



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

**ÍONS DIVALENTES E DNA: EFEITOS NA AGREGAÇÃO E NA ESTRUTURA DA
PROTEÍNA DO PRION (PrP) E DE DOMÍNIOS ISOLADOS DA PrP**

JULIANA ALVIM PAIXÃO CHAVES

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Mestrado em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Yraima Moura Lopes Cordeiro

Rio de Janeiro

2011

**ÍONS DIVALENTES E DNA: EFEITOS NA AGREGAÇÃO E NA ESTRUTURA DA
PROTEÍNA DO PRION (PrP) E DE DOMÍNIOS ISOLADOS DA PrP**

JULIANA ALVIM PAIXÃO CHAVES

Orientadora: YRAIMA MOURA LOPES CORDEIRO

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre.

Rio de Janeiro

2011

FICHA CATALOGRÁFICA

S237 Chaves, Juliana Alvim Paixão
Íons divalentes e DNA: Efeitos na Agregação e na Estrutura da
Proteína do Prion (PrP) e de Domínios Isolados da PrP / Juliana Alvim
Paixão Chaves. Rio de Janeiro, 2011.
xv, 107 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) –
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa de Pós-graduação
em Ciências Farmacêuticas, 2011.

Orientadora: Yraima Moura Lopes Cordeiro

1. Prion. 2. Cobre. 3. DNA.

I. Cordeiro, Yraima Moura Lopes (Orient.). II.

Universidade Federal do Rio de Janeiro. Programa de Pós-graduação em
Ciências Farmacêuticas. III. Título.

CDD: 658.4

ÍONS DIVALENTES E DNA: EFEITOS NA AGREGAÇÃO E NA ESTRUTURA DA PROTEÍNA DO PRION (PrP) E DE DOMÍNIOS ISOLADOS DA PrP

JULIANA ALVIM PAIXÃO CHAVES

Orientadora: YRAIMA MOURA LOPES CORDEIRO

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre.

Aprovada por:

Prof. Dr. Luís Maurício Trambaioli da Rocha e Lima, Faculdade de Farmácia, UFRJ

Prof. Dr. Cristian Follmer, Instituto de Química, UFRJ

Prof^a. Dr^a. Jennifer Lowe, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ

Prof^a. Dr^a. Yraima M. Lopes Cordeiro, Faculdade de Farmácia, UFRJ
(orientadora)

Prof^a. Dr^a. Ana Luisa Palhares de Miranda, Faculdade de Farmácia, UFRJ
(suplente interna)

Prof^a. Dr^a. Monica dos Santos Freitas, Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ
(suplente externa)

Rio de Janeiro

2011

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a **Deus** por sempre iluminar meu caminho com muita sorte e colocar pessoas tão boas no meu caminho.

Agradeço muito a minha mãe **Adailza** por seu amor tão intenso que muitas vezes a faz abdicar da própria vida. Obrigada pela confiança, pelo amor e até pela cobrança. Você sempre me ensinou a ser uma pessoa ética, leal e boa, não apenas com palavras, e sim, como um exemplo diário.

Agradeço as minhas tias pelo apoio de sempre, dedicação, carinho e amor. Obrigada pelos ensinamentos sobre como ser uma Alvim. Cada uma foi um pouco minha mãe também. A minha madrinha **Leila** por ser uma mãe na minha vida, por todas as vezes que me levou pra escola, pro curso, pra cima e pra baixo, por ser uma amiga sempre presente. A minha tia **Neném** por me ensinar a ser uma pessoa mais divertida e que confia e acredita que a vida pode ser o que queremos. A minha tia **Lilian** pela sua amizade, admiração e respeito.

A minha vó **Adahil**, pois é ela que me atura todos os dias. É ela que me ama, me mimar, me admira e me conhece mais que qualquer pessoa nesse mundo. Obrigada por também ser minha mãe e a mãe mais cuidadosa que eu poderia ter. Sempre escuto todos seus conselhos e aprendo com essa velha boba.

Obrigada ao meu pai **Carlos** que mesmo lá de longe sempre torce e me admira mais que qualquer coisa. Obrigada aos meus avós, tios e tias da família Chaves que mesmo com a distância, demonstram um amor enorme quando estão por perto.

Obrigada aos meus primos Alvim (**Luiz, João e Fabianna**) que são como irmãos. E obrigada aos meus irmãos distantes também e ao **Serginho** pela presença na minha vida.

