

2. Ciências Biológicas - 2.06.01 - Morfologia / Citologia e Biologia Celular

PAPEL DA COCHAPERONA STI1 NA AUTORRENOVAÇÃO E PLURIPOTÊNCIA DE CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS MURINAS

Maria Clara da Silva Souza^{1*}, Camila Felix de Lima Fernandes², Samuel Ribeiro Soares³, João Pedro Alves de Araújo⁴, Marilene Hohmuth Lopes⁵

1. Estudante do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo (IB-USP)
2. Doutoranda do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (ICB-USP)
3. Estudante do ICB-USP
4. Estudante do Centro Universitário da Fundação de Ensino Octávio Bastos (UNIFEOB)
5. Professora Associada e pesquisadora do ICB-USP - Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento /Orientadora

Resumo

A proteína *Stress Inducible Protein 1* (STI1) é uma cochaperona, que atua na formação de um complexo com as chaperonas de choque-térmico HSP70-HSP90, auxiliando na manutenção da homeostase proteica. A depleção total dessa proteína leva à morte precoce de embriões de camundongo, sugerindo sua importância no desenvolvimento embrionário inicial. Para estudar essa fase do desenvolvimento *in vitro*, células-tronco embrionárias murinas (CTEm), células pluripotentes com capacidade de autorrenovação, correspondem a um modelo bem estabelecido. Sendo assim, CTEm expressando diferentes níveis de STI1 foram utilizadas com o objetivo de investigar a função dessa proteína no desenvolvimento embrionário inicial, através do estudo das suas funções na manutenção da pluripotência, autorrenovação e diferenciação celular, aspectos que precisam ser melhor elucidados para o potencial uso de CTEm em pesquisas científicas para futuras terapias celulares.

Palavras-chave: Desenvolvimento embrionário inicial; proliferação; viabilidade.

Apoio financeiro: FAPESP

Trabalho selecionado para a JNIC: Pró-Reitoria de Pesquisa da USP

Introdução

Stress Inducible Protein 1 (STI1) é uma proteína expressa constitutivamente, desde estágios iniciais do desenvolvimento embrionário (HAJJ et al., 2009), atuando principalmente como cochaperona na formação de um complexo entre as proteínas de choque-térmico HSP70 e HSP90, auxiliando na homeostase proteica (LEE et al, 2012). Porém, estudos apontam que a STI1 está envolvida em uma série de outros processos relevantes para a célula (DA FONSECA et al, 2020), sugerindo outras funções importantes e pouco exploradas dessa proteína.

De fato, a importância da STI1 no processo de desenvolvimento foi evidenciada em experimentos realizados com camundongos *knockout*, os quais se mostraram inviáveis, havendo degeneração precoce do embrião antes do décimo dia de vida intrauterina (BERALDO et al, 2013). Apesar do fenótipo de inviabilidade observado, os mecanismos que levam a degeneração precoce dos embriões não foram totalmente elucidados. O papel crucial da STI1 no desenvolvimento está evidente no fenótipo, mas as bases moleculares envolvidas nesse processo ainda precisam ser descobertas.

Um dos principais modelos de estudo utilizados para reproduzir *in vitro* o desenvolvimento embrionário inicial de mamíferos são as células-tronco embrionárias murinas (CTEm), células pluripotentes capazes de autorrenovação (DOGAN, 2018). Interessantemente, a capacidade dessas células de se replicarem indefinidamente sem senescência requer um aumento em proteínas chaperonas e cochaperonas, como a STI1 (SARETZKI et al, 2004).

Dada à importância da STI1 no desenvolvimento embrionário de camundongos, o principal objetivo do trabalho é analisar a função dessa proteína na manutenção da pluripotência, proliferação e diferenciação de CTEm com expressão diferencial dessa proteína, consequentemente entendendo melhor a função da STI1 no desenvolvimento de mamíferos. Compreender melhor a biologia de CTEm, como suas taxas de proliferação e autorrenovação, é muito importante para elucidar aspectos associados à pluripotência que são ainda pouco conhecidos. Elucidar os mecanismos básicos que regulam características-chaves de CTEm poderá ampliar a nossa capacidade de utilização dessas células como modelo de estudo em pesquisas científicas para futuras terapias celulares.

Metodologia

Diferentes linhagens de CTE_m foram previamente derivadas de camundongos transgênicos (obtidos comercialmente). Essas células expressam níveis regulares de STI1 (tipo-selvagem ou STI1-WT), possuem expressão aumentada de STI1 (STI1-OE), ou expressam níveis reduzidos de uma forma truncada da proteína (STI1-Δ). Especificamente, cultivamos triplicatas biológicas de cada um dos *backgrounds* genéticos de acordo com metodologias pré-estabelecidas de cultura de CTE_m, acrescentando os fatores *Leukemia inhibitory factor* (LIF), *Glycogen synthase kinase 3* (GSK3) e *mitogen-activated protein kinase* (MEK) -2iL, que atuam sobre vias relacionadas à diferenciação e autorrenovação de CTEs.

Para investigar a proliferação, utilizamos as abordagens de curva de crescimento e quantificação de células positivas para KI67 (marcador de proliferação). Brevemente, nos ensaios de curva de crescimento, 1×10^4 células foram semeadas em duplicatas técnicas e contadas 24h, 48h, e 72h após semeadura. No processamento de imagens de imunofluorescência, colônias de CTE_m - previamente marcadas com DAPI (núcleos totais) e KI67 (células em todas as fases do ciclo celular, exceto G0) - foram fotografadas em microscópio confocal e analisadas usando o *software* ImageJ (NIH). Nessa análise foi quantificada a porcentagem de núcleos KI67 positivos em relação aos núcleos totais. Entre 10 e 50 colônias foram analisadas em triplicatas biológicas, e os experimentos foram realizados com amostrador cego aos *backgrounds* genéticos das células. De maneira semelhante ao descrito para a quantificação de KI67, também avaliamos Caspase-3 clivada (CC3, marcador de apoptose) e histona H2AX fosforilada (pH2AX, indicador de danos a dupla-fita do DNA).

Para a detecção da expressão de STI1 e demais genes de interesse utilizamos a técnica de RT-qPCR. Em síntese, 2μg de RNA foram extraídos da cultura das CTE_m e subsequentemente submetidos a reação de transcriptase reversa para obtenção de cDNA. Aproximadamente 10ng de cDNA foi utilizado nas reações, contendo SYBR Select Master Mix (ThermoFisher) e *primers* específicos para cada gene (previamente validados). As reações foram realizadas no equipamento StepOnePlus (ThermoFisher), e a expressão gênica relativa foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, utilizando TBP ou GAPDH (também previamente validados) como genes de referências para a normalização dos dados.

Nos ensaios de formação de corpos embrióides (EBs) utilizamos aproximadamente 2000 células imersas em uma gota de 30μl de meio, colocadas em suspensão na parte interna da tampa de uma placa de 100mm (aprox. 40 gotas/placa). Utilizamos um meio de cultura sem adição de 2iL para possibilitar a diferenciação estocástica dessas células por 3 dias. Os EBs tiveram seus diâmetros mensurados com auxílio do *software* Zen Blue (Zeiss).

Análises estatísticas foram realizadas no *software* GraphPad Prism 6, e o teste adequado foi escolhido baseado na distribuição de amostras, para realização de testes paramétricos ou não paramétricos.

Resultados e Discussão

CTE_m correspondem a um modelo de estudo amplamente utilizado para mimetizar o desenvolvimento embrionário inicial de mamíferos. Isso é possível devido a sua característica pluripotente, ou seja, capacidade de se diferenciar em células dos três folhetos germinativos, e sua capacidade de se propagar indefinidamente sem senescência (RIPPON e BISHOP, 2004). Essas características demandam um controle fino dos mecanismos específicos de proteostase em CTE (GARCÍA-PRAT et al, 2017), corroborados pelo aumento da expressão de chaperonas e cochaperonas nessas células (SARETZKI et al, 2004). Diante disso, analisando CTE_m de diferentes *backgrounds* genéticos para a expressão de STI1, comparamos o perfil de proliferação, pluripotência e diferenciação diante de níveis variados dessa cochaperona.

A proliferação das CTE_m foi impactada pela variação dos níveis de STI1, visto que a diminuição da expressão de uma forma truncada de STI1 (STI1-Δ) resultou na diminuição dos níveis de proliferação, tanto por curva de crescimento, quando por marcação de KI67. Alternativamente, o aumento da expressão da proteína em STI1-OE resgata esse efeito, aumentando a proliferação mesmo quando comparada a STI1-WT, evidenciando a influência dos níveis de STI1 nesse processo. Associado a isso, mecanismos de controle de qualidade das proteínas são indispensáveis para a proliferação, sendo observado em células-tronco pluripotentes (CTPs) altas taxas de síntese de chaperonas e cochaperonas (LEE et al, 2016).

Em concordância com esses resultados, a quantificação de apoptose pela marcação com CC3 mostrou que em células STI1-OE os níveis desse tipo de morte são menores quando comparado ao controle. Com a quebra da dupla fita do DNA, a histona H2AX é fosforilada (p-H2AX) no sítio da lesão, gerando focos dessa proteína no DNA (SQUATRITO, et al, 2010). Marcação por imunofluorescência e posterior quantificação de células positivas para p-H2AX mostrou um aumento nos focos detectados em células STI1-Δ. Em contrapartida, o aumento da expressão de STI1 no grupo STI1-OE parece exercer um efeito protetor nas CTE_m, diminuindo significativamente o número de focos de p-H2AX detectados, quando comparados às células STI1-Δ. Nossos resultados demonstram que a diminuição de STI1 pode sensibilizar CTE_m, aumentando a propensão ao dano, e o aumento dessa proteína parece exercer um efeito protetor nessas células. Os resultados descritos até então, podem estar relacionados a uma estabilidade celular gerada pelo aumento de STI1, já que a diminuição de morte e dano celular na linhagem STI1-OE é coerente a seus níveis aumentados de proliferação, ao passo que a linhagem STI1-Δ possui uma menor taxa proliferativa e valores mais altos de dano no DNA.

Para avaliar os impactos da expressão diferencial de STI1 na diferenciação de CTE_m, fizemos ensaios de formação de EBs, submetidos a diferenciação estocástica durante 3 dias na ausência de LIF e 2i. Obtivemos valores menores de diâmetro e volume para as células STI1-Δ quando comparadas às células STI1-WT. Esses

resultados podem se relacionar a um impacto negativo da diminuição de STI1 na proliferação, mas também na capacidade de diferenciação de CTE_m. Interessantemente, os resultados do grupo de EBs formados a partir das células STI1-OE demonstram um padrão distinto do observado no contexto proliferativo, tendo em vista que esses EBs são também menores que os controles. Sabemos que a regulação positiva de STI1 em CTE_m impacta positivamente a proliferação, e diante disso, hipotetizamos que o aumento de STI1, no contexto de diferenciação estocástica, pode estar relacionado a um processo que mantém o *stemness* de CTE_m, retardando o crescimento dos EBs. Para testar essa hipótese, iniciamos a avaliação da expressão de marcadores de pluripotência e diferenciação em EBs e culturas tradicionais de CTE_m.

Realizamos análises de expressão gênica por meio da técnica de RT-qPCR, iniciando a investigação pela expressão de marcadores dos três folhetos germinativos e fatores de pluripotência (FPs) clássicos nas linhagens estudadas. Resultados preliminares mostram que, além da esperada diminuição de STI1 em STI1-Δ, observamos uma diminuição nos FPs clássicos. Em contrapartida, parece haver uma tendência para o aumento da expressão de alguns FPs em CTE_m STI1-OE, como NANOG e KLF4, quando comparado ao controle. Por fim, em EBs STI1-Δ, observamos um aumento na expressão gênica de marcadores dos três folhetos germinativos, com uma propensão para diferenciação em mesoderme, indicando em conjunto um papel da STI1 na manutenção da expressão de FPs, e uma consequente relevância no processo de diferenciação de CTE_m.

