHIP/Stub1, a STI-1 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 em processos de neuritogênese e neuroproteção (ZANATA *et al.*, 2002; CHIARINI *et al.*, 2002; LIMA *et al.*, 2007; LINDEN *et al.*, 2008).

A distribuição celular de STI1 é predominantemente citoplasmática. Entretanto, sua presença no núcleo já foi descrita, o que aponta para a existência de um processo de importação nuclear de STI1 (LASSLE *et al.*, 1997; LONGONGSHAW *et al.*, 2000). Alguns trabalhos têm demonstrado que tanto

STI1/Hop como CHIP/Stub1 podem participar juntos na modulação do equilíbrio entre o dobramento e a degradação de proteínas clientes de Hsp70/90 (KUNDRAT e REGAN, 2010; MULLER *et al.*, 2013). Mais especificamente, um estudo realizado por Muller e colaboradores, mostrou que a fosforilação da região C-terminal de Hsp70 e Hsp90 impede a ligação de CHIP/Stub1 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 CHIP/Stub1, promovendo assim a degradação de proteínas alvo (MULLER *et al.*, 2013). É possível 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 CHIP/Stub1.

FIGURA 4: DOMÍNIOS ESTRUTURAIS DE STI-1



Nota: Domínios estruturais de STI-1: A STI-1 possui domínios de ligação as chaperonas Hsp70 e Hsp 90, formados por tetratricopeptídeos repetidos (TPR) e domínios de ativação a receptor esteróides, ricos em aspartato e prolina (DP). FONTE: REVISADO POR PAUL E GOSH, 2014; ADAPTADO DE SONG e MASISON, 2005.

3 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito tóxico da PrP citosólico (CytPrP) em diferentes linhagens celulares (N2a, SH-SY5Y, CF10, HEK 293T) podem ser modulados por CHIP/ Stub1 e ST11.

4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito neurotóxico da PrP citosólico em diferentes linhagens neuronais (N2a, SH-SY5Y, CF10,) e renal (HEK293T), através da superexpressão dessa forma de PrP e ensaios de viabilidade celular;
- Verificar se o efeito tóxico da CytPrP pode ser modulado através da superexpressão de CHIP/Stub1 e ST11;
- Investigar se as vias de degradação de proteínas por proteossomo e lisossomo estão envolvidas na modulação do efeito neurotóxico de CytPrP por CHIP/Stub1 e ST11;

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 CULTURA DE CÉLULAS

A linhagem de neuroblastoma murino, Neuro-2a (N2a) foi cultivada segundo as normas da ATCC, (American Type Culture Collection) com meio DMEM alta glicose (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Cultilab) completo contendo aminoácidos não-essenciais MEM NEAA Non-Essential Amino Acids Solution 1X (Life Technologies); 10% (v/v) de SFB (soro fetal bovino) (Gibco Life Technologies); antibiótico gentamicina (1µg/ml) (Scheringh Plough). As células N2a foram cultivadas em placas de Petri de 100 cm² (NEST) em estufa com 5% de CO₂ a 37°C. A cada dois dias, sempre que as células atingiam 80% de confluência, era feito um repique de 1:3 com PBS-EDTA 2 mM e 0,25% (v/v) de tripsina. Em seguida, essas células em suspensão no meio de cultura eram centrifugadas a 2500rpm por 2 minutos para a remoção do sobrenadante contendo tripsina. Esse procedimento é necessário, uma vez que, qualquer resíduo de tripsina é muito tóxico para essa linhagem celular. Dessa forma, o meio de cultura contendo a tripsina era descartado e novo meio adicionado para a ressuspensão do sedimento celular.

A linhagem de neuroblastoma humano, SH-SY5Y foi cultivada segundo as normas da ATCC, com meio DMEM alta glicose (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Cultilab) completo contendo aminoácidos não-essenciais MEM NEAA Non-Essential Amino Acids Solution 1X (Life Technologies); 15% (v/v) de SFB (soro fetal bovino) (Gibco Life Technologies); antibiótico gentamicina (1µg/ml) (Scheringh Plough). As células SHSY5Y foram cultivadas em placas de Petri de 100 cm² (NEST) em estufa com 5% de CO₂ a 37°C.

A linhagem CF10, uma célula neural imortalizada de camundongo nocaute deficiente para PrP^C (GREIL *et al.*, 2008) foi cultivada segundo as normas da ATCC, com meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Cultilab); 10% (v/v) de SFB (soro fetal bovino) (Gibco Life Technologies); antibiótico gentamicina (1µg/ml) (Scheringh Plough). As células CF10 foram cultivadas em placas de Petri de 100 cm² (TPP) em estufa com 5% de CO₂ a 37°C.

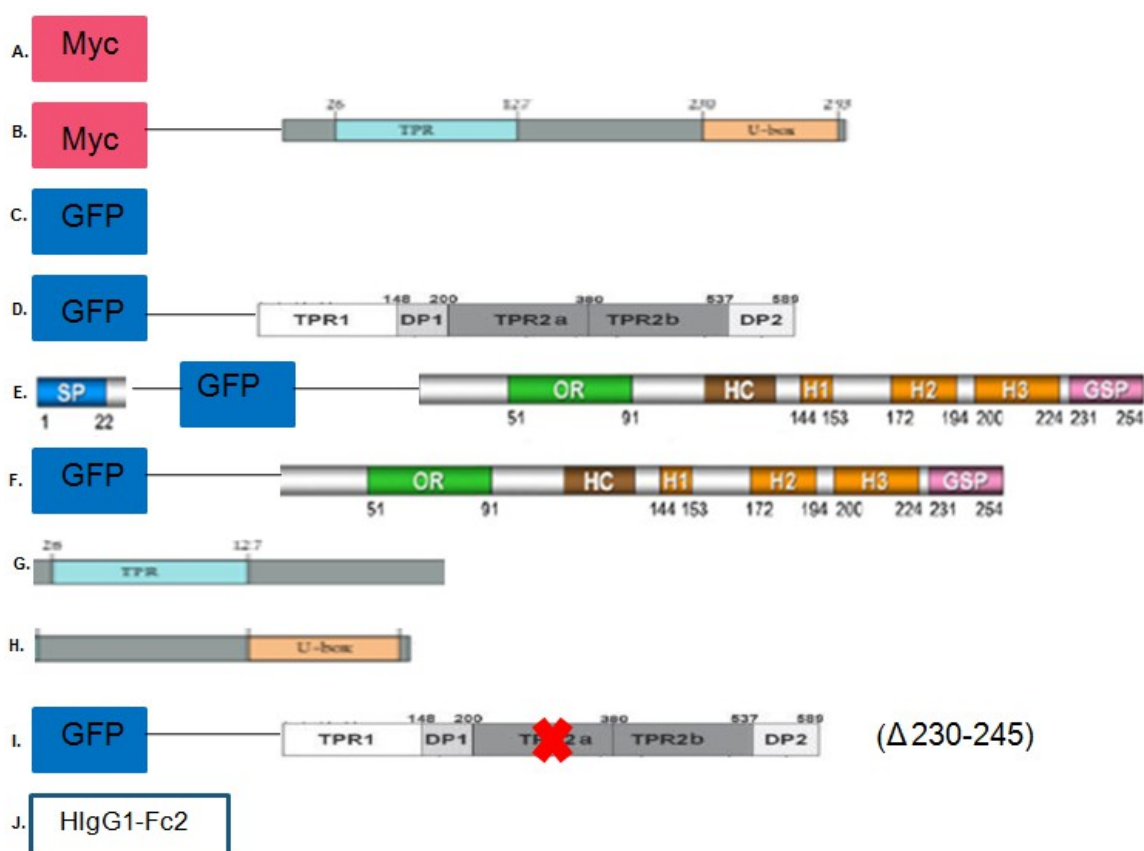
A linhagem HEK293T de rim de embrião humano (Human Embryonic Kidney cells) foi cultivada em meio MEM (Minimum Essential Medium) (Cultilab), 10% (v/v)

de SFB (soro fetal bovino) (Cultilab), pH 7,2-7,4, antibiótico gentamicina (1µg/ml) (Schering Plough). As células foram cultivadas em placas de Petri de 100 cm² (NEST) em estufa com 5% de CO₂ a 37°C. A cada dois dias, sempre que as células atingiam 80% de confluência, foi feito um repique de 1:3 com PBS-EDTA e 0,25% (v/v) de tripsina.

5.2 PLASMÍDEOS

Os plasmídeos utilizados nas transfecções de células foram: pMyc-Stub1, capaz de expressar Stub1/CHIP murina, produzido no Laboratório de Neurobiologia pelo aluno Celso Fávaro Júnior (GIMENEZ *et al.*, 2015); pEGFP-PrP^C e pEGFP-PrP^{C*} (denominado neste trabalho como Cyt-PrP), que apresentam, respectivamente, a sequência capaz de codificar a sequência inteira de PrP^C murino e o fragmento 23-254 do PrP^C murino (sem o peptídeo sinal que endereça para o retículo endoplasmático, ficando no citosol). Ambas as sequências foram inseridas 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); pEGFP-STI1, capaz de expressar STI1 em fusão com GFP; pEGFP vazio; Myc vazio, pcDNA3-CHIP-ΔTPR, resíduos 32-145 deletados; pcDNA3-CHIP-ΔE3, pEGFP-STI1-TPRΔ, resíduos 230-245 deletados; pcDNA-HlgG1-Fc2, que produz a a região Fc de IgG humana. As proteínas expressas pelos diferentes vetores estão representadas na FIGURA 5.

FIGURA 5: PROTEÍNAS EXPRESSAS PELOS DIFERENTES VETORES



Nota: Representação das proteínas expressas pelos vetores de expressão utilizados na transfecção: etiqueta myc expressa pelo vetor pCDNA-myc vazio (A), CHIP com a etiqueta de myc (B), GFP (C), STI-1 com etiqueta de GFP (D), sequência de PrP^C inteira com GFP (E), PrP^C sem o peptideo sinal, sendo considerado como CytPrP com GFP (F), CHIP com domínio U-box deletado, (G), CHIP com o domínio TPR deletado, (H), STI-1 com domínio 230-245 deletado o qual se liga a PrP^C (I), e um plasmídeo o qual não apresenta nenhum envolvimento a proteína prion e expressa os domínios CH2 e CH3 de IgG1 humana, HlgG1Fc2 (J).