Obrigada aos meus irmãos que escolhi pra vida. Especialmente a **Juliana Diniz** que foi a pessoa que me abriu as portas para essa jornada e a cada dia me mostra como ser uma pessoa melhor. A **Flavia** por estar sempre presente na minha vida e por me ouvir, ouvir, ouvir... Ao **Gustavo** por me obrigar a estudar, ao **Stephan** por também me fazer estudar e ser minha companhia na ida e na volta quase todos os dias durante

esses dois anos e ao **Elias** por me ajudar com tudo no laboratório sempre que precisei com isso e com aquilo. A Cris e Mariah pelos almoços divertidos e me acolherem sempre nos congressos no mesmo quarto. Foi muito divertido.

Aos meus outros amigos que sempre torcem por mim (**Fernandas, Natália, Vanessa, Elaine, Tilza, Vania, Melyssa, Andrea, Hood, David, Mariah, Cris, Cyro, Wanderson, Danielle, Any, Shana, Priscilla, Natasha, Patrícia, Pablo** e tantos outros). São muitos. Sim. E são bons também.

A professora **Helena** que me indicou ao laboratório da professora Yraima.

A minha orientadora **Yraima** que abriu as portas pra mim com tanto carinho e me ensinou como uma mãe tornando possível a realização de todo esse trabalho com uma incansável disposição em ajudar. Você é uma inspiração. Obrigada pela confiança e respeito.

Ao **Bruno** por todas as dicas, por tornar meus dias no laboratório muito divertidos e por esquecer o prion comigo. A **Thayna** por todo esforço em me ajudar nessa dissertação. A sua ajuda foi imprescindível e obrigada por andar comigo pelos laboratórios. A **Karen** pela amizade e pelos conselhos sobre o futuro. E ao **Ícaro** por me divertir com suas novas palavras. Agradeço do fundo do meu coração toda ajuda de todos do **LaBiME**.

Ao professor **Luis Maurício Trambaioli** e todos os membros do **Biotecfar** por serem como uma extensão do meu laboratório e pela convivência diária prazerosa e a disponibilização de todos os equipamentos do laboratório.

A professora **Carolina Braga** pela ajuda com as microscopias e suas ajuda na interpretação.

Ao professor **Ronaldo Mohana** e aos amigos do **Laboratório de Genômica Estrutural** pelo suporte com o dicróismo circular.

A todos do **LAPA** e **LTPV** pela ajuda com reagentes, liofilizador e centrifuga. Obrigada por me adotarem quase como uma aluna da bioquímica. Queria agradecer a **Luciana** pela ajuda com as células e a **Danielly** pela ajuda com western blot.

A todos dos laboratórios do bloco B subsolo, em especial, ao **Arídio** pela amizade e ajuda constante com o liofilizador. Aos componentes do **LabECoM** pela

companhia em congressos e a disponibilidade em ajudar sempre. Aos componentes do **LabOMol**, em especial a **Andreia** pela ajuda com western blot. Aos componentes do **LASSBio** pela constante ajuda.

Aos professores **Luís Maurício Trambaioli**, **Cristian Follmer** e **Jennifer Lowe** por aceitarem gentilmente participar da banca de defesa dessa dissertação.

A todos os funcionários e colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

A todos que me apoiaram, me ajudaram, incentivaram, que me ouviram e que de alguma forma contribuíram para a realização desse sonho.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

