UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Tuane Cristine Ramos Gonçalves Vieira

Aspectos estruturais da interação entre a proteína do prion e

heparina.

Rio de Janeiro 2009

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

Tuane Cristine Ramos Gonçalves Vieira

Aspectos estruturais da interação entre a proteína do prion e heparina.

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pósgraduação em Química Biológica, Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Química Biológica.

Orientador: Jerson Lima Silva Co-orientadora: Yraima Cordeiro

> Rio de Janeiro 2009

Vieira, Tuane Cristine Ramos Gonçalves

Título / Tuane Cristine Ramos Gonçalves Vieira – Rio de Janeiro/IBqM, 2009.

Xi, 264f .: il.

Tese (Doutorado em Química Biológica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Bioquímica Médica, 2009.

Orientador: Jerson Lima Silva Co-Orientadora: Yraima Cordeiro

1. Glicosaminoglicanos. 2. Prion. 3. Encefalopatias espongiformes. 4. Agregação. – Teses.

I. Silva, Jerson Lima (Orient.). II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Bioquímica Médica/Programa de Pós-graduação

Tuane Cristine Ramos Gonçalves Vieira

Aspectos estruturais da interação entre a proteína do prion e heparina.

Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Química Biológica, Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Química Biológica.

Rio de Janeiro, 27 de agosto de 2009.

Avaliada por:

Prof. Paulo Antônio de Souza Mourão Professor Titular do Instituto de Bioquímica Médica, IBqM, UFRJ

Prof. Hernán Francisco Terenzi Professor Associado da Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC

Prof. Rafael Linden Professor Titular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, IBCCF, UFRJ

Revisor e suplente interno: Prof. Julio A. Mignaco Professor Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica, IBqM, UFRJ

Suplente externo: Prof. Paulo Mascarello Bisch Professor Titular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, IBCCF, UFRJ

Orientador: Prof. Jerson Lima Silva Professor Titular do Instituto de Bioquímica Médica, IBqM, UFRJ

Co-orientadora: Prof. Yraima Cordeiro Professora adjunta do Departamento de Fármacos, FF, UFRJ

Aos meus pais e grandes amigos que sempre estiveram ao meu lado me apoiando ou me amparando.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Jerson Lima Silva pela oportunidade de fazer o doutorado sob sua orientação, pelas conversas e idéias, e principalmente pela confiança.

A Prof. Yraima Cordeiro pelo seu carinho, amizade e orientação durante esses quase quatro anos, pela revisão da tese e prontidão sempre que precisei.

Ao Prof. Julio Mignaco pela revisão desta tese.

Aos membros da banca por terem aceitado o convite.

Ao colaborador Marcius Almeida pela ajuda com os experimentos de ressonância, explicações, conversas e até brincadeiras.

Aos colaboradores Mauricio Trambaioli, Lilian Costa, Narcisa Leal e Carolina Braga pelas conversas e experimentos que acabaram não entrando nesta tese.

A todos do LTPV, LAPA e LABEV pelas ajudas com experimentos, por fazerem da marcação de equipamentos um grande evento, pelos churrascos na varandinha, pelas discussões de dados e artigos, pelas piadas e brincadeiras, pelas idéias, pelas conversas jogadas fora ("arebaba" e quantas!!!), pelas colaborações, pelas sessões de terapia, pelas cervejas no bloco A... "Please don't stop the music!!!"

A Prof Débora Foguel por ser um grande exemplo de mãe, mulher, pesquisadora e administradora. É um prazer conviver com uma pessoa tão inspiradora.

Um grande agradecimento aos professores Andrea Cheble ("mãe Andrea") e André Gomes pelas conversas mais variadas, pela amizade, pela simpatia (muito mais por parte da Andrea é claro... rssss), pelas dúvidas experimentais esclarecidas, e por me fazerem sentir um pouco parte do LABEV.

Agradeço a minha querida aluna Camila Bessa, que chegou aos 45 do segundo tempo mas me deu uma grande ajuda pra finalizar essa tese.

Aos amigos que compartilharam as angústias de se trabalhar com a PrP, mas que agora "sofrem" com outros projetos, Thiago e Adriana.

Agradeço a minha amiga Prisciloca Ferreira pelas conversas, existenciais e engraçadas, pela colaboração no trabalho, pelas viagens divertidas, pelos conselhos, por tantos levantamentos de copo e jogatinas compartilhados!

Agradeço a minha amiga, colaboradora, irmãzinha, companheira de bancada e de viagens, meu anjinho-da-guarda Mariana Pierre. Agradeço pelo grande carinho, preocupação, amizade, conselhos, fofocas, segredos, angústias, vontades compartilhadas... Fico imensamente feliz dos nossos caminhos terem se cruzado nessa vida. Dizem por aí que ela tem um coração gelado, mas posso garantir que é um coração de manteiga, que ela até tenta colocar na geladeira, mas é porque senão derrete demais!

Um agradecimento especial aos meus amigos e companheiros de Semana de PG pelos momentos divertidíssimos, pelas idéias compartilhadas, pelas novas amizades conquistadas, pelas amizades reforçadas, pelos ensinamentos, pelos abraços com upa, pelos jantares no porção que ainda vão acontecer...

Agradeço aos meus amigos de mais de vinte anos, Thiago, Flávia e Jaqueline, que não entendem nada do que eu faço, mas me dão o maior apoio. Aos amigos da dança pela amizade e por fazerem o final de um dia de trabalho mais animado.

Um agradecimento a minha amiga Maisa Souza, pelo grande apoio no inicio do doutorado, pela preocupação dedicada sempre ao longo desses anos, pelas conversas, pelos "coração com coração" sempre que precisei, e agora por colocar uma Flor na minha vida. É claro que pra isso precisou de meu grande amigo Leonardinho Cinelli, que também agradeço pela amizade, reflexões sobre nossa vida pessoal e acadêmica, conselhos, e ajuda sempre quando precisei.

Agradeço ao apoio da minha família, à minha tia Wilma Ramos pelas várias novenas e compreender como pra nós virginianos é difícil ser prolixo, à minha tia Silvia Ramos sempre perguntando como esta tudo e torcendo bastante, e à minha avó Selma Ramos sempre interessada, perguntando como estão os experimentos e se dispondo a ajudar.

Ao meu amor, amigo e também colaborador Daniel Reynaldo pela dedicação, paciência, alegria, por querer fazer parte da minha vida e me deixar fazer parte da sua em todos os momentos. Por me fazer feliz, me fazer rir (e muito), pela admiração que é mútua e por todos os momentos que ainda virão. Que bom que você finalmente chegou!!

Aos meus queridos pais por todo amor, dedicação, apoio e suporte (emocional e também financeiro). Ao meu pai pela paciência e disponibilidade há qualquer momento. À minha mãe por ouvir meus pensamentos, por me ajudar em qualquer momento, por me amar incondicionalmente.

E não seria eu se não agradecesse aos meus filhotes, Norah, Mendel e Nick, pelas lambidas, pela preocupação comigo, pela companhia (principalmente durante a escrita da tese, aturando até luz acesa até tarde), por tudo...

De tudo ficaram três coisas: A certeza de que estamos sempre recomeçando; A certeza de que devemos continuar; A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar. (Fernando Pessoa)

RESUMO

VIEIRA, Tuane Cristine Ramos Gonçalves. Aspectos estruturais da interação entre a proteína do prion e heparina. Rio de Janeiro, 2009. Tese (Doutorado em Química Biológica)-Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

A conversão entre a isoforma celular de PrP (PrP^C) e sua conformação patológica. PrP^{Sc}. envolve o contato entre as duas isoformas e provavelmente requer um fator celular, como um glicosaminoglicano (GAG). Embora a interação direta entre a proteína do prion e heparina tenha sido reportada, ainda não existem informações estruturais suficientes sobre essa interação. No presente trabalho, realizamos experimentos de espalhamento de luz, fluorescência, ressonância magnética nuclear, e outras técnicas espectroscópicas a fim de fornecer informações sobre as propriedades químicas e físicas da interação entre a proteína recombinante do prior murina (r PrP^{23-231}) e heparina (Hep) em pH 7,4 e pH 5,5. Nesta tese mostramos que Hep interage com r PrP^{23-231} induzindo sua oligomerização/agregação. Estes agregados não se mostraram tóxicos para células ou com características amilóides. Através de cinéticas de ligação e conteúdo de estrutura secundária, verificamos que essa oligomerização é em grande parte transiente. A interação de PrP murina com Hep mostrou ser maior em pH ácido. Após alcançar o equilíbrio, espectros de HSQC e SAXS mostraram que a proteína do prion complexada com Hep tem uma estrutura muito similar à da proteína livre, embora apresente algumas mudanças em deslocamentos químicos e aminoácidos nas regiões N e Cterminal. Também investigamos a interação entre Hep e outras construções de prion, com deleções em porções do domínio N-terminal ($rPrP^{\Delta 51-90}$ and $rPrP^{\Delta 32-121}$). Heparina não interagiu com essas construções em pH 7,4, mas foi capaz de interagir em pH 5,5, indicando que heparina interage com a região octapeptídica em pH 7,4, mas pode interagir também com outra região da proteína (assim como o domínio C-terminal) quando a interação ocorre em pH 5,5. Essa interação em pH 5,5 foi dependente da presença dos resíduos de histidina da proteína. Além disso, procuramos por grupamentos sulfato de Hep importantes para a interação utilizando heparinas modificadas. Heps contendo somente grupamentos 6-Osulfatados ou 2-O-sulfatados não alteraram significativamente a estrutura secundária de Hep. Desta forma, pudemos inferir que esses dois grupamentos sulfato desempenham um papel importante para interação prion-heparina. Apesar das pequenas mudanças induzidas na estrutura da proteína pela interação com heparina, o complexo formado foi menos susceptível a agregação por temperatura ou ligação com RNA. O complexo também perdeu a propensão a converter-se em formas amilóides em condições de conversão in vitro.

ABSTRACT

VIEIRA, Tuane Cristine Ramos Gonçalves. Aspectos estruturais da interação entre a proteína do prion e heparina. Rio de Janeiro, 2009. Tese (Doutorado em Química Biológica)-Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

Conversion of cellular PrP (PrP^C) into the pathological conformer, PrP^{Sc}, involves contact between both isoforms and probably requires a cellular factor, such as a glycosaminoglycan (GAG). Though direct interaction between prion protein and heparin has been reported, little is known about the structural features implicit in this interaction. In the present work, we light-scattering. fluorescence, nuclear magnetic resonance spectroscopy performed measurements and other spectroscopic techniques in order to provide information on the chemical and physical properties of the murine recombinant PrP (rPrP²³⁻²³¹) interaction with heparin (Hep) at pH 7.4 and pH 5.5. Here we found that Hep interacts with rPrP²³⁻²³¹ inducing its oligomerization/aggregation. These aggregates were not toxic to cells or with amyloid characteristics. Following the binding kinetics and secondary structure content we found that this oligomerization is mostly transient. The interaction of murine PrP with heparin showed to be higher at the acidic pH. After reaching equilibrium, NMR HSQC and SAXS spectra showed that the prion protein complexed with Hep has the same general fold of the free protein, although displaying some chemical shifts changes on the N and C-terminal amino acid residues. We also investigated the interaction of Hep with other PrP constructs lacking portions of the N-terminal domain (rPrP^{$\Delta 51-90$} and rPrP^{$\Delta 32-121$}). Heparin did not bind these constructs at pH 7.4 but was able to interact at pH 5.5, indicating that heparin interacts with the octapeptide repeat region at pH 7.4, but can also interact with another region of the protein (as the C-terminal domain) when the interaction occurs at pH 5.5. This interaction at pH 5.5 was dependent on histidine residues of the protein. In addition, we searched for Hep sulfations important for interaction using modified heparins. Heps containing only 6-O-sulfated or 2-Osulfated groups did not alter significantly the PrP secondary structure. On this basis it may be inferred that these two sulfations play an important role in prion-heparin interaction. Despite the little changes on prion protein structure induced by heparin binding, the complex formed was less susceptible to aggregation by temperature or RNA binding. It also lost its intrinsic propensity to convert into amyloid forms in *in vitro* conversion reaction.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Funil de enovelamento protéico versus mau-enovelamento.	20	
Figura 2	As vias de enovelamento que levam à agregação.	24	
Figura 3	Estrutura em folhas-β cruzadas de fibras amilóides.	27	
Figura 4	Mutações de PRNP associadas com formas hereditárias das EETs.		
Figura 5	Estrutura tridimensional da proteína do prion.		
Figura 6	Modelo trimérico de PrP 27-30 em hélices-ß		
Figura 7	Modelos de conversão de PrP ^C para PrP ^{Sc} .	49	
Figura 8	Diagrama de energia e de volume do mau-enovelamanto de PrP.	50	
Figura 9	Estrutura das cadeias dos diferentes GAGs.	53	
Figura 10	Proteoglicanos de heparan sulfato (HSPG) desempenham diversos papéis	57	
U	fisiológicos na célula.		
Figura 11	Estrutura dissacarídica de acharan sulfato.	58	
Figura 12	Formação de PrP ^{Sc} mediada por GAG.	61	
Figura 13	Carboidratos sulfatados induzem mudança conformacional na PrP ^C .	62	
Figura 14	O efeito paradoxal dos GAGs.	63	
Figura 15	Esquema simplificado do espectrofluorímetro de stopped-flow.	78	
Figura 16	Estrutura química da acrilamida.	81	
Figura 17	Modificação do anel imidazólico de histidina por DEPC.	86	
Figura 18	Curva de saturação de DEPC.	87	
Figura 19	Esquema de redução do MTT.	88	
Figura 20	Interação entre a proteína do prion murina com heparina em dois pHs diferentes.	92	
Figura 21	Anisotropia de fluorescência com diferentes concentrações de rPrP ²³⁻²³¹ .	93	
Figura 22	Efeito de Hep na emissão de fluorescência do triptofano.	95	
Figura 23	Efeito de Hep na estrutura secundária de rPrP ²³⁻²³¹ .	96	
Figura 24	A interação com Hep é dependente de força iônica.	97	
Figura 25	Modulação do efeito de Hep na estrutura secundária de rPrP ²³⁻²³¹ por NaCl.	98	
Figura 26	Efeito de Hep na agregação de rPrP ²³⁻²³¹ .	99	
Figura 27	Exemplo do sinal obtido por cinética rápida.	100	
Figura 28	Amplitude de fluorescência observada para as amostras em pH 5,5 e pH	101	
	7,4.		
Figura 29	Amplitude de espalhamento observadas para as amostras em pH 5,5 e pH 7,4.	102	
Figura 30	Constantes de velocidade observadas de fluorescência e de espalhamento	103	
-	para as amostras em pH 5,5 e pH 7,4.		
Figura 31	Cinética lenta de agregação de rPrP ²³⁻²³¹ com Hep.	104	
Figura 32	Reversão do efeito de Hep acompanhado por CD.	106	
Figura 33	Reversão do efeito de Hep acompanhado por fluorescência.	107	
Figura 34	Cinética lenta monitorando a anisotropia de fluorescência de Hep.	108	
Figura 35	Plot de Stern-Volmer para supressão da fluorescência intrínseca de triptofanos de rPrP ²³⁻²³¹ por acrilamida.	110	
Figura 36	Hep não induz a formação de fibras amilóides de rPrP ²³⁻²³¹ .	111	
Figura 37	Plot de Guinier e plot de Kratky para r $PrP^{\Delta 51-90}$ e r $PrP^{\Delta 51-90}$:Hep r $PrP^{\Delta 51-90}$.	113	
Figura 38	Efeito de Hep na estrutura da proteína do prion por RMN em pH 5,5.	115	
Figura 39	Efeito de Hep na estrutura da proteína do prion por RMN em pH 7,4.	116	
Figura 40	Toxicidade dos complexos PrP:Hep.	118	
Figura 41	Efeito do cobre em associação com Hep na proteína do prion.	120	

Figura 42	Importância do domínio N-terminal para a interação com Hep.	121
Figura 43	Importância de resíduos de histidina para a interação entre PrP:Hep.	122
Figura 44	Avaliação da interação entre heparinas modificadas e rPrP ²³⁻²³¹ por	124
	anisotropia de fluorescência.	
Figura 45	Avaliação da interação entre heparinas modificadas e rPrP ²³⁻²³¹ por CD.	125
Figura 46	Efeito de N2aRNA no complexo rPrP ²³⁻²³¹ :Hep.	126
Figura 47	Comparação do efeito da temperatura entre PrP e PrP:Hep por CD e	128
	espalhamento de luz.	
Figura 48	Efeito de rPrP ²³⁻²³¹ na agregação do peptídeo ShaPrP ¹⁰⁹⁻¹⁴⁹ .	129
Figura 49	Influência de Hep na formação de fibras amilóides de rPrP ²³⁻²³¹ .	130

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Exemplos de amilóides funcionais.	28
Tabela 2	Principais doenças humanas associadas com a formação de depósitos	30
	amilóides.	
Tabela 3	Principais doenças de prion.	33
Tabela 4	Métodos de diagnósticos de infecções por prion.	41
Tabela 5	Resumo da influência de heparina/HS em proteínas amilóides.	60
Tabela 6	Contantes de Stern-Volmer para as amostras de PrP livre ou formando	109
	complexo com Hep.	

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AH- Ácido hialurônico AS- Acharan sulfato CD – Dicroísmo circular CS- Condroitin sulfato DCJ- Doença de Creutzfeldt-Jakob DEPC- Dietil pirocarbonato DNA- Ácido Desoxirribonucléico DO- Densidade óptica DS- Dermatan sulfato EDTA- Etilenodiaminotetraacetato tetrasódico EEB- Encefalopatia espongiforme bovina EETs- Encefalopatias espongiformes transmissíveis FITC- Isotiocianato de fluoresceína FT-IR- Infravermelho por transformada de Fourier GAG- Glicosaminoglicano Gal-Galactose GalNAc- N-acetil galactosamina GDN-HCl- Hidrocloreto de Guanidina GlcA- Ácido glicurônico GlcNAc- N-acetil glicosamina GPI- Glicosil-fosfatidil-inositol GSS- Síndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker Hep-Heparina HS- Heparan sulfato HSPG- Proteoglicano de heparan sulfato HSQC- Correlação heteronuclear de um único quantum IdoA- Ácido idurônico IFF- Insônia familiar fatal IPTG- Isopropil-β-D-tiogalactosídeo LB- Meio rico de cultura, Luria-Bertani NA-Heparina N-acetilada NADOS- Heparina N-acetilada de-O-sulfatada PG-Proteoglicano PRNP- Gene que codifica proteína do prion humana PrP- Proteína do prion PrP^C- Proteína do prion celular PrPres- Proteína do prion resistente à digestão PrP^{Sc}- Proteína do Prion *Scrapie* PrP^{sen}- PrP sensível a digestão QS- Queratan sulfato RMN- Ressonância magnética nuclear RNA- Ácido ribonocléico SDS- Dodecil sulfato de sódio ShaPrP- Proteína do prion de hamster sírio t=o/n- Tempo de 20 a 24 horas. ThT- Tioflavina T Tris-Tris (hidroximetil) aminometano

vDCJ- Doença de Creutzfeldt-Jakob variante u.a- Unidade arbitrária

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 ENOVELAMENTO PROTÉICO	18
1.1.1 Agregação protéica	22
1.1.1.1 Agregados não-amilóides ou amorfos	25
1.1.1.2 Agregados amilóides	25
1.1.2 Amilóides funcionais	28
1.1.3 Amilóides associados a doenças	29
1.2 DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS	31
1.3 PRION E AS ENCEFALOPATIAS ESPONGIFORMES	32
1.3.1 Doenças de causa hereditária	34
1.3.2 Doenças esporádicas	35
1.3.3 Doenças infecciosas	36
1.3.4 Cepas de prion e barreira de espècie	38
1.3.5 Terapia e diagnostico das doenças de prion	40
1.4 A PROTEINA DO PRION (PPP)	41
1.4.1 Função listologica da PFP	44
1.4.2 FFF e conversão	43
1.4.2.1 Mecanismos de conversão 1.5 PROTEOGUICANOS E GUICOSAMINOGUICANOS	47 51
1.5.1 Nomenclatura e aspectos gerais dos GAGs	52
1.6 GLICOSAMINOGLICANOS E AMILOIDOSES	59
1 7 INTERAÇÃO ENTRE PrP E POLISSACARÍDEOS SULFATADOS	60
171 O efeito paradoxo dos polissacarídeos sulfatados	61
1.7.2 Uso terapêutico dos polissacarídeos sulfatados	64
1.7.3 Papel funcional da interação PrP ^C :GAG	65
1.7.4 Sítios de ligação a Heparina/HS	67
2 OBJETIVOS	70
3 MATERIAL E MÉTODOS	72
	- '
3.1 MATERIAL	13
3.2 MÉTODOS	73
3.2.1 Expressão, purificação e estoque de rPrP ²³⁻²³¹ , dos mutantes PrP ^{Δ32-}	73
e PrP	
3.2.2 Sintese e Estoque do Peptídeo ShaPrP (109-149)	74
3.2.3 Medidas espectroscópicas	75
3.2.4 Agregação do Peptideo ShaPrP (109-149)	85
3.2.5 Agregação mediada por KNA na presença de Hep	85
3.2.0 Conversao de PPP em libras amiloides 2.2.7 Modificação de pPuP ²³⁻²³ non distiluirecenhonete (DEPC)	83 94
3.2.7 Miounicação de FFFF por dictipirocarbonato (DEFC) 2.2.8 Deducão de MTT evelição de petencial redev colular	80 87
5.2.0 Neuuçao de 1911 1 – avanação do potencial redox celular	0/
4 RESULTADOS	90
4.1 INTERAÇÃO rPrP ²³⁻²³¹ : HEPARINA	91
4.2 EFEITO DE HEP NA ESTRUTURA DE rPrP ²³⁻²³¹	94
4.3 TOXICIDADE DO COMPLEXO rPrP ²³⁻²³¹ :HEP	117

4.4 REGIÕES IMPORTANTES PARA A FORMAÇÃO DO COMPLEXO	119
	105
4.5 EFEITOS DA INTERACAO ENTRE PrP E HEP.	125
5 DISCUSSÃO	131
6 CONCLUSÕES	142
7 REFERÊNCIAS	144
8 ANEXO 1	176
Artigo publicado no The Journal of Biological Chemistry, 2008	177
9 ANEXO 2	187
Manuscrito aceito no Frontiers in Bioscience, 2009	188
10 ANEXO 3	210
Manuscrito aceito no Accounts of Chemical Research, 2009	211
11 ANEXO 4	235
Manuscrito "Prion protein interaction with low molecular weight heparin"	236

1 INTRODUÇÃO

1.1 O ENOVELAMENTO PROTÉICO

As proteínas são responsáveis por catalisar inúmeras reações químicas necessárias às células vivas assim como são importantes moléculas estruturais. A funcionalidade de uma proteína requer a localização espacial correta de seus aminoácidos, necessitando, portanto, de uma estrutura tridimensional definida. A estrutura tridimensional de uma proteína é obtida através do enovelamento da cadeia polipeptídica a partir de uma configuração desordenada, chamada de estado desenovelado, a uma configuração bem definida, compacta, conhecida como estado nativo (MURPHY, 1995). A estabilidade de uma proteína é descrita pela diferença de energia livre de Gibbs entre o estado desenovelado e nativo, ΔG . Um valor positivo de ΔG indica que o estado nativo é energeticamente mais favorável que o estado desenovelado (MURPHY, 1995).

A diferença de energia livre, ΔG , é definida em termos da diferença de entalpia, ΔH , e entropia, ΔS , como:

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S$$

O enovelamento da cadeia polipeptídica pode ser entendido como a aquisição seqüencial de todas as interações necessárias para a manutenção do estado nativo. No estado nativo, muitos grupamentos funcionais de uma proteína encontram-se escondidos no interior de sua estrutura, excluídos do solvente, e suas cadeias laterais fixas por interações específicas Cadeias de aminoácidos presentes na superfície da proteína também possuem sua mobilidade restringida pela proximidade umas com as outras, porém com restrição menor que as do interior da proteína. No estado desenovelado, as interações entre cadeias laterais de aminoácidos e o esqueleto polipeptídico são desfeitas e substituídas por interações com o

solvente. O balanço entre todas essas interações resulta no enovelamento da proteína (MURPHY, 1995; CHITI e DOBSON, 2006; LUHESHI e cols., 2008).

Proteínas não exploram todas as combinações possíveis de interações até chegar ao estado nativo (DOBSON, 2003). Somente um pequeno número de conformações possíveis precisa ser experimentado durante a transição de uma estrutura randômica para uma estrutura nativa (DINNER e cols., 2000; DOBSON, 2003). Isso se deve à própria sequência de aminoácidos da cadeia polipeptídica, que possibilita que interações próximas a nativa entre os resíduos sejam mais estáveis que as não nativas, levando a cadeia polipeptídica a alcançar sua estrutura de menor energia. Subsequentemente, pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas permitem que a proteína atinja sua forma completamente enovelada. Com isso, é possível que uma proteína se enovele rápida e eficientemente (DOBSON, 1999).

Outra característica importante é a capacidade de uma cadeia polipeptídica chegar a sua conformação nativa através de diferentes rotas, isto é, não existe uma ordem fixa para a aquisição das diversas interações. O enovelamento é desenhado em um funil no qual moléculas individuais, em uma ordem estocástica, adquirem um número crescente de interações nativas seguindo uma rota principal de decréscimo de energia, finalmente chegando à conformação nativa com o mínimo de energia para a molécula e a água sendo excluída do interior da proteína (DINNER e cols., 2000) (**Figura 1**).



Figura 1 – Funil de enovelamento protéico versus mau-enovelamento. Proteínas desenoveladas (representadas no topo do diagrama) possuem uma alta entropia conformacional e são altamente hidratadas. Enquanto a proteína evolui pelo funil, as espécies intermediárias vão se tornando mais estruturadas e menos hidratadas. Algumas proteínas alcançam uma bifurcação, levando a conformações metaestáveis que, dependendo das condições, podem avançar para espécies mal-enoveladas estáveis e levar a sua agregação.

Mesmo em condições ótimas, em algumas situações o processo de enovelamento protéico não acontece perfeitamente, e parte das proteínas celulares não enovela corretamente. Neste processo algumas proteínas podem formar interações "erradas" e ficarem presas cineticamente em um mínimo de energia local, gerando proteínas mal-enoveladas. Moléculas que sofreram enovelamento incorreto podem formar interações com outros polipeptídios mal-enovelados resultando em agregação (SPEED e cols., 1997). A agregação também resulta de mudanças na hidratação, similarmente ao enovelamento e à interação com ligantes (FOGUEL e SILVA, 2004) (Figura 1).

Existem mecanismos na célula capazes de reparar esse problema, seja induzindo seu re-enovelamento para uma estrutura correta através das chaperonas moleculares, ou levando essas proteínas para um processo de degradação por um sistema proteolítico como o complexo proteasoma ou através de mecanismos lisossomais ou autofágicos (HARTL e HAYER-HARTL, 2009). Esses mecanismos são na maioria das vezes suficientemente eficientes, porém mudanças no ambiente das células ou no que é produzido dentro delas pode levar a um aumento na produção de proteínas mal-enoveladas, podendo resultar em mecanismos de perda ou ganho de função prejudicial ao organismo. Doenças que surgem pela incapacidade de um peptídeo ou proteína adotar seu estado conformacional nativo são chamadas de Doenças Conformacionais.

O enovelamento ineficiente de uma proteína pode reduzir sua disponibilidade, influenciando diretamente sua função na célula (LOMAS e CARRELL, 2002; AMARAL, 2004). Contudo, grande parte das doenças conformacionais está associada ao acúmulo de agregados de proteínas mal-enoveladas, que em alguns casos podem se organizar em estruturas chamadas fibrilas amilóides, ou placas amilóides, ou até mesmo em agregados amorfos (PRUSINER, 1991; KELLY, 1998).

1.1.1 Agregação protéica

Durante e imediatamente após a sua tradução no ribossomo, a proteína recém-formada deve enovelar-se na conformação correta, a fim de cumprir sua função. Esta não é uma tarefa trivial dado o grande número de interações que o peptídeo nascente deve experimentar, e a grande concentração de proteínas que encontra dentro da célula (ELLIS, 2001), aumentando a chance de contatos inapropriados e conseqüente agregação.

A agregação protéica tem sido sugerida como uma característica genérica da cadeia polipeptídica, sem necessariamente estar relacionada a uma patologia (DOBSON, 1999). Porém, a propensão de uma proteína em agregar depende de suas propriedades físico-químicas; hidrofobicidade, tendência em formar determinada estrutura secundária, e carga. Pequenas perturbações em sua sequência, estabilidade, ou em seu ambiente químico, afetarão essa propensão (TJERNBERG e cols., 2002; CHITI e cols., 2003; TARTAGLIA e cols., 2004).

Proteínas que são totalmente ou parcialmente desenoveladas em condições normais na célula em geral apresentam sequências de aminoácidos com propriedades químicas de baixa propensão para agregar (UVERSKY e FINK, 2004), porém mutações localizadas ou outros tipos de perturbações podem aumentar essa propensão (PAWAR e cols., 2005). No caso de proteínas globulares, acredita-se atualmente que estas precisam desenovelar, ao menos

parcialmente, antes de agregar (KELLY, 1998; DOBSON, 1999; UVERSKY e FINK, 2004). Além disso, durante o processo de enovelamento existe a formação de diversos intermediários parcialmente enovelados até chegar ao estado nativo (BALDWIN, 1975; WETZEL, 1994), e estes intermediários estariam susceptíveis a agregação. Condições como alta temperatura, alta pressão, baixo pH, e solventes orgânicos são capazes de aumentar a propensão a agregação por provocarem perturbações em pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre cadeias laterais, levando a um desdobramento parcial para um estado intermediário (CHITI e cols., 1999; FERRAO-GONZALES e cols., 2000; VILLEGAS e cols., 2000).

Os mecanismos que levam uma proteína a agregar envolvem inicialmente a formação de espécies com características similares às suas estruturas precursoras, sejam estas nativamente desenoveladas ou enoveladas, que por um processo mutacional ou de estresse celular expõem resíduos hidrofóbicos ao solvente, estando propensas a auto-associação e posterior agregação e precipitação. Essa agregação pode ocorrer em duas rotas, uma com a formação de espécies com características morfológicas e estruturais bem ordenadas, como as fibras amilóides, e outra com a formação de estruturas desordenadas, como os agregados amorfos (**Figura 2**). A proporção na qual uma proteína desenovela e agrega, sua sequência de aminoácidos e a natureza dos intermediários formados irão determinar a rota de agregação predominante (DOBSON, 2003; STEFANI e DOBSON, 2003; FERNANDEZ-ESCAMILLA e cols., 2004).



Figura 2 – **As vias de enovelamento que levam à agregação.** Uma proteína desenovelada alcança sua conformação nativa via a formação de intermediários parcialmente enovelados. Este processo é rápido e reversível. No entanto, em determinadas condições os intermediários podem persistir e associar-se através da exposição de regiões hidrofóbicas que normalmente estariam escondidas no interior da proteína em seu estado nativo. Quando isso ocorre, os intermediários agregam através de um mecanismo ordenado ou desordenado, levando a formação de precipitados amorfos ou fibras amilóides. Adaptado de ECROYD e CARVER (2008).

1.1.1.1 Agregados não-amilóides ou amorfos

A rápida perda de estrutura e subsequente agregação de intermediários do enovelamento de uma proteína resultam em mecanismos de agregação desordenada, onde monômeros individuais adicionam-se ao crescente aglomerado de proteínas agregadas através de um processo aleatório. Isso leva à formação de agregados amorfos que contém intermediários parcialmente enovelados com uma conformação estendida, que eventualmente tornam-se grandes o suficiente, formando precipitados insolúveis (ECROYD e CARVER, 2008). Este tipo de agregação está envolvido com a formação de corpos de inclusão em células de bactéria durante a expressão de proteínas recombinantes, levando à perda de produtividade do sistema de expressão (SPEED e cols., 1996).

Agregados amorfos também vêm sendo relacionados a diferentes patologias. Em Amiloidose de cadeia leve a formação dos agregados amorfos acontece pela existência de resíduos de aminoácidos específicos (HELMS e WETZEL, 1996). Já para peptídeos de Aβ, relacionados à doença de Alzheimer, a formação de agregados amorfos se mostrou dependente de pHs ácidos (WOOD e cols., 1996). No caso da agregação da proteína do prion, 90% dos pacientes acometidos pela doença de Creutzfeldt-Jakob apresentam agregados desorganizados (PRUSINER, 2001).

1.1.1.2 Agregados amilóides

Ao contrário dos agregados amorfos, a agregação pode ocorrer mais lentamente através de um processo ordenado, no qual formas parcialmente enoveladas de uma proteína se associam para formar um núcleo estável. Este núcleo atua em seguida como um molde, sequestrando outros intermediários que são adicionados ao crescente filamento de proteína agregada (protofibra). A adição seqüencial de intermediários às extremidades da cadeia leva à formação de uma forma protéica altamente estruturada, insolúvel, conhecida como fibra amilóide. A cinética de formação da fibra amilóide envolve uma fase lag, envolvendo a formação de um núcleo estável, e uma fase de elongação (LOMAKIN e cols., 1996; HARPER e LANSBURY, Jr., 1997; KELLY, 2000). Este mecanismo é descrito para a maioria das espécies estudadas formadas *in vitro*.

Os depósitos amilóides eram historicamente detectados por corantes histológicos, e sua característica fibrilar confirmada por microscopia eletrônica. Desde 1920 o corante vermelho do Congo é utilizado para identificar depósitos amilóides (HOWIE e BREWER, 2009). Quando em contato com essas estruturas, este apresenta birrefringência verde sob luz polarizada (SIPE e COHEN, 2000). Testes espectrofotométricos de ligação a esse corante (KLUNK e cols., 1999) e a outro corante chamado tioflavina T (NAIKI e cols., 1989) também são utilizados. Estudos de microscopia eletrônica demonstraram que a fibra formada possui uma estrutura não ramificada, torcida, com diâmetro de 7 a 12 nm (COHEN e cols., 1982). Outra metodologia bastante utilizada é a difração de raios X, capaz de detectar uma repetição estrutural ao longo do eixo da fibra de 4.7 Å (reflexão meridional) e um espaçamento estrutural de 10 Å perpendicular ao eixo da fibra (reflexão equatorial), característica de uma folha-β cruzada (Figura 3) (PAULING e COREY, 1951). Análises espectroscópicas como dicroísmo circular (CD) (CASCIO e cols., 1989) e infravermelho (FTIR) (O'LEARY e LEVIN, 1985) também são utilizados por serem sensíveis à estrutura secundária, rica em folhas β, das fibras amilóides. Recentemente, técnicas como ressonância magnética nuclear (RMN) no estado sólido (JARONIEC e cols., 2002; PETKOVA e cols., 2002) e difração de raio-X por cristais (MAKIN e cols., 2005; NELSON e cols., 2005) vem permitindo a construção de modelos descrevendo a estrutura molecular dos filamentos.



Figura 3 – **Estrutura em folhas-β cruzadas de fibras amilóides.** (A) Padrão de difração de raio-X de cruz-β. Os detalhes característicos são a reflexão meridional de ~ 4,7 Å e a reflexão equatorial da ordem de 10 Å (adaptado de ECROYD e CARVER, 2008). (B) Visão esquemática da estrutura em cruz-β central das fibras amilóides (adaptado de JIMENEZ e cols., 2002). Folhas-β paralelas são mostradas, mas a estrutura poderia ser composta também de folhas-β antiparalelas ou de uma mistura de paralelas e antiparalelas. O espaçamento de ~ 4,7 Å dentro de cada folha-β é paralelo ao eixo longo da fibra. O espaçamento de 10 Å folha-a-folha pode variar de 5 a 14 Å dependendo do tipo da cadeia de aminoácido (adaptado de NELSON e EISENBERG, 2006).

1.1.2 Amilóides funcionais

Agregados amilóides também podem representar uma estrutura funcional, evolutiva, altamente conservada, que contribua com a fisiologia normal da célula. Organismos evoluíram tirando vantagem da capacidade de algumas proteínas de formar uma estrutura que apresenta alta resistência a proteólise, características auto-replicativas, e potencialmente transmitem informação. Amilóides funcionais são encontrados em diversos organismos, de bactérias aos mamíferos, com diversas funções como a formação de biofilmes, regulação da síntese de melanina, e controle epigenético de poliaminas, entre outras (**Tabela 1**). Para evitar a geração de intermediários tóxicos ou depósitos amilóides patológicos, a amiloidogênese funcional deve ser estritamente controlada.

Proteína amilóide	Origem	Função proposta	Referência
Chaplin	Streptomyces ceolicolor	Formação de hifas aéreas	CLAESSEN e cols., 2003
Curlin	E.coli	Formação de biofilme Adesão celular Invasão	CHERNY e cols., 2005; BARNHART e CHAPMAN, 2006
[PSI+] prion	Saccharomyces cerevisiae	Regulação de poliaminas	NAMY e cols., 2008
[RNQ+] prion	Saccharomyces cerevisiae	Citoproteção	DOUGLAS e cols., 2008
[Het-s] prion	Podospora anserina	Formação de heterocárion	BALGUERIE e cols., 2003
CPEB prion	Aplysia californica	Memória de longa duração	SHORTER e LINDQUIST, 2005
Córion amilóide	Lepidoptera	Proteção	ICONOMIDOU e cols., 2000
Amilóide de ovo de peixe	Austrofundulus limnaeus	Resistência a desidratação	PODRABSKY e cols., 2001
Pmel	Mamíferos	Regulação da biosíntese de melanina	BERSON e cols., 2003
Fibrina	Mamíferos	Ativação de fatores hemostáticos	HERCZENIK e cols., 2007

Tabela 1 – Exemplos de amilóides funcionais. Adaptado de MAURY (2009)

1.1.3 Amilóides associados a doenças

Um grande número de doenças está diretamente associado com a formação de agregados extracelulares ou intracelulares (**Tabela 2**), incluindo as doenças de Parkinson e Alzheimer, as encefalopatias espongiformes, e diabetes tipo II. Doenças deste tipo estão entre as mais debilitantes, socialmente perturbadoras e onerosas atualmente, e são cada vez mais prevalentes com o envelhecimento de nossa sociedade, tornando-nos mais dependentes de novas práticas médicas. Cada uma dessas doenças envolve predominantemente a agregação de uma proteína específica, além de moléculas adicionais como outras proteínas e carboidratos quando essa agregação acontece *in vivo*. Quase trinta proteínas já foram descritas como capazes de formar estruturas amilóides, e embora não exista homologia entre sua sequência de aminoácidos, todas compartilham a mesma estrutura secundária com ligações de hidrogênio altamente organizadas que garantem sua estabilidade cinética (**Tabela 2**) (DOBSON, 1999).

A citotoxicidade associada à formação da estrutura amilóide não está relacionada somente à fibra, mas também aos seus precursores. Embora a deposição da placa amilóide cause efeitos negativos, e tenha sido demonstrada a toxicidade das fibras maduras (WARD e cols., 2000; NOVITSKAYA e cols., 2006), diversos trabalhos vêm apontando para o efeito tóxico de espécies solúveis, dímeros e trímeros pré-fibrilares, ou outros oligômeros produzidos durante os estágios inicias de formação da fibra (SOUSA e cols., 2001; DODART e cols., 2002; STEFANI e DOBSON, 2003; CHITI e DOBSON, 2006).

Doença associada	Proteína
Doenças neurodegenerativas	
Doença de Alzheimer	Peptídeo β-amilóide
Encefalopatia espongiforme	Prion
Doença de Parkinson	α -sinucleína
Esclerose amiotrópica lateral	Superóxido dismutase I
Doença de Huntington	Huntintina
Amiloidose AL Amiloidose AA Amiloidose sistêmica senile Polineuropatia amiloidótica familiar	Imunoglobulina de cadeia leve Proteína amilóide A Transtirretina Transtirretina
Amiloidose relacionada à hemodiálise	β2-microglobulina
Amiloidoses localizadas	
Diabetes tipo II	Amilina (IAPP)
Amiloidose atrial	Fator atrial natriurético
Prolactinoma pituitário	Prolactina
Amiloidose córnea	Lactoferrina
i minoraobe connea	

Tabela 2 – **Principais doenças humanas associadas com a formação de depósitos amilóides.** Adaptado de CHITI e DOBSON (2006).

1.2 DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS

A definição convencional para neurodegeneração indica que este é um processo de morte neuronal progressiva idiopática, ocorrendo geralmente com uma distribuição seletiva que frequentemente envolve vias funcionais relacionadas (CALNE e cols., 1992). Esta definição envolve, por exemplo, o desgaste normal que ocorre pelo envelhecimento do sistema nervoso; entretanto, o termo neurodegeneração implica anormalidade, doença.

As doenças neurodegenerativas estão associadas com a formação progressiva de agregados protéicos extracelulares ou de inclusões intracelulares em células do sistema nervoso. A perda de células neuronais nestas doenças é caracterizada por mudanças histológicas marcantes. Determinados neurônios podem ser afetados em um padrão desigual de distribuição pelo sistema nervoso central, e vias funcionalmente relacionadas, como moto neurônios superiores e inferiores, podem ser seletivamente afetadas (BRAAK e BRAAK, 2000).

As doenças neurodegenerativas mais registradas na atualidade são as doenças de Parkinson e Alzheimer. A doença de Alzheimer foi relatada pela primeira vez em 1907 (GRAEBER e MEHRAEIN, 1999), mas somente 80 anos mais tarde foram identificadas as proteínas envolvidas no desencadeamento desta doença (GLENNER e WONG, 1984). Há pouco mais de 20 anos atrás partículas protéicas infecciosas (denominadas prion "scrapie") foram identificadas como o agente transmissível de uma desordem neurodegenerativa (PRUSINER, 1982). Na última década, diversas investigações revelaram um mecanismo patogênico em comum dentre várias doenças neurodegenerativas: a agregação e deposição de proteínas mal-enoveladas levando à amiloidose progressiva do sistema nervoso central. Portanto, proteínas solúveis são gradativamente convertidas em polímeros insolúveis, em geral com estruturas em cruz- β que acumulam como depósitos amilóides fibrilares.

1.3 PRION E AS ENCEFALOPATIAS ESPONGIFORMES

As encefalopatias espongiformes transmissíveis (EETs) são doenças raras que afetam mamíferos (incluindo humanos) (**Tabela 3**). EETs Manifestam diversos sintomas clínicos de disfunção cognitiva e motora como demência, distúrbios psiquiátricos, mioclonia, parestesia, insônia e ataxia. Estas doenças podem ser hereditárias, esporádicas (de origem não determinada), e também possuem natureza infecciosa (**Tabela 3**) (PRUSINER, 1998). As características neuropatológicas incluem perda neuronal, gliose astrocítica (crescimento anormal dos astrócitos), e alteração espongiforme (neurodegeneração em forma de vacúolos) (PRUSINER, 1998; AGUZZI e POLYMENIDOU, 2004). Todas as EETs são progressivas, fatais e até o momento incuráveis (PRUSINER, 1998). As EETs que afetam humanos são: doença de Creutzfeldt-Jakob (DCJ), síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (SGS), Insônia Familiar Fatal (IFF) e Kuru (atualmente erradicada).

Doença	Hospedeiro natural	Mecanismo de indução da doença
Doença de Creutzfeldt–Jakob	Humanos	Esporádica, hereditária, iatrogênica
Doença de Creutzfeldt–Jakob variante	Humanos	Ingestão de EEB – alimento contaminado
Kuru	Humanos	Ingestão em rituais de canibalismo
Insônia familiar fatal	Humanos	Hereditária
Doença de Gerstmann– Sträussler–Scheinker	Humanos	Hereditária
Scrapie	Ovelhas	Infecção em ovelhas geneticamente susceptíveis
Encefalopatia espongiforme bovina	Rebanho bovino	Ingestão de carne contaminada
Encefalopatia espongiforme felina	Felinos de zoológico e domésticos	Ingestão de carne contaminada

Tabela 3 – Principais doenças de prion. Adaptado de AGUZZI e SIGURDSON (2004).

A primeira descrição de uma EET é anterior à metade do século 18, quando o primeiro caso de "scrapie" (doença de prion que acomete ovelhas) comprometeu a expansão da indústria têxtil durante a Revolução Industrial (AGUZZI e POLYMENIDOU, 2004). No início do século XX, o primeiro caso de doença de Creutzfeldt-Jakob foi relatado em humanos (CREUTZFELDT, 1920; JAKOB, 1921). Na metade do século XX, Kuru foi identificada como uma EET em Papua Nova Guiné, e foi consequente da contaminação por prática de ritual canibalístico, levando à morte grande parte da população aborígene local (GAJDUSEK e ZIGAS, 1957). Ulteriormente, Alper e colaboradores demonstraram que o agente infeccioso relacionado as EETs era altamente resistente a tratamentos que degradavam ácidos nucléicos, como radiação ionizante e luz ultravioleta (ALPER e cols., 1967), sugerindo que uma proteína por si só poderia infectar e se replicar na ausência de um ácido nucléico (GRIFFITH, 1967). Na década de oitenta, o neurocientista Stanley Prusiner (ganhador do prêmio Nobel de Medicina em 1997) caracterizou esse agente infeccioso, que é sensível a agentes que modificam proteínas (proteases, fenol, dodecil sulfato de sódio) e cunhou o conceito de prion: "*proteinaceous infectious particle"* (PRUSINER e cols., 1980; PRUSINER, 1982). O termo

prion denomina uma partícula protéica infecciosa, capaz de se replicar e transmitir infecção na ausência de informação genética.

Até o momento, todas as evidências indicam fortemente que as EETs, incluindo "scrapie" em ovelhas e EEB em vacas, são causadas pelo mesmo agente infeccioso, que é uma isoforma de uma proteína constitutiva conhecida como proteína do prion (PrP), codificada pelo gene *PRNP* (AGUZZI e POLYMENIDOU, 2004). Existem duas moléculas principais envolvidas nas doenças de prion, que apresentam a mesma sequência de aminoácidos. A primeira é a proteína do prion celular (PrP^C), uma isoforma que ocorre naturalmente nas células do organismo do hospedeiro (PRUSINER e cols., 1984). A segunda é um variante conformacional da primeira, que está envolvida com a transmissão da doença, conhecida como prion "scrapie" (PrP^{Sc}) ou ainda PrPres (de PrP resistente a proteases) (CAUGHEY e CHESEBRO, 2001).

1.3.1 Doenças de causa hereditária

As doenças de prion de causa hereditária estão associadas com mutações no gene que codifica a PrP (*PRNP*). *PRNP* está presente no cromossomo 20 humano e possui dois exons (3 em camundongos e ratos), com toda sua fase de abertura de leitura no segundo exon (MEAD, 2006). O polimorfísmo encontrado no códon 129 entre uma metionina (129M) e valina tem mostrado susceptibilidade a doenças de prion (MEAD, 2006). Mutações patogênicas comumente encontradas no gene *PRNP* incluem E200K, D178N, P102L, V210I, e inserções adicionais de repetições octapeptídicas (**Figura 4**). D178N está associada com duas doenças, IFF ou DCJ, dependendo da presença de metionina e valina na posição 129,
respectivamente. Outras mutações vêem sendo descritas, mas são raras (MEAD, 2006). A DCJ de origem genética engloba aproximadamente 10% de todos os casos descritos para essa doença (KOVACS e cols., 2005; HEINEMANN e cols., 2007). Mais de trinta mutações diferentes já foram descritas; algumas estão associadas com características clínicas particulares de determinadas doenças de prion. Outras estão associadas com fenótipos clínicos variados (MEAD, 2006).



Figura 4 – Mutações de PRNP associadas com formas hereditárias das EETs. Mutações confirmadas ou não confirmadas representadas no gene da proteína do prion. Adaptado de MEAD (2006).

1.3.2 Doenças esporádicas

A maioria dos casos de DCJ são esporádicos. O termo "esporádico" indica que até o presente momento não foi possível identificar nenhum fator de risco que justifique o desenvolvimento da doença, como exposição a uma infecção nos pacientes afetados

(COLLINS e cols., 2004). Por outro lado, existem achados mostrando uma susceptibilidade genética ao desenvolvimento deste tipo de doença. Indivíduos homozigotos para metionina no códon 129 parecem apresentar maior chance de desenvolver DCJ esporádica do que outros pacientes (LADOGANA e cols., 2005). A explicação freqüente para essas doenças é uma mutação somática espontânea no gene *PRNP* ou mudanças conformacionais raras, ao acaso, na proteína PrP presente no organismo do paciente (PRUSINER, 2001). Doenças esporádicas não estão restritas a humanos, ocorrendo também em animais como gado (BUSCHMANN e cols., 2006).

1.3.3 Doenças infecciosas

Infecções por prion são responsáveis por um grande número de incidentes médicos e veterinários. São diversos os casos epidêmicos desde a primeira descrição de uma epidemia de scrapie em ovelhas após imunização com vacinas contaminadas e a comprovação de sua transmissibilidade (AGUZZI e POLYMENIDOU, 2004; COLLINS e cols., 2004), até o surgimento do mal da vaca louca (Encefalopatia espongiforme bovina-EEB), famoso caso que se tornou popular e trouxe crescente interesse dos meios de comunicação em 1986 e sua consequência em humanos sob a forma de uma DCJ variante, em 1996 (EGGENBERGER, 2007).

A origem da EEB ainda não está totalmente determinada. Contudo, não há dúvidas de que alterações nas práticas de alimentação do gado levaram ao desenvolvimento da mesma. A ração era suplementada com derivados de carne de ovinos e bovinos mortos por um processamento modificado, que excluía o tratamento com altas temperaturas prolongadas e solventes (EGGENBERGER, 2007). Existe a sugestão de que a nova DCJ variante seria causada pela contaminação humana por EEB. Não existe uma prova experimental direta, porém estudos epidemiológicos, bioquímicos e neuropatológicos apontam para essa explicação. Os pacientes afetados pela forma variante da doença são muito mais jovens (mortes em torno dos 29 anos para a forma variante e 65 anos para a forma esporádica), apresentam sintomas psiquiátricos iniciais proeminentes, e a proteína acumula principalmente em tecidos linforeticulares (COLLINS e cols., 2004; EGGENBERGER, 2007; AGUZZI e cols., 2008a).

Uma doença também associada à ingestão de carne contaminada foi descrita em humanos. Esta doença, chamada Kuru, afetou humanos de tribos na Papua-Nova Guiné entre 5 e 60 anos, com uma razão relativa ao gênero parecida entre os pré-adolescentes, porém com um excesso em mulheres adultas. A incidência da doença foi atribuída ao ritual de luto canibalístico praticado naquelas tribos, principalmente por mulheres e crianças pequenas. Com o fim dos rituais a doença foi extinta (LIBERSKI e GAJDUSEK, 1997; EGGENBERGER, 2007).

Outras formas de contaminação também já foram relatadas, como por instrumentos neurocirúrgicos esterilizados inadequadamente, enxertos de córnea, hormônio de crescimento humano extraído de cadáveres, implantação e uso terapêutico de dura mater humana (BROWN e cols., 2000b). Tecidos a partir do sistema nervoso central e o sistema linforeticular são os mais prováveis a oferecer risco de contaminação. Porém, tem sido identificada a presença da proteína do prion associada às EETs em outros tecidos como no caso de órgãos inflamados extra neuronais não linfóides de camundongos (HEIKENWALDER e cols., 2005), e também em fluidos como saliva (MATHIASON e cols.,

2006) e urina (SEEGER e cols., 2005). Casos de transmissão através de transfusões de sangue também foram reportados (LLEWELYN e cols., 2004; PEDEN e cols., 2004; WROE e cols., 2006).

A proteína do prion capaz de causar EET é resistente aos métodos de esterilização e descontaminação convencionais (TAYLOR, 2000). Detergentes, alcoóis, permanganato de potássio, peróxido de hidrogênio, luz ultravioleta, são ineficazes. Temperatura em torno de 134°C, hidróxido de sódio e hipoclorito de sódio concentrado, durante uma hora, são os procedimentos atuais para reduzir a infecciosidade (RUTALA e WEBER, 2001).

1.3.4 Cepas de prion e barreira de espécie

Uma determinada EET pode exibir diferentes padrões com relação ao tempo de incubação, a manifestações clínicas, transmissibilidade e patologia (padrão de vacuolização e formação de agregados) (FRASER e DICKINSON, 1973; FRASER, 1993), que persistem mesmo após uma transmissão serial. Em analogia a outros agentes infecciosos, essas diferenças se devem à existência de diferentes cepas de prion. O padrão de acumulação da proteína infecciosa e sinais clínicos, característicos de determinada cepa, são utilizados para rastrear a origem do material infeccioso, como foi o caso da transmissão de EEB para humanos, originando a DCJ variante (BRUCE e cols., 1997; SCOTT e cols., 1999). O que determina as diferenças *in vivo* de cada cepa são suas características bioquímicas, apresentando diferente susceptibilidade ao tratamento com proteases (KUCZIUS e GROSCHUP, 1999), diferentes padrões de glicosilação (COLLINGE e cols., 1996) e de resistência a agentes caotrópicos (PERETZ e cols., 2001), entre outras. Existe a hipótese de

que todas essas diferenças residem na diversidade de conformações que a proteína patogênica pode adotar, com o fenótipo da doença sendo determinado por uma conformação específica presente no doador (SAFAR e cols., 1998; AGUZZI e cols., 2007). Essa hipótese ainda é debatida pela controvérsia em existirem um grande número de conformações diferentes para a mesma proteína (CHESEBRO, 1998), além disso, as diferentes conformações podem ser co-determinadas por outros fatores, cuja presença ou ausência na célula infectada pode definir sua competência a replicar uma determinada cepa (WEISSMANN, 2009).

Cada cepa possui um grau de infecciosidade diferente, fazendo com que uma espécie tenha maior dificuldade em se propagar em uma espécie diferente, demonstrando a existência de uma barreira entre espécies. Na passagem inicial de uma espécie A para uma espécie B, nem todos os animais da espécie B morrem, e aqueles que morrem com a doença apresentam períodos de incubação mais longos e variados do que naqueles quando a transmissão se dá entre a mesma espécie, no qual todos os animais inoculados morrem com período de incubação curto e similar. Em passagens subseqüentes de infecciosidade de B para B, a transmissão é semelhante à transmissão entre espécies (COLLINGE e CLARKE, 2007; MORALES e cols., 2007). Alguns dados apontam para as diferenças entre estrutura primária da PrP derivada do inoculo e do hospedeiro inoculado como a base molecular para a barreira de espécie (PRUSINER e cols., 1990), além do tipo de cepa (BRUCE e cols., 1994). A sequência de aminoácidos e o tipo de cepa afetam a estrutura tridimensional da PrP, provavelmente afetando a eficiência de suas interações e determinando a sua propagação. A presença de co-fatores deve também contribuir para a barreira de espécies (COLLINGE e CLARKE, 2007).

1.3.5 Terapia e diagnóstico das doenças de prion

Uma série de estratégias terapêuticas tem sido utilizada a fim de encontrar um tratamento efetivo contra as EETs. Neste caso, o agente terapêutico deve ser eficiente e eliminar o acúmulo da proteína do prion, deve ser direcionado para os sítios onde há infecção dentro de um determinado tempo, e ser tolerado pelo organismo. Uma vez que o acúmulo de proteína e o dano ao sistema nervoso central ocorrem anteriormente aos sinais clínicos da doença, o desenvolvimento de uma terapia eficiente é um grande desafio. Ainda não há um tratamento eficaz que previna o desenvolvimento da doença e a subseqüente morte. Diversos compostos têm sido testados a fim de reverter ou prevenir a formação de PrP^{Sc}, como o vermelho do Congo (CAUGHEY e RACE, 1992), porfírinas (PRIOLA e cols., 2000), poliaminas (SUPATTAPONE e cols., 2001), e poliânions sulfatados (CAUGHEY e RAYMOND, 1993). Esses compostos parecem funcionar diretamente ou indiretamente na conversão da PrP^C para PrP^{Sc}, e assim prevenindo a disseminação da forma infecciosa. Infelizmente, esses compostos não se mostraram efetivos quando administrados após os primeiros sintomas da doença (CASHMAN e CAUGHEY, 2004a).

Além da necessidade do desenvolvimento de terapias contra as EETs, é necessário o desenvolvimento de novas metodologias para o diagnóstico dessas doenças. Uma metodologia eficaz permitirá a detecção de PrP^{Sc} em estágios pré-sintomáticos da doença, facilitando a remoção de agregados antes deles se tornarem significativamente tóxicos. A maioria dos métodos utilizados para o diagnóstico das infecções por prion são baseadas na presença de PrP^{Sc} pela sua resistência a digestão com protease (MCKINLEY e cols., 1983; MEYER e

cols., 1986). Como PrP^{Se} acumula em grande quantidade no cérebro, esse órgão é utilizado para sua detecção, necessitando portanto de análises pós-morte. Análises histopatológicas são comumente utilizadas. Outras metodologias vêm sendo desenvolvidas, entre elas metodologias que podem ser utilizadas com o hospedeiro vivo (**Tabela 4**) (SAKUDO e cols., 2007). Anticorpos e aptâmeros são capazes de distinguir entre a forma "scrapie" e a forma celular, mas são ferramentas que ainda precisam ser extensivamente exploradas (RHIE e cols., 2003; CURIN, V e cols., 2004).

Método	Indicador do método	Procedimento
Western blot	Resistência à proteinase K	Detecta PrP resistente
ELISA	Resistência à proteinase K	Detecta PrP resistente
Imunohistoquímica	Resistência à proteinase K	Imunomarcação de secções de tecidos
Bioensaio	Resistência à proteinase K Tempo de incubação	Transmissão a camundongos
Cultura de células	Resistência à proteinase K	Transmissão para células
<i>PMCA</i> – amplificação cíclica de proteína mal-enovelada	Resistência à proteinase K	Amplificação por ciclos de incubação e sonicação
CDI – Imunoensaio dependente de conformação	Conformação de PrP	Interação específica de anticorpo com formas nativas e desenoveladas
Aptâmeros	Conformação de PrP	Usa aptâmeros de RNA que reconhecem especificamente PrP ^C e PrP ^{Sc}

Tabela 4 – Métodos de diagnósticos de infecções por prion. Adaptado de SAKUDO e cols. (2007).

1.4 A PROTEÍNA DO PRION (PrP)

A proteína do prion celular (PrP^C) é um constituinte normal da membrana de células de mamíferos, sendo expressa amplamente em todos os tecidos, mas apresentando abundância particular no sistema nervoso central (OESCH e cols., 1985), linfócitos e órgãos linfóides (CASHMAN e cols., 1990).

O gene *PRNP* codifica uma proteína com 253 aminoácidos. Os primeiros 22 aminoácidos formam um peptídeo sinal, que é clivado após a translocação pelo retículo endoplasmático. PrP é uma proteína extracelular ligada à parte externa da membrana celular por uma âncora de glicosil-fosfatidilinositol (GPI) através do aminoácido Ser230 (porção (C)-terminal) (STAHL e cols., 1987; PRUSINER, 1998). Possui dois sítios de *N*-glicosilação nos resíduos ASN181 e ASN197, nos quais pode ser adicionada uma variedade de tipos de açúcares (RUDD e cols., 1999; RUDD e cols., 2001). É uma proteína altamente conservada em mamíferos (mais de 90% de identidade de sequência) e altamente homóloga (30% identidade e 50% de similaridade) em répteis e anfíbios (WOPFNER e cols., 1999; RIVERA-MILLA e cols., 2006).

A PrP^C pode ser dividida em duas regiões com propriedades estruturais e dinâmicas distintas (**Figura 5**) (RIEK e cols., 1997; LYSEK e cols., 2005; CALZOLAI e cols., 2005). O domínio N-terminal, com aproximadamente 100 resíduos, possui uma flexibilidade desordenada (DONNE e cols., 1997). Outra característica interessante desta região é a presença de repetições de uma determinada seqüência de oito resíduos de aminoácidos (PHGGGWGQ), entre os resíduos 50 a 90 (VILES e cols., 1999). Esta região é altamente conservada, com quatro repetições da seqüência de oito aminoácidos na PrP humana, e liga cobre físiologicamente (VILES e cols., 1999). Zinco, níquel e manganês também interagem, mas com afinidade menor que a do cobre (PAN e cols., 1992; BROWN e cols., 2000a; JACKSON e cols., 2001). Verifícou-se também que essa região pode interagir diretamente com PrP^{Se} exógena ou com componentes da matriz extracelular, como glicosaminoglicanos (PRIOLA e CAUGHEY, 1994), laminina (GRANER e cols., 2000) ou com outros ligantes

(MARTINS e cols., 2002). O N-terminal possui ainda um domínio hidrofóbico e um domínio carregado (AGUZZI e cols., 2008b).

O C-terminal é estruturado e apresenta uma estrutura globular com três α -hélices (H1 – resíduo 144 a 154, H2 – resíduo 173 a 194, e H3 – resíduo 200 a 228) e uma pequena folha- β antiparalela (S1 – resíduo 128 a 131, S2 – resíduo 161 a 164). Uma ponte dissulfeto entre os aminoácidos Cys179 e Cys214 conecta as hélices H2 e H3 (WUTHRICH e RIEK, 2001; PASTORE e ZAGARI, 2007).



Figura 5 – **Estrutura tridimensional da proteína do prion.** α -hélices 1, 2 e 3 estão representadas em vermelho; Folhas- β 1 e 2 em amarelo; loops e voltas estão coloridas em verde. A linha pontilhada representa a região N-terminal não estruturada da PrP. Adaptado de RIEK e cols. (1997).

1.4.1 Função fisiológica da PrP^C

O gene que codifica PrP^C foi identificado na década de 80. O primeiro animal nocaute para esse gene foi gerado em 1992. Mesmo três décadas após essas importantes descobertas, sabe-se muito pouco sobre a função fisiológica de PrP^C, sendo um tema de intenso debate. Ao longo desses anos, muitas funções têm sido apontadas para PrP^C, incluindo regulação do sistema imune, transdução de sinal, metabolismo de cobre, processamento de ácidos nucléicos, transmissão sináptica, proteção, e indução de apoptose (MARTINS e cols., 2002; AGUZZI e HEIKENWALDER, 2006; LINDEN e cols., 2008).

Muitos parceiros biológicos para PrP foram identificados, e podem estar envolvidos na sua função. Com base nos dados atualmente disponíveis, sugere-se que a presença da âncora de GPI indicaria a necessidade da PrP de interagir com uma proteína transmembrana extracelular, transferindo um sinal para o espaço intracelular, indicando que PrP pode funcionar como uma proteína acessória (AGUZZI e cols., 2008b). São diversas as moléculas que interagem com PrP. Elas estão envolvidas em diversos processos fisiológicos, incluindo os citados anteriormente; no entanto, o significado biológico da maioria dessas interações continua desconhecido.

Animais nocaute e seus derivados celulares tem sido utilizados para elucidar as funções de PrP^C. Experimentos com animais nocaute demonstraram que a expressão de PrP^C é dispensável ao desenvolvimento e função celular. No entanto, sua expressão é crucial para a replicação e desenvolvimento das doenças de prion (BUELER e cols., 1992; BUELER e cols., 1993). Dois modelos de camundongos nocaute demonstraram ataxia e perda de células de Purkinje, porém a remoção de PrP^C nesse caso levou a super-regulação da expressão de outro

transcrito localizado abaixo do gene para PrP gerando a proteína denominada Doppel. A causa da degeneração seria resultado da superexpressão de Doppel e não da ausência de PrP (MOORE e cols., 1999; AL e cols., 2005).

O ligante mais estudado da proteína prion é o cobre (BROWN e cols., 1997), que interage com PrP através do seu domínio N-terminal, sugerindo uma função no metabolismo desse íon (MARTINS e cols., 2002). Alguns estudos têm sugerido que PrP^C é capaz de interagir com macromoléculas da matriz extracelular, tais como laminina (GRANER e cols., 2000) e receptor de laminina (GAUCZYNSKI e cols., 2001). PrP também interage e modula a ativação de plasminogênio (ELLIS e cols., 2002). Outros ligantes celulares de PrP têm sido relatados: as chaperonas Hsp60 e GroEL; STI1 (stress-inducible protein I); nNOS (Neural nitric oxide synthase), alfa-tubulina (BARRET e cols., 2005) e ácidos nucléicos (SILVA e cols., 2008; AGUZZI e cols., 2008a).

1.4.2 PrP^{Sc} e conversão

Ao contrário da PrP^{C} , a estrutura de PrP^{Sc} ainda é pouco conhecida devido a sua insolubilidade e natureza fibrilar, que dificultam seus estudos estruturais por métodos clássicos de alta resolução e exigem o uso de abordagens alternativas. Experimentos de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) indicaram que a isoforma PrP^{Sc} apresenta um incremento de 42% de estrutura em folha- β e um decréscimo de 10% de estrutura em α -hélice em relação a PrP^{C} (PAN e cols., 1993). Sua natureza amilóide foi confirmada pela presença de estrutura cruz- β em experimentos de difração de raios-X por fibras, que permitiu a construção de um modelo no qual a região 89-175 forma hélices- β que se associam formando trímeros (**Figura 6**)(GOVAERTS e cols., 2004). Esta conversão estrutural (PrP^C-PrP^{Sc}) afeta profundamente as propriedades físico-químicas desta proteína, que forma agregados tóxicos que levam células neuronais a morte (LEGNAME e cols., 2004), e possuem resistência parcial à digestão por proteinase K (por esse motivo essa isoforma também é chamada de PrP-res). Após sofrer clivagem pela proteinase K é gerado um fragmento de 27 a 30 kDa, designado PrP 27-30, que não possui os primeiros 90 aminoácidos da região N-terminal e que retém a infecciosidade (PRUSINER, 1998).



Figura 6 – **Modelo trimérico de PrP 27-30 em hélices-\beta.** Este modelo trimérico inclui os resíduos de 89-175 da sequência da PrP em uma conformação de β -hélice com o C-terminal (resíduos 176-227), retendo a conformação em α -hélice observada na isoforma celular.

A primeira teoria para tentar explicar a conversão de PrP^C em PrP^{Sc} foi a hipótese de que a proteína PrP^{Sc} seria o único agente responsável pelo desenvolvimento de EETs ("Protein-only Hypotesis"). A hipótese "protein-only" foi primeiramente delineada por GRIFFITH (1967) e desenvolvida por PRUSINER (1998). De acordo com essa teoria, a PrP^{Sc} seria capaz de replicar sua conformação anormal, induzindo a conversão de PrP^C em PrP^{Sc}, semelhante a uma "partícula infecciosa" (KOCISKO e cols., 1994; KOCISKO e cols., 1995;

CAUGHEY e cols., 2001). A descoberta de que camundongos nocaute para PrP são resistentes a infecção por prions é um dos achados que mais suportam esta teoria (BUELER e cols., 1992; BUELER e cols., 1993).

Acredita-se que a conversão de PrP ocorra em um local onde as duas isoformas da proteína se encontrem e interajam fisicamente. Até hoje não há evidência direta sobre a participação de um compartimento intracelular específico para que esse evento ocorra (CAUGHEY e cols., 1991; BARMADA e HARRIS, 2005; GODSAVE e cols., 2008). Baseado em análises sobre a localização subcelular de PrP, apontam os lisossomos e endossomos como possíveis locais para o processo de conversão (MCKINLEY e cols., 1991; ARNOLD e cols., 1995; PIMPINELLI e cols., 2005; MARIJANOVIC e cols., 2009), embora existam dados controversos (SHYNG e cols., 1993; SUNYACH e cols., 2003).

1.4.2.1 Mecanismos de conversão

Os mecanismos que levam a conversão de PrP^{C} em PrP^{Sc} ainda não são completamente entendidos, mas existem modelos propostos. Existem duas teorias que explicam o mecanismo de conversão: modelo de conversão assistido por molde, ou do heterodímero (GAJDUSEK, 1988; PRUSINER e DEARMOND, 1990); e o modelo de polimerização mediada por semente (COME e cols., 1993) (**Figura 7**).

O modelo de polimerização nucleada por semente propõe que a mudança conformacional entre PrP^{C} e PrP^{Sc} é termodinamicamente controlada: a conversão é um

processo reversível, mas em equilíbrio a conformação celular é favorecida. A conversão para PrP^{Sc} é estabelecida e estabilizada somente quando PrP^{Sc} é incorporada a um agregado de PrP^{Sc}, uma semente. Havendo a presença de uma semente, a adição de monômeros é acelerada (**Figura 7**). De acordo com essa hipótese, o estado agregado estaria diretamente ligado à infecciosidade; PrP^{Sc} monomérico seria inofensivo, mas pode ser capaz de gerar oligômeros (AGUZZI e cols., 2001; AGUZZI e SIGURDSON, 2004; AGUZZI e cols., 2008b).

O modelo de conversão assistido por molde propõe que PrP^{Sc} é capaz de iniciar uma cascata catalítica utilizando PrP^C ou um intermediário de enovelamento (PrP*) como substrato, convertendo essas espécies em uma nova proteína rica em folha-β. A nova PrP^{Sc} formada vai por sua vez converter novas PrP^C em novas PrP^{Sc} (**Figura 7**). Esse modelo se baseia nos experimentos que mostram que, em um ensaio livre de células, a incubação de PrP^C com grandes quantidades de PrP^{Sc} conferiu resistência à digestão por protease, sugerindo que PrP^{Sc} catalisa a conversão em novas formas resistentes de PrP^{Sc} (KOCISKO e cols., 1994; KOCISKO e cols., 1995). Consequentemente, a isoforma "scrapie" induz conversão de PrP^C em PrP^{Sc}, sendo responsável por sua própria propagação (WEISSMANN, 2004). Nesta hipótese a mudança conformacional é cineticamente controlada; uma grande barreira energética preveniria a conversão espontânea.



Figura 7 – Modelos de conversão de PrP^C para PrP^{Sc}. (a) Modelo de conversão assistido por molde. (b) Modelo de polimerização nucleada por semente. Adaptado de AGUZZI e cols. (2008b).

Diversas abordagens biofísicas têm sido aplicadas a fim de caracterizar as propriedades termodinâmicas de PrP^C e PrP^{Sc}. Estudos demonstraram que a transição entre os dois estados envolve mudanças de hidratação (CORDEIRO e cols., 2004; DE SIMONE e cols., 2005; CORDEIRO e cols., 2005). O diagrama de energia livre e de volume (**Figura 8**) destaca o modelo no qual a isoforma celular está em uma conformação metaestável, e as diferenças envolvem maiores mudanças em volume do que em energia livre. Estudos com alta pressão demonstraram que a isoforma celular é mais hidratada e tem uma superfície acessível ao solvente maior que a proteína recombinante agregada (CORDEIRO e cols., 2004). O papel da hidratação na estabilidade e amiloidogenicidade da PrP tem sido também corroborado por dinâmica molecular (DE SIMONE e cols., 2005).



Figura 8 – **Diagrama de energia e de volume do mau-enovelamanto de PrP.** PrP^{C} (esquerda) pode enovelar para uma isoforma mal-enovelada rica em folhas-β capaz de formar agregados tóxicos e infecciosos (PrP^{Sc}) (direita). A transição entre as espécies é separada por uma grande barreira energética. I e U representam os estágios intermediários e mal-enovelados da proteína. Um fator adjuvante reduziria a barreira de energia livre que previne a conversão, levando a formação de PrP^{Sc} . PrP^{C} apresenta uma acessibilidade ao solvente maior do que a forma mal-enovelada e agregados, e a via de enovelamento também exibe uma barreira cinética no volume de ativação (inserto, modificado de CORDEIRO e cols., 2004). Os estados desnaturados por pressão de α-rPrP (PrP^{C}) e β-rPrP (similar a PrP^{Sc}) são U e U', respectivamente.

Ao longo dos anos, a hipótese "protein-only" vem sendo questionada. Estudos com camundongos transgênicos sugerem que a conversão assistida pelo molde de PrP^{Sc} é auxiliada por outra molécula biológica (SILVA e cols., 2008), que seria o fator que contribui para a barreira de espécies do prion (TELLING e cols., 1995). Sendo a conversão espontânea da PrP^{C} em PrP^{Sc} prevenida por uma barreira energética elevada, somente alterações no equilíbrio, como a presença de um catalisador, por exemplo, levariam a esta conversão (**Figura 8**) (COHEN e PRUSINER, 1998). A interação com um cofator levaria a um decréscimo da acessibilidade ao solvente e uma diminuição do nível de hidratação. Ao interagir com o cofator, segmentos desordenados da proteína podem enovelar e se tornarem menos hidratados. Diversas moléculas vêm sendo promovidas a cofatores adjuvantes da conversão, como moléculas de adesão celular (GAUCZYNSKI e cols., 2001; GAUCZYNSKI e cols., 2006), ácidos nucléicos (SILVA e cols., 2008), e principalmente os glicosaminoglicanos (GAGs) (BEN ZAKEN e cols., 2003).

1.5 PROTEOGLICANOS E GLICOSAMINOGLICANOS

Os proteoglicanos (PGs) são um grupo de glicoconjugados formados por uma porção protéica e uma porção polissacarídica não ramificada denominada glicosaminoglicanos (GAGs). Os GAGs compõem o maior grupo de polissacarídeos sulfatados encontrados em tecidos animais. Esses compostos possuem carga negativa, devido à presença de resíduos de açúcar carboxilados e/ou sulfatados. Nestes polissacarídeos um açúcar carboxilado (um ácido hexurônico) alterna-se através de uma ligação O-glicosídica com um açúcar aminado (uma hexosamina) formando unidades dissacarídicas que se repetem ao longo da cadeia (IOZZO,

1998; PRYDZ e DALEN, 2000; KRESSE e SCHONHERR, 2001; SASISEKHARAN e cols., 2006).

Os PGs atuam como organizadores de tecidos, influenciam o crescimento e a maturação das células de tecidos especializados, desempenham funções como filtros biológicos, modulam a atividade de fatores de crescimento, regulam a fibrilogênese do colágeno, afetam a invasão e o crescimento das células tumorais, regulam o crescimento de neuritos, atraem cátions, atuam na coagulação sangüínea e absorção de variações de pressão (IOZZO, 1998; FUNDERBURGH, 2000; PERRIMON e BERNFIELD, 2000; PRYDZ e DALEN, 2000; KRESSE e SCHONHERR, 2001; BELTING, 2003; SASISEKHARAN e cols., 2006). As cadeias de GAGs são as principais responsáveis pelas funções dos PGs, contudo a cadeia protéica atua não somente como um suporte para os GAGs, mas também apresenta domínios com atividades biológicas, tais como a sinalização celular na gastrulação e na organogênese (IOZZO, 1998; KRAMER e YOST, 2003; WHITELOCK e cols., 2008).

1.5.1 Nomenclatura e aspectos gerais dos GAGs

Os GAGs são classificados de acordo com sua organização estrutural (unidades dissacarídicas) assim como pela extensão e natureza das suas modificações após a polimerização (*N*-sulfatação, *O*-sulfatação e epimerização). Segundo a nomenclatura de JEANLOZ (1960) podem ser divididos nos seguintes grupos (**Figura 9**):

GAG	Ácido hexurônico	Galactose	Hexosamina	Composição dissacarídica
Heparam sulfato/ Heparina	D-Ácido Glicurônico (GlcA) L-Ácido idurônico (IdoA)	-	D-Glicosamina (GlcNAc)	$GlcA \beta(1\rightarrow 4) GlcNAc \alpha((1\rightarrow 4))$ $H = 0 + H + $
Queratam sulfato	-	Galactose (Gal)	D-Glicosamina (GlcNAc)	$Gal \beta(1\rightarrow 4) GlcNAc \beta(1\rightarrow 3)$
Condroitim sulfato	D-Ácido Glicurônico (GlcA)	-	D-Galactosamina (GalNAc)	$\frac{COO^{-}}{H} + \frac{H}{H} $
Dermatam sulfato	D-Ácido Glicurônico (GlcA) L-Ácido idurônico (IdoA)	-	D-Galactosamina (GalNAc)	H H COO ⁻ OH H H H H H H H H H H H H H
Ácido Hialurônico	D-Ácido Glicurônico (GlcA)	-	D-Glicosamina (GlcNAc)	$\begin{array}{c} \begin{array}{c} COO^{-} \\ H \\ H \\ H \\ H \end{array} \begin{array}{c} OH \\ H \\ H \end{array} \begin{array}{c} H \\ H \\ H \\ H \end{array} \begin{array}{c} CH_2OH \\ H \\$

Figura 9 – Estrutura das cadeias dos diferentes GAGs. As estruturas dissacarídicas dos diferentes tipos de glicosaminoglicanos estão representadas sem sulfatação. As diferentes posições de sulfatação em cada GAG estão marcadas por um quadrado de linha tracejada vermelha. Modificado a partir de PRYDZ e DALEN (2000).

Ácido hialurônico (AH):

O AH apresenta uma maior simplicidade na sua composição estrutural. Suas unidades dissacarídicas são constituídas por um ácido glicurônico (GlcA) ligado a uma N-acetilglicosamina (GlcNAc) por ligações $\beta \ 1 \rightarrow 4$, e não apresentam sulfatação, logo, a propriedade aniônica do AH é dada apenas pelos seus grupos carboxila. Diferente dos outros GAGs, o AH não é sintetizado covalentemente ligado à cadeia protéica, sendo portanto classificado simplesmente como GAG (PREHM, 1983a; PREHM, 1983b; ITANO, 2008).

Eles formam polímeros de alto peso molecular, sendo importantes componentes de matriz extracelular, onde interagem não-covalentemente com os PGs. Possuem importantes papéis funcionais na sinalização durante a morfogênese embrionária, reparo celular, lubrificação de articulações, além de estar envolvidos com doenças pulmonares e vasculares (GANDHI e MANCERA, 2008; ITANO, 2008). São particularmente abundantes no tecido conjuntivo, derme, músculos lisos, pulmões, lâmina própria da mucosa e camada adventícia que envolve os vasos sanguíneos (NAOR e cols., 1997).

Condroitim sulfato (CS) / Dermatam sulfato (DS):

CS e DS são considerados como GAGs pertencentes à mesma família por apresentarem em suas unidades dissacarídicas uma N-acetilgalactosamina (GalNAc), também sendo chamados de galactosaminoglicanos (SUGAHARA e KITAGAWA, 2000). O CS tem sua unidade dissacarídica formada por uma GalNAc ligada a um GlcA por ligações $\beta 1 \rightarrow 4$ ou $\beta 1 \rightarrow 3$, e pode apresentar sulfatação nas posições 4- ou 6- da GalNAc, formando os condroitim 4 (condroitim A) ou 6 (condroitim C) sulfatos respectivamente. Já o DS possui resíduos de GalNAc alternados com porções variáveis de resíduos de GlcA e de ácidos idurônico (IdoA), que são formados a partir da epimerização do GlcA durante a polimerização e subsequente sulfatação na posição 4 da GalNAc. O DS pode ser considerado como um variante do condroitim 4-sulfato sendo também chamado de condroitim B. Além disso, o DS é freqüentemente sulfatado na posição 2 do IdoA e pode ser sulfatado na posição 6 da GalNAc. (KOBAYASHI e cols., 1999; TROWBRIDGE e GALLO, 2002; KUSCHE-GULLBERG e KJELLEN, 2003; SUGAHARA e cols., 2003).

CS e DS desempenham funções no desenvolvimento do sistema nervoso central, reparação tecidual, infecção, sinalização com fatores de crescimento, morfogênese e divisão celular (SUGAHARA e cols., 2003; MALAVAKI e cols., 2008). DS participa especificamente na coagulação, estabilidade da matriz extracelular, modulação de resposta inflamatória (TROWBRIDGE e GALLO, 2002) e CS na memória e aprendizado, regulação do crescimento axonal, adesão neuronal, migração e neuritogênese (SUGAHARA e cols., 2003).

Queratam sulfato (QS):

O QS apresenta unidades dissacarídicas compostas por GlcNAc e um açúcar neutro no lugar do ácido hexurônico, uma galactose (Gal), $\beta 1 \rightarrow 3$ ligados. Esse polissacarídeo exibe uma grande variedade de tamanhos e padrões de sulfatação. Está presente na córnea, cartilagem, zona pelúcida e derme (FUNDERBURGH e cols., 1996; FUNDERBURGH, 2000).

Heparam sulfato (HS) / Heparina:

O HS e a heparina são GAGs de estrutura intimamente relacionados. Constituem outro grupo de GAGs, onde a glicosamina é o açúcar aminado e a ligação hexosaminídica está na configuração $\alpha \rightarrow 4$. A glicosamina apresenta-se N-sulfatada (GlcNSO₃), N-acetilada (GlcNAc) ou N-livre (GlcNH₂), ou ainda uma GlcNSO₃ 6-sulfatada. O ácido hexurônico pode ser um GlcA ou um IdoA O-sulfatado na posição 2 (SILVA e DIETRICH, 1975; GALLAGHER, 2001). No HS cerca de 40-50% da glicosamina apresenta-se N-sulfatada (GALLAGHER, 2001), já na heparina essa sulfatação está em torno de 80% e este polissacarídeo consiste majoritariamente de dissacarídeos trisulfatados (NADER e cols., 1987; LINDAHL e cols., 1989; MULLOY e FORSTER, 2000).

É importante destacar que a heparina pode ser isolada a partir de diferentes tecidos animais, sejam eles vertebrados ou invertebrados (NADER e cols., 1999). Nos mamíferos ela é sintetizada e estocada em grânulos citoplasmáticos de mastócitos, sendo liberada como cadeias livres, não ligadas a proteínas, após ativação e degranulação dos mastócitos em eventos associados ao sistema imune. O HS é sintetizado por uma grande variedade de tipos celulares, podendo ser secretado tanto na forma de cadeias livres de GAGs quanto de PGs . É encontrado na superfície celular e na membrana basal (LINDAHL e cols., 1989; PIEPKORN e cols., 1989; SALMIVIRTA e cols., 1996; CAPILA e LINHARDT, 2002; BISHOP e cols., 2007).

Por sua localização, o HS interage com diversas proteínas. Essas interações são importantes fisiologicamente, uma vez que irá modular a função de diversas proteínas como fatores de crescimento, proteínas da matriz extracelular, enzimas lipolíticas, entre outras,

regulando diversas atividades biológicas como sinalização celular, organização do citoesqueleto, migração, inflamação, metástase e formação sináptica (**Figura 10**) (KRAMER e YOST, 2003; BISHOP e cols., 2007). A heparina além de sua conhecida atividade anticoagulante possui outras atividades, como a regulação do metabolismo lipídico, e atividade antiproliferativa entre outras (CISAR e cols., 1989; KRAMER e YOST, 2003; BISHOP e cols., 2007).



Figura 10 – Proteoglicanos de heparan sulfato (HSPG) desempenham diversos papéis fisiológicos na célula. HSPGs funcionam como co-receptores para fatores de crescimento e seus receptores tirosina quinases, presentes na mesma célula (a) ou em uma célula adjacente (b). Transportam quimiocinas através da célula (c) e as apresentam na superfície celular (d). Processamento proteolítico leva ao desprendimento de sindecanas e glipicanas da superfície celular (e), e heparanase cliva as cadeias de HS (f), liberando ligantes (como fatores de crescimento). HSPGs de superfície são ativamente interiorizados por endocitose (g) e podem ser reciclados de volta à superfície ou degradados por lisossomos (h). HSPG também facilitam a adesão celular à matriz extracelular (i) e formam pontes ao citoesqueleto (j). HSPG secretados estão envolvidos com a formação de matrizes extracelulares organizadas formando barreiras fisiológicas (k) e seqüestram hormônios de crescimento para serem liberados depois (l). Serglicinas carregando cadeias de heparina altamente sulfatadas são empacotadas em grânulos secretórios de células hematopoiéticas (m). Finalmente, alguns experimentos sugerem que cadeias de HS existem no núcleo (n), embora sua função neste local seja desconhecida.

Acharan sulfato (AS):

Em 1996, KIM e cols. descreveram um novo GAG que foi denominado acharan sulfato (AS) como sendo o único polissacarídeo sulfatado presente no corpo do molusco *Achatina fulica*. As análises por ressonância magnética nuclear (RMN) determinaram a estrutura \rightarrow 4- α -D-GlcNAc (1 \rightarrow 4)- α -L-IdoA2S(1 \rightarrow (KIM e cols., 1996; VIEIRA e cols., 2004) (**Figura 11**). A análise das estruturas oligossacarídicas identificou uma variação de 5 a 15% na presença de IdoA não sulfatado, unidades N-sulfatadas não foram detectadas (KIM e cols., 1998). Embora apresente algumas semelhanças com o HS e a heparina, o AS apresenta peso molecular, seqüência e homogeneidade estrutural que diferem muito desses GAGs, permitindo a classificação de AS como um novo GAG, porém pertencente ao mesmo grupo do HS e da heparina (KIM e cols., 1996; VIEIRA e cols., 2004). AS foi localizado em diversos órgãos, no muco e na concha do caracol, indicando sua importância para a fisiologia do animal (JEONG e cols., 2001; VIEIRA e cols., 2004).



 \rightarrow 4)-2-acetil,2-deoxi- α -D-glucopiranose(1 \rightarrow 4)-2-sulfo- α -L- ácido idopiranosiluronico (1 \rightarrow

Figura 11 – Estrutura dissacarídica de acharan sulfato.

O AS apresenta diferentes atividades farmacológicas, como inibição de FGF-2 (WANG e cols., 1997), atividade anticoagulante *in vitro* quando este foi quimicamente N-sulfatado (WU e cols., 1998) e *in vivo* (LI e cols., 2004), inibição da angiogênese e atividade antitumoral (GHOSH e cols., 2002; LEE e cols., 2003).

1.6 GLICOSAMINOGLICANOS E AMILOIDOSES

O primeiro achado de que depósitos amilóides continham polissacarídeos foi em 1854 por VIRCHOW. Somente nos anos de 1940, outro estudo veio a identificar e caracterizar esses polissacarídeos. HASS (1942) observou a presença de polissacarídeos aminados e sulfatados em agregados amilóides, que mais tarde foram identificados como GAGs (ANCSIN, 2003).

PGs e GAGs têm sido implicados em muitas doenças conformacionais e detectados em diferentes tipos de depósitos amilóides (SNOW e KISILEVSKY, 1985; YOUNG e cols., 1989; YOUNG e cols., 1992). Além disso, a importância destas moléculas não está restrita apenas à deposição espacial, mas também ao aspecto temporal (MCBRIDE e cols., 1998) e à indução de mudanças conformacionais (WONG e cols., 2001) na amiloidogênese.

De todos os tipos de GAGs, HS e DS são os mais encontrados em depósitos amilóides (HIRSCHFIELD e HAWKINS, 2003). Além dos diversos depósitos amilóides extracelulares, GAGs também se associam a proteínas que formam depósitos intracelulares, como no caso dos corpos de Lewy de pacientes com doença de Parkinson (COHLBERG e cols., 2002). Seu papel nas amiloidoses vem sendo relacionado à nucleação e formação das fibras. Foi observado que GAGs são capazes de estabilizar fibras maduras contra dissociação (YAMAGUCHI e cols., 2003) e degradação proteolítica (GUPTA-BANSAL e cols., 1995) além de interagirem com diversas proteínas amilóides (**Tabela 5**) facilitando a formação de fibras. GAGs não teriam um papel passivo, como simples componentes do depósito amilóide, e sim promovendo conformações protéicas propensas a fibrilizar (COHLBERG e cols., 2002; ANCSIN, 2003).

Proteína	Doença asociada	Efeito
Proteína do prion	Encefalopatia espongiforme	Facilitam formação/propagação de PrP ^{Sc}
α-sinucleína	Doença de Parkinson	Modula formação de fibras
Peptídeo Aß	Doença de Alzheimer	Aumenta a formação de fibra e induz mudança conformacional
IAPP	Diabete tipo II	Acelera formação de fibra e induz mudança conformacional

Tabela 5 – Resumo	da influência	de heparina/HS em	proteínas amilóides.
-------------------	---------------	-------------------	----------------------

1.7 INTERAÇÃO ENTRE PrP E POLISSACARÍDEOS SULFATADOS

GAGs, principalmente heparam sulfato (HS), têm sido objeto de muitos estudos sobre doenças de prion. Snow e colaboradores foram os primeiros a demonstrar a presença de heparam sulfato em placas amilóides de prion em doenças como a doença de Creutzfeldt-Jakob, na síndrome Gerstmann-Sträussler-Scheinker, e scrapie (SNOW e cols., 1989; SNOW e cols., 1990). Desde então, estudos vêm sendo concentrados sobre a função destes carboidratos na patogênese das encefalopatias espongiformes transmissíveis.

Diversas evidências revelam a ligação direta de GAGs à PrP^C tanto em sua forma solúvel quanto na superfície da célula (GABIZON e cols., 1993; CAUGHEY e cols., 1994; WARNER e cols., 2002; PAN e cols., 2002). A diminuição do conteúdo celular de cadeias de heparam sulfato leva a uma forte redução da formação e incorporação de PrP^{Sc} nas células, regulando o metabolismo do prion (BEN ZAKEN e cols., 2003; HIJAZI e cols., 2005). Estas observações indicam que a interação dos proteoglicanos de HS e PrP^C/PrP^{Sc} é essencial para a patogênese das doenças de prion (**Figura 12**).



Figura 12 – Formação de PrP^{Sc} mediada por GAG. O modelo associa a formação de PrP^{Sc} com GAGs, no qual a isoforma "scrapie" se ligaria à isoforma celular através das cadeias de HS, causando mudanças conformacionais. Esta conversão ocorreria na superfície celular ou em vesículas endocíticas, embora o exato local onde essa conversão aconteceria ainda não está esclarecido. Adaptado de CASHMAN e CAUGHEY (2004a).

1.7.1 O efeito paradoxal dos polissacarídeos sulfatados

Após a identificação dos GAGs como consideráveis componentes de agregados amilóides, alguns estudos mostraram que polissacarídeos sulfatados podem inibir o acúmulo de PrPres em células infectadas com scrapie (CAUGHEY e cols., 1993; CAUGHEY e cols., 1994). Não foi observada nenhuma alteração na síntese ou degradação de PrP^C, quando sob efeito de compostos sulfatados administrados de forma exógena, que justificasse a inibição da produção de PrP^{Sc} pela diminuição de PrP^C presente na célula. Contudo, sugere-se que o

efeito observado seja devido a um aumento na taxa de endocitose de PrP^C presente na membrana celular induzida por esses compostos (SHYNG e cols., 1995). Outro trabalho demonstrou que GAGs sulfatados são capazes de inibir a polimerização de peptídeos sintéticos do prion em fibrilas amilóides (PEREZ e cols., 1998).

WONG e cols. (2001) utilizando um ensaio de conversão livre de célula sugeriram que carboidratos sulfatados induzem mudanças conformacionais em PrP-sen e estimulam a conversão de PrP-sen para uma isoforma PrP-res (**Figura 13**), agindo como um cofator no processo patogênico. Além disso, em outro estudo, GAGs exógenos foram capazes de reconstituir a formação de PrP^{Sc} em células com grande redução de GAGs associados à membrana (BEN ZAKEN e cols., 2003). HSPG também estimularam a amplificação de PrP-res *in vitro* (DELEAULT e cols., 2005), e heparina foi capaz de aumentar a agregação de um fragmento da proteína do prion (PrP185-208) e induzir a formação de agregados amilóides tóxicos para células neuronais (KLAJNERT e cols., 2006; CORTIJO-ARELLANO e cols., 2008).



Figura 13 – Carboidratos sulfatados induzem mudança conformacional na PrP^{C}. Espectro de dicroísmo circular de PrP^{C} na ausência e na presença de pentosan polisulfato. Reproduzido de WONG e cols. (2001).

Essa contradição na literatura sobre a capacidade de polissacarídeos sulfatados em estimular ou não a conversão de PrP revela o efeito paradoxal dessas moléculas. A principal hipótese para explicar esse efeito postula que a interação de PrP (PrP^C e/ou PrP^{Sc}) com GAGs endógenos seria necessária para a propagação de PrP^{Sc}, e GAGs exógenos atuariam como inibidores bloqueando a interação de PrP com PG endógenos (**Figura 14**). Sendo assim, faltaria às moléculas exógenas alguma característica importante para facilitar a formação/propagação de PrP^{Sc} por elas próprias, diferente dos GAGs presentes na membrana celular.



Figura 14 – O efeito paradoxal dos GAGs. (A) PrP-sen interagiria com um cofator e com PrP^{Sc} para uma conversão eficiente. (B) GAGs exógenos ou análogos inibiriam a formação de PrP^{Sc} por interagir com PrP-sen na região de ligação com o cofator. (C) Em reações livres de células os três componentes se associariam e estimulariam a conversão. Adaptado de WONG e cols. (2001).

1.7.2 Uso terapêutico dos polissacarídeos sulfatados

Até hoje não existe um tratamento eficaz para EETs (CASHMAN e CAUGHEY, 2004b). Açúcares sulfatados foram as primeiras drogas contra EETs, na época ainda utilizadas como antivirais, e demonstraram prolongar o tempo de incubação da doença e prevenir os sintomas quando administrado profilaticamente em camundongos (KIMBERLIN e WALKER, 1986; FARQUHAR e DICKINSON, 1986; DIRINGER e EHLERS, 1991; LADOGANA e cols., 1992). Infusão intraventricular de pentosan polissulfato, um análogo da heparina, aumentou a sobrevivência de pacientes com DCJ variante (TODD e cols., 2005; HORONCHIK e cols., 2005).

Devido às diversas funções biológicas de HS e seu envolvimento com as doenças de prion, muitos HS miméticos (HMs) tem sido desenvolvidos e testados como drogas antiprion. HMs são moléculas baseadas em dextranas com éteres carboximetilados, ésteres de sulfato, e grupamentos hidrofóbicos, substituindo grupamentos hidroxil. Essas moléculas demonstraram inibir o acúmulo de PrP^{Sc} em culturas sem afetar o nível de PrP^C, efeito de longa duração, e prolongamento da sobrevivência de hamsters infectados com scrapie, sem induzirem efeitos citopáticos ou citostáticos (ADJOU e cols., 2003; SCHONBERGER e cols., 2003; LARRAMENDY-GOZALO e cols., 2007). HMs interagiriam com PrP diminuindo sua ligação ao HS celular. Aumento no tamanho, graus de sulfatação intermediários e introdução de hidrofobicidade modulam positivamente esse efeito (OUIDJA e cols., 2007).

1.7.3 Papel funcional da interação PrP^C:GAG

A capacidade de PrP em interagir com GAGs pode estar envolvida não só na patogênese de prion, mas também na função normal da PrP e HS. PrP^C está localizada principalmente na superfície da célula (OESCH e cols., 1985), e este seria o provável ambiente onde interagiria com os proteoglicanos de superfície celular e com a matriz extracelular. Proteoglicanos de heparam sulfato (HSPG) presentes na membrana celular são principalmente sindecanas (Sdc) ou glipicanas (Gpc) (BISHOP e cols., 2007).

Embora PrP^C seja uma proteína ancorada por GPI na membrana celular, sem possuir nenhum domínio citoplasmático, esta proteína parece estar envolvida no crescimento de neuritos e sobrevivência neuronal através de vias de transdução de sinais, incluindo p59 (Fyn) (membro da família Src-relacionada), PI3 quinase/Akt, proteína quinase A dependente de cAMP, e MAP quinase (CHEN e cols., 2003). *N*-sindecanas são proteoglicanos transmembranares da superfície celular que interagem com quinases Src mediando crescimento de neurito (KINNUNEN e cols., 1998). Portanto, o efeito da PrP na indução de crescimento de neuritos e sobrevivência neuronal pode estar associada a sua interação com HSPG.

GAGs também auxiliam a interação da proteína do prion com outras moléculas, como o receptor de laminina 37-kDa/67-kDa (LRP/LR) (HUNDT e cols., 2001; GAUCZYNSKI e cols., 2006). Assim como o heparam sulfato, LRP/LR é outro ligante ao prion que se acredita ser um receptor de membrana celular para PrP^C e PrP^{Sc} (GAUCZYNSKI e cols., 2001; LEUCHT e cols., 2003). Não somente heparina atua como um cofator modulando o papel de

PrP^C em estimular a atividade de plasminogênio mediada por t-PA, talvez influenciando proteólise celular (PRAUS e cols., 2003).

O tráfego de HSPG e de PrP estão intimamente relacionados. Glipicanas são proteoglicanos ancorados na membrana celular por GPI presentes em "rafts" lipídicos (FRANSSON e cols., 2004). A reciclagem de Gpc-1 envolve a internalização via caveola e degradação em lisossomos. Este processo leva à remoção e degradação enzimática das cadeias de HS (por heparanase) ou degradação não enzimática (por clivagem deaminativa catalizada por óxido nítrico, dependente de Cu (II) -/Zn (II)-). Estes processos geram produtos, tais como oligossacarídeos de anidromanose, que interagem com proteínas oxidadas e o proteosoma, participando do processo de remoção de proteínas mal enoveladas (MANI e cols., 2007). A reciclagem de Gpc-1 é também crucial para a captação de poliaminas, que são moléculas importantes para o crescimento e sobrevivência celular (BELTING e cols., 1999). Gpc-1 possui resíduos de cisteínas conservados no domínio central que são S-nitrosiladas em um ciclo redox dependente de Cu (II)-Cu (I) durante endocitose (DING e cols., 2002). PrP^C é conhecida como ligadora de cobre na região octapeptídica de seu domínio N-terminal (MILLHAUSER, 2007). PrP^C ligada a Cu(II) é capaz de transferir cobre e sustentar a autodegradação de Gpc-1 catalisada por NO in vitro (MANI e cols., 2003). Gpc-1 e PrP^C são co-internalizadas, evento este induzido por íons Cu(II). A expressão de Gpc-1 não influencia a endocitose de PrP^C, no entanto PrP^C controla a interiorização e auto-processamento de Gpc-1 (CHENG e cols., 2006). Polissacarídeos sulfatados e íons Cu(II) também estimulam endocitose de PrP^C (SHYNG e cols., 1995; PAULY e HARRIS, 1998).

1.7.4 Sítios de ligação a Heparina/HS

GAGs são moléculas carregadas negativamente pela presença de grupamento sulfato e carboxílico. Por esta razão, sua interação com proteínas será principalmente iônica, com grupos de aminoácidos básicos. Essa interação, embora pareça aleatória, possui especificidade por determinadas sequências. CARDIN e WEINTRAUB (1989) foram os primeiros a demonstrar a presença de determinados padrões em domínios ligadores de heparina em quatro proteínas investigadas. Eles caracterizaram duas sequências consenso, XBBXBX e XBBBXXBX, onde B é um resíduo básico e X outro aminoácido. SOBEL e cols. (1992) também propuseram uma terceira sequência consenso XBBBXXBBA. Esses motivos não são sempre encontrados em regiões de ligação, com isso, um padrão espacial distinto é também importante em determinar a habilidade de interagir com heparina (MARGALIT e cols., 1993; FROMM e cols., 1997).

Lisina e arginina são aminoácidos básicos que mostram a maior afinidade, arginina ligando 2,5 vezes mais fortemente (FROMM e cols., 1995). De maneira diferente, resíduos de histidina se mostram importantes para interação de heparinas com algumas proteínas, com forte dependência a pH e ligação com cátions (PIXLEY e cols., 2003; HALLGREN e cols., 2004; SEBOLLELA e cols., 2005; ABEDINI e cols., 2006).

A proteína do prion possui uma região conservada em seu domínio N-terminal chamada de região octapeptídica, tendo a sequência consenso PHGGGWGQ (WOPFNER e cols., 1999). Essa região é conhecida por ligar Cu(II), e repetições extras dessa região estão associadas com a doença de prion (GOLDFARB e cols., 1991; YU e cols., 2007). Embora essa região não possua um motivo ligador de heparina, alguns trabalhos a apontam como a

região de interação na proteína do prion. Essa interação seria mediada por íons divalentes por cadeias laterais de histidinas (BRIMACOMBE e cols., 1999; GONZALEZ-IGLESIAS e cols., 2002). Além disso, acredita-se que a interação entre LRP/LR e PrP é dependente de uma ponte formada por HSPG interagindo através da região octapeptídica (HUNDT e cols., 2001). Peptídeos sintéticos compreendendo os aminoácidos 53-93 são capazes de interagir com HS/Heparina conforme avaliado por análises com biosensores (WARNER e cols., 2002).

Além da região octapeptídica, WARNER e cols. (2002) também identificaram mais dois peptídeos sintéticos capazes de interagir com Heparina/HS independentemente, compreendendo as regiões 23-52 e 110-128. A primeira região contém um motivo Cardin-Weintraub com quatro resíduos básicos, KKRPK. PAN e cols. (2002) usando um peptídeo sintético 23-35 identificaram essa região como a única capaz de interagir com GAG, sobre várias outras testadas incluindo aqueles da região octapeptídica. Mais tarde, eles verificaram que a deleção dos primeiros 12 aminoácidos na proteína do prion era suficiente para terminar com a interação com GAGs, e que a presença de repetições extras de peptídeos deixavam a região *N*-terminal mais flexível, interagindo mais fortemente com GAG. Uma porção *N*terminal com maior mobilidade exporia a região de interação a heparina, aumentando sua interação com GAGs (YIN e cols., 2006; YIN e cols., 2007; YU e cols., 2008).

Existe outro motivo Cardin-Weintraub presente na sequência *N*-terminal da proteína do prion, compreendendo os aminoácidos 112-121, que estão incluídos na terceira sequência identificada por WARNER e cols. (2002). O fragmento 185-208 da proteína do prion também foi capaz de interagir com heparina/HS, e essa interação induz a formação de agregados amilóides (KLAJNERT e cols., 2006; CORTIJO-ARELLANO e cols., 2008).

Não só a sequência de aminoácidos é importante para a interação, mas também domínios específicos sacarídicos na cadeia polissacarídica. Resíduos de ácido idurônico de Heparina/HS podem ser 2-O-sulfatados ou não substituídos (livre), e a glucosamina pode ser 6-O-sulfatada, N-acetilada, livre ou N-sulfatada. Os grupamentos GlcN N-livre e 3-O-sulfato (uma modificação não usual encontrada em GlcN) estão envolvidos com ligação específica de HS com a proteína gD do vírus herpes (SHUKLA e cols., 1999). GlcN N-sulfatada, IdoA, grupamentos 6-O-sulfato e 3-O-sulfato são importantes para ligação com antitrombina (CASU e LINDAHL, 2001). Tamanho e grau de sulfatação de HMs foram importantes para a eficácia em inibir endocitose da proteína do prion (OUIDJA e cols., 2007). No entanto, a propriedade do esqueleto sacarídico, não só a densidade de cargas, é importante para interação. Condroitim sulfato e kappa-carragenana possuem densidade de cargas similar, porém não apresentam o mesmo efeito (CAUGHEY e RAYMOND, 1993). Utilizando experimentos de competição, WARNER e cols. (2002) mostraram que removendo o grupamento 2-O-sulfatado reduz-se a capacidade de competir pela interação com PrP^Cheparina. A remoção do grupamento 6-O-sulfato teve menores efeitos. Portanto, heparinas 2-O-sulfatadas têm importante papel para o reconhecimento.

Glicosaminoglicanos, principalmentente Heparan sulfato, são moléculas que compartilham o mesmo ambiente celular que a proteína do prion, sendo então grandes candidatos a parceiros em eventos fisiológicos e também patológicos na célula. Existe ainda na literatura grande controvérsia com relação ao papel desses polissacarídeos no desenvolvimento das doenças de príons. Não existe ainda uma profunda caracterização estrutural sobre essa interação, e são ainda contraditórios os dados sobre as regiões de interação na proteína. Sendo assim, são de grande importância os estudos sobre como se dá a interação entre essas moléculas e seus efeitos.

2 OBJETIVOS
O principal objetivo deste trabalho é caracterizar as mudanças estruturais na proteína do prion induzidas pela interação com heparina, investigando sua participação no processo de conversão estrutural da forma celular para a forma scrapie. Também estão entre os objetivos identificar os sítios de ligação na PrP e na heparina importantes para que ocorra interação, além de investigar o possível efeito dessa interação para a estabilidade da proteína. Para a obtenção dos resultados utilizamos diversas técnicas de ponta em biologia estrutural. Assim, nossos objetivos específicos para este estudo foram:

Avaliar a interação entre Hep e rPrP²³⁻²³¹ em dois pHs diferentes (ácido e neutro), referentes aos encontrados em compartimentos celulares que são possíveis locais de conversão da proteína.

Investigar a influência da interação com Hep na estrutura da proteína, identificando as possíveis mudanças estruturais, através de diversas técnicas espectroscópicas como fluorescência, dicroísmo circular, espalhamento de raios-x a baixos ângulos, ressonância magnética nuclear, entre outras.

Identificar as regiões da proteína e de Hep importantes para a interação entre as duas moléculas.

Avaliar os efeitos da interação com Hep na estabilidade da proteína.

Investigar os efeitos de Hep na agregação e conversão da proteína.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. As heparinas utilizadas, A6039 (NADOS), A8036 (NA) e H3400 (Hep), a sonda tioflavina T, o reagente dietil pirocarbonato e o DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose*) para cultura das células de neuroblastoma, com e sem vermelho de fenol, foram adquiridos de Sigma-Aldrich St. Louis, MO, EUA). Acharan sulfato foi purificado de acordo com VIEIRA e cols. (2004). O soro fetal bovino foi comprado da Cultilab (Campinas, SP, Brasil). A Acrilamida foi obtida de Amersham Bioscience. Todos os experimentos foram realizados com PrP recombinante, obtida por expressão heteróloga em *Eschericha coli*, purificada em nosso laboratório com pureza > 95%.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Expressão, purificação e estoque de rPrP²³⁻²³¹, dos mutantes PrP^{Δ32-121} e PrP^{Δ51-90}

A proteína recombinante de Prion de camundongo rPrP²³⁻²³¹ e os mutantes $PrP^{\Delta 32-121}$ e $PrP^{\Delta 51-90}$ foram expressos em *E. coli* e purificados de acordo com o protocolo proposto por ZAHN e cols. (1997). Todas as PrPs expressas continham seis resíduos de histidina fusionados para facilitar sua purificação. Após a expressão protéica, as células foram homogeneizadas em cloridrato de guanidina (Gdn-HCl) 6 M. A fração protéica solúvel obtida após sonicação e centrifugação foi adicionada a uma coluna contendo resina de níquel-agarose imobilizando a PrP fusionada à histidina. Realizou-se o re-enovelamento oxidativo da

r-PrP ligada à resina, retirando-se lentamente a Gdn-HCl da coluna. A proteína foi eluida com imidazol e a cauda de histidina clivada com α -trombina humana, gentilmente cedida pelo Professor Robson Queiroz Monteiro, do Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro. A protease foi removida da proteína aplicando-se a solução em uma resina de troca iônica Carboxi-Metil celulose (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e a proteína eluida com gradiente de cloreto de sódio (NaCl) de 0 a 500 mM. A cauda de histidina foi removida por diálise contra água. A pureza das proteínas foi determinada por eletroforese em gel de poliacrilamida e suas concentrações foram aferidas através do ϵ^{**} a 280 nm calculado em 63.495 M⁻¹ cm⁻¹ para a rPrP²³⁻²³¹, 33.015 M⁻¹ cm⁻¹ e 41.495 M⁻¹ cm⁻¹ para os mutantes PrP^{Δ32-121} e PrP^{Δ51-90}, respectivamente. As proteínas, depois de devidamente purificadas e clivadas, foram estocadas em água estéril e congeladas a -20° C. Para sua utilização nos experimentos, os estoques foram descongelados e alíquotas foram diluídas nos tampões utilizados nos experimentos para obter-se as concentrações finais desejadas.

**Os coeficientes de extinção molar (ε) foram calculados através do programa ProtParam (www.expasy.ch/tools/protparam.html), a partir da seqüência primária dos polipeptídios estudados.

3.2.2 Síntese e Estoque do Peptídeo ShaPrP (109-149)

O peptídeo foi sintetizado quimicamente em fase sólida e purificado pelos professores Maria Aparecida Juliano e Luiz Juliano Neto do Departamento de Biofísica da UNIFESP (Universidade Federal de São Paulo). Seu peso molecular foi determinado por espectrometria de massa e sua pureza acessada por cromatografia líquida de alta performance de fase reversa (RP-HPLC). O peptídeo ShaPrP (109-149) foi estocado em solução tampão (MES 50 mM pH 5,0), contendo 1% de SDS e 6 M de Uréia. Esta solução permite que o peptídeo permaneça desenovelado e não agregue, podendo ser estocado durante algum tempo. A concentração do peptídeo em solução foi determinada pelo coeficiente de extinção molar** (ϵ) a 280 nm de 8250 M⁻¹ cm⁻¹.

3.2.3 Medidas espectroscópicas

Espalhamento de luz:

As medidas de espalhamento de luz (LS) foram realizadas em espectrofluorímetro ISS PC-1 (ISS, Champaign, IL, EUA). O espalhamento de luz das amostras foi monitorado a 90° em relação à incidência da luz de excitação, e os valores de LS estão diretamente relacionados ao tamanho médio das partículas em solução (SZABO, 2000). Sendo assim, uma vez ocorrendo agregação, observa-se um aumento no espalhamento de luz. As amostras foram iluminadas a 320 nm e coletou-se o valor de espalhamento de luz de 300 a 340 nm. A área correspondente aos valores de intensidade obtidos neste intervalo foi determinada e comparada ao valor de espalhamento de luz inicial (EL_0). A razão EL/EL_0 foi utilizada para se avaliar a extensão da agregação das amostras.

As cinéticas de agregação foram realizadas em função do tempo. Nelas, o comprimento de onda para excitação e emissão é o mesmo: 320 nm, o que nos permite monitorar apenas o espalhamento da luz que ilumina as amostras. Neste experimento, a

solução com proteína foi pré-equilibrada antes da adição de heparina, e a luz de espalhamento foi iluminada e coletada em 320 nm e monitorada em função do tempo.

Também foram realizados experimentos variando a temperatura de 20°C - 84°C através de banho termostatizado conectado ao compartimento onde a amostra se localiza. Enquanto a temperatura da amostra aumentava os dados de espalhamento de luz a 320 nm eram coletados. Os valores de espalhamento após o retorno da temperatura para 20 °C foram coletados ao final do experimento.

Fluorescência:

A fluorescência intrínseca das proteínas resulta da emissão de resíduos aromáticos de triptofano, tirosina e fenilalanina. Esses resíduos, quando excitados em um determinado comprimento de onda, absorvem energia e emitem fluorescência, que (assim como o espalhamento) é medida a um ângulo de 90°. A emissão dos triptofanos é a que mais contribui para o espectro de emissão da proteína. Além disto, o grupamento indol dos resíduos de triptofano é bastante sensível às mudanças de polaridade do meio em que se encontra. Assim, o máximo de emissão de fluorescência deste resíduo depende diretamente da polaridade do ambiente em que o mesmo se encontra, podendo variar de 320 nm a 355 nm (LAKOWICZ, 1999). Quando o resíduo de triptofano se encontra em um meio mais hidrofóbico, como o interior das proteínas, o máximo de emissão fica em torno de 320 nm. Entretanto, quando o triptofano se torna mais exposto ou em ambiente mais polar, ou seja, em maior contato com o solvente, o máximo de emissão se desloca para valores próximos a 355 nm (LAKOWICZ, 1999).

Os espectros de fluorescência foram obtidos em um espectrofluorímetro modelo ISS PC-1 (ISS Inc., Champaign, IL). Os espectros de emissão de triptofano foram obtidos excitando-se a amostra em 280 nm e coletando a emissão na faixa de 300-420 nm. Os espectros foram analisados e comparados pela quantificação do centro de massa (v), que é o ponto que divide o espectro em duas áreas iguais. O centro de massa (v), quando expresso em número de ondas, é diretamente proporcional à energia de emissão, sendo calculado de acordo com a seguinte equação:

$$\langle v \rangle = \sum v_i \cdot F_i / \sum F_i$$
 (eq. 2)

onde F_i é a fluorescência emitida em um número de onda v_i , sendo o somatório realizado a partir de valores apreciáveis de F.

O grau de dissociação (α) é relacionado ao centro de massa (ν) a partir da expressão:

$$\alpha = (\langle v_p \rangle - \langle v_i \rangle)/(\langle v_i \rangle - \langle v_i \rangle)$$
(eq. 3),

onde $\langle v_i \rangle$ e $\langle v_f \rangle$ são os valores iniciais e finais de centro de massa espectral.

A área correspondente aos valores de intensidade obtidos no intervalo de 300-420 nm foi determinada e comparada ao valor inicial (IL_0) . A razão I/I_0 foi utilizada para se avaliar as mudanças no rendimento quântico. Todos os experimentos foram realizados no mínimo três vezes, com lotes diferentes de proteínas.

Cinética rápida:

A fim de acessar os passos iniciais da interação entre rPrP²³⁻²³¹ e Hep foram realizados experimentos de cinética rápida utilizando-se um espectrofluorímetro do tipo *stopped-flow* (**Figura 15**) que permite acompanhar mudanças na fluorescência e espalhamento das amostras induzidas pela interação entre as duas moléculas em tempos muito reduzidos (MANCHENO e cols., 1994).

Nós usamos o modelo SX17MV da Applied Photophysics (London, UK). O monocromador era ajustado a 295 nm para as leituras de fluorescência de triptofano e a 360 nm para as leituras de espalhamento com fendas de 5 nm na entrada e 5 nm na saída. A emissão era captada colocando-se um filtro com cut-off de 320 nm. As amostras eram colocadas nas seringas apropriadas e o sinal analisado usando software do fabricante. Todas as reações foram feitas a temperatura ambiente.



Figura 15 - Esquema simplificado do espectrofluorimetro de *stopped-flow*. O pulso de nitrogênio empurra 50 µl de cada seringa na câmara de mistura.

As concentrações de rPrP²³⁻²³¹ e Hep nas seringas eram 2x a concentração final, uma vez que 50 μ l de cada seringa são misturados para obter-se 100 μ l na câmara de mistura, reduzindo a concentração do conteúdo de cada seringa à metade. O sinal era coletado a 90° da luz incidente e repetido cinco vezes para cada condição. Os pontos nos gráficos são as médias de três experimentos com preparações diferentes de proteína. O tempo morto no aparelho foi de cerca de 2 milissegundos.

Polarização e anisotropia de fluorescência

As medidas de polarização de fluorescência foram realizadas no espectrofluorímetro ISS-PC1 (ISS, Champaign, IL, EUA). É possível se obter informações sobre a forma, o tamanho e a mobilidade de macromoléculas excitando-se um sistema fluorescente com luz plano-polarizada e detectando-se componentes linearmente polarizados da emissão (CANTOR e SCHIMMEL, 1980). Estas medidas se baseiam no princípio da excitação foto seletiva de fluoróforos pela luz polarizada (LAKOWICZ, 1999). Um fluoróforo irá absorver preferencialmente fótons que apresentam vetores elétricos alinhados paralelamente ao seu momento de transição. Em uma solução isotrópica, os fluoróforos estão orientados randomicamente, mas, durante excitação com luz polarizada, podemos excitar seletivamente aquelas moléculas fluorescentes que apresentam dipolos de transição de absorção orientados paralelamente ao vetor elétrico da excitação. Esta excitação seletiva resultará em uma população de fluoróforos parcialmente orientada e em uma emissão de fluorescência parcialmente polarizada. A emissão também irá ocorrer com a luz polarizada ao longo de um eixo fixo no fluoróforo. O ângulo relativo entre esses momentos determina a anisotropia máxima medida. No decorrer desta tese, utilizamos tanto medidas de anisotropia (r), quanto de polarização (P) de fluorescência que são definidas por:

$$r = I_v - I_h / I_v + 2I_h e P = I_v - I_h / I_v + I_h$$
(eq. 4)

onde $I_v e I_h$ são as intensidades de fluorescência da emissão polarizada verticalmente (,) e horizontalmente (,), quando a amostra é excitada com luz verticalmente polarizada. Sendo assim, a técnica de anisotropia de fluorescência tem sido amplamente utilizada para se medir associações proteína:proteína ou proteína:ligante (LAKOWICZ, 1999).

Para os experimentos de polarização utilizou-se a fluorescência intrínseca da proteína $rPrP^{23-231}$ e $rPrP^{\Delta 51-90}$ (não foi possível realizar a mesma medida com $rPrP^{\Delta 32-121}$ devido à diminuição do número de aminoácidos aromáticos pela deleção), sendo excitada em 280 nm e emissão observada através dos filtros W7-54 e WG 335, ou Hep marcada com isotiocianato de fluoresceína – FITC. Hep foi marcada com FITC segundo LIBERDA e cols. (1997). A partir desse protocolo, uma solução aquosa contendo Hep foi misturada a etileno diamino em uma proporção de 2,5:1 (mg Hep:µL ED). Em seguida, N-etil-N'-(3-dimetil-aminopropil) carbodiimida foi adicionada na proporção 1,25:1 (mg Hep:mg carbodiimida). A mistura foi agitada por duas horas em temperatura ambiente e depois aplicada em coluna G25 e liofilizada. A amostra de polissacarídeo foi em seguida dissolvida em tampão carbonato 0,1 M, pH 9,2 e misturada a 200 µL de uma solução de FITC (20 mg FITC em 1 mL de dimetilformamida e 8 mL de etileno glicol). A reação de mistura foi agitada no escuro, a 4º durante 1 hora. Em seguida foram adicionados 200 µL da solução de FITC por mais três vezes. O excesso de fluoresceína foi retirado depois precipitando o polissacarídeo com etanol P.A. (3 volumes de ETOH:1 de solução). Nos ensaios com FITC, na emissão utilizou-se o filtro 3.69, específico para a fluoresceína, e excitou-se a amostra a 485 nm.

Atenuação ("quenching") da fluorescência:

A molécula de acrilamida é comumente utilizada como um atenuador da fluorescência de proteínas (**Figura 16**). Neste caso, a acrilamida ao colidir com o fluoróforo (triptofano) no estado excitado faz com que este retorne ao estado fundamental sem emitir fóton. Isto nos dá idéia sobre a acessibilidade do atenuador ao fluoróforo, fornecendo em conseqüência informação sobre o enovelamento da proteína LAKOWICZ, 1999.



Figura 16 – Estrutura química da acrilamida. Extraído de BESARATINIA e PFEIFER (2005).

Os experimentos de supressão com acrilamida foram realizados com amostras de rPrP²³⁻²³¹ (2 μ M), rPrP²³⁻²³¹ + Hep (2 μ M, 1:1) no tempo 0 (amostra preparada no momento anterior à medida, t=0), e rPrP²³⁻²³¹ + Hep (2 μ M, 1:1) no tempo "over-night" (amostra preparada no dia anterior a medida, t=0/n) em diversas concentrações. A acrilamida foi adicionada seqüencialmente para a concentração final de 80 mM. Os espectros de emissão de triptofano foram obtidos excitando-se a amostra em 295 nm e coletando a emissão na faixa de 315-420 nm. As intensidades de fluorescência foram subtraídas dos respectivos tampões, e a supressão de fluorescência calculada usando a relação (F₀/F), onde F₀ e F são as medidas das intensidades na ausência e na presença de acrilamida, respectivamente. As constantes de supressão de Stern-Volmer (K_{sv}) foram obtidas através da equação:

$$F_0/F = 1 + K_{sv}[Q]$$

 K_{sv} , calculada como a inclinação do plot de Stern-Volmer, é a constante de supressão de Stern-Volmer e daí a medida de acessibilidade aos triptofanos pela acrilamida. [Q] é a concentração do supressor.

Os dados de supressão geralmente são apresentados como gráficos de F_0/F versus [Q]. Isto é porque F_0/F é esperado ser linearmente dependente da concentração do agente supressor. Um gráfico de F_0/F versus [Q] produz um intercepto de 1 sobre o eixo y e uma inclinação igual a K_{SV} . Um gráfico de Stern-Volmer linear geralmente é indicativo de uma classe simples de fluoróforos, todos igualmente acessíveis ao supressor (LAKOWICZ, 1999).

Nesta análise, uma maior exposição do fluoróforo ao solvente resulta em uma menor intensidade de fluorescência, em decorrência das colisões das moléculas de acrilamida com o anel aromático.

Dicroísmo circular:

As medidas de Dicroísmo Circular (CD) são utilizadas para se estudar o conteúdo de estrutura secundária de polipeptídios e proteínas (KELLY e cols., 2005). A espectroscopia de CD mede a diferença na absorção de luz circularmente polarizada para a esquerda e para a direita de uma substância. Espectros de CD na faixa do ultravioleta distante (de 260 a 180 nm) podem caracterizar os diferentes tipos de estruturas secundárias. Valores negativos máximos de elipticidade em 222 e 208 nm indicam a presença de uma estrutura predominantemente em α -hélice, e valores de elipticidade negativos entre 215 e 225 nm sugerem a presença de estrutura em folha- β (JOHNSON, Jr., 1988).

(eq. 5),

As medidas de CD foram realizadas em um espectropolarímetro Jasco J-715 (Jasco Corporation, Tóquio, Japão), utilizando-se uma cubeta circular de 0,01 ou 0,02 cm de caminho óptico a 25°C. Os espectros finais são resultantes de 4 acumulações para cada medida abrangendo comprimentos de onde de 190-260 nm, e subtraídos dos espectros dos respectivos tampões e da heparina. Os resultados são expressos como valores de epipticidade bruta (em miligraus).

Para os ensaios de desnaturação térmica foi utilizada cubeta reta de 2 mm de caminho ótico e o valor da elipticidade foi monitorada a 222 nm em função da temperatura. As amostras foram aquecidas a 2°C por minuto de 20 °C a 85 °C. Os valores de elipticidade também foram subtraídos dos valores do tampão.

Ressonância magnética nuclear:

Para os ensaios de RMN, utilizamos 300 μ M de proteína recombinante do prion uniformemente marcada com ¹⁵N em 200 mM tampão acetato de sódio 20 mM (pH 7.4) ou acetato de sódio 20 mM (pH 5,5), 100 mM NaCl, em 10% D₂O/ 90% H₂O, na presença (1:1 razão molar) ou ausência de Hep. Todos os espectros de ressonância magnética nuclear foram adquiridos a 298K em um espectrômetro Bruker Avance 800 MHz (Bruker, Alemanha). Os espectros foram processados utilizando TOPSPIN 2.1 (Bruker) e analisados com CARA 1.8. Os espectros de HSQC, 1H–15N foram adquiridos com 64 acumulações e com 2048 e 200 pontos em F1 e F2, respectivamente. O assinalamento foi realizado com base nos dados do arquivo star BMR4402 star file (ZAHN e cols., 2000). Os parâmetros de aquisição e processamento usados para a rPrP²³⁻²³¹ livre e com Hep foram os mesmos.

Espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS) e análise dos dados:

As medidas de SAXS foram empregadas para determinarmos padrões estruturais do complexo rPrP:Hep. Esta abordagem estrutural se baseia na medida da densidade eletrônica de uma partícula em solução e fornece informação direta sobre o tamanho, forma e comportamento oligomérico de biomoléculas. Nós medimos através de SAXS os parâmetros gerais da partícula tanto para a rPrP livre quanto para a proteína ligada a Hep. Utilizamos nesses experimentos a rPrP de camundongo com deleção na região amino-terminal que engloba os resíduos 51 a 90 (rPrP^{Δ 51-90}).

Os dados de SAXS foram coletados na linha de luz 2 no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Campinas, São Paulo (KELLERMANN e cols., 1997), utilizando um detector unidimensional sensível à posição (*position-sensitive detector*), com capilar de quartzo e comprimento de onda de 0,1488 nm (1,488 Å), a 22 °C. Os experimentos foram realizados em tampão Tris HCl 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,5 ou Acetato de sódio 5 mM, NaCl 100 mM, pH 5,5 com ligantes a 150 µM.

A aquisição dos dados foi realizada coletando-se várias tomadas de 600-s de cada amostra, o que permitiu controlar qualquer dano causado pela radiação. O módulo do vetor de espalhamento q foi calculado de acordo com ($q = (4\pi/\lambda) \sin 2\theta$), onde λ é o comprimento de onda utilizado e 2 θ é o ângulo de espalhamento. A monodispersidade das amostras foi confirmada através do gráfico de Guinier dos resultados (GUINIER e FOURNET, 1955) e o cálculo do peso molecular dos complexos foi efetuado utilizando a lizosima de clara de ovo de galinha como padrão. As correções usuais para a homogeneidade do detector, intensidade do feixe de luz incidente, absorção da amostra e subtração do branco foram incluídas na rotina de análise e tratamento dos dados. O ajuste dos dados foi realizado utilizando o programa computacional GNOM (SVERGUN e STUHRMANN, 1991).