5.3 TRANSFECCÃO E CO- TRANSFECCÃO DOS PLASMÍDEOS EM DIFERENTES LINHAGENS CELULARES

Um dia antes das transfecções, as células foram plaqueadas em placas de 96 wells (TPP) a $1,5 \times 10^4$ para as células N2a e SH-SY5Y e 1×10^4 para as células HEK293T e CF10. Ao adquirirem uma confluência de 70-90% o procedimento de

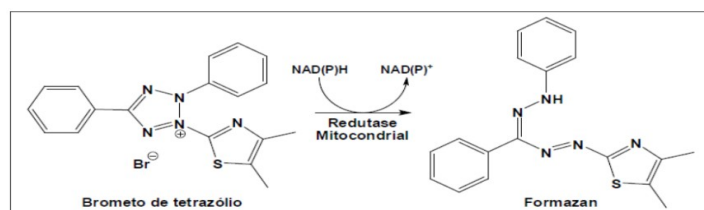
transfecção foi realizado com Lipofectamine 2000 (Invitrogen) conforme instruções do fabricante. Brevemente, utilizamos 0,3µl/poço de lipofectamina e 0,1µg/poço de plasmídeo em 25µl de meio MEM (Minimum Essential Medium) (Cultilab) sem soro, e sem antibiótico para a incubação do complexo lipossomo-DNA. Depois de 20 min. de incubação, a solução foi distribuída na placa, juntamente com 100µl de meio sem antibiótico das respectivas células. E por fim incubadas por 24 horas a 37°C, 5% CO₂.

5.4 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO COLORIMÉTRICO (MTT)

O ensaio utilizado para avaliar a citotoxicidade da célula foi o método colorimétrico do brometo de 3(4,5dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT, Sigma). Esse método se baseia na dosagem da atividade metabólica de células viáveis utilizando ensaio colorimétrico. Os sais tetrazolium (MTT) são reduzidos através de uma reação enzimática que envolve a oxidação do NADH/NADPH catalisada pelo complexo succinato-tetrazolium redutase presente somente em células viáveis. Quando reduzidos os sais tetrazolium formam o sal formazan (FIGURA 6) que é hidrofóbico e colorido (solubilizado pela adição de DMSO), podendo ser quantificado por absorvância (RISS *et al.*, 2004).

O ensaio do MTT foi realizado conforme descrito a seguir. Todo o meio de cultivo no qual as células se encontravam foi retirado, adicionando-se 100 uL por poço de solução de MTT [MTT 5 mg/mL em tampão fosfato salina (PBS)]. Após três horas de incubação em estufa a 5% de CO₂ e 37°C, foram adicionados 100 uL da solução de lise (dimetilsulfóxido– DMSO) a cada poço. A placa foi delicadamente agitada para solubilização dos precipitados e, em seguida, foi feita a medição da absorvância a 570 nm em leitor de microplacas (Bio Rad)

FIGURA 6: REAÇÃO DE REDUÇÃO DE MTT À FORMAZAN PELA ENZIMA SUCCINATO DESIDROGENASE MITOCONDRIAL.



FONTE:MOSMEN, 1983.

Cada condição experimental foi realizada em quintuplicatas e três ou mais experimentos independentes foram feitos para posterior análise estatística.

5.5 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE PELO USO DO VERMELHO NEUTRO

Este método analisa a viabilidade celular através da capacidade endocítica da célula, a qual irá executar maior ou menor captação do corante de acordo com a integridade da membrana plasmática. O composto endocitado fica armazenado no citosol, o qual é possível realizar a leitura de absorbância das amostras (FOTAKIS e TIMBRELL, 2006).

Após 24 horas de transfecção, o sobrenadante de cada poço foi removido e substituído por 200 uL da solução vermelho neutro (40ug/mL). A incorporação do vermelho neutro pelas células viáveis foi verificada após 3 horas de incubação a 37°C, 5% CO₂. O meio foi então removido e as células lavadas com tampão fosfato-salina (PBS), seguida de outra lavagem (200uL) com uma solução formaldeído (0,5% v/v) em CaCl₂ (1%).

Após cinco minutos o sobrenadante foi retirado e foram adicionados 100 uL da solução álcool ácido (1% de ácido acético em 50% de álcool etílico absoluto) (BABICH e BOREUNFREUND, 1991). Por fim, as absorbâncias foram lidas a 550 nm em leitor de placas (Bio-Tek).

5.6 PROLIFERAÇÃO CELULAR PELO MÉTODO DE CRISTAL VIOLETA

Para investigação da proliferação celular, foi utilizado o método de cristal violeta, o qual é responsável por corar os ácidos nucléicos das células (KUENG *et al.*, 1989). Após os procedimentos de cultivo celular, citados no item 5.1, células N2a

foram plaqueadas em placas de 96 poços e tranfectadas por um período de 24 horas.

Após o período de transfecção as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 10 minutos, seguida da solução de metanol 2% por 10 minutos, coradas com solução de cristal violeta 0,5% em etanol 20%, durante 10 minutos. E posteriormente submersa em água destilada até remover o excesso do corante. Por fim procedeu-se a eluição do corante utilizando uma solução de citrato de sódio 0,14% em etanol 50%, a leitura da absorbância das amostras foi feita em um leitor de microplacas em 550 nm.

5.7 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR COM INIBIDOR DE PROTEASSOMA MG132

Células N2a foram tranfectadas com os diferentes vetores, como mencionado anteriormente. Após 6 horas de transfecção adicionou-se o inibidor de proteassoma MG132 (concentração final por poço). A ação do MG132 baseia-se em impedir a atividade da porção 20S do proteassomo (fração catalítica do proteassoma 26S) através da ligação covalente ao sítio ativo das subunidades beta, bloqueando assim a atividade catalítica (GUO e PENG, 2013). Por fim as células foram incubadas por mais 18 horas a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂. Seguiu-se então a determinação da viabilidade celular pelo método de MTT

5.8 VIABILIDADE CELULAR POR INIBIÇÃO DA VIA LISOSSOMAL

A viabilidade celular também foi analisada após uso da hidroxicloroquina, um inibidor de autofagossoma, a fim de avaliar se a neuroproteção das co-chaperonas CHIP e STI-1 estavam relacionadas à via lisossomal (HUI-CHUAN YU *et al.*, 2013).

Células N2a foram tranfectadas utilizando o reagente Lipofectamina 2000 (Invitrogen), com mutantes de PrP, e co-chaperonas CHIP e STI-1 por 6 horas. Posteriormente foram adicionados 25µM da hidroxicloroquina, a qual foi incubada por um período de 16 horas. O resultado foi analisado pelo método colorimétrico MTT em 550nm (Bio-tek).

5.9 ANÁLISE DE DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise dos dados obtidos nos ensaios de viabilidade celular, foram utilizados a Análise de Variância (ANOVA) e posterior o teste de comparação múltipla de Tukey com significância de $p < 0,05$. O programa utilizado para realizar as análises foi o Software GraphPad-Prism. E por fim, foi realizado a construção de gráficos utilizando a média de três experimentos independentes.

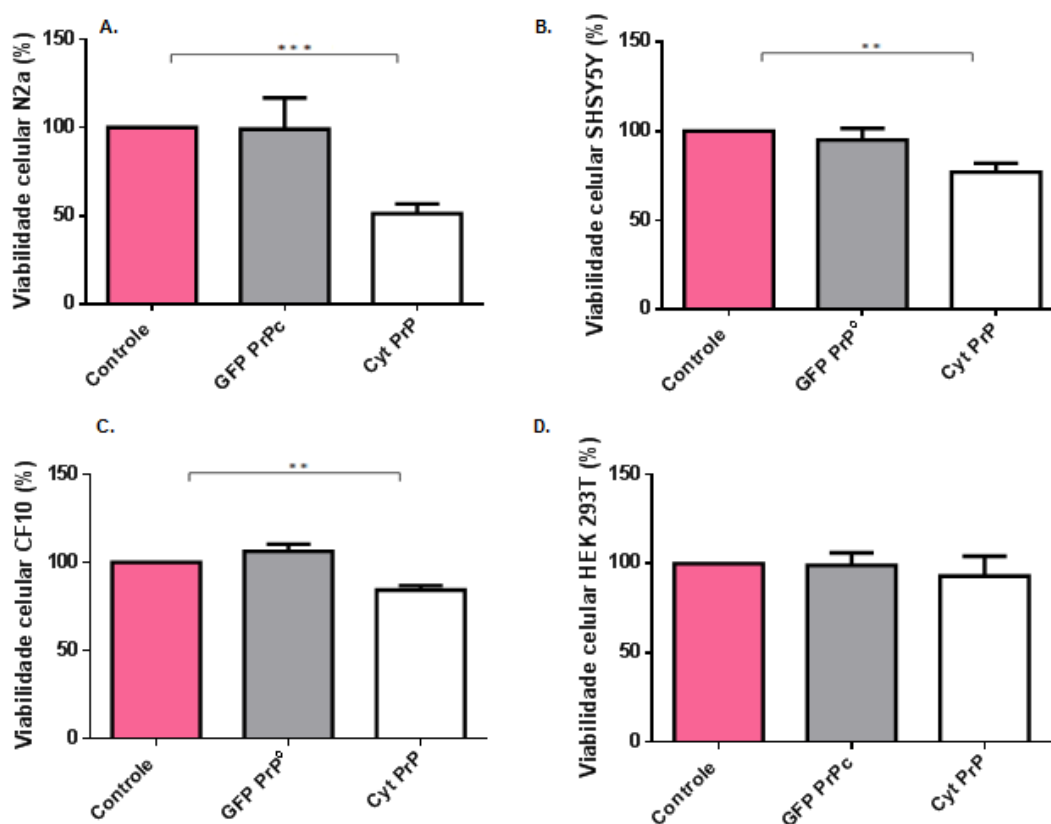
6 RESULTADOS

6.1 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR PELA TÉCNICA DE MTT

Uma vez que o presente estudo teve como objetivo analisar a possível toxicidade do CytPrP, foi realizado o ensaio de viabilidade celular. Após 24 horas de transfecção das linhagens celulares N2a, SH-SY5Y, CF10 e HEK293 com vetores capazes de expressar as proteínas GFP, GFP-PrP^C e GFP-CytPrP, prosseguiu-se com a técnica de MTT, para obtenção da viabilidade celular nas diferentes condições.

Nas linhagens neuronais N2a, SH-SY5Y e neural CF10 houve uma diminuição significativa da viabilidade celular de 48%, 23% e 14%, respectivamente, quando as células transfectadas com CytPrP são comparadas com o controle (plasmídeo capaz de expressar apenas GFP). Esses dados sugerem que o CytPrP apresenta um efeito neurotóxico nestas linhagens (FIGURA 7A, 7B E 7C). Entretanto, com relação a linhagem HEK293T, não houve uma diminuição significativa da viabilidade celular, indicando que CytPrP não é tóxico para essas células (FIGURA 7D).

FIGURA 7: PrP NO CITOSOL MOSTROU SER CITOTÓXICO EM LINHAGENS CELULARES NEURAIS.



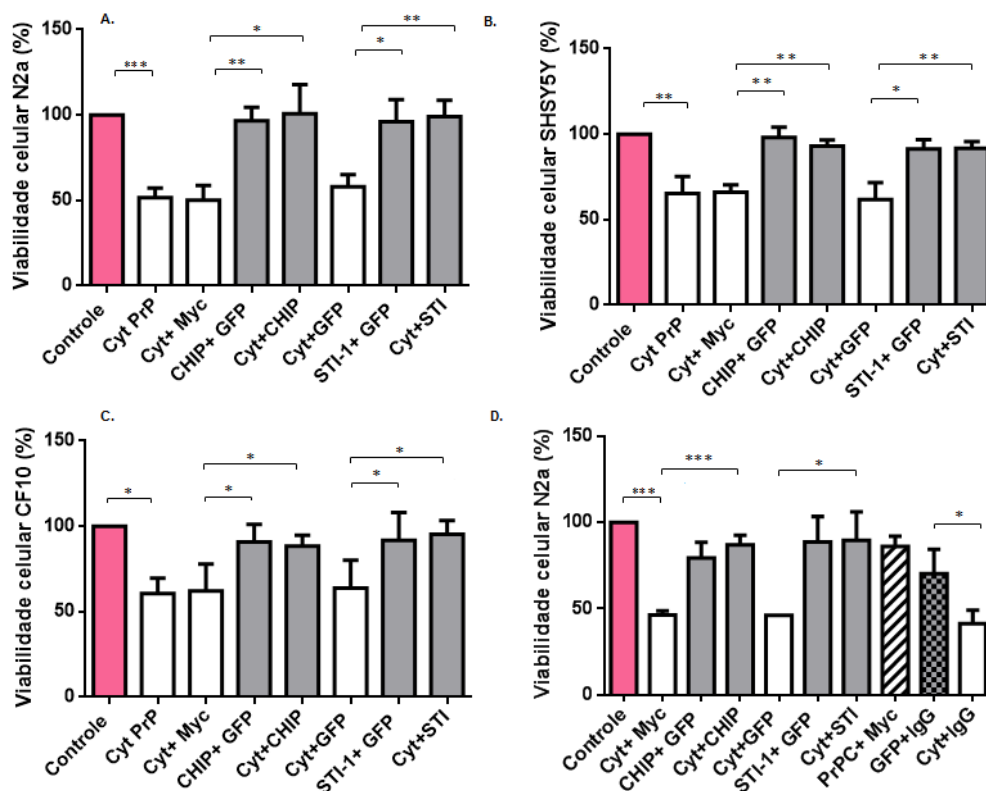
Nota: Viabilidade celular avaliada pela técnica de MTT. Células N2a (A), SHSY5Y (B), CF10 (C) foram transfectadas com os vetores capazes de expressar as proteínas GFP (Controle), GFP-PrP^c (GFP PrP^c) e GFP-CytPrP (Cyt). A viabilidade celular foi determinada 24 horas após a transfecção através do método MTT e estão expressas como valores percentuais referentes às células transfectadas com o vetor pEGFP (GFP). As médias foram obtidas a partir de 3 experimentos independentes; *** $p < 0,0001$; ** $p < 0,01$. FONTE: A AUTORA (2015).

Devido as linhagens N2a, SH-SY5Y e CF10 serem sensíveis aos efeitos neurotóxicos de CytPrP, estas células foram co-transfectadas com os vetores para expressão das duas co-chaperonas de interesse, CHIP e STI-1, além de CytPrP. Tanto CHIP quanto STI-1 foram capazes de reverter a neurotoxicidade mediada por CytPrP (FIGURA 8A,B e C).

Como controles, utilizaram-se células co-transfectadas com plasmídeos que expressavam CytPrP com os vetores vazios usados para clonar as sequências das duas co-chaperonas (FIGURA 8). Outro controle realizado foi a co-transfecção das células N2a com o vetor para expressão de CytPrP e um vetor, que não apresenta nenhum envolvimento com a proteína prion. Este plasmídeo foi o pcDNA-hIgG1-Fc2 (Invitrogen), capaz de produzir região Fc de IgG1 humana. Como pode ser visto na FIGURA 8D, a expressão desse domínio não é capaz de reverter o efeito tóxico de

CytPrP. Assim, CHIP e STI-1 parecem apresentar um efeito neuroprotetor específico.

FIGURA 8: REVERSÃO DA NEUROTOXICIDADE PELAS CO-CHAPERONAS CHIP E STI-1 PELO MÉTODO MTT.



Nota: Células N2a (A), SH-SY5Y (B) e CF10 (C) foram co-transfectadas, em combinações indicadas nos gráficos, com os vetores capazes de expressar as proteínas EGFP (Controle), myc-Stub1/CHIP (CHIP), GFP-STI1 (STI1), GFP-PrPC (PrPC) e GFP-CytPrP (Cyt) e vetores vazios (capazes de expressar apenas a etiqueta myc ou GFP) para normalizar a quantidade total de DNA transfectada. A viabilidade celular foi determinada 24 horas após a transfecção através do método MTT estão expressas como valores percentuais referentes às células transfectadas com o vetor pEGFP (GFP). (D) Células N2a foram co-transfectadas com o plasmídeo pcDNA-hlgG1-Fc2 (IgG), o qual é capaz de produzir o domínio Fc de IgG e com o vetor que expressa CytPrP, apresentam viabilidade celular reduzida, indicando que o efeito protetor observado para STI1 e CHIP parece ser específico. As médias foram obtidas a partir de 3 experimentos independentes; *** $p < 0,0001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. FONTE: A AUTORA (2015)

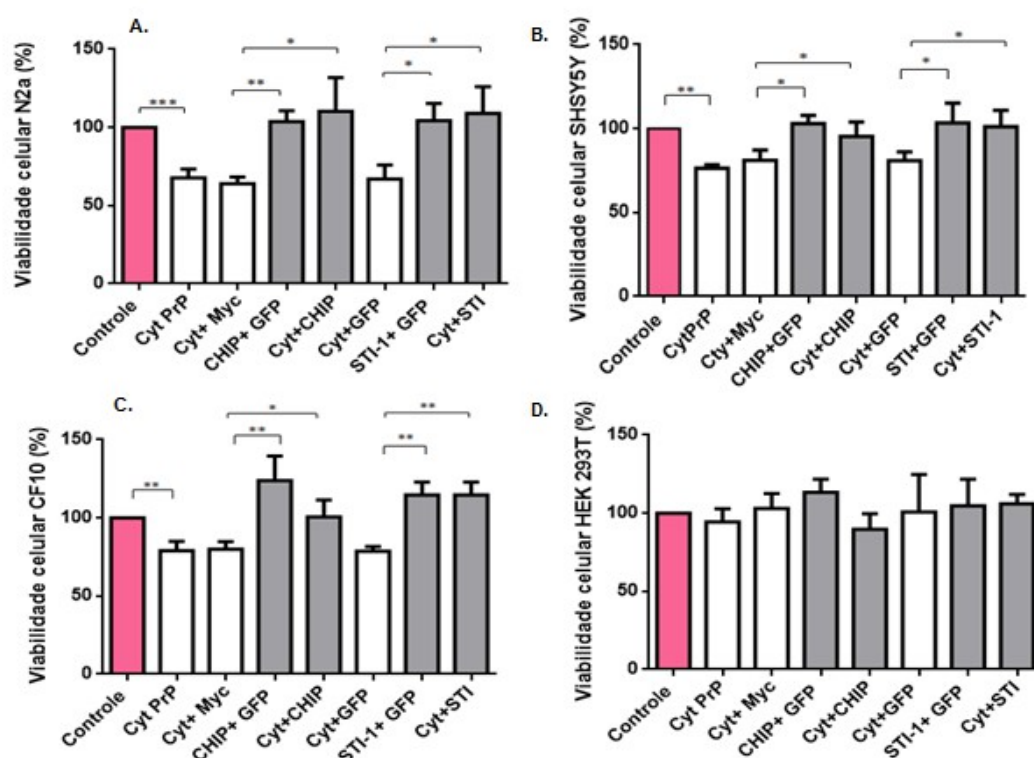
6.2 VIABILIDADE CELULAR PELO USO DO VERMELHO NEUTRO

Com o intuito de confirmar os resultados obtidos pelo método MTT, os ensaios de transfecção foram repetidos, porém a viabilidade celular foi avaliada pelo método do vermelho neutro.

A FIGURA 9 nos mostra o resultado de 3 experimentos independentes obtidos através do método do vermelho neutro.

Este resultado indicam que as linhagens neuronais (N2a,SH-SY5Y) e neural (CF10) obtiveram realmente uma diminuição significativa da viabilidade celular quando superexpressavam CytPrP comparado com o controle. E que o uso das duas co-chaperona, CHIP e STI-1, são capazes de reverter a neurotoxicidade mediada por CytPrP em todas linhagens neuronais utilizada no estudo. Novamente, o efeito tóxico de CytPrP não foi observado para a linhagem renal HEK 293T.

FIGURA 9: ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR ATRAVÉS DO MÉTODO DE VERMELHO NEUTRO



Nota: Células N2a (A), CF10 (B), SH-SY5Y (C) ou HEK293T (D) foram co-transfectadas com os vetores capazes de expressar as proteínas GFP (Controle), myc-Stub1/CHIP (CHIP), GFP-STI1 (STI1), GFP-PrP^C (PrP^C) e GFP-CytPrP (Cyt) e vetores vazios (capazes de expressar apenas a etiqueta myc ou GFP) para normalizar a quantidade total de DNA transfectada. Outros grupos de células foram co-transfectados com plasmídeos que expressam CytPrP e myc-Stub1/CHIP (Cyt+CHIP) ou CytPrP e GFP-STI1 (Cyt+STI1). A viabilidade celular foi determinada 24 horas após a transfecção através do método do vermelho neutro e estão expressas como valores percentuais referentes às células transfectadas com o vetor pEGFP (GFP). As médias foram obtidas a partir de 3 experimentos independentes; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. FONTE: A AUTORA (2016).