Índice de figuras	viii
Índice de tabelas	xi
Lista de siglas e abreviaturas	xii
Resumo	xiv
Abstract	xv
1. Introdução	1
1.1 Patogênese das doenças por prion	9
1.2 Proteína do prion – Papel Fisiológico	11
1.3 Proteína do prion e cobre	13
1.4 Interação da proteína do prion com ácidos nucleicos	20
1.5 Interação da proteína do prion com cobre e ácidos nucleicos	22
2. Objetivos	25
2.1 Geral	25
2.2 Específicos	25
3. Materiais e Métodos	26
4. Resultados e Discussão	34
4.1 Avaliação do efeito de Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} e DNA sobre o peptídeo $\text{PrP}^{109-149}$	34
4.2 Avaliação do efeito de Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} e Mg^{2+} e DNA em domínios octarepeats	60
4.3 Avaliação do efeito de Cu^{2+} e DNA na PrP^{WT}	67
5. Conclusões	88
6. Referências	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Características histopatológicas das doenças por prion.....	5
Figura 2: Esquema da estrutura primária da proteína humana do prion.....	7
Figura 3: Alinhamento das sequências primárias da PrP humana (gi:13879449) (linha superior) da PrP de camundongo (gi:119489920) (linha do meio) e da PrP de hamster sírio (gi:18490397) (linha inferior).....	8
Figura 4: Proteína do prion celular e scrapie.....	10
Figura 5: Diferentes modos de coordenação de Cu^{2+} ao domínio octarepeat, através de uma, duas ou três histidinas simultaneamente.....	19
Figura 6: Representação dos possíveis locais de interação da PrP^{C} com cobre e DNA..	23
Figura 7: Barreira energética para conversão da proteína do prion (PrP^{C}).....	24
Figura 8: Agregação do peptídeo $\text{PrP}^{109-149}$ em várias concentrações monitorada através de mudanças no espalhamento de luz.....	36
Figura 9: Cinética de agregação do peptídeo $\text{PrP}^{109-149}$ na presença de Cu^{2+} (em várias concentrações) em função do tempo.....	37
Figura 10: Extensão da inibição da agregação do peptídeo $\text{PrP}^{109-149}$ em função da concentração de CuCl_2	38
Figura 11: Cinética de agregação do peptídeo $\text{PrP}^{109-149}$ na presença de Cu^{2+} a $30 \mu\text{M}$ na presença de EDTA.....	39
Figura 12: EDTA inibe o efeito anti-agregante de Cu^{2+} sobre o $\text{PrP}^{109-149}$	40
Figura 13: Controles para comprovação do efeito do Cu^{2+} na inibição da agregação do peptídeo $\text{PrP}^{109-149}$	41
Figura 14: Estrutura cristalográfica do complexo Cu-HGGGW.....	43
Figura 15: Esquema para possíveis modos de coordenação a cobre pelo peptídeo Hu(84-114) em valores de $\text{pH} \leq 5,5$	44
Figura 16: Estrutura secundária do peptídeo $\text{PrP}^{109-149}$ na presença de concentrações crescentes de cobre.....	46
Figura 17: Efeito do Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} e Mg^{2+} na agregação do $\text{PrP}^{109-149}$ através da avaliação do espalhamento de luz.....	48
Figura 18: Análise da ligação a tioflavina T pelo peptídeo $\text{PrP}^{109-149}$	50

Figura 19: Resumo dos efeitos do íon Cu^{2+} na estrutura e na agregação do peptídeo PrP ¹⁰⁹⁻¹⁴⁹	52
Figura 20: Avaliação da agregação do peptídeo PrP ¹⁰⁹⁻¹⁴⁹ na presença de Cu^{2+} e DNA. 53	
Figura 21: Análise da morfologia dos agregados por microscopia de transmissão eletrônica.....	54
Figura 22: O efeito do Cu^{2+} e DNA na estrutura secundária do peptídeo PrP ¹⁰⁹⁻¹⁴⁹	55
Figura 23: Efeito do íon Cu^{2+} no espectro de DC do DNA.....	57
Figura 24: Avaliação de viabilidade celular por redução do MTT em células N2a.....	59
Figura 25: Supressão da fluorescência do triptofano dos peptídeos 3OR e 4OR mediada por Cu^{2+} em diferentes valores de pH.....	62
Figura 26: Efeito dos íons Zn^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+} na fluorescência do triptofano do peptídeo 4OR em pH 7,4, 6,5 e 5,0.....	64
Figura 27: Espectros de emissão de fluorescência do peptídeo 4OR na presença de Mg^{2+} (na forma de MgCl_2).....	65
Figura 28: Supressão da fluorescência do peptídeo 3OR (A) e 4OR (B) na presença de Cu^{2+} e DNA.....	66
Figura 29: Efeito do Cu^{2+} na agregação e na supressão da emissão de fluorescência da PrP ^{WT} (5 μM).....	68
Figura 30: Agregação da PrP ^{WT} na presença de Cu^{2+} e DNA avaliada por espalhamento de luz a 320 nm.....	70
Figura 31: Análise da morfologia dos agregados por microscopia de transmissão eletrônica.....	72
Figura 32: Efeito da presença de Cu^{2+} e DNA na estrutura secundária da PrP ^{WT}	74
Figura 33: Avaliação da estrutura secundária da PrP ^{WT} em diferentes condições.....	77
Figura 34: Inibição da PK promovida pelo íon Cu^{2+}	81
Figura 35: Ganho de resistência à digestão por proteinase K pela PrP ^{WT} na presença de Cu^{2+}	83
Figura 36: Resistência à digestão por proteinase K pela PrP ^{WT} na presença de DNA (E2DBS18 df).....	84
Figura 37: Resistência à digestão por proteinase K pela PrP ^{WT} na presença de DNA	