3.2.4 Agregação do peptídeo Peptídeo ShaPrP (109-149)

Alíquota do estoque de peptídeo ShaPrP (109-149) foi diluída em tampão Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4 ou acetato de sódio 10 mM, NaCl 100 mM, ph 5,5 na concentração de 1 μ M, e sua cinética de agregação monitorada. Após atingir o máximo de agregação, concentrações crescentes de rPrP²³⁻²³¹ (estoque 20 μ M), rPrP²³⁻²³¹ + Hep (1:1, 20 μ M, t=0) ou rPrP²³⁻²³¹ + Hep (1:1, 20 μ M, t=o/n) foram adicionadas, e o espalhamento de luz monitorado.

3.2.5 Agregação mediada por RNA na presença de Hep

Amostras de rPrP²³⁻²³¹ foram diluídas para a concentração de 1 μ M em tampão Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4 na ausência ou na presença de Hep. Após t=o/n, alíquotas de RNAs sintéticos (SAF) e de extratos celulares (N2a e HEPG2) foram adicionados às amostras na concentração final de 1 μ M, e o espalhamento de luz monitorado.

3.2.6 Conversão de PrP em fibras amilóides

O ensaio de conversão *in vitro* de rPrP²³⁻²³¹ em fibras amilóides foi desenvolvido segundo BASKAKOV e BOCHAROVA (2005) com algumas modificações. Amostras de rPrP²³⁻²³¹ foram diluídas para a concentração de 22 µM em tampão acetato de sódio 20 mM, NaCl 150 mM, 6 M de uréia e incubadas a 37°C com agitação contínua, na ausência ou presença de Hep, durante 48 horas. Após o tempo de incubação as amostras foram avaliadas

com relação à ligação de tioflavina T. A sonda tioflavina T é bastante utilizada para a identificação de fibras amilóides, que são compostas por uma estrutura rica em folhas-β. Esta sonda possui grande afinidade por este tipo específico de estrutura, e quando está ligada a ela, nota-se um considerável incremento em seu espectro de emissão de fluorescência em 482 nm (NAIKI e cols., 1989). As amostras contendo esta sonda foram excitadas a 433 nm e a emissão de fluorescência foi coletada de 450 a 550 nm.

3.2.7 Modificação de rPrP²³⁻²³¹ por dietilpirocarbonato (DEPC)

DEPC modifica quimicamente os resíduos de histidina pela carboetoxilação do anel imidazólico (Figura 17).



Figura 17 - Modificação do anel imidazólico de histidina por DEPC.

Primeiramente foi realizada uma curva de saturação de DEPC com 2 μ M de rPrP²³⁻²³¹, em tampão acetato de sódio 10 mM, NaCl 100 mM, pH 5,5, monitorando-se a formação do produto da reação de modificação pelo DEPC pela sua absorbância a 240 nm (**Figura 18**).



Figura 18 - Curva de saturação de DEPC.

A concentração de DEPC escolhida para o experimento seguinte foi de 10 mM para 2 μ M de rPrP²³⁻²³¹. DEPC foi diluído em água no momento do experimento e adicionado à amostra de rPrP²³⁻²³¹ na concentração escolhida, durante 30 minutos em temperatura ambiente (HESP e cols., 2007). Em seguida concentrações crescentes de Hep foram adicionadas às amostras tratadas e não tratadas com DEPC e o espalhamento de luz medido. As amostras foram iluminadas a 320 nm e coletou-se o valor de espalhamento de luz de 300 a 340 nm. A área correspondente aos valores de intensidade obtidos neste intervalo foi determinada e comparada ao valor de espalhamento de luz inicial (EL₀). A razão EL/EL₀ foi utilizada para se avaliar a extensão da agregação das amostras.

3.2.8 Redução de MTT – avaliação do potencial redox celular

Sais de tetrazolium pertencem a um grande grupo de compostos orgânicos heterocíclicos que apresentam alta coloração e formam cristais de formazan insolúveis após redução. A redução do sal de tetrazolium MTT (3[4,5-dimethylthiazol-2-y1]-2,5-diphenyltetrazolium bromide), ilustrada na **Figura 19** é um dos métodos mais utilizados para

medir a proliferação celular e citotoxidade neural. O MTT é reduzido pela atividade mitocondrial em células vivas. O MTT reduzido pelas células é confinado em vesículas intracelulares na forma de cristais de formazan (LIU e cols., 1997).



Figura 19- Esquema de redução do MTT. Adaptado de: www.dojindo.com

Para o ensaio de viabilidade celular utilizamos a rPrP²³⁻²³¹, sozinha ou na presença de Hep. As amostras foram preparadas em tampão Tris 5 mM, NaCl 10 mM, pH 7,4 ou Acetato de sódio 5 mM, NaCl 10 mM, pH 5,5, e o tampão foi previamente filtrado. As amostras foram preparadas imediatamente antes da aplicação nas células (t=0) ou 24 horas após a preparação (t=o/n). A concentração final de proteína de todas as amostras em cada poço foi de 3 μ M. Todas as amostras foram preparadas em fluxo laminar.

A linhagem de células utilizadas foi o neuroblastoma (N2a), mantida em DMEM com 10% de soro fetal e 2% de antibiótico (penicilina e estreptomicina) em uma atmosfera de 5% de CO_2 . Após 3 dias de cultura (mais de 80% de confluência), as células foram plaqueadas em placas de 96 poços, com aproximadamente 5.000 células por poço, e mantidas a 37° C em uma atmosfera de 5% de CO_2 . Depois de 24h de cultura na placa de 96 poços, as células foram lavadas com PBS (estéril) e aplicou-se 75 µL de meio DMEM, sem vermelho de fenol, para não interferir na leitura, com 5% de soro fetal e 2% de antibiótico e 35 µL de

amostra de proteína alcançando-se um volume final de 100 μ L por poço. Após a aplicação das amostras, a placa foi incubada a 37° C em uma atmosfera de 5% de CO₂ por 3 dias.

Passado esse tempo, adicionou-se 25 μ L de MTT a 5 mg/mL em cada poço e incubou-se a placa por 4 horas a 37° C em uma atmosfera de 5% de CO₂ para que as células metabolizassem o MTT. Aplicou-se então 25 μ L de tampão de lise (20% de SDS, dimetilformamida 1:1, 2% de ácido acético, 2,5% de HCl 1 M) a cada poço e após 3 h o formazan produzido, foi quantificado por DO a 540 nm em um leitor de ELISA. Todas as amostras foram feitas em triplicata.

A redução do MTT mede a atividade metabólica das células. Para simplificar nós expressamos os resultados como porcentagem de sobrevivência celular relativa àquela vista no controle, a expressão que utilizamos para calcular a porcentagem de sobrevivência foi a seguinte:

onde a DO do branco foi calculada medindo-se a DO de um poço que continha somente DMEM sem células e a DO controle foi obtida medindo-se a DO de um poço com DMEM e neuro- 2A, na ausência das amostras de proteína.

4 RESULTADOS

4.1 INTERAÇÃO rPrP²³⁻²³¹: HEPARINA

Glicosaminoglicanos, principalmente heparan sulfato, têm sido apontados como receptores celulares para PrP^{Sc} (BEN ZAKEN e cols., 2003; HORONCHIK e cols., 2005), e a interação direta entre PrP e glicanos sulfatados tem sido documentada (WONG e cols., 2001; GONZALEZ-IGLESIAS e cols., 2002; ANDRIEVSKAIA e cols., 2007; YIN e cols., 2007). Heparina, um análogo de HS, foi capaz de interagir com a proteína do prion bovina em pHs ácidos (GONZALEZ-IGLESIAS e cols., 2002; ANDRIEVSKAIA e cols., 2007). A fim de investigar a ligação de Hep (MW ~ 3000 Da) à proteína do prion murina, realizamos experimentos de anisotropia de fluorescência intrínseca da rPrP²³⁻²³¹ (3 μ M) adicionando concentrações crescentes de Hep em dois pHs diferentes, pH 7,4 e pH 5,5 (**Figura 20**).

O aumento dos valores de anisotropia confirma a formação do complexo rPrP^{23-²³¹:Hep, tanto em pH ácido, como já havia sido mostrado com construções de PrP de outros organismos, como também em pH neutro. Podemos observar que a saturação da curva foi mais tardia em pH 5,5 do que em pH 7,4; o plateau foi atingido na razão molar aproximada 1:1 (Hep:PrP) em pH 7,4 e 2:1 (Hep:PrP) em pH 5,5.}



Figura 20 – Interação entre a proteína do prion murina com heparina em dois pHs diferentes. Adição de concentrações crescentes de Hep a 3 μ M de rPrP²³⁻²³¹. A ligação foi monitorada pela anisotropia de fluorescência da proteína a 280 nm. Os experimentos foram realizados em tampão Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4 e acetato de sódio 10 mM, NaCl 100 mM, pH 5,5.

O mesmo experimento de anisotropia foi realizado com diferentes concentrações de rPrP²³⁻²³¹, demonstrando que a interação entre rPrP²³⁻²³¹:Hep é dependente da concentração de proteína (**Figura 21**).



Figura 21 – Anisotropia de fluorescência com diferentes concentrações de rPrP²³⁻²³¹. Adição de concentrações crescentes de Hep a 1 μ M, 2 μ M e 3 μ M de rPrP²³⁻²³¹. A ligação foi monitorada pela anisotropia de fluorescência da proteína a 280nm. Os experimentos foram realizados em tampão Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4 e Acetato de sódio 10 mM, NaCl 100 mM, pH 5,5.

4.2 EFEITO DE HEP NA ESTRUTURA DE rPrP²³⁻²³¹

Após confirmar a interação entre PrP:Hep através das medidas de anisotropia, partimos para investigar as mudanças de estrutura terciária e secundária da proteína provocadas por essa interação. O espectro de emissão de fluorescência de proteínas que apresentam resíduos aromáticos em suas sequências pode fornecer informações valiosas acerca das propriedades estruturais locais (LAKOWICZ, 1999). Os resíduos de triptofano na rPrP²³⁻²³¹ estão localizados na região N-terminal, que é bastante flexível. Estes resíduos estão normalmente expostos ao solvente e o espectro de emissão de fluorescência nesta condição encontra-se desviado para comprimentos de onda maiores e menos energéticos. Medidas de fluorescência intrínseca do triptofano foram realizadas a fim de investigar se a formação do complexo era capaz de alterar o ambiente químico desse fluoróforo (**Figura 22**), dando-nos informações sobre alterações na estrutura terciária da proteína.

Os resultados mostraram que houve um pequeno aumento na emissão de fluorescência de PrP com o aumento da concentração de Hep (**Figura 22A**), e não houve desvio significativo no espectro de emissão (**Figura 22B**). O mesmo resultado foi encontrado nos dois pHs avaliados (não mostrado). Este dado sugere que a interação com Hep causou um aumento no rendimento quântico dos resíduos de triptofano, contudo essa alteração não foi suficiente para provocar uma grande alteração de polaridade no ambiente químico desses aminoácidos.





Figura 22 – Efeito de Hep na emissão de fluorescência do triptofano. (A) Intensidade de fluorescência relativa dos triptofanos de r PrP^{23-231} a 1 μ M com concentrações crescentes de Hep. (B) Espectro de fluorescência de triptofano normalizado na ausência (---) e na presença de Hep (--). As amostras foram excitadas a 280 nm e a emissão coletada de 300 nm a 420 nm. Os experimentos foram realizados em tampão Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4.

A pergunta se heparina induziria mudanças estruturais na proteína do prion, levando a uma conformação "scrapie" ou um intermediário do processo de conversão, foi investigada avaliando-se os espectros de dicroísmo circular (CD) do complexo (**Figura 23**). A rPrP²³⁻²³¹ murina exibiu um típico espectro de CD UV-distante em α -hélice, com mínimos em 222 nm e 208 nm (**inserto da Figura 23**). Observamos que o aumento na concentração de Hep levou a um decréscimo de elipticidade em 222 nm em pH 5,5 e pH 7,4 (**Figura 23**), sugerindo que essa interação afeta a estrutura da proteína.



Figura 23– Efeito de Hep na estrutura secundária de rPrP²³⁻²³¹. Elipcicidade de dicroísmo circular (CD) bruta em 222 nm de rPrP²³⁻²³¹ na presença de diferentes concentrações de heparina em pH 7,4 (–) e pH 5,5 (–). O inserto da figura mostra o espectro de CD de rPrP²³⁻²³¹ (–) e rPrP²³⁻²³¹ + Hep (–) em pH 7,4. Os espectros de CD foram coletados a 25° C, com cubeta circular de 0,01 cm. Os experimentos foram realizados em tampão Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4 e acetato de sódio 10 mM, NaCl 100 mM, pH 5,5, t=0.

Com o objetivo de compreender o mecanismo de interação entre PrP e Hep, incubamos o complexo rPrP²³⁻²³¹:Hep em concentrações crescentes de diversos sais. A importância da força iônica na conversão de PrP tem sido alvo de investigação em diversos estudos (MORRISSEY e SHAKHNOVICH, 1999), e já foi mostrado que a concentração salina pode influenciar na conversão de PrP^C, mediada por PrP^{Sc} (HORIUCHI e CAUGHEY, 1999).

Podemos observar na **Figura 24**, através de medidas de espalhamento de luz, que o complexo é desfeito de acordo com o aumento da força iônica, principalmente na presença de cloreto de magnésio e de cálcio.



Figura 24 – A interação com Hep é dependente de força iônica. Hep foi adicionada a $rPrP^{23-231}$ em concentrações equimolares e o espalhamento de luz a 320 nm foi avaliado em função de concentração crescente dos diversos sais. Os experimentos foram realizados em tampão Tris 10 mM, pH 7,4, t=0.

Os dados de CD também nos mostram que a dissociação do complexo mediada por aumento da força iônica do meio é acompanhada pelo retorno dos sinais de CD da proteína (Figura 25).



Figura 25 – **Modulação do efeito de Hep na estrutura secundária de rPrP**²³⁻²³¹ **por NaCl.** Elipticidade bruta de CD em 222 nm de rPrP²³⁻²³¹:Hep na presença de diferentes concentrações de NaCl. O inserto da figura mostra o espectro de CD de rPrP²³⁻²³¹:Hep na ausência de NaCl (—) e na presença de 400 mM de NaCl (—). Os espectros de CD foram coletados a 25° C, com cubeta circular de 0,01 cm. O experimento foi realizado em tampão Tris 10 mM, , pH 7,4, t=0.

Também realizamos medidas de espalhamento de luz para investigarmos o efeito de Hep no estado de oligomerização da proteína, e podemos observar que o aumento da concentração de Hep foi acompanhado por um aumento no espalhamento de luz (**Figura 26**), sugerindo a formação de oligômeros/agregados, o que também pôde ser confirmado a olho nu pela observação de turbidez da amostra na presença de Hep. Essa oligomerização/agregação foi mais acentuada em pH 5,5 (**Figura 26**).



Figura 26 - Efeito de Hep na agregação de rPrP²³⁻²³¹. Espalhamento de luz de rPrP²³⁻²³¹ (2 μ M) na presença de diferentes concentrações de heparina em pH 7,4 (—) e pH 5,5 (—). Todos os espectros foram subtraídos dos respectivos tampões e do espectro de Hep e o resultado é média de 3 espectros. Intensidade de fluorescência a 90° foi medida iluminando as amostras em 280 nm e coletando a emissão de 300 nm a 420 nm. Os experimentos foram realizados em tampão Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4 e acetato de sódio 10 mM, NaCl 100 mM, pH 5,5.

A fim de acessar os passos iniciais da formação do complexo PrP:Hep, foram realizados experimentos de cinética rápida através de medidas de "stopped-flow" em diferentes concentrações de Hep, monitorando tanto as variações de fluorescência quanto as mudanças de espalhamento de luz da proteína. Um exemplo do sinal adquirido é mostrado na **Figura 27**, onde podemos observar um aumento na intensidade de fluorescência e no espalhamento de luz, seguido por um decréscimo a partir de 6 segundos.



Figura 27 – Exemplo do sinal obtido por cinética rápida. (A) Amplitude de fluorescência e (B) amplitude de espalhamento para amostras de rPrP²³⁻²³¹ 2 μ M misturadas a Hep 4 μ M. O comprimento de excitação para fluorescência foi de 295 nm e de 360 nm para o espalhamento. Os experimentos foram realizados em tampão Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4 e acetato de sódio 10 mM, NaCl 100 mM, pH 5,5.

Para todas as concentrações de Hep estudadas, todas as curvas foram fitadas por uma função exponencial simples, e as amplitudes de fluorescência (AF) (**Figura 28**), amplitudes de espalhamento (AE) (**Figura 29**), e constantes de velocidade observadas (k_{obs}) (**Figura 30**) obtidas. Tanto as AFs quanto as AEs foram maiores em pH 5,5. Além disso, a k_{obs} em pH ácido também foi maior, mostrando que nesse pH os efeitos da Hep na estrutura e oligomerização da proteína são comparativamente mais pronunciados, além de ocorrerem com uma maior velocidade. Nos dois pHs a velocidade é dependente da concentração de ligante.



Figura 28 – Amplitude de fluorescência observada para as amostras em pH 5,5 e pH 7,4. Concentrações crescentes de Hep foram misturadas a 2 μ M de rPrP²³⁻²³¹, e para cada concentração de Hep foi obtido um sinal de AF em função do tempo. O ajuste de cada curva forneceu os valores de AF para cada concentração. Os experimentos foram realizados em tampão Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4 e acetato de sódio 10 mM, NaCl 100 mM, pH 5,5.



Figura 29 – Amplitudes de espalhamento observadas para as amostras em pH 5,5 e pH 7,4. Concentrações crescentes de Hep foram misturadas a 2 μ M de rPrP²³⁻²³¹, e para cada concentração de Hep foi obtido um sinal de AE em função do tempo. O ajuste de cada curva forneceu os valores de AE para cada concentração. Os experimentos foram realizados em tampão Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4 e acetato de sódio 10 mM, NaCl 100 mM, pH 5,5.



Figura 30 – Constantes de velocidade observadas de fluorescência (A) e de espalhamento (B) para as amostras em pH 5,5 e pH 7,4. Concentrações crescentes de Hep foram misturadas a 2 μ M de rPrP²³⁻²³¹, e para cada concentração de Hep foi obtido um sinal de AF ou AE em função do tempo. O ajuste de cada curva forneceu os valores de fluorescência e k_{obs} de espalhamento para cada concentração. Os experimentos foram realizados em tampão Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4 e acetato de sódio 10 mM, NaCl 100 mM, pH 5,5.

A fim de avaliar o fenômeno de reversão do efeito da heparina após 6 segundos de interação, realizamos experimentos de cinética longa para avaliar a extensão de reversão do processo de agregação. Concentrações equimolares de heparina foram adicionadas a uma solução pré-equilibrada de rPrP²³⁻²³¹ em pH 5,5 ou pH 7,4 (**Figura 31**). Hep induziu um aumento imediato no espalhamento de luz, chegando a valores correspondentes à formação de grandes agregados, principalmente em pH 5,5. Este efeito foi subsequentemente seguido por uma diminuição da intensidade, sugerindo um processo de reorganização que após 6 a 7 horas retorna quase completamente aos valores iniciais (**Figura 31**).



Figura 31 – **Cinética lenta de agregação de rPrP²³⁻²³¹ com Hep.** Valores de espalhamento de luz a 320 nm foram medidos em função do tempo. rPrP²³⁻²³¹ e heparina a 2 μ M. A seta indica o momento da diluição de heparina no tampão. Os experimentos foram realizados em tampão Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4 (—) e acetato de sódio 10 mM, NaCl 100 mM, pH 5,5 (—). As amostras permaneceram por todo o tempo da cinética em agitação para evitar possível precipitação.

Pudemos observar também esse efeito utilizando espectroscopia de CD em UVdistante (**Figura 32**). Logo após a diluição de Hep na amostra contendo PrP podemos observar uma diminuição dos valores de elipticidade nos dois pHs analisados (**Figura 32A**). Além disso, 20 horas depois (t=o/n) a estrutura da proteína retornou em pH 7,4 mas não em pH 5,5 (**Figura 32B**). Esta diferença entre pHs pode ser resultado de parte da proteína ainda permanecer agregada ou por uma diferença de efeito na estrutura da proteína quando o complexo é formado em pH 5,5.

A reversão nos valores de intensidade de fluorescência também foi avaliada. Amostras de rPrP²³⁻²³¹ contendo diferentes concentrações de Hep tiveram seus espectros de emissão de fluorescência coletados nos tempos t=o e t=o/n (**Figura 33**). Podemos observar um aumento relativo na intensidade de fluorescência de PrP no tempo t=o, porém as mesmas amostras após t=o/n apresentaram uma intensidade de fluorescência menor que a intensidade da proteína, com o mesmo tempo, sozinha. Esse dado mostra que o aumento de fluorescência induzido por Hep é revertido, e, além disso, essa interação provocou uma subseqüente supressão da fluorescência da proteína, com a Hep atuando como supressor da fluorescência dos triptofanos.



Figura 32 – Reversão do efeito de Hep acompanhado por CD. Espectros de CD de rPrP²³⁻²³¹ sozinha ou na presença de Hep (1:1) em pH 7,4 (–) e pH 5,5 (–). rPrP²³⁻²³¹ e Hep a 30 μ M. Espectros do complexo foram coletados das amostras preparadas no momento da medida (---, t=0) (A) e 20 horas depois (---, t=o/n) (B). Os espectros foram coletados a 25°C, com cubeta circular de 0,02 cm.


Figura 33 - Reversão do efeito de Hep acompanhado por fluorescência. Intensidade de fluorescência relativa do triptofano de rPrP²³⁻²³¹ a 1 μ M com concentrações crescentes de Hep. Espectros foram coletados das amostras preparadas no momento da medida (-, t=0) e 20 horas depois (-, t=o/n). Os experimentos foram realizados em tampão Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4. As amostras foram excitadas a 280 nm e a emissão coletada de 300 nm a 420 nm.

Observando a reversão dos efeitos de Hep, surge a pergunta se Hep e PrP permanecem complexadas após t=o/n. Para responder essa pergunta, Hep foi marcada com o fluoróforo isotiocianato de fluoresceína e sua anisotropia de fluorescência medida ao longo do tempo (**Figura 34**). O que se observa é um aumento da anisotropia seguida pela adição de rPrP²³⁻²³¹ à amostra (seta no gráfico), seguida por um decréscimo dos valores. No entanto, neste caso os valores não retornaram aos valores iniciais, mostrando que o aumento de anisotropia observado foi correspondente à ligação de heparina à PrP e formação de agregados. Após o tempo necessário para o retorno dos valores de espalhamento a amostra permanece com valores de anisotropia acima dos valores de Hep livre, mostrando que esta permanece interagindo com rPrP²³⁻²³¹.



Figura 34 – **Cinética lenta monitorando a anisotropia de fluorescência de Hep.** Variação dos valores de anisotropia de fluorescência de Hep-FITC a 485 nm foram medidos em função do tempo. Para emissão utilizou-se o filtro 3.69. rPrP²³⁻²³¹ e heparina a 2 μ M. A seta indica o momento da diluição de rPrP²³⁻²³¹ no tampão. O experimento foi realizado em tampão Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4. As amostras permaneceram por todo o tempo da cinética em agitação para evitar possível precipitação.

Para investigar mudanças provocadas por Hep no enovelamento da proteína, realizamos experimentos de supressão de fluorescência, que neste caso nos dará informação sobre a acessibilidade dos resíduos de triptofano à molécula supressora utilizada, acrilamida. Os resíduos de triptofano de PrP estão principalmente situados na região N-terminal, expostos ao solvente. Mudanças no enovelamento da proteína, como por exemplo, ganho de estrutura nessa região, poderiam diminuir a exposição desses resíduos de aminoácidos ao solvente. Na

Figura 35 mostramos os plots de Stern-Volmer para cada condição analisada; rPrP²³⁻²³¹, rPrP²³⁻²³¹:Hep (t=0, 1:1) e rPrP²³⁻²³¹:Hep (t=o/n, 1:1). O aumento da concentração de acrilamida provoca uma diminuição da intensidade de fluorescência da proteína, com consequente aumento da razão F_0/F . A interação com Hep, seguida pela agregação, resultou na diminuição da acessibilidade da acrilamida aos resíduos de triptofano. Após a desagregação os valores retornaram a valores próximos aos da proteína livre, mesmo formando complexo com Hep (**Tabela 6**). O plot observado para todas as condições foge à linearidade, mostrando que existe mais de uma população de triptofanos, respondendo de maneira diferente, com acessibilidade diferente ao supressor. O mesmo resultado foi observado para os dois pHs analisados.

Amostra	K _{sv} pH 7,4 (M ⁻¹)	K _{sv} pH 5,5 (M ⁻¹)
rPrP ²³⁻²³¹	56,2 ± 3,4	43,5 ± 3,15
$rPrP^{23-231} + Hep, t=0$	38,7 ± 4,0	$28,9\pm2,1$
$rPrP^{23-231} + Hep, t=o/n$	51,9 ± 1,9	$38,3 \pm 2,0$

Tabela 6 – Contantes de Stern-Volmer para as amostras de PrP livre ou formando complexo com Hep.



Figura 35 – Plot de Stern-Volmer para supressão da fluorescência intrínseca de triptofanos de rPrP²³⁻²³¹ por acrilamida. Amostras de PrP e Hep na concentração de 2 μ M (1:1) em pH 7,4 (A) e 5,5 (B). As curvas foram adquiridas no tempo t=0 e em t=o/n. A excitação foi realizada a 295 nm, e a emissão coletada de 315 nm a 420 nm. Os experimentos foram realizados em tampão Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4 e acetato de sódio 10 mM, NaCl 100 mM, pH 5,5.

Existe um paradoxo na literatura sobre os efeitos de polissacarídeos sulfatados, em especial heparina e heparan sulfato, no processo de conversão da proteína do prion. Alguns autores demonstraram a indução da formação de fibras por parte dessas moléculas (CORTIJO-ARELLANO e cols., 2008). Outros demonstraram um efeito inibidor (PEREZ e cols., 1998). A fim de avaliar se em nosso modelo Hep era capaz de induzir a formação de agregados amilóides, utilizamos o corante tioflavina T em amostras de rPrP²³⁻²³¹ agregadas pela presença de heparina no t=0 e no t=o/n (Figura 36). A sonda tioflavina T (ThT) é bastante utilizada para a identificação de fibras amilóides, que são ricas em folhas- β . Esta sonda possui grande afinidade por este tipo específico de estrutura e, quando ligada a ela, apresenta um considerável incremento em seu espectro de emissão de fluorescência em 482 nm (KREBS e cols., 2005). Podemos observar na Figura 36 que nenhuma das amostras de PrP ou PrP conjugada a Hep foi capaz de interagir com ThT.



Figura 36 – Hep não induz a formação de fibras amilóides de rPrP²³⁻²³¹. Amostras de rPrP²³⁻²³¹ (3 μ M) foram incubadas com Hep (6 μ M) nos tempos t=0 e t=o/n e em seguida foi adicionada 20 μ M de ThT. A proteína Sup35 (PALHANO e cols., 2009) foi utilizada como controle positivo. ThT livre foi utilizada como controle negativo. As amostras foram excitadas em 450 nm e a emissão coletada de 465 nm a 520 nm.

No intuito de melhor caracterizar se a ligação com Hep provocava alguma mudança na estrutura da proteína, após a reversão da agregação, partimos para análises com maior resolução estrutural. Uma das técnicas utilizadas foi o espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS). Esta técnica fornece informação sobre tamanho, forma e estrutura oligomérica de biomoléculas em solução. Nos experimentos de SAXS não foi possível obter amostras homogêneas para rPrP²³⁻²³¹, por isso nesses experimentos utilizamos o mutante $rPrP^{\Delta 51-90}$. A regressão linear da função de espalhamento obtida para as amostras nos dá o raio de giro da molécula (GUINIER e FOURNET, 1955). Tanto a proteína sozinha quanto proteína complexada com Hep apresentaram aproximadamente o mesmo raio (19 Å para a PrP e 20 Å para o complexo) (Figura 37A). Este resultado sugere que a proteína tenha retornado ao seu estado monomérico após t=o/n, e que não houve nenhuma mudanca drástica no seu envelope molecular. Por ser uma molécula bastante pequena, a presença da molécula de Hep não é suficiente para aumentar significativamente o raio de giro de PrP. Outra análise possível dos dados obtidos é o plot de Kratky. Com ele obtemos informação sobre a compacidade da molécula através da intensidade de raios-X espalhada (FITZKEE e ROSE, 2004). Uma proteína globular apresenta um plot em forma de sino com um máximo definido. Uma proteína parcialmente enovelada possui uma região definida em valores de "q" (vetor de espalhamento) menores e aumento da intensidade em "q" maiores (BOTELHO e cols., 2003; FITZKEE e ROSE, 2004). Podemos observar na Figura 37B que rPr $P^{\Delta 51-90}$ apresentou um plot de Kratky condizente com o esperado, com um máximo definido e uma região em "q" maiores com alguma dispersão, já que essa é uma proteína que possui parte de sua estrutura bastante flexível. No caso do complexo com Hep, ainda podemos observar um máximo definido, em uma dispersão maior dos pontos em "q" maiores, sugerindo uma maior liberdade conformacional. Esses dados sugerem que a interação com Hep, mesmo após agregação, não



causa uma grande modificação no envelope molecular da proteína, mas indica que houve um alongamento da estrutura protéica.

Figura 37 – Plot de Guinier e plot de Kratky para rPrP^{Δ 51-90} (–) e rPrP^{Δ 51-90}:Hep (–). rPrP^{Δ 51-90} e Hep a 150 μ M. Amostras em tampão acetato de sódio 10 mM, NaCl 100 mM, pH 5,5.

Outra metodologia utilizada para caracterizar mudanças na estrutura de PrP foi a ressonância magnética nuclear (RMN). Análises de RMN de PrP^C em pH 4,5 e 5,5 revelaram que o Nterminal da proteína é altamente flexível e não estruturado; de maneira diferente, a região Cterminal possui um domínio globular bem estruturado, rico em α -hélice (DONNE e cols., 1997; ZAHN e cols., 2000). Nós realizamos experimentos bidimensionais de correlação heteronuclear ¹H-¹⁵N (HSQC) de rPrP²³⁻²³¹ na presença e na ausência de Hep em pH 5,5 (Figura 38) e pH 7,4 (Figura 39). Espectros de HSQC apresentaram um pico para cada grupamento amida na molécula (exceto aqueles envolvendo prolinas). De acordo com a sequência de mrPrP²³⁻²³¹, 288 picos HN eram esperados no HSQC. Nós encontramos 260 picos com boa resolução na proteína livre. Hep foi adicionada, e após a amostra alcançar o equilíbrio (t=o/n) os espectros foram coletados (Figura 38 e 39). Comparando-se os espectros encontramos a superposição de diversos deslocamentos químicos nos dois pHs, indicando que Hep não causa uma mudança na conformação da proteína. Ainda assim, existem algumas diferenças no deslocamento químico entre os espectros da proteína livre e do complexo em aminoácidos da região N-terminal (setas laranjas) e C-terminal (setas verdes). Além disso, a área entre 7,6-8,4 ppm de ¹H e 124-129 ppm de ¹⁵N de deslocamentos químicos apresenta diversos picos adicionais nos espectros dos complexos. Essa extensão espectral de ¹H é populada por diversos picos amídicos de cadeias polipeptídicas desenoveladas (Figura 38 e 39). O efeito de Hep na estrutura da proteína foi o mesmo nos dois pHs, mostrando que o resultado observado por espectroscopia de CD (Figura 32) se deu por diferenças na solubilidade da proteína, que em pH 5,5 permaneceu mais agregada do que em pH 7,4; ainda assim podemos apontar mudancas em alguns deslocamentos químicos diferentes entre os pHs.



Figura 38 – Efeito de Hep na estrutura da proteína do prion por RMN em pH 5,5. Espectros de HSQC sobrepostos de rPrP²³⁻²³¹ livre (preto) ligada à Hep (vermelho) mostrando diferenças em deslocamentos químicos em pH 5,5. Os experimentos foram realizados em tampão acetato de sódio 10 mM, NaCl 100 mM, pH 5,5.



Figura 39 – Efeito de Hep na estrutura da proteína do prion por RMN em pH 7,4. Espectros de HSQC sobrepostos de rPrP²³⁻²³¹ livre (preto) ligada à Hep (vermelho) mostrando diferenças em deslocamentos químicos em pH 7,4. Os experimentos foram realizados em tampão fosfato de sódio 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4.

É proposto que a interação com polissacarídeos sulfatados induz mudanças conformacionais na proteína do prion, com consequente conversão em PrP^{Sc} (WONG e cols., 2001). Com base nessa informação, testamos a toxicidade do complexo PrP:Hep em cultura de células de neuroblastoma, adicionando o complexo solúvel (t=o/n) e principalmente o complexo agregado (t=0). Células da linhagem de neuroblastoma são bem estabelecidas e caracterizadas para experimentos com a proteína do prion (BUTLER e cols., 1988; WINDL e cols., 1999). O ensaio utilizado para testar a toxicidade dos complexos foi o ensaio de redução de MTT (SORIANO e cols., 2003). O MTT é captado do meio de cultura por endocitose sendo consequentemente reduzido a formazan pela NADH redutase, entre outras enzimas. A quantidade de formazan reflete o potencial redutor do citoplasma, apresentando uma boa correlação com testes de viabilidade (LIU e cols., 1997; LOSKE e cols., 1998; SORIANO e cols., 2003; REIXACH e cols., 2004). Podemos observar que não houve nenhum percentual de morte significativo para as amostras do complexo agregado tanto em pH 7,4 quanto em pH 5,5 (Figura 40). O mesmo resultado foi obtido para as amostras do complexo solúvel (não mostrado). Estes dados mostram que Hep não foi capaz por si só de induzir mudanças estruturais que tornassem o complexo PrP:Hep tóxico para as células em cultura.



Figura 40 - Toxicidade dos complexos PrP:Hep. Ensaio de toxicidade por redução de MTT. () Células N2a não tratadas; () Células N2a tratadas com DMSO; () Células N2a tratadas com tampão; () Células N2a tratadas com Hep a 3 μ M; () Células N2a tratadas com PrP23-231 a 3 μ M; () Células N2a tratadas com complexo rPrP²³⁻²³¹:Hep(t=0) 3 μ M (1:1). Os experimentos foram realizados em tampão Tris 5 mM, NaCl 10 M, pH 7,4 e acetato de sódio 5 M, NaCl 10 mM, pH 5,5.

4.4 REGIÕES IMPORTANTES PARA A FORMAÇÃO DO COMPLEXO PrP:HEP

O N-terminal de PrP^C possui importante contribuição para a patogênese (LAWSON e cols., 2001; ZANUSSO e cols., 2004) assim como agregação de rPrP (FRANKENFIELD e cols., 2005). Algumas evidências vêm apontando a região N-terminal de PrP como sítio de ligação para GAGs (SHYNG e cols., 1995; CHEN e cols., 1995; GONZALEZ-IGLESIAS e cols., 2002; YIN e cols., 2006). Contudo, outros autores reportaram, utilizando fragmentos ou peptídeos sintéticos, a interação com outros sítios da proteína, incluindo regiões do domínio C-terminal (WARNER e cols., 2002; CORTIJO-ARELLANO e cols., 2008). Existe ainda o debate sobre que resíduos seriam importantes para a interação.

Um dos ligantes de PrP mais conhecidos por interagir com a região N-terminal da proteína é o cobre. O cobre interage fisiologicamente com a proteína do prion através da região octapeptídica, entre os aminoácidos 50 a 90 (VILES e cols., 1999). Sua interação é capaz de induzir mudanças na conformação da proteína e facilita sua auto associação (LINDEN e cols., 2008). GONZALEZ-IGLESIAS e cols. (2002) propuseram que o Cu(II) faria uma ponte promovendo a interação de GAGs com os resíduos de histidina da proteína do prion presentes nessa região. Com o objetivo de elucidar as regiões da proteína rPrP²³⁻²³¹ importantes para interação com Hep, primeiramente avaliamos a interação dessa proteína com heparina na presença de cobre (**Figura 41**). O que podemos observar é que as duas moléculas apresentaram um efeito aditivo em induzir diminuição de sinal de CD, possivelmente através da ligação à região octapeptídica (**Figura 41**).

119



Figura 41 – Efeito do cobre em associação com Hep na proteína do prion. rPrP23-231 30 μ M, Hep 15 μ M e CuCl₂ 0,2 μ M. Experimento realizado em tampão Tris 100 mM, NaCl 10 M, pH 7,4.

Para investigar mais profundamente o papel da região octapeptídica de PrP, nós investigamos, através de medidas de anisotropia, a interação entre Hep e rPrP^{Δ 51-90}, mutante de PrP que não possui região octapeptídica (**Figura 42A**). Concentrações crescentes de Hep não levaram a mudanças significativas na anisotropia de rPrP^{Δ 51-90} em pH 7,4, demonstrando a importância dessa região para a interação proteína-Hep em pHs neutros. Ao contrário, pode-se notar que houve interação em pH 5,5 mesmo faltando essa região da proteína, sugerindo a existência de outros sítios de ligação na sequência da proteína do prion. Além disso, observamos esse mesmo padrão de interação monitorando o aumento do espalhamento de luz induzido por Hep em rPrP^{Δ 32-121} (**Figura 42B**). Houve mudança na intensidade somente quando a reação aconteceu em pH 5,5 (**Figura 42B**).



Figura 42 – Importância do domínio N-terminal para interação com Hep. (A) Adição de quantidades crescentes de heparina a 2 μ M de rPrP^{Δ 51-90} em pH 7,4 (—) e pH 5,5 (—). A interação foi monitorada por anisotropia de fluorescência a 280 nm. (B) Espalhamento de luz relativo de rPrP^{Δ 32-121} na presença de diferentes concentrações de Hep em pH 7,4 e pH 5,5. Os experimentos foram realizados em tampão Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4 e acetato de sódio 10 mM, NaCl 100 mM, pH 5,5.

GONZALEZ-IGLESIAS e cols. (2002) sugeriram a participação de resíduos de histidina na interação da proteína do prion com polissacarídeos sulfatados. A histidina é o único aminoácido cuja cadeia lateral pode servir tanto como um ácido quanto como uma base na faixa de pH fisiológico (MARKLEY, 1975). Para investigar o papel das histidinas na interação com Hep, amostras de rPrP²³⁻²³¹ foram tratadas com DEPC (modificador de histidinas) e em seguida o espalhamento induzido por Hep nessa amostra foi monitorado. O resultado da **Figura 43** nos mostra que após o tratamento com DEPC a Hep não é mais capaz de induzir a agregação da proteína, mostrando que esse aminoácido (e, por conseguinte regiões onde esse aminoácido esteja presente) é importante para a interação PrP:Hep.



Figura 43 – Importância de resíduos de histidina para a interação entre PrP:Hep. Amostras de rPrP²³⁻²³¹ 2 μ M foram incubadas com DEPC 10 mM, e após 30 minutos alíquotas de Hep foram adicionadas à amostra (—). Como controle positivo temos os valores de espalhamento da amostra não tratada com DEPC na presença de Hep (—). Os experimentos foram realizados em tampão acetato de sódio 10 mM, NaCl 100 mM, pH 5,5.

Além da presença de motivos específicos na sequência da proteína, para que haja ligação efetiva entre PrP:GAG deve existir também características específicas na estrutura do polissacarídeo. Glicanas sulfadas são conhecidas por reduzir a formação de PrP^{Sc} em células em cultura (CAUGHEY e cols., 1994; PRIOLA e CAUGHEY, 1994), portanto o estudo sobre domínios estruturais específicos é bastante importante para o desenvolvimento racional de drogas anti-prion. Uma série de heparan miméticos (HM) têm sido desenvolvidos, e foi mostrado que estes são capazes de inibir a endocitose de PrP^{Sc} (SCHONBERGER e cols., 2003). Tamanho e grau de sulfatação destes compostos se mostraram importantes para sua eficácia (OUIDJA e cols., 2007). A Heparina é composta por dissacarídeos repetitivos de ácido hexurônico (α -L-idurônico ou β -D-glicurônico) ligados 1,4 a uma α -D-glicosamina com substituições variadas de O-sulfato, N-sulfato e grupos N-acetil. WARNER e cols. (2002), utilizando um ensaio de competição, sugeriu que os grupamentos O-sulfatados da heparina possuem importância significativa para o reconhecimento de PrP:GST humana. Nesta tese, utilizamos três heparinas modificadas diferentes, e monitoramos sua ligação através de anisotropia de fluorescência afim de investigar a importância das substituições. Nosso resultados revelam que heparina N-acetilada (NA, -4)- α -L-IdoA2(OSO₃⁻)-(1 \rightarrow 4)- α -D-GlcNAc-,6(OSO₃⁻)-1-) foi capaz de interagir com rPrP²³⁻²³¹ na mesma proporção que Hep não modificada. No entanto, heparina N-acetilada de-O-sulfatada (NADOS, -4)- α -L-IdoA-(1 \rightarrow 4)- α -D-GlcNAc-,6(OSO₃⁻)-1-) e acharan sulfato (um heparinóide de ocorrência natural formado por dissacarídeos -4)- α -L-IdoA2(OSO₃⁻)-(1 \rightarrow 4)- α -D-GlcNAc-1-) não demonstraram nenhuma interação (Figura 44). Este resultado indica que não só a 2-O-sulfatação, mas também a 6-O-sulfatação, são grupamentos importantes para a interação prion-heparina.



Figura 44 – Avaliação da interação entre heparinas modificadas e rPrP²³⁻²³¹ por anisotropia de fluorescência. Adição de concentrações crescentes de heparinas a 2 μ M de rPrP²³⁻²³¹. A interação foi monitorada por anisotropia de fluorescência a 280 nm. Todos os experimentos foram realizados em Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4.

Confirmando os dados de anisotropia, podemos observar na **Figura 45** o efeito dessas heparinas modificadas no sinal de CD da proteína. NADOS e AS não causaram nenhuma alteração significativa no espectro da proteína, diferente de Hep e de NA. Condroitin sulfato (C6S) também foi capaz de provocar diminuição de elipcicidade na proteína, mostrando que a interação não ocorre simplesmente pela carga da unidade dissacarídica e sim por seu arranjo tridimensional, já que este também apresenta somente um grupamento sulfato por unidade dissacarídica e, ainda assim, é capaz de interagir (**Figura 45**).



Figura 45 - Avaliação da interação entre heparinas modificadas e rPrP²³⁻²³¹ por CD. Espectros de CD de rPrP²³⁻²³¹ na ausência e presença de diferentes heparinas (1:1). Os espectros de CD foram realizados em cubeta circular de 0,01 cm. Todos os espectros foram subtraídos dos respectivos tampões. Todos os experimentos foram realizados em Tris 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4.

4.5 EFEITOS DA INTERACÃO ENTRE PrP E HEP.

Mesmo não tendo observado grande mudança na conformação da proteína provocada pela interação com Hep, o complexo formado pode adquirir características distintas que influenciem na sua estabilidade e na sua propensão à conversão.

Moléculas de ácidos nucléicos são candidatos a adjuvantes do processo de conversão de PrP^C em PrP^{Sc}, capazes de induzir agregação e mudanças conformacionais na proteína do prion (CORDEIRO e cols., 2001; DELEAULT e cols., 2003; DELEAULT e cols., 2005;

SILVA e cols., 2008). Nosso grupo demonstrou que moléculas de RNA extraídas de cultura de células de neuroblastoma são capazes de induzir a formação de agregados tóxicos de rPrP²³⁻²³¹, e que essa interação se dá através da região N-terminal da proteína (restrita aos resíduos 51-90) em pH 7,4 (GOMES e cols., 2008). Medidas de espalhamento de luz foram realizadas, com o intuito de avaliar a susceptibilidade do complexo PrP:Hep à agregação induzida por RNA (**Figura 46**). O gráfico mostra a reversibilidade da agregação induzida por Hep. O RNA (N2a) foi capaz de induzir a agregação da proteína sozinha, porém não demonstrou o mesmo efeito para o complexo PrP:Hep (t=o/n). O resultado sugere que esses dois ligantes aniônicos interajam no mesmo sítio na proteína, sendo então competidores, com uma maior afinidade para Hep. Porém, também pode sugerir que a interação com Hep provoque mudanças na estabilidade da proteína e na sua susceptibilidade à agregação.



Figura 46 – Efeito de N2aRNA no complexo rPrP²³⁻²³¹**:Hep.** Espalhamento de luz relativo das amostras de rPrP²³⁻²³¹ 1 μ M (**■**), rPrP²³⁻²³¹**:Hep** (1:1) no t=0 (**■**), rPrP²³⁻²³¹**:Hep** (1:1) no t=o/n (**■**), rPrP²³⁻²³¹ + RNA (1:1) (**■**), rPrP²³⁻²³¹**:Hep** t=0 + RNA(**■**).Os experimentos foram realizados em tampão Tris 10 mM, NaCl 100 M, pH 7,4.

Dados anteriores do nosso grupo mostraram que a rPrP^C rica em α -hélices poderia ser convertida em uma isoforma rica em folhas- β com o uso de altas temperaturas. Essa mudança estrutural ocorria concomitantemente a um processo de agregação da proteína, gerando diferenças entre a estabilidade das duas isoformas (CORDEIRO e cols., 2004). Com o objetivo de verificar se a formação do complexo PrP:Hep provocava alterações de estabilidade, acompanhamos o enovelamento de rPrP²³⁻²³¹ livre e formando complexo com Hep frente a variações de temperatura. Espectros de CD foram coletados de 20 °C a 84 °C, a cada 2 °C, e os valores de elipticidade a 222 nm foram comparados (Figura 47A). O experimento foi realizado em pH 7,4 para que os efeitos referentes a agregação fossem menos pronunciados. Podemos observar que o valor de $T_{1/2}$ da proteína livre passou de 67,55 \pm 0,25 °C para 70,60 \pm 0,31 °C quando ligada a Hep. Além disso, a variação de sinal de CD foi muito mais pronunciada para a proteína livre, mostrando que a interação com Hep trouxe maior estabilidade à estrutura da proteína contra altas temperaturas. Acompanhando o perfil de agregação da rPrP²³⁻²³¹ frente ao tratamento com temperatura, monitorando-se o espalhamento de luz da amostra, percebemos que altas temperaturas provocam uma agregação muito mais intensa na proteína livre do que no complexo (Figura 47B). Na concentração utilizada (7 µM) não foi observada formação de estruturas amilóides, ricas em folhas-β, avaliado por ligação de ThT (não mostrado).



Figura 47 – Comparação do efeito da temperatura entre PrP e PrP:Hep por CD e espalhamento de luz. (A) Variação de elipcicidade de CD em 222 nm de PrP^{23-231} (—) e rPrP²³⁻²³¹:Hep (—) na presença de diferentes temperaturas. Os espectros de CD foram coletados com cubeta reta de 0.2 cm. (B) Espalhamento de luz relativo de PrP^{23-231} (—) e rPrP²³⁻²³¹:Hep (—) na presença de diferentes temperaturas. Os experimentos foram realizados em tampão Fosfato de sódio 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4.

O peptídeo ShaPrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹, derivado da proteína do prion de hamster sírio, corresponde a uma curva, uma pequena fita beta e parte da primeira α-hélice da proteína nativa, estando também envolvido na conversão da PrP^C em PrP^{Se} e faz parte de uma região de grande homologia entre as espécies de mamíferos (CAUGHEY, 2000). O peptídeo ShaPrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹, estocado em uréia 6 M e SDS 1%, foi diluído para uma concentração final de 1,0 μ M em tampão sem agentes desnaturantes. O processo de agregação se inicia imediatamente após sua diluição no tampão e é favorecido em pHs ácidos (CORDEIRO e cols., 2001). Após o processo de agregação do peptídeo ter atingido o equilíbrio, alíquotas de rPrP²³⁻²³¹, e de rPrP²³⁻²³¹:Hep (t=o/n) foram adicionadas à amostra (**Figura 48**). A adição de rPrP²³⁻²³¹ livre provocou um aumento do espalhamento de luz da amostra, já o complexo não foi capaz de causar nenhuma variação. Hep sozinha também não induz mudanças no perfil de espalhamento. Esse dado mostra que PrP livre é capaz de se incorporar aos agregados Sha¹⁰⁹⁻



Figura 48 – Efeito de rPrP²³⁻²³¹ na agregação do peptídeo ShaPrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹. Concentrações crescentes de rPrP²³⁻²³¹ (—) e de rPrP²³⁻²³¹:Hep (—) e Hep (—) foram adicionadas a amostras agregadas do peptídeo ShaPrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹. Experimento realizado em tampão acetato de sódio 10 mM, NaCl 100 mM, pH 5,5.

A conversão da isoforma celular para a isoforma scrapie da proteína do prion envolve importantes mudanças conformacionais, e a habilidade da isoforma scrapie em se propagar de uma maneira autocatalítica é um elemento chave para a reconstituição da infecciosidade *in vitro*. BASKAKOV e cols. (2002) desenvolveram um protocolo de conversão *in vitro* para proteínas recombinantes capaz de gerar isoformas amilóides autopropagativas. Esse protocolo se baseia em adicionar a proteína do prion recombinante a uma solução de pH ácido, na presença de desnaturante e NaCl, sob agitação constante, à temperatura de 37 °C. Com base nesse protocolo submetemos amostras de rPrP²³⁻²³¹ e rPrP²³⁻²³¹:Hep a essas condições capazes de induzir a formação de estruturas amilóides, e medimos o aparecimento dessas fibras através da ligação de ThT (**Figura 49**). rPrP²³⁻²³¹ mostrou ser capaz de se converter em uma estrutura amilóide nas condições analisadas; contudo, a interação com Hep foi capaz de inibir essa propensão (**Figura 49**).



Figura 49 – Influência de Hep na formação de fibras amilóides de rPrP²³⁻²³¹. Amostras de rPrP²³⁻²³¹ (22 μ M) livre (—) ou incubadas com Hep (22 μ M, t=o/n) (—) foram submetidas ao protocolo descrito por BASKAKOV e cols. (2002), e em seguida sua capacidade em ligar ThT (20 μ M) foi avaliada. ThT livre foi utilizada como controle negativo. As amostras foram excitadas em 450 nm e a emissão coletada de 465 nm a 520 nm.

5 DISCUSSÃO

O nome prion se refere a uma nova categoria de patógenos infecciosos, responsáveis por doenças neurodegenerativas, tanto humanas quanto animais. O que torna as doenças priônicas únicas dentre as várias doenças neurodegenerativas é o seu caráter infeccioso, ou seja, inoculando-se macerado de cérebro de um animal portador de EET em um animal sadio, este último desenvolverá a doença (PRUSINER, 1998).

Mudanças na conformação da PrP^{C} de uma proteína rica em estrutura em α -hélice para uma isoforma predominantemente em folhas- β (PrP^{Sc}) e subsequente agregação, são as principais causas paras as EETs (CAUGHEY e cols., 1991; PAN e cols., 1993). A PrP^{Sc} se propaga através de um processo autocatalítico, no qual PrP^{C} é induzida por PrP^{Sc} a adquirir a conformação scrapie; *in vitro*, no entanto, essa simples reação de conversão não é eficiente (HILL e cols., 1999). Por esta razão, acredita-se que o acúmulo de prions está envolvido com a participação de diversos cofatores celulares, incluindo os glicosaminoglicanos. O principal GAG envolvido na patogênese é o heparan sulfato presente na membrana celular (BEN ZAKEN e cols., 2003; HIJAZI e cols., 2005; HORONCHIK e cols., 2005).

A heparina é largamente utilizada terapeuticamente, e é disponível em grandes quantidades. Embora seja sintetizada e estocada somente em mastócitos, sua estrutura é muito semelhante às regiões altamente sulfatadas de HS, portanto é normalmente substituta de HS em experimentos de interação, apresentando-se como um excelente modelo. Heparina é capaz de interagir com algumas construções de proteína do prion e induzir a formação de complexos oligoméricos em pHs ácidos (GONZALEZ-IGLESIAS e cols., 2002; ANDRIEVSKAIA e cols., 2007). Neste trabalho, nós investigamos a interação da proteína recombinante murina do prion (rPrP²³⁻²³¹) com heparina, e os aspectos estruturais contidos nessa interação. Acredita-se que a conversão da proteína do prion ocorra na superfície celular ou em vesículas endocíticas

e de reciclagem (CAUGHEY e cols., 1991; CAUGHEY e RAYMOND, 1991; BORCHELT e cols., 1992; MARIJANOVIC e cols., 2009), e a interação dos proteoglicanos de HS com PrP^C mostrou ser importante para o tráfego dessas moléculas entre compartimentos celulares (CHENG e cols., 2006). Por esse motivo escolhemos realizar nossos experimentos em pH 5,5 e pH 7,4, que mimetizariam o pH lisosomal e da membrana celular, respectivamente. Nesta tese nós mostramos que Hep é capaz de interagir com rPrP²³⁻²³¹ nos dois pHs analisados, mostrando uma razão aparente de 1:1 em pH 7,4 e 2:1 (Hep:PrP) em pH 5,5 (**Figura 20**). Este resultado indica a presença de sítios de interação distintos em pH 5,5. Pudemos também observar que com o aumento da força iônica do meio o efeito de Hep foi revertido, mostrando que este se dá através de interações eletrostáticas (**Figura 24 e 25**).

A hipótese "protein-only" é a teoria mais aceita para a conversão da proteína do príon (PRUSINER, 1998). Por outro lado, homogenatos de cérebro e poliânions (incluindo HS) têm mostrado gerar mais eficientemente a conversão do que proteínas do prion purificadas (SABORIO e cols., 2001; LUCASSEN e cols., 2003; DELEAULT e cols., 2005). Estes trabalhos sugerem que outras moléculas poderiam promover importantes mudanças na estrutura da proteína induzindo ou facilitando a conversão. WONG e cols. (2001) e ANDRIEVSKAIA e cols. (2007) sugeriram que polissacarídeos sulfatados, heparina e pentosan polissulfato respectivamente, eram capazes de induzir mudanças estruturais na proteína do prion recombinante bovina, diminuindo o conteúdo de α -hélices, monitorando-as por espectroscopia de CD no UV-distante. Equipamentos de CD medem a diferença na absorbância entre os componentes luminosos circularmente polarizados. Agregados de proteínas causam artefatos devido ao espalhamento de luz diferencial e absorção dos agregados. Estes fatores distorcem a magnitude do espectro de CD e diminuem a razão sinal/ruído (LITMAN, 1972; KELLY e cols., 2005; CASTIGLIONI e cols., 2007). Nós

observamos uma diminuição na elipticidade de CD com concentrações crescentes de Hep (**Figura 23**). Este resultado poderia também demonstrar um decréscimo de conteúdo em α -hélice, mas mudanças no espalhamento de luz (**Figura 26**) nos mostram que a informação estrutural está sendo escondida pela agregação da proteína, mesmo sem sua precipitação. Neste caso, esta metodologia não se mostra eficiente para inferirmos quais modificações conformacionais estariam ocorrendo na proteína, mas serve para demonstrar que há efeito de Hep sobre a proteína e possivelmente interação direta.

CORTIJO-ARELLANO e cols. (2008), utilizando um fragmento da proteína do prion (PrP¹⁸⁵⁻²⁰⁸), mostraram a formação de agregados amilóides tóxicos na presença de heparina. Já PEREZ e cols. (1998), com o peptídeo PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶, observaram o efeito contrário, de inibição da formação de fibras amilóides, embora houvesse ainda a formação de estruturas fibrilares. Em nossos estudos verificamos que Hep induz agregação da proteína, porém não há formação de fibras (não mostrado) nem de fibras amilóides (**Figura 36**). Além disso, o complexo agregado ou solúvel mostrou não ser tóxico em cultura (**Figura 40**). Estes resultados mostram também que resultados com peptídeos nem sempre podem ser extrapolados para a proteína inteira.

A fluorescência intrínseca de proteínas fornece informação sobre a conformação de proteínas ao correlacionarmos as propriedades espectrais do triptofano com sua localização em um motivo estrutural (LAKOWICZ, 1999). A interação entre moléculas frequentemente induz a mudança de alguma propriedade física como, por exemplo, mudanças de fluorescência, espalhamento de luz, calor produzido, entre outras. Pudemos observar que a interação entre PrP e Hep promove aumento da intensidade de fluorescência de triptofano (**Figura 22A**), concordando com os dados de GONZALEZ-IGLESIAS e cols. (2002), sugerindo um aumento na hidrofobicidade do ambiente químico desse fluoróforo, embora não

tenhamos observado um desvio significativo do espectro de emissão para comprimentos de onda mais energéticos (**Figura 22B**).

Experimentos de cinética rápida são capazes de perceber mudanças em tempos muito curtos, acessando etapas que ocorrem rapidamente, que não se consegue acessar com medidas clássicas de estado estacionário ou equilíbrio. Nossas medidas de cinética rápida mostraram que a interação de Hep com rPrP²³⁻²³¹ induz o aumento na intensidade de fluorescência e de espalhamento de luz no intervalo de 2 segundos (Figura 28 e 29), porém esse efeito não é mantido, após 6-8 segundos há uma queda concomitante dos dois valores (Figura 27). Mais do que isso, essa queda se prolonga até retornar praticamente aos valores iniciais de espalhamento, em algumas horas (Figura 31). Interações entre proteína e a água são importantes para a estabilidade conformacional da proteína. PrP^C possui uma área acessível ao solvente grande em relação ao normalmente encontrado para proteínas enoveladas e regiões de troca rápida com a camada de solvatação (CORDEIRO e cols., 2004; DE SIMONE e cols., 2005). Os dados sugerem que a interação com Hep provoca mudanças conformacionais locais (possivelmente favorecendo contatos transientes entre as cadeias polipeptídicas que permitirão a associação entre os monômeros e a consequente agregação), diminuindo a acessibilidade ao solvente, o que faz com que haja o aumento da intensidade de fluorescência dos triptofanos. Regiões flexíveis da proteína devem mediar essas interações intermoleculares. Esse fenômeno parece ser seguido por um processo de estabilização seqüencial, passando por variações conformacionais, no qual resíduos de aminoácidos mostram diferentes deslocamentos químicos durante esse período (dado não mostrado), até o equilíbrio ser atingido. A consequente desagregação provoca um aumento da hidratação da molécula, com conseqüente diminuição da intensidade de fluorescência.

No caso da fluorescência há um retorno para valores de intensidade menores que os da proteína livre (**Figura 33**), que pode ser explicado por um efeito supressor de fluorescência por parte da molécula de Hep que permanece interagindo com a proteína; ou pela possível mudança do ambiente químico de determinados resíduos de aminoácidos, aproximando triptofanos a resíduos supressores; ou por um aumento da acessibilidade ao solvente em relação à proteína livre. A acessibilidade da acrilamida aos resíduos de triptofano foi menor no tempo 0, concordando com a agregação que ocorre nesse momento, porém, após desagregar, os valores retornam a valores de acessibilidade muito próximos aos da proteína livre (**Figura 35 e Tabela 6**). Contudo, os triptofanos estão localizados na região flexível da proteína, normalmente bastante expostos ao solvente, podendo não refletir o estado conformacional da região globular.

O passo seguinte foi investigar se essa agregação transitória e ligação com Hep provocavam mudanças conformacionais na proteína. Experimentos de dicroísmo circular foram capazes de mostrar que, após desagregar, o conteúdo em α -hélice da proteína em pH 7,4 retorna a valor muito semelhante à proteína livre (**Figura 32**). Para investigar com maior refinamento as alterações na estrutura da proteína, medidas de SAXS e de RMN foram obtidas do complexo. As duas metodologias não revelaram mudanças dramáticas na estrutura da proteína. O complexo solúvel apresentou uma estrutura terciária global bastante similar à proteína livre (**Figura 37, 38 e 39**). Embora as diferenças entre os deslocamentos químicos no HSQC da proteína livre ou ligada à Hep sejam bastante pequenas, mostrando que a estrutura secundária da proteína foi mantida, podemos observar mudanças em algumas áreas do espectro. Podemos observar o aparecimento de novos picos em uma faixa espectral populada por picos pertencentes à região flexível da proteína, sugerindo que esta região esteja adquirindo uma estrutura mais ordenada (ou rígida) com a ligação de Hep. Também podemos observar diferenças no deslocamento químico de resíduos das regiões N- e C-terminais, mostrando que os efeitos da ligação de Hep se estendem por toda proteína. Os dados de SAXS mostram que não há alterações significativas no raio de giro da proteína, mas o complexo apresentou uma menor compacidade, possivelmente referente à região globular já que pelos dados de RMN a região N-terminal teria uma menor flexibilidade.

YIN e cols. (2006) mostraram que a deleção dos 12 primeiros aminoácidos da rPrP humana inibia a ligação com GAGs, e sugerem que inserções adicionais de repetições octapeptídicas promovem uma maior interação com GAGs por gerarem um domínio Nterminal mais exposto. Outros autores apontaram a própria região octapeptídica, além de outras regiões, utilizando fragmentos de PrP ou peptídeos sintéticos, como os principais componentes para interação com GAG (WARNER e cols., 2002; GONZALEZ-IGLESIAS e cols., 2002), embora seja discutido se o comportamento desses peptídeos é representativo para a proteína inteira. Nesta tese utilizamos um mutante de rPrP com deleção na sequência de 51-90, referente à repetição octapeptídica (Figura 42). Essa região é conhecida por interagir com cobre fisiologicamente (MARTINS e cols., 2002). A adição de cobre teve um efeito aditivo ao efeito da Hep em induzir perda de sinal de CD. Todavia, heparina não interagiu com r $PrP^{\Delta 51-90}$ em pH 7,4, mostrando que esta região contém o único sítio de interação em pH neutro (condizente com a estequiometria observada). Esse resultado está de acordo com a observação de SHYNG e cols. (1995) que reportaram que a região entre os resíduos 25 e 91 de PrP (incorporando a região octapeptídica) é suficiente para interação com HSPG de células N2a; mas contraria GONZALEZ-IGLESIAS e cols. (2002), que observaram interação com BoPrP(63-94) somente em pH ácido.

A razão molar entre Hep e PrP encontrada em pH ácido foi aparentemente de 2:1 (Hep:PrP) (**Figura 20**). A fim de investigar a presença de sítios de interação adicionais em pHs ácidos, acompanhamos a interação de rPrP^{Δ 51-90} em pH 5,5 (**Figura 42A**). Embora não haja interação de heparina com esse mutante em pH 7,4, podemos observar ligação em pH 5,5, com uma razão molar de 1:1 (Hep:PrP), indicando que na proteína inteira existem dois sítios de ligação neste pH, a região octapeptídica e outra adicional (responsável pela interação com rPrP^{Δ 51-90} neste pH). Tentando esquadrinhar a localização desse segundo sítio, utilizamos o mutante rPrP^{Δ 32-121} (**Figura 42B**), apresentando um deleção mais extensa do N-terminal, e observamos que, assim como com o outro mutante, Hep induziu agregação somente em pH 5,5, sugerindo que essa outra região de ligação compreenda os primeiros aminoácidos do domínio N-terminal (concordando com YIN e cols., 2006) ou uma outra região presente na região C-terminal da proteína.

As propriedades conformacionais da proteína do prion são conhecidas por serem moduladas por pH (SWIETNICKI e cols., 1997; CALZOLAI e ZAHN, 2003). Mudanças que provocassem uma maior exposição do domínio N-terminal e de motivos normalmente escondidos do solvente justificariam a presença de um novo sítio de ligação e aumento do conteúdo de heparina em pHs ácidos. Outra possibilidade é a protonação de resíduos de histidina. A histidina é o único aminoácido cuja cadeia lateral pode servir tanto como ácido quanto como base em pH fisiológico, e poderia então ser responsável por essa interação. O pK(a) de His155 e His187 é em torno de 5,5 (CALZOLAI e ZAHN, 2003; LANGELLA e cols., 2006). Para avaliar a importância de histidinas para a interação em pH 5,5, tratamos rPrP23-231 com DEPC, um modificador da cadeia lateral de histidinas, amplamente utilizado para bloquear interações entre esse aminoácido (HESP e cols., 2007). Nossos dados mostraram que o bloqueio dessas histidinas foi capaz de impedir a interação com Hep (**Figura**

43). Na sequência dos 12 primeiros aminoácidos sugeridos por YIN e cols. (2006) como região de interação, não existe nenhum resíduo de histidina, sugerindo que o segundo sítio de ligação estaria contido na região globular da proteína do prion. Os resultados mostrados apontam a importância do pH ao investigar e comparar os sítio de interação.

Polissacarídeos aniônicos precisam proporcionar um padrão espacial definido de grupamentos sulfatados e carboxilados para o reconhecimento molecular e consequente atividade biológica. O resíduo de ácido urônico de heparina/HS pode estar 2-*O*-sulfatado ou não substituído e a glicosamina pode estar 6-*O*-sulfadata, *N*-acetilada, *N*-livre ou *N*-sulfatada. WARNER e cols. (2002) demonstraram a importância da 2-*O*-sulfatação por ensaio de competição. Nesta tese mostramos que a presença da 2-*O*-sulfatação e 6-*O*-sulfatação é necessária para interação prion:heparina (**Figura 44**). Este resultado indica que a interação não apresenta uma natureza exclusivamente iônica, depende de uma configuração espacial. Essa interação sítio específica deve se assemelhar à encontrada para histamina (CHUANG e cols., 2000) na qual o anel imidazólico se liga a uma fenda limitada pela tríade IdoA- $(1\rightarrow 4)$ - α -D-GlcN- $(1\rightarrow 4)$ IdoA. Diversas moléculas que mimetizam a estrutura do HS têm sido desenvolvidas como drogas anti-prion (ADJOU e cols., 2003; OUIDJA e cols., 2007). O conhecimento sobre o arranjo estrutural importante para a interação com PrP é de extrema relevância para o desenvolvimento dessas drogas.

Polissacarídeos sulfatados apresentam um efeito paradoxal porque ora parecem prevenir (LADOGANA e cols., 1992; GABIZON e cols., 1993; CAUGHEY e RAYMOND, 1993; SCHONBERGER e cols., 2003; OUIDJA e cols., 2007), ora estimular (WONG e cols., 2001; HIJAZI e cols., 2005; DELEAULT e cols., 2005; HORONCHIK e cols., 2005) a conversão em PrP^{Sc}. Uma explicação para os efeitos anti-prion de GAGs livres é a competição pela ligação da PrP com GAGs celulares. No entanto, GAGs livres estimulariam a conversão celular (WONG e cols., 2001). As modificações observadas por nós na estrutura da proteína mediante a interação com heparina não mostraram serem por si só suficientes para induzir a conversão; pelo contrário, o complexo formado se mostrou menos suscetível à agregação e às modificações estruturais induzidas por temperatura (**Figura 47**). Além disso, a interação com Hep fez com que a proteína perdesse a capacidade de interagir com moléculas de RNA (**Figura 46**), conhecidos por promover a conversão da proteína (DELEAULT e cols., 2003; GOMES e cols., 2008). A proteína perdeu também a capacidade de se incorporar a núcleos de agregados (**Figura 48**), e teve sua propensão intrínseca em se converter à forma amilóide anulada/reduzida (**Figura 49**).

Os dados apresentados mostram que não há paradoxo com relação à interação com a isoforma celular. Podemos dizer que heparina não provoca mudanças estruturais na proteína do prion (sequência inteira) que levem à conversão da proteína, e que os dados da literatura que mostram perda de estrutura da proteína estão na verdade relacionados à agregação. Essa agregação observada *in vitro* se mostrou bastante transiente e sofre a influência de diversos sais. GAGs celulares, mais freqüentes na forma de proteoglicanos, estão imobilizados na membrana da célula, assim como PrP^C. Uma agregação induzida por GAG na membrana da célula seria um evento esporádico, difícil de acontecer, dada a restrição espacial, grau e transitoriedade do efeito observado em pH 7,4, e a influência de íons. Mais ainda, o complexo PrP:Hep se mostrou menos suscetível à conversão. Isso explicaria o efeito protetor dessas moléculas observado em diversos modelos.

HS se mostrou importante para infecção por estar envolvido com a ligação e incorporação da isoforma "scrapie" nas células (HORONCHIK e cols., 2005; HIJAZI e cols.,

2005). Assim como heparina pareceu estabilizar a estrutura da isoforma celular, HS sulfato pode ajudar a estabilizar a isoforma "scrapie", além de poder servir como via de entrada para essa isoforma na célula. A entrada na célula da isoforma "scrapie" é um evento essencial para a conversão, já que a inibição da endocitose previne a formação de PrP^{Sc} (BORCHELT e cols., 1992; CAMPANA e cols., 2005). HS e PrP^C são normalmente co-internalizados na célula (CHENG e cols., 2006). Ao ser internalizada na célula, uma molécula de HS ligada a PrP^{Sc} encontraria na via endocítica local para encontrar e interagir com PrP^C. Dentro da via endocítica, HS é destinado aos endossomos tardios, ao invés de endossomos de reciclagem, reticulo endoplasmático ou golgi (PAYNE e cols., 2007), no entanto MARIJANOVIC e cols. (2009) mostraram que endossomos tardios não estão envolvidos com o processo de conversão, e sim endossomos de reciclagem. O HS promoveria então o encontro entre as duas isoformas, porém não participaria do processo de conversão.

6 CONCLUSÕES
Os glicosaminoglicanos são molécuas que estão relacionadas à proteína do prion tanto em condições fisiológicas quanto patológicas, sendo então de grande importância os estudos sobre como se dá a interação entre essas moléculas e seus efeitos. Nossos resultados indicam que:

Heparina interage com a proteína recombinante do prion murina.

A interação entre mPrP é dependente de interações eletrostáticas, concentração de proteína, e do pH do meio, sendo favorecida por pHs mais ácidos.

Em pH ácido mPrP exibe duas regiões de ligação contendo resíduos de histidina, importantes para a interação.

A ligação de heparina provoca uma agregação transiente da proteína, sem a formação de espécies amilóides e/ou tóxicas, seguido por um processo de reorganização até alcançar o equilíbrio.

A interação com heparina não induz conversão da proteína para uma isoforma "scrapie", nem provoca mudanças em seu enovelamento.

O complexo formado por mPrP e heparina se mostrou mais estável e menos propenso à conversão.

7 REFERÊNCIAS

ABEDINI A., TRACZ S. M., CHO J. H. e RALEIGH D. P. (2006) Characterization of the heparin binding site in the N-terminus of human pro-islet amyloid polypeptide: implications for amyloid formation. **Biochemistry** 45:30, 9228-9237.

ADJOU K. T., SIMONEAU S., SALES N., LAMOURY F., DORMONT D., PAPY-GARCIA D., BARRITAULT D., DESLYS J. P. e LASMEZAS C. I. (2003) A novel generation of heparan sulfate mimetics for the treatment of prion diseases. **J.Gen.Virol.** 84:Pt 9, 2595-2603.

AGUZZI A., BAUMANN F. e BREMER J. (2008a) The prion's elusive reason for being. **Annu.Rev.Neurosci.** 31, 439-477.

AGUZZI A. e HEIKENWALDER M. (2006) Pathogenesis of prion diseases: current status and future outlook. **Nat.Rev.Microbiol.** 4:10, 765-775.

AGUZZI A., HEIKENWALDER M. e POLYMENIDOU M. (2007) Insights into prion strains and neurotoxicity. **Nat.Rev.Mol.Cell Biol.** 8:7, 552-561.

AGUZZI A., MONTRASIO F. e KAESER P. S. (2001) Prions: health scare and biological challenge. **Nat.Rev.Mol.Cell Biol.** 2:2, 118-126.

AGUZZI A. e POLYMENIDOU M. (2004) Mammalian prion biology: one century of evolving concepts. **Cell** 116:2, 313-327.

AGUZZI A., SIGURDSON C. e HEIKENWAELDER M. (2008b) Molecular mechanisms of prion pathogenesis. **Annu.Rev.Pathol.** 3, 11-40.

AGUZZI A. e SIGURDSON C. J. (2004) Antiprion immunotherapy: to suppress or to stimulate? **Nat.Rev.Immunol.** 4:9, 725-736.

AL B. R., ROBERT I., LUTZ Y., BLANC F., SOMMERMEYER-LEROUX G., SHIBAGUCHI H., AUNIS D. e FUCHS J. P. (2005) Purkinje-cell degeneration in prion protein-deficient mice is associated with a cerebellum-specific Doppel protein species signature. **FEBS Lett.** 579:12, 2715-2721.

ALPER T., CRAMP W. A., HAIG D. A. e CLARKE M. C. (1967) Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? **Nature** 214:5090, 764-766.

AMARAL M. D. (2004) CFTR and chaperones: processing and degradation. **J.Mol.Neurosci.** 23:1-2, 41-48.

ANCSIN J. B. (2003) Amyloidogenesis: historical and modern observations point to heparan sulfate proteoglycans as a major culprit. **Amyloid.** 10:2, 67-79.

ANDRIEVSKAIA O., POTETINOVA Z., BALACHANDRAN A. e NIELSEN K. (2007) Binding of bovine prion protein to heparin: a fluorescence polarization study. **Arch.Biochem.Biophys.** 460:1, 10-16.

ARNOLD J. E., TIPLER C., LASZLO L., HOPE J., LANDON M. e MAYER R. J. (1995) The abnormal isoform of the prion protein accumulates in late-endosome-like organelles in scrapie-infected mouse brain. **J.Pathol.** 176:4, 403-411.

BALDWIN R. L. (1975) Intermediates in protein folding reactions and the mechanism of protein folding. **Annu.Rev.Biochem.** 44, 453-475.

BALGUERIE A., DOS R. S., RITTER C., CHAIGNEPAIN S., COULARY-SALIN B., FORGE V., BATHANY K., LASCU I., SCHMITTER J. M., RIEK R. e SAUPE S. J. (2003) Domain organization and structure-function relationship of the HET-s prion protein of Podospora anserina. **EMBO J.** 22:9, 2071-2081.

BARMADA S. J. e HARRIS D. A. (2005) Visualization of prion infection in transgenic mice expressing green fluorescent protein-tagged prion protein. **J.Neurosci.** 25:24, 5824-5832.

BARNHART M. M. e CHAPMAN M. R. (2006) Curli biogenesis and function. **Annu.Rev.Microbiol.** 60, 131-147.

BARRET A., FORESTIER L., DESLYS J. P., JULIEN R. e GALLET P. F. (2005) Glycosylation-related gene expression in prion diseases: PrPSc accumulation in scrapie infected GT1 cells depends on beta-1,4-linked GalNAc-4-SO4 hyposulfation. **J.Biol.Chem.** 280:11, 10516-10523.

BASKAKOV I. V. e BOCHAROVA O. V. (2005) In vitro conversion of mammalian prion protein into amyloid fibrils displays unusual features. **Biochemistry** 44:7, 2339-2348.

BASKAKOV I. V., LEGNAME G., BALDWIN M. A., PRUSINER S. B. e COHEN F. E. (2002) Pathway complexity of prion protein assembly into amyloid. **J.Biol.Chem.** 277:24, 21140-21148.

BELTING M. (2003) Heparan sulfate proteoglycan as a plasma membrane carrier. **Trends Biochem.Sci.** 28:3, 145-151.

BELTING M., PERSSON S. e FRANSSON L. A. (1999) Proteoglycan involvement in polyamine uptake. **Biochem.J.** 338 (Pt 2), 317-323.

BEN ZAKEN O., TZABAN S., TAL Y., HORONCHIK L., ESKO J. D., VLODAVSKY I. e TARABOULOS A. (2003) Cellular heparan sulfate participates in the metabolism of prions. **J.Biol.Chem.** 278:41, 40041-40049.

BERSON J. F., THEOS A. C., HARPER D. C., TENZA D., RAPOSO G. e MARKS M. S. (2003) Proprotein convertase cleavage liberates a fibrillogenic fragment of a resident glycoprotein to initiate melanosome biogenesis. **J.Cell Biol.** 161:3, 521-533.

BESARATINIA A. e PFEIFER G. P. (2005) DNA adduction and mutagenic properties of acrylamide. **Mutat.Res** 580:1-2, 31-40.

BISHOP J. R., SCHUKSZ M. e ESKO J. D. (2007) Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. **Nature** 446:7139, 1030-1037.

BORCHELT D. R., TARABOULOS A. e PRUSINER S. B. (1992) Evidence for synthesis of scrapie prion proteins in the endocytic pathway. **J.Biol.Chem.** 267:23, 16188-16199.

BOTELHO M. G., GRALLE M., OLIVEIRA C. L., TORRIANI I. e FERREIRA S. T. (2003) Folding and stability of the extracellular domain of the human amyloid precursor protein. **J.Biol.Chem.** 278:36, 34259-34267.

BRAAK H. e BRAAK E. (2000) Pathoanatomy of Parkinson's disease. **J.Neurol.** 247 Suppl 2, II3-10.

BRIMACOMBE D. B., BENNETT A. D., WUSTEMAN F. S., GILL A. C., DANN J. C. e BOSTOCK C. J. (1999) Characterization and polyanion-binding properties of purified recombinant prion protein. **Biochem.J.** 342 Pt 3, 605-613.

BROWN D. R., HAFIZ F., GLASSSMITH L. L., WONG B. S., JONES I. M., CLIVE C. e HASWELL S. J. (2000a) Consequences of manganese replacement of copper for prion protein function and proteinase resistance. **EMBO J.** 19:6, 1180-1186.

BROWN D. R., QIN K., HERMS J. W., MADLUNG A., MANSON J., STROME R., FRASER P. E., KRUCK T., VON BOHLEN A., SCHULZ-SCHAEFFER W., GIESE A., WESTAWAY D. e KRETZSCHMAR H. (1997) The cellular prion protein binds copper in vivo. **Nature** 390:6661, 684-687.

BROWN P., PREECE M., BRANDEL J. P., SATO T., MCSHANE L., ZERR I., FLETCHER A., WILL R. G., POCCHIARI M., CASHMAN N. R., D'AIGNAUX J. H., CERVENAKOVA L., FRADKIN J., SCHONBERGER L. B. e COLLINS S. J. (2000b) Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease at the millennium. **Neurology** 55:8, 1075-1081. BRUCE M., CHREE A., MCCONNELL I., FOSTER J., PEARSON G. e FRASER H. (1994) Transmission of bovine spongiform encephalopathy and scrapie to mice: strain variation and the species barrier. **Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.** 343:1306, 405-411.

BRUCE M. E., WILL R. G., IRONSIDE J. W., MCCONNELL I., DRUMMOND D., SUTTIE A., MCCARDLE L., CHREE A., HOPE J., BIRKETT C., COUSENS S., FRASER H. e BOSTOCK C. J. (1997) Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. **Nature** 389:6650, 498-501.

BUELER H., AGUZZI A., SAILER A., GREINER R. A., AUTENRIED P., AGUET M. e WEISSMANN C. (1993) Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. Cell 73:7, 1339-1347.

BUELER H., FISCHER M., LANG Y., BLUETHMANN H., LIPP H. P., DEARMOND S. J., PRUSINER S. B., AGUET M. e WEISSMANN C. (1992) Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. **Nature** 356:6370, 577-582.

BUSCHMANN A., GRETZSCHEL A., BIACABE A. G., SCHIEBEL K., CORONA C., HOFFMANN C., EIDEN M., BARON T., CASALONE C. e GROSCHUP M. H. (2006) Atypical BSE in Germany--proof of transmissibility and biochemical characterization. **Vet.Microbiol.** 117:2-4, 103-116.

BUTLER D. A., SCOTT M. R., BOCKMAN J. M., BORCHELT D. R., TARABOULOS A., HSIAO K. K., KINGSBURY D. T. e PRUSINER S. B. (1988) Scrapie-infected murine neuroblastoma cells produce protease-resistant prion proteins. **J.Virol.** 62:5, 1558-1564.

CALNE D. B., HOCHBERG F. H., SNOW B. J. e NYGAARD T. (1992) Theories of neurodegeneration. Ann.N.Y.Acad.Sci. 648, 1-5.

CALZOLAI L., LYSEK D. A., PEREZ D. R., GUNTERT P. e WUTHRICH K. (2005) Prion protein NMR structures of chickens, turtles, and frogs. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A** 102:3, 651-655.

CALZOLAI L. e ZAHN R. (2003) Influence of pH on NMR structure and stability of the human prion protein globular domain. **J.Biol.Chem.** 278:37, 35592-35596.

CAMPANA V., SARNATARO D. e ZURZOLO C. (2005) The highways and byways of prion protein trafficking. **Trends Cell Biol.** 15:2, 102-111.

CANTOR,C.R. e SCHIMMEL,P.R. (1980). Other optical techniques. In **Biophysical Chemistry Part II - Techniques for the study of biological structure and function.** (New York, EUA: W. H. Freeman and Co.), pp. 454-458. CAPILA I. e LINHARDT R. J. (2002) Heparin-protein interactions. Angew.Chem.Int.Ed Engl. 41:3, 391-412.

CARDIN A. D. e WEINTRAUB H. J. (1989) Molecular modeling of proteinglycosaminoglycan interactions. Arteriosclerosis 9:1, 21-32.

CASCIO M., GLAZER P. A. e WALLACE B. A. (1989) The secondary structure of human amyloid deposits as determined by circular dichroism spectroscopy. **Biochem.Biophys.Res.Commun.** 162:3, 1162-1166.

CASHMAN N. R. e CAUGHEY B. (2004a) Prion diseases--close to effective therapy? **Nat.Rev.Drug Discov.** 3:10, 874-884.

CASHMAN N. R. e CAUGHEY B. (2004b) Prion diseases--close to effective therapy? **Nat.Rev.Drug Discov.** 3:10, 874-884.

CASHMAN N. R., LOERTSCHER R., NALBANTOGLU J., SHAW I., KASCSAK R. J., BOLTON D. C. e BENDHEIM P. E. (1990) Cellular isoform of the scrapie agent protein participates in lymphocyte activation. **Cell** 61:1, 185-192.

CASTIGLIONI E., ABBATE S., LONGHI G., GANGEMI R., LAUCERI R. e PURRELLO R. (2007) Absorption flattening as one cause of distortion of circular dichroism spectra of Delta-RuPhen3 . H2TPPS complex. **Chirality** 19:8, 642-646.

CASU B. e LINDAHL U. (2001) Structure and biological interactions of heparin and heparan sulfate. Adv.Carbohydr.Chem.Biochem. 57, 159-206.

CAUGHEY B. (2000) Transmissible spongiform encephalopathies, amyloidoses and yeast prions: common threads? **Nat.Med.** 6:7, 751-754.

CAUGHEY B., BROWN K., RAYMOND G. J., KATZENSTEIN G. E. e THRESHER W. (1994) Binding of the protease-sensitive form of PrP (prion protein) to sulfated glycosaminoglycan and congo red [corrected]. **J.Virol.** 68:4, 2135-2141.

CAUGHEY B. e CHESEBRO B. (2001) Transmissible spongiform encephalopathies and prion protein interconversions. Adv.Virus Res. 56, 277-311.

CAUGHEY B., ERNST D. e RACE R. E. (1993) Congo red inhibition of scrapie agent replication. J.Virol. 67:10, 6270-6272.

CAUGHEY B. e RACE R. E. (1992) Potent inhibition of scrapie-associated PrP accumulation by congo red. **J.Neurochem.** 59:2, 768-771.

CAUGHEY B. e RAYMOND G. J. (1991) The scrapie-associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease- and phospholipase-sensitive. **J.Biol.Chem.** 266:27, 18217-18223.

CAUGHEY B. e RAYMOND G. J. (1993) Sulfated polyanion inhibition of scrapie-associated PrP accumulation in cultured cells. **J.Virol.** 67:2, 643-650.

CAUGHEY B., RAYMOND G. J., CALLAHAN M. A., WONG C., BARON G. S. e XIONG L. W. (2001) Interactions and conversions of prion protein isoforms. Adv.Protein Chem. 57, 139-169.

CAUGHEY B., RAYMOND G. J., ERNST D. e RACE R. E. (1991) N-terminal truncation of the scrapie-associated form of PrP by lysosomal protease(s): implications regarding the site of conversion of PrP to the protease-resistant state. **J.Virol.** 65:12, 6597-6603.

CHEN S., MANGE A., DONG L., LEHMANN S. e SCHACHNER M. (2003) Prion protein as trans-interacting partner for neurons is involved in neurite outgrowth and neuronal survival. **Mol.Cell Neurosci.** 22:2, 227-233.

CHEN S. G., TEPLOW D. B., PARCHI P., TELLER J. K., GAMBETTI P. e AUTILIO-GAMBETTI L. (1995) Truncated forms of the human prion protein in normal brain and in prion diseases. **J.Biol.Chem.** 270:32, 19173-19180.

CHENG F., LINDQVIST J., HAIGH C. L., BROWN D. R. e MANI K. (2006) Copperdependent co-internalization of the prion protein and glypican-1. **J.Neurochem.** 98:5, 1445-1457.

CHERNY I., ROCKAH L., LEVY-NISSENBAUM O., GOPHNA U., RON E. Z. e GAZIT E. (2005) The formation of Escherichia coli curli amyloid fibrils is mediated by prion-like peptide repeats. **J.Mol.Biol.** 352:2, 245-252.

CHESEBRO B. (1998) BSE and prions: uncertainties about the agent. Science 279:5347, 42-43.

CHITI F. e DOBSON C. M. (2006) Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. **Annu.Rev.Biochem.** 75, 333-366.

CHITI F., STEFANI M., TADDEI N., RAMPONI G. e DOBSON C. M. (2003) Rationalization of the effects of mutations on peptide and protein aggregation rates. **Nature** 424:6950, 805-808.

CHITI F., WEBSTER P., TADDEI N., CLARK A., STEFANI M., RAMPONI G. e DOBSON C. M. (1999) Designing conditions for in vitro formation of amyloid protofilaments and fibrils. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A** 96:7, 3590-3594.

CHUANG W. L., CHRIST M. D., PENG J. e RABENSTEIN D. L. (2000) An NMR and molecular modeling study of the site-specific binding of histamine by heparin, chemically modified heparin, and heparin-derived oligosaccharides. **Biochemistry** 39:13, 3542-3555.

CISAR L. A., HOOGEWERF A. J., CUPP M., RAPPORT C. A. e BENSADOUN A. (1989) Secretion and degradation of lipoprotein lipase in cultured adipocytes. Binding of lipoprotein lipase to membrane heparan sulfate proteoglycans is necessary for degradation. **J.Biol.Chem.** 264:3, 1767-1774.

CLAESSEN D., RINK R., DE J. W., SIEBRING J., DE V. P., BOERSMA F. G., DIJKHUIZEN L. e WOSTEN H. A. (2003) A novel class of secreted hydrophobic proteins is involved in aerial hyphae formation in Streptomyces coelicolor by forming amyloid-like fibrils. **Genes Dev.** 17:14, 1714-1726.

COHEN, A., SHIRAHAMA, T. e SKINNER, M. (1982). Electron Microscopy of Amyloid. (New York: Academic Press).

COHEN F. E. e PRUSINER S. B. (1998) Pathologic conformations of prion proteins. **Annu.Rev.Biochem.** 67, 793-819.

COHLBERG J. A., LI J., UVERSKY V. N. e FINK A. L. (2002) Heparin and other glycosaminoglycans stimulate the formation of amyloid fibrils from alpha-synuclein in vitro. **Biochemistry** 41:5, 1502-1511.

COLLINGE J. (1999) Variant Creutzfeldt-Jakob disease. Lancet 354:9175, 317-323.

COLLINGE J. e CLARKE A. R. (2007) A general model of prion strains and their pathogenicity. **Science** 318:5852, 930-936.

COLLINGE J., SIDLE K. C., MEADS J., IRONSIDE J. e HILL A. F. (1996) Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. **Nature** 383:6602, 685-690.

COLLINS S. J., LAWSON V. A. e MASTERS C. L. (2004) Transmissible spongiform encephalopathies. Lancet 363:9402, 51-61.

COME J. H., FRASER P. E. e LANSBURY P. T., Jr. (1993) A kinetic model for amyloid formation in the prion diseases: importance of seeding. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A** 90:13, 5959-5963.

CORDEIRO Y., KRAINEVA J., GOMES M. P., LOPES M. H., MARTINS V. R., LIMA L. M., FOGUEL D., WINTER R. e SILVA J. L. (2005) The amino-terminal PrP domain is crucial to modulate prion misfolding and aggregation. **Biophys.J.** 89:4, 2667-2676.

CORDEIRO Y., KRAINEVA J., RAVINDRA R., LIMA L. M., GOMES M. P., FOGUEL D., WINTER R. e SILVA J. L. (2004) Hydration and packing effects on prion folding and beta-sheet conversion. High pressure spectroscopy and pressure perturbation calorimetry studies. J.Biol.Chem. 279:31, 32354-32359.

CORDEIRO Y., MACHADO F., JULIANO L., JULIANO M. A., BRENTANI R. R., FOGUEL D. e SILVA J. L. (2001) DNA converts cellular prion protein into the beta-sheet conformation and inhibits prion peptide aggregation. J.Biol.Chem. 276:52, 49400-49409.

CORTIJO-ARELLANO M., PONCE J., DURANY N. e CLADERA J. (2008) Amyloidogenic properties of the prion protein fragment PrP(185-208): comparison with Alzheimer's peptide Abeta(1-28), influence of heparin and cell toxicity. **Biochem.Biophys.Res.Commun.** 368:2, 238-242.

CREUTZFELDT H. G. (1920) Über eine eigenartige herdförmige erkrankung des zentralnervensystems. **Z.Ges.Neurol.Psychiatr. 57**, 1-19.

CURIN S., V, BRESJANAC M., POPOVIC M., PRETNAR H. K., GALVANI V., RUPREHT R., CERNILEC M., VRANAC T., HAFNER I. e JERALA R. (2004) Monoclonal antibody against a peptide of human prion protein discriminates between Creutzfeldt-Jacob's disease-affected and normal brain tissue. **J.Biol.Chem.** 279:5, 3694-3698.

DE SIMONE A., DODSON G. G., VERMA C. S., ZAGARI A. e FRATERNALI F. (2005) Prion and water: tight and dynamical hydration sites have a key role in structural stability. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A** 102:21, 7535-7540.

DELEAULT N. R., GEOGHEGAN J. C., NISHINA K., KASCSAK R., WILLIAMSON R. A. e SUPATTAPONE S. (2005) Protease-resistant prion protein amplification reconstituted with partially purified substrates and synthetic polyanions. **J.Biol.Chem.** 280:29, 26873-26879.

DELEAULT N. R., LUCASSEN R. W. e SUPATTAPONE S. (2003) RNA molecules stimulate prion protein conversion. **Nature** 425:6959, 717-720.

DING K., MANI K., CHENG F., BELTING M. e FRANSSON L. A. (2002) Copperdependent autocleavage of glypican-1 heparan sulfate by nitric oxide derived from intrinsic nitrosothiols. **J.Biol.Chem.** 277:36, 33353-33360.

DINNER A. R., SALI A., SMITH L. J., DOBSON C. M. e KARPLUS M. (2000) Understanding protein folding via free-energy surfaces from theory and experiment. **Trends Biochem.Sci.** 25:7, 331-339.

DIRINGER H. e EHLERS B. (1991) Chemoprophylaxis of scrapie in mice. J.Gen.Virol. 72 (Pt 2), 457-460.

DOBSON C. M. (1999) Protein misfolding, evolution and disease. **Trends Biochem.Sci.** 24:9, 329-332.

DOBSON C. M. (2003) Protein folding and misfolding. Nature 426:6968, 884-890.

DODART J. C., BALES K. R., GANNON K. S., GREENE S. J., DEMATTOS R. B., MATHIS C., DELONG C. A., WU S., WU X., HOLTZMAN D. M. e PAUL S. M. (2002) Immunization reverses memory deficits without reducing brain Abeta burden in Alzheimer's disease model. **Nat.Neurosci.** 5:5, 452-457.

DONNE D. G., VILES J. H., GROTH D., MEHLHORN I., JAMES T. L., COHEN F. E., PRUSINER S. B., WRIGHT P. E. e DYSON H. J. (1997) Structure of the recombinant fulllength hamster prion protein PrP(29-231): the N terminus is highly flexible. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A** 94:25, 13452-13457.

DOUGLAS P. M., TREUSCH S., REN H. Y., HALFMANN R., DUENNWALD M. L., LINDQUIST S. e CYR D. M. (2008) Chaperone-dependent amyloid assembly protects cells from prion toxicity. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A** 105:20, 7206-7211.

ECROYD H. e CARVER J. A. (2008) Unraveling the mysteries of protein folding and misfolding. **IUBMB.Life** 60:12, 769-774.

EGGENBERGER E. (2007) Prion disease. Neurol.Clin. 25:3, 833-42, viii.

ELLIS R. J. (2001) Macromolecular crowding: an important but neglected aspect of the intracellular environment. **Curr.Opin.Struct.Biol.** 11:1, 114-119.

ELLIS V., DANIELS M., MISRA R. e BROWN D. R. (2002) Plasminogen activation is stimulated by prion protein and regulated in a copper-dependent manner. **Biochemistry** 41:22, 6891-6896.

FARQUHAR C. F. e DICKINSON A. G. (1986) Prolongation of scrapie incubation period by an injection of dextran sulphate 500 within the month before or after infection. **J.Gen.Virol.** 67 (Pt 3), 463-473.

FERNANDEZ-ESCAMILLA A. M., ROUSSEAU F., SCHYMKOWITZ J. e SERRANO L. (2004) Prediction of sequence-dependent and mutational effects on the aggregation of peptides and proteins. **Nat.Biotechnol.** 22:10, 1302-1306.

FERRAO-GONZALES A. D., SOUTO S. O., SILVA J. L. e FOGUEL D. (2000) The preaggregated state of an amyloidogenic protein: hydrostatic pressure converts native transthyretin into the amyloidogenic state. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A** 97:12, 6445-6450.

FITZKEE N. C. e ROSE G. D. (2004) Reassessing random-coil statistics in unfolded proteins. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A** 101:34, 12497-12502.

FOGUEL D. e SILVA J. L. (2004) New insights into the mechanisms of protein misfolding and aggregation in amyloidogenic diseases derived from pressure studies. **Biochemistry** 43:36, 11361-11370.

FRANKENFIELD K. N., POWERS E. T. e KELLY J. W. (2005) Influence of the N-terminal domain on the aggregation properties of the prion protein. **Protein Sci.** 14:8, 2154-2166.

FRANSSON L. A., BELTING M., CHENG F., JONSSON M., MANI K. e SANDGREN S. (2004) Novel aspects of glypican glycobiology. **Cell Mol.Life Sci.** 61:9, 1016-1024.

FRASER H. (1993) Diversity in the neuropathology of scrapie-like diseases in animals. **Br.Med.Bull.** 49:4, 792-809.

FRASER H. e DICKINSON A. G. (1973) Scrapie in mice. Agent-strain differences in the distribution and intensity of grey matter vacuolation. **J.Comp Pathol.** 83:1, 29-40.

FROMM J. R., HILEMAN R. E., CALDWELL E. E., WEILER J. M. e LINHARDT R. J. (1995) Differences in the interaction of heparin with arginine and lysine and the importance of these basic amino acids in the binding of heparin to acidic fibroblast growth factor. **Arch.Biochem.Biophys.** 323:2, 279-287.

FROMM J. R., HILEMAN R. E., WEILER J. M. e LINHARDT R. J. (1997) Interaction of fibroblast growth factor-1 and related peptides with heparan sulfate and its oligosaccharides. **Arch.Biochem.Biophys.** 346:2, 252-262.

FUNDERBURGH J. L. (2000) Keratan sulfate: structure, biosynthesis, and function. **Glycobiology** 10:10, 951-958.

FUNDERBURGH J. L., FUNDERBURGH M. L., MANN M. M., PRAKASH S. e CONRAD G. W. (1996) Synthesis of corneal keratan sulfate proteoglycans by bovine keratocytes in vitro. **J.Biol.Chem.** 271:49, 31431-31436.

GABIZON R., MEINER Z., HALIMI M. e BEN SASSON S. A. (1993) Heparin-like molecules bind differentially to prion-proteins and change their intracellular metabolic fate. **J.Cell Physiol** 157:2, 319-325.

GAJDUSEK D. C. (1988) Transmissible and non-transmissible amyloidoses: autocatalytic post-translational conversion of host precursor proteins to beta-pleated sheet configurations. **J.Neuroimmunol.** 20:2-3, 95-110.

GAJDUSEK D. C. e ZIGAS V. (1957) Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea; the endemic occurrence of kuru in the native population. **N.Engl.J.Med.** 257:20, 974-978.

GALLAGHER J. T. (2001) Heparan sulfate: growth control with a restricted sequence menu. **J.Clin.Invest** 108:3, 357-361.

GANDHI N. S. e MANCERA R. L. (2008) The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins. **Chem.Biol.Drug Des** 72:6, 455-482.

GAUCZYNSKI S., NIKLES D., EL GOGO S., PAPY-GARCIA D., REY C., ALBAN S., BARRITAULT D., LASMEZAS C. I. e WEISS S. (2006) The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as a receptor for infectious prions and is inhibited by polysulfated glycanes. **J.Infect.Dis.** 194:5, 702-709.

GAUCZYNSKI S., PEYRIN J. M., HAIK S., LEUCHT C., HUNDT C., RIEGER R., KRASEMANN S., DESLYS J. P., DORMONT D., LASMEZAS C. I. e WEISS S. (2001) The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as the cell-surface receptor for the cellular prion protein. **EMBO J.** 20:21, 5863-5875.

GHOSH A. K., HIRASAWA N., LEE Y. S., KIM Y. S., SHIN K. H., RYU N. e OHUCHI K. (2002) Inhibition by acharan sulphate of angiogenesis in experimental inflammation models. **Br.J.Pharmacol.** 137:4, 441-448.

GLENNER G. G. e WONG C. W. (1984) Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. **Biochem.Biophys.Res.Commun.** 120:3, 885-890.

GODSAVE S. F., WILLE H., KUJALA P., LATAWIEC D., DEARMOND S. J., SERBAN A., PRUSINER S. B. e PETERS P. J. (2008) Cryo-immunogold electron microscopy for prions: toward identification of a conversion site. **J.Neurosci.** 28:47, 12489-12499.

GOLDFARB L. G., BROWN P., MCCOMBIE W. R., GOLDGABER D., SWERGOLD G. D., WILLS P. R., CERVENAKOVA L., BARON H., GIBBS C. J., Jr. e GAJDUSEK D. C. (1991) Transmissible familial Creutzfeldt-Jakob disease associated with five, seven, and eight extra octapeptide coding repeats in the PRNP gene. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A** 88:23, 10926-10930.

GOMES M. P., MILLEN T. A., FERREIRA P. S., SILVA N. L., VIEIRA T. C., ALMEIDA M. S., SILVA J. L. e CORDEIRO Y. (2008) Prion protein complexed to N2a cellular RNAs through its N-terminal domain forms aggregates and is toxic to murine neuroblastoma cells. **J.Biol.Chem.** 283:28, 19616-19625.

GONZALEZ-IGLESIAS R., PAJARES M. A., OCAL C., ESPINOSA J. C., OESCH B. e GASSET M. (2002) Prion protein interaction with glycosaminoglycan occurs with the formation of oligomeric complexes stabilized by Cu(II) bridges. **J.Mol.Biol.** 319:2, 527-540.

GOVAERTS C., WILLE H., PRUSINER S. B. e COHEN F. E. (2004) Evidence for assembly of prions with left-handed beta-helices into trimers. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A** 101:22, 8342-8347.

GRAEBER M. B. e MEHRAEIN P. (1999) Reanalysis of the first case of Alzheimer's disease. **Eur.Arch.Psychiatry Clin.Neurosci.** 249 Suppl 3, 10-13.

GRANER E., MERCADANTE A. F., ZANATA S. M., FORLENZA O. V., CABRAL A. L., VEIGA S. S., JULIANO M. A., ROESLER R., WALZ R., MINETTI A., IZQUIERDO I., MARTINS V. R. e BRENTANI R. R. (2000) Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis. **Brain Res.Mol.Brain Res.** 76:1, 85-92.

GRIFFITH J. S. (1967) Self-replication and scrapie. Nature 215:5105, 1043-1044.

GUINIER, A. e FOURNET, G. (1955). Small Angle Scattering of X-Ray. (New York, EUA: Wiley).

GUPTA-BANSAL R., FREDERICKSON R. C. e BRUNDEN K. R. (1995) Proteoglycanmediated inhibition of A beta proteolysis. A potential cause of senile plaque accumulation. J.Biol.Chem. 270:31, 18666-18671. HALLGREN J., BACKSTROM S., ESTRADA S., THUVESON M. e PEJLER G. (2004) Histidines are critical for heparin-dependent activation of mast cell tryptase. **J.Immunol.** 173:3, 1868-1875.

HARPER J. D. e LANSBURY P. T., Jr. (1997) Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins. **Annu.Rev.Biochem.** 66, 385-407.

HARTL F. U. e HAYER-HARTL M. (2009) Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. **Nat.Struct.Mol.Biol.** 16:6, 574-581.

HASS G. (1942) Studies of amyloid II: The isolation of a polysaccharide from amyloidbearing tissues. **Arch.Pathology** 34, 92-105.

HEIKENWALDER M., ZELLER N., SEEGER H., PRINZ M., KLOHN P. C., SCHWARZ P., RUDDLE N. H., WEISSMANN C. e AGUZZI A. (2005) Chronic lymphocytic inflammation specifies the organ tropism of prions. **Science** 307:5712, 1107-1110.

HEINEMANN U., KRASNIANSKI A., MEISSNER B., VARGES D., KALLENBERG K., SCHULZ-SCHAEFFER W. J., STEINHOFF B. J., GRASBON-FRODL E. M., KRETZSCHMAR H. A. e ZERR I. (2007) Creutzfeldt-Jakob disease in Germany: a prospective 12-year surveillance. **Brain** 130:Pt 5, 1350-1359.

HELMS L. R. e WETZEL R. (1996) Specificity of abnormal assembly in immunoglobulin light chain deposition disease and amyloidosis. **J.Mol.Biol.** 257:1, 77-86.

HERCZENIK E., BOUMA B., KORPORAAL S. J., STRANGI R., ZENG Q., GROS P., VAN E. M., VAN BERKEL T. J., GEBBINK M. F. e AKKERMAN J. W. (2007) Activation of human platelets by misfolded proteins. **Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.** 27:7, 1657-1665.

HESP J. R., RAVEN N. D. e SUTTON J. M. (2007) A role for His155 in binding of human prion peptide144-167 to immobilised prion protein. **Biochem.Biophys.Res Commun.** 362:3, 695-699.

HIJAZI N., KARIV-INBAL Z., GASSET M. e GABIZON R. (2005) PrPSc incorporation to cells requires endogenous glycosaminoglycan expression. **J.Biol.Chem.** 280:17, 17057-17061.

HILL A. F., ANTONIOU M. e COLLINGE J. (1999) Protease-resistant prion protein produced in vitro lacks detectable infectivity. **J.Gen.Virol.** 80 (Pt 1), 11-14.

HIRSCHFIELD G. M. e HAWKINS P. N. (2003) Amyloidosis: new strategies for treatment. **Int.J.Biochem.Cell Biol.** 35:12, 1608-1613.

HORIUCHI M. e CAUGHEY B. (1999) Specific binding of normal prion protein to the scrapie form via a localized domain initiates its conversion to the protease-resistant state. **EMBO J.** 18:12, 3193-3203.

HORONCHIK L., TZABAN S., BEN ZAKEN O., YEDIDIA Y., ROUVINSKI A., PAPY-GARCIA D., BARRITAULT D., VLODAVSKY I. e TARABOULOS A. (2005) Heparan sulfate is a cellular receptor for purified infectious prions. **J.Biol.Chem.** 280:17, 17062-17067.

HOWIE A. J. e BREWER D. B. (2009) Optical properties of amyloid stained by Congo red: history and mechanisms. **Micron.** 40:3, 285-301.

HUNDT C., PEYRIN J. M., HAIK S., GAUCZYNSKI S., LEUCHT C., RIEGER R., RILEY M. L., DESLYS J. P., DORMONT D., LASMEZAS C. I. e WEISS S. (2001) Identification of interaction domains of the prion protein with its 37-kDa/67-kDa laminin receptor. **EMBO J.** 20:21, 5876-5886.

ICONOMIDOU V. A., VRIEND G. e HAMODRAKAS S. J. (2000) Amyloids protect the silkmoth oocyte and embryo. **FEBS Lett.** 479:3, 141-145.

IOZZO R. V. (1998) Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. **Annu.Rev.Biochem.** 67, 609-652.

ITANO N. (2008) Simple primary structure, complex turnover regulation and multiple roles of hyaluronan. **J.Biochem.** 144:2, 131-137.

JACKSON G. S., MURRAY I., HOSSZU L. L., GIBBS N., WALTHO J. P., CLARKE A. R. e COLLINGE J. (2001) Location and properties of metal-binding sites on the human prion protein. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A** 98:15, 8531-8535.

JAKOB A. (1921) Über eigenartige erkrankungen des zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischem befunde (spastische pseudoskleroseencephalomyelopathie mit disseminierten degenerationsherden). **Z.Ges.Neurol.Psychiatr 64**, 147-228.

JARONIEC C. P., MACPHEE C. E., ASTROF N. S., DOBSON C. M. e GRIFFIN R. G. (2002) Molecular conformation of a peptide fragment of transthyretin in an amyloid fibril. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A** 99:26, 16748-16753.

JEANLOZ R. W. (1960) The nomenclature of mucopolysaccharides. Arthritis Rheum. 3, 233-237.

JEONG J., TOIDA T., MUNETA Y., KOSIISHI I., IMANARI T., LINHARDT R. J., CHOI H. S., WU S. J. e KIM Y. S. (2001) Localization and characterization of acharan sulfate in the body of the giant African snail Achatina fulica. **Comp Biochem.Physiol B Biochem.Mol.Biol.** 130:4, 513-519.

JIMENEZ J. L., NETTLETON E. J., BOUCHARD M., ROBINSON C. V., DOBSON C. M. e SAIBIL H. R. (2002) The protofilament structure of insulin amyloid fibrils. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A** 99:14, 9196-9201.

JOHNSON W. C., Jr. (1988) Secondary structure of proteins through circular dichroism spectroscopy. **Annu.Rev.Biophys.Biophys.Chem.** 17, 145-166.

KELLERMANN G., VICENTIN F., TAMURA E., ROCHA M., TOLENTINO H., BARBOSA A., CRAIEVICH A. e TORRIANI I. (1997) The small-angle x-ray scattering beamline of the Brazilian Synchrotron Light Laboratory. **J.Appl.Crystallogr.** 30, 880-883.

KELLY J. W. (1998) The alternative conformations of amyloidogenic proteins and their multi-step assembly pathways. **Curr.Opin.Struct.Biol.** 8:1, 101-106.

KELLY J. W. (2000) Mechanisms of amyloidogenesis. Nat.Struct.Biol. 7:10, 824-826.

KELLY S. M., JESS T. J. e PRICE N. C. (2005) How to study proteins by circular dichroism. **Biochim.Biophys.Acta** 1751:2, 119-139.

KIM Y. S., AHN M. Y., WU S. J., KIM D. H., TOIDA T., TEESCH L. M., PARK Y., YU G., LIN J. e LINHARDT R. J. (1998) Determination of the structure of oligosaccharides prepared from acharan sulfate. **Glycobiology** 8:9, 869-877.

KIM Y. S., JO Y. Y., CHANG I. M., TOIDA T., PARK Y. e LINHARDT R. J. (1996) A new glycosaminoglycan from the giant African snail Achatina fulica. **J.Biol.Chem.** 271:20, 11750-11755.

KIMBERLIN R. H. e WALKER C. A. (1986) Suppression of scrapie infection in mice by heteropolyanion 23, dextran sulfate, and some other polyanions. **Antimicrob.Agents Chemother.** 30:3, 409-413.

KINNUNEN T., KAKSONEN M., SAARINEN J., KALKKINEN N., PENG H. B. e RAUVALA H. (1998) Cortactin-Src kinase signaling pathway is involved in N-syndecandependent neurite outgrowth. **J.Biol.Chem.** 273:17, 10702-10708. KLAJNERT B., CORTIJO-ARELLANO M., BRYSZEWSKA M. e CLADERA J. (2006) Influence of heparin and dendrimers on the aggregation of two amyloid peptides related to Alzheimer's and prion diseases. **Biochem.Biophys.Res.Commun.** 339:2, 577-582.

KLUNK W. E., JACOB R. F. e MASON R. P. (1999) Quantifying amyloid by congo red spectral shift assay. **Methods Enzymol.** 309, 285-305.

KOBAYASHI M., SUGUMARAN G., LIU J., SHWORAK N. W., SILBERT J. E. e ROSENBERG R. D. (1999) Molecular cloning and characterization of a human uronyl 2sulfotransferase that sulfates iduronyl and glucuronyl residues in dermatan/chondroitin sulfate. **J.Biol.Chem.** 274:15, 10474-10480.

KOCISKO D. A., COME J. H., PRIOLA S. A., CHESEBRO B., RAYMOND G. J., LANSBURY P. T. e CAUGHEY B. (1994) Cell-free formation of protease-resistant prion protein. **Nature** 370:6489, 471-474.

KOCISKO D. A., PRIOLA S. A., RAYMOND G. J., CHESEBRO B., LANSBURY P. T., Jr. e CAUGHEY B. (1995) Species specificity in the cell-free conversion of prion protein to protease-resistant forms: a model for the scrapie species barrier. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A** 92:9, 3923-3927.

KOVACS G. G., PUOPOLO M., LADOGANA A., POCCHIARI M., BUDKA H., VAN D. C., COLLINS S. J., BOYD A., GIULIVI A., COULTHART M., DELASNERIE-LAUPRETRE N., BRANDEL J. P., ZERR I., KRETZSCHMAR H. A., DE PEDRO-CUESTA J., CALERO-LARA M., GLATZEL M., AGUZZI A., BISHOP M., KNIGHT R., BELAY G., WILL R. e MITROVA E. (2005) Genetic prion disease: the EUROCJD experience. **Hum.Genet.** 118:2, 166-174.

KRAMER K. L. e YOST H. J. (2003) Heparan sulfate core proteins in cell-cell signaling. **Annu.Rev.Genet.** 37, 461-484.

KREBS M. R., BROMLEY E. H. e DONALD A. M. (2005) The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: localisation and implications. **J.Struct.Biol.** 149:1, 30-37.

KRESSE H. e SCHONHERR E. (2001) Proteoglycans of the extracellular matrix and growth control. **J.Cell Physiol** 189:3, 266-274.

KUCZIUS T. e GROSCHUP M. H. (1999) Differences in proteinase K resistance and neuronal deposition of abnormal prion proteins characterize bovine spongiform encephalopathy (BSE) and scrapie strains. **Mol.Med.** 5:6, 406-418.

KUSCHE-GULLBERG M. e KJELLEN L. (2003) Sulfotransferases in glycosaminoglycan biosynthesis. **Curr.Opin.Struct.Biol.** 13:5, 605-611.

LADOGANA A., CASACCIA P., INGROSSO L., CIBATI M., SALVATORE M., XI Y. G., MASULLO C. e POCCHIARI M. (1992) Sulphate polyanions prolong the incubation period of scrapie-infected hamsters. **J.Gen.Virol.** 73 (Pt 3), 661-665.

LADOGANA A., PUOPOLO M., CROES E. A., BUDKA H., JARIUS C., COLLINS S., KLUG G. M., SUTCLIFFE T., GIULIVI A., ALPEROVITCH A., DELASNERIE-LAUPRETRE N., BRANDEL J. P., POSER S., KRETZSCHMAR H., RIETVELD I., MITROVA E., CUESTA J. P., MARTINEZ-MARTIN P., GLATZEL M., AGUZZI A., KNIGHT R., WARD H., POCCHIARI M., VAN DUIJN C. M., WILL R. G. e ZERR I. (2005) Mortality from Creutzfeldt-Jakob disease and related disorders in Europe, Australia, and Canada. **Neurology** 64:9, 1586-1591.

LAKOWICZ, J.R. (1999). **Principles of fluorescence spectroscopy.** (New York, EUA: Kluwer Academic/ Plenum publishers).

LANGELLA E., IMPROTA R., CRESCENZI O. e BARONE V. (2006) Assessing the acidbase and conformational properties of histidine residues in human prion protein (125-228) by means of pK(a) calculations and molecular dynamics simulations. **Proteins** 64:1, 167-177.

LARRAMENDY-GOZALO C., BARRET A., DAUDIGEOS E., MATHIEU E., ANTONANGELI L., RIFFET C., PETIT E., PAPY-GARCIA D., BARRITAULT D., BROWN P. e DESLYS J. P. (2007) Comparison of CR36, a new heparan mimetic, and pentosan polysulfate in the treatment of prion diseases. **J.Gen.Virol.** 88:Pt 3, 1062-1067.

LAWSON V. A., PRIOLA S. A., WEHRLY K. e CHESEBRO B. (2001) N-terminal truncation of prion protein affects both formation and conformation of abnormal protease-resistant prion protein generated in vitro. **J.Biol.Chem.** 276:38, 35265-35271.

LEE Y. S., YANG H. O., SHIN K. H., CHOI H. S., JUNG S. H., KIM Y. M., OH D. K., LINHARDT R. J. e KIM Y. S. (2003) Suppression of tumor growth by a new glycosaminoglycan isolated from the African giant snail Achatina fulica. **Eur.J.Pharmacol.** 465:1-2, 191-198.

LEGNAME G., BASKAKOV I. V., NGUYEN H. O., RIESNER D., COHEN F. E., DEARMOND S. J. e PRUSINER S. B. (2004) Synthetic mammalian prions. **Science** 305:5684, 673-676.

LEUCHT C., SIMONEAU S., REY C., VANA K., RIEGER R., LASMEZAS C. I. e WEISS S. (2003) The 37 kDa/67 kDa laminin receptor is required for PrP(Sc) propagation in scrapie-infected neuronal cells. **EMBO Rep.** 4:3, 290-295.

LI D. W., LEE I. S., SIM J. S., TOIDA T., LINHARDT R. J. e KIM Y. S. (2004) Long duration of anticoagulant activity and protective effects of acharan sulfate in vivo. **Thromb.Res.** 113:1, 67-73.

LIBERDA J., TICHÁ M. e JONÁKOVÁ V. (1997) Preparation of fluorescein-labelled and biotinylated derivatives of polysaccharides for lectin-saccharide binding studies. **Biotechnol.Tech.** 11:4, 265-267.

LIBERSKI P. P. e GAJDUSEK D. C. (1997) Kuru: forty years later, a historical note. **Brain Pathol.** 7:1, 555-560.

LINDAHL U., KUSCHE M., LIDHOLT K. e OSCARSSON L. G. (1989) Biosynthesis of heparin and heparan sulfate. **Ann.N.Y.Acad.Sci.** 556, 36-50.

LINDEN R., MARTINS V. R., PRADO M. A., CAMMAROTA M., IZQUIERDO I. e BRENTANI R. R. (2008) Physiology of the prion protein. **Physiol Rev.** 88:2, 673-728.

LITMAN B. J. (1972) Effect of light scattering on the circular dichroism of biological membranes. **Biochemistry** 11:17, 3243-3247.

LIU Y., PETERSON D. A., KIMURA H. e SCHUBERT D. (1997) Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. **J.Neurochem.** 69:2, 581-593.

LLEWELYN C. A., HEWITT P. E., KNIGHT R. S., AMAR K., COUSENS S., MACKENZIE J. e WILL R. G. (2004) Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. Lancet 363:9407, 417-421.

LOMAKIN A., CHUNG D. S., BENEDEK G. B., KIRSCHNER D. A. e TEPLOW D. B. (1996) On the nucleation and growth of amyloid beta-protein fibrils: detection of nuclei and quantitation of rate constants. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A** 93:3, 1125-1129.

LOMAS D. A. e CARRELL R. W. (2002) Serpinopathies and the conformational dementias. **Nat.Rev.Genet.** 3:10, 759-768.

LOSKE C., NEUMANN A., CUNNINGHAM A. M., NICHOL K., SCHINZEL R., RIEDERER P. e MUNCH G. (1998) Cytotoxicity of advanced glycation endproducts is mediated by oxidative stress. **J.Neural Transm.** 105:8-9, 1005-1015.

LUCASSEN R., NISHINA K. e SUPATTAPONE S. (2003) In vitro amplification of protease-resistant prion protein requires free sulfhydryl groups. **Biochemistry** 42:14, 4127-4135.

LUHESHI L. M., CROWTHER D. C. e DOBSON C. M. (2008) Protein misfolding and disease: from the test tube to the organism. **Curr.Opin.Chem.Biol.** 12:1, 25-31.

LYSEK D. A., SCHORN C., NIVON L. G., ESTEVE-MOYA V., CHRISTEN B., CALZOLAI L., VON SCHROETTER C., FIORITO F., HERRMANN T., GUNTERT P. e WUTHRICH K. (2005) Prion protein NMR structures of cats, dogs, pigs, and sheep. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A** 102:3, 640-645.

MAKIN O. S., ATKINS E., SIKORSKI P., JOHANSSON J. e SERPELL L. C. (2005) Molecular basis for amyloid fibril formation and stability. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A** 102:2, 315-320.

MALAVAKI C., MIZUMOTO S., KARAMANOS N. e SUGAHARA K. (2008) Recent advances in the structural study of functional chondroitin sulfate and dermatan sulfate in health and disease. **Connect.Tissue Res** 49:3, 133-139.

MANCHENO J. M., GASSET M., LACADENA J., RAMON F., MARTINEZ DEL P. A., ONADERRA M. e GAVILANES J. G. (1994) Kinetic study of the aggregation and lipid mixing produced by alpha-sarcin on phosphatidylglycerol and phosphatidylserine vesicles: stopped-flow light scattering and fluorescence energy transfer measurements. **Biophys.J.** 67:3, 1117-1125.

MANI K., CHENG F. e FRANSSON L. A. (2007) Heparan sulfate degradation products can associate with oxidized proteins and proteasomes. **J.Biol.Chem.** 282:30, 21934-21944.

MANI K., CHENG F., HAVSMARK B., JONSSON M., BELTING M. e FRANSSON L. A. (2003) Prion, amyloid beta-derived Cu(II) ions, or free Zn(II) ions support S-nitrosodependent autocleavage of glypican-1 heparan sulfate. **J.Biol.Chem.** 278:40, 38956-38965.

MARGALIT H., FISCHER N. e BEN SASSON S. A. (1993) Comparative analysis of structurally defined heparin binding sequences reveals a distinct spatial distribution of basic residues. **J.Biol.Chem.** 268:26, 19228-19231.

MARIJANOVIC Z., CAPUTO A., CAMPANA V. e ZURZOLO C. (2009) Identification of an intracellular site of prion conversion. **PLoS.Pathog.** 5:5, e1000426.

MARKLEY J. L. (1975) Observation of histidine residues in proteins by means of nuclear magnetic-resonance spectroscopy. Acc.Chem.Res. 8:2, 70-80.

MARTINS V. R., LINDEN R., PRADO M. A., WALZ R., SAKAMOTO A. C., IZQUIERDO I. e BRENTANI R. R. (2002) Cellular prion protein: on the road for functions. **FEBS Lett.** 512:1-3, 25-28.

MATHIASON C. K., POWERS J. G., DAHMES S. J., OSBORN D. A., MILLER K. V., WARREN R. J., MASON G. L., HAYS S. A., HAYES-KLUG J., SEELIG D. M., WILD M. A., WOLFE L. L., SPRAKER T. R., MILLER M. W., SIGURDSON C. J., TELLING G. C. e HOOVER E. A. (2006) Infectious prions in the saliva and blood of deer with chronic wasting disease. Science 314:5796, 133-136.

MAURY C. P. (2009) The emerging concept of functional amyloid. **J.Intern.Med.** 265:3, 329-334.

MCBRIDE P. A., WILSON M. I., EIKELENBOOM P., TUNSTALL A. e BRUCE M. E. (1998) Heparan sulfate proteoglycan is associated with amyloid plaques and neuroanatomically targeted PrP pathology throughout the incubation period of scrapie-infected mice. **Exp.Neurol.** 149:2, 447-454.

MCKINLEY M. P., BOLTON D. C. e PRUSINER S. B. (1983) A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion. **Cell** 35:1, 57-62.

MCKINLEY M. P., TARABOULOS A., KENAGA L., SERBAN D., STIEBER A., DEARMOND S. J., PRUSINER S. B. e GONATAS N. (1991) Ultrastructural localization of scrapie prion proteins in cytoplasmic vesicles of infected cultured cells. Lab Invest 65:6, 622-630.

MEAD S. (2006) Prion disease genetics. Eur.J.Hum.Genet. 14:3, 273-281.

MEYER R. K., MCKINLEY M. P., BOWMAN K. A., BRAUNFELD M. B., BARRY R. A. e PRUSINER S. B. (1986) Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A** 83:8, 2310-2314.

MILLHAUSER G. L. (2007) Copper and the prion protein: methods, structures, function, and disease. **Annu.Rev.Phys.Chem.** 58, 299-320.

MOORE R. C., LEE I. Y., SILVERMAN G. L., HARRISON P. M., STROME R., HEINRICH C., KARUNARATNE A., PASTERNAK S. H., CHISHTI M. A., LIANG Y., MASTRANGELO P., WANG K., SMIT A. F., KATAMINE S., CARLSON G. A., COHEN F. E., PRUSINER S. B., MELTON D. W., TREMBLAY P., HOOD L. E. e WESTAWAY D. (1999) Ataxia in prion protein (PrP)-deficient mice is associated with upregulation of the novel PrP-like protein doppel. J.Mol.Biol. 292:4, 797-817.

MORALES R., ABID K. e SOTO C. (2007) The prion strain phenomenon: molecular basis and unprecedented features. **Biochim.Biophys.Acta** 1772:6, 681-691.

MORRISSEY M. P. e SHAKHNOVICH E. I. (1999) Evidence for the role of PrP(C) helix 1 in the hydrophilic seeding of prion aggregates. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A** 96:20, 11293-11298.

MULLOY B. e FORSTER M. J. (2000) Conformation and dynamics of heparin and heparan sulfate. **Glycobiology** 10:11, 1147-1156.

MURPHY K. P. (1995) Noncovalent forces important to the conformational stability of protein structures. **Methods Mol.Biol.** 40, 1-34.

NADER H. B., CHAVANTE S. F., DOS-SANTOS E. A., OLIVEIRA T. W., DE-PAIVA J. F., JERONIMO S. M., MEDEIROS G. F., DE-ABREU L. R., LEITE E. L., DE-SOUSA-FILHO J. F., CASTRO R. A., TOMA L., TERSARIOL I. L., PORCIONATTO M. A. e DIETRICH C. P. (1999) Heparan sulfates and heparins: similar compounds performing the same functions in vertebrates and invertebrates? **Braz.J.Med.Biol.Res.** 32:5, 529-538.

NADER H. B., DIETRICH C. P., BUONASSISI V. e COLBURN P. (1987) Heparin sequences in the heparan sulfate chains of an endothelial cell proteoglycan. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A** 84:11, 3565-3569.

NAIKI H., HIGUCHI K., HOSOKAWA M. e TAKEDA T. (1989) Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavin T1. **Anal.Biochem.** 177:2, 244-249.

NAMY O., GALOPIER A., MARTINI C., MATSUFUJI S., FABRET C. e ROUSSET J. P. (2008) Epigenetic control of polyamines by the prion [PSI(+)]. **Nat.Cell Biol.**

NAOR D., SIONOV R. V. e ISH-SHALOM D. (1997) CD44: structure, function, and association with the malignant process. Adv.Cancer Res. 71, 241-319.

NELSON R. e EISENBERG D. (2006) Recent atomic models of amyloid fibril structure. **Curr.Opin.Struct.Biol.** 16:2, 260-265.

NELSON R., SAWAYA M. R., BALBIRNIE M., MADSEN A. O., RIEKEL C., GROTHE R. e EISENBERG D. (2005) Structure of the cross-beta spine of amyloid-like fibrils. **Nature** 435:7043, 773-778.

NOVITSKAYA V., BOCHAROVA O. V., BRONSTEIN I. e BASKAKOV I. V. (2006) Amyloid fibrils of mammalian prion protein are highly toxic to cultured cells and primary neurons. **J.Biol.Chem.** 281:19, 13828-13836.

O'LEARY T. J. e LEVIN I. W. (1985) Secondary structure of endocrine amyloid: infrared spectroscopy of medullary carcinoma of the thyroid. Lab Invest 53:2, 240-242.

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. e. (1985) A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. Cell 40:4, 735-746.

OUIDJA M. O., PETIT E., KERROS M. E., IKEDA Y., MORIN C., CARPENTIER G., BARRITAULT D., BRUGERE-PICOUX J., DESLYS J. P., ADJOU K. e PAPY-GARCIA D. (2007) Structure-activity studies of heparan mimetic polyanions for anti-prion therapies. **Biochem.Biophys.Res.Commun.** 363:1, 95-100.

PALHANO F. L., ROCHA C. B., BERNARDINO A., WEISSMULLER G., MASUDA C. A., MONTERO-LOMELI M., GOMES A. M., CHIEN P., FERNANDES P. M. e FOGUEL D. (2009) A fluorescent mutant of the NM domain of the yeast prion Sup35 provides insight into fibril formation and stability. **Biochemistry** 48:29, 6811-6823.

PAN K. M., BALDWIN M., NGUYEN J., GASSET M., SERBAN A., GROTH D., MEHLHORN I., HUANG Z., FLETTERICK R. J., COHEN F. E. e . (1993) Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A** 90:23, 10962-10966.

PAN K. M., STAHL N. e PRUSINER S. B. (1992) Purification and properties of the cellular prion protein from Syrian hamster brain. **Protein Sci.** 1:10, 1343-1352.

PAN T., WONG B. S., LIU T., LI R., PETERSEN R. B. e SY M. S. (2002) Cell-surface prion protein interacts with glycosaminoglycans. **Biochem.J.** 368:Pt 1, 81-90.

PASTORE A. e ZAGARI A. (2007) A structural overview of the vertebrate prion proteins. **Prion.** 1:3, 185-197.

PAULING L. e COREY R. B. (1951) Configurations of Polypeptide Chains With Favored Orientations Around Single Bonds: Two New Pleated Sheets. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A** 37:11, 729-740.

PAULY P. C. e HARRIS D. A. (1998) Copper stimulates endocytosis of the prion protein. **J.Biol.Chem.** 273:50, 33107-33110.

PAWAR A. P., DUBAY K. F., ZURDO J., CHITI F., VENDRUSCOLO M. e DOBSON C. M. (2005) Prediction of "aggregation-prone" and "aggregation-susceptible" regions in proteins associated with neurodegenerative diseases. **J.Mol.Biol.** 350:2, 379-392.

PAYNE C. K., JONES S. A., CHEN C. e ZHUANG X. (2007) Internalization and trafficking of cell surface proteoglycans and proteoglycan-binding ligands. **Traffic.** 8:4, 389-401.

PEDEN A. H., HEAD M. W., RITCHIE D. L., BELL J. E. e IRONSIDE J. W. (2004) Preclinical vCJD after blood transfusion in a PRNP codon 129 heterozygous patient. Lancet 364:9433, 527-529.

PERETZ D., SCOTT M. R., GROTH D., WILLIAMSON R. A., BURTON D. R., COHEN F. E. e PRUSINER S. B. (2001) Strain-specified relative conformational stability of the scrapie prion protein. **Protein Sci.** 10:4, 854-863.

PEREZ M., WANDOSELL F., COLACO C. e AVILA J. (1998) Sulphated glycosaminoglycans prevent the neurotoxicity of a human prion protein fragment. **Biochem.J.** 335 (Pt 2), 369-374.

PERRIMON N. e BERNFIELD M. (2000) Specificities of heparan sulphate proteoglycans in developmental processes. **Nature** 404:6779, 725-728.

PETKOVA A. T., ISHII Y., BALBACH J. J., ANTZUTKIN O. N., LEAPMAN R. D., DELAGLIO F. e TYCKO R. (2002) A structural model for Alzheimer's beta -amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A** 99:26, 16742-16747.

PIEPKORN M., HOVINGH P. e LINKER A. (1989) Glycosaminoglycan free chains. External plasma membrane components distinct from the membrane proteoglycans. **J.Biol.Chem.** 264:15, 8662-8669.

PIMPINELLI F., LEHMANN S. e MARIDONNEAU-PARINI I. (2005) The scrapie prion protein is present in flotillin-1-positive vesicles in central- but not peripheral-derived neuronal cell lines. **Eur.J.Neurosci.** 21:8, 2063-2072.

PIXLEY R. A., LIN Y., ISORDIA-SALAS I. e COLMAN R. W. (2003) Fine mapping of the sequences in domain 5 of high molecular weight kininogen (HK) interacting with heparin and zinc. **J.Thromb.Haemost.** 1:8, 1791-1798.

PODRABSKY J. E., CARPENTER J. F. e HAND S. C. (2001) Survival of water stress in annual fish embryos: dehydration avoidance and egg envelope amyloid fibers. **Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol** 280:1, R123-R131.

PRAUS M., KETTELGERDES G., BAIER M., HOLZHUTTER H. G., JUNGBLUT P. R., MAISSEN M., EPPLE G., SCHLEUNING W. D., KOTTGEN E., AGUZZI A. e GESSNER R. (2003) Stimulation of plasminogen activation by recombinant cellular prion protein is conserved in the NH2-terminal fragment PrP23-110. **Thromb.Haemost.** 89:5, 812-819.

PREHM P. (1983a) Synthesis of hyaluronate in differentiated teratocarcinoma cells. Characterization of the synthase. **Biochem.J.** 211:1, 181-189.

PREHM P. (1983b) Synthesis of hyaluronate in differentiated teratocarcinoma cells. Mechanism of chain growth. **Biochem.J.** 211:1, 191-198.

PRIOLA S. A. e CAUGHEY B. (1994) Inhibition of scrapie-associated PrP accumulation. Probing the role of glycosaminoglycans in amyloidogenesis. **Mol.Neurobiol.** 8:2-3, 113-120.

PRIOLA S. A., RAINES A. e CAUGHEY W. S. (2000) Porphyrin and phthalocyanine antiscrapie compounds. **Science** 287:5457, 1503-1506.

PRUSINER S. B. (1982) Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. Science 216:4542, 136-144.

PRUSINER S. B. (1991) Molecular biology of prion diseases. Science 252:5012, 1515-1522.

PRUSINER S. B. (1998) Prions. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 95:23, 13363-13383.

PRUSINER S. B. (2001) Shattuck lecture--neurodegenerative diseases and prions. **N.Engl.J.Med.** 344:20, 1516-1526.

PRUSINER S. B. e DEARMOND S. J. (1990) Prion diseases of the central nervous system. **Monogr Pathol.** 32, 86-122.

PRUSINER S. B., GROTH D. F., BOLTON D. C., KENT S. B. e HOOD L. E. (1984) Purification and structural studies of a major scrapie prion protein. **Cell** 38:1, 127-134.

PRUSINER S. B., GROTH D. F., COCHRAN S. P., MASIARZ F. R., MCKINLEY M. P. e MARTINEZ H. M. (1980) Molecular properties, partial purification, and assay by incubation period measurements of the hamster scrapie agent. **Biochemistry** 19:21, 4883-4891.

PRUSINER S. B., SCOTT M., FOSTER D., PAN K. M., GROTH D., MIRENDA C., TORCHIA M., YANG S. L., SERBAN D., CARLSON G. A. e. (1990) Transgenetic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. **Cell** 63:4, 673-686.

PRYDZ K. e DALEN K. T. (2000) Synthesis and sorting of proteoglycans. J.Cell Sci. 113 Pt 2, 193-205.

REIXACH N., DEECHONGKIT S., JIANG X., KELLY J. W. e BUXBAUM J. N. (2004) Tissue damage in the amyloidoses: Transthyretin monomers and nonnative oligomers are the major cytotoxic species in tissue culture. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A** 101:9, 2817-2822. RHIE A., KIRBY L., SAYER N., WELLESLEY R., DISTERER P., SYLVESTER I., GILL A., HOPE J., JAMES W. e TAHIRI-ALAOUI A. (2003) Characterization of 2'-fluoro-RNA aptamers that bind preferentially to disease-associated conformations of prion protein and inhibit conversion. **J.Biol.Chem.** 278:41, 39697-39705.

RIEK R., HORNEMANN S., WIDER G., GLOCKSHUBER R. e WUTHRICH K. (1997) NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231). **FEBS Lett.** 413:2, 282-288.

RIVERA-MILLA E., OIDTMANN B., PANAGIOTIDIS C. H., BAIER M., SKLAVIADIS T., HOFFMANN R., ZHOU Y., SOLIS G. P., STUERMER C. A. e MALAGA-TRILLO E. (2006) Disparate evolution of prion protein domains and the distinct origin of Doppel- and prion-related loci revealed by fish-to-mammal comparisons. **FASEB J.** 20:2, 317-319.

RUDD P. M., ENDO T., COLOMINAS C., GROTH D., WHEELER S. F., HARVEY D. J., WORMALD M. R., SERBAN H., PRUSINER S. B., KOBATA A. e DWEK R. A. (1999) Glycosylation differences between the normal and pathogenic prion protein isoforms. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A** 96:23, 13044-13049.

RUDD P. M., WORMALD M. R., WING D. R., PRUSINER S. B. e DWEK R. A. (2001) Prion glycoprotein: structure, dynamics, and roles for the sugars. **Biochemistry** 40:13, 3759-3766.

RUTALA W. A. e WEBER D. J. (2001) Creutzfeldt-Jakob disease: recommendations for disinfection and sterilization. **Clin.Infect.Dis.** 32:9, 1348-1356.

SABORIO G. P., PERMANNE B. e SOTO C. (2001) Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. **Nature** 411:6839, 810-813.

SAFAR J., WILLE H., ITRI V., GROTH D., SERBAN H., TORCHIA M., COHEN F. E. e PRUSINER S. B. (1998) Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations. **Nat.Med.** 4:10, 1157-1165.

SAKUDO A., NAKAMURA I., IKUTA K. e ONODERA T. (2007) Recent developments in prion disease research: diagnostic tools and in vitro cell culture models. **J.Vet.Med.Sci.** 69:4, 329-337.

SALMIVIRTA M., LIDHOLT K. e LINDAHL U. (1996) Heparan sulfate: a piece of information. **FASEB J.** 10:11, 1270-1279.

SASISEKHARAN R., RAMAN R. e PRABHAKAR V. (2006) Glycomics approach to structure-function relationships of glycosaminoglycans. **Annu.Rev.Biomed.Eng** 8, 181-231.

SCHONBERGER O., HORONCHIK L., GABIZON R., PAPY-GARCIA D., BARRITAULT D. e TARABOULOS A. (2003) Novel heparan mimetics potently inhibit the scrapie prion protein and its endocytosis. **Biochem.Biophys.Res.Commun.** 312:2, 473-479.

SCOTT M. R., WILL R., IRONSIDE J., NGUYEN H. O., TREMBLAY P., DEARMOND S. J. e PRUSINER S. B. (1999) Compelling transgenetic evidence for transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to humans. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A** 96:26, 15137-15142.

SEBOLLELA A., CAGLIARI T. C., LIMAVERDE G. S., CHAPEAUROUGE A., SORGINE M. H., COELHO-SAMPAIO T., RAMOS C. H. e FERREIRA S. T. (2005) Heparin-binding sites in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Localization and regulation by histidine ionization. **J.Biol.Chem.** 280:36, 31949-31956.

SEEGER H., HEIKENWALDER M., ZELLER N., KRANICH J., SCHWARZ P., GASPERT A., SEIFERT B., MIELE G. e AGUZZI A. (2005) Coincident scrapie infection and nephritis lead to urinary prion excretion. **Science** 310:5746, 324-326.

SHORTER J. e LINDQUIST S. (2005) Prions as adaptive conduits of memory and inheritance. **Nat.Rev.Genet.** 6:6, 435-450.

SHUKLA D., LIU J., BLAIKLOCK P., SHWORAK N. W., BAI X., ESKO J. D., COHEN G. H., EISENBERG R. J., ROSENBERG R. D. e SPEAR P. G. (1999) A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry. **Cell** 99:1, 13-22.

SHYNG S. L., HUBER M. T. e HARRIS D. A. (1993) A prion protein cycles between the cell surface and an endocytic compartment in cultured neuroblastoma cells. **J.Biol.Chem.** 268:21, 15922-15928.

SHYNG S. L., LEHMANN S., MOULDER K. L. e HARRIS D. A. (1995) Sulfated glycans stimulate endocytosis of the cellular isoform of the prion protein, PrPC, in cultured cells. **J.Biol.Chem.** 270:50, 30221-30229.

SILVA J. L., LIMA L. M., FOGUEL D. e CORDEIRO Y. (2008) Intriguing nucleic-acidbinding features of mammalian prion protein. **Trends Biochem.Sci.** 33:3, 132-140.

SILVA M. E. e DIETRICH C. P. (1975) Structure of heparin. Characterization of the products formed from heparin by the action of a heparinase and a heparitinase from Flavobacterium heparinum. **J.Biol.Chem.** 250:17, 6841-6846.

SIPE J. D. e COHEN A. S. (2000) Review: history of the amyloid fibril. **J.Struct.Biol.** 130:2-3, 88-98.

SNOW A. D. e KISILEVSKY R. (1985) Temporal Relationship Between Glycosaminoglycan Accumulation and Amyloid Deposition During Experimental Amyloidosis - A Histochemical-Study. Laboratory Investigation 53:1, 37-44.

SNOW A. D., KISILEVSKY R., WILLMER J., PRUSINER S. B. e DEARMOND S. J. (1989) Sulfated Glycosaminoglycans in Amyloid Plaques of Prion Diseases. Acta Neuropathologica 77:4, 337-342.

SNOW A. D., WIGHT T. N., NOCHLIN D., KOIKE Y., KIMATA K., DEARMOND S. J. e PRUSINER S. B. (1990) Immunolocalization of heparan sulfate proteoglycans to the prion protein amyloid plaques of Gerstmann-Straussler syndrome, Creutzfeldt-Jakob disease and scrapie. Lab Invest 63:5, 601-611.

SOBEL M., SOLER D. F., KERMODE J. C. e HARRIS R. B. (1992) Localization and characterization of a heparin binding domain peptide of human von Willebrand factor. **J.Biol.Chem.** 267:13, 8857-8862.

SORIANO F. X., GALBETE J. L. e FORLONI G. (2003) Effect of beta-amyloid on endothelial cells: lack of direct toxicity, enhancement of MTT-induced cell death and intracellular accumulation. **Neurochem.Int.** 43:3, 251-261.

SOUSA M. M., CARDOSO I., FERNANDES R., GUIMARAES A. e SARAIVA M. J. (2001) Deposition of transthyretin in early stages of familial amyloidotic polyneuropathy: evidence for toxicity of nonfibrillar aggregates. **Am.J.Pathol.** 159:6, 1993-2000.

SPEED M. A., KING J. e WANG D. I. (1997) Polymerization mechanism of polypeptide chain aggregation. **Biotechnol.Bioeng.** 54:4, 333-343.

SPEED M. A., WANG D. I. e KING J. (1996) Specific aggregation of partially folded polypeptide chains: the molecular basis of inclusion body composition. **Nat.Biotechnol.** 14:10, 1283-1287.

STAHL N., BORCHELT D. R., HSIAO K. e PRUSINER S. B. (1987) Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. **Cell** 51:2, 229-240.

STEFANI M. e DOBSON C. M. (2003) Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. **J.Mol.Med.** 81:11, 678-699.

SUGAHARA K. e KITAGAWA H. (2000) Recent advances in the study of the biosynthesis and functions of sulfated glycosaminoglycans. **Curr.Opin.Struct.Biol.** 10:5, 518-527.

SUGAHARA K., MIKAMI T., UYAMA T., MIZUGUCHI S., NOMURA K. e KITAGAWA H. (2003) Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate. **Curr.Opin.Struct.Biol.** 13:5, 612-620.

SUNYACH C., JEN A., DENG J., FITZGERALD K. T., FROBERT Y., GRASSI J., MCCAFFREY M. W. e MORRIS R. (2003) The mechanism of internalization of glycosylphosphatidylinositol-anchored prion protein. **EMBO J.** 22:14, 3591-3601.

SUPATTAPONE S., WILLE H., UYECHI L., SAFAR J., TREMBLAY P., SZOKA F. C., COHEN F. E., PRUSINER S. B. e SCOTT M. R. (2001) Branched polyamines cure prioninfected neuroblastoma cells. **J.Virol.** 75:7, 3453-3461.

SVERGUN D. I. e STUHRMANN H. B. (1991) New developments in direct shape determination from small-angle scattering 1. Theory and model calculations. Acta Crystallogr. A47, 736-744.

SWIETNICKI W., PETERSEN R., GAMBETTI P. e SUREWICZ W. K. (1997) pHdependent stability and conformation of the recombinant human prion protein PrP(90-231). J.Biol.Chem. 272:44, 27517-27520.

SZABO,A.G. (2000). Fluorescence principles and measurement. In **Spectrophotometry & Spectrofluorimetry.**, Michael G.Gore, ed. (Reino Unido: Oxford University Press), pp. 33-66.

TARTAGLIA G. G., CAVALLI A., PELLARIN R. e CAFLISCH A. (2004) The role of aromaticity, exposed surface, and dipole moment in determining protein aggregation rates. **Protein Sci.** 13:7, 1939-1941.

TAYLOR D. M. (2000) Inactivation of transmissible degenerative encephalopathy agents: A review. **Vet.J.** 159:1, 10-17.

TELLING G. C., SCOTT M., MASTRIANNI J., GABIZON R., TORCHIA M., COHEN F. E., DEARMOND S. J. e PRUSINER S. B. (1995) Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. **Cell** 83:1, 79-90.

TJERNBERG L., HOSIA W., BARK N., THYBERG J. e JOHANSSON J. (2002) Charge attraction and beta propensity are necessary for amyloid fibril formation from tetrapeptides. **J.Biol.Chem.** 277:45, 43243-43246.

TODD N. V., MORROW J., DOH-URA K., DEALLER S., O'HARE S., FARLING P., DUDDY M. e RAINOV N. G. (2005) Cerebroventricular infusion of pentosan polysulphate in human variant Creutzfeldt-Jakob disease. **J.Infect.** 50:5, 394-396.

TROWBRIDGE J. M. e GALLO R. L. (2002) Dermatan sulfate: new functions from an old glycosaminoglycan. **Glycobiology** 12:9, 117R-125R.

UVERSKY V. N. e FINK A. L. (2004) Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded. **Biochim.Biophys.Acta** 1698:2, 131-153.

VIEIRA T. C., COSTA-FILHO A., SALGADO N. C., ALLODI S., VALENTE A. P., NASCIUTTI L. E. e SILVA L. C. (2004) Acharan sulfate, the new glycosaminoglycan from Achatina fulica Bowdich 1822. Structural heterogeneity, metabolic labeling and localization in the body, mucus and the organic shell matrix. **Eur.J.Biochem.** 271:4, 845-854.

VILES J. H., COHEN F. E., PRUSINER S. B., GOODIN D. B., WRIGHT P. E. e DYSON H. J. (1999) Copper binding to the prion protein: structural implications of four identical cooperative binding sites. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A** 96:5, 2042-2047.

VILLEGAS V., ZURDO J., FILIMONOV V. V., AVILES F. X., DOBSON C. M. e SERRANO L. (2000) Protein engineering as a strategy to avoid formation of amyloid fibrils. **Protein Sci.** 9:9, 1700-1708.

VIRCHOW R. (1854) Zur cellulosefrage. Virchows Arch.Pathol.Anat.Physiol. 6, 416-426.

WANG H., TOIDA T., KIM Y. S., CAPILA I., HILEMAN R. E., BERNFIELD M. e LINHARDT R. J. (1997) Glycosaminoglycans can influence fibroblast growth factor-2 mitogenicity without significant growth factor binding. **Biochem.Biophys.Res.Commun.** 235:2, 369-373.

WARD R. V., JENNINGS K. H., JEPRAS R., NEVILLE W., OWEN D. E., HAWKINS J., CHRISTIE G., DAVIS J. B., GEORGE A., KARRAN E. H. e HOWLETT D. R. (2000) Fractionation and characterization of oligomeric, protofibrillar and fibrillar forms of betaamyloid peptide. **Biochem.J.** 348 Pt 1, 137-144.

WARNER R. G., HUNDT C., WEISS S. e TURNBULL J. E. (2002) Identification of the heparan sulfate binding sites in the cellular prion protein. **J.Biol.Chem.** 277:21, 18421-18430.

WEISSMANN C. (2004) The state of the prion. Nat.Rev.Microbiol. 2:11, 861-871.

WEISSMANN C. (2009) Thoughts on mammalian prion strains. Folia Neuropathol. 47:2, 104-113.

WETZEL R. (1994) Mutations and off-pathway aggregation of proteins. **Trends Biotechnol.** 12:5, 193-198.

WHITELOCK J. M., MELROSE J. e IOZZO R. V. (2008) Diverse cell signaling events modulated by perlecan. **Biochemistry** 47:43, 11174-11183.

WINDL O., LORENZ H., BEHRENS C., ROMER A. e KRETZSCHMAR H. A. (1999) Construction and characterization of murine neuroblastoma cell clones allowing inducible and high expression of the prion protein. **J.Gen.Virol.** 80 (Pt 1), 15-21.

WONG C., XIONG L. W., HORIUCHI M., RAYMOND L., WEHRLY K., CHESEBRO B. e CAUGHEY B. (2001) Sulfated glycans and elevated temperature stimulate PrP(Sc)-dependent cell-free formation of protease-resistant prion protein. **EMBO J.** 20:3, 377-386.

WOOD S. J., MALEEFF B., HART T. e WETZEL R. (1996) Physical, morphological and functional differences between ph 5.8 and 7.4 aggregates of the Alzheimer's amyloid peptide Abeta. **J.Mol.Biol.** 256:5, 870-877.

WOPFNER F., WEIDENHOFER G., SCHNEIDER R., VON BRUNN A., GILCH S., SCHWARZ T. F., WERNER T. e SCHATZL H. M. (1999) Analysis of 27 mammalian and 9 avian PrPs reveals high conservation of flexible regions of the prion protein. **J.Mol.Biol.** 289:5, 1163-1178.

WROE S. J., PAL S., SIDDIQUE D., HYARE H., MACFARLANE R., JOINER S., LINEHAN J. M., BRANDNER S., WADSWORTH J. D., HEWITT P. e COLLINGE J. (2006) Clinical presentation and pre-mortem diagnosis of variant Creutzfeldt-Jakob disease associated with blood transfusion: a case report. **Lancet** 368:9552, 2061-2067.

WU S. J., CHUN M. W., SHIN K. H., TOIDA T., PARK Y., LINHARDT R. J. e KIM Y. S. (1998) Chemical sulfonation and anticoagulant activity of acharan sulfate. **Thromb.Res.** 92:6, 273-281.

WUTHRICH K. e RIEK R. (2001) Three-dimensional structures of prion proteins. Adv.Protein Chem. 57, 55-82.

YAMAGUCHI I., SUDA H., TSUZUIKE N., SETO K., SEKI M., YAMAGUCHI Y., HASEGAWA K., TAKAHASHI N., YAMAMOTO S., GEJYO F. e NAIKI H. (2003) Glycosaminoglycan and proteoglycan inhibit the depolymerization of beta2-microglobulin amyloid fibrils in vitro. **Kidney Int.** 64:3, 1080-1088.

YIN S., PHAM N., YU S., LI C., WONG P., CHANG B., KANG S. C., BIASINI E., TIEN P., HARRIS D. A. e SY M. S. (2007) Human prion proteins with pathogenic mutations share common conformational changes resulting in enhanced binding to glycosaminoglycans. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A** 104:18, 7546-7551.

YIN S., YU S., LI C., WONG P., CHANG B., XIAO F., KANG S. C., YAN H., XIAO G., GRASSI J., TIEN P. e SY M. S. (2006) Prion proteins with insertion mutations have altered N-terminal conformation and increased ligand binding activity and are more susceptible to oxidative attack. **J.Biol.Chem.** 281:16, 10698-10705.

YOUNG I. D., AILLES L., NARINDRASORASAK S., TAN R. e KISILEVSKY R. (1992) Localization of the Basement-Membrane Heparan-Sulfate Proteoglycan in Islet Amyloid Deposits in Type-Ii Diabetes-Mellitus. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine** 116:9, 951-954.

YOUNG I. D., WILLMER J. P. e KISILEVSKY R. (1989) The Ultrastructural-Localization of Sulfated Proteoglycans Is Identical in the Amyloids of Alzheimers-Disease and Aa, Al, Senile Cardiac and Medullary Carcinoma-Associated Amyloidosis. Acta Neuropathologica 78:2, 202-209.

YU S., YIN S., LI C., WONG P., CHANG B., XIAO F., KANG S. C., YAN H., XIAO G., TIEN P. e SY M. S. (2007) Aggregation of prion protein with insertion mutations is proportional to the number of inserts. **Biochem.J.** 403:2, 343-351.

YU S., YIN S., PHAM N., WONG P., KANG S. C., PETERSEN R. B., LI C. e SY M. S. (2008) Ligand binding promotes prion protein aggregation--role of the octapeptide repeats. **FEBS J.** 275:22, 5564-5575.

ZAHN R., LIU A., LUHRS T., RIEK R., VON SCHROETTER C., LOPEZ G. F., BILLETER M., CALZOLAI L., WIDER G. e WUTHRICH K. (2000) NMR solution structure of the human prion protein. **Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A** 97:1, 145-150.

ZAHN R., VON S. C. e WUTHRICH K. (1997) Human prion proteins expressed in Escherichia coli and purified by high-affinity column refolding. **FEBS Lett.** 417:3, 400-404.

ZANUSSO G., FARINAZZO A., PRELLI F., FIORINI M., GELATI M., FERRARI S., RIGHETTI P. G., RIZZUTO N., FRANGIONE B. e MONACO S. (2004) Identification of distinct N-terminal truncated forms of prion protein in different Creutzfeldt-Jakob disease subtypes. J.Biol.Chem. 279:37, 38936-38942.

Prion Protein Complexed to N2a Cellular RNAs through Its N-terminal Domain Forms Aggregates and Is Toxic to Murine Neuroblastoma Cells*

Received for publication, March 17, 2008, and in revised form, May 1, 2008 Published, JBC Papers in Press, May 1, 2008, DOI 10.1074/jbc.M802102200

Mariana P. B. Gomes[‡], Thiago A. Millen[‡], Priscila S. Ferreira[‡], Narcisa L. Cunha e Silva[§], Tuane C. R. G. Vieira[‡], Marcius S. Almeida[‡], Jerson L. Silva^{‡1}, and Yraima Cordeiro^{¶2}

From the [‡]Programa de Biologia Estrutural, Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear Jiri Jonas, Instituto de Bioquímica Médica, [§]Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, and [¶]Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21491-590 Rio de Janeiro, Brazil

ASBMB

ibc

Conversion of the cellular prion protein (PrP^C) into its altered conformation, PrP^{Sc}, is believed to be the major cause of prion diseases. Although PrP is the only identified agent for these diseases, there is increasing evidence that other molecules can modulate the conversion. We have found that interaction of PrP with double-stranded DNA leads to a protein with higher β -sheet content and characteristics similar to those of PrP^{Sc}. RNA molecules can also interact with PrP and potentially modulate PrP^C to PrP^{Sc} conversion or even bind differentially to both PrP isoforms. Here, we investigated the interaction of recombinant murine PrP with synthetic RNA sequences and with total RNA extracted from cultured neuroblastoma cells (N2aRNA). We found that PrP interacts with N2aRNA with nanomolar affinity, aggregates upon this interaction, and forms species partially resistant to proteolysis. RNA does not bind to N-terminal deletion mutants of PrP, indicating that the N-terminal region is important for this process. Cell viability assays showed that only the N2aRNA extract induces PrP-RNA aggregates that can alter the homeostasis of cultured cells. Small RNAs bound to PrP give rise to nontoxic small oligomers. Nuclear magnetic resonance measurements of the PrP-RNA complex revealed structural changes in PrP, but most of its native fold is maintained. These results indicate that there is selectivity in the species generated by interaction with different

* This work was supported by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, the Millenium Institute for Structural Biology in Biomedicine and Biotechnology (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico Millenium Program), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (to J. L. S. and Y. C.), Financiadora de Estudos e Projetos of Brazil, an international grant from the International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (to J. L. S.), and a grant from L'Oréal, and Fundação Universitária José Bonifácio grant 13145-8 (to Y. C.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

* Author's Choice—Final version full access.

The on-line version of this article (available at http://www.jbc.org) contains supplemental data, supplemental Table S1, and supplemental Figs. S1–S4. This work is dedicated to Leopoldo de Meis in commemoration of his 70th molecules of RNA. The catalytic effect of RNA on the $\rm PrP^{C} \rightarrow$ PrP^{Sc} conversion depends on the RNA sequence, and small RNA molecules may exert a protective effect.

Prion diseases can be infectious, sporadic, or inherited (1). Regardless of their origin, they are related to modifications of a ubiquitous membrane-anchored protein, the prion protein (PrP).³ Through a poorly understood process, the cellular PrP isoform (PrP^C), an α -helix-rich protein, undergoes a profound conformational change, acquiring higher β -sheet content; the latter isoform is known as PrP^{Sc} (Sc from scrapie) and is the only known component of the infectious prion particle (1-4).

The protein-only hypothesis postulates that PrP^{Sc} "multiplies" by catalyzing the conversion of PrP^C into a likeness of itself, thus becoming responsible for its own propagation (5). This hypothesis is based strongly on the fact that PrP knock-out mice are resistant to prion infection, suggesting that endogenous PrP is necessary for prion propagation and infection (6). It was also suggested, however, that an additional unknown factor could influence the PrP^C to PrP^{Sc} conversion (7–10). This molecule would act by lowering the free energy barrier between PrP^C and PrP^{Sc} and triggering conversion (11, 12). In this field, a great number of biological macromolecules have emerged as candidates for conversion catalysts. Cellular adhesion molecules, nucleic acids (NAs), basal membrane molecules, and sulfated glycans, among other biological macromolecules, have been reported to interact with PrP^C and to induce its conversion into a β -sheet-rich structure similar to the infectious prion protein (8, 10, 13, 14).

Our previous findings have demonstrated that PrP interacts with nucleic acids in vitro, binding small sequences of doublestranded DNA, acquiring β -sheet secondary structure as revealed by spectroscopic measurements and presenting some PrP^{Sc}-like characteristics (8, 15). It has also been shown that PrP interaction with nucleic acids can lead to partial unfolding of prion protein, triggering formation of an amyloid-like struc-

birthday. ¹ To whom correspondence may be addressed: Instituto de Bioquímica Méd-

ica, BE, S10 21491-590, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Tel.: 55-21-2562-6756; Fax: 55-21-2561-2936; E-mail: jerson@biogmed.ufrj.br.

² To whom correspondence may be addressed: Departamento de Fármacos, Faculdade de Farmácia, Bl. B Ss, S15, 21491-590, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Tel.: 55-21-2562-6756; Fax: 55-21-2561-2936; E-mail: yraima@pharma.ufrj.br.

³ The abbreviations used are: PrP, prion protein; rPrP, recombinant prion protein; HSQC, heteronuclear single quantum coherence; LS, light scattering; N2aRNA, total RNA extracted from cultured neuroblastoma cells; NA, nucleic acid; FITC, fluorescein isothiocyanate; MTT, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; PK, proteinase K.

Prion-RNA Complex Aggregates and Their Toxicity to Cultured Cells

ture resistant to protein ase K digestion (8, 16–18), depending on the PrP-NA molar ratio.

The interaction of prion protein with ribonucleic acid has also been reported. PrP^{C} interacts with mammalian RNA preparations, acquiring resistance to protease digestion *in vitro* (17, 19, 20). Highly structured RNAs can also convert human PrP^{C} into PrP^{Sc} -like forms (21), and some RNA aptamers bind with high specificity to the disease-associated PrP conformation (22, 23). It has also been reported that the N terminus of the protein is important for the interaction with nucleic acids, because mutants lacking different portions of this region presented lower or no affinity for some RNA aptamers (24, 25), and DNA binding was obtained for a rPrP(23-144) construction (26).

All of these findings suggest that nucleic acids play a role in prion diseases. Based on these results, we have proposed a complement for the "protein-only" hypothesis in which nucleic acids can act by serving as catalysts and/or molecular chaperones in the conversion, not by encoding genetic information (8, 10, 13). More recently, Prusiner and co-workers (27) found that the binding of single-stranded DNA thioaptamers to PrP occurs on at least two different sites on the protein. Selection against recombinant Syrian hamster PrP 90-231 (recSHaPrP) identified a 12-base consensus sequence within a series of 20 thioaptamers, all of which consist of 40 bases, and one thioaptamer bound to recSHaPrP with extremely high affinity (0.58 nm) (27). The potential therapeutic use of these molecules against prion diseases reinforces the importance of understanding the interaction of PrP protein with different nucleic acids at the molecular level.

Besides the prion structural puzzle and the mystery involving the mechanisms of conversion from PrP^{C} into PrP^{Sc} , many questions remain unanswered regarding the toxicity of prion aggregates. In addition to amyloid fibers and unstructured deposits of misfolded protein found in infected brains, smaller oligomers have been reported to be the toxic species for several amyloidogenic diseases, including transthyretin amyloidoses, Alzheimer, and Parkinson diseases (28–30). A series of PrP aggregates, oligomers, and fibers generated *in vitro* have been tested for toxicity in cultured cells and hamsters. In both cases, the aggregates were toxic, leading to cell death in culture and to neurodegeneration and spongiosis in hamster brains (31, 32). Moreover, it cannot be completely excluded that a small oligonucleotide may be present in PrP aggregates and account for prion cytotoxicity, as previously proposed (33).

Here we report experimental data on the interaction between murine recombinant prion protein (rPrP23–231) and RNA. We used total RNA extracted from cultured cells and small synthetic oligonucleotides, focusing on PrP secondary and tertiary structure changes. We have also investigated the role of the N-terminal PrP region in RNA binding using two mutants lacking N-terminal domains and evaluating the toxicity of the PrP-RNA complex in cultured mouse neuroblastoma cells (N2a). The recombinant prion protein (rPrP) deletion mutants investigated were rPrP Δ 51–90 and rPrP Δ 32–121, the former lacking residues 51–90, which is the copper-binding region, and the latter lacking residues 32–121, the majority of the PrP N terminus (34). We show that RNA extracted from N2a cells (N2aRNA) induces a loss of α -helical secondary structure and triggers aggregation of rPrP23–231 but has no effect on the rPrP-lacking portions of the N-terminal region. Nuclear magnetic resonance experiments reveal, however, that full-length rPrP partially recovers its native fold 3 days after RNA addition, but the changes observed in heteronuclear single quantum coherence (HSQC) spectrum suggest that RNA binding induces changes in PrP structure. We also find that aggregates generated from PrP-N2aRNA interaction are toxic to cultured N2a cells, which suggests that RNA molecules are potential candidates for catalyzing the PrP^C to PrP^{Sc} conversion *in vivo*.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Construction, Expression, and Purification of Recombinant Prion Proteins—Construction of rPrP N-terminal deletion mutants rPrP Δ 51–90 and rPrP Δ 32–121, heterologous expression in *Escherichia coli*, and further purification of the constructs and full-length rPrP by high affinity column refolding followed previously described protocols (8, 34, 35).

rPrP23-231, rPrP Δ 31-121, and rPrP Δ 51-90 Labeling with Fluorescein Isothiocyanate-All of the rPrPs were labeled with amino-reactive fluorescein isothiocyanate (FITC) for fluorescence anisotropy assays. For the labeling reaction, rPrPs were dissolved in 0.1 M sodium bicarbonate buffer at pH 8.0 to a final concentration of 5-10 mg/ml and incubated with FITC (final concentration, 0.5–1.0 mg/ml) for 1 h at room temperature. After incubation, the FITC-rPrP23–231 conjugate (FITC-rPrP) was separated from the free dye by gel filtration using a PD-10 desalting column (Amersham Biosciences) equilibrated with Tris buffer (50 mm, pH 7.4) containing 100 mm NaCl. After elution, concentration of the labeled protein and the efficiency of labeling were determined based on molar extinction coefficients of rPrP23–231 (63,495 cm⁻¹ M⁻¹ at 280 nm), rPrP Δ 32– 121 (33,015 cm $^{-1}$ M $^{-1}$ at 280 nm), rPrP Δ 51–90 (41,495 cm $^{-1}$ M^{-1} at 280 nm), and FITC (68,000 cm⁻¹ M^{-1} at 494 nm). FITCrPrPs were stored at -20 °C and protected from light.

Ribonucleic Acid Samples—Total RNA from cultured neuroblastoma (N2a) cells (N2aRNA) (36) was extracted using the RNeasy Midikit (Qiagen) and the RNAspin Mini isolation kit (GE Healthcare, Milwaukee, WI). Other cell lineages used in this work are listed in the supplemental data. High pressure liquid chromatography-purified synthetic single-stranded RNA fragment 43–59 of SAF93 aptamer (SAF93^{43–59}) (22) and opRNA, a random 18-mer sequence, derived from a translational operator of MS2 bacteriophage (37) were obtained from Integrated DNA Technologies, Inc. (Coralville, IA). Nucleotide sequences were: SAF93^{43–59}, 5'-GGA UGC AAU CUC CAU CCC-3'; and opRNA, 5'-AAA CAU GGG UUC CCA UGU-3'. Synthetic RNA samples were maintained lyophilized at -20 °C and used in RNase-free water.

Reagents and Protein Samples—All of the reagents used were of analytical grade. Protein concentration was 1.0 μ M (0.023 mg/ml for rPrP23–231, 0.018 mg/ml for rPrP Δ 51–90, and 0.014 mg/ml for rPrP Δ 32–121) for light scattering (LS) and fluorescence measurements, 30 μ M (0.69 mg/ml for rPrP23– 231, 0.57 mg/ml for rPrP Δ 51–90, and 0.42 mg/ml for rPrP Δ 32– 121) for CD assays, and 50 nM (1.15 μ g/ml for rPrP Δ 32–121) for fluorescence anisotropy assays. All of the experiments were

ASBMB

Prion-RNA Complex Aggregates and Their Toxicity to Cultured Cells

performed in 50 mM Tris buffer containing 100 mM NaCl, pH 7.4. All of the figures presented in this work are representative of at least three experiments.

Spectroscopic Measurements—LS, fluorescence anisotropy, and fluorescence emission were recorded on an ISSPC1 fluorometer (ISS, Champaign, IL). LS at 90 ° was measured illuminating the samples at 320 nm and collecting LS from 300 to 340 nm. Tryptophan fluorescence of rPrP23–231, rPrP Δ 51–90, and rPrP Δ 32–121 was measured by exciting the samples at 280 nm and collecting the emission from 300 to 420 nm. For anisotropy measurements, the samples were excited at 490 nm, and the emission was observed through a 3–69 filter.

Far-UV Circular Dichroism—CD spectra were recorded in a Jasco J-715 spectropolarimeter (Jasco Corporation, Tokyo, Japan) at 25 °C with circular 0.10-mm-pathlength cells. Buffer spectra were subtracted from each sample spectrum, and traces were collected with four accumulations each.

NMR Spectroscopy—NMR spectra were collected at 298 K with a Bruker Avance 800-MHz spectrometer equipped with gradient triple resonance probes. The spectra were processed using TOPSPIN 2.1 (Bruker) and analyzed with CARA 1.8 (38). Two-dimensional [15 N, 1 H]HSQCs were collected with 2048 \times 200 points and 8–64 scans for the different samples. One-dimensional 1 H-NMR spectra were collected with 2048 points and 128 scans for all samples. For HSQC measurements, we used 0.2 mM uniformly labeled [15 N]rPrP23–231 in 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, 100 mM NaCl, and a 10% D₂O, 90% H₂O mixture in the presence (at 1:1 molar ratio) or absence of SAF93^{43–59}.

Transmission Electron Microscopy—Samples were adhered to a carbon-coated grid, blotted to remove excess material, and stained for 10 s with a 2% solution of uranyl acetate prepared in water. The images were digitally collected with a Zeiss EM 900 electron microscope (Carl Zeiss Inc.).

Neuroblastoma Cell (N2a) Culture and Cell Viability Assays-N2a cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum and 2% antibiotic (penicillin, erythromycin, and gentamicin) in a 5% CO₂ atmosphere for 3 days and then transferred to a 96-well plate (\sim 5,000 cells/well). After transfer, the cells were exposed to samples containing rPrP23-231, N2aRNA, or rPrP-RNA complex for 3 days. An MTT assay was performed following the previously described protocol (30). MTT enters the cells by endocytosis and is reduced to formazan by NADH reductase and other enzymes in a reaction that can be measured spectrophotometrically. The amount of formazan reflects the reductive potential of the cytoplasm and the cell viability and generally shows good correlation with other viability tests (30, 39, 40). Live/dead assays were performed following the protocol provided by the kit (live/dead viability/cytotoxicity kit for mammalian cells; Invitrogen). Live cells were distinguished by the presence of ubiquitous intracellular esterase activity, which was determined by the enzymatic conversion of the virtually nonfluorescent cell-permeant calcein AM to the intensely fluorescent calcein. The polyanionic dye calcein is well retained within live cells, producing an intense uniform green fluorescence in live cells (ex/em = \sim 495 nm/ \sim 515 nm). EthD-1 enters cells with damaged membranes and undergoes a 40-fold enhancement of fluorescence upon binding to nucleic acids, thereby producing a bright red fluorescence in dead cells (ex/em = \sim 495 nm/ \sim 635 nm). EthD-1 is excluded by the intact plasma membrane of live cells. All of the assays were done in triplicate. Live/dead images were generated in the Observer.Z1 Microscope (SN: 3834000373; Carl Zeiss Inc.).

Western Blotting—All of the protease-digested (+PK) samples were incubated with 20 μ g/ml proteinase K (Sigma-Aldrich) for 1 h at 37 °C. SDS-PAGE was performed on 1.5-mm 15% polyacrylamide gels. The blocked membrane was incubated overnight at 4 °C with anti-PrP monoclonal antibody (SAF84; Cayman Chemical, MI) diluted 1:500. Following this incubation, the membrane was washed and incubated for 1 h at room temperature with secondary antibody, IgG-horseradish peroxidase-conjugated goat anti mouse (SC-2005; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) diluted 1:200. The blot was stained with diaminobenzidine tetrahydrochloride and revealed with hydrogen peroxide (both from Sigma-Aldrich).

RESULTS

We first investigated the effects of RNA on the full-length recombinant PrP (rPrP23-231) in vitro. It has been shown that PrP^C present in hamster brain homogenates interacts with RNA in vitro, acquiring protease resistance, and that RNase treatment can inhibit this conversion without changing the PrP^C content (17). Questions remain unanswered, however, regarding the size and structure of the RNA that are necessary for interaction with $\rm PrP^{C}$ and for catalysis of this conversion. In light of these results, we investigated the interaction of prokaryotic and eukaryotic RNA extracts and of two synthetic RNAs (SAF9343-59 and 18-mer opRNA) (Fig. 1 and supplemental Table S1) with rPrP23-231 and with two N-terminal rPrP deletion mutants (rPrP Δ 51–90 and rPrP Δ 32–121). The SAF93^{43–59} sequence was chosen based on previous work (22) that described the isolation of 2'-fluoropyrimidine-substituted RNA aptamers that bind selectively to disease-associated, β -sheet-rich isoforms of PrP. The SAF93 sequence was identified by Sayer et al. (23) as a high affinity PrP ligand; therefore, we selected the main binding domain (nucleotides 43-59) to perform our studies. The opRNA random sequence was selected because it has been suggested that PrP-nucleic acid interaction is guided by NA structure and not by its specific nucleotide sequence (22, 23). The local secondary structures of the synthetic RNAs used in this work were predicted with the program GeneBee, which indicated that both sequences adopt a hairpin-like structure (not shown). Thus we report the PrP binding behavior of two different base sequences with similar secondary structures.

RNA Incubation with rPrP23–231 Leads to Protein Aggregation—We verified that incubation of the RNA extracts with recombinant PrP led to an increase in light scattering values for full-length rPrP, indicating that the protein aggregates upon RNA addition (Table 1 and supplemental Table S1). This result was obtained for incubation with both prokaryotic (from *E. coli*) and eukaryotic (from mammals, N2aRNA and vRNA; from mosquito cells, C6RNA; and from yeast, ScRNA) RNA extracts (supplemental Table S1). Interestingly, incubation of the rPrP Δ 51–90 N-terminal deletion mutant with all of the

ASBMB
Supplemental Material can be found at: http://www.jbc.org/content/suppl/2008/05/07/M802102200.DC1.html

Prion-RNA Complex Aggregates and Their Toxicity to Cultured Cells



FIGURE 1. **RNA binding to rPrP and its effects on rPrP secondary structure.** *A*, opRNA was titrated into 50 nm FITC-labeled rPrP23–231 (*black*), rPrP Δ 51–90 (*dark gray*), or rPrP Δ 32–121 (*light gray*). Anisotropy values were collected through a 3–69 filter (excitation was set at 490 nm). *B*, CD spectra of free rPrP23–231 (*solid black line*) and in the presence of opRNA (*solid black line*) and free rPrP Δ 51–90 (*dask gray line*). The *inset* represents the CD spectra of opRNA (*dask green line*) or SAF93^{43–59} (*dark grean line*). The *inset* represents the CD spectra of opRNA (*dashed black line*) and SAF93^{43–59} (*dotted black line*) free in solution. *C*, CD spectra of free rPrP23–231 (*solid black line*) and in the presence of N2aRNA at 0.69 mg/ml (*dashed black line*); free rPrP Δ 51–90 in the presence of

RNAs investigated did not alter the LS values, revealing an important role for the PrP N-terminal region in the RNA interaction. We further selected the neuroblastoma cell-derived RNA (N2aRNA) to continue our studies because this RNA originates from the same tissue as our prion protein constructs (from mouse) (Figs. 1*C* and 2).

The rPrP N-terminal Region Is Necessary for RNA-induced Aggregation—We monitored the interaction of FITC-labeled rPrP23–231, rPrP Δ 51–90, and rPrP Δ 32–121 with opRNA by fluorescence anisotropy to further investigate the role of the N-terminal region in RNA binding to rPrP. Increasing concentrations of opRNA led to an increase in the anisotropy values only for RNA titration in rPrP23–231 solution, confirming the high affinity interaction between full-length PrP and RNA (Fig. 1*A, black symbols*). Binding of rPrP23–231 to N2aRNA was also observed, with a half-maximal effect at 5.95 µg/ml (Fig. 2). Consistent with measurements taken when rPrP Δ 51–90 is incubated with different RNA extracts (supplemental Table S1), anisotropy data confirm the absence of interaction between the N-terminal deletion rPrP mutants and RNA in the investigated concentration range (Fig. 1*A, gray symbols*).

PrP-RNA Interaction Leads to Secondary and Tertiary Structural Changes Only for rPrP23-231-The changes in secondary structure of the prion protein constructs upon interaction with the different RNAs were analyzed by CD. To determine whether free RNA interferes with the CD spectra, far-UV CD spectra were collected for all RNA samples used. They all showed one negative peak (~208 nm) and one positive peak (~265 nm) (Fig. 1, *B* and *C*, *insets*). These results show a significant secondary structure signal from the nucleic acids that were investigated. Because the RNA structure may change upon rPrP binding, the RNA spectra were not subtracted from the spectra of the complex (PrP-RNA). Instead, the spectrum of the PrP-RNA complex is displayed together with the sum of each RNA spectrum and that of rPrP alone (supplemental Fig. S1). In this way, it is possible to infer whether the changes seen are due to modifications in the secondary structure of PrP or due only to the addition of the free RNA and rPrP spectra.

The addition of synthetic RNA oligonucleotides SAF93^{43–59} and opRNA (Fig. 1*B*) and of N2aRNA (Fig. 1*C*) led to immediate loss of secondary structure in rPrP23–231. Interestingly, changes in secondary structure caused by the synthetic RNA sequences were different from the effects observed for N2aRNA. Both SAF93^{43–59} and opRNA induced an increase in LS (supplemental Table S1), but this increase was much less marked than the one induced by N2aRNA (Table 1 and supplemental Table S1). This result indicates that, for the synthetic RNA sequences, an oligomeric species of limited size is populated. Unlike N2aRNA, in the presence of SAF93^{43–59} and opRNA, rPrP23–231 fluorescence emission intensity was reduced and shifts of the spectra (increase in center of spectral mass values) to more energetic wavelengths were also observed (supplemental Table S1). Because the N2aRNA is a pool of sev-

ibc

ASBMB

N2aRNA at 0.57 mg/ml (dashed red line); rPrP Δ 32–121 at 0.42 mg/ml (solid blue line) and rPrP Δ 32–121 in the presence of N2aRNA at 0.42 mg/ml (dashed blue line). The inset represents the CD spectrum of free N2aRNA at 0.69 mg/ml. For *B* and *C*, protein and synthetic RNAs concentrations were 30 μ M.

Prion-RNA Complex Aggregates and Their Toxicity to Cultured Cells

TABLE 1

ASBMB

The Journal of Biological Chemistry

ibc

Spectroscopic measurements	rPrP23-231		RNA digestion by RNase A		rPrP∆51–90	
	-RNA	+RNA	Before rPrP incubation with RNA	After rPrP incubation with RNA	-RNA	+RNA
ϵ 222 nm ^a	-12.32	-1.23	_	_	-6.85	-6.63
LS/LS_0^{b}	1	21.18	2.09	5.96	1	0.86
FI/FI_0^b	1	1.03	1.00	0.82	1	0.88
ΔCM (cm ⁻¹) ^c	0	227	-35	90	0	6

^a Raw ellipticity values at 222 nm obtained from CD measurements.

^b Normalized values obtained by dividing each recorded value (in the presence of N2aRNA) by the initial value (*LS*₀, initial light scattering; *FI*₀, initial fluorescence intensity) for free protein in solution.

^c Changes in center of spectral mass values from the tryptophan emission spectra. N2aRNA digestion with RNase A was performed at room temperature for 1 h at pH 8.0 with a N2aRNa:RNase ratio of 100:1.



FIGURE 2. **N2aRNA binds rPrP23–231 with high affinity.** N2aRNA was titrated into a 1.15 μ g/ml (50 nm) FITC-rPrP23–231 solution, and the anisotropy values were collected through a 3–69 filter (excitation was set at 490 nm).

eral RNAs with distinct sequences, sizes, and structures, differences between synthetic RNAs and the RNA pool are to be expected.

We observed that N2aRNA addition led to visible protein aggregation and that the CD spectrum of the complex showed immediate loss of α -helical content (at 222 nm) in the presence of N2aRNA (Fig. 1*C* and supplemental Fig. S1). This process is irreversible, because no significant gain in the secondary structure content was observed even after 7 days of incubation (not shown).

The aggregation of rPrP23–231 was confirmed by the increase in LS upon RNA addition (Table 1 and supplemental Table S1). The fluorescence emission spectrum was displaced toward more energetic wavelengths, as seen from the increase in CM values after N2aRNA incubation with rPrP23–231 (Table 1 and supplemental Table S1) but not when this RNA extract was incubated with rPrP Δ 51–90 (Table 1). This result indicates protection of the tryptophan residues, which are mainly exposed to the solvent when rPrP23–231 is free in solution (35). Total fluorescence intensity did not change significantly in the presence of N2aRNA (Table 1 and supplemental Table S1).

There were no changes in secondary structure (α -helical content) in either of the rPrP N-terminal deletion mutants after incubation with opRNA, SAF93^{43–59}, or N2aRNA, as shown in Fig. 1 (*B* and *C*) and supplemental Fig. S1 for rPrP Δ 51–90 (not shown for rPrP Δ 32–121). Furthermore, neither LS nor fluorescence emission changed significantly in either case upon RNA addition, indicating no changes in tertiary structure (Table 1,



FIGURE 3. **rPrP23–231-N2aRNA resistance to PK digestion.** Western blotting for PrP C-terminal domain. The samples were treated with PK at 37 °C for 1 h (ratio PrP:PK = 100:1), except where indicated (–). *Lanes* 1 and 2, rPrP23– 231 at 5 μ M; *Lanes* 3 and 4, rPrP23–231 at 5 μ M + N2aRNA at 0.057 mg/ml. Molecular mass markers (*MW*) are shown on the *left*.

last column, and supplemental Table S1 for rPrP Δ 51–90). These data agree with prior observations that suggest the importance of the N-terminal region to PrP-NA interactions (24, 25, 41, 42).

Treatment of rPrP23-231-N2aRNA Complex with Proteinase K—PrP^C and PrP^{Sc} differ substantially in their conformations. Unlike PrP^C, PrP^{Sc} is a multimeric assembly characterized by an increase in the amount of β -sheet structure and enhanced resistance to proteinase K (PK) digestion (3, 4). After observing rPrP23-231 changes in secondary structure and aggregation upon N2aRNA binding, we treated the aggregates with PK for 1 h at 37 °C (ratio PrP:PK = 100:1). The Western blotting shown in Fig. 3 revealed that PK treatment completely digested free rPrP23-231, but the rPrP23-231-N2aRNA complex was partially resistant to digestion. The same result was observed when PK resistance of the rPrP23-121-N2aRNA complex was monitored by SDS-PAGE and stained with silver (supplemental Fig. S2). Larger aggregates are also formed upon incubation with N2aRNA and present high resistance to PK digestion (supplemental Fig. S2B, asterisk). Treatment of other rPrP23-231-RNA complexes formed by other RNA extracts and synthetic sequences SAF9343-59 and opRNA, however, resulted in total digestion by PK (not shown). We performed the same assay for rPrP Δ 51–90 and verified that this rPrP construction does not

Supplemental Material can be found at: http://www.jbc.org/content/suppl/2008/05/07/M802102200.DC1.html

Prion-RNA Complex Aggregates and Their Toxicity to Cultured Cells



FIGURE 4. Characterization of rPrP23-231 and SAF93⁴³⁻⁵⁹ interaction by NMR spectroscopy. Superposition of the two-dimensional [¹⁵N,¹H]HSQC spectra of rPrP(23–231) (*black contours*) and rPrP23–231 72 h after the addition of SAF93^{43–59} (*red contours*). The *inset* presents a region of one-dimensional ¹H-NMR spectra of rPrP23–231 (*black line*), rPrP23–231 immediately after SAF93^{43–59} addition (*blue line*), and 72 h after RNA addition (red line).

acquire protease resistance upon incubation with N2aRNA (supplemental Fig. S3), further indicating that the N-terminal mutants do not interact with the RNAs investigated here.

Treatment of N2aRNA with RNase Blocks the PrP-RNA Interaction Effects-Prior treatment of N2aRNA with RNase A abolished the effect of the nucleic acid on rPrP23-231 aggregation, as shown in Table 1. LS and fluorescence emission also returned to values close to that of the soluble, nonaggregated rPrP23-231. This indicates that the effects seen are specific for RNA interaction and not caused by interaction with free ribonucleotides in solution. In contrast, treatment with RNase A after RNA incubation with rPrP23-231 did not completely reverse aggregation and tertiary structure changes (Table 1), suggesting either that the rPrP aggregate formed can no longer be solubilized after RNA removal or that the RNA bound to PrP is protected from cleavage. To confirm the latter assumption we applied RNase-treated rPrP23-231-N2aRNA samples on agarose gel in the presence of ethidium bromide (supplemental Fig. S4). It is possible to visualize that larger aggregates are formed, and even after RNase treatment there is still RNA associated to the protein (supplemental Fig. S4, lane 4).

NMR Spectroscopy of PrP(23-231) and the Effect of RNA Addition-In Fig. 4, we present the NMR data obtained for rPrP23-231 in the presence or absence of RNA (SAF9343-59). We selected this RNA sequence because it is homogeneous and can be synthesized in sufficient quantities to perform the NMR measurements. The N2aRNA does not fulfill these characteristics. A small region of one-dimensional ¹H NMR spectra taken for free rPrP23-231, rPrP23-231 immediately after RNA addition, and 3 days after RNA addition is shown in the *inset* of Fig. 4. These spectra were recorded and processed with the same spectral parameters so that the methyl signal shown could serve as a relative indication of soluble protein concentration.

According to the protein sequence, 288 HN cross-peaks are expected in the two dimensional [¹⁵N,¹H]HSQC for rPrP23–231. We found 225 HN cross-peaks in the ¹⁵N,¹H]HSQC of the sample prior to RNA supplementation. Immediately after RNA addition, there were no signals above the noise because of protein precipitation. It is worth mentioning that the precipitation can be visually detected during the addition of RNA. After a few days, the precipitation is no longer visible, and 3 days after RNA addition the sample presents 211 HN cross-

peaks. As we noticed from the one-dimensional spectra, the amount of signal of this sample accounts for 8% of the signal of the initial sample without RNA. The spectra of PrP23-231 and PrP23-231 plus RNA are similar in regard to the chemical shift of several cross-peaks, indicating that both samples present the same three-dimensional structure. There are, however, many evident chemical shift differences between the spectra of these samples, in particular within the range of 7.8-8.6 ppm of ¹H chemical shift. Furthermore, the area within 7.6 – 8.4 ppm of ¹H and 124-129 ppm of ¹⁵N chemical shift has many additional cross-peaks. This ¹H spectral range is populated by many amide cross-peaks of unfolded polypeptide backbone.

Taken together, these NMR data indicate that immediately after the addition of RNA, rPrP23-231 undergoes severe aggregation, which turns slowly into a soluble form of rPrP23-231. This is a new form of rPrP, which closely resembles the globular region of the free protein but with some modification in the unfolded N-terminal region of rPrP23-231. It is worth mentioning that the N terminus (residues 23 to \sim 120) accounts for most of the PrP flexibly disordered behavior, whereas the C terminus (residues 121-231) encompasses a globular fold (35).

Ultrastructural Analysis of rPrP-RNA Complexes-To characterize possible morphological differences between the aggre-

ASBMB

Prion-RNA Complex Aggregates and Their Toxicity to Cultured Cells



FIGURE 5. Electron microscopy of rPrP23–231 and rPrP Δ 51–90 in the presence of RNA. *A*, rPrP23–231 at 2 μ M (46 μ g/ml). *B*, N2aRNA at 23 μ g/ml. *C*, SAF93^{43–59} 2 μ M. *D*, rPrP23–231 at 2 μ M (46 μ g/ml) in the presence of N2aRNA at 23 μ g/ml. *E*, rPrP23–231 at 2 μ M in the presence of SAF93^{43–59} at 2 μ M. *F*, rPrPD51–90 at 2 μ M (38 μ g/ml). *G*, rPrP Δ 51–90 at 2 μ M (38 μ g/ml) in the presence of N2aRNA at 19 μ g/ml. *Scale bars*, 0.2 μ M.

gates obtained after incubation with the RNA extract, N2aRNA, and with the small oligonucleotide sequence, SAF93^{43–59}, we collected transmission electron microscopy images of the samples. Recombinant PrP23–231 was incubated with the aforementioned RNAs, and the transmission electron microscopy grids were prepared immediately. Fig. 5 displays both complexes, and we observed that rPrP forms amorphous aggregates upon incubation with RNA that are not present in soluble, RNA-free rPrP samples. Both aggregates appear very similar, but the one generated by the SAF sequence seems to adopt a more organized structure. These slight differences may account for the different structural changes elicited by the RNAs investigated.

PrP-RNA Complex Alters Cultured Cell Viability—A series of aggregates, oligomers, and fibers generated *in vitro* have been shown to be toxic to cultured cells, leading to death by apoptosis (32), but there is no report of toxic PrP^{Sc/res} generated *in*



FIGURE 6. **rPrP23-231-N2aRNA complex alters MTT reduction in cultured neuroblastoma cells.** Samples containing rPrP23-231, RNA molecules, or protein-RNA complexes were added to the culture medium 3 days before MTT addition. MTT reduction assay was performed as previously described (29). The following concentrations were used: rPrP23-231 at 0.115 mg/ml (5 μ M), N2aRNA at 0.057 mg/ml, rPrP-N2aRNA (0.115 mg/ml:0.057 mg/ml) complex, SAF93⁴³⁻⁵⁹ at 5 μ M, and rPrP23-231:SAF93⁴³⁻⁵⁹ (5 μ M:5 μ M) complex. For simplicity, the results are expressed as percentages of living cells relative to the value for control cells (cells in culture medium only). This expression is $100 \times (OD_{sample} \times OD_{blank})/(OD_{control} \times OD_{blank})$. The OD_{blank} was established from the average of the wells containing only Dulbecco's modified Eagle's medium with no cells. OD_{control} was established from the average of wells containing nontreated cells. *DMSO*, dimethyl sulfoxide.

vitro using total recombinant PrP purified from a heterologous system. After structural characterization of the rPrP23-231-RNA interaction, we investigated whether the aggregates formed upon N2aRNA or SAF9343-59 interaction with rPrP23-231 were toxic to cultured N2a cells using MTT reduction (30) and viability assays to measure cellular survival. As shown in Fig. 6, only the rPrP23-231-N2aRNA complex was able to alter the MTT reduction pattern in cultured neuroblastoma cells, leading to a \sim 60% decrease in MTT reduction compared with rPrP23-231 alone. The complex formed with the synthetic sequence SAF9343-59 did not affect the cultures (Fig. 6), and neither did the samples containing only RNA molecules, which suggests that the PrP changes induced by RNA cause formation of a toxic PrP species. MTT reduction results were corroborated by viability assays in the presence of SAF93^{43–59}, opRNA, and N2aRNA. The rPrP-N2aRNA complex was the most toxic to cells in culture (Fig. 7), and the rPrP complexes with SAF93⁴³⁻⁵⁹ (Fig. 7) or opRNA did not show significant toxic effects. The free opRNA sequence was already toxic to cells, but the addition of rPrP23-231 did not increase the observed cytotoxicity (not shown).

All of these results show that prion protein interacts with RNA molecules and that this interaction leads to protein aggregation. There is still no single sequence identified that would specifically bind to rPrP, but we have shown that the N-terminal prion protein domain is responsible for RNA recognition and binding. For DNA binding, both the globular and N-terminal domains are important (15).

DISCUSSION

Although the protein-only hypothesis is currently the most accepted explanation for the development of transmissible spongiform encephalopathies (1), the evidence for an additional cofactor in the PrP^{C} conversion is accumulating (7–10,

ASBMB

Supplemental Material can be found at: http://www.jbc.org/content/suppl/2008/05/07/M802102200.DC1.html

Prion-RNA Complex Aggregates and Their Toxicity to Cultured Cells



prion protein binds to nucleic acid sequences and acquires higher β -sheet content but remains soluble, assuming a scrapie-like form (8, 44). More recently, we have mapped the regions that are directly involved in DNA binding by PrP (15), which revealed that both the globular and N-terminal domains participate in the binding event. This result clarified the importance of the PrP globular domain for DNA recognition, but it also showed for the first time that the N-terminal domain is involved in stabilization of the complex. Since then, new information about the possible physiological relevance of prion-nucleic acid complexes in vivo has appeared (13, 17, 19, 45). The use of NA aptamers for the diagnosis of prion diseases is another interesting approach that takes advantage of the selective PrP-NA interaction. It has been reported that some aptamers can interact with specific isoforms of the prion protein, recognizing either the cellular or the scrapie form of PrP in vitro (20, 23, 46). It remains a challenge to develop such an assay for PrP^{Sc} identification in vivo.

Here we show that RNA sequences can also interact with the prion protein with high affinity but with different specificities and that they lead to different changes in the secondary and tertiary structure of recombinant PrP compared with DNA binding. The interaction of prion protein with ribonucleic acid has been investigated by other groups; it has been shown that PrP can acquire protease resistance upon RNA binding (17) and that scrapie and cellular PrP isoforms can bind with different affinities to some highly structured RNA sequences (19-21). This property has allowed specific RNA aptamers to be constructed to aid in the early diagnosis of prion diseases in humans and animals. Although much effort has been devoted to

FIGURE 7. Only rPrP23–231-N2aRNA complex is toxic to cultured neuroblastoma cells. A, cell viability measured by live/dead assay. The following concentrations were used: rPrP23–231 at 0.115 mg/ml (5 μ M), N2aRNA at 0.057 mg/ml, rPrP-N2aRNA (0.115 mg/ml:0.057 mg/ml) complex, SAF93^{43–59} at 5 μ M, and rPrP23–231:SAF93^{43–59} (5 μ M:5 μ M) complex. B, statistics of viability assay presented in A. For simplicity, the results are expressed as the percentages of living cells relative to the value for control cells (cells in culture medium only).

17, 42). The physiological role of prion protein interaction with nucleic acids has attracted special attention in the last five years, with particular emphasis on the potential for new therapeutic strategies (27, 43). We have shown that recombinant murine

identifying a key sequence or effect of RNA interaction with the prion protein, this subject remains controversial. First, there is no single, specific sequence that binds to PrP, nor is there a single nucleic acid-binding domain in this protein. Moreover,

ASBMB

The Journal of Biological Chemistry

Prion-RNA Complex Aggregates and Their Toxicity to Cultured Cells

the minimum number of bases required for efficient binding of PrP by RNA is unknown. Therefore, the aim of the present work was to investigate in more detail what happens to the prion protein structure during interaction with RNA and also to compare the observed changes with previous data on the PrP-DNA interaction (8, 15). We have seen that these interactions, although identical in some respects, display substantial differences.

We have shown that PrP interacts with RNA with high affinity (nanomolar range) and that this interaction leads to an insoluble aggregated protein. It is noteworthy that PrP is less prone to aggregation when it interacts with double-stranded DNAs (8, 15). Moreover, the prion protein (N-terminal) deletion mutants do not seem to interact with any of the RNA sequences investigated. RNA-induced aggregation of prion protein depends on the N-terminal region of this protein, indicating that at least part of the 51-90 PrP region is responsible for this process. It has been reported that truncation of the PrP N-terminal region affects formation of protease-resistant PrP (PrP-res) in vitro (47). Reduced formation of PrP-res with deletion of N-terminal residues relative to full-length hamster PrP (47) may be related to RNA binding ability in vivo because N-terminal deletion mutants do not bind RNA and are also not toxic to cultured cells. This differs from what was observed with the PrP-DNA interaction (15), suggesting that the role of these nucleic acids in prion biology must be different. In an early publication, Gabus et al. (26) found that the human prion protein has DNA strand transfer properties comparable with the retroviral nucleocapsid protein and that it forms large nucleoprotein complexes upon binding to DNA. The same group found that the huPrP(23–144) fragment could bind DNA and have strand transfer activity (26). Our previous NMR study demonstrated that most of the changes in chemical shift upon DNA binding were in the N terminus domain and in helix 1 (15).

Interestingly, the NMR HSQC measurements revealed that, although there is immediate aggregation of rPrP23–231 upon RNA addition, a few days after incubation with RNA, the rPrP recovers most of its original fold (Fig. 4). This result indicates that the changes induced by this synthetic RNA are partially reversible, but most importantly, the appearance of additional cross-peaks in the HSQC spectrum indicates that part of the protein N-terminal domain is modified after interaction with RNA (Fig. 4). The NMR data lead us to conclude that, although the overall fold of rPrP is recovered ~3 days after RNA addition, significant structural changes are now present and can reveal important features about the PrP interaction with ribonucleic acids.

We previously reported that α -helical rPrP is more hydrated and has a larger solvent-accessible surface area than aggregated β -rPrP as measured by pressure perturbation calorimetry (48), and it may be that nucleic acid binding to cellular rPrP leads to similar dehydration effects. These changes in structure of the prion protein when complexed to the nucleic acid would be typical of nucleic acid chaperones (10, 41, 42, 49).

To investigate whether the aggregates formed upon RNA binding are toxic to N2a cells in culture, we performed cell viability assays. Interestingly, the aggregates formed upon PrP incubation with total RNA extract from N2a cells were significantly cytotoxic, leading to an approximately 60% loss in cell viability (Fig. 6). In contrast, we did not observe significant toxicity when recombinant PrP aggregates were induced by small synthetic oligonucleotides (opRNA or SAF).

Our findings obtained when PrP protein binds either to DNA or RNA show that the heterogeneous mixture of RNA extracted from neuroblastoma cells was the only one to trigger toxicity and massive aggregation. The small RNAs were able to bind PrP, also leading to protein aggregation (Fig. 5, *B* and *D*), but the oligomeric species formed presented no toxicity (Figs. 6 and 7).

The component of the N2A RNA extract that leads to aggregation and further toxicity remains to be identified, but we suppose that a specific RNA sequence or structure present in this preparation may be responsible for this effect. The local secondary structures of the synthetic RNAs, based on the prediction program GeneBee, were predicted to be hairpins. Although the SAF sequence has more guanine (~39% versus \sim 22% for opRNA), they are otherwise similar in base content. The guanine base is expected to contribute to a greater number of hydrogen bonds with the binding protein (50), but both RNA sequences displayed a very similar pattern of interaction with the prion protein, and this base composition difference would also not explain the toxicity observed upon incubation with N2aRNA. Moreover, because the N2aRNA pool is very heterogeneous, it is still not possible to infer whether there it contains a specific RNA secondary structure responsible for rPrP binding and conversion to a toxic species. Altogether, our results reveal that there is selectivity in the species generated by interaction with different molecules of RNA. Because the catalytic effect of RNA on the $PrP^{C} \rightarrow PrP^{Sc}$ conversion may depend on the RNA sequence, small RNA molecules may exert a protective effect.

Acknowledgments—We thank Prof. Martha M. Sorenson for carefully reading the manuscript, Dr. Vilma R. Martins for constructing and providing the rPrPs expression vectors, Aline Brando Lima for the help with western blotting technique, and Emerson Gonçalves for excellent technical assistance.

REFERENCES

- 1. Prusiner, S. B. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95, 13363-13383
- 2. Aguzzi, A., and Polymenidou, M. (2004) Cell 116, 313-327
- Caughey, B. W., Dong, A., Bhat, K. S., Ernst, D., Hayes, S. F., and Caughey, W. S. (1991) *Biochemistry* 30, 7672–7680
- Pan, K. M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R. J., Cohen, F. E., and Prusiner, S. B. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 10962–10966
- 5. Weissmann, C. (2004) Nat. Rev. Microbiol. 2, 861-871
- Bueler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R. A., Autenried, P., Aguet, M., and Weissmann, C. (1993) *Cell* 73, 1339–1347
- Telling, G. C., Scott, M., Mastrianni, J., Gabizon, R., Torchia, M., Cohen, F. E., DeArmond, S. J., and Prusiner, S. B. (1995) *Cell* 83, 79–90
- Cordeiro, Y., Machado, F., Juliano, L., Juliano, M. A., Brentani, R. R., Foguel, D., and Silva, J. L. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 49400 – 49409
- 9. Caughey, B., and Kocisko, D. A. (2003) Nature 425, 673-674
- Silva, J. L., Lima, L. M. T. R., Foguel, D., and Cordeiro, Y. (2008) *Trends Biochem. Sci.* 33, 132–140
- 11. Baskakov, I. V., Legname, G., Prusiner, S. B., and Cohen, F. E. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 19687–19690
- 12. Cordeiro, Y., and Silva, J. L. (2005) Protein Pept. Lett. 12, 251-255

ASBMB

Supplemental Material can be found at: http://www.jbc.org/content/suppl/2008/05/07/M802102200.DC1.html

Prion-RNA Complex Aggregates and Their Toxicity to Cultured Cells

- Caughey, B., Brown, K., Raymond, G. J., Katzenstein, G. E., and Thresher, W. (1994) J. Virol. 68, 2135–2141
- Horonchik, L., Tzaban, S., Ben-Zaken, O., Yedidia, Y., Rouvinski, A., Papy-Garcia, D., Barritault, D., Vlodavsky, I., and Taraboulos, A. (2005) *J. Biol. Chem.* 280, 17062–17067
- Lima, L. M., Cordeiro, Y., Tinoco, L. W., Marques, A. F., Oliveira, C. L., Sampath, S., Kodali, R., Choi, G., Foguel, D., Torriani, I., Caughey, B., and Silva, J. L. (2006) *Biochemistry* 45, 9180–9187
- Nandi, P. K., Leclerc, E., Nicole, J. C., and Takahashi, M. (2002) J. Mol. Biol. 322, 153–161
- 17. Deleault, N. R., Lucassen, R. W., and Supattapone, S. (2003) *Nature* **425**, 717–720
- 18. Nandi, P. K., and Nicole, J. C. (2004) J. Mol. Biol. 344, 827-837
- Deleault, N. R., Georghegan, J. C., Nishina, K., Kascsak, R., Williamson, R. A., and Supattapone, S. (2005) J. Biol. Chem. 280, 26873–26879
- Deleault, N. R., Harris, B. T., Rees, J. R., and Supattapone, S. (2007) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104, 9741–9746
- Adler, V., Zeiler, B., Kryukov, V., Kascsak, R., Rubenstein, R., and Grossman, A. (2003) J. Mol. Biol. 332, 47–57
- Rhie, A., Kirby, L., Sayer, N., Wellesley, R., Disterer, P., Sylvester, I., Gill, A., Hope, J., James, W., and Tahiri-Alaoui, A. (2003) *J. Biol. Chem.* 278, 39697–39705
- Sayer, N. M., Cubin, M., Rhie, A., Bullock, M., Tahiri-Alaoui, A., and James, W. (2004) J. Biol. Chem. 279, 13102–13109
- Weiss, S., Proske, D., Neumann, M., Groschup, M. H., Kretzschmar, H. A., Famulok, M., and Winnacker, E. L. (1997) J. Virol. 71, 8790–8797
- Sekiya, S., Noda, K., Nishikawa, F., Yokoyama, T., Kumar, P. K., and Nishikawa, S. (2006) *J. Biochem. (Tokyo)* 139, 383–390
- Gabus, C., Auxilien, S., Péchoux, C., Dormont, D., Swietnicki, W., Morillas, M., Surewicz, W., Nandi, P., and Darlix, J. L. (2001) *J. Mol. Biol.* 307, 1011–1021
- King, D. J., Safar, J. G., Legname, G., and Prusiner, S. B. (2007) *J. Mol. Biol.* 369, 1001–1014
- Lambert, M. P., Barlow, A. K., Chromy, B. A., Edwards, C., Freed, R., Liosatos, M., Morgan, T. E., Rozovsky, I., Trommer, B., Viola, K. L., Wals, P., Zhang, C., Finch, C. E., Krafft, G. A., and Klein, W. L. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 6448–6453
- Gosavi, N., Lee, H. J., Lee, J. S., Patel, S., and Lee, S. J. (2002) J. Biol. Chem. 277, 48984–48992
- Reixach, N., Deechongkit, S., Jiang, X., Kelly, J. W., and Buxbaum, J. N. (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101, 2817–2822
- 31. Castilla, J., Saa, P., Hetz, C., and Soto, C. (2005) Cell 121, 195-206

- Novitskaya, V., Bocharova, O. V., Bronstein, I., and Baskakov, I. V. (2006) J. Biol. Chem. 281, 13828–13836
- 33. Zou, W. Q., and Gambetti, P. (2005) Cell 121, 155-157
- Cordeiro, Y., Kraineva, J., Gomes, M. P. B., Lopes, M. H., Martins, V. R., Lima, L. M. T. R., Foguel, D., Winter, R., and Silva, J. L. (2005) *Biophys. J.* 89, 2667–2676
- Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Glockshuber, R., and Wuthrich, K. (1997) *FEBS Lett.* **413**, 282–288
- Windl, O., Lorenz, H., Behrens, C., Romer, A., and Kretzschmar, H. A. (1999) J. Gen. Virol. 80, 15–21
- Lim, F., Downey, T. P., and Peabody, D. S. (2001) J. Biol. Chem. 276, 22507–22513
- Keller, R. (2005) Optimizing the Process of Nuclear Magnetic Resonance Spectrum Analysis and Computer-Aided Resonance Assignment Diss. ETH No. 15947, Swiss Federal Institute of Technology, Zurich
- Liu, Y., Peterson, D. A., Kimura, H., and Schubert, D. (1997) J. Neurochem. 69, 581–593
- 40. Loske, C., Neumann, A., Cunningham, A. M., Nichol, K., Schinzel, R., Riederer, P., and Munch, G. (1998) *J. Neural Transm.* **105**, 1005–1015
- Gabus, C., Derrington, E., Leblanc, P., Chnaiderman, J., Dormont, D., Swietnicki, W., Morillas, M., Surewicz, W. K., Marc, D., Nandi, P., and Darlix, J. L. (2001) J. Biol. Chem. 276, 19301–19309
- 42. Supattapone, S. (2004) J. Mol. Med. 82, 348-356
- Kocisko, D. A., Vaillant, A., Lee, K. S., Arnold, K. M., Bertholet, N., Race, R. E., Olsen, E. A., Juteau, J. M., and Caughey, B. (2006) *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 1034–1044
- Cordeiro, Y., Lima, L. M., Gomes, M. P., Foguel, D., and Silva, J. L. (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 5346–5352
- Zou, W. Q., Zheng, J., Gray, D. M., Gambetti, P., and Chen, S. G. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 1380–1385
- Takemura, K., Wang, P., Vorberg, I., Surewicz, W., Priola, S. A., Kanthasamy, A., Pottathil, R., Chen, S. G., and Sreevatsan, S. (2006) *Exp. Biol. Med.* 231, 204–214
- Lawson, V. A., Priola, S. A., Meade-White, K., Lawson, M., and Chesebro, B. (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 13689–13695
- Cordeiro, Y., Kraineva, J., Ravindra, R., Lima, L. M., Gomes, M. P., Foguel, D., Winter, R., and Silva, J. L. (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 32354–32359
- Cristofari, G., and Darlix, J. L. (2002) Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol. 72, 223–268
- Luscombe, N. M., Laskowski, R. A., and Thornton, J. M. (2001) Nucleic Acids Res. 29, 2860–2874

SBMB



9 ANEXOS 2

Jerson L. Silva¹, Mariana P. B. Gomes¹, Tuane C. R. G. Vieira¹ & Yraima Cordeiro²

¹Instituto de Bioquímica Medica, Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear Jiri Jonas, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Biologia Estrutural e Bioimagem, Universidade Federal do Rio de Janeiro, CCS, RJ 21941-590, Rio de Janeiro, Brazil, ²Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ 21941-590, Rio de Janeiro, Brazil.

TABLE OF CONTENTS

1. Abstract

- 2. Introduction
 - 2.1. Prion Diseases
 - 2.2. Cellular Prion Protein
 - 2.3. The prion scrapie (PrP^{Sc}) and the conversion reaction
- 3. Are cofactors needed for prion infectivity?
- 4. Interaction with sulfated polysaccharides
 - 4.1. The paradoxical effect of sulfated glycans.
 - 4.2. The function of the PrP^{C}/GAG interaction
 - 4.3. Heparin/Heparan sulfate binding sites
- 5. PrP interaction with nucleic acids
 - 5.1. Outline: a decade of interesting findings
 - 5.1.1. DNA
 - 5.1.2. RNA
 - 5.1.3. New insights on RNA structure and function
 - 5.2. DNA vs. RNA: Similarities and differences
 - 5.3. NA chaperone and PrP^{Sc} generation
- 6. Perspectives in therapy and diagnosis
- 7. Conclusions and Perspectives

8. Acknowledgments

9. References

1. ABSTRACT

Since the first description of prion diseases, great effort has been made toward comprehending this new paradigm in biology. Despite large advances in the field, many questions remain unanswered, especially concerning the conversion of PrP^{C} into PrP^{Sc} . How this conformational transition evolves is a crucial problem that must be solved in order to attain further progress in therapeutics and prevention. Recent developments have indicated the requirement for partners of the prion protein in triggering the conversion. In the present review, we will explore the interaction of PrP with some of its most intriguing partners, such as sulfated glycans and nucleic acids. These molecules seem to play a dual role in prion biology and could be fundamental to explaining how prion diseases arise, as well as in the development of effective therapeutic approaches.

2. INTRODUCTION

2.1 Prion Diseases

According to the World Health Organization (WHO) website, between 1986 and 2002, almost 200,000 cases of bovine spongiform encephalopathy (BSE) were registered in Great Britain (WHO official website: www.who.int). The "mad cow disease" epidemic caused serious damage to the European economy at the end of the 1980s and the beginning of the 1990s and led to the death of thousands of cattle across Europe. Since the first description of variant Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD) in humans in 1995, over 200 cases have been recorded in England, France, Ireland, Italy, and the USA.

Transmissible Spongiform Encephalopathies (TSEs) belong to a group of conformationally misfolding neurodegenerative disorders. They are rare, fatal, affect mammals (including humans), and are characterized, in general, by the loss of motor control, paralysis, and dementia (1). In addition to the hereditary and sporadic forms of prion disease, the group also possesses an infectious nature as well. All TSEs are progressive, fatal and incurable (1). The TSEs that affect humans are: Creutzfeldt-Jakob disease (CJD), the Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome (GSS), Fatal Familial Insomnia (FFI) and the previously eradicated kuru.

The first description of a TSE dates back to the mid-eighteenth century, when the first cases of scrapie (the prion disease that affects sheep) compromised the expansion of the textile industry during the Industrial Revolution (2). At the beginning of the twentieth century, the first cases of Creutzfeldt-Jakob disease were reported in humans (3, 4). In the mid-twentieth century, kuru was identified as a TSE in Papua New Guinea, and resulted from contamination by the practice of ritualistic cannibalism, killing a large number of the local aborigine population (5). Subsequently, Alper and collaborators demonstrated that the infectious agent related to TSEs was highly resistant to treatments that affect nucleic acids, such as ionizing radiation and ultraviolet light (6), suggesting that a protein alone could infect and replicate in the absence of nucleic acids (7). In the 1980s, the neuroscientist Stanley Prusiner characterized the infectious agent and the concept of the prion: **prot**einaceous **in**fectious particle (8, 9).

All TSEs, including scrapie in sheep and BSE in cow, have been described as single infectious agents that are isoforms of a constitutive protein known as the prion protein (PrP) (2). There are two main players involved in prion disease. The first is the cellular prion protein (PrP^{C}), an isoform that occurs naturally in cells of the host body (10). The second is a conformational variant of the first, which is involved in transmission of the disease, such as the prion scrapie ($PrP^{S_{c}}$) (11).

2.2. Cellular prion protein (PrP^C)

 PrP^{C} (or PrP-sen, for protease-sensitive) is a constitutive and highly conserved protein among mammals (1). It is normally found in the membrane of mammalian cells in many tissues, such as kidney and skeletal muscle (2). PrP^{c} is found in particular abundance in the central nervous system (12), and also in lymphocytes and lymphoid organs (13). This protein is encoded by a the *PRNP* gene contained in chromosome 20 in humans, and present only in one copy (12). Mature PrP contains 209 amino acid residues, two preserved glycosylation sites, and is anchored to the outer cell membrane through a glycosyl phosphatidyl inositol (GPI) anchor (1, 14).

The mouse prion protein is synthesized in the endoplasmic reticulum as a protein with 254 amino acid residues. The first 22 amino acids in the amino-terminal region localize the protein to the membrane. Post-translational processing attaches the C-terminal region of the PrP GPI anchor, fixing it to the outer portion of the cell membrane (1). There are two *N*-glycosylation sites present in asparagine residues 181 and 197 (in human PrP), to which are added a variety of sugar species (15, 16). PrP possesses a sequence of eight amino acid residues (PHGGGWGQ) in its amino-terminal region between residues 50 and 90 that are flanked by basic and hydrophobic segments (residues 23-50 and 99-120, respectively) (17, 18). This octapeptide region is highly conserved and contains four repetitions of these eight amino acids that function to bind copper (18, 19).

The tertiary structures of recombinant prion proteins $(rPrP^C)$ from different species were determined by nuclear magnetic resonance (17, 20-22). The human PrP structure reveals the presence of a globular domain (residues 125 to 228) and a highly disordered amino-terminal domain (23). The globular domain contains three alpha-helices (residues 144-154; 173-194 and 200-228) and a small beta-sheet formed by two beta-strands comprising residues 128 to 131 and 161 to 164 (23) (Figure 1).

The *Prnp* gene was identified in the 1980s. It is located on chromosome 2 in mice and 20 in humans (see (24) for review). The knockout mouse for this gene was generated in 1992 (25). Today, almost three decades after the identification of the *Prnp* gene and 16 years after construction of the first prion protein knockout animal, little is known about its physiological function. Over the years, many functions have been assigned to PrP^{C} , including immune regulation, signal transduction, copper metabolism, nucleic acid processing, synaptic transmission, protection, and induction of apoptosis (26-28).

Despite all efforts to elucidate the physiological role of PrP^C, a specific function has not been firmly established. Many biological partners for PrP have been identified that could be involved in its function. Based on the currently available data, it is suggested that the presence of the GPI anchor indicates the requirement for PrP to bind a transmembrane protein to transfer an extracellular signal to the intracellular space, indicating PrP may function as an accessory protein (27).

The most studied ligand of the prion protein is copper (19), which interacts with PrP through its amino-terminal domain, suggesting a function in copper metabolism (28). Some studies have suggested that PrP^{C} is able to bind extracellular matrix macromolecules, such as laminin (29, 30) and the laminin receptor (31). PrP has also been shown to interact with and

modulate the activation of plasminogen (32). Other ligands for cellular PrP have been reported: the chaperones Hsp60 and GroEL; STI1 (stress-inducible protein I); nNOS (Neural nitric oxide synthase); alpha-tubulin (33-36); and nucleic acids (37, 38).

2.3. The prion scrapie (PrP^{Sc}) and the conversion reaction

 PrP^{Sc} is the isoform of PrP^{C} associated with prior diseases, and is enriched in beta-sheet structures, as measured by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). PrP^{Sc} presents itself as an insoluble protein that has a tendency to aggregate, and is partially resistant to digestion by proteases. For this reason it is also called PrP-res (39). The protease resistant core forms amyloid fibrils and amorphous aggregates comprising residues 90 to 231 (40). Because of the tendency to form aggregates, determination of the three-dimensional structure of PrP^{Sc} by high-resolution techniques, such as X-ray crystallography and nuclear magnetic resonance, has proven to be a challenge. However, molecular modeling studies suggest that the formation of PrP^{Sc} involves the re-folding of residues 90 to 140 into beta-sheets (41). The single disulfide bond, which links the helices on the C-terminal region, would remain intact since this bridge is necessary for the formation of PrP^{Sc} (42). A recent model included the flexible region of the prion protein (residues 89 to 175), suggesting that this domain could also fold into beta-sheets (43).

The "protein-only hypothesis" was first outlined by Griffith (7) and developed by Stanley Prusiner (1). According to this theory, the prion protein is the main agent responsible for the outbreak of TSEs. The discovery that PrP knockout mice are resistant to infection by prions (25, 44) is one of the most solid foundations that support this theory. Changes in protein secondary structure from an alpha-helical-rich conformation to a higher beta-sheet content account for the physical-chemical differences between PrP^{C} and PrP^{Sc} . The mechanisms that lead to conversion of PrP^{C} into PrP^{Sc} are not yet fully understood, but there are several proposed models. In a previous cell-free assay, incubation of PrP^{C} with large quantities of PrP^{Sc} conferred resistance to protease digestion (45, 46), suggesting that PrP^{Sc} catalyzes the conversion of PrP^{C} into newly formed, protease resistant PrP^{Sc} . Accordingly, the scrapie form induces misfolding of PrP^{C} into more PrP^{Sc} , and is therefore responsible for its own propagation (47). PrP^{Sc} could act as a molecular template by helping PrP^{C} refold incorrectly to generate more PrP^{Sc} . No post-translational modifications have been identified that distinguish the two isoforms. The mechanism by which the conversion takes place is another open question. Several groups have suggested that an additional, unknown factor may initiate or modulate the conversion of PrP^{C} in order to trigger conversion (1, 15) (Figure 2).

Several biophysical approaches have been applied to characterize the thermodynamic properties of the alpha-helical PrP^{C} and beta-sheet species (53-55) The free-energy diagram depicted in Figure 2 highlights a model in which the cellular isoform is in a metastable conformation. High-pressure FTIR and pressure perturbation calorimetry studies have demonstrated that the cellular PrP isoform is more hydrated and has a larger solvent-accessible surface area than aggregated a-rPrP obtained by thermal treatment (55-57). The role of hydration in the folding stability and amyloidogenicity of PrP has been corroborated by molecular dynamics (58, 59). As represented in Figure 1, binding of a cofactor or a catalytic effector (such as nucleic acid) would lead to a decrease in solvent-accessible surface area and a decrease in the level of hydration. The finding that PrP^{C} is highly hydrated is consistent with the observation that the protein has a long, disordered segment (the N-domain), and the globular C-domain is highly flexible and not well-packed. Upon binding to biological targets, disordered segments can fold and become less hydrated. This could occur with PrP^{C} when it binds a partner such as a glycosaminoglycan or nucleic acid. Alternatively, this could also happen by protein-protein interactions with assembling oligomers or amyloid fibrils. Below, we focus our review on the nucleic acid- and glycosaminoglycan- binding properties of the prion protein and try to clarify the importance of these ubiquitous macromolecules in prion biology, as well as in the occurrence of transmissible spongiform encephalopathies.

3. ARE COFACTORS NEEDED FOR PRION INFECTIVITY?

Since the proposal of the protein-only hypothesis, scientists have had little success generating infectious prion particles from recombinant prion protein (60, 61). Even the generation of detergent insoluble aggregates and protease resistant prion particles, which possess classical characteristics of PrP^{Sc} , failed to produce infectivity in animals (62). The lack of infectivity indicated that something was missing in the generation of infectious prion particles *in vitro*.

Through the protein-misfolding cyclic amplification (PMCA) technique first described by Saborio and collaborators in 2001, it was shown that a mixture of crude homogenates from normal and scrapie brain resulted in a 6-fold amplification of PrP-res (63, 64). However, it was necessary to use a 50-fold excess of PrP-res template to drive conversion in a cell-free system containing only purified proteins (45). These results indicate that other factors are required for efficient conversion and that brain homogenates must contain such adjuvants.

Legname and coworkers (65) published a paper that claimed to contain the definitive proof for the protein-only hypothesis. This group managed to induce the disease in transgenic animals by inoculating them with a recombinant prion protein (residues 89 to 230) in its fibrillar beta-sheet-rich form. The disease was induced in transgenic animals overexpressing the prion fragment (PrP 89-230). However, animals bearing many copies of the prion protein developed the disease later on and, in some cases, presented a sub-clinical form of scrapie. Therefore, it seems that the injected material only accelerated the process in transgenic animals expressing excess PrP.

Studies with transgenic animals also suggest that conversion of PrP^{C} into PrP^{Sc} could be assisted by another biological macromolecule (49). This observation could explain the species barrier in prion diseases (49). The adjuvant could be a binding cofactor or even a specific posttranslational modifier (49, 66).

It is currently well-accepted that an unknown factor is involved in prion pathology (38, 48, 49, 67). This molecule would function by lowering the free energy barrier between PrP^{C} and PrP^{Sc} and triggering conversion (53, 68). A great number of biological macromolecules have emerged as candidates for conversion catalysts: cellular adhesion molecules, extracellular matrix molecules, glycosaminoglycans, and nucleic acids. All of these molecules have been reported to interact with PrP and trigger structural conversion from an alpha-helical-rich structure to a beta-sheet-rich form (38, 48, 50, 69, 70). Throughout this review, we will focus mainly on two prion protein ligands: the glycosaminoglycans and nucleic acids.

4. INTERACTION WITH SULFATED POLYSACCHARIDES

Proteoglycans (PG) are glycoproteins consisting of a core protein covalently linked to one or more glycosaminoglycan chains. Glycosaminoglycans (GAGs) are linear polysaccharides comprised of a disaccharide repeat unit of a hexuronic acid linked to a hexosamine that is mainly modified by *N*-deacetylase and *N*-sulfotransferases. Sulfated polysaccharides have long been shown to interact with several proteins. They play important roles in the regulation of many physiological processes, including cell-cell and cell-matrix interactions, cell growth and proliferation, and viral infection (for review see (71)). GAGs have been implicated in many conformational diseases and have been detected in different types of amyloid deposits since the 19th century (72-76). In addition, the importance of these molecules is not only restricted to spatial deposition, but also to temporal appearance (77) and the induction of conformational changes (78) in amyloidogenesis.

Numerous evidence reveals the direct binding of GAGs to PrP^{C} in soluble form and at the cell surface (50, 79-81). The decrease in cellular heparan sulfate content leads to a strong reduction in PrP^{Sc} formation and incorporation in cells to regulate the metabolism of prions (82, 83). These observations indicate that the interaction of HS proteoglycans and PrP^{C}/PrP^{Sc} is essential for the pathogenesis of prion diseases.

4.1. The paradoxical effect of sulfated glycans.

GAGs, mostly heparan sulfate (HS), have been the subject of many prion disease studies. Snow and collaborators were the first to show the presence of heparan sulfate in amyloid plaques in prion diseases like Creutzfeldt-Jakob disease, Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome, and scrapie (76, 84). Since then, efforts have focused on the function of these carbohydrates in transmissible spongiform encephalopathy pathogenesis.

After the identification of GAGs as considerable amyloid aggregate components, some studies showed that sulfated polysaccharides can inhibit the accumulation of PrP^{Res} in cells infected with scrapie, and can bind PrP^{C} (50, 85). One explanation for this finding is that exogenous sulfated compounds inhibit PrP^{Sc} production by decreasing the amount of plasma membrane PrP^{C} . Since no alteration in the synthesis or degradation of PrP^{C} was observed, the observed effect may be due to an increase in the rate of endocytosis induced by these compounds (86). Another work demonstrated that sulfated GAGs could inhibit the polymerization of synthetic prion peptides into amyloid fibrils (87). It is postulated that the interaction of $PrP(PrP^{C} \text{ and/or } PrP^{Sc})$ with endogenous GAGs could be necessary for PrP^{Sc} propagation, and that exogenous GAGs act as inhibitors that block the interaction of PrP with endogenous PG (78). According to this hypothesis, endogenous GAGs at the cell membrane possess characteristics that are necessary to facilitate PrP^{Sc} formation/propagation and differ from exogenous molecules that do not cause this effect.

Wong and collaborators (78) used a cell-free conversion assay to show that sulfated glycans induce conformational changes in PrP-sen and stimulate the conversion of PrP-sen to a PrP-res isoform, which probably acts as a cofactor in the pathogenic process. Exogenous GAGs have been shown to reconstitute the formation of PrP^{Sc} in cells possessing strongly reduced membrane-associated GAGs (82). Furthermore, heparan sulfate proteoglycans (HSPG) stimulated PrP-res amplification *in vitro* (88), and heparin enhanced the aggregation of a prion protein fragment (PrP¹⁸⁵⁻²⁰⁸) and induced the formation of amyloid aggregates that are toxic to neuronal cells (89, 90). The ability to stimulate PrP conversion reveals the paradoxical effect of these sulfated glycans.

4.2. Function of the PrP^C:GAG interaction

 PrP^{C} is mainly located on the cell surface where it interacts with cell surface proteoglycans and the extracellular matrix. Heparan sulfate proteoglycans (HSPG) on the cell membrane are mainly syndecans (Sdc) or glypicans (Gpc). The ability to bind GAGs may be involved not only in the pathogenesis of prions, but also in the normal function of PrP and HS.

Although PrP^c is a GPI-anchored membrane protein with no cytoplasmic domain, it appears to be involved in neurite outgrowth and neuronal survival through signal transduction pathways, including the nonreceptor Src-related family member p59 (Fyn), PI3 kinase/Akt, cAMP-dependent protein kinase A, and MAP kinase.(91). *N*-syndecans are transmembrane cell surface proteoglycans that interact with Src family kinases and mediate neurite outgrowth (92). Therefore, the effect of PrP on promoting neurite outgrowth and neuronal survival may be modulated by its interaction with HSPG.

GAGs also mediate the interaction of prion protein with other molecules, such as the 37-kDa/67-kDa laminin receptor (LRP/LR) (93, 94). Like heparan sulfate, LRP/LR is another prion ligand that is believed to be a cell membrane receptor for PrP^{C} and PrP^{Sc} (31, 95). Not only does heparin function as a cofactor to mediate plasminogen activity through PrP^{C} stimulation of tissue-type plasminogen activator (t-PA), but it may also influence cellular proteolysis (96).

Glypicans, which include PrP^C, are GPI-anchored proteins present in lipid rafts (for review see (97)). Gpc-1 recycling involves internalization via the caveolae pathway and degradation in lysosomes. This process leads to removal and either

enzymatic degradation of the HS sulfate chains by heparanase or non-enzymatic degradation by (Cu(II)-/Zn(II)-dependent, nitric oxide (NO)-catalyzed deaminative cleavage. These processes generate products, such as anhydromannose oligosaccharides, that interact with oxidized proteins and the proteasome to participate in the clearance of misfolded proteins (98). Recycling Gpc-1 is also crucial for the uptake of polyamines, which are important molecules for cell growth and survival (99). Gpc-1 possesses conserved cysteine residues in the central domain that are *S*-nitrosylated in a Cu(II)-Cu(I)-dependent redox cycle during endocytosis (100). PrP^C is known to bind copper at the octapeptide repeat region of its N-terminal domain, and has been related to copper metabolism and oxidative stress (for review, see (101)). Cu(II)-loaded PrP^C transfers copper and supports NO-catalyzed Gpc-1 autodegradation *in vitro*. Ectopic expression of PrP^c in prion-null fibroblasts (*PRNP*^{0/0}) restores this process (102). Gpc-1 and PrP^C are co-internalized by Cu(II) ions. Gpc-1 expression does not influence PrP^C endocytosis, but PrP^C controls GPC-1 internalization and auto-processing (103). Sulfated polysaccharides and Cu(II) ions also stimulate PrP^C endocytosis (86, 104).

4.3. Heparin/Heparan sulfate binding sites

The presence of sulfur and carboxyl groups makes GAGs negatively charged molecules. Interactions with other proteins are mainly ionic and depend on the presence of basic amino acids throughout the protein sequence. Although the interaction might look random, GAGs have specific requirements for defined sequences. Cardin and Weintraub (105) were the first to show the presence of defined motifs in heparin-binding domains of four proteins (105). They characterized two consensus sequences, XBBXBX and XBBBXXBX, where B is a basic residue and X is any other amino acid (105). Sobel and collaborators also proposed a third consensus sequence, XBBBXXBBBXXBBX (106). These motifs are not always found as binding regions; therefore, other spatial patterns for heparin binding must exist (107, 108).

Lysine and arginine are basic amino acids that show greatest affinity for sulfated glycans, with arginine exhibiting 2.5 times greater affinity (109). Histidine residues are also important for heparin interactions, with some proteins demonstrating a strong pH and cation binding dependence (110-113).

The prion protein's conserved octapeptide repeat region at the N-terminus has a consensus sequence of PHGGGWGQ that binds Cu(II) (114). The presence of extra octapeptide repeats is associated with prion disease (115, 116). Although this region is not a heparin-binding motif, evidence indicates that it can bind heparin. The interaction could be mediated by divalent ions bound to protonated His side chains (117, 118). Additionally, the interaction between LRP/LR and PrP is thought to be dependent on an HSPG bridge that interacts with the octarepeat region (93). A synthetic peptide of amino acids 53-93 was shown to interact with heparin/HS, as demonstrated by biosensor analysis (80).

Aside from the octapeptide region, Warner and collaborators (80) also identified two additional synthetic peptides (a.a. 23-52 and 110-128) that independently bind heparin/HS. The first region contains a Cardin-Weintraub motif with four basic residues, KKRPK. Pan and collaborators demonstrated that a synthetic peptide (a.a. 23-35) contained the only region capable of binding GAG (79). They later reported that deletion of the first 12 amino acids was sufficient to abrogate binding to GAG, and the presence of extra peptide repeats resulted in a more flexible N-terminus that bound GAG with greater affinity. A more flexible N-terminus has been suggested to expose the heparin-binding region and increase its interaction with GAGs (119-121).

Another Cardin-Weintraub motif in the N terminal sequence of the prion protein (a.a. 112-121) was included in the third sequence identified by Warner et al (80). The amino acid 185-208 fragment of the prion protein has been shown to interact with heparin/HS to induce the formation of amyloid aggregates (89, 90).

The amino acid sequence and saccharide domains of the polysaccharide chain are important for the protein:GAG interaction. The uronic acid residues of Heparin/HS can be 2-*O*-sulfated or unsubstituted. Glucosamine can be 6-*O*-sulfated, *N*-acetylated, unsubstituted, or *N*-sulfated. An *N*-unsubstituted GlcN and a 3-*O*-sulfate group (an unusual modification encountered in GlcN) are involved in the binding of HS to herpes simplex gD (122). The *N*-sulfated GlcN, IdoA, 6-*O*-sulfate, and 3-*O*-sulfate groups are required for antithrombin binding (123). Both the size and the degree of sulfate content in heparan mimetics are important for their ability to inhibit PrP endocytosis (124). Not only is sulfate density important for the interaction, but it also affects the properties of the glycan backbone. Chondroitin sulfate and kappa-carrageenan possess similar sulfate densities, but they do not have the same effect (85). Using competition assays, Warner and collaborators showed that removal of the 2-*O*-sulfate group reduced the capacity to compete for interaction with PrP^C-heparin. Removal of the 6-*O*-sulfate group had only a minor effect. Hence, the 2-*O*-sulfates of heparin play an important role in substrate recognition (80).

5. PRP INTERACTION WITH NUCLEIC ACIDS

Nucleic acid molecules, both deoxyribonucleic acid (DNA) and ribonucleic acid (RNA), form a peculiar group of PrP ligands. Due to the "protein-only" hypothesis, these molecules were excluded from prion biology for decades (1, 9), but they are now being considered for several new roles: instead of carrying genetic information, DNA and RNA molecules can participate in prion diseases as adjuvants in the conversion of PrP^{C} into PrP^{Sc} , and they may generate toxic species (38, 48, 50, 69, 125, 126). On the other hand, they have been shown to prevent PrP aggregation and accumulation in cultured cells (127, 128). The participation of nucleic acids as prion protein cofactors was first considered by Weissmann in 1991 when he raised the idea that another molecule, such as a nucleic acid, could play a crucial role in the propagation of prion proteins (10). Nucleic acid binding of recombinant PrP to DNA was described by Nandi & Leclerc (129). In 2001, we provided the first experimental evidence for the catalytic participation of a nucleic acid molecule in prion protein conversion (48).

Some research groups have also proposed the use of modified NA molecules as prototypes for prion diagnosis (130, 131). Another interesting feature of the interplay between prions and NAs is that the former might participate in nucleic acid processing as an NA chaperone (38, 132-134). DNA and RNA molecules present similarities and differences in their effects on prion structure, conversion, aggregation, and propagation (69). In this section, we focus on PrP interactions with DNA and RNA separately. We will also examine new possibilities and questions raised by the experimental observations of these molecules in prion biology.

5.1. Outline: a decade of interesting findings

5.1.1. DNA

The interaction between PrP and DNA molecules has captured the attention of scientists for over a decade, and was first described by P. K. Nandi in 1997. Through fluorescence measurements, he observed that the human PrP-derived peptide PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ could bind a small DNA sequence derived from the papilloma virus with micromolar affinity. This finding was similar to that observed for the retroviral protein p10 (129).

Two years later, Nandi observed the polymerization of a full-length recombinant murine prion protein (rPrP) in nucleic acid solution (135). In 2001, our group showed that the same prion protein can bind DNA sequences with high affinity *in vitro*. This interaction can prevent the aggregation of a highly hydrophobic prion peptide derived from the Syrian hamster PrP sequence (ShaPrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹) In a concentration-dependent manner. It can also induce a change in the rPrP conformation, converting it from an alpha-helical-rich structure to an alternative, beta-sheet-rich conformation (48). We proposed that the PrP-nucleic acid complex could act as a catalyst. When the full-length prion protein was added to the rPrP-DNA complex, aggregation did not occur (Figure 3); however, when a large amount of prion β -sheet-rich aggregate was added to a solution containing the DNA complex, aggregation increased drastically (Figure 3). These results led us to propose that the rPrP-DNA complex catalyzes aggregate formation (Cordeiro et al., 2001). However, in addition to the PrP-DNA complex, a considerable amount of protein in the scrapie conformation was required. Without excess PRP^{sc}, spontaneous aggregation of the α -helical PRP^c form would occur if PrP bound nucleic acids.

Following this observation, the interaction of rPrP with synthetic double-stranded DNAs was confirmed to lead to partial unfolding of the protein into an amyloid-like structure. This was characterized by binding to amyloid-specific dyes of Congo red and thioflavin T (136). These amyloid-like structures were also found to be spherical and resistant to proteinase-K (PK) digestion, similar to those in infected brains (137).

Subsequently, we showed that double-stranded DNA sequences also interact with the rrPrP construct, which lacked most of the unfolded N-terminal domain (PrPD32-121). This construct contains a deletion of amino acids 32 to 121 (138). The structural data obtained from Small Angle X-ray Scattering (SAXS) and Nuclear Magnetic Resonance (NMR) measurements showed that rPrP interacts with DNA through the globular domain (Figure 4). NMR measurements further identified chemical shift changes in amino acids both in the C and N domains of the protein, suggesting a restructuring of the protein upon DNA binding (138).

Mangé *et al.* reported translocation and accumulation of misfolded scrapie-like prions in the nuclei of infected cells, and that this transport was independent of the proteasome machinery. They also reported that the misfolded PrP has the capacity to interact with chromatin (139). Recently, the interaction of exogenous DNA and recombinant PrP was shown to result in DNA internalization and expression in mammalian cells in the presence of Ca^{2+} (140). Membrane-attached PrP^C binds DNA during DNA internalization, but not during DNA expression (140). Further investigation of DNA interactions with PrP led to the identification of anti-DNA antibodies that were specific to the PrP^{Sc} of diseased human brain tissues. This raised the possibility of using antibodies as markers of prion disease (131). These data indicate nucleic acids might be physiological ligands of PrP (38).

The use of modified, more stable oligonucleotides represents another strategy used to identify PrP isoform-specific ligands for use as aptamers in diagnostic and therapeutic procedures. Kocisko and coworkers designed degenerate phosphorothioate oligonucleotides that reduce PrP^{Sc} formation *in vivo* (141). Recently, King and collaborators described DNA thioaptamers that bind with high affinity to different mammalian prion proteins and short phosphorothioate DNA molecules to decrease the PrP^{C} and PrP^{Sc} content of infected neuroblastoma cells (128, 142).

5.1.2. RNA

In 1997, Weiss and colleagues isolated RNA aptamers that specifically recognize recombinant prion protein (143). An interaction was observed for the full-length Syrian golden hamster protein, but not a construct lacking residues 23 to 90, suggesting that the amino-terminal region is required (143). Adler and colleagues (144) isolated highly structured RNA molecules that bind recombinant human PrP with high affinity in the presence of bovine serum *in vitro*. They also observed that this interaction formed oligomers that remained complexed with the RNA, protecting it from ribonuclease A degradation (144). A few years later, Vasan and coworkers observed that bovine PrP, in the absence of bovine serum, interacted with their RNA aptamers to produce soluble oligomers. These oligomers were sensitive to PK digestion, but were potentially toxic, according to *in vitro* testing (125).

Gabus and colleagues demonstrated that PrP possesses the characteristics of RNA-binding chaperones and, similar to the nucleocapsid protein of HIV-1, forms structures similar to nucleocapsid retroviral proteins. Based on their finding, the group suggested that PrP could participate in the metabolism of nucleic acids (133).

In 2003, several groups investigated the interaction of PrP with RNA *in vivo* and *in vitro* to demonstrate that the presence of RNA molecules could stimulate the conversion of PrP^{C} to PrP-res in hamster brain homogenates. They also showed that treatment of these homogenates with RNase could inhibit the conversion (52). In the same year, Rhie and colleagues characterized RNA aptamers that preferentially bind to the infectious form of PrP and inhibit the conversion of the cellular isoform. The aptamer is thought to bind the scrapie form to prevent an interaction between PrP^{C} and PrP^{Sc} (130). Following this study, other groups presented a series of PrP-binding RNA aptamers (145, 146).

The *in vivo* evidence that RNA molecules induce PrP conversion to a PrP^{Sc}-like form was provided by Deleault and coworkers (88, 126). Through a modified PMCA *in vitro* reaction, they demonstrated that synthetic RNAs could generate PrP^{Res} formation (88). This is consistent with our *in vitro* DNA-binding results suggesting that nucleic acid molecules could be involved in prion conversion. In their study, inoculation of commercially available synthetic RNAs, along with purified PrP and co-purified lipids caused neurodegeneration in healthy wild type hamsters (126). Geoghegan and colleagues co-localized hamster PrP extracellular aggregates with RNA molecules, suggesting that RNA molecules incorporate into forming prion aggregates (147).

Recently, our group characterized the biophysical and structural features of the interaction between recombinant mouse PrP and RNA molecules. We investigated PrP:RNA complex formation through structural changes in PrP during RNA binding. The reagents used include: recombinant full-length rPrP, two constructs lacking different portions of the amino-terminal domain (rPrPD23-121 and rPrPD51-90), total RNA extracts from prokaryotic and eukaryotic cells, and two small RNA sequences synthesized *in vitro*. Our results revealed that the full-length rPrP aggregates upon RNA binding, and immediately loses most of its alpha-helical content. This phenomenon was observed for all RNA samples tested. RNA extracted from neuroblastoma cells (N2aRNA) elicited the most drastic effects. Complex formation with N2aRNA protected both the protein and RNA from degradation with proteinase K and ribonuclease A, respectively (69). NMR measurements with the synthetic sequence, SAF93⁴³⁻⁵⁹, presented a surprising result: after 3 days of incubation, the soluble portion of PrP recovered most of its original fold, but with distinct changes in NMR. The N-terminal deletion constructs revealed that RNA interacts with rPrP at the N-terminal, octapeptide region of the protein between residues 50 and 90. In this study, we also performed viability assays to verify the toxicity of PrP:RNA aggregates. Incubation of cultured neuroblastoma cells with the aggregates revealed that the toxicity of PrP:RNA aggregates was restricted to total RNA extract from N2a cells. Synthetic sequences were not able to induce toxicity, suggesting that an unidentified component present in the total RNA extract of N2a cells is responsible for PrP aggregation and PrP:N2aRNA complex toxicity (69).

5.1.3. New insights on RNA structure and function

For many decades, RNA molecules were classically described as accessories of the cellular machinery involved in DNA translation and transcription (148). The human genome project showed, however, that only a small portion of our DNA is actually transcribed into protein and the majority does not encode functional sequences. In the past decade, evidence that this portion of our genome is actually largely transcribed has emerged (148, 149). These versatile transcripts are being revisited, and new functions for them are being proposed. Non-coding RNAs (ncRNA), for example, exercise a variety of important functions in eukaryotic cells, such as post-translational regulation, cell morphogenesis, and participation in embryo and neural development (for review see (148)). RNA is a flexible molecule, and its structural properties allow it to exercise different roles through a broad range of mechanisms, including cell to cell communication (150).

As discussed in this review, the interaction of PrP with RNA molecules has been widely reported, and the secondary structure of RNA has been suggested to be important for this interaction (69, 130, 144-146). The particular RNA structure necessary for prion binding remains elusive, but the flexibility of such molecules certainly account for these interactions.

5.2. DNA vs. RNA: Similarities and differences

All experimental evidence for PrP:NA interactions suggests the partnership of these molecules *in vivo*. Both DNA and RNA produce misfolded isoforms of PrP. Interestingly, the misfolded PrP isoforms generated by DNA and RNA are not identical. DNA usually produces aggregates with amyloid properties, such as high beta-sheet content and fiber formation (135, 136). Under some conditions, soluble species are produced (48, 138). Depending on the RNA origin, PrP:RNA complexes can form large aggregates or small oligomers (69, 125), but they adopt an amorphous morphology (69). DNA and RNA also bind PrP at different sites: DNA interacts mostly with the C-terminal region, but causes significant changes in the N-terminal domain (138). Experiments performed with RNA suggest that the RNA binding site is located in the PrP unfolded N-terminal domain; PrP constructs lacking residues 50-90 do not interact with RNA (69, 143). The toxicity of PrP:NA complexes was observed only for PrP:RNA aggregates (69, 126).

These findings suggest that a nucleic acid molecule could be involved in prion conversion. Emerging evidence for the extracellular functions of RNA molecules (150) also contribute to the idea that a nucleic acid molecule might be implicated in the generation of PrP^{Sc} .

Some groups reported that both DNA and RNA molecules can prevent prion misfolding and propagation in infected cells (48, 128, 131, 141, 142), and that these molecules could preferentially recognize PrP^{C} or PrP^{Sc} (125, 130). The experimental evidence raises the possibility for further development of new molecules for TSE diagnosis and therapy.

Binding of NA molecules to PrP can alter the structure of the protein, as well as the structure of the nucleic acid. NA binding can induce modifications in the amino-terminal region of PrP (48, 69, 138). The interaction with PrP bends DNA molecules and facilitates strand transfer (151). This property of PrP is consistent with the activity of proteins involved in protein synthesis (151). These observations, along with the finding that PrP exhibits characteristics of NA-binding proteins (132, 133), suggest a possible role as an NA chaperone (151, 152). To confirm this assumption, however, more experimental clues are needed.

5.3. NA chaperone and PrP^{Sc} generation

After decades of intense study, spongiform encephalopathies are clinically well-described, but they remain incurable. The spontaneous generation of PrP^{Sc} in sporadic prion diseases, along with the capacity of transmission is still an obscure subject. Despite the significant efforts of the scientific community, the physiological role of PrP^{C} remains unknown (153). PrP interaction with nucleic acid molecules presents an interesting avenue for understanding prion physiology and the occurrence of TSEs.

Recent studies suggest that the function of PP^{C} is related to NA metabolism. PrP has been reported to share similarities with viral NA-binding proteins, such as the Ncp7 of HIV1 (133). Using a methodology to predict DNA interaction sites in proteins, Tjong and coworkers identified 23 residues as possible DNA-binding sites in the murine PrP globular domain (154). Identification of this binding region is consistent with the findings of our group using chemical shift variation analysis of DNA binding to rPrP via examination of rPrP HSQC spectra (138). Anchored PrP^{C} enables DNA translocation to the intracellular space (140), and recombinant prion proteins can bend small double-stranded DNA molecules and promote DNA expression (140, 155). The FRET experiments (Figure 5) performed by Nandi's group provide clear-cut evidence that the prion protein modifies the structure of nucleic acids. The observation that the prion protein has a disordered N-terminal domain is consistent with other nucleic acid chaperones (156) and suggests a nucleic acid chaperone function for PrP.

A considerable amount of evidence suggests that nucleic acids can be involved in the conversion of PrP^{C} to PrP^{Sc} . Both DNA and RNA can convert recombinant or purified PrP into misfolded isoforms that possess PrP^{Sc} characteristics. These studies reported a series of PrP:NA aggregates, some of which induced cell death and neurodegeneration (38, 48, 50, 69, 125, 126, 135-137). However, the size, composition, and secondary structure of nucleic acid molecules necessary for binding and converting PrP^{C} to PrP^{Sc} are still open for debate. The different effects observed for DNA and RNA molecules indicate that these molecules exercise distinct roles in prion biology. For example: both DNA and RNA can generate aggregated forms of PrP but, until recently, toxicity was only observed in association with PrP:RNA aggregates (69, 126).

If PrP^{C} is indeed involved in nucleic acid metabolism, how do nucleic acids convert PrP^{C} into PrP^{Sc} ? Under what conditions does this interaction become dangerous? The answers to these questions could explain the sporadic incidence of prion disease cases.

6. PERSPECTIVES IN THERAPY AND DIAGNOSIS

A series of therapeutic strategies have been tested to find an effective treatment against TSEs. However, there is still no efficient approach to preventing disease development and death (for a review on TSE drug therapies, see (157). A broad variety of compounds have been tested in an attempt to reverse or prevent the formation of PrP^{Sc}, such as Congo Red, amphotericin B, porphyrins, polyamines, and sulfated polyanions (2). These drugs seem to function directly or indirectly in the conversion of PrP^C to PrP^{Sc}, and thus prevent the spread of the infectious form. Unfortunately, the compounds tested were not effective in inhibiting the spread of disease when given after the first appearance of symptoms (2). In 2001, Korth and colleagues reported that some phenotiazine and acridine-derived compounds were able to inhibit PrP^{Sc} formation when administered to infected neuroblastoma cells (ScN2a) (158). Unfortunately, when administered over a long period or at high doses, these drugs caused side effects in humans, such as liver damage (159), and they were not suitable for prion disease treatment. Further work described a screening assay for PrP^{Sc} inhibitors and characterized a group of polyphenols that inhibit the cell-free conversion reaction (160). In 2004, our group reported that the naphthalene derivative compound 4,4'-dianilino-1,1'-binaphthyl-5,5'-sulfonate (bis-ANS) can inhibit Syrian hamster PrP peptide ShaPrP(109-149) aggregation (161). This compound is also able to convert rPrP23-231 from its normal alpha-helical form to an alternative, beta-sheet-rich structure. This dual effect was also observed in response to small double-stranded DNA sequences (48). Moreover, binding of bis-ANS to full-length rPrP was reduced by the addition of nanomolar concentrations of oligonucleotides, demonstrating that they compete for the same binding site.

Other groups described the capacity of some NA molecules to reduce PrP^{Sc} formation and to decrease PrP^{Sc} content in infected cells (128, 130, 141, 142) This interesting property of NA molecules as potential anti-prion compounds opens the possibility of new drugs based on PrP:NA interactions (128, 130, 141, 142).

Aside from the use of nucleic acids, glycosaminoglycans have long been considered as a candidate for prion therapy. Sulfated glycans were first used for TSE treatment as antiviral drugs when the pathogen was thought to be a virus. Sulfated glycans were able to prolong the incubation time of the disease and prevent symptoms in mice when administered prophylactically (162-165). Intraventricular infusion of pentosan polysulfate, an analog of heparin, was reported to increase

survival of vCJD patients (70, 166). Due to the diverse biological functions of heparan sulfate and its involvement in prion diseases, many heparan sulfate mimetics (HMs) are being developed and tested as anti-prion drugs. HMs are dextran-based molecules whose hydroxyl groups are substituted with carboxymethyl ether, sulfate esters, or hydrophobic groups. These molecules inhibit PrP^{Sc} accumulation in cell culture without affecting the level of PrP^{C} , and they prolong the survival of scrapie-infected hamsters with no cytopathic or cytostatic effects (167-169). HMs could interact with the prion to lower its binding to cellular HS, and increase the length and mediate the degree of sulfation. The introduction of hydrophobicity could positively modulate this effect (124).

Another developing area in prior diseases is the improvement of new methodologies for TSE diagnosis; PrP:NA interactions could elucidate new possibilities in this field. Some anti-DNA antibodies are able to detect PrP^{Sc} *in vivo* (131), and RNA aptamers can bind selectively to PrP^{C} and PrP^{Sc} (145, 146). The establishment of an effective TSE diagnosis may allow for detection of PrP^{Sc} in pre symptomatic states of prior diseases, and facilitate clearance of PrP aggregates before they become highly toxic. We expect great developments in this field in the years to come.

7. CONCLUSIONS AND PERSPECTIVES

There is increasing evidence that prions have other additional accomplices that chaperone their activity in converting the normal, cellular form of protein into the disease-causing isoform. The most likely candidates for this partnership are nucleic acids and glycosaminoglycans. The catalytic effect of RNA or DNA on the $PrP^C \rightarrow PrP^{Sc}$ conversion would depend on the sequence and structure of the nucleic acids and their ability to provide a protective effect. The potential therapeutic use of modified nucleic acids has recently been demonstrated by different groups. In this review, we examined recent research seeking to understand how nucleic acids and GAGs bind to prions, and the resultant implications for cellular toxicity and prion conversion. Figure 6 summarizes possible mechanisms by which a nucleic acid or GAG could affect conversion of the prion protein.

There are, however, many questions that remain to be explored. The nucleic-acid binding properties of the prion protein (both RNA and DNA) might have broader implications for its native function than for disease. The great abundance of RNA in the cytosol that acts in a variety of cellular processes may hint at the physiological target of prion protein. In a recent article, Beaudoin and coworkers (170) described large ribonucleoprotein particles induced by cytoplasmic PrP, which share striking similarities with the chromatoid body. The chromatoid body is an RNA granule that is predicted to function in post-transcriptional gene regulation, Their findings indicate that PrP functions in the assembly and RNA processing center.

The formation of a complex between non-infectious PrP and RNA may be just part of the story. The connection between PrP^C, NA, and PrP^{Sc} could be a side effect of the prion protein's native cellular function. The implications of these interactions are causing a paradigm shift in the area of prion research and we can anticipate new findings in the years ahead

8. ACKNOWLEDGMENTS

The work in our laboratories was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Millenium Institute for Structural Biology in Biomedicine and Biotechnology (CNPq Millenium Program), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Biologia Estrutural e Bioimagem (CNPq INCT Program) Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), and by a grant from L'Oréal to Y. C.

9. REFERENCES

1. S.B. Prusiner: Prions. Proc Natl Acad Sci U S A 95, 13363-13383 (1998)

2. A. Aguzzi and M. Polymenidou: Mammalian prion biology: one century of evolving concepts. Cell 116, 313-327 (2004)

3. H.G. Creutzfeldt: Über eine eigenartige herdförmige erkrankung des zentralnervensystems. Z Ges Neurol Psychiatr 57, 1-19 (1920)

4. A. Jakob: Über eigenartige erkrankungen des zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischem befunde (spastische pseudosklerose-encephalomyelopathie mit disseminierten degenerationsherden). Z Ges Neurol Psychiatr 64, 147-228 (1921)

5. D.C. GAJDUSEK and V. ZIGAS: Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea; the endemic occurrence of kuru in the native population. *N Engl J Med* 257, 974-978 (1957)

6. T. Alper, W.A. Cramp, D.A. Haig and M.C. Clarke: Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature* 214, 764-766 (1967)

7. J.S. Griffith: Self-replication and scrapie. Nature 215, 1043-1044 (1967)

8. S.B. Prusiner, D.F. Groth, S.P. Cochran, F.R. Masiarz, M.P. McKinley and H.M. Martinez: Molecular properties, partial purification, and assay by incubation period measurements of the hamster scrapie agent. *Biochemistry* 19, 4883-4891 (1980) 9. S.B. Prusiner: Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216, 136-144 (1982)

10. S.B. Prusiner, D.F. Groth, D.C. Bolton, S.B. Kent and L.E. Hood: Purification and structural studies of a major scrapie prion protein. *Cell* 38, 127-134 (1984)

11. B. Caughey and B. Chesebro: Transmissible spongiform encephalopathies and prion protein interconversions. Adv Virus Res 56, 277-311 (2001)

12. B. Oesch, D. Westaway, M. Walchli, M.P. McKinley, S.B. Kent, R. Aebersold, R.A. Barry, P. Tempst, D.B. Teplow, L.E. Hood and .: A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* 40, 735-746 (1985)

13. N.R. Cashman, R. Loertscher, J. Nalbantoglu, I. Shaw, R.J. Kascsak, D.C. Bolton and P.E. Bendheim: Cellular isoform of the scrapie agent protein participates in lymphocyte activation. *Cell* 61, 185-192 (1990)

14. N. Stahl, D.R. Borchelt, K. Hsiao and S.B. Prusiner: Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell* 51, 229-240 (1987)

15. P.M. Rudd, T. Endo, C. Colominas, D. Groth, S.F. Wheeler, D.J. Harvey, M.R. Wormald, H. Serban, S.B. Prusiner, A. Kobata and R.A. Dwek: Glycosylation differences between the normal and pathogenic prion protein isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 13044-13049 (1999)

16. P.M. Rudd, M.R. Wormald, D.R. Wing, S.B. Prusiner and R.A. Dwek: Prion glycoprotein: structure, dynamics, and roles for the sugars. *Biochemistry* 40, 3759-3766 (2001)

17. R. Riek, S. Hornemann, G. Wider, R. Glockshuber and K. Wuthrich: NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231). *FEBS Lett* 413, 282-288 (1997)

18. J.H. Viles, F.E. Cohen, S.B. Prusiner, D.B. Goodin, P.E. Wright and H.J. Dyson: Copper binding to the prion protein: structural implications of four identical cooperative binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2042-2047 (1999)

19. D.R. Brown, K. Qin, J.W. Herms, A. Madlung, J. Manson, R. Strome, P.E. Fraser, T. Kruck, A. von Bohlen, W. Schulz-Schaeffer, A. Giese, D. Westaway and H. Kretzschmar: The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature* 390, 684-687 (1997)

20. D.G. Donne, J.H. Viles, D. Groth, I. Mehlhorn, T.L. James, F.E. Cohen, S.B. Prusiner, P.E. Wright and H.J. Dyson: Structure of the recombinant full-length hamster prion protein PrP(29-231): the N terminus is highly flexible. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13452-13457 (1997)

21. D.A. Lysek, C. Schorn, L.G. Nivon, V. Esteve-Moya, B. Christen, L. Calzolai, C. von Schroetter, F. Fiorito, T. Herrmann, P. Guntert and K. Wuthrich: Prion protein NMR structures of cats, dogs, pigs, and sheep. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 640-645 (2005)

22. L. Calzolai, D.A. Lysek, D.R. Perez, P. Guntert and K. Wuthrich: Prion protein NMR structures of chickens, turtles, and frogs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 651-655 (2005)

23. R. Zahn, A. Liu, T. Luhrs, R. Riek, C. von Schroetter, G.F. Lopez, M. Billeter, L. Calzolai, G. Wider and K. Wuthrich: NMR solution structure of the human prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 145-150 (2000)

24. J.C. Watts and D. Westaway: The prion protein family: diversity, rivalry, and dysfunction. *Biochim Biophys Acta* 1772, 654-672 (2007)

25. H. Bueler, M. Fischer, Y. Lang, H. Bluethmann, H.P. Lipp, S.J. DeArmond, S.B. Prusiner, M. Aguet and C. Weissmann: Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* 356, 577-582 (1992)

26. A. Aguzzi and M. Heikenwalder: Pathogenesis of prion diseases: current status and future outlook. *Nat Rev Microbiol* 4, 765-775 (2006)

27. A. Aguzzi, C. Sigurdson and M. Heikenwaelder: Molecular mechanisms of prion pathogenesis. *Annu Rev Pathol* 3, 11-40 (2008)

28. V.R. Martins, R. Linden, M.A. Prado, R. Walz, A.C. Sakamoto, I. Izquierdo and R.R. Brentani: Cellular prion protein: on the road for functions. *FEBS Lett* 512, 25-28 (2002)

29. E. Graner, A.F. Mercadante, S.M. Zanata, O.V. Forlenza, A.L. Cabral, S.S. Veiga, M.A. Juliano, R. Roesler, R. Walz, A. Minetti, I. Izquierdo, V.R. Martins and R.R. Brentani: Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis. *Brain Res Mol Brain Res* 76, 85-92 (2000)

30. E. Graner, A.F. Mercadante, S.M. Zanata, V.R. Martins, D.G. Jay and R.R. Brentani: Laminin-induced PC-12 cell differentiation is inhibited following laser inactivation of cellular prion protein. *FEBS Lett* 482, 257-260 (2000)

31. S. Gauczynski, J.M. Peyrin, S. Haik, C. Leucht, C. Hundt, R. Rieger, S. Krasemann, J.P. Deslys, D. Dormont, C.I. Lasmezas and S. Weiss: The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as the cell-surface receptor for the cellular prion protein. *EMBO J* 20, 5863-5875 (2001)

32. V. Ellis, M. Daniels, R. Misra and D.R. Brown: Plasminogen activation is stimulated by prion protein and regulated in a copper-dependent manner. *Biochemistry* 41, 6891-6896 (2002)

33. A. Barret, L. Forestier, J.P. Deslys, R. Julien and P.F. Gallet: Glycosylation-related gene expression in prion diseases: PrPSc accumulation in scrapie infected GT1 cells depends on beta-1,4-linked GalNAc-4-SO4 hyposulfation. *J Biol Chem* 280, 10516-10523 (2005)

34. S.M. Zanata, M.H. Lopes, A.F. Mercadante, G.N. Hajj, L.B. Chiarini, R. Nomizo, A.R. Freitas, A.L. Cabral, K.S. Lee, M.A. Juliano, E. de Oliveira, S.G. Jachieri, A. Burlingame, L. Huang, R. Linden, R.R. Brentani and V.R. Martins: Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. *EMBO J* 21, 3307-3316 (2002)

35. G.I. Keshet, O. Bar-Peled, D. Yaffe, U. Nudel and R. Gabizon: The cellular prion protein colocalizes with the dystroglycan complex in the brain. *J Neurochem* 75, 1889-1897 (2000)

36. K. Nieznanski, H. Nieznanska, K.J. Skowronek, K.M. Osiecka and D. Stepkowski: Direct interaction between prion protein and tubulin. *Biochem Biophys Res Commun* 334, 403-411 (2005)

37. A. Aguzzi, F. Baumann and J. Bremer: The prion's elusive reason for being. Annu Rev Neurosci 31, 439-477 (2008)

38. J.L. Silva, L.M. Lima, D. Foguel and Y. Cordeiro: Intriguing nucleic-acid-binding features of mammalian prion protein. *Trends Biochem Sci* 33, 132-140 (2008)

39. K.M. Pan, M. Baldwin, J. Nguyen, M. Gasset, A. Serban, D. Groth, I. Mehlhorn, Z. Huang, R.J. Fletterick, F.E. Cohen and S.B. Prusiner: Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 10962-10966 (1993)

40. S.B. Prusiner, M.P. McKinley, K.A. Bowman, D.C. Bolton, P.E. Bendheim, D.F. Groth and G.G. Glenner: Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell* 35, 349-358 (1983)

41. Z. Huang, S.B. Prusiner and F.E. Cohen: Scrapie prions: a three-dimensional model of an infectious fragment. *Fold Des* 1, 13-19 (1996)

42. L.M. Herrmann and B. Caughey: The importance of the disulfide bond in prion protein conversion. *Neuroreport* 9, 2457-2461 (1998)

43. C. Govaerts, H. Wille, S.B. Prusiner and F.E. Cohen: Evidence for assembly of prions with left-handed beta-helices into trimers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 8342-8347 (2004)

44. H. Bueler, A. Aguzzi, A. Sailer, R.A. Greiner, P. Autenried, M. Aguet and C. Weissmann: Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* 73, 1339-1347 (1993)

45. D.A. Kocisko, J.H. Come, S.A. Priola, B. Chesebro, G.J. Raymond, P.T. Lansbury and B. Caughey: Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature* 370, 471-474 (1994)

46. D.A. Kocisko, S.A. Priola, G.J. Raymond, B. Chesebro, P.T. Lansbury, Jr. and B. Caughey: Species specificity in the cell-free conversion of prion protein to protease-resistant forms: a model for the scrapie species barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 3923-3927 (1995)

47. C. Weissmann: The state of the prion. Nat Rev Microbiol 2, 861-871 (2004)

48. Y. Cordeiro, F. Machado, L. Juliano, M.A. Juliano, R.R. Brentani, D. Foguel and J.L. Silva: DNA converts cellular prion protein into the beta-sheet conformation and inhibits prion peptide aggregation. *J Biol Chem* 276, 49400-49409 (2001)

49. G.C. Telling, M. Scott, J. Mastrianni, R. Gabizon, M. Torchia, F.E. Cohen, S.J. DeArmond and S.B. Prusiner: Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. *Cell* 83, 79-90 (1995)

50. B. Caughey, K. Brown, G.J. Raymond, G.E. Katzenstein and W. Thresher: Binding of the protease-sensitive form of PrP (prion protein) to sulfated glycosaminoglycan and congo red [corrected]. *J Virol* 68, 2135-2141 (1994)

51. B. Caughey and G.S. Baron: Prions and their partners in crime. *Nature* 443, 803-810 (2006)

52. N.R. Deleault, R.W. Lucassen and S. Supattapone: RNA molecules stimulate prion protein conversion. *Nature* 425, 717-720 (2003)

53. I.V. Baskakov, G. Legname, S.B. Prusiner and F.E. Cohen: Folding of prion protein to its native alpha-helical conformation is under kinetic control. *Journal of Biological Chemistry* 276, 19687-19690 (2001)

54. A.C. Apetri and W.K. Surewicz: Atypical effect of salts on the thermodynamic stability of human prion protein. *J Biol Chem* 278, 22187-22192 (2003)

55. Y. Cordeiro, J. Kraineva, R. Ravindra, L.M. Lima, M.P. Gomes, D. Foguel, R. Winter and J.L. Silva: Hydration and packing effects on prion folding and beta-sheet conversion. High pressure spectroscopy and pressure perturbation calorimetry studies. *J Biol Chem* 279, 32354-32359 (2004)

56. Y. Cordeiro, J. Kraineva, M.P. Gomes, M.H. Lopes, V.R. Martins, L.M. Lima, D. Foguel, R. Winter and J.L. Silva: The amino-terminal PrP domain is crucial to modulate prion misfolding and aggregation. *Biophys J* 89, 2667-2676 (2005)

57. Y. Cordeiro, J. Kraineva, R. Winter and J.L. Silva: Volume and energy folding landscape of prion protein revealed by pressure. *Braz J Med Biol Res* 38, 1195-1201 (2005)

58. A. De Simone, G.G. Dodson, C.S. Verma, A. Zagari and F. Fraternali: Prion and water: tight and dynamical hydration sites have a key role in structural stability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 7535-7540 (2005)

59. A. De Simone, G.G. Dodson, F. Fraternali and A. Zagari: Water molecules as structural determinants among prions of low sequence identity. *FEBS Lett* 580, 2488-2494 (2006)

60. A.F. Hill, M. Antoniou and J. Collinge: Protease-resistant prion protein produced in vitro lacks detectable infectivity. *J Gen Virol* 80 (Pt 1), 11-14 (1999)

61. S.B. Prusiner, D. Groth, A. Serban, N. Stahl and R. Gabizon: Attempts to restore scrapie prion infectivity after exposure to protein denaturants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 2793-2797 (1993)

62. G.M. Shaked, G. Fridlander, Z. Meiner, A. Taraboulos and R. Gabizon: Protease-resistant and detergent-insoluble prion protein is not necessarily associated with prion infectivity. *J Biol Chem* 274, 17981-17986 (1999)

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

64. R. Lucassen, K. Nishina and S. Supattapone: In vitro amplification of protease-resistant prion protein requires free sulfhydryl groups. *Biochemistry* 42, 4127-4135 (2003)

65. G. Legname, I.V. Baskakov, H.O. Nguyen, D. Riesner, F.E. Cohen, S.J. DeArmond and S.B. Prusiner: Synthetic mammalian prions. *Science* 305, 673-676 (2004)

66. K. Kaneko, L. Zulianello, M. Scott, C.M. Cooper, A.C. Wallace, T.L. James, F.E. Cohen and S.B. Prusiner: Evidence for protein X binding to a discontinuous epitope on the cellular prion protein during scrapie prion propagation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 10069-10074 (1997)

67. B. Caughey and D.A. Kocisko: Prion diseases - A nucleic-acid accomplice? *Nature* 425, 673-674 (2003)

68. Y. Cordeiro and J.L. Silva: The hypothesis of the catalytic action of nucleic acid on the conversion of prion protein. *Protein Pept Lett* 12, 251-255 (2005)

69. M.P. Gomes, T.A. Millen, P.S. Ferreira, N.L. Silva, T.C. Vieira, M.S. Almeida, J.L. Silva and Y. Cordeiro: Prion protein complexed to N2a cellular RNAs through its N-terminal domain forms aggregates and is toxic to murine neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 283, 19616-19625 (2008)

70. L. Horonchik, S. Tzaban, O. Ben Zaken, Y. Yedidia, A. Rouvinski, D. Papy-Garcia, D. Barritault, I. Vlodavsky and A. Taraboulos: Heparan sulfate is a cellular receptor for purified infectious prions. *J Biol Chem* 280, 17062-17067 (2005)

71. I. Capila and R.J. Linhardt: Heparin-protein interactions. Angew Chem Int Ed Engl 41, 391-412 (2002)

72. R. Virchow: Zur cellulosefrage. Virchows Arch Pathol Anat Physiol 6, 416-426 (1854)

73. A.D. Snow and R. Kisilevsky: Temporal Relationship Between Glycosaminoglycan Accumulation and Amyloid Deposition During Experimental Amyloidosis - A Histochemical-Study. *Laboratory Investigation* 53, 37-44 (1985)

74. I.D. Young, J.P. Willmer and R. Kisilevsky: The Ultrastructural-Localization of Sulfated Proteoglycans Is Identical in the Amyloids of Alzheimers-Disease and Aa, Al, Senile Cardiac and Medullary Carcinoma-Associated Amyloidosis. *Acta Neuropathologica* 78, 202-209 (1989)

75. I.D. Young, L. Ailles, S. Narindrasorasak, R. Tan and R. Kisilevsky: Localization of the Basement-Membrane Heparan-Sulfate Proteoglycan in Islet Amyloid Deposits in Type-Ii Diabetes-Mellitus. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 116, 951-954 (1992)

76. A.D. Snow, R. Kisilevsky, J. Willmer, S.B. Prusiner and S.J. DeArmond: Sulfated Glycosaminoglycans in Amyloid Plaques of Prion Diseases. *Acta Neuropathologica* 77, 337-342 (1989)

77. P.A. McBride, M.I. Wilson, P. Eikelenboom, A. Tunstall and M.E. Bruce: Heparan sulfate proteoglycan is associated with amyloid plaques and neuroanatomically targeted PrP pathology throughout the incubation period of scrapie-infected mice. *Exp Neurol* 149, 447-454 (1998)

78. C. Wong, L.W. Xiong, M. Horiuchi, L. Raymond, K. Wehrly, B. Chesebro and B. Caughey: Sulfated glycans and elevated temperature stimulate PrP(Sc)-dependent cell-free formation of protease-resistant prion protein. *EMBO J* 20, 377-386 (2001)

79. T. Pan, B.S. Wong, T. Liu, R. Li, R.B. Petersen and M.S. Sy: Cell-surface prion protein interacts with glycosaminoglycans. *Biochem J* 368, 81-90 (2002)

80. R.G. Warner, C. Hundt, S. Weiss and J.E. Turnbull: Identification of the heparan sulfate binding sites in the cellular prion protein. *J Biol Chem* 277, 18421-18430 (2002)

81. R. Gabizon, Z. Meiner, M. Halimi and S.A. Ben Sasson: Heparin-like molecules bind differentially to prion-proteins and change their intracellular metabolic fate. *J Cell Physiol* 157, 319-325 (1993)

82. O. Ben Zaken, S. Tzaban, Y. Tal, L. Horonchik, J.D. Esko, I. Vlodavsky and A. Taraboulos: Cellular heparan sulfate participates in the metabolism of prions. *J Biol Chem* 278, 40041-40049 (2003)

83. N. Hijazi, Z. Kariv-Inbal, M. Gasset and R. Gabizon: PrPSc incorporation to cells requires endogenous glycosaminoglycan expression. *J Biol Chem* 280, 17057-17061 (2005)

84. A.D. Snow, T.N. Wight, D. Nochlin, Y. Koike, K. Kimata, S.J. DeArmond and S.B. Prusiner: Immunolocalization of heparan sulfate proteoglycans to the prion protein amyloid plaques of Gerstmann-Straussler syndrome, Creutzfeldt-Jakob disease and scrapie. *Lab Invest* 63, 601-611 (1990)

85. B. Caughey, D. Ernst and R.E. Race: Congo red inhibition of scrapie agent replication. J Virol 67, 6270-6272 (1993)

86. S.L. Shyng, S. Lehmann, K.L. Moulder and D.A. Harris: Sulfated glycans stimulate endocytosis of the cellular isoform of the prion protein, PrPC, in cultured cells. *J Biol Chem* 270, 30221-30229 (1995)

87. M. Perez, F. Wandosell, C. Colaco and J. Avila: Sulphated glycosaminoglycans prevent the neurotoxicity of a human prion protein fragment. *Biochem J* 335 (Pt 2), 369-374 (1998)

88. N.R. Deleault, J.C. Geoghegan, K. Nishina, R. Kascsak, R.A. Williamson and S. Supattapone: Protease-resistant prion protein amplification reconstituted with partially purified substrates and synthetic polyanions. *J Biol Chem* 280, 26873-26879 (2005)

89. M. Cortijo-Arellano, J. Ponce, N. Durany and J. Cladera: Amyloidogenic properties of the prion protein fragment PrP(185-208): comparison with Alzheimer's peptide Abeta(1-28), influence of heparin and cell toxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 368, 238-242 (2008)

90. B. Klajnert, M. Cortijo-Arellano, M. Bryszewska and J. Cladera: Influence of heparin and dendrimers on the aggregation of two amyloid peptides related to Alzheimer's and prion diseases. *Biochem Biophys Res Commun* 339, 577-582 (2006)

91. S. Chen, A. Mange, L. Dong, S. Lehmann and M. Schachner: Prion protein as trans-interacting partner for neurons is involved in neurite outgrowth and neuronal survival. *Mol Cell Neurosci* 22, 227-233 (2003)

92. T. Kinnunen, M. Kaksonen, J. Saarinen, N. Kalkkinen, H.B. Peng and H. Rauvala: Cortactin-Src kinase signaling pathway is involved in N-syndecan-dependent neurite outgrowth. *J Biol Chem* 273, 10702-10708 (1998)

93. C. Hundt, J.M. Peyrin, S. Haik, S. Gauczynski, C. Leucht, R. Rieger, M.L. Riley, J.P. Deslys, D. Dormont, C.I. Lasmezas and S. Weiss: Identification of interaction domains of the prion protein with its 37-kDa/67-kDa laminin receptor. *EMBO J* 20, 5876-5886 (2001)

94. S. Gauczynski, D. Nikles, S. El Gogo, D. Papy-Garcia, C. Rey, S. Alban, D. Barritault, C.I. Lasmezas and S. Weiss: The 37kDa/67-kDa laminin receptor acts as a receptor for infectious prions and is inhibited by polysulfated glycanes. *J Infect Dis* 194, 702-709 (2006)

95. C. Leucht, S. Simoneau, C. Rey, K. Vana, R. Rieger, C.I. Lasmezas and S. Weiss: The 37 kDa/67 kDa laminin receptor is required for PrP(Sc) propagation in scrapie-infected neuronal cells. *EMBO Rep* 4, 290-295 (2003)

96. M. Praus, G. Kettelgerdes, M. Baier, H.G. Holzhutter, P.R. Jungblut, M. Maissen, G. Epple, W.D. Schleuning, E. Kottgen, A. Aguzzi and R. Gessner: Stimulation of plasminogen activation by recombinant cellular prion protein is conserved in the NH2-terminal fragment PrP23-110. *Thromb Haemost* 89, 812-819 (2003)

97. L.A. Fransson, M. Belting, F. Cheng, M. Jonsson, K. Mani and S. Sandgren: Novel aspects of glypican glycobiology. *Cell Mol Life Sci* 61, 1016-1024 (2004)

98. K. Mani, F. Cheng and L.A. Fransson: Heparan sulfate degradation products can associate with oxidized proteins and proteasomes. *J Biol Chem* 282, 21934-21944 (2007)

99. M. Belting, S. Persson and L.A. Fransson: Proteoglycan involvement in polyamine uptake. *Biochem J* 338 (Pt 2), 317-323 (1999)

100. K. Ding, K. Mani, F. Cheng, M. Belting and L.A. Fransson: Copper-dependent autocleavage of glypican-1 heparan sulfate by nitric oxide derived from intrinsic nitrosothiols. *J Biol Chem* 277, 33353-33360 (2002)

101. G.L. Millhauser: Copper and the prion protein: methods, structures, function, and disease. *Annu Rev Phys Chem* 58, 299-320 (2007)

102. K. Mani, F. Cheng, B. Havsmark, M. Jonsson, M. Belting and L.A. Fransson: Prion, amyloid beta-derived Cu(II) ions, or free Zn(II) ions support S-nitroso-dependent autocleavage of glypican-1 heparan sulfate. *J Biol Chem* 278, 38956-38965 (2003)

103. F. Cheng, J. Lindqvist, C.L. Haigh, D.R. Brown and K. Mani: Copper-dependent co-internalization of the prion protein and glypican-1. *J Neurochem* 98, 1445-1457 (2006)

104. P.C. Pauly and D.A. Harris: Copper stimulates endocytosis of the prion protein. J Biol Chem 273, 33107-33110 (1998)

105. A.D. Cardin and H.J. Weintraub: Molecular modeling of protein-glycosaminoglycan interactions. *Arteriosclerosis* 9, 21-32 (1989)

106. M. Sobel, D.F. Soler, J.C. Kermode and R.B. Harris: Localization and characterization of a heparin binding domain peptide of human von Willebrand factor. *J Biol Chem* 267, 8857-8862 (1992)

107. H. Margalit, N. Fischer and S.A. Ben Sasson: Comparative analysis of structurally defined heparin binding sequences reveals a distinct spatial distribution of basic residues. *J Biol Chem* 268, 19228-19231 (1993)

108. J.R. Fromm, R.E. Hileman, J.M. Weiler and R.J. Linhardt: Interaction of fibroblast growth factor-1 and related peptides with heparan sulfate and its oligosaccharides. *Arch Biochem Biophys* 346, 252-262 (1997)

109. J.R. Fromm, R.E. Hileman, E.E. Caldwell, J.M. Weiler and R.J. Linhardt: Differences in the interaction of heparin with arginine and lysine and the importance of these basic amino acids in the binding of heparin to acidic fibroblast growth factor. *Arch Biochem Biophys* 323, 279-287 (1995)

110. A. Abedini, S.M. Tracz, J.H. Cho and D.P. Raleigh: Characterization of the heparin binding site in the N-terminus of human pro-islet amyloid polypeptide: implications for amyloid formation. *Biochemistry* 45, 9228-9237 (2006)

111. J. Hallgren, S. Backstrom, S. Estrada, M. Thuveson and G. Pejler: Histidines are critical for heparin-dependent activation of mast cell tryptase. *J Immunol* 173, 1868-1875 (2004)

112. A. Sebollela, T.C. Cagliari, G.S. Limaverde, A. Chapeaurouge, M.H. Sorgine, T. Coelho-Sampaio, C.H. Ramos and S.T. Ferreira: Heparin-binding sites in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Localization and regulation by histidine ionization. *J Biol Chem* 280, 31949-31956 (2005)

113. R.A. Pixley, Y. Lin, I. Isordia-Salas and R.W. Colman: Fine mapping of the sequences in domain 5 of high molecular weight kininogen (HK) interacting with heparin and zinc. *J Thromb Haemost* 1, 1791-1798 (2003)

114. F. Wopfner, G. Weidenhofer, R. Schneider, A. von Brunn, S. Gilch, T.F. Schwarz, T. Werner and H.M. Schatzl: Analysis of 27 mammalian and 9 avian PrPs reveals high conservation of flexible regions of the prion protein. *J Mol Biol* 289, 1163-1178 (1999)

115. L.G. Goldfarb, P. Brown, W.R. McCombie, D. Goldgaber, G.D. Swergold, P.R. Wills, L. Cervenakova, H. Baron, C.J. Gibbs, Jr. and D.C. GAJDUSEK: Transmissible familial Creutzfeldt-Jakob disease associated with five, seven, and eight extra octapeptide coding repeats in the PRNP gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 10926-10930 (1991)

116. S. Yu, S. Yin, C. Li, P. Wong, B. Chang, F. Xiao, S.C. Kang, H. Yan, G. Xiao, P. Tien and M.S. Sy: Aggregation of prion protein with insertion mutations is proportional to the number of inserts. *Biochem J* 403, 343-351 (2007)

117. R. Gonzalez-Iglesias, M.A. Pajares, C. Ocal, J.C. Espinosa, B. Oesch and M. Gasset: Prion protein interaction with glycosaminoglycan occurs with the formation of oligomeric complexes stabilized by Cu(II) bridges. *J Mol Biol* 319, 527-540 (2002)

118. D.B. Brimacombe, A.D. Bennett, F.S. Wusteman, A.C. Gill, J.C. Dann and C.J. Bostock: Characterization and polyanionbinding properties of purified recombinant prion protein. *Biochem J* 342 Pt 3, 605-613 (1999)

119. S. Yin, S. Yu, C. Li, P. Wong, B. Chang, F. Xiao, S.C. Kang, H. Yan, G. Xiao, J. Grassi, P. Tien and M.S. Sy: Prion proteins with insertion mutations have altered N-terminal conformation and increased ligand binding activity and are more susceptible to oxidative attack. *J Biol Chem* 281, 10698-10705 (2006)

120. S. Yin, N. Pham, S. Yu, C. Li, P. Wong, B. Chang, S.C. Kang, E. Biasini, P. Tien, D.A. Harris and M.S. Sy: Human prion proteins with pathogenic mutations share common conformational changes resulting in enhanced binding to glycosaminoglycans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 7546-7551 (2007)

121. S. Yu, S. Yin, N. Pham, P. Wong, S.C. Kang, R.B. Petersen, C. Li and M.S. Sy: Ligand binding promotes prion protein aggregation--role of the octapeptide repeats. *FEBS J* 275, 5564-5575 (2008)

122. D. Shukla, J. Liu, P. Blaiklock, N.W. Shworak, X. Bai, J.D. Esko, G.H. Cohen, R.J. Eisenberg, R.D. Rosenberg and P.G. Spear: A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry. *Cell* 99, 13-22 (1999)

123. B. Casu and U. Lindahl: Structure and biological interactions of heparin and heparan sulfate. Adv Carbohydr Chem Biochem 57, 159-206 (2001)

124. M.O. Ouidja, E. Petit, M.E. Kerros, Y. Ikeda, C. Morin, G. Carpentier, D. Barritault, J. Brugere-Picoux, J.P. Deslys, K. Adjou and D. Papy-Garcia: Structure-activity studies of heparan mimetic polyanions for anti-prion therapies. *Biochem Biophys Res Commun* 363, 95-100 (2007)

125. S. Vasan, P.Y. Mong and A. Grossman: Interaction of prion protein with small highly structured RNAs: detection and characterization of PrP-oligomers. *Neurochem Res* 31, 629-637 (2006)

126. N.R. Deleault, B.T. Harris, J.R. Rees and S. Supattapone: Formation of native prions from minimal components in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 9741-9746 (2007)

127. N. Daude, M. Marella and J. Chabry: Specific inhibition of pathological prion protein accumulation by small interfering RNAs. *J Cell Sci* 116, 2775-2779 (2003)

128. M.V. Karpuj, K. Giles, S. Gelibter-Niv, M.R. Scott, V.R. Lingappa, F.C. Szoka, D. Peretz, W. Denetclaw and S.B. Prusiner: Phosphorothioate oligonucleotides reduce PrP levels and prion infectivity in cultured cells. *Mol Med* 13, 190-198 (2007)

129. P.K. Nandi: Interaction of prion peptide HuPrP106-126 with nucleic acid. Arch Virol 142, 2537-2545 (1997)

130. A. Rhie, L. Kirby, N. Sayer, R. Wellesley, P. Disterer, I. Sylvester, A. Gill, J. Hope, W. James and A. Tahiri-Alaoui: Characterization of 2'-fluoro-RNA aptamers that bind preferentially to disease-associated conformations of prion protein and inhibit conversion. *J Biol Chem* 278, 39697-39705 (2003)

131. W.Q. Zou, J. Zheng, D.M. Gray, P. Gambetti and S.G. Chen: Antibody to DNA detects scrapie but not normal prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 1380-1385 (2004)

132. C. Gabus, S. Auxilien, C. Pechoux, D. Dormont, W. Swietnicki, M. Morillas, W. Surewicz, P. Nandi and J.L. Darlix: The prion protein has DNA strand transfer properties similar to retroviral nucleocapsid protein. *J Mol Biol* 307, 1011-1021 (2001)

133. C. Gabus, E. Derrington, P. Leblanc, J. Chnaiderman, D. Dormont, W. Swietnicki, M. Morillas, W.K. Surewicz, D. Marc, P. Nandi and J.L. Darlix: The prion protein has RNA binding and chaperoning properties characteristic of nucleocapsid protein NCP7 of HIV-1. *J Biol Chem* 276, 19301-19309 (2001)

134. J.L. Silva, L.M. Lima, D. Foguel and Y. Cordeiro: Response to Radulescu and Brenig: Infectious nucleic acids in prion disease: halfway there. *Trends Biochem Sci* 34, 5-6 (2009)

135. P.K. Nandi and E. Leclerc: Polymerization of murine recombinant prion protein in nucleic acid solution. Arch Virol 144, 1751-1763 (1999)

136. P.K. Nandi, E. Leclerc, J.C. Nicole and M. Takahashi: DNA-induced partial unfolding of prion protein leads to its polymerisation to amyloid. *J Mol Biol* 322, 153-161 (2002)

137. P.K. Nandi and J.C. Nicole: Nucleic acid and prion protein interaction produces spherical amyloids which can function in vivo as coats of spongiform encephalopathy agent. *J Mol Biol* 344, 827-837 (2004)

138. L.M. Lima, Y. Cordeiro, L.W. Tinoco, A.F. Marques, C.L. Oliveira, S. Sampath, R. Kodali, G. Choi, D. Foguel, I. Torriani, B. Caughey and J.L. Silva: Structural insights into the interaction between prion protein and nucleic acid. *Biochemistry* 45, 9180-9187 (2006)

139. A. Mange, C. Crozet, S. Lehmann and F. Beranger: Scrapie-like prion protein is translocated to the nuclei of infected cells independently of proteasome inhibition and interacts with chromatin. *J Cell Sci* 117, 2411-2416 (2004)

140. S. Yin, X. Fan, S. Yu, C. Li and M.S. Sy: Binding of recombinant but not endogenous prion protein to DNA causes DNA internalization and expression in mammalian cells. *J Biol Chem* 283, 25446-25454 (2008)

141. D.A. Kocisko, A. Vaillant, K.S. Lee, K.M. Arnold, N. Bertholet, R.E. Race, E.A. Olsen, J.M. Juteau and B. Caughey: Potent antiscrapie activities of degenerate phosphorothioate oligonucleotides. *Antimicrob Agents Chemother* 50, 1034-1044 (2006)

142. D.J. King, J.G. Safar, G. Legname and S.B. Prusiner: Thioaptamer interactions with prion proteins: sequence-specific and non-specific binding sites. *J Mol Biol* 369, 1001-1014 (2007)

143. S. Weiss, D. Proske, M. Neumann, M.H. Groschup, H.A. Kretzschmar, M. Famulok and E.L. Winnacker: RNA aptamers specifically interact with the prion protein PrP. *J Virol* 71, 8790-8797 (1997)

144. V. Adler, B. Zeiler, V. Kryukov, R. Kascsak, R. Rubenstein and A. Grossman: Small, highly structured RNAs participate in the conversion of human recombinant PrP(Sen) to PrP(Res) in vitro. *J Mol Biol* 332, 47-57 (2003)

145. S. Sekiya, K. Noda, F. Nishikawa, T. Yokoyama, P.K. Kumar and S. Nishikawa: Characterization and application of a novel RNA aptamer against the mouse prion protein. *J Biochem* 139, 383-390 (2006)

146. N.M. Sayer, M. Cubin, A. Rhie, M. Bullock, A. Tahiri-Alaoui and W. James: Structural determinants of conformationally selective, prion-binding aptamers. *J Biol Chem* 279, 13102-13109 (2004)

147. J.C. Geoghegan, P.A. Valdes, N.R. Orem, N.R. Deleault, R.A. Williamson, B.T. Harris and S. Supattapone: Selective incorporation of polyanionic molecules into hamster prions. *J Biol Chem* 282, 36341-36353 (2007)

148. F.F. Costa: Non-coding RNAs: new players in eukaryotic biology. *Gene* 357, 83-94 (2005)

149. D. Kampa, J. Cheng, P. Kapranov, M. Yamanaka, S. Brubaker, S. Cawley, J. Drenkow, A. Piccolboni, S. Bekiranov, G. Helt, H. Tammana and T.R. Gingeras: Novel RNAs identified from an in-depth analysis of the transcriptome of human chromosomes 21 and 22. *Genome Res* 14, 331-342 (2004)

150. M.E. Dinger, T.R. Mercer and J.S. Mattick: RNAs as extracellular signaling molecules. *J Mol Endocrinol* 40, 151-159 (2008)

151. A. Bera and P.K. Nandi: Biological polyamines inhibit nucleic-acid-induced polymerisation of prion protein. *Arch Virol* 152, 655-668 (2007)

152. M.P. Gomes, Y. Cordeiro and J.L. Silva: The peculiar interaction between mammalian prion protein and RNA. *Prion* 2, 64-66 (2008)

153. R. Linden, V.R. Martins, M.A. Prado, M. Cammarota, I. Izquierdo and R.R. Brentani: Physiology of the prion protein. *Physiol Rev* 88, 673-728 (2008)

154. H. Tjong and H.X. Zhou: DISPLAR: an accurate method for predicting DNA-binding sites on protein surfaces. *Nucleic Acids Res* 35, 1465-1477 (2007)

155. A. Bera, A.C. Roche and P.K. Nandi: Bending and unwinding of nucleic acid by prion protein. *Biochemistry* 46, 1320-1328 (2007)

156. P. Tompa and P. Csermely: The role of structural disorder in the function of RNA and protein chaperones. *FASEB J* 18, 1169-1175 (2004)

157. N.R. Cashman and B. Caughey: Prion diseases--close to effective therapy? Nat Rev Drug Discov 3, 874-884 (2004)

158. C. Korth, B.C. May, F.E. Cohen and S.B. Prusiner: Acridine and phenothiazine derivatives as pharmacotherapeutics for prion disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9836-9841 (2001)

159. S.J. Collins, V. Lewis, M. Brazier, A.F. Hill, A. Fletcher and C.L. Masters: Quinacrine does not prolong survival in a murine Creutzfeldt-Jakob disease model. *Ann Neurol* 52, 503-506 (2002)

160. D.A. Kocisko, G.S. Baron, R. Rubenstein, J. Chen, S. Kuizon and B. Caughey: New inhibitors of scrapie-associated prion protein formation in a library of 2000 drugs and natural products. *J Virol* 77, 10288-10294 (2003)

161. Y. Cordeiro, L.M. Lima, M.P. Gomes, D. Foguel and J.L. Silva: Modulation of prion protein oligomerization, aggregation, and beta-sheet conversion by 4,4'-dianilino-1,1'-binaphthyl-5,5'-sulfonate (bis-ANS). *J Biol Chem* 279, 5346-5352 (2004)

162. R.H. Kimberlin and C.A. Walker: Suppression of scrapie infection in mice by heteropolyanion 23, dextran sulfate, and some other polyanions. *Antimicrob Agents Chemother* 30, 409-413 (1986)

163. C.F. Farquhar and A.G. Dickinson: Prolongation of scrapie incubation period by an injection of dextran sulphate 500 within the month before or after infection. *J Gen Virol* 67 (Pt 3), 463-473 (1986)

164. H. Diringer and B. Ehlers: Chemoprophylaxis of scrapie in mice. J Gen Virol 72 (Pt 2), 457-460 (1991)

165. A. Ladogana, P. Casaccia, L. Ingrosso, M. Cibati, M. Salvatore, Y.G. Xi, C. Masullo and M. Pocchiari: Sulphate polyanions prolong the incubation period of scrapie-infected hamsters. *J Gen Virol* 73 (Pt 3), 661-665 (1992)

166. N.V. Todd, J. Morrow, K. Doh-ura, S. Dealler, S. O'Hare, P. Farling, M. Duddy and N.G. Rainov: Cerebroventricular infusion of pentosan polysulphate in human variant Creutzfeldt-Jakob disease. *J Infect* 50, 394-396 (2005)

167. K.T. Adjou, S. Simoneau, N. Sales, F. Lamoury, D. Dormont, D. Papy-Garcia, D. Barritault, J.P. Deslys and C.I. Lasmezas: A novel generation of heparan sulfate mimetics for the treatment of prion diseases. *J Gen Virol* 84, 2595-2603 (2003)

168. O. Schonberger, L. Horonchik, R. Gabizon, D. Papy-Garcia, D. Barritault and A. Taraboulos: Novel heparan mimetics potently inhibit the scrapie prion protein and its endocytosis. *Biochem Biophys Res Commun* 312, 473-479 (2003)

169. C. Larramendy-Gozalo, A. Barret, E. Daudigeos, E. Mathieu, L. Antonangeli, C. Riffet, E. Petit, D. Papy-Garcia, D. Barritault, P. Brown and J.P. Deslys: Comparison of CR36, a new heparan mimetic, and pentosan polysulfate in the treatment of prion diseases. *J Gen Virol* 88, 1062-1067 (2007)

170. S. Beaudoin, B. Vanderperre, C. Grenier, I. Tremblay, F. Leduc and X. Roucou: A large ribonucleoprotein particle induced by cytoplasmic PrP shares striking similarities with the chromatoid body, an RNA granule predicted to function in posttranscriptional gene regulation. *Biochim Biophys Acta* 1793, 335-345 (2009)

Key words: Prion protein, aggregation, encephalopathy, DNA, RNA, glycosaminoglycan

Send correspondence to: J. L. Silva, Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ, CCS, Bloco E, Sala 10. Phone 55 21 25626756; E-mail: jerson@bioqmed.ufrj.br

Running Title: Prion Protein and Ligands: Nucleic Acids and Glycosaminoglycans

Figure legends:

Figure 1. Mouse PrP high resolution structure. Fragment 121-231 of mouse PrP (rPrP121-231), PDB 1AG2. Alpha helixes 1, 2 and 3 are represented in red; beta strands 1 and 2 are shown in yellow; loops and turns are colored in green. The dotted line represents the unstructured amino terminal region of rPrP, containing residues 23-120. Adapted from Riek et al., 1997 (17).

Figure 2. Conversion of PrP^{C} into the beta-sheet isoform free energy diagram. Unfolding of the cellular prion protein (PrP^{C}) and its subsequent misfolding to the scrapie isoform (PrP^{Sc}) has been implicated in transmissible spongiform encephalopathies. The two isofoms of PrP can be differentiated by their secondary structures: PrP^{C} is largely helical whereas PrP^{Sc} is enriched in beta-structure. The conformational transition is separated by a large energetic barrier that is associated with unfolding and oligomerization. I and U represent intermediate and unfolded states of the protein. For these reason, it seems likely that other molecules are crucial for prion propagation acting as an adjuvant factor by lowering the energy barrier. Adapted from Cordeiro et. al., 2001 (48).

Figure 3. DNA can act as catalyst in PrP^{Sc} formation. (A) ShaPrP 109-149 aggregation is increased by rPrP:DNA complex. *Left,* addition of increasing concentrations of rPrP 23–231 to a solution at pH 5.0 containing 25 nM E2DBS labeled with rhodamine at the 3' end. *Right,* light scattering at 320 nm when ShaPrP 109–149 (*open squares*) or rPrP 23–231 (*filled squares*) was added to the rPrP:E2DBS complex. The LS values plotted are the difference between the conditions in the presence and in the absence of the complex. (**B**) rPrP:DNA complex facilitates PrP^{C}/PrP^{Sc} conversion together with the perturbation of an excess of PrP^{Sc} aggregates. Adapted from Cordeiro et al., 2001 (48).

Figure 4. Models for the mouse prion protein complexed with DNA. (A and B) Three-dimensional model of rPrP reconstituted from SAXS measurements. Superposition of the rPrPD32-121 model obtained from SAXS experiments and the NMR structure of the murine prion protein globular domain, residues 121-231 (PDB entry 1AG2). (C) rPrPD32-121-DNA complex envelopes superimposed onto rPrPdel32-121 envelope and crystal structure of a 16 base pair DNA (PDB entry 2BOP). The DNA used in this superposition is smaller than the used in the measurements and complete superposition was not realized. (D) Adapted from Lima et al., 2006 (138).

Figure 5. Dependence of FRET efficiency (TE = $(I_{DO}-I_D)/I_{DO}$) on alpha-PrP concentration at pH 6 and 7.2. (A) FAM-Lef-DNA-TAMRA. (B) FAM-NC-DNA-TAMRA. At both pHs, the FRET efficiency is greater for the NC-DNA albeit to a smaller extent, and the efficiency is more at pH 7.2 than that at pH 6. Extracted from Bera et al., 2007(155).

Figure 6. Models for PrP^{C} conversion into PrP^{Sc} . (A) PrP^{Sc} is the only responsible for structural conversion of PrP^{C} into new PrP^{Sc} . (B) A macromolecule (DNA, RNA or GAG) is responsible for PrP^{C} conversion into PrP^{Sc} . (C) An adjuvant molecule acts as a catalyst, facilitating PrP^{C} conversion into PrP^{Sc} . Adapted from Aguzzi and Polymenidou, 2004 and Silva et al., 2008 (2, 38).



Figure 1.



Figure 2.



Figure 3.





Figure 4.



Figure 5.



Figure 6.

10 ANEXOS 3

Ligand Binding and Hydration in Protein Misfolding: Insights from Studies of Prion and p53 Tumor Suppressor Proteins

Jerson L. Silva[#]*, Tuane C. R. G. Vieira[#], Mariana P. B. Gomes[#], Ana Paula Ano Bom[#], Luis Mauricio T. R. Lima[&], Monica S. Freitas[#], Daniella Ishimaru[#], Yraima Cordeiro[&] and Debora Foguel[#]

[#]Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear Jiri Jonas, Instituto de Bioquímica Médica, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Biologia Estrutural e Bioimagem, [&]Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 21941-590, Brazil;

AUTHOREMAILADDRESS:jerson@bioqmed.ufrj.br;tuane@bioqmed.ufrj.br;mpbg@bioqmed.ufrj.br;apdinis@bioqmed.ufrj.br;mauricio@pharma.ufrj.br;msfreitas@bioqmed.ufrj.br;ishimaru@musc.edu;yraima@pharma.ufrj.br;foguel@bioqmed.ufrj.br;ishimaru@musc.edu;yraima@pharma.ufrj.br;

DEDICATED TO THE MEMORY OF PROFESSOR GREGORIO WEBER

CORRESPONDING AUTHOR FOOTNOTE: Jerson L. Silva, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Bioquímica, Bloco E Sala 10, Cidade Universitária, 21941-590, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Phone: 55 21 2562 6756; FAX: 55 21 2270 8647; E-mail: jerson@bioqmed.ufrj.br

Conspectus:

This review focuses on the interplay between ligand binding and hydration in the formation of misfolded protein species. Protein misfolding has been implicated in a large number of diseases, which are grouped under the name of protein folding disorders (PFDs). In these diseases, large quantities of wrongly folded proteins undergo aggregation, destroying brain cells and other tissues. Such disorders include Alzheimer's disease, Parkinson's disease, transmissible spongiform encephalopathies, familial amyloid polyneuropathy, Huntington's disease and type II diabetes. Hydration drives various biological processes, including protein folding, ligand binding, macromolecular assembly, enzyme kinetics, and signal transduction. To approach the changes in hydration and packing - both when proteins fold correctly or when folding goes wrong, leading to the protein folding disorders- several biochemical, biophysical and structural approaches have been utilized. Whereas in many cases binding of a ligand such as a nucleic acid acts by preventing misfolding and aggregation, there are several cases in which ligands induce misfolding and assembly into amyloids. This occurs simply because the formation of structured aggregates, such as protofibrillar and fibrillar amyloids, involves decreases in hydration, formation of an H-bond network in the secondary structure, and burying of non-polar amino-acid residues, processes that also occur in the normal folding landscape. This Account describes the present knowledge of the folding and misfolding of different proteins, with a more detailed emphasis on mammalian prion protein (PrP) and tumoral suppressor protein p53, and also explores how ligand binding and hydration influence the fate of the proteins. The cellular isoform of PrP possesses a disordered Nterminal domain and also a highly flexible and not well-packed C-terminal domain, which might account for its significant hydration. When PrP binds to biological molecules, such as glycosaminoglycans and nucleic acids, the disordered segments appear to fold and become less hydrated. Formation of the PrP-nucleic acid complex seems to accelerate the conversion of the cellular form of the protein into the disease-causing isoform. For p53, binding to some ligands, including nucleic acids, would prevent misfolding of the protein. Recently several groups have

begun to analyze the folding/misfolding of the individual domains of p53, but several questions remain unanswered. We discuss the implications of all these findings for our understanding of the productive and incorrect folding pathways of these proteins in normal physiological states and in human disease, such as prion disorders and cancer, and we show how these studies lay the groundwork for the development of new drugs.

Introduction

In the year 2009, we commemorate Charles Darwin's 200th birthday and 150 years since the publication of the seminal book "On the Origin of Species"¹. In the last one and a half centuries, Biology has evolved in fascinating and unexpected ways and most of the general predictions of Darwin's theory of evolution have been tested at the molecular level. Chemists, biochemists and physicists are trying to describe the conformation landscape of biomolecules through the use of their sophisticated tools, including quantum mechanics, kinetics and irreversible thermodynamics. But the understanding of apparently simple processes, such as protein folding, has so far eluded us. The applications of some of the laws of chemistry and physics do not always result in success – as was brilliantly pointed out by Schrödinger in "What is Life" (1944):² ".....from all we have learnt about the structure of living matter, we must be prepared to find it working in a manner that cannot be reduced to the ordinary laws of Physics"; and that is so "because the construction is different from anything we have yet tested in the physical laboratory."

Schrödinger's forecasts have become real and most of our attempts to frame Biology according to a deterministic view have failed. This is particularly true in the processes that lead a biopolymer to evolve in space and time. Water is the ubiquitous background for all these processes and, although it tended initially to be overlooked, theoreticians and experimentalists have had to take it into account more and more³. From enzyme catalysis to cell signaling throughout the different compartments in the cell, water activity plays a crucial role. A protein will successfully sample the lowest free energies of the protein folding funnel according to the interactions among the different amino-acid residues as well as to the differential interactions with water molecules (Figure 1). It is the balance of all these interactions that results in the folded protein.

The protein energy landscape gains considerable complexity with the inclusion of interactions with water³. For some proteins, the energy landscape becomes more complicated when the system drifts into an aggregation pathway, as exemplified in Figure 1. Protein misfolding and aggregation are involved in more than 30 human diseases, including Parkinson's, Alzheimer's, transmissible

spongiform encephalopathies, systemic amyloidogenic diseases and cancer⁴. Protein aggregation also proceeds with changes in hydration similar to folding and ligand binding⁵. Protein folding intermediates have been spotted as precursors to the misfolded and aggregated species. The choice of the folding intermediates that lead into a native or misfolded conformation will depend on how the different states are populated, based on their energies, energy barriers and exposure of hydrophobic surfaces to the aqueous milieu (Figure 1). Homeostasis of cellular proteins is controlled by proteasomes, chaperones and other folding assistants that play a crucial role in preventing the deleterious effects of misfolding⁶. Folding and misfolding/aggregation are equally driven by dehydration, and, therefore, it is critical to evaluate the contribution of hydration to the formation of folded and misfolded species. Ligand binding leads to a decrease in solvent exposure very similar to that observed when the protein folds or aggregates. The ligand might be a small molecule, another protein, a nucleic acid, a glycosaminoglycan or a membrane lipid.

Here, we will review how ligand interaction affects protein folding and misfolding. The effects might be paradoxical; depending on concentration and the presence of partners; the outcome can be prevention of misfolding or its acceleration. The interplay between hydration and ligand binding will also be an important part of this account.

1. Hydration in protein folding, misfolding and amyloid assembly

The importance of hydration for the formation of amyloids has been deduced from structural studies⁷ as well by molecular dynamics⁸. The use of computer simulations to study protein aggregation encounters problems due to the complexity of the system. Using explicit and implicit solvent simulations, a study with the amyloidogenic β -hairpin peptide (residues 109–122 of the Syrian hamster prion protein) allowed the authors to demonstrate that solvent exposure of hydrophobic surfaces is the driving force for the folding of the peptide⁸.

There are several in vitro studies that address the effects of water deprivation on the aggregation of proteins^{9,10}. Using model cosolvents, Grudzielanek et al.¹⁰ described how solvational
perturbations lead into pronounced and different effects on the unfolding, non-native assembly and fibril formation of insulin. More recently, Mukherjee and coworkers⁹ utilized reverse micelles to show that the aggregation rates of two amyloid-forming peptides increase when hydration is decreased.

As described below, pressure and volumetric approaches make it possible to assess the effects of hydration and ligands on the folding and misfolding/aggregation of proteins.

Hydration effects on protein misfolding and amyloid aggregation as studied by high hydrostatic pressure. Proteins undergo dissociation and unfolding by pressure mostly because the final states are more hydrated and have fewer cavities⁵ (Figure 2). In contrast, alpha helices and beta sheets are less sensitive to high pressure because of the low compressibility of hydrogen bonds. Because of these properties, high pressure has been used to assess the underlying mechanisms of protein misfolding and aggregation^{5,11,12,13}. Some fibrillar aggregates are highly sensitive to pressure, and it is becoming a consensus that this sensitivity is related with the infiltration of water molecules into the protein interior^{5,11}. Since pressure shifts the equilibrium towards the species with smaller volumes, it has the potential to dissociate aggregates (Figure 2).

The similar sensitivity to pressure of folded and misfolded proteins indicates comparable forces maintaining these states, especially because they have similar water-excluded cavities. Thus, both the folded and aggregated states will be less hydrated and have larger specific volumes than the unfolded state (Figure 2). Early aggregated species and protofilaments always have larger volumes and are thus sensitive to hydrostatic pressure^{12,13,14,15,16}. Although fibrils might be less hydrated than early aggregates, they are more stable and have greater contributions from hydrogen bonds. Thus, much higher pressures would be required to dissociate these aggregates. A typical case is the amyloid fibrils of β 2-microglobulin (β 2-m), involved in dialysis-related amyloidosis, which are not tightly packed; instead, they present a larger number of cavities than denatured protein¹⁶. However, mature amyloid-like fibrils formed from a fragment of the β 2-m protein have a smaller partial

specific volume, probably because of a greater contribution from hydrogen bonds¹⁶. Similar results had been observed when comparing whole transthyretin with TTR peptides^{11,13}.

Pressure can also promote the formation of intermediates that are prone to aggregation^{11,13} (Figure 2). Pressure would have a reshuffling activity, producing intermediates that might evolve into misfolded/aggregated species under decompression. For transthyretin, involved in senile systemic amyloidosis and in familial amyloidotic polyneuropathy, a less stable tetramer is formed after decompression^{11,14}. More recently, high pressure was used to explore a potential therapy against amyloidogenic diseases by trapping the monomer of a non-amyloidogenic variant (T119M) of transthyretin¹⁷. Pressure produced long-lived monomers of T119M. They were mixed with aggressive mutants of TTR to generate heterotetramers, which became non-amyloidogenic¹⁷.

2. Prion protein: a hydrated promiscuous protein

Transmissible Spongiform Encephalopathies (TSEs) are rare, fatal neurodegenerative diseases¹⁸. The most intriguing feature of TSEs is that they can be infectious, in addition to the hereditary and sporadic forms. All TSEs are related to single infectious agents that are isoforms of a constitutive protein known as the prion protein (PrP)¹⁸. To some extent contradicting Anfinsen's paradigm, there are two isoforms of the prion protein with the same amino-acid sequence, the cellular and the misfolded isoform¹⁸. The cellular prion isoform (PrP^C) is rich in alpha helices and occurs naturally in cells of the host, whereas the misfolded form is a conformational variant of the first, rich in beta-sheet, involved in transmission of the disease, called the prion scrapie (PrP^{Sc})¹⁸. Mature PrP^C is anchored to the outer cell membrane through a glycosyl phosphatidyl inositol (GPI) anchor and has a globular domain and a highly disordered amino-terminal domain¹⁸. The physiological function of PrP is still a matter of intense debate.

Conversion of PrP^{Sc} into PrP^C involves changes in hydration and might be promoted by ligands. The "protein-only hypothesis" postulates that the PrP is the main agent responsible for the outbreak of TSEs¹⁸. The discovery that PrP knockout mice are resistant to infection by prions¹⁹ is the main groundwork for this hypothesis. The mechanisms that lead to conversion of PrP^C into PrP^{Sc} are still unknown, but there are several proposed models. Incubation of PrP^C with large quantities of PrP^{Sc} give resistance to protease digestion²⁰, suggesting that PrP^{Sc} catalyzes the conversion of PrP^C into newly formed PrP^{Sc}. However, it has been suggested by several groups that a still unknown cofactor might initiate or modulate the conversion of PrP^C to PrP^{Sc21,22,23}. This hypothetical molecule would lower the free-energy barrier that prevents conversion between PrP^C and PrP^{Sc}, triggering formation of PrP^{Sc} (Figure 3).

Biophysical studies have demonstrated that the transition between these states involves changes in hydration^{15,24,25}. The free-energy and volume diagrams (Figure 3) show that the cellular isoform is in a metastable conformation, and surprisingly the differences involve larger changes in volume than in free energy. Studies employing high-pressure FTIR and pressure perturbation calorimetry indicated that the cellular PrP isoform is more hydrated and has a larger solvent-accessible surface area than aggregated recombinant PrP (rPrP)^{15,25} (Figure 3). Molecular dynamics studies corroborated the role of hydration in the folding stability and amyloidogenicity of PrP²⁴. Binding of a cofactor (such as nucleic acid or a glycosaminoglycan) would lead to a decrease in solvent-accessible surface area and a decrease in the level of hydration (Figure 3). Below, we focus on the ligand-binding properties of the prion protein and its implication in hydration changes in the latter leading to disease progression.

Binding of PrP to Nucleic Acids and Changes in Hydration. Nucleic acids are now believed to be important players²⁶ in prion biology. DNA or RNA molecules would participate in prion diseases as cofactors, helping to trigger the conversion of PrP^C into PrP^{Sc} (Figure 3). Nandi and coworkers showed that recombinant murine prion protein (rPrP) polymerizes in a nucleic acid solution²⁷. The first experimental evidence for a catalytic role of nucleic acids in PrP conversion was presented by some of us (J.L.S., D.F. and Y.C.) in 2001²¹. We showed that recombinant prion protein could bind

DNA oligonucleotides with high affinity *in vitro*. Our main finding was that the PrP:nucleic acid complex could act as a catalyst, increasing the aggregation rate²¹ (Figure 3). The structural data obtained from small angle X-ray scattering (SAXS) and nuclear magnetic resonance (NMR) measurements showed that rPrP interacts with DNA through both the globular and disordered domains²⁸. The NMR measurements identified chemical-shift changes in amino acids both in the C-and N-domains of the protein, suggesting a restructuring of the protein upon DNA binding and decrease of hydration²⁸.

PrP can also bind RNA molecules^{29,30,31,32}. Adler and collaborators isolated highly structured RNA molecules that bind human rPrP with high affinity *in vitro*³⁰. Prion protein can also form structures similar to retroviral proteins, therefore possessing RNA-binding chaperone characteristics, likely participating in nucleic-acid metabolism³³. The interaction of PrP with RNA *in vivo* and *in vitro* was shown to stimulate the conversion of PrP^C to PrP-res in hamster brain homogenates and treatment of these homogenates with RNase could inhibit the conversion²². Lately, synthetic RNAs were used to generate protease-resistant prion protein (PrP^{Res}) formation³². This result is consistent with our *in-vitro* DNA-binding results suggesting that nucleic acids could be involved in prion conversion²¹. Intracerebral inoculation of a mixture of synthetic RNAs, purified PrP and co-purified lipids caused neurodegeneration in healthy wild-type hamsters³².

Full-length rPrP interacts with RNA at the disordered and highly hydrated N-terminus undergoing aggregation and losing most of its alpha-helical content³¹. NMR measurements with a synthetic RNA sequence showed that the soluble portion of PrP recovered most of its original fold, but with distinct changes in the NMR HSQC spectrum³¹. The aggregates derived from interaction of PrP with RNA extracted from neuroblastoma cells were highly cytotoxic³¹. In contrast, complexes formed with synthetic RNAs were not toxic. The precise RNA structure needed for prion binding is still unknown, but the high flexibility of such molecules is certainly important for these interactions. It also seems crucial to the interaction changes in hydration of the protein itself that would decrease the solvent accessibility (Figure 3).

In the last decade, non-coding RNAs (ncRNA) have been shown to act in post-translational regulation. The finding that PrP interacts with nucleic acid with potential NA chaperone activities³³ raises the possibility that PrP might have some effects in the processing of ncRNA. In fact, recent studies showed that cytoplasmic PrP induced large ribonucleoprotein particles³⁴, with potential function in post-transcriptional regulation. The participation of a nucleic acid in prion conversion would be a rare event because a seed of misfolded material would also be needed. More recently, it was found that recombinant PrP translocates DNA to the intracellular space and promotes DNA expression³⁵. Fluorescence resonance energy transfer experiments recently showed that PrP modifies the structure of nucleic acids³⁶. A putative nucleic acid-chaperone function for PrP raises the question of how interaction with nucleic acids could contribute to the sporadic cases of prion diseases.

Binding of PrP to glycosaminoglycans and potential therapeutic approaches to prion diseases. Glycosaminoglycans (GAGs) have been implicated in many conformational diseases and were detected in different types of amyloid deposits³⁷. GAGs bind PrP^C both in its soluble form and at the cell surface³⁸. Heparan sulfate was found in amyloid plaques in TSEs³⁷ and other studies showed that sulfated polysaccharides can inhibit the accumulation of PrP^{Res} in cells infected with scrapie³⁹. Moreover, it was shown that sulfated GAGs could inhibit the polymerization of prion peptides into amyloid fibrils⁴⁰. Thus, interaction of PrP (PrP^C and/or PrP^{Sc}) with endogenous GAGs might be needed for PrP^{Sc} propagation, and exogenous GAGs might act as inhibitors, blocking the interaction of PrP with endogenous proteoglycans. In this respect, GAGs would act as some nucleic acids do²⁶ by reducing the access of the solvent to the surface of the protein. Accordingly, endogenous GAGs at the cell membrane possess characteristics that are necessary to facilitate PrP^{Sc} formation/propagation and differ from exogenous molecules that do not cause this effect.

A great variety of compounds have been tested in an effort to find agents that reverse or prevent the formation of PrP^{Sc}. Degenerate phosphorothioate oligonucleotides were designed to

reduce PrP^{Sc} formation *in vivo⁴¹*. DNA thioaptamers bind with high affinity to different mammalian prion proteins^{41,42} and have great potential as anti-prion agents. GAGs are also considered as promising compounds for prion diseases^{26,43}. Heparan sulfate mimetics (HMs) inhibit PrP^{Sc} accumulation in cell culture without affecting the level of PrP^C, and they prolong the survival of scrapie-infected hamsters with no cytopathic or cytostatic effects⁴³.

3. Misfolding of p53 and cancer

When cells are subjected to stress, p53 works as a transcription factor, resulting in cell cycle arrest or apoptosis⁴⁴. It is the failure of these responses that contributes to an uncontrolled cell cycle. p53 function is lost in more than 50% of human cancers, making it an appealing target for cancer therapies. p53 is a modular protein containing an N-terminal transactivation domain, followed by a proline-rich region, a central DNA-binding domain (p53C), a tetramerization domain, and an extreme C terminus⁴⁵. The central or core domain of p53 (p53C), which is comprised of residues 94 to 312, is responsible for specific DNA interactions⁴⁵. Of the nearly 22,000 point mutations in p53, 97% are found in the core domain.

An aggravating factor to the misfolding of p53 caused by single-amino acid mutations is the negative dominance property: several p53 mutants (translated from a single mutant allele) are able to drive wild-type p53 protein (translated from the remaining wild-type p53 allele) into a mutant conformation⁴⁶, in a way that resembles the action of the prion protein.

p53C is a relatively unstable protein undergoing easily chemical, thermal and pressure denaturation^{47,48,49,50}. Interestingly, p53C loses its DNA-binding activity spontaneously at 37°C *in vitro* due to a kinetic partitioning between folding and misfolding pathways of the protein⁴⁷. Recently, we found that the interaction with a cognate DNA sequence stabilizes p53 and prevents aggregation of the protein into an amyloid-like structure (Figure 4). Sequence-specific DNA also stabilized full-length p53. The effects of cognate DNA could be simulated by high concentrations of osmolytes, implying that the stabilization is caused by water exclusion. We propose that aptameric

nucleic acids can be used as therapeutic approaches to prevent misfolded species of p53 and treat cancer⁵¹ (Figure 4).

The intriguing amyloid potential of different domains of p53. Formation of amyloid-like aggregates has been described for the core⁸², for the tetramerization^{52,53} and for the transactivation⁵⁴ domains of p53. Stefani and coworkers⁵⁴ elegantly demonstrated that the p53 N-terminal domain can aggregate into amyloid assemblies that exhibit cytotoxicity. We found that the wild-type p53 core domain (p53C) can form fibrillar aggregates⁴⁹. An intermediate oligomer of p53C was also observed during equilibrium and kinetic folding/unfolding transitions⁵⁵. Annular and fibrillar aggregates of p53C were toxic to cells⁴⁹. The hot-spot mutant R248Q also had a tendency to aggregate. Thus, the fibrillogenesis of p53 might contribute to its loss of function and seed the accumulation of conformationally altered protein in cancerous cells (Figure 4D).

Several carcinomas exhibit abnormal accumulation of wild-type or mutant tumor suppressor protein p53 either in the cytoplasm or in the nucleus of the cell⁵⁶. Evidence that the three domains of p53 form amyloid-like aggregates is quite striking, making it tempting to speculate that p53 amyloid formation might participate in the malignant process. Aggregation of p53 would act as a sink to sequester native protein into the inactive conformation, replicating the structural information, very much like a prion (Figure 4D). Hot-spot mutations of p53, related to highly malignant tumors, usually destabilize the folded conformation^{45,47}, exposing hydrophobic surfaces to water, and we did find that they have a greater tendency to aggregate⁴⁹. Because this aggregation is likely to include wild-type subunits, it could be the basis for the negative dominance of p53 mutants⁴⁶. The search for molecules that preclude the formation of the misfolded conformation, which may ultimately lead to the prevention of tumor development, is a major goal in cancer research⁵⁷. The use of aptameric nucleic acids could be a good alternative to prevent aggregation and to rescue activity⁵¹ (Figure 4). A more stable variant of p53 would shift the equilibrium toward the soluble and active form of the protein.

4. Nucleic-acid effects on other amyloidogenic proteins:

The effects of nucleic acids on the aggregation and misfolding properties are not restricted to prion protein²⁶ and p53⁵¹. For all the cases, the binding seems to be driven by decreases in the surface exposed to the aqueous environment. The replication initiator protein of *Pseudomonas* pPS10 plasmid (RepA) aggregates into amyloids⁵⁸. DNA induced the aggregation of one of the domains of the protein into amyloids, which might have a role in the negative regulation of plasmid replication. However, DNA was not present in fibrils, similar to what we found for the interaction of PrP with DNA⁵⁸.

In the case of α -synuclein, involved in Parkinson's disease, it has been found that DNA stimulates formation of fibrils^{59,60}. There was a parallel between the effects of DNA-binding and osmolytes in inducing fibrillation⁶⁰. These results are similar to that found with DNA-induced stabilization of p53C, which in turn resembles the stabilization promoted by high concentrations of glycerol⁵¹. Formation of α -synuclein fibrils is driven by exclusion of molecules of water, as clearly shown by pressure studies of the fibrils¹¹.

5. Overview and Future Perspectives

At the end of his book "Protein Interactions", published in 1992⁶¹, Gregorio Weber wrote that "Future knowledge of the relation of protein function to structure and dynamics is much more likely to come from the comparative study of the proteins than from their study as isolated entities to which elementary physics and chemistry are applicable". To some extent, his words reinforce Schrodinger's statement that biomolecules are quite complex entities². The great challenge in Biology for the next decades will be to discover how interactions among different biomolecules and with solvent occur in space and time in the cellular context. Even at one of the lowest hierarchical levels, such as the protein folding, understanding the frequent failure of polypeptides to reach the

native state requires that we comprehend the interactions of a plethora of intermediate states with ligands and the solvent⁵. Here we exemplified this quite well with the prion protein, p53 and other amyloidogenic proteins.

For prions, they seem to have other accomplices (most likely nucleic acids and GAGs) that chaperone their activity in converting the cellular form of the protein into the disease-causing isoform. There are, however, many questions that remain to be explored. The ability of the prion protein to bind nucleic acids may have broader implications for its native function than for disease. The great abundance of RNA in the cytosol that acts in a variety of cellular processes may hint at the physiological target of prion protein.

In the case of p53, the complexity increases significantly when one considers all of its domains. To exert its functions, p53 interacts with a large number of other proteins, which potentially contribute to p53's conformation and affinity for its target DNA. In the same manner, post-translational modifications likely interfere with protein folding. Another level of complexity for p53 folding involves p53 mutants that can alter the conformation of the wild-type protein either by forming heterotetramers or by aggregation, converting the wild-type monomer into an inactive form, as described for prions. It will be exciting to explore the different pathways of the p53 folding landscape and the role of individual conformational intermediates. The comprehension of p53 folding/misfolding may shed light on the mechanisms of p53 regulation and ultimately the cell's fate in tumorigenic processes.

References

- (1) Darwin, C. R. On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life.; *John Murray*: London, **1859**.
- (2) Schrödinger, E. What Is Life? Mind and Matter. Cambridge University Press. 1944.
- (3) Levy, Y.; Onuchic, J. N. Water Mediation in Protein Folding and Molecular Recognition. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2006**, *35*, 389-415.
- (4) Chiti, F.; Dobson, C. M. Protein Misfolding, Functional Amyloid, and Human Disease. *Annu. Rev. Biochem.* **2006**, *75*, 333-366.
- (5) Foguel, D.; Silva, J. L. New Insights into the Mechanisms of Protein Misfolding and Aggregation in Amyloidogenic Diseases Derived From Pressure Studies. *Biochemistry* 2004, 43, 11361-11370.
- (6) Balch, W. E.; Morimoto, R. I.; Dillin, A.; Kelly, J. W. Adapting Proteostasis for Disease Intervention. *Science* **2008**, *319*, 916-919.
- (7) Nelson, R.; Sawaya, M. R.; Balbirnie, M.; Madsen, A. O.; Riekel, C.; Grothe, R.; Eisenberg, D. Structure of the Cross-Beta Spine of Amyloid-Like Fibrils. *Nature* 2005, *435*, 773-778.
- (8) Daidone, I.; Ulmschneider, M. B.; Di, N. A.; Amadei, A.; Smith, J. C. Dehydration-Driven Solvent Exposure of Hydrophobic Surfaces As a Driving Force in Peptide Folding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **2007**, *104*, 15230-15235.
- (9) Mukherjee, S.; Chowdhury, P.; Gai, F. Effect of Dehydration on the Aggregation Kinetics of Two Amyloid Peptides. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 531-535.
- (10) Grudzielanek, S.; Jansen, R.; Winter, R. Solvational Tuning of the Unfolding, Aggregation and Amyloidogenesis of Insulin. *J. Mol. Biol.* **2005**, *351*, 879-894.
- (11) Foguel, D.; Suarez, M. C.; Ferrao-Gonzales, A. D.; Porto, T. C.; Palmieri, L.; Einsiedler, C. M.; Andrade, L. R.; Lashuel, H. A.; Lansbury, P. T.; Kelly, J. W.; Silva, J. L. Dissociation of Amyloid Fibrils of Alpha-Synuclein and Transthyretin by Pressure Reveals Their Reversible Nature and the Formation of Water-Excluded Cavities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 2003, *100*, 9831-9836.
- (12) Niraula, T. N.; Konno, T.; Li, H.; Yamada, H.; Akasaka, K.; Tachibana, H. Pressure-Dissociable Reversible Assembly of Intrinsically Denatured Lysozyme Is a Precursor for Amyloid Fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 2004, *101*, 4089-4093.
- (13) Dirix, C.; Meersman, F.; MacPhee, C. E.; Dobson, C. M.; Heremans, K. High Hydrostatic Pressure Dissociates Early Aggregates of TTR105-115, but Not the Mature Amyloid Fibrils. J. Mol. Biol. 2005, 347, 903-909.
- (14) Ferrao-Gonzales, A. D.; Palmieri, L.; Valory, M.; Silva, J. L.; Lashuel, H.; Kelly, J. W.; Foguel, D. Hydration and Packing Are Crucial to Amyloidogenesis As Revealed by Pressure Studies on Transthyretin Variants That Either Protect or Worsen Amyloid Disease. J. Mol. Biol. 2003, 328, 963-974.

- (15) Cordeiro, Y.; Kraineva, J.; Ravindra, R.; Lima, L. M.; Gomes, M. P.; Foguel, D.; Winter, R.; Silva, J. L. Hydration and Packing Effects on Prion Folding and Beta-Sheet Conversion. High Pressure Spectroscopy and Pressure Perturbation Calorimetry Studies. *J. Biol. Chem.* 2004, 279, 32354-32359.
- (16) Lee, Y. H.; Chatani, E.; Sasahara, K.; Naiki, H.; Goto, Y. A Comprehensive Model for Packing and Hydration for Amyloid Fibrils of Beta2-Microglobulin. J. Biol. Chem. 2009, 284, 2169-2175.
- (17) Palhano, F. L.; Leme, L. P.; Busnardo, R. G.; Foguel, D. Trapping the Monomer of a Non-Amyloidogenic Variant of Transthyretin: Exploring Its Possible Use As a Therapeutic Strategy Against Transthyretin Amyloidogenic Diseases. J. Biol. Chem. 2009, 284, 1443-1453.
- (18) Prusiner, S. B. Prions. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 1998, 95, 13363-13383.
- (19) Bueler, H.; Aguzzi, A.; Sailer, A.; Greiner, R. A.; Autenried, P.; Aguet, M.; Weissmann, C. Mice Devoid of PrP Are Resistant to Scrapie. *Cell* 1993, 73, 1339-1347.
- (20) Kocisko, D. A.; Come, J. H.; Priola, S. A.; Chesebro, B.; Raymond, G. J.; Lansbury, P. T.; Caughey, B. Cell-Free Formation of Protease-Resistant Prion Protein. *Nature* **1994**, *370*, 471-474.
- (21) Cordeiro, Y.; Machado, F.; Juliano, L.; Juliano, M. A.; Brentani, R. R.; Foguel, D.; Silva, J. L. DNA Converts Cellular Prion Protein into the Beta-Sheet Conformation and Inhibits Prion Peptide Aggregation. J. Biol. Chem. 2001, 276, 49400-49409.
- (22) Deleault, N. R.; Lucassen, R. W.; Supattapone, S. RNA Molecules Stimulate Prion Protein Conversion. *Nature* **2003**, *425*, 717-720.
- (23) Caughey, B.; Baron, G. S. Prions and Their Partners in Crime. Nature 2006, 443, 803-810.
- (24) De Simone, A.; Dodson, G. G.; Verma, C. S.; Zagari, A.; Fraternali, F. Prion and Water: Tight and Dynamical Hydration Sites Have a Key Role in Structural Stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **2005**, *102*, 7535-7540.
- (25) Cordeiro, Y.; Kraineva, J.; Gomes, M. P.; Lopes, M. H.; Martins, V. R.; Lima, L. M.; Foguel, D.; Winter, R.; Silva, J. L. The Amino-Terminal PrP Domain Is Crucial to Modulate Prion Misfolding and Aggregation. *Biophys. J.* 2005, 89, 2667-2676.
- (26) Silva, J. L.; Lima, L. M.; Foguel, D.; Cordeiro, Y. Intriguing Nucleic-Acid-Binding Features of Mammalian Prion Protein. *Trends Biochem. Sci.* **2008**, *33*, 132-140.
- (27) Nandi, P. K.; Leclerc, E. Polymerization of Murine Recombinant Prion Protein in Nucleic Acid Solution. *Arch. Virol.* **1999**, *144*, 1751-1763.
- (28) Lima, L. M.; Cordeiro, Y.; Tinoco, L. W.; Marques, A. F.; Oliveira, C. L.; Sampath, S.; Kodali, R.; Choi, G.; Foguel, D.; Torriani, I.; Caughey, B.; Silva, J. L. Structural Insights into the Interaction Between Prion Protein and Nucleic Acid. *Biochemistry* 2006, 45, 9180-9187.
- (29) Weiss, S.; Proske, D.; Neumann, M.; Groschup, M. H.; Kretzschmar, H. A.; Famulok, M.; Winnacker, E. L. RNA Aptamers Specifically Interact With the Prion Protein PrP. J. Virol. 1997, 71, 8790-8797.

- (30) Adler, V.; Zeiler, B.; Kryukov, V.; Kascsak, R.; Rubenstein, R.; Grossman, A. Small, Highly Structured RNAs Participate in the Conversion of Human Recombinant PrP(Sen) to PrP(Res) in Vitro. *J. Mol. Biol.* **2003**, *332*, 47-57.
- (31) Gomes, M. P.; Millen, T. A.; Ferreira, P. S.; Silva, N. L.; Vieira, T. C.; Almeida, M. S.; Silva, J. L.; Cordeiro, Y. Prion Protein Complexed to N2a Cellular RNAs Through Its N-Terminal Domain Forms Aggregates and Is Toxic to Murine Neuroblastoma Cells. *J. Biol. Chem.* 2008, 283, 19616-19625.
- (32) Deleault, N. R.; Harris, B. T.; Rees, J. R.; Supattapone, S. Formation of Native Prions From Minimal Components in Vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **2007**, *104*, 9741-9746.
- (33) Gabus, C.; Derrington, E.; Leblanc, P.; Chnaiderman, J.; Dormont, D.; Swietnicki, W.; Morillas, M.; Surewicz, W. K.; Marc, D.; Nandi, P.; Darlix, J. L. The Prion Protein Has RNA Binding and Chaperoning Properties Characteristic of Nucleocapsid Protein NCP7 of HIV-1. J. Biol. Chem. 2001, 276, 19301-19309.
- (34) Beaudoin, S.; Vanderperre, B.; Grenier, C.; Tremblay, I.; Leduc, F.; Roucou, X. A Large Ribonucleoprotein Particle Induced by Cytoplasmic PrP Shares Striking Similarities With the Chromatoid Body, an RNA Granule Predicted to Function in Posttranscriptional Gene Regulation. *Biochim. Biophys. Acta* 2009, 1793, 335-345.
- (35) Yin, S.; Fan, X.; Yu, S.; Li, C.; Sy, M. S. Binding of Recombinant but Not Endogenous Prion Protein to DNA Causes DNA Internalization and Expression in Mammalian Cells. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 25446-25454.
- (36) Bera, A.; Roche, A. C.; Nandi, P. K. Bending and Unwinding of Nucleic Acid by Prion Protein. *Biochemistry* **2007**, *46*, 1320-1328.
- (37) Snow, A. D.; Kisilevsky, R.; Willmer, J.; Prusiner, S. B.; DeArmond, S. J. Sulfated Glycosaminoglycans in Amyloid Plaques of Prion Diseases. *Acta Neuropathologica* **1989**, 77, 337-342.
- (38) Pan, T.; Wong, B. S.; Liu, T.; Li, R.; Petersen, R. B.; Sy, M. S. Cell-Surface Prion Protein Interacts With Glycosaminoglycans. *Biochem. J.* **2002**, *368*, 81-90.
- (39) Caughey, B.; Brown, K.; Raymond, G. J.; Katzenstein, G. E.; Thresher, W. Binding of the Protease-Sensitive Form of PrP (Prion Protein) to Sulfated Glycosaminoglycan and Congo Red. *J. Virol.* **1994**, *68*, 2135-2141.
- (40) Perez, M.; Wandosell, F.; Colaco, C.; Avila, J. Sulphated Glycosaminoglycans Prevent the Neurotoxicity of a Human Prion Protein Fragment. *Biochem. J.* 1998, 335 (*Pt 2*), 369-374.
- (41) Kocisko, D. A.; Vaillant, A.; Lee, K. S.; Arnold, K. M.; Bertholet, N.; Race, R. E.; Olsen, E. A.; Juteau, J. M.; Caughey, B. Potent Antiscrapie Activities of Degenerate Phosphorothioate Oligonucleotides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006, *50*, 1034-1044.
- (42) King, D. J.; Safar, J. G.; Legname, G.; Prusiner, S. B. Thioaptamer Interactions With Prion Proteins: Sequence-Specific and Non-Specific Binding Sites. *J. Mol. Biol.* 2007, *369*, 1001-1014.
- (43) Larramendy-Gozalo, C.; Barret, A.; Daudigeos, E.; Mathieu, E.; Antonangeli, L.; Riffet, C.; Petit, E.; Papy-Garcia, D.; Barritault, D.; Brown, P.; Deslys, J. P. Comparison of

CR36, a New Heparan Mimetic, and Pentosan Polysulfate in the Treatment of Prion Diseases. J. Gen. Virol. 2007, 88, 1062-1067.

- (44) Vousden, K. H.; Lane, D. P. P53 in Health and Disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 275-283.
- (45) Joerger, A. C.; Fersht, A. R. Structural Biology of the Tumor Suppressor P53. *Annu. Rev. Biochem.* **2008**, *77*, 557-582.
- (46) Milner, J.; Medcalf, E. A. Cotranslation of Activated Mutant P53 With Wild Type Drives the Wild-Type P53 Protein into the Mutant Conformation. *Cell* **1991**, *65*, 765-774.
- (47) Butler, J. S.; Loh, S. N. Kinetic Partitioning During Folding of the P53 DNA Binding Domain. J. Mol. Biol. 2005, 350, 906-918.
- (48) Bullock, A. N.; Henckel, J.; DeDecker, B. S.; Johnson, C. M.; Nikolova, P. V.; Proctor, M. R.; Lane, D. P.; Fersht, A. R. Thermodynamic Stability of Wild-Type and Mutant P53 Core Domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **1997**, *94*, 14338-14342.
- (49) Ishimaru, D.; Andrade, L. R.; Teixeira, L. S.; Quesado, P. A.; Maiolino, L. M.; Lopez, P. M.; Cordeiro, Y.; Costa, L. T.; Heckl, W. M.; Weissmuller, G.; Foguel, D.; Silva, J. L. Fibrillar Aggregates of the Tumor Suppressor P53 Core Domain. *Biochemistry* 2003, 42, 9022-9027.
- (50) Ishimaru, D.; Maia, L. F.; Maiolino, L. M.; Quesado, P. A.; Lopez, P. C.; Almeida, F. C.; Valente, A. P.; Silva, J. L. Conversion of Wild-Type P53 Core Domain into a Conformation That Mimics a Hot-Spot Mutant. J. Mol. Biol. 2003, 333, 443-451.
- (51) Ishimaru, D.; Ano Bom, A. P. D.; Lima, L. M. T. R.; Quesado, P. A.; Oyama, M. F. C.; Moura Gallo, C. V.; Cordeiro, Y.; Silva, J. L. Cognate DNA Stabilizes the Tumor Suppressor p53 and Prevents Misfolding and Aggregation. *Biochemistry* 2009, in press.
- (52) Lee, A. S.; Galea, C.; DiGiammarino, E. L.; Jun, B.; Murti, G.; Ribeiro, R. C.; Zambetti, G.; Schultz, C. P.; Kriwacki, R. W. Reversible Amyloid Formation by the P53 Tetramerization Domain and a Cancer-Associated Mutant. *J. Mol. Biol.* 2003, *327*, 699-709.
- (53) Higashimoto, Y.; Asanomi, Y.; Takakusagi, S.; Lewis, M. S.; Uosaki, K.; Durell, S. R.; Anderson, C. W.; Appella, E.; Sakaguchi, K. Unfolding, Aggregation, and Amyloid Formation by the Tetramerization Domain From Mutant P53 Associated With Lung Cancer. *Biochemistry* 2006, 45, 1608-1619.
- (54) Rigacci, S.; Bucciantini, M.; Relini, A.; Pesce, A.; Gliozzi, A.; Berti, A.; Stefani, M. The (1-63) Region of the P53 Transactivation Domain Aggregates in Vitro into Cytotoxic Amyloid Assemblies. *Biophys. J.* 2008, 94, 3635-3646.
- (55) Ishimaru, D.; Lima, L. M.; Maia, L. F.; Lopez, P. M.; Ano Bom, A. P.; Valente, A. P.; Silva, J. L. Reversible Aggregation Plays a Crucial Role on the Folding Landscape of P53 Core Domain. *Biophys. J.* **2004**, *87*, 2691-2700.
- (56) Moll, U. M.; Ostermeyer, A. G.; Haladay, R.; Winkfield, B.; Frazier, M.; Zambetti, G. Cytoplasmic Sequestration of Wild-Type P53 Protein Impairs the G1 Checkpoint After DNA Damage. *Mol. Cell Biol.* **1996**, *16*, 1126-1137.

- (57) Selivanova, G.; Wiman, K. G. Reactivation of Mutant P53: Molecular Mechanisms and Therapeutic Potential. *Oncogene* **2007**, *26*, 2243-2254.
- (58) Giraldo, R. Defined DNA Sequences Promote the Assembly of a Bacterial Protein into Distinct Amyloid Nanostructures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **2007**, *104*, 17388-17393.
- (59) Cherny, D.; Hoyer, W.; Subramaniam, V.; Jovin, T. M. Double-Stranded DNA Stimulates the Fibrillation of Alpha-Synuclein in Vitro and Is Associated With the Mature Fibrils: an Electron Microscopy Study. J. Mol. Biol. 2004, 344, 929-938.
- (60) Hegde, M. L.; Rao, K. S. DNA Induces Folding in Alpha-Synuclein: Understanding the Mechanism Using Chaperone Property of Osmolytes. *Arch. Biochem. Biophys.* **2007**, *464*, 57-69.
- (61) Weber, G. Protein Interactions.; Chapman and Hall.: 1992.

Figure Legends

Figure 1. **Free-energy landscape of protein folding versus misfolding**. Unfolded proteins (represented in the top of the diagram) have high conformational entropy and are highly hydrated. As the proteins evolve in the funnel, the intermediate species become more structured and less hydrated. Some proteins face a bifurcation in the landscape leading to metastable conformations, which depending on the conditions might advance to stabilized misfolded species and undergo aggregation.

Figure 2. **Hydrostatic pressure effects in different systems.** Pressure acts on proteins by water infiltration and shifts the equilibrium to smaller volumes, and may induce protein denaturation, protein dissociation, dissociation of protein-nucleic acid complexes, disassembly of aggregates, including amyloids, and formation of pre-amyloidogenic intermediates.

Figure 3. Energy and volume diagram of PrP misfolding. PrP^{C} (left) can misfold into an isoform rich in beta sheet structure capable of forming toxic and infectious aggregates (PrP^{Sc}) (right). The transition between the species is separated by a large energetic barrier. I and U represent intermediate and unfolded states of the protein. An adjuvant factor would lower the free-energy barrier that prevents conversion, triggering formation of PrP^{Sc} . PrP^{C} has a larger solvent-accessible surface area than the misfolded and aggregated species, and the folding pathway also exhibits a kinetic barrier in the activation volume (inset, modified from ref. 15). The pressure-denatured states of α -rPrP (PrP^C) and β -rPrP (PrP^{Sc}-like) are denoted as U and U', respectively.

Figure 4. **Stabilization of p53C upon sequence-specific DNA binding and recovery of misfolded aggregated species of p53C.** (A) Structure of p53C bound to DNA (PDB entry 2ABY). (B) Full-length p53 is stabilized against pressure denaturation upon DNA binding as measured by fluorescence: p53 (blue circles), consensus-bound p53 (red squares), and poly(GC)-bound p53 (green triangles). Open symbols correspond to the values after return to atmospheric pressure. (C) Cognate DNA rescues the native conformation of p53C after misfolding and aggregation. Fluorescence spectrum of wt p53C at atmospheric pressure (solid black line); after the first cycle of compression and decompression in the absence of DNA (red line); after DNA addition at atmospheric pressure (blue line); and after the second pressure cycle in the presence of DNA (green line). (D) Proposed model for p53C aggregation. Conversion of native, active p53 (blue circles) into aggregates (red squares) in the cytoplasm (upper panels). Nuclear DNA is represented in purple. Adapted from refs. 49, 51.

ACKNOWLEDGMENTS

The work in our laboratories was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Biologia Estrutural e Bioimagem (CNPq INCT Program), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), and by a grant from L'Oréal to Y. C.









11 ANEXOS 4

PRION PROTEIN INTERACTION WITH LOW MOLECULAR WEIGHT HEPARIN

Tuane C. R. G. Vieira¹, Mariana P. B. Gomes¹, Débora Foguel¹, Marcius S. Almeida¹, Yraima Cordeiro² & Jerson L. Silva^{1*}. ¹Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 21491-590, Brazil and ²Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 21491-590, Brazil.

***Corresponding author**: J. L. Silva, Instituto de Bioquímica Médica, BE, S10, 21491-590, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Telephone: 55 21 25626756, FAX: 55 21 3881 4155. E-mail: jerson@bioqmed.ufrj.br.

Abbreviations: Circular dichroism, CD; Light scattering, LS; PrP, prion protein; rPrP, recombinant prion protein; scrapie prion protein, PrP^{Sc}; protease-resistant prion protein, PrP^{res}; low molecular weight heparin, LMWHep; N-Acetyl heparin, NA; N-Acetyl-de-O-sulfated heparin, NADOS; acharan sulfate, AS; glycophosphatidylinositol, GPI; glycosaminoglycan, GAG; heparan sulfate, HS.

SUMMARY

Transmissible spongiform encephalopathies are a group of fatal diseases, which affect mammals, caused by an abnormal isoform of the prion protein (PrP). Conversion of cellular PrP (PrP^C) into the pathological conformer, PrP^{Sc}, involves contact between both isoforms and probably requires a cellular factor, such as a glycosaminoglycan. Though direct interaction between PrP and heparin (Hep) has been recorded, little is known about the structural features implicit in this interaction. In the present work, we developed light-scattering, fluorescence and nuclear magnetic resonance spectroscopy measurements in order to provide information on the chemical and physical properties of the murine recombinant PrP (rPrP 23-231) interaction with low molecular weight heparin (LMWHep) at pH 7.4 and pH 5.0. We found that LMWHep interacts with rPrP 23-231 inducing its oligomerization/aggregation, which is a reversible process. After reaching equilibrium, NMR HSQC spectra show marked differences in chemical shifts between free and Hep-bound protein samples. We also investigated the interaction of Hep with other PrP constructs, lacking portions of the N-terminal domain (rPrP Δ 51-90 and Δ 32-121). Heparin did not bind these constructs at pH 7.4 but was able to interact at pH 5.0, suggesting that Hep can interact with different regions of the protein depending on pH. In addition, we searched for Hep sulfation groups important for interaction using modified heparins. Heps containing only 6-Osulfated or 2-O-sufated groups did not alter significantly the PrP secondary structure. On this basis it may be inferred that these two sulfate groups play an important role in prion-heparin interaction.

INTRODUCTION

Transmissible spongiform encephalopathies such as Creutzfeldt-Jakob disease of humans, scrapie of sheep, and bovine spongiform encephalopathy are fatal degenerative diseases caused Prions are glycoproteins attached to the cell surface via a bv prions (1). glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor at the protein's C- terminus and are mainly expressed in cells of the central nervous system (2). The protein conformation which occurs in healthy, non-infected cells (PrP^C), is mainly composed by α -helices linked to a disorder N-terminal domain (3-5). The refolding of PrP^{C} into an abnormal β -sheet-rich isoform capable of forming toxic and infectious aggregates, called PrP scrapie (PrP^{Sc}) is the key event in prion disease pathology (6, 7). Although it is well established that this structural conversion leads to TSE development, it is still unclear how this process results in neuronal cell death.

According to the "protein only" hypothesis the PrP^{Sc} acts as a template, inducing the conversion of PrP^{C} and propagating itself as an 'infectious protein' (8, 9). This occurs primarily on the cell surface or in endocytic vesicles (10-12). The scrapie isoform is thermodynamically more stable than the native. The conformational transition is separated by a large energetic barrier that is associated with unfolding and oligomerization (13, 14). While prion disease is believed to be an autocatalytic process, it seems likely that other molecules are crucial for prion propagation acting as adjuvant factors by lowering the free-energy barrier (15, 16). The different environments the protein finds itself *in vivo* are likely to influence its ability to misfold and aggregate (ref?). Several candidates have been put forward like cellular adhesion molecules (17, 18), nucleic acids (19-22), and glycosaminoglycans (21, 23, 24).

Glycosaminoglycans (GAGs) are primary components of the cell surface and the cell– extracellular matrix interface. GAGs are linear polysaccharides comprised of a disaccharide repeat unit of a hexuronic acid linked to a hexosamine that can be mainly modified by *N*deacetylase and *N*-sulfotransferases (25). Sulfated GAGs, particularly heparan sulfate, have long been implicated in interactions with many amyloid proteins and are associated with several important syndromes (26-29). Many lines of evidences have linked heparan sulfate (HS) or it's analog heparin to the pathogenesis and metabolism of prions (21, 23, 24, 30, 31). For example, HS accumulates in cerebral prion amyloid plaques (32), stimulates the cell-free conversion of PrP^C to PrP^{res} (31), is necessary to PrP^{Sc} formation in ScN2a cells (24) and may act as it's cellsurface receptor (23). Sulfated GAGs have also been shown to prevent the accumulation of protease-resistant prion protein (33, 34).

Heparin was shown to bind to bovine recombinant prion protein with high affinity at acidic pH and sharply decreased at pH beyond 7.5 (35). At pH 6.5 the interaction was shown to be followed by the formation of oligomeric complexes (30). Though direct interaction between prion protein and heparin has been recorded, little is known about the structural features implicit in this interaction.

Investigation about the binding site of heparin on PrP^{C} , using synthetic peptides and biosensor analysis, have pointed out for the involvement of residues in three segments of the Nterminal domain with independent binding activity: the highly cationic amino-terminal residues (23-52), the octapeptide repeats (53-93) and a more C-terminal site (110-128) (36). Conversely, Yin and collaborators (37) revealed that when the first 12 amino acids of the N-terminus of human recombinant prion protein are deleted, the recombinant protein is no longer able to bind GAG. Consequently, there is still some debate as to which residues are most important for binding. Competitive inhibition studies showed that de 2-O-sulfated heparin was not able to inhibit prion-heparin interaction, suggesting the importance of 2-O-sulfate groups for interaction (36).

In this study we show that LMWHeparin interacts with murine recombinant prion protein inducing oligomerization. Following the binding kinetics and secondary structure content we found that this oligomerization is mostly transient, with aggregation of a smaller part of the samples (mostly at pH 5.5). In accordance, the interaction of murine PrP with heparin showed to be higher at the acidic pH. The NMR results demonstrate that the prion protein complexed with LMWHeparin has the same general folding of the free protein, with some chemical shifts changes on N and C- terminal amino acids. We have further investigated the interaction of LMWHep with a PrP mutant lacking a region of the N-terminal domain, and the results indicate that heparin interacts with the octapeptide repeat region at pH 7.4, but can also interact with other regions of the protein (as the C-terminal domain) when the interaction occurs at pH 5.0. Analyzing the interaction of PrP with modified heparins we indicate that 6-O-sulfation is also an important component of PrP binding site like 2-O-sulfation.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials - All reagents used were of analytical grade. Low molecular weight heparin (LMWHep, H3400), N-Acetyl heparin (NA, A8036), and N-Acetyl-de-O-sulfated heparin (NADOS, A6039) were purchased from Sigma (cidade, estado, país). Acharan sulfate (AS) was purified as described (38).

Prion protein expression and purification - The recombinant full-length PrP 23–231 and N-terminal deletion mutants rPrP Δ 51-90 and rPrP Δ 32-121 were expressed in *Escherichia coli* and purified by high-affinity column refolding as described previously (39).

Spectroscopic Measurements - Light scattering spectra were recorded on a PC1 spectrofluorometer (ISS, Champaign, IL), in "L" geometry (at 90° in relation to excitation light), illuminating the samples at 320 nm and collecting LS from 300 to 340 nm. rPrP 23-231 oligomerization was followed as a function of light scattering after the addition of LMWHep. For the aggregation kinetic assays protein solutions were pre-equilibrated before LMWHeparin addition, and light scattering illuminating and collecting at 320 nm was monitored as a function of time. For anisotropy measurements, samples were excited at 280 nm and the emission was observed through W7-54 and WG335 filters. The results are the mean of three experiments.

Far-UV Circular Dichroism - Circular dichroism (CD) spectra of rPrP 23–231 were recorded in a Jasco J-715 spectropolarimeter (Jasco Corporation, Tokyo, Japan) with 0.01 and 0.02 mm circular path-length cells at 25 °C. All spectra were subtracted from the respective buffer and heparin spectra, four accumulations were collected and each experiment was repeated three times.

NMR Experiments - NMR spectra were collected at 298 K with a Bruker Avance 800 MHz spectrometer equipped with gradient triple resonance probes, with 0.2 mM uniformly labeled [¹⁵N]rPrP23-231 in 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) or 20mM sodium acetate buffer (pH5.5), 100 mM NaCl, and a 10% D₂O/ 90% H₂O mixture in the presence (at 1:1 molar ratio) or absence of LMWHeparin. The spectra were processed using TOPSPIN 2.1 (Bruker) and analyzed with CARA 1.8 (40). The assignment of N and C-terminal amino acids was based on data from the BMR4402. 2D [¹⁵N,¹H]-HSQCs were collected with 2048 × 200 points and 8–64 scans for the different samples.

RESULTS

Figure 1: Glycosaminoglycans, such as heparan sulfate, have been pointed as cellular receptors for infectious prions (23, 24), and direct interaction between PrP and sulfated glycans has been documented (30, 31, 35, 41). Heparin, an analog of HS, was shown to bind bovine prion protein at acid pHs (30, 35). In order to investigate the binding of LMWHeparin to murine prion protein, we conducted anisotropy measurements of rPrP 23-231 with increasing concentrations of LMWHeparin at two different pHs, pH 7.4 (Fig. 1, empty circles) and pH 5.5 (Fig. 1, filled circles). We can observe an increase in the LMWHeparin:PrP ratio at acid pH.

Figure 2: We investigated whether heparin would induce structural changes on the prion protein, leading to a scrapie-like conformation or to a conformational intermediate of the conversion process, through circular dichroism (CD) measurements of the complex. The murine rPrP 23-231 exhibited typical α -helical far-UV CD spectra, with minima at 222 nm and 208 nm (Figure 2A, inset). We also observed that increasing the heparin concentration led to a decrease in ellipticity at 222nm at pH 5.5 and pH 7.4 (Figure 2A), indicating loss of alpha-helical secondary structure content upon Hep binding. The increase in LMWheparin concentration was followed by an increase in light scattering values for both pHs, suggesting the formation of oligomers. This oligomerization was higher at pH 5.5 (Figure 2B, solid line).

Figure 3: To further analyze the kinetic of prion aggregation induced by LMWheparin, equimolar concentrations of heparin were added to a solution of pre-equilibrated rPrP 23-231 at pH 5.5 or pH 7.4. LMWHeparin addition caused an immediate increase in light scattering,

leading to values corresponding to the formation of large aggregates, mostly at pH 5.5. This effect is subsequently followed by a decrease in LS intensity, suggesting a disaggregation process that after six to eight hours returns almost completely to the initial values (Figure 3A). We could also observe this effect using far-UV CD spectroscopy. Just after dilution of LMWheparin in the buffer we saw a decrease in ellipticity values at both pHs (Figure 3B, inset). Moreover, 20 hours later the secondary structure content of rPrP returned to values close to the native protein without Hep addition at pH 7.4 but not at pH 5.5 (Figure 3B). This difference could result from part of the protein content that remained aggregated or by a different effect on protein structure when the complex is formed at pH 5.5.

Figure 4: NMR analyses of rPrP^C at pH 4.5 and 5.5 revealed that the N-terminus is highly flexible and unstructured; in contrast, the C-terminal region has a well-structured globular domain, rich in α -helix (3, 5). We recorded ¹H-¹⁵N heteronuclear single quantum coherence (HSQC) spectra of rPrP23-231 in the presence (red) or absence (black) of LMWheparin at pH 5.5 and pH 7.4 (Figure 4). [¹⁵N,¹H]-HSQC spectra contain one crosspeak for each amide group in the molecule (except those involving prolines). According to the rPrP23-231 sequence, 288 HN cross peaks are expected in the two dimensional [¹⁵N,¹H]-HSQC. We found around 260 cross peaks with good resolution on free protein samples. LMWheparin was added, and after the sample reached equilibrium (20 hours later), [¹⁵N,¹H]-HSQC spectra of the soluble complex were recorded. Comparing the spectra we found the superposition of many chemical shifts on both pHs, indicating that LMWheparin causes no dramatic changes on protein folding, after disaggregation. However, there were still significant chemical shift differences between the free and complex spectra on amino acids from the N-terminal (orange arrow head) and C-terminal

(green arrow heads) domains. Furthermore, the area within 7.6- 8.4 ppm of ¹H and 124-129 ppm of ¹⁵N chemical shift has many additional cross peaks. This ¹H spectral range is populated by many amide cross peaks of unfolded polypeptide backbone (Figure 4A and B). The effect of heparin on rPrP structure was the same at both pHs (Figure 4), showing that the result observed by CD spectroscopy (Figure 3B) was due to differences on protein solubility; unlike we can point different changes on some chemical shifts between pHs.

Figure 5: The PrP N terminus is important to PrP^C function and pathogenesis (42-44) as well as rPrP aggregation (45). Many evidences have pointed the N-terminal region of PrP, mainly the octapeptide repeat, as the binding site for GAGs (30, 37, 46, 47). On the other hand other investigators have reported, using PrP fragments or synthetic peptides, interaction with other sites of the protein including C-terminal regions (36, 48). With this in mind, we investigated through anisotropy measurements the interaction of LMWheparin with rPrPΔ51-90, a murine PrP mutant lacking the octapeptide region. Increasing concentrations of heparin led to no significant changes on rPrP Δ 51-90 anisotropy at pH 7.4, showing the importance of this region for heparin-protein interaction at basic pHs. In contrast, the interaction was observed at pH 5.5 even for the mutant lacking this domain, suggesting the existence of another heparin binding site on the prion sequence. Furthermore, we observed this interaction monitoring the increase in light scattering induced by heparin on rPrPA51-90 and rPrPA32-121. There were no changes in intensity when the incubation was performed at pH 7.4, confirming the octapeptide repeat as the unique binding site at this pH value (Figure 5B). We observed oligomerization of both mutants at pH 5.5 when the concentration of LMWheparin was increased, confirming the interaction. The oligomerization of rPrP Δ 51-90 (Fig 5B, circles) was higher in relation to the effect on rPrP Δ 32121 (Fig. 5B, squares), suggesting the existence of at least three sites of interaction for heparin at acid pHs, two in the N-terminal region and one in the C terminus.

Figure 6: Besides the presence of binding motifs through the protein sequence, for a suitable PrP:GAG interaction there must be specific features on the polysaccharide structure. Sulfated glycans are known to reduce PrP^{Sc} formation in cultured cells (33, 34), therefore investigations about specific structural domains are very important for the rational development of anti-prion drugs. A series of heparan mimicking molecules have been developed and showed to inhibit endocytosis of prion protein (49). The size and sulfation degree of this compounds were found to be important for their efficacy (50). Heparin is composed by disaccharide repeats of hexuronic acid (α -L-iduronic acid or β -D-glucuronic acid) linked 1,4 to α -D-glucosamine with variable substitutions of O-sulfate, N-sulfate and N-acetyl groups. Warner et al. (36) using competition assays suggested that 2-O-sulfates of heparin have important role for recognition with GST::human PrP. Here we used three different modified heparins, and monitored binding through fluorescence anisotropy in order to investigate the importance of the selected substitutions. Our results revealed that N-acetylated heparin (-4)- α -L-IdoA2(OSO3-)-(1 \rightarrow 4)- α -D-GlcNAc-,6(OSO3-)-1-) was able to bind rPrP23-231 in the same proportion of unmodified LMWHeparin. However, N-acetylated de-O-sulfated heparin (-4)- α -L-IdoA-(1 \rightarrow 4)- α -D-GlcNAc-,6(OSO3-)-1-) and Acharan sulfate (a naturally occurring heparin-like molecule formed by $(-4)-\alpha$ -L-IdoA2(OSO3-)- $(1\rightarrow 4)$ - α -D-GlcNAc-1- disaccharides) showed no interaction (Figure 6) at the concentration range investigated. This result indicates that not only 2-O-sulfates but also 6-O-sulfates are important groups for prion protein:heparin interaction.

DISCUSSION

Changes in conformation of PrP^{C} from an α -helix-rich protein to a predominantly β -sheet form (PrP^{Sc}), and subsequent aggregation are the main causes of TSEs (6, 7). PrP^{Sc} propagates itself through an autocatalytic process, where PrP^{C} is induced by PrP^{Sc} to acquire the scrapie conformation; *in vitro*, however, this simple conversion reaction is not efficient (51). For this reason, the accumulation of prions is believed to involve participation of various cellular cofactors including glycosaminoglycans. The main GAG involved in pathogenesis is the membrane bound heparan sulfate (23, 24, 52).

Heparin has a structure that resembles the sequences found in HS, is largely used therapeutically, and is readily available in good quantities, being a useful model for HS interactions. Heparin was shown to interact with some prion constructs and to induce the formation of oligomeric complexes at acid pHs (30, 35). In this work we investigated the interaction of recombinant murine prion protein (rPrP23-231) with LMWheparin, and the structural features implicit in this interaction. The conversion of prion protein is believed to occur on the cell surface or in endocytic vesicles (10-12), and the interaction of heparan sulfate proteoglycan with PrP^C showed to be important in trafficking between cellular compartments (24, 47, 53). We have therefore chosen to make all experiments at pH 5.5 and pH 7.4, which mimic lysosomal and cellular fluid pHs, respectively. This result also indicates the presence of different sites of interaction accessible at acid pHs, that are not found at neutral pH.

The "protein-only" hypothesis is the more acceptable theory for conversion of prion protein. On the other hand, crude brain homogenates and polyanions (including heparan sulfate) have been shown to generate more efficient conversion than only purified prion proteins (21, 54, 55). These works suggest that other molecules could promote important changes on protein structure inducing or facilitating conversion. Wong et al (31). and Andrievskaia et al. (35) suggested that sulfated polysaccharides, heparin and pentosan polysulfate respectively, could induced structural changes in bovine recombinant prion protein, decreasing α -helix content, monitored by far-UV CD spectroscopy. CD instruments measure the difference in absorbance between circularly polarized components of light. Protein aggregates cause artifacts due to differential light scattering and absorption flattening in such aggregates. These factors distort the magnitude of CD spectrum and decrease the signal/noise ratio (56). We observed decrease in protein CD ellipticity with increasing concentrations of heparin (Figure 2A). This result could also suggest a decrease in α -helix content, but changes in light scattering (Figure 2B) indicate that the structural information is been hidden by protein aggregation, even without protein precipitation.

Protein-water interactions are important for folding stability. PrP^C has a large solvent accessible area and regions in fast exchange with bulk water (57, 58). In this work we show that heparin can induce protein oligomerization/aggregation, but this is a transient effect (Figures 2 and 3). Binding of heparin would induce local conformational changes decreasing solvent accessibility, also revealed by spectral shift of the intrinsic trytophan fluorescence at nonpolar environments (data not shown), favoring transient contacts between polypeptide chains. Flexible protein regions must mediate these intermolecular interactions. This phenomenon is followed by a sequential stabilization process, a period with varied folding behavior, where amino acid residues show different chemical shift over time (data not shown), until equilibrium is reached. In this case, soluble proteins with an overall tertiary structure very similar to the free protein

populate the equilibrium (Figure 3 and 4). Aggregated (t=0) and soluble protein (t=o/n) showed no toxic effect to cultured N2a cells (data not shown).

Although most of the differences in HSQC chemical shifts between free and heparinbound rPrP23-231 samples were small, showing that the overall secondary structure was maintained, we can observe significant changes in some areas of the protein (Figure 4). We could observe additional cross peaks in a spectral range populated by cross peaks from the unfolded region of the protein, suggesting that this region is acquiring a more ordered (or rigid_) structure upon heparin binding. We also observed differences of chemical shift on N and C terminus residues, showing that heparin binding affects the whole protein structure.

Human rPrP with additional octapeptide repeat insertions (unit with the consensus sequence PHGGGWGQ) has a more exposed N terminus and binds strongly to GAGs (37). Other authors have pointed this and other regions, using rPrP fragments or synthetic peptides to be the main GAG-binding components (30, 36), but whether the behavior of these peptides is representative for the full-length protein is not known. In this work we used rPrP mutant lacking sequences 51-90, concerning the octapeptide repeat (Figure 5A). Heparin does not interact with rPrP Δ 51-90 at pH 7.4, showing that this region contains the only site of interaction at neutral pH (such as when the protein is attached to the cell membrane). It agrees with the observation made by Shyng et al. (47) reporting that the region between residues 25 and 91 of PrP (incorporating the octapeptide repeat region) is sufficient for PrP binding to HSPG moieties on N2a cells; but contradicts Gonzales-Iglesias et al. (30) that observed interaction with BoPrP(63-94) only at acid pH. Histidine is the only amino acid whose side chain can serve either as an acid or as a base in the physiological pH range (59) and could account for interaction.

In order to investigate the presence of additional sites of interaction at acid pHs, we utilized other rPrP mutant lacking most of the protein N terminus (rPrP Δ 32-121) (Figure 5B). We found that heparin is able to induce oligomerization of this mutant at pH 5.5, and this effect was less pronounced when compared to rPrP Δ 51-90. This result indicates the presence of at least three sites of interaction, as proposed by Warner et al (36). The conformational properties of prion protein is known to be modulated by pH (60, 61). Changes that would expose the N terminus and normally hidden motifs could justify these new binding sites and enrichment in heparin content (Figure 1) at acid pH. Another possibility is the protonation of His155 and His187 at pH 5.5 (61, 62), but there are many other proposed interaction regions (36, 41, 48). Here we point to the importance of pH when investigating and comparing the interaction sites.

Anionic polysaccharides must provide a spatially defined pattern of sulfate and carboxylate substituents for molecular recognition and consequent biological activities. The uronic acid residues of Heparin/HS can be 2-O-sulfated or unsubstituted and glucosamine can be 6-O-sulfated, N-acetylated, unsubstituted or N-sulfated. Warner et al. (36) demonstrated the importance of 2-O-sulfation in competition assays, despite charge density. Here we showed that the existence of 2-O-sulfate and 6-O-sulfate groups is necessary for prion:heparin interaction (Figure 6). This result indicates that this interaction is not exclusively ionic in nature. This site-specific interaction must resemble that found for histamine (63) where imidazolium ring bind at a cleft defined by IdoA- $(1\rightarrow 4)$ - α -D-GlcN- $(1\rightarrow 4)$ IdoA triad.

Sulfated polysaccharides present a paradoxical effect because they can prevent (49, 50, 64-66) or stimulate (21, 23, 31, 52) PrP^{Sc} formation. One explanation for the anti-prion effects of free GAGs is the competition for binding to PrP with cellular GAGs. But free GAGs would stimulate cell-free conversion (31). In this work we show that heparin is able to bind prion

protein and induce aggregation, but this is a transient effect that generates little modification on protein structure, with a folding that resembles the normal conformation (justifying no conversion stimulation by anti-prion compounds). These changes on protein structure must be important, but would be not sufficient to alone induce disease. It may need other molecules like the scrapie agent, other proteins or a nucleic acid to trigger the conversion.

Cellular GAGs most frequently as proteoglycan side-chains are immobilized to cell membrane either as PrP^{C} . Aggregation induced by GAG on the cell membrane environment would be a sporadic event, given the spatial restriction, the degree and transience of the effect observed at pH 7.4 and influence of ions. HS proteoglycans may be important for infectivity by concentrating PrP^{C} for conversion.
Reference List

- 1. Knight, R. S. & Will, R. G. (2004) J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 75 Suppl 1, i36-i42.
- 2. Stahl, N., Borchelt, D. R., Hsiao, K., & Prusiner, S. B. (1987) Cell 51, 229-240.
- Donne, D. G., Viles, J. H., Groth, D., Mehlhorn, I., James, T. L., Cohen, F. E., Prusiner, S. B., Wright, P. E., & Dyson, H. J. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 13452-13457.
- 4. Liu, H., Farr-Jones, S., Ulyanov, N. B., Llinas, M., Marqusee, S., Groth, D., Cohen, F. E., Prusiner, S. B., & James, T. L. (1999) *Biochemistry* **38**, 5362-5377.
- Zahn, R., Liu, A., Luhrs, T., Riek, R., von Schroetter, C., Lopez, G. F., Billeter, M., Calzolai, L., Wider, G., & Wuthrich, K. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 145-150.
- Caughey, B. W., Dong, A., Bhat, K. S., Ernst, D., Hayes, S. F., & Caughey, W. S. (1991) Biochemistry 30, 7672-7680.
- Pan, K. M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R. J., Cohen, F. E. *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 10962-10966.
- 8. Prusiner, S. B. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 95, 13363-13383.
- 9. Cohen, F. E. & Prusiner, S. B. (1998) Annu. Rev. Biochem. 67, 793-819.
- 10. Borchelt, D. R., Taraboulos, A., & Prusiner, S. B. (1992) J. Biol. Chem. 267, 16188-16199.
- 11. Caughey, B. & Raymond, G. J. (1991) J. Biol. Chem. 266, 18217-18223.
- 12. Caughey, B., Raymond, G. J., Ernst, D., & Race, R. E. (1991) J. Virol. 65, 6597-6603.
- 13. Cohen, F. E. (1999) J. Mol. Biol. 293, 313-320.
- 14. Harrison, P. M., Chan, H. S., Prusiner, S. B., & Cohen, F. E. (1999) *J. Mol. Biol.* **286**, 593-606.
- 15. Telling, G. C., Scott, M., Mastrianni, J., Gabizon, R., Torchia, M., Cohen, F. E., DeArmond, S. J., & Prusiner, S. B. (1995) *Cell* 83, 79-90.
- 16. Caughey, B. & Baron, G. S. (2006) Nature 443, 803-810.
- 17. Vana, K. & Weiss, S. (2006) J. Mol. Biol. 358, 57-66.
- 18. Gauczynski, S., Peyrin, J. M., Haik, S., Leucht, C., Hundt, C., Rieger, R., Krasemann, S., Deslys, J. P., Dormont, D., Lasmezas, C. I. *et al.* (2001) *EMBO J.* **20**, 5863-5875.

- 19. Cordeiro, Y., Machado, F., Juliano, L., Juliano, M. A., Brentani, R. R., Foguel, D., & Silva, J. L. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 49400-49409.
- 20. Cordeiro, Y. & Silva, J. L. (2005) Protein Pept. Lett. 12, 251-255.
- Deleault, N. R., Geoghegan, J. C., Nishina, K., Kascsak, R., Williamson, R. A., & Supattapone, S. (2005) J. Biol. Chem. 280, 26873-26879.
- 22. Gomes, M. P., Millen, T. A., Ferreira, P. S., NL, E. S., Vieira, T. C., Almeida, M. S., Silva, J. L., & Cordeiro, Y. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 19616-19625.
- 23. Horonchik, L., Tzaban, S., Ben Zaken, O., Yedidia, Y., Rouvinski, A., Papy-Garcia, D., Barritault, D., Vlodavsky, I., & Taraboulos, A. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 17062-17067.
- 24. Ben Zaken, O., Tzaban, S., Tal, Y., Horonchik, L., Esko, J. D., Vlodavsky, I., & Taraboulos, A. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 40041-40049.
- 25. Sasisekharan, R., Raman, R., & Prabhakar, V. (2006) Annu. Rev. Biomed. Eng 8, 181-231.
- Scholefield, Z., Yates, E. A., Wayne, G., Amour, A., McDowell, W., & Turnbull, J. E. (2003) J. Cell Biol. 163, 97-107.
- 27. Schubert, D., Schroeder, R., LaCorbiere, M., Saitoh, T., & Cole, G. (1988) *Science* 241, 223-226.
- 28. Lindahl, B. & Lindahl, U. (1997) J. Biol. Chem. 272, 26091-26094.
- 29. Ancsin, J. B. (2003) Amyloid. 10, 67-79.
- Gonzalez-Iglesias, R., Pajares, M. A., Ocal, C., Espinosa, J. C., Oesch, B., & Gasset, M. (2002) J. Mol. Biol. 319, 527-540.
- Wong, C., Xiong, L. W., Horiuchi, M., Raymond, L., Wehrly, K., Chesebro, B., & Caughey, B. (2001) *EMBO J.* 20, 377-386.
- Snow, A. D., Wight, T. N., Nochlin, D., Koike, Y., Kimata, K., DeArmond, S. J., & Prusiner, S. B. (1990) *Lab Invest* 63, 601-611.
- 33. Priola, S. A. & Caughey, B. (1994) Mol. Neurobiol. 8, 113-120.
- 34. Caughey, B., Brown, K., Raymond, G. J., Katzenstein, G. E., & Thresher, W. (1994) J. *Virol.* 68, 2135-2141.
- 35. Andrievskaia, O., Potetinova, Z., Balachandran, A., & Nielsen, K. (2007) Arch. Biochem. Biophys. 460, 10-16.
- 36. Warner, R. G., Hundt, C., Weiss, S., & Turnbull, J. E. (2002) J. Biol. Chem. 277, 18421-18430.

- Yin, S., Yu, S., Li, C., Wong, P., Chang, B., Xiao, F., Kang, S. C., Yan, H., Xiao, G., Grassi, J. et al. (2006) J. Biol. Chem. 281, 10698-10705.
- Vieira, T. C., Costa-Filho, A., Salgado, N. C., Allodi, S., Valente, A. P., Nasciutti, L. E., & Silva, L. C. (2004) *Eur. J. Biochem.* 271, 845-854.
- 39. Zahn, R., von Schroetter, C., & Wuthrich, K. (1997) FEBS Lett. 417, 400-404.
- 40. Keller, R. (2005) (Swiss Federal Institute of Technology, Zurich.
- 41. Yin, S., Pham, N., Yu, S., Li, C., Wong, P., Chang, B., Kang, S. C., Biasini, E., Tien, P., Harris, D. A. *et al.* (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **104**, 7546-7551.
- 42. Zanusso, G., Farinazzo, A., Prelli, F., Fiorini, M., Gelati, M., Ferrari, S., Righetti, P. G., Rizzuto, N., Frangione, B., & Monaco, S. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 38936-38942.
- 43. Lawson, V. A., Priola, S. A., Wehrly, K., & Chesebro, B. (2001) J. Biol. Chem. 276, 35265-35271.
- 44. Lawson, V. A., Priola, S. A., Meade-White, K., Lawson, M., & Chesebro, B. (2004) J. *Biol. Chem.* **279**, 13689-13695.
- 45. Frankenfield, K. N., Powers, E. T., & Kelly, J. W. (2005) Protein Sci. 14, 2154-2166.
- 46. Chen, S. G., Teplow, D. B., Parchi, P., Teller, J. K., Gambetti, P., & Autilio-Gambetti, L. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 19173-19180.
- 47. Shyng, S. L., Lehmann, S., Moulder, K. L., & Harris, D. A. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 30221-30229.
- 48. Cortijo-Arellano, M., Ponce, J., Durany, N., & Cladera, J. (2008) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **368**, 238-242.
- 49. Schonberger, O., Horonchik, L., Gabizon, R., Papy-Garcia, D., Barritault, D., & Taraboulos, A. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **312**, 473-479.
- Ouidja, M. O., Petit, E., Kerros, M. E., Ikeda, Y., Morin, C., Carpentier, G., Barritault, D., Brugere-Picoux, J., Deslys, J. P., Adjou, K. *et al.* (2007) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 363, 95-100.
- 51. Hill, A. F., Antoniou, M., & Collinge, J. (1999) J. Gen. Virol. 80 (Pt 1), 11-14.
- Hijazi, N., Kariv-Inbal, Z., Gasset, M., & Gabizon, R. (2005) J. Biol. Chem. 280, 17057-17061.
- 53. Cheng, F., Lindqvist, J., Haigh, C. L., Brown, D. R., & Mani, K. (2006) *J. Neurochem.* **98**, 1445-1457.
- 54. Lucassen, R., Nishina, K., & Supattapone, S. (2003) Biochemistry 42, 4127-4135.

- 55. Saborio, G. P., Permanne, B., & Soto, C. (2001) Nature 411, 810-813.
- 56. Kelly, S. M., Jess, T. J., & Price, N. C. (2005) Biochim. Biophys. Acta 1751, 119-139.
- 57. Cordeiro, Y., Kraineva, J., Ravindra, R., Lima, L. M., Gomes, M. P., Foguel, D., Winter, R., & Silva, J. L. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 32354-32359.
- 58. De Simone, A., Dodson, G. G., Verma, C. S., Zagari, A., & Fraternali, F. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**, 7535-7540.
- 59. Markley J.L. (1975) Acc. Chem. Res. 8, 70-80.
- 60. Swietnicki, W., Petersen, R., Gambetti, P., & Surewicz, W. K. (1997) J. Biol. Chem. 272, 27517-27520.
- 61. Calzolai, L. & Zahn, R. (2003) J. Biol. Chem. 278, 35592-35596.
- 62. Langella, E., Improta, R., Crescenzi, O., & Barone, V. (2006) Proteins 64, 167-177.
- 63. Chuang, W. L., Christ, M. D., Peng, J., & Rabenstein, D. L. (2000) *Biochemistry* **39**, 3542-3555.
- 64. Gabizon, R., Meiner, Z., Halimi, M., & Ben Sasson, S. A. (1993) *J. Cell Physiol* **157**, 319-325.
- 65. Ladogana, A., Casaccia, P., Ingrosso, L., Cibati, M., Salvatore, M., Xi, Y. G., Masullo, C., & Pocchiari, M. (1992) *J. Gen. Virol.* **73 (Pt 3)**, 661-665.
- 66. Caughey, B. & Raymond, G. J. (1993) J. Virol. 67, 643-650.

LEGENDS

Figure 1 – Binding of murine prion protein with LMWheparin at two different pHs. Addition of increasing concentrations of LMWHeparin to 2μ M of rPrP 23-231. Binding was monitored by tryptophan fluorescence anisotropy at 280nm.

Figure 2 – Effect of heparin on rPrP 23-231 secondary structure and light scattering. Circular dichroism (CD) raw ellipticity measured at 222 nm for rPrP 23-231 (A) and relative light scattering (B) in the presence of different concentrations of Heparin at pH 7.4 and pH 5.0. The figure inset shows CD spectrum of rPrP 23-231 () and rPrP 23-231 + Hep at 5μ M () at pH 7.4. CD spectra were recorded at 25° C, with 0.01 mm circular path-length cells.

Figure 3 – **Aggregation kinetics of rPrP (23-231) with heparin.** Light scattering values at 320 nm measured as a function of time (A). rPrP 23-231 and Heparin at 2.0 μ M. The arrow indicates the moment of heparin dilution in the buffer. CD spectrum of rPrP 23-231 in the presence of LMWHeparin (1:1) at pH 7.4 and pH 5.5 (B). rPrP 23-231 and Heparin at 30.0 μ M. Spectra were taken just after sample preparation (inset, t=0) and 20 hours later (t=o/n). CD spectra were recorded at 25° C, with 0.02 mm circular path-length cells.

Figure 4 - **Effect of heparin on prion structure depending on pH.** Superimposed ¹H-¹⁵N HSQC spectra of free rPrP23-231 (black) and heparin bound rPrP23-231 (red) showing differences in chemical shifts at pH 5.5 (A) and pH 7.4 (B).

Figure 5 - Interactio of heparin with rPrP Δ **51-90 and rPrP** Δ **32-121.** Addition of increasing concentrations of LMWHeparin to 2µM of rPrP Δ 51-90 or Δ 32-121 at pH 7.4 and pH 5.5. Binding was monitored by tryptophan fluorescence anisotropy of rPrP Δ 51-90 at 280nm (A) and relative light scattering of rPrP Δ 51-90 and Δ 32-121 (B) at 90° was measured illuminating the samples at 320 nm and scanning from 300 to 340 nm.

Figure 6 - Binding of rPrP 23-231 with modified heparins. Addition of increasing concentrations of different heparins to 2μ M of rPrP 23-231. The different heparins have a major

disaccharide unit as follow: LMWHeparin (-4)- α -L-IdoA2(OSO3-)-(1 \rightarrow 4)- α -D-GlcNSO3-,6(OSO3-)-1-), NAHeparin (-4)- α -L-IdoA2(OSO3-)-(1 \rightarrow 4)- α -D-GlcNAc-,6(OSO3-)-1-), NADOSHeparin (-4)- α -L-IdoA-(1 \rightarrow 4)- α -D-GlcNAc-,6(OSO3-)-1-), AS (-4)- α -L-IdoA2(OSO3-)-(1 \rightarrow 4)- α -D-GlcNAc-1-). Binding was monitored by tryptophan fluorescence anisotropy at 280nm. All experiments were performed in Tris buffer at 50 mM, NaCl 100mM, pH 7.4.







Figure 3







CURRICULUM VITAE

Nome: Tuane Cristine Ramos Gonçalves VieiraNascimento: 14/09/1982Naturalidade: Rio de Janeiro

Formação Acadêmica

-Ciências Biológicas pela Universidade federal do Rio de Janeiro, março de 2000 a fevereiro de 2004.

-Mestrado em Química Biológica no Instituto de Bioquímica Médica – Universidade Federal do Rio de Janeiro, março de 2004 a setembro de 2005.

Orientação de Estudante

- 1. Luciana Ferreira Dimas iniciação científica de agosto/2003 a outubro/2005.
- 2. Diogo Medeiros iniciação científica júnior de março/2004 a novembro/2004.
- 3. Vinicius Coutinho iniciação científica, Programa Jovens Talentosos de janeiro/2007 a janeiro/2008.
- 4. Camila Isabela Bessa iniciação científica em andamento.

Co-orientação de Monografia

1. "Isolamento, caracterização parcial e avaliação do potencial anticoagulante de polissacarídeos sulfatados obtidos do corpo de quatro espécies de minhocas: *Eisenia foetida, Eudrilus eugenae, Pontoscolex corethrurus e Amyntas awayanus*" Luciana Ferreira Dimas, monografia apresentada no curso de Ciências Biológicas - Modalidade Médica na Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro.

Comunicação em Congresso

-23 comunicações em congressos nacionais

-6 comunicação em congresso internacional

Publicações

-Vieira, T.C.R.G., Costa-Filho, A., Salgado, N. C., Allodi, S., Nasciutti, L.E., Valente, A.P. and Silva, L.C.F.: "Acharan sulfate, the new glycosaminoglycan from *Achatina fulica* (Bowdich,1822): structural heterogeneity, metabolic labeling and localization in the body, mucus and the organic shell matrix." *European Journal of Biochemistry, Inglaterra, v. 271, p. 845-854, 2004.*

-Gomes, M. P. B., Millen, T. A., Ferreira, P. S., e Silva, N. L. C., VIEIRA, T. C. R. G., Almeida, M. S., Silva, J. L., Cordeiro, Y.: "Prion Protein Complexed to N2a Cellular RNAs through Its N-terminal Domain Forms Aggregates and Is Toxic to Murine Neuroblastoma Cells." *The Journal of Biological Chemistry.*, v.283, p.19616 - 19625, 2008.

-Silva, J. L., Vieira, T. C. R. G., Gomes, M. P. B., Ano Bom, A. P., Freitas, M. S., Ishimaru, D., Y, C., Foguel, D.: "Ligand Binding and Hydration in Protein Misfolding: Insights from Studies of Prion and p53 Tumor Suppressor Proteins." *Accounts of Chemical Research., aceito, 2009.*

-Silva, J. L., Gomes, M. P. B., Vieira, T. C. R. G., Y, C.: "PrP interactions with nucleic acids and glycosaminoglycans in function and disease." *Frontiers in Bioscience.aceito*,2009.

Livros Grátis

(<u>http://www.livrosgratis.com.br</u>)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração Baixar livros de Agronomia Baixar livros de Arquitetura Baixar livros de Artes Baixar livros de Astronomia Baixar livros de Biologia Geral Baixar livros de Ciência da Computação Baixar livros de Ciência da Informação Baixar livros de Ciência Política Baixar livros de Ciências da Saúde Baixar livros de Comunicação Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE Baixar livros de Defesa civil Baixar livros de Direito Baixar livros de Direitos humanos Baixar livros de Economia Baixar livros de Economia Doméstica Baixar livros de Educação Baixar livros de Educação - Trânsito Baixar livros de Educação Física Baixar livros de Engenharia Aeroespacial Baixar livros de Farmácia Baixar livros de Filosofia Baixar livros de Física Baixar livros de Geociências Baixar livros de Geografia Baixar livros de História Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura Baixar livros de Literatura de Cordel Baixar livros de Literatura Infantil Baixar livros de Matemática Baixar livros de Medicina Baixar livros de Medicina Veterinária Baixar livros de Meio Ambiente Baixar livros de Meteorologia Baixar Monografias e TCC Baixar livros Multidisciplinar Baixar livros de Música Baixar livros de Psicologia Baixar livros de Química Baixar livros de Saúde Coletiva Baixar livros de Servico Social Baixar livros de Sociologia Baixar livros de Teologia Baixar livros de Trabalho Baixar livros de Turismo