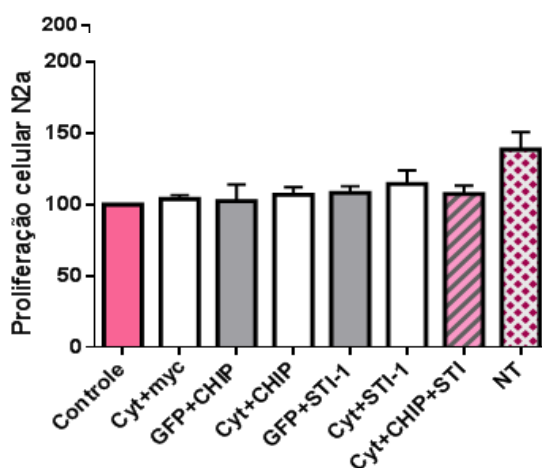
6.3 ENSAIO DE COLORAÇÃO POR CRISTAL VIOLETA

Com o objetivo de investigar se a reversão do efeito tóxico de CytPrP por CHIP e STI1 é devido ao aumento da proliferação celular, realizou-se o ensaio de

cristal violeta, o qual consiste na coloração dos ácidos nucleicos das células (KUENG *et al.*, 1989).

O resultado obtido na FIGURA 10 mostra que em todas as condições, após 24 horas de transfecção, há o mesmo número de células, indicando que a expressão das diferentes proteínas não altera a proliferação celular nesse tempo.

A FIGURA 10: A EXPRESSÃO DAS DIFERENTES PROTEÍNAS NÃO ALTERA O NÚMERO DE CÉLULAS.

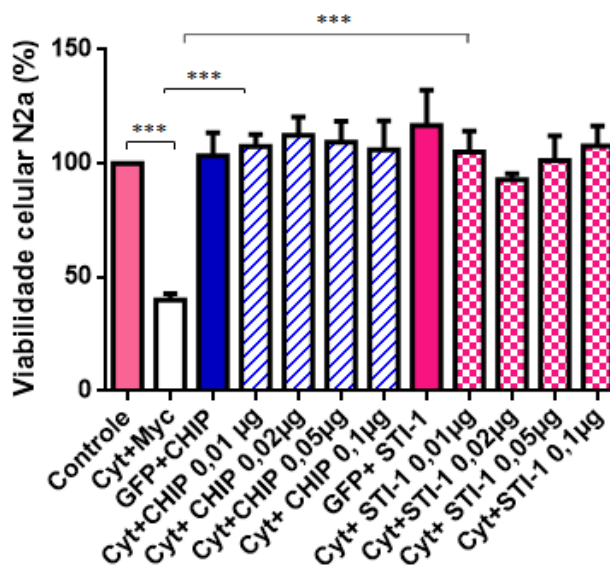


Nota: Células N2a foram transfectadas com as diferentes combinações de plasmídeos, capazes de expressar as proteínas de interesse, como indicado no gráfico. Após 24 horas, a quantidade de células foi determinada através da coloração pelo cristal violeta. Controle: células co-transfectadas com o vetor pEGFP vazio e pCDNA-myc vazio; NT: células não transfectadas..FONTE: A AUTORA (2017).

6.4 CURVA DOSE-RESPOSTA DAS CO- CHAPERONAS CHIP E STI-1

Quantidades crescentes dos vetores para a expressão de CHIP e STI-1 (0,01µg; 0,02 µg; 0,05µg e 0,1µg) foram usadas para a co-transfecção de células N2a com o vetor que expressa Cyt-PrP. É possível verificar que a reversão do efeito tóxico de Cyt-PrP já ocorre com a menor quantidade de vetor testada (FIGURA 11).

FIGURA 11: CURVA DOSE-RESPOSTA COM CHIP E STI1

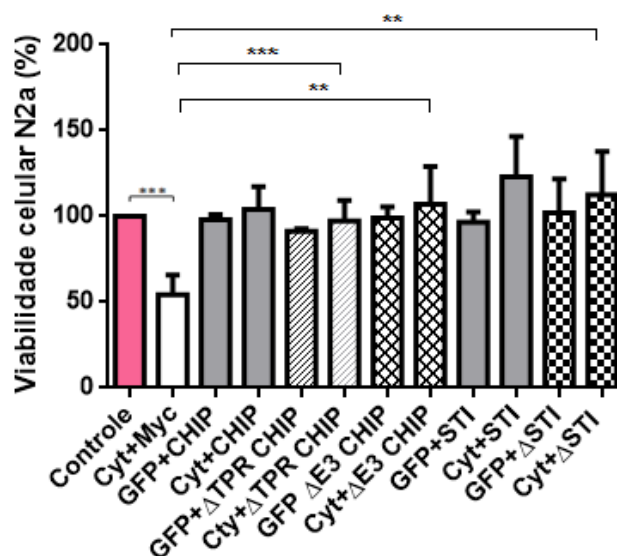


Nota: Células N2a foram transfectadas com quantidades crescentes de vetores (0,01µg; 0,02 µg; 0,05µg e 0,1µg) capazes de expressar CHIP ou STI1. Após 24 horas, a viabilidade celular foi analisada pelo método colorimétrico MTT. As médias foram obtidas a partir de 3 experimentos independentes; *** $p < 0,001$. FONTE: A AUTORA (2016).

6.5 VIABILIDADE CELULAR COM MUTANTES DE DELEÇÃO DE CHIP E DE STI-1

Com o intuito de determinar qual domínio de CHIP era responsável pela reversão do efeito neurotóxico mediado por CytPrP, células N2a foram transfectadas com vetores capazes de expressar essa co-chaperona sem o domínio U-box ($\Delta E3$), ou sem o domínio TPR (ΔTPR). Também foi utilizado um mutante de STI-1: foi usado um vetor que expressa STI-1 deletada (ΔTPR STI) para o domínio de ligação a PrP^C (resíduos deletados: 230-245) (ZANATA *et.al*, 2002). Como mostrado na FIGURA 12, todos os mutantes ainda foram capazes de reverter a neurotoxicidade produzida pela proteína prion citosólica.

FIGURA 12: OS MUTANTES DAS CO-CHAPERONAS CHIP E STI-1 FORAM CAPAZES DE REVERTER A NEUROTOXICIDADE DA CytPrP

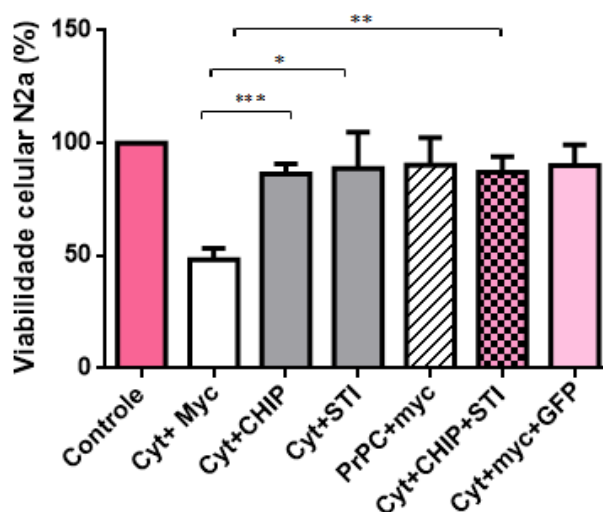


Nota: Células N2a foram co-transfectadas, nas combinações indicadas no gráfico, com os vetores capazes de expressar as proteínas GFP (Controle), myc-Stub1/CHIP (CHIP), GFP-STI1 (STI1), GFP-PrP^C (PrP^C) e GFP-CytPrP (Cyt) e vetores vazios (capazes de expressar apenas a etiqueta myc ou GFP) para normalizar a quantidade total de DNA transfectada. Utilizou-se também plasmídeos que expressam mutantes de deleção de CHIP ($\Delta E3$ e ΔTPR) e de STI-1 (ΔTPR STI). A viabilidade celular foi determinada 24 horas após a transfecção através do método MTT e estão expressas como valores percentuais referentes às células transfectadas com o vetor pEGFP (Controle). As médias foram obtidas a partir de 3 experimentos independentes; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. FONTE: A AUTORA (2016).

6.6 ANÁLISE DE UM POSSÍVEL SINERGISMO DE CHIP E STI-1

Como já demonstrado na FIGURA 8, as co-chaperonas CHIP e STI-1, envolvidas no controle de qualidade da proteína, protegem as células neuronais da morte mediada pela CytPrP. Para investigar o efeito da superexpressão combinada dessas duas proteínas, realizou-se um ensaio de viabilidade celular, após a co-transfecção das células N2a com os plasmídeos para expressão de CHIP e STI1. O resultado obtido (FIGURA 13), mostra que a expressão conjunta de CHIP e a STI-1 não apresenta um efeito sinérgico sobre a reversão da toxicidade de CytPrP.

FIGURA 13: AS CO-CHAPERONAS JUNTAS NÃO LEVAM A UMA MAIOR PROTEÇÃO NEURAL

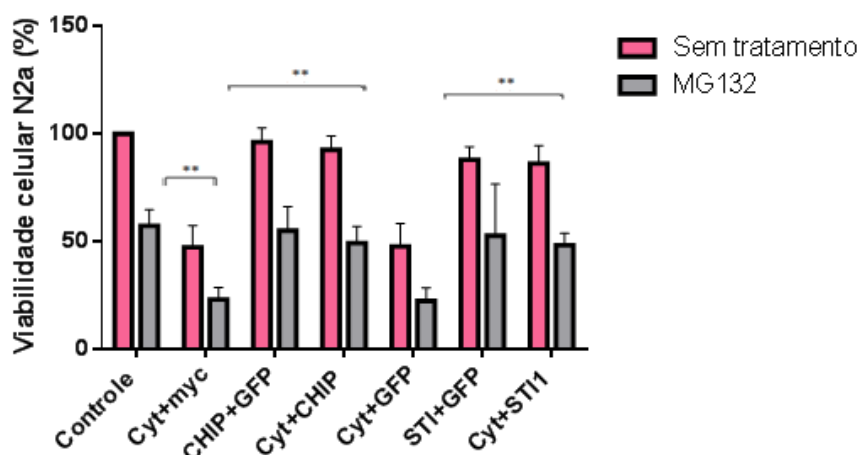


Nota: Células N2a foram transfectadas com as diferentes combinações de plasmídeos, capazes de expressar as proteínas de interesse, como indicado no gráfico. Após 24 horas, a viabilidade celular foi determinada através do método colorimétrico MTT. Controle: células co-transfectadas com o vetor pEGFP vazio e pCDNA-myc vazio. FONTE: A AUTORA (2017).

6.7 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR UTILIZANDO INIBIDOR DE PROTEASSOMA MG132

Pelo fato de CHIP ter atividade ubiquitina E3 ligase (BALLINGER *et al.*, 1999), levantou-se a hipótese de que o seu efeito protetor sobre a neurotoxicidade induzida por CytPrP poderia ser devido à degradação deste pela CHIP, através da via ubiquitina-proteossomo. Para testar essa hipótese, os ensaios de transfecção de células N2a foram repetidos com a adição do inibidor de proteossomo, MG132. A FIGURA 14 indica que MG132 diminuiu a viabilidade celular em todas as condições, entretanto CHIP e STI-1 ainda foram capazes de reverter o efeito neurotóxico de CytPrP mesmo na presença desse inibidor. Assim, pode-se supor que a via do efeito neurotóxico apresentado pela proteína prion citosólica e que o efeito neuroprotetor pelas co-chaperonas CHIP e STI-1, não estão relacionadas com a via de degradação de proteínas pelo proteossomo.

FIGURA 14: EFEITO NEUROTÓXICO DE CytPrP E NEUROPROTETOR DE CHIP E STI1 PARECEM NÃO SER INFLUENCIADAS PELA VIA PROTEASSOMO



Nota: Células N2a foram transfectadas com os vetores capazes de expressar as proteínas de interesse, como indicado no gráfico. Após 6h de transfecção, as células foram tratadas com 10µg de inibidor de proteossoma MG132 por 18h e a viabilidade celular foi determinada pelo método MTT. Análise estatística utilizando três experimentos independentes foram realizados em programa GraphPad Prisma. *** p< 0,001; **p<0,01; *p< 0,05. FONTE: A AUTORA (2017).

6.8 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR UTILIZANDO INIBIDOR DE LISOSSOMO

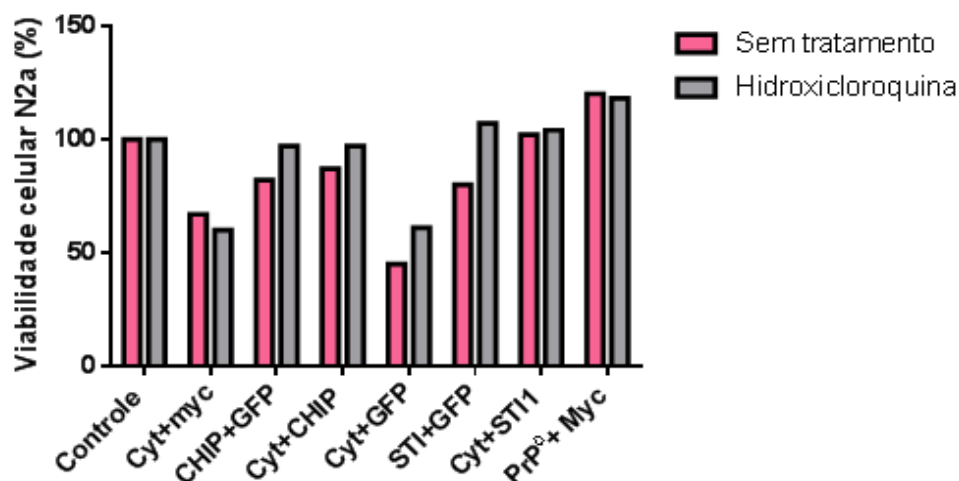
Visto que a hipótese do efeito protetor das co-chaperonas CHIP e STI-1 via proteossoma foi descartada, decidiu-se investigar se a via de autofagia poderia estar envolvida, já que a literatura indica que CHIP é capaz de induzir essa via (GOLDBERG, 2003; KOROLCHUK *et al.*, 2010). Investigou-se essa via também para a reversão do efeito tóxico por STI1, apesar de não haver nada a respeito sobre o envolvimento dessa proteína na autofagia. Para testar a participação dessa via, utilizou-se hidroxiquina, que inibe a autofagia aumentando o pH lisossômico levando à inibição tanto da fusão do autofagosoma com o lisossoma como da degradação da proteína lisossômica (HUI-CHUAN YU *et al.*, 2013).

Assim, após a transfecção das células N2a com os vetores de interesse, realizou-se a incubação de 25µM da hidroxiquina, para posterior análise da viabilidade celular pelo método colorimétrico MTT.

O resultado obtido, como mostra na FIGURA 15, indica que, CHIP e STI-1 continuaram a reverter o efeito neurotóxico de CytPrP, mesmo na presença do inibidor. Sugerindo que esta proteção não está associada com a via lisossomal. Esse ensaio precisa ser repetido outras vezes para ser passível de análise

estatística. Além disso, pela falta de um controle positivo, não é possível ter certeza que a inibição funcionou.

FIGURA 15 NEUROPROTEÇÃO DE CHIP E STI-1 PARECE NÃO ESTAR RELACIONADAS COM A VIA LISSOSSOMAL.



Nota.: A linhagem celular N2a foi transfectada com o vetor de expressão para Cyt-PrP e co-transfectada com vetores vazios ou contendo as sequências para expressão de CHIP ou STI1. Após 6 horas de transfecção, as células foram tratadas com 25 ug de inibidor de autofagossoma, hidroxycloroquina, e incubadas durante 16 horas. A viabilidade celular foi avaliada por ensaio MTT. FONTE: A AUTORA (2016).

7 DISCUSSÃO

7.1 EFEITO NEUROTÓXICO DE CytPrP POR DIFERENTES ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR

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). Há evidências de que a expressão inapropriada de PrP no citosol é tóxica, sobretudo para linhagens celulares de origem neuronal (MA *et al.*, 2002; RANE *et al.*, 2004; GRENIER *et al.*, 2006; RAMBOLD *et al.*, 2006). Condições como estresse de ER prolongado, inibição do proteassomo e a superexpressão de PrP citosólicos podem resultar na formação de agregados de PrP. Estes últimos apresentam algumas características similares à PrP^{Sc}, como insolubilidade parcial em detergentes e resistência à proteinase K (MA e LINDQUIST, 2002; YEDIDIA *et al.*, 2001). Os agregados de CytPrP diminuem a viabilidade celular e também aumentam a sensibilidade à apoptose induzida por *estaurosporina* (GRENIER *et al.*, 2006; MA e LINDQUIST, 2001). Camundongos transgênicos que apresentam expressão forçada de CytPrP desenvolvem neurodegeneração, com morte de neurônios cerebelares e gliose (MA *et al.*, 2002). Outros camundongos transgênicos capazes de expressar PrP com peptídeo sinal pouco eficiente para translocação ao ER, acumulam quantidades de CytPrP suficientes para causar neurodegeneração (RANE *et al.*, 2008). Assim, há vários dados na literatura que indicam que falhas no controle de qualidade de PrP^C e a geração de PrP no citosol podem contribuir para o desenvolvimento das doenças priônicas.

Outros estudos na literatura contradizem essa idéia de que CytPrP é neurotóxico (FIORITI *et al.*, 2005; CROZET *et al.*, 2006), e inclusive indicam que essas formas de PrP apresentam efeitos neuroprotetores (ROUCOU *et al.*, 2003; LIN *et al.*, 2008; RESTELLI *et al.*, 2010). É provável que determinadas células sejam susceptíveis à toxicidade mediada por CytPrP e outras não (RESTELLI *et al.*, 2010).

Os resultados do presente trabalho demonstraram uma redução de 30-50% na viabilidade celular das linhagens neuronais N2a, SH-SY5Y e neural CF10, quando essas foram transfectadas com um vetor para expressão de CytPrP. Entretanto, esta toxicidade não foi observada na linhagem renal HEK293T. Assim,

os dados obtidos estão de acordo com os achados de Ma *et al.* (2002), Roucou *et al.* (2003), e Restelli *et al.* (2010), os quais sugerem que o efeito tóxico causado pelo CytPrP somente é tóxico para determinadas linhagens celulares, principalmente neuronais. É importante mencionar que a maioria dos estudos detecta a toxicidade de CytPrP apenas após a inibição do proteossomo. Nos nossos experimentos, essa toxicidade foi observada mesmo na ausência desse inibidor (Figura 7). Uma provável explicação para essa diferença pode estar nas diferentes construções de vetores usadas. Por exemplo, Rambold e colaboradores (RAMBOLD *et al.*, 2006), transfectaram células SH-SY5Y com um vetor contendo a sequência para expressão de PrP no citosol sem o peptídeo sinal e também sem a sequência que é clivada para adição da âncora de GPI. Ou seja, a sequência usada por eles é capaz de expressar os resíduos 23-231 de PrP murino. O plasmídeo que usamos em nossas transfeções também não contém a sequência para o peptídeo sinal, porém apresenta os resíduos para o reconhecimento e inserção de GPI. Ou seja, o CytPrP dos nossos ensaios corresponde aos resíduos 23-254. Talvez, esses resíduos a mais possam ter influenciado nesse efeito neurotóxico maior obtido nos nossos resultados. Além disso, o CytPrP recombinante expresso nos nossos experimentos apresenta na sua região N-terminal a proteína GFP. É possível que GFP-CytPrP apresente uma conformação diferente de CytPrP, tornando-se mais citotóxico. Ou ainda, a fusão com GFP pode tornar a proteína mais estável, diminuindo sua degradação.

Os resultados de viabilidade celular ainda mostram que a presença de PrP^C endógeno não é necessária para a toxicidade mediada por CytPrP, já que as células CF10, provenientes de animais nocautes que não expressam PrP^C, também são sensíveis aos efeitos tóxicos observados.

7.2. REVERSÃO DO EFEITO TÓXICO POR CHIP E STI1

Como já mencionado, o objetivo desse trabalho foi motivado por resultados recentes do nosso grupo, que identificaram CHIP como uma proteína ligante de PrP^C (GIMENEZ *et al.*, 2015). Alguns estudos mostraram o envolvimento de Stub1/CHIP em doenças neurodegenerativas relacionadas ao mal dobramento de proteínas e formação de agregados, como Parkinson e Alzheimer (DICKY *et al.*, 2007). Como as doenças causadas por príons também são caracterizadas pelo dobramento

incorreto e agregação de proteínas, é lógico supor que PrP^C seja um substrato para Stub1/CHIP. Assim, é possível que a interação identificada entre PrP^C e CHIP possa ocorrer *in vivo* e modular a estabilidade de PrP^C. Interessantemente, CHIP é homóloga à proteína STI1. STI1 é um ligante conhecido de PrP^C (ZANATA *et al.*, 2002) e assim como Stub1/CHIP, é também uma co-chaperona que contém domínios TPR e interage com a região C-terminal de Hsp70 e Hsp90.