(E2DBS18 df).....85

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis.....	02
Tabela 2 - Peptídeos da PrP que serão avaliados neste projeto.....	27
Tabela 3 - Caracterização dos oligômeros formados por DLS.....	71
Tabela 4 - Diferentes componentes de estrutura secundária (%) da PrP ^{WT} em pH 6,0 obtido a partir dos dados de dicroísmo circular.....	75
Tabela 5 - Diferentes componentes de estrutura secundária (%) da PrP ^{WT} obtido a partir dos dados de Infravermelho.....	77

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATR - Refletância Total Atenuada

BCS - Ácido Batocuproíno Dissulfônico

CD - Dicroísmo Circular

CJD - Doença de Creutzfeldt-Jakob

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

EDTA - Ácido etilenodiaminotetraacético

EEB - Encefalopatia Espongiforme Bovina

EETs - Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis

EL - Espalhamento de Luz

ELD - Espalhamento de Luz Dinâmico

EPR - Ressonância Eletrônica Paramagnética

FTIR - Infravermelho por Transformada de Fourier

GAG - Glicosaminoglicanos

GPI - Glicosil Fosfatidil Inositol

GSS - Síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker

HEPES - N-2-Hidroxietilpiperazina-N'-2'-Etanossulfônico

IFF - Insônia Familiar Fatal

IPTG - Isopropil Tiogalactopiranosídeo

IR - Infravermelho

MES - Ácido 2-[N-morfolino] etanossulfônico

MET - Microscopia Eletrônica

mPrP - PrP Murina

PMSF - Fenil-metano(sulfonil)fluoreto

PrP - Prion

PrP^C - PrP Celular

PrP^{res} - PrP resistente a proteases

PrP^{Sc} - PrP Scrapie

PrP^{WT} - Proteína do prion nativa

RNA - Ácido ribonucleico

RP-HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa

SDS - Dodecil Sulfato de Sódio

ShaPrP - Proteína do Prion Recombinante Inteira de Hamster

RESUMO

A conversão da proteína do prion celular (PrP^C), com alto conteúdo de α -hélice, em uma estrutura com maior conteúdo de folhas- β , a PrP^{Sc}, é um passo crítico para o desenvolvimento das doenças por prion. Além dessa diferença estrutural, a PrP^{Sc} é pouco solúvel em solventes aquosos, sendo encontrada em agregados no SNC. A PrP tem 6 sítios de ligação a cobre, com isso, essa proteína pode estar envolvida no metabolismo de cobre no SNC. Quatro sítios estão localizados no domínio octarepeat e dois sítios estão fora do domínio octarepeat, a His-96 e a His-111. Nessa dissertação, nós investigamos o efeito do Cu²⁺ na agregação e na estrutura da proteína do prion recombinante inteira (PrP^{WT}) e de peptídeos derivados dessa proteína contendo um (PrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹), 3 ou 4 (domínios octarepeats) sítios de ligação a cobre através de técnicas espectroscópicas. Além disso, avaliamos também o efeito do DNA, um ligante da PrP previamente caracterizado, nesse sistema. Os resultados obtidos demonstram que o Cu²⁺ afeta diretamente a estrutura da PrP e dos peptídeos de maneira específica, uma vez que outros íons divalentes (Zn²⁺, Mn²⁺ e Mg²⁺) não apresentaram o mesmo efeito. Caracterizamos também, pela primeira vez, a alteração estrutural da PrP e dos peptídeos na presença de Cu²⁺ e DNA e nossos resultados mostraram que ambos ligantes tem capacidade de interação mesmo na presença do outro e que essa interação não parecer ser competitiva. Outro ponto relevante, no que tange a alteração estrutural dos modelos utilizados, foi que o DNA e Cu²⁺ geraram diferentes alterações estruturais. Além disso, temos fortes evidências de que em pH 5,0, o Cu²⁺ se liga ao peptídeo PrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹, devido aos seus efeitos na estrutura e agregação desse peptídeo. Nossos resultados também demonstraram um papel dual do Cu²⁺ na agregação: a inibição da agregação do PrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹ e o estímulo da agregação da PrP^{WT}; assim como o Cu²⁺, o DNA também apresentou o mesmo efeito, porém os agregados formados apresentaram morfologia e tamanhos diferentes e, na presença dos dois ligantes, nós podemos observar uma população mista. Outra diferença observada entre o Cu²⁺ e o DNA no efeito sobre a PrP^{WT} foi a formação de uma espécie com maior resistência a digestão por proteinase K (PK) pelo DNA. Podemos observar também que a interação entre o Cu²⁺ e o domínio octarepeat é dependente do pH, sendo o pH 6,5 que apresenta a melhