

Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Graduação em Ciências Biológicas

Investigação sobre a participação de três tipos de  
chaperonas na conversão da proteína celular  
PrPc em prion patogênico

**Trabalho realizado para a  
disciplina Biologia Molecular,  
ministrada pelos professores  
Santuza Teixeira e José Miguel  
Ortega; apresentado pelos  
alunos: André Jardim, Laila de  
Oliveira, Luciana de Assis,  
Mayara Pizarro, Patricia Lanza  
e Paula Campos.**

## SUMÁRIO

RESUMO.....	3
INTRODUÇÃO.....	3
OBJETIVO GERAL E OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	7
JUSTIFICATIVA.....	7
MATERIAIS E MÉTODOS.....	8
ORÇAMENTO.....	11
CRONOGRAMA.....	12
RESULTADOS ESPERADOS.....	13
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	13

## **RESUMO**

Encefalopatias espongiformes transmissíveis (TSEs) são infecciosas desordens letais do sistema nervoso de mamíferos. As TSEs são provocadas pela conversão de uma proteína celular PrP<sup>c</sup> a uma proteína patogênica PrP<sup>sc</sup>. PrP<sup>c</sup> é sensível a protease, monomérica, solúvel em detergente e predomina alfa-hélice em sua estrutura secundária; PrP<sup>sc</sup> é resistente a protease, insolúvel em detergente e rica em beta-pregas. A “protein only hypothesis” postula que PrP<sup>sc</sup> é o agente infeccioso de TSEs que converte diretamente PrP<sup>c</sup> em PrP<sup>sc</sup>, prejudicando neurônios e criando novos agentes de infecção. Pouco se sabe sobre este processo de conversão, por isso testaremos a habilidade de algumas proteínas chaperonas em afetar a conversão de PrP<sup>c</sup> ao seu estado resistente a protease, PrP<sup>sc</sup>. Sabe-se que as chaperonas supervisionam a transição conformacional de proteínas de diversas formas, podendo, assim, estar envolvidas na transição conformacional de PrP<sup>c</sup>. Nosso objetivo é descobrir se a conversão de PrP<sup>c</sup> a PrP<sup>sc</sup> persistirá na ausência das chaperonas HSP70, HSP90 e STI1. Este estudo providenciará nova intuição da natureza de conversão de PrP e um novo conjunto de ferramentas para estudar processos envolvidos nas patologias TSE.

## **INTRODUÇÃO**

O príon é uma das moléculas mais excêntricas já estudadas pela ciência. Com 209 aminoácidos, a proteína está normalmente presente na membrana de neurônios, onde desempenham funções ainda pouco conhecidas. Muito mais enigmáticas, porém, são as suas formas patogênicas, causadoras de doenças animais e humanas raras e invariavelmente fatais. As mais populares são a encefalopatia espongiforme bovina (doença da vaca louca), e sua variante humana, contraída pelo consumo de carne contaminada e que já fez quase 200 vítimas. As doenças priônicas humanas incluem kuru, doença de Creutzfeldt-

Jakob (DCJ), nova variante da doença de Creutzfeldt-Jakob (nvDCJ), doença de Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome (GSS), e insônia familiar fatal (IFF).

O termo prion, do inglês “proteinaceous infectious particle” (partícula proteinácea infecciosa) foi criado pelo neurologista americano Stanley Prusiner, da Universidade da Califórnia, em São Francisco, para designar o agente causador de um grupo de patologias conhecidas como encefalopatias espongiformes transmissíveis. O conceito das doenças priônicas pressupõe a existência de doenças infecciosas produzidas por agentes desprovidos de ácidos nucléicos, conhecida como a “protein-only hypothesis”, abrindo um novo capítulo para a biologia molecular (Prusiner, 1996).

Conforme propôs o neurologista americano Stanley Prusiner, os prions são moléculas puramente protéicas capazes de infectar seres vivos e se auto-replicar em seu interior. Prusiner concluiu que este agente etiológico era diferente dos demais agentes infecciosos (fungos, bactérias e vírus) ao perceber que a propagação das doenças em cirurgias ocorria mesmo com a utilização de métodos comuns de assepsia sobre os instrumentos, embora fosse interrompida quando se utilizavam métodos de desnaturação ou degradação protéica, sugerindo que o agente transmissor seria constituído basicamente por proteína. Outra importante observação que também ajudou a fundamentar a “protein-only hypothesis” foi a de que, quando expostos à radiação ultravioleta (que normalmente destrói ácidos nucléicos), os extratos com poder infeccioso estudados não perdiam esta capacidade.