Alguns trabalhos têm demonstrado que STI1 e CHIP estão envolvidos juntos, modulando de maneira oposta, o equilíbrio entre o dobramento e a degradação de proteínas clientes de Hsp70/90 (KUNDRAT e REGAN, 2010; MULLER *et al.*, 2013; SEO, *et al.* 2016). Enquanto CHIP favorece a degradação de proteínas clientes das chaperonas, STI1 ajuda no dobramento e manutenção destas.

Sendo assim, utilizamos ambas co-chaperonas no presente estudo, com intuito de avaliar uma possível modulação do efeito tóxico de CytPrP. Nossos resultados mostram que as células co-transfectadas com os vetores para expressão das duas co-chaperonas de interesse, foram capazes de reverter a neurotoxicidade mediada por CytPrP. Podendo assim, estar de alguma forma, ainda não esclarecida, protegendo as linhagens celulares em questão. E que esta neuroproteção parece ser de modo específico, visto que com a expressão de outras proteínas não relacionadas (apenas GFP ou região Fc de IgG humana), não houve a reversão do efeito tóxico causado pelo CytPrP.

Pelo fato de CHIP ter atividade ubiquitina E3 ligase (BALLINGER *et al.*, 1999), levantou-se a hipótese de que o seu efeito protetor sobre a neurotoxicidade induzida por CytPrP, poderia ser devido a expressão aumentada dessa proteína nas células, levando a uma degradação via ubiquitina-proteossomo. Entretanto, como foi visto na Figura 14, mesmo com a inibição do proteossomo, CHIP continuou revertendo a toxicidade mediado por CytPrP. O mesmo ocorreu para STI1. Assim, esses dados sugerem que a via de degradação ubiquitina-proteossoma não está envolvida nessa proteção induzida por ambas co-chaperonas.

A literatura ainda evidência que CHIP pode participar no processo de autofagia (GOLDBERG, 2003; KOROLCHUK *et al.*, 2010). Investigou-se essa via também para a reversão do efeito tóxico por STI1, apesar de não ter sido descrito nenhum envolvimento dessa proteína nesta via. Para testar a participação da autofagia, utilizou-se hidroxicloroquina, um inibidor de autogafossoma. Os dados da Figura 15, mostraram que CHIP e STI-1 continuaram a reverter o efeito neurotóxico

de CytPrP, mesmo na presença do inibidor, sugerindo que esta proteção não está associada com a via lisossomal.

De acordo com Rambold e colaboradores (RAMBOLD *et al.*, 2006), a toxicidade de CytPrP envolve a ligação de PrP à proteína anti-apoptótica Bcl2, formando “co-agregados”, induzindo as células à apoptose. Quando as chaperonas Hsp70 e Hsp40 eram superexpressas, havia a redução dos co-agregados PrP/Bcl2 e redução da apoptose. Com esses dados, é possível que a neuroproteção observada em nossos resultados, possa ser atribuída a ação indireta de CHIP e STI-1 na via de morte pela apoptose. De fato, há vários dados na literatura que indicam uma função anti-apoptótica para CHIP (revisado em JOSHI *et al.*, 2016). Quanto à STI1, também há evidências de que essa proteína apresenta função neuroprotetora. Zanata e colaboradores (ZANATA *et al.*, 2002) mostraram que quando STI1 extracelular se liga ao PrP^C na membrana celular, sinais protetores são ativados, salvando as células da apoptose. Entretanto, o possível efeito anti-apoptótico verificado em nossos resultados de viabilidade celular, mostraram que a ligação de STI-1 à CytPrP não é necessária, já que a expressão de um mutante de ST1 sem o domínio de ligação à PrP^C é capaz de reverter a toxicidade de CytPrP. Assim, é possível que STI-1 module indiretamente esse efeito de CytPrP. Ainda, pode-se especular que o sítio de ligação de STI-1 à CytPrP seja diferente do que foi determinado para PrP^C, o que poderia explicar o resultado obtido com o mutante de STI1 utilizado.

Quanto aos mutantes de deleção de CHIP, os resultados obtidos revelaram que ambos os domínios funcionais, TRP e U-Box, revertem o efeito tóxico de CytPrP. O exato mecanismo de como isso ocorre ainda precisa ser explicado. É possível, por exemplo, que esses domínios isolados consigam, de alguma forma, se associar a CHIP endógena presente nas células e promover a neuroproteção.

O fato de CHIP e STI1 também terem função de co-chaperona (ROSSER, 2007; LIMA *et al.*, 2007; ZANATA, 2002; HAJJ *et al.*, 2013) gera a hipótese de que essas proteínas, quando superexpressas, podem ajudar no dobramento correto de CytPrP, impedindo a formação de agregados tóxicos. Essa possibilidade está sendo investigada em nosso grupo.

8 CONCLUSÃO

- Com este projeto mostramos, por diferentes ensaios de viabilidade celular, que todas as linhagens neurais utilizadas no projeto (N2a, SH-SY5Y e CF10) sofreram um efeito neurotóxico quando foi superexpressa com PrP citosólica. Não sendo observado tal efeito na linhagem renal como a HEK 293T.
- Nossos dados indicam que a superexpressão das co-chaperonas CHIP/Stub1 e STI-1 foi capaz de reverter o efeito neurotóxico produzido por CytPrP. Essa reversão não é dependente da via de degradação ubiquitina-proteassomo e nem da via de degradação por lisossomos. É provável que CHIP e STI-1 estejam atuando por ação indireta sob a via de morte por apoptose, e assim protegendo a célula da toxicidade de CytPrP.

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. **J. Cell Biol**, v. 281, n. 36, p. 26714–26724, 2006.

AGUZZI, A.; NUVOLONE, M., ZHU, C. The immunobiology of prion diseases. **Nature**, v.13, p. 888-902, 2013.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Encefalopatia espongiforme transmissível**: caderno técnico. -1. ed.- Brasília, 2004.

BABICH, H.; BORENFREUND, E. Cytotoxicity of T-2 toxin and its metabolites determined with the neutral red cell viability assay. **Appl Environ Microbiol**, v. 57, p. 2101-2103, 1991.

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. **J. Cell. Biol.**, 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, p. 149-156, 1992.

BANKS, J.C.; JOSHI, A.; MICHOEL, T. Functional transcription factor target discovery via compendia of binding and expression profiles. **Scientific Reports**, v.6, p. 20649, 2016.

BIASINI, E., TURNBAUGH, J.A, UNTERBERGER, U., HARRIS, D.A. Prion protein at the crossroads of physiology and disease. **Trends Neuro. sci**, v. 35, p. 92-103, 2012.

BLATCH, G.L.; LASSLE, M..The tetratricopeptide repeat : a structural motif mediating protein-protein interactions. **Bioessays**, v.21, p. 932-939, 1999.

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

BORCHELT, D.R. Scrapie and cellular prion proteins differ in their kinetics of synthesis and topology in cultured cells. **J. Cell Biol**, v. 110, p. 743-752, 1990.

BOUNHAR, Y., ZHANG, Y., GOODYER, C.G, LEBLANC A. Prion protein protects human neurons against Bax-mediated apoptosis. **J Biol Chem**, v. 42, p. 39145-39149, 2001.

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. 3307-3316, 2002.

BROWN, D.R. Prion and prejudice: normal protein and the synapse. **Trends Neurosci**, 2001.

BUELER, 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, p. 577–582, 1992.

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.

BUELER, 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, p. 577–582, 1992.

CAMPANA, V.; SARNATARO, D.; ZURZOLO, C. The highways and by ways of prion protein trafficking. **Trends Cell Biol**, v. 15, p. 102-111, 2005.

CAUGHEY, B. Prion protein biosynthesis in scrapie- infected and uninfected neuroblastoma cells. **J. Virol**, v. 63, p. 175-181, 1989.

CAUGHEY, B.; CHESEBRO, B. Prion Protein and the transmissible spongiform encephalopathies. **Trends Cell. Biol**, v. 7, p. 56-62, 1997.

CAMPANA, V.; SARNATARO, D.; ZURZOLO, C. The highways and by ways of prion protein trafficking. **Trends Cell Biol**, v. 15, p. 102-111, 2005.

CAUGHEY, B. Prion protein biosynthesis in scrapie- infected and uninfected neuroblastoma cells. **J. Virol**, v. 63, p. 175-181, 1989.

CAUGHEY, B.; CHESEBRO, B. Prion Protein and the transmissible spongiform encephalopathies. **Trends Cell. Biol**, v. 7, p. 56-62, 1997.

CHAKRABARTI, O.; ASHOK, A.; HEGDE, R.S. Prion protein biosynthesis and its emerging role in neurodegeneration. **Trend Biochem Sci**, v. 34, n. 6, p. 287-295, 2009.

CHENG, E.H; KIRSCH, D.G; CLEM, R.J; RAVI, R.; KASTAN, M.B.; BEDI, A.; UENO, K.; HARDWICK, J.M. Conversion of Bcl-2 to a bax like death effector by caspases. **Science**, v. 278, p. 1966-1968, 1997.

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.

CHOI, C.J.; KANTHASAMY, A.; ANANTHARAM, V.; KANTHASAMY, A.G. Interaction of metals with prion protein: possible role of divalent cations in the pathogenesis of prion diseases. **Neurotoxicology**, 2006.

CLEM, R.J.; CHENG, E.H.; KARP, C.L.; KIRSCH, D.G.; UENO, K.; TAKAHASHI, A.; KASTAN, M.B.; GRIFFIN, D.E.; EARNSHAW, W.C.; VELIUONA, M.A.; HARDWICK, J.M.. Modulation of cell death by Bcl-XL through caspase interaction. **Proc Natl Acad Sci**, v. 95, p. 554-559, 1998.

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, R.M. **Imunolocalização da proteína Príon celular(PrP^c) na retina humana**. 77f. Tese (Doutorado) , Universidade de Ribeirão Preto, São Paulo, 2007.

CROZET, C.; VEZILIER, J.; DELFIEU, V.; NISHIMURA, T.; ONODERA, T.; CASANOVA, D.; LEHMANN, S.; BERANGER, F.; The truncated 23–230 form of the prion protein localizes to the nuclei of inducible cell lines independently of its nuclear localization signals and is not cytotoxic. **Mol Cell Neurosci.**, v. 32, p. 315–323, 2006

CUNNINGHAM, A. A.; WELLS, G. A. H.; SCOTT, A. C.; KIRKWOOD, J. K. and BARNETT, J. E. F. Transmissible spongiform encephalopathy in greater kudu (*Tragelaphus strepsiceros*). **Vet. Rec.**, v. 132, p. 68, 1993.

DeARMOND, S. J. and PRUSINER, S. B. Etiology and pathogenesis of prion diseases. **Am. J. Path.**, v. 146, p. 785-811, 1995.

DENNY, G. O.; WILESMITH, J. W.; CLEMENTS, R. A. and HUESTON, W. D. Bovine spongiform encephalopathy in Northern Ireland: epidemiological observations 1988-1990. **Vet. Rec.**, v. 130, p. 113-116, 1992.

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

DING, X.;GOLDBERG,M.S.Regulation of LRRK2 stability by the E3 ubiquitin ligase CHIP. **PLoS One**, v. 4, p. 5949, 2009.

DRISALDI, B.; STEWART, R.S.; ADLES, C.; STEWART, L.R.; QUAGLIO, E.; BIASINI, F. L.; CHIESA, R.; HARRIS, D.A. Mutant PrP is delayed in its exit from the endoplasmic reticulum, but neither wild-type nor mutant PrP undergoes retrotranslocation prior to proteasomal degradation. **J.Biol. Chem**, v. 278, p. 21732–21743, 2003.

FIORITI, L.; QUAGLIO, E.; MASSIGNAN, T.; COLOMBO, L.; STEWART, R. S.; SALMONA, M.; HARRIS, D. A.; FORLONI, G.; AND CHIESA, R. Cytosolic Prion Protein (PrP) is not toxic in N2a cells and primary neurons expressing pathogenic mutations. **Mol. Cell Neurosci**, v. 28, p.165–176, 2005.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J.A. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicol Lett**, v. 2, p. 171-177, 2006.

FRASER, H.; PEARSON, G. R.; McCONNELL, I.; BRUCE, M. E.; WYATT, J. M. and GRUFFYDDJONES, T. J. 1994. Transmission of feline spongiform encephalopathy to mice. **Vet. Rec.**, v. 134, p. 449, 1994.

GAJDUSEK, D.C.; GIBBS, C,J; JR.; AND ALPERS, M. Experimental transmission of a Kuru like syndrome to chimpanzees. **Nature.**, v. 209, p. 794-796, 1996.

GARCIA, M.; STTIL, M. **Encefalopatia Espongiforme Bovina**. Disponível em :<http://www.mgar.com.br/zoonoses/aulas/aula_bse.htm> <Acessado em 20/03/2015>.

GIMENÉZ, A.L.**Identificação e caracterização de interações realizadas pela proteína príon celular no sistema olfatório**. 87f . Dissertação (Mestrado) -Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

GOLDBERG, A.L.Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. **Nature**, v. 426,p. 895–899, 2003.

GREIL, C.S.; VORBERG, I.M.; WARD, A.E.; MEADE-WHITE, K.D.; HARRIS, D.A.; PRIOLA, S.A. Acute cellular uptake of abnormal prion protein is cell type and scrapie strain independent. **Virology**, v. 379, p. 284–293, 2008.

GRENIER, C.; BISSONNETTE, C.; VOLKOV, L.; ROUCOU, X. Molecular morphology and toxicity of cytoplasmic prion protein aggregates in neuronal and non-neuronal cells. **J Neuro Chem**, v. 97, p. 1456–1466, 2006.

GUO, N; PENG, Z. MG132, a proteasomw inhibitor, induces apoptosis in tumor cells. **Asia- Pacific Journal of clinical Oncology**, v. 9, n. 1, p.6-11, 2012

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. 1915-1926, 2007.

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.

HARDY, J.; SELKOE, D.J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. **Science**, v. 297, p. 353–356, 2002.

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

HEBERT, D.; MOLINARI, M. In and out of the ER: protein folding, quality control, degradation, and related human diseases. **Physiol. Rev.** 87, p. 1377–1408, 2007.

HEGDE ,R.S.; VOIGT, S.; LINGAPPA, V.R. Regulation of protein topology by trans-acting factors at the endoplasmic reticulum. **Mol Cell** ,v. 2, p. 85–91, 1998.

HEGDE, R.S.; RANE, N.R. Prion protein trafficking and the development of neurodegeneration. **Trends Neuro Sci**, v. 26, p. 337–339, 2003.

HELLER, U.; WINKLHOFER, K.F.; HESKE, J.; REINTJES, A.; TATZELT, J. Post-translational import of the prion protein into the endoplasmic reticulum interferes with cell viability: a critical role for the putative transmembrane domain. **J Biol Chem.**, v. 278,p. 36139–36147, 2003.

HORIUCHI, M.; YAMAZAKI, N.; IKEDA, T.; ISHIGURO, N.; SHINAGAWA, M. A cellular form of prion protein (PrPC) exists in many non-neuronal tissues of sheep, v.76, p. 2583-2587, 1995.

HUI-CHUAN YU, CHEN-SI LIN, WEI-TIEN TAI, CHUN-YU LIU ,CHUNG-WAI SHIAU, and KUEN-FENG CHEN. Nilotinib Induces Autophagy in Hepatocellular Carcinoma through AMPK Activation. **J Biol Chem.** , v. 288, n. 25, p. 18249 –18259, 2013.

JOHNSON, R.T. Prion diseases. **Lancet Neurol**, 2005.

JOSHI, V.; AMANULLAH, A.; UPADHYAY, A.; MISHRA, R.; KUMAR, A. MISHRA, A. A Decade of Boon or Burden: What Has the CHIP Ever Done for Cellular Protein Quality Control Mechanism Implicated in Neurodegeneration and Aging?. **Mol. Cell. Neurobiol.**, v.9, p. 93-112, 2016.

KELLER, J. N., GEE, J., AND DING, Q. The proteasome in brain aging. **Ageing Res. Rev.**1, p. 279–293, 2002.

KIENG, W., SILBER, E., EPPENBERGER, Y. Quantification of cells cultures on 96-well plates. **Anal Biochem**, 1989.

KIRKWOOD, J.K.; WELLS, G.A.; WILESMITH, J.W.; CUNNINGHAM, A.A.; JACKSON, S.I. Spongiform encephalopathy in an arabian oryx (*Oryx leucoryx*) and a greater kudu (*Tragelaphus strepsiceros*). **Vet Rec**, v. 17, p. 418–420, 1990.

KOROLCHUK, V.I., MENZIES, F.M., and RUBINSZTEIN, D.C.Mechanisms of cross-talk between the ubiquitin-proteasome and autophagy lysosome systems. **FEBS Lett**, v. 584, p. 1393–1398, 2010

KUENG, W.; SILBER, E.; EPPENBERGER, U. Quantification of cells cultured on 96-well plates. **Anal. Biochem.**, v. 182, p. 16-19, 1989.

KUMAR, P., PRADHAN, K., KARUNYA, R., AMBASTA, R. K., QUERFURTH, H. W.

Cross-functional E3 ligases Parkin and C-terminus Hsp70- interacting protein in neurodegenerative disorders. **J. Neurochem**, v. 120, p. 350–370, 2012.

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.

LASSLE, M.; BLATCH, G.L.; KUNDRA, V.; TAKATORI, T.; ZETTER, B.R. Stress-inducible, murine protein mSTI1. Characterization of binding domains for heat shock proteins and *in vitro* phosphorylation by different kinases. **J. Biol. Chem**, v. 272, p. 1876–1884, 1997.

LEBLANC, A. In Handbook of the aging brain. **Academic Press**. p. 201-221, 1998.

LEMAIRE, V.; KOEHL, M.; LE MOAL, M.; ABROUS, D.N. Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus. **Proc Natl Acad Sci**, v. 97, p. 11032–11037, 2000.

LEUCHT, C.; SIMONEAU, S. The 37 kDa/67 kDa laminin receptor is required for PrP^{Sc} propagation in scrapie-infected neuronal cells. **EMBO J. Rep**, v. 4, n. 3, p. 290-295, 2003.

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 Neuro. Chem**, v. 103, n. 6, p. 2164-2176, 2007.

LINDEN, R. Doenças por príons. *Ciência Hoje*, v. 33, n. 194, p. 18-25, 2003.

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.

LIU, Y.; PENNINGER, J.; KARIN, M. Immunity by ubiquitylation: a reversible process of modification. **Nature reviews Immunology**, v. 5, p. 941–952, 2005.

LLEDO, PIERRE. História das Vacas Loucas. **Instituto Piaget**, 2002.

MA, J.; LINDQUIST, S. Wild-type PrP and a mutant associated with prion disease are subject to retrograde transport and proteasome degradation. **Proc Natl Acad Sci**, p. 14955–14960, 2001.

MA, J., LINDQUIST, S. Conversion of PrP to a self-perpetuating PrP^{Sc}-like conformation in the cytosol. **Science**, p. 1785–1788, 2002

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

MACHADO, C.F. **Estudo funcional de mutantes da proteína prion celular associados as doenças por prions**. 130f . Tese (Doutorado) - Fundação Antônio Prudente. São Paulo, 2011.

MARTIN, M. P.; PILEGGI, R. A quantitative analysis of propolis: a promising new storage media following avulsion. **Dental Traumatology**, v. 20, n. 2, p. 85-89, 2004.

MARTINS, V.R; GRANER E,GARCIA, J., MERCADANTE, A. F, VEIGA, S.S.; ZANATA, S.M.; NETO, V.M.; BRENTANI, R.R. Complementary hydrophathy identifies a cellular prion protein receptor. **Nature Med.**, v.3, p. 1376-1382, 1997.

MARTINS, V.R.; LINDEN, R.; PRADO, M.A.; WALZ, R.; SAKAMOTO, A.C.; IZQUIERDO, I. Cellular prion protein: on the road for functions. **FEBS Lett**, 2002.

MENDONÇA, I.C. **Uso terapêutico de chaperones em doenças conformacionais**. 61f. Dissertação (Mestrado) - Setor de Ciências da saúde. Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2003.

MEYER, R.K.; MCKINLEY, M.P.; BOWMAN, K.A. Scrapie prion proteins. **Proc Natl. Acad. Sci.**, v. 83, n. April, p. 2310- 2314, 1986.

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

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

MINDE, D. P.; ANVARIAN, Z.; RÜDIGER, S.G.D.; MAURICE, M.M.Desordem: Como é que mutações missense na liderança supressor de tumor APC proteína para o câncer?". **Câncer Molecular**, v. 10, p. 101, 2011.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol Meth**, v. 16, p. 55-63, 1983.

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.

OESCH, B.; WESTAWAY, D.; WALCHLI, M.; MCKINLEY, M.P.; KENT, S.B.; AEBERSOLD, R.; BARRY, R.A; TEMPST, P.; TEPLow, D.B.; HOOD, L.E.. A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. **Cell**, v.40, p. 735- 746, 1985.

ORSI, A.; SITIA, R. Interplays between covalent modifications in the endoplasmic reticulum increase conformational diversity in nascent prion protein. **Prion**, v 1, p.236-242, 2007.

PAITEL, E.; ALVES, C.; VILETTE, D.; GRASSI, J.; CHECLER, F. Overexpression of PrPc triggers caspase 3 activation: potentiation by proteasome inhibitors and blockade by anti-PrP antibodies. **J Neurochem**, v. 83, p. 1208–1214, 2002

PAITEL, E.; FAHRAEUS, R.; CHECLER, F. Cellular prion protein sensitizes neurons to apoptotic stimuli through Mdm2-regulated and p53-dependent caspase 3-like activation. **J Biol Chem**, v. 278, p. 10061–10066, 2003.

PAUL, I.; GHOSH, M.K. The E3 ligase CHIP: Insights into its structure and regulation. **Biomed Res. Intern.**, v.10, p. 12, 2014.

PEARSON, G. R.; WYATT, J. M.; GRUFFYDD-JONES, T. J.; HOPE, J.; CHONG, A.; HIGGINS, R. J.; SCOTT, A. C. and WELLS, G. A. H. Feline spongiform encephalopathy: fibril and PrP studies. **Vet. Rec.**, v. 131, p. 307-310, 1992.

PINHEIRO, T.J. The role of rafts in the fibrillization and aggregation of prions. **Chem Phys Lipids**, p.141, p. 66-71, 2006.

PENG, Y.R.; HE, S.; MARIE, H.; ZENG, S.Y.; MA, J.; TAN, Z.J.; LEE, S.Y.; MALENKA, R.C.; YU, X. Coordinated changes in dendritic arborization and synaptic strength during neural circuit development. **Neuron**, v. 61, p. 71–84, 2009.

PICCARDO, P.; LIEPNIEKS, J.J.; WILLIAM, A. Prion proteins with different conformations accumulate in Gerstmann- StrausslerScheinker disease caused by A117V and F198S mutations. **J Pathol**, v. 158, p. 2201-2207, 2001.

PRUSINER, S. B.; BOLTON, D. C.; GROTH, D. F.; BOWMAN, K. A.; COCHRAN, S. P.; MCKINLEY, M. P. **Biochemistry**. Further purification and characterization of scrape prion, v. 21, p. 6942–6950, 1982.

PRUSINER, S.B. Molecular Biology of prion diseases. **Science**, v.252, p. 1515-1522, 1991.

PRUSINER, S.B. Molecular biology and pathogenesis of prion diseases. **Trends Biochem. Sci.**, v. 21 p. 482-487, 1996.

PRUSINER, S.B. The prion diseases. **Brain Pathol**, v. 8, p. 499-513, 1998.

PUSTIGLIONE, M.; TAMASAUSKAS, C. Doenças causadas por príons e provável nexos ocupacionais. *Revista Brasileira Med. Trab*, São Paulo, v. 12, n. 2, p. 96-99, 2014.

RANE, N.S., YONKOVICH, J.L., AND HEGDE, R.S. Protection from cytosolic prion protein toxicity by modulation of protein translocation. **EMBO J.**, v. 23, p. 4550–4559, 2004.

RAMBOLD, A.S; MIESBAUER, M.; RAPAPORT *et al.*. Association of Bcl-2 with misfolded prion protein is linked to the toxic potential of cytosolic PrP. **Mol Biol Cell**, v. 17, p. 3356-3368, 2006.

RAPOPORT, T.A.; JUNGnickel, B.; KUTAY, U. Protein transport across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial inner membranes. **J. Biol. Chem.**, v. 65, p. 271–303, 1996.

RESELLI, E.; FIORITI, L.; MANTOVANI, S.; AIRAGHI, S.; FORLONI, G.; CHIESA, R. Cell type-specific neuroprotective activity of untranslocated prion protein. **PLoSOne**, v. 5, n. 10, p. 13725, 2010.

RICHTER, L.M. **Caracterização do papel de Stub1/CHIP no controle da estabilidade da proteína prion celular**. 94f. Dissertação (Mestrado) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015

RIDLEY, M. **Genoma**. Editora Record, 1ª ed, p. 398, 2001.

RISS, T.L.; MORAVEC, R.A. Use of multiple assay endpoints to investigate the effects of incubation time, dose of toxin, and plating density in cell-based cytotoxicity assays. **Assay Drug Dev Technol**, v. 2, p. 51–62, 2004.

ROUCOU, X.; GUO, Q.; ZHANG, Y.; GOODYER, C.G.; LEBLANC, A.C. Cytosolic prion protein is not toxic and protects against Bax-mediated cell death in human primary neurons. **J. Biol. Chem**, v. 278, p. 40877–40881, 2003.

ROSSER, M.F.N.; WASHBURN, E.; MUCHOWSKI, P.J.; PATTERSON, C.; CYR, D.M. Chaperone functions of the E3 ubiquitin ligase CHIP. **J. Biol. Chem.** v. 282, p. 22267–22277, 2007.

RUTKOWSKI, D.T.; LINGAPPA, V.R.; HEGDE, R.S. Substrate-specific regulation of the ribosome-translocon junction by N-terminal signal sequences. **Proc Natl Acad Sci**, v. 98, p. 7823–7828, 2001.

SAA, P.; CASTILLA, J.; SOTO, C. Presymptomatic detection of prions in blood. **Science**, v. 313, p. 92-94, 2006.

SCHEUFLER, C. BRINKER, A.;BOURENKOV, G.;PEGORARO, S.; MORODER, L.; BARTUNIK, H.; HARTL, F.U; MOAREFI, I. Structure of TPR domain-peptide complexes: Critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. **Cell**. v, 101, p. 199-210, 2000.

SEO, J.H *et al.* ARD-1 mediated Hsp70 acetylation balances stress-induced protein refolding and degradation. **Nature commun.**, v. 7, p. 12882, 2016.

SONG, Y., MASISON, D.C.. Independent regulation of Hsp70 and Hsp90 chaperones by Hsp70/Hsp90-organizing protein Sti1 (Hop1). **J Biol Chem**, v. 280, p. 34178-34185, 2005.

STAHL N, PRUSINER, SB. Prions and prion proteins. **Faseb J.**, v.13; p. 2799- 2807, 1991.

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 Clin. Oncol**, v. 140, n. 2, p. 189-97, 2014.

SWIETNICKI, W., PETERSEN, R., GAMBETTI, P., AND SUREWICZ, W. K. pH-dependent stability and conformation of the recombinant human prion protein PrP. **J Biol.Chem**, v. 272, p. 27517–27520, 1997.

THACKRAY, A.M.; ZHANG, C.; ARNDT, T.; BUJDOSO, R. Cytosolic PrP Can Participate in Prion-Mediated Toxicity, **J. Virol.**, v. 89, 2015.

TABRIZI, S. J. Creutzfeldt-Jakob disease in a young woman. **Lancet**, v. 347, p. 945-948, 1996

TAKEICHI, M. The cadherin superfamily in neuronal connections and interactions. **Nat Rev Neuro sci**, v. 8, p. 11-20, 2007.

TARABOULOS, A.; JENDROSKA, K.; SERBAN, D.; TARABOULOS, A.; JENDROSKA, K.; SERBAN, D.; YANG, S.L.; DEARMOND, S.J.; PRUSINER, S.B. Regional mapping of prion proteins in brain. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89, p. 7620-7624, 1992.

THOMPSON, H.N. **Mudanças estruturais na proteína príon celular induzidas por pH baixo**. 46f. Trabalho de Graduação (Bacharelado em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

VAN DER SPUY J., KANA B.D, DIRR H.W., BLATCH G.L. Heat shock cognate protein 70 chaperone- binding site in the co-chaperone murine stress-inducible protein 1 maps to within three consecutive tetratricopeptide repeat motifs. **J Biol Chem** , v. 345, p. 645-651, 2000.

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

WADSWORTH, J.D; HILL, A.F, BECK; J.A; COLLINGE, J.. Molecular and clinical classification of human prion disease. **Br Med Bull**, v. 66 p. 241-254, 2003.

WELLS, G.A.; WILESMITH, J.W. Bovine spongiform encephalopathy and related diseases. *Prion Biology and Diseases*. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 2 ed, p. 595-628, 2004.

WILL, R. G.; IRONSIDE, J. W.; ZEIDLER, M., COUSENS, S. N.; ESTIBEIRO, K.; ALPEROVITCHI, A.; POSER, S.; POCCHIARI, M.; HOFMAN, A. and SMITH, P. G. A new variant of Creutzfeld-Jakob disease in the UK. **Lancet**, v. 347, p. 921-925, 1996.

WALUM, E.; STRENBORG, K.; JENSSEN, D. Understanding cell toxicology: principles and practice. NewYork: **Ellis Howood**, p. 97-111, 1990.

WILESMITH, J.W.; RYAN, J.B.; HUESTON, W.D.; HOINVILLE, L.J. Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological features 1985 to 1990. **Veterinary Record**, v. 5, p. 90–94, 1992

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

YOUNG, J.C; AGASHE V.R; SIEGERS K.; HARTL F.U. Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. **Nature**, v. 5, p. 781-791, 2004.

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. 3307-3316, 2002.

ZHAI, R.G.; VARDINON, F. H.; CASES, L. C.; BECKER, B.; GUNDELFINGER, E.D.; ZIV, N.E.; GARNER, C.C. Assembling the presynaptic active zone: a characterization of an active one precursor vesicle. **Neuron**, v. 29, p. 131-143, 2001.

ZOU, W. Q., AND CASHMAN, N. R. Acidic pH and detergents enhance in vitro conversion of human brain PrP^c to a PrP^{sc}-like form. **J.Biol.Chem**, v. 277,p. 43942–43947, 2002.

ZHANG, J.; KE, WANG; YAN, GUO; QI, SHI; CHAN; TIAN, CAO; CHEN, CHEN; GAO, BAO-YUN, ZHANG AND XIAO-PING, DON. Heat shock protein 70 selectively mediates the degradation of cytosolic PrPs and restores the cytosolic PrP-induced cytotoxicity via a molecular interaction. **J. Virol.**, v.9, p. 303, 2012.