Conclusões

Apesar de todo o conhecimento gerado e das inúmeras pesquisas no campo da biologia de CTEs, os mecanismos moleculares exatos que regulam e caracterizam a capacidade de autorrenovação e pluripotência dessas células permanecem pouco conhecidos. São também desconhecidos os mecanismos associados à função da STI1 no desenvolvimento, já que camundongos *knockout* para essa cochaperona mostraram-se inviáveis. O estudo das funções da STI1 na biologia de CTE_m contribui para o melhor entendimento da biologia singular dessas células. Em conjunto, os dados obtidos até esse ponto do nosso trabalho indicam que o aumento da STI1 impacta positivamente a proliferação de CTE_m, diminuindo a morte celular por apoptose, enquanto a diminuição dessa cochaperona, por sua vez, reduz a proliferação dessas células, com um considerável aumento no dano ao DNA. Os corpos embrioides formados de linhagens STI1-Δ possuem diâmetros reduzidos, levando à hipótese de envolvimento significativo de STI1 no processo de diferenciação, havendo uma tendência para diferenciação desses EBs em células associadas ao folheto de mesoderme. Ainda, nossos dados de expressão gênica mostram uma maior expressão de FPs em células STI1-OE, indicando que essa cochaperona está relacionada a pluripotência dessas células, característica intrínseca de CTE.

As evidências apresentadas até então mostram a STI1 como uma proteína importante no processo de desenvolvimento embrionário de murinos. Muitos fatores cruciais da biologia de CTPs permanecem em aberto e, portanto, o estudo associado a manutenção da pluripotência e autorrenovação é de fundamental importância, tanto para a utilização dessas células nas pesquisas de doenças degenerativas e do envelhecimento, quanto como grande promessa para medicina regenerativa.

Referências bibliográficas

- HAJJ, G. N. M., et al. (2009). Developmental expression of prion protein and its ligands stress inducible protein 1 and vitronectin. *Journal of Comparative Neurology* v. 517, n. 3, p. 371–384.
- LEE C. T., Graf C., Mayer F. J., Richter S. M. and Mayer M. P. (2012) Dynamics of the regulation of Hsp90 by the co-chaperone Sti1. *EMBO J.* 31, 1518–1528.
- Da Fonseca, A. C. C., Matias, D., Geraldo, L. H. M., Leser, F. S., Pagnoncelli, I., Garcia, C., ... Lima, F. R. S. (2020). The Multiple Functions of the Co-Chaperone Stress Inducible Protein 1. *Cytokine & Growth Factor Reviews*.
- BERALDO, F.H. et al. (2013) Stress-inducible phosphoprotein 1 has unique cochaperone activity during development and regulates cellular response to ischemia via the prion protein. *FASEB, Journal* v. 27, n. 9, p. 3594–3607.
- Doğan, A. (2018). Embryonic Stem Cells in Development and Regenerative Medicine. *Cell Biology and Translational Medicine*, Volume 1, 1–15. doi:10.1007/5584_2018_175
- SARETZKI, G., et al (2004) Stress defense in murine embryonic stem cells is superior to that of various differentiated murine cells, *Stem Cells*. 22, 962-71.
- RIPPON, H.J.; BISHOP, A.E. (2004) Embryonic stem cells. *Cell Proliferation* v. 37, p. 23–34.
- GARCÍA-PRAT, L.; SOUSA-VICTOR, P.; MUÑOZ-CÁNOVES, P. (2017) Proteostatic and Metabolic Control of Stemness. *Cell Stem Cell* v 20, n. 5, p. 593-608.
- LEE HJ, Gutierrez-Garcia R, Vilchez D (2016) Embryonic stem cells: a novel paradigm to study proteostasis? *FEBS J* 284(3):391
- SQUATRITO, M., et al., (2010) Loss of ATM/Chk2/p53 pathway components accelerates tumor development and contributes to radiation resistance in gliomas. *Cancer Cell*, 18(6): p. 619-29.