Sabe-se hoje que um gene denominado “prnp”, localizado no braço curto do cromossomo 20 humano, codifica uma proteína denominada PrPc, que está presente em diversos tipos celulares, sendo encontrado principalmente nas células nervosas. A constituição básica da PrPc é representada por uma região amino-terminal desordenada e uma região globular carboxi-terminal. Esta proteína é peça fundamental na emissão de neuritos (neuritogênese), que participam da comunicação entre células nervosas, além de conferir proteção e de participar dos

mecanismos de diferenciação neuronal (Collinge et al., 1994). Sabe-se também que a PrPc está relacionada com a manutenção da concentração intracelular adequada de íons  $\text{Cu}^{2+}$  através de região ligante pertencente à extremidade amino-terminal; com o transporte ou metabolismo de zinco; com a proteção ao estresse oxidativo e com a apoptose celular, de acordo com o tipo celular em que se encontra.

As duas isoformas de PrP apresentam a mesma seqüência primária e as mesmas modificações pós-traducionais, sendo que a conversão de PrPc para PrPsc representa uma alteração exclusivamente conformacional (revisto por Prusiner, 1998; Harris, 1999). Na proteína PrPc há um predomínio da estrutura secundária alpha-hélice (42%) em relação às folhas-beta (3%). Já na PrPsc há um predomínio da folha-beta (43-54% ) em relação a alpha-hélice (17-30%) (Pan et al., 1992).

As PrPsc podem ser adquiridas por contágio ou emergir de uma mutação. Estas proteínas infecciosas ao entrarem em contato com uma PrPc presente em outras células, fazem com que a proteína normal se torne defeituosa (Saborio et al., 2001). Acredita-se que uma família de proteínas chamadas chaperonas, que atuam como auxiliares no enovelamento das proteínas normalmente sintetizadas pela célula, participe dessa conversão e de alguma forma confira estabilidade termodinâmica ao príon patogênico, porém pouco se conhece sobre o mecanismo que articula esse tipo de ação. Por isso, pesquisas que possam elucidar os mecanismos de supressão da formação de prions são de suma importância. Porém, esses mecanismos de supressão só poderão ser desenvolvidos quando todo o processo de conversão da proteína PrPc em PrPsc (prion) for completamente compreendido.

Um agravante desse processo é que não se conhece até hoje nenhum mecanismo de defesa imunológica capaz de eliminá-los do organismo e nenhuma droga que combata a ação dos prions. Isso sinaliza a importância do estudo do papel das chaperonas na formação de prions, tendo em vista que estas unidades

patogênicas são resultantes de um enovelamento errado. As chaperonas são nomeadas com a sigla Hsp, do inglês, *heat shock proteins*, por serem super expressadas em condições de aumento de temperatura, condição que favorece o enovelamento incorreto de proteínas. As chaperonas são identificadas principalmente por seu peso molecular aproximado, dado na unidade quilodalton (kDa): HSP40, HSP70, HSP90, etc. Hoje já se sabe da capacidade de associação dos monômeros de chaperonas (chaperoninas) HSP60 e BiP com a PrPc. Porém, pouco se sabe sobre os mecanismos dessas interações e a relevância biológica das chaperonas na formação de prions patogênicos, sendo necessário estudos mais esclarecedores.

As proteínas HSP70 e HSP90, primeiramente descritas como proteínas de choque térmico, atuam como chaperonas moleculares *in vivo*, reconhecendo e estabilizando intermediários durante o dobramento, montagem e desmontagem de proteínas. A proteína HSP70 além de se ligar a polipeptídeos recém sintetizados no citoplasma e a proteínas desnaturadas *in vitro*, também atua, através da hidrólise de ATP, na remoção da cobertura de vesículas recobertas por clatrina (Gao et al., 1991). Sabe-se que a HSP90 está envolvida no processo de ativação de tradição de moléculas, como kinases, fatores de transcrição, entre outras (Picard et. al., 2002; Young et. al., 2001; Richter et. al., 2001; Panaretou et. al., 1998). Por outro lado, a proteína HSP90 é, possivelmente, a proteína constitutivamente expressada mais abundante no citoplasma de eucariotos. A interação mais estudada da HSP90 é com o receptor inativo de hormônios esteróides. Esta e outras associações de HSP90 aparentam ter como principal característica a estabilização de proteínas marcadas em um estado inativo, parcialmente dobradas ou desmontadas.

Pesquisas têm demonstrado ainda que proteínas ST11 de diversas espécies formam complexos com as proteínas de estresse HSP70 e HSP90 (Van Der Spuy et al., 2000; Van Der Spuy et al., 2001). Discute-se diferentes sítios de ligação desta proteína com HSP70 e HSP90 usando peptídeos representativos de diferentes regiões da molécula de ST11 de camundongos, demonstrando-se que a

proteína de choque térmico HSP70 somente se liga à região N-terminal de STI1, enquanto que na região C-terminal há apenas a ligação de HSP90. Esta interação STI1-HSP70 e STI1-HSP90 permite a associação íntima entre HSP70 e HSP90, sendo mediada por módulos de interação proteína-proteína constituídos de motivos repetidos de tetratricopeptídeos (TRP) (Van Der Spuy et al., 2001), os quais acredita-se serem importantes na formação de complexos macromoleculares. É possível que este complexo possa participar no transporte de uma série de proteínas através do citoplasma, ou, como já mencionado anteriormente, atuar como um complexo chaperonina, podendo assim mudar a conformação de PrPc em PrPsc.

## **OBJETIVO GERAL**

Verificar se as proteínas chaperonas HSP70, HSP90 e STI1, auxiliares no enovelamento das proteínas normalmente sintetizadas pelas células, participam na conversão da proteína PrPc em PrPsc (príon patogênico) e se a sua ausência na célula impossibilita esta conversão.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Verificar se a célula se multiplica normalmente na ausência das chaperonas HSP70, HSP90 e STI1, tanto unicamente quanto aos pares.
2. Analisar a quantidade de príons patogênicos nas células através da técnica de Western Blot e comparar esses valores entre as diferentes inibições de chaperonas.
3. Descobrir se a conversão de PrPc em PrPsc é inibida na ausência única ou aos pares de alguma dessas chaperonas.
4. Determinação de quais chaperonas participam na conversão da PrPc em PrPsc.

## **JUSTIFICATIVA**

O maior entendimento de como ocorre o processo de infecção por príons e a conversão de PrPc celulares em príons patogênicos é indispensável para o desenvolvimento de drogas capazes de interferir na evolução da doença. O estudo da participação das chaperonas nesse processo de conversão é muito promissor, já que se sabe do auxílio dessas proteínas no enovelamento de outras proteínas e que a mudança de configuração espacial é justamente o que transforma uma proteína PrPc celular em um príon patogênico.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### *1. Cultura de células neuronais:*

Células SN56 serão gentilmente doadas pelo Dr. Marco Antônio Máximo Prado, Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Essas células são derivadas da fusão de neurônios do septo com células de neuroblastoma da linhagem N18TG2 (Barbosa et al, 1999). Todas as células serão mantidas em DMEM (Invitrogen) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de penicilina/estreptomicina e 1mM de glutamina a 37°C em atmosfera umedecida com 5% de CO<sub>2</sub>. As células SN56 serão repicadas na proporção 1:10 a cada 4 dias.

A cultura será dividida em 8 grupos:

- 1- Células sem inibição da expressão de chaperonas.
- 2- Células com inibição da expressão das chaperonas HSP70.
- 3- Células com inibição da expressão das chaperonas HSP90.
- 4- Células com inibição da expressão das chaperonas STI1.
- 5- Células com inibição da expressão das chaperonas HSP70 e HSP90.
- 6- Células com inibição da expressão das chaperonas HSP70 e STI1.
- 7- Células com inibição da expressão das chaperonas HSP90 e STI1.



8- Células com inibição da expressão das chaperonas HSP70, HSP90 e STI1.

A inibição da expressão das chaperonas ocorrerá com a utilização de RNAs de interferência. Cada um desses grupos conterá seis placas Delta T, sendo que três de cada grupo terão suas células infectadas com o príon “scrapie” PrPsc. O príon PrPsc será obtido pela conversão in vitro do príon celular segundo Peter Lansbury e Byron Caughey. O príon celular será doado também pelo Dr. Marco Antônio Máximo Prado, Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais.

## *2. Inibição da expressão gênica por siRNA:*

2.1. Serão encomendados três RNA's de interferência para silenciar os genes das chaperonas HSP70, HSP90 E STI1. Estes serão silenciados individualmente em diferentes placas de cultura, bem como em combinações diferentes destes genes, de modo a verificar a ação independente e em conjunto das chaperonas na conversão dos prions celulares a patogênicos. Após purificação do produto, os siRNA's serão transfectados para as células em cultura.

2.2. Para inserir o RNA de interferência nas células da cultura, será utilizado o kit de transfecção METAFECTENE®PRO, conforme protocolo do produto.

## *3. Quantificação do número de príons patogênicos nas culturas de células neuronais através de Western Blot:*

3.1. Para extração da proteína, as células neuronais serão coletadas dos recipientes de cultura, lavadas duas vezes com PBS e lisadas em tampão de lise com inibidores de protease. Este lisado será então centrifugado. O sobrenadante será retirado e será feita uma dosagem de proteínas. A esta mesma solução protéica será adicionado tampão de amostra.

3.2. As amostras de proteínas retiradas de cada meio de cultura serão separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 12%.

3.3. Após a migração as proteínas PrPsc serão imobilizadas em membranas de nitrocelulose. Será feito o bloqueio das membranas com solução de TBS-tween contendo leite desnatado liofilizado. Logo em seguida, as membranas serão incubadas com anticorpos primário anti-PrPsc, diluídos em tampão de bloqueio. Após lavagens com TBS-tween, as membranas serão incubadas com anticorpo secundário, que emite luz capaz de ser captada pela máquina reveladora (Storm - Amersham-Pharmacia) após reagir com a solução reveladora de ECL.

Os anticorpos anti-PrPsc serão cedidos gentilmente pelo Dr. Marco Antônio Máximo Prado do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais e a técnica de Western Blot será realizada no mesmo departamento.

Essa técnica nos permitirá quantificar os prions patogênicos (PrPsc) em cada cultura de células. Os dados obtidos serão comparados com a quantidade de prions patogênicos usada previamente para contaminar as células das culturas e, assim, poderemos tirar conclusões sobre a interferência ou não das chaperonas HSP70, HSP90 e STI1 no processo de infecção por prions.

#### *4. Protocolo de biossegurança:*

Todas as técnicas envolvendo células ou material contaminado com PrPsc serão realizadas dentro de fluxo laminar. Todo o descarte líquido proveniente de cultivo de células, Western Blots e outros serão misturados a LpH (Steris Corp., St. Louis, Mo) e posteriormente descartado como lixo comum. Todo o descarte sólido (ponteiras, garrafas e placas de cultura, tubos, géis e etc) será colocado em garrafas contendo LpH e separado para ser autoclavado e posteriormente incinerado.

Os experimentos serão realizados no laboratório do Dr. Marco Antônio Máximo Prado, Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Os materiais de consumo como micropipetas e ponteiras serão cedidos pelo laboratório. A estufa utilizada para o crescimento das culturas celulares também será emprestada para a realização dos testes.

## **ORÇAMENTO**

### *1. Cultura de células:*

- Garrafas 75cm<sup>2</sup> (100unidades): R\$783,00
- Placa de cultura celular (caixa com 240 placas): R\$201,60
- DEMEM (2 litros): U\$18,52
- Soro fetal bovino (500ml): U\$289,44
- Antibiótico penicilina/streptomocina (100ml): U\$15,41

### *2. Técnica de RNAi:*

- Mix do vetor pGB HSP70 siRNA (20µg): U\$495,00
- Mix do vetor pGB HSP90 siRNA (20µg): U\$495,00
- Mix do vetor pGB STI1 siRNA (20µg): U\$495,00
- Kit de transfecção METAFECTENE®PRO (1mL): €185,00

### *3. Western Blot:*

- Acrilamida (1Kg): U\$227,50
- Tris ultra pure grade (1Kg): U\$59,42
- TMED (50mL): U\$31,46
- SDS (1Kg): U\$167,84
- Persulfato de amônio (100g): U\$42,57
- Membrana de nitrocelulose (0,45 micrometro): U\$352,00
- Kit ECL plus western blotting: U\$590,58

*Total:* R\$6.865,85 (Cotações: Dólar/Real: 1,65. Euro/Real: 2,54).

## CRONOGRAMA

	Ago/08	Set/08	Out/08	Nov/08	Dez/08	Jan/09	Fev/09
Compra das células neuronais	X						
Cultivo das células		X	X	X			
Culturas prontas de células neuronais					X		
Compra dos RNAi						X	
Inoculação dos RNAi nas culturas de células							X

	Mar/09	Abr/09	Mai/09	Jun/09	Jul/09
Contaminação das culturas celulares com prion patogênico	X				
Compra de anticorpos específicos para PrPc e PrPsc		X			
Western Blot com cada uma das culturas celulares			X	X	X

## RESULTADOS ESPERADOS

Espera-se que a inativação da expressão do gene de alguma das chaperonas em estudo, sozinhas ou nas combinações propostas, resulte em nenhum ou pequeno aumento no número de prions patogênicos inoculados. Caso alcancemos este resultado, teremos um forte indicativo de que as chaperonas estudadas têm participação essencial na conversão dos prions celulares a prions patogênicos. Isso abrirá espaço para novos estudos que levem ao desenvolvimento de técnicas ou drogas que atuem de forma contrária a esta conversão.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Barbosa J Jr, Massensini AR, Santos MS, Meireles SI, Gomez RS, Gomez MV, Romano-Silva MA, Prado VF, Prado MA (1999) Expression of the vesicular acetylcholine transporter, proteins involved in exocytosis, and functional calcium signaling in varicosities and soma of a murine septal cell line. *J Neurochem.* 73(5):1881-93.

Collinge J, Clarke AR. A general model of prion strains and their pathogenicity. *Science* 2007; 318: 930-6

Gao, B.; Biosca, J.; Craig, E. A.; Greene, L.E.; Eisenberg, E. Uncoating of coated vesicles by yeast hsp70 proteins. *Journal Biol Chem*, v.76, p. 85-92, 2000.

Gattás VL *et al* New variant of Creutzfeldt-Jacob (nvD-CJ) disease and other human prion diseases under epidemiological surveillance in Brazil. *Dementia & Neuropsychologia*.

Martins V *et al*. Complementary hydrophathy identifies a cellular prion protein receptor. *Nature Medicine* 1997; 3: 1376-82.

Martins *et al.* Prion diseases are under compulsory notification in Brazil: surveillance of evaluated by biochemical and/or genetic markers from 2005 to 2007. *Dementia & Neuropsychologia*.

Pan, K.M.; Stahl, N.; Prisner, S.B. Purification and properties of cellular prion protein from Syrian hamster brain. *Protein Sci.* v.1, p. 1343-52, 1992.

Panaretou, B., Prodromou, C., Roe, S. M., O'Brien, R., Ladbury, J. E., Piper, P. W., and Pearl, L. H. *EMBO J.* 17, 4829-4836, 1998.

Picard, D. *Cell. Mol. Life Sci.* 59, 1640-1648, 2002.

Prusiner, S. B. Molecular biology and pathogenesis of prion diseases *Trends Biochemical Science* 21(12), 482-487, 1996.

Richter, K., and Buchner, J. *J. Cell. Physiol.* 188, 281-290, 2001.

Romano-Silva MA, Prado VF, Prado MA. Expression of the vesicular acetylcholine transporter, proteins involved in exocytosis, and functional calcium signaling in varicosities and soma of a murine septal cell line. *J Neurochem.* 73(5):1881-93, 1999.

Saborio, G. P., Permanne, B. & Soto, C. Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature.* 411, 810-813, 2001.

Van Der Spuy, J. ; Kana, B.D.; Dirr, H.W.; Blatch, G. L Heat Shock protein 70 chaperone-binding site in the co-chaperone murine stress-inducible protein 1 maps to within three consecutive tetratricopeptide repeat motifs. *Biochem. J.*, v. 345, p. 645-651, 2000.

Van Der Spuy, J. ; Kana, B.D.; Dirr, H.W.; Blatch, G. L The chaperone murine stress-inducible protein 1: overexpression, purification, and characterization. *Protein Expression and Purification*, v.21, p. 462-469, 2001.

Young, J. C., Moarefi, I., and Hartl, F. U. *J. Cell Biol.* 154, 267-273, 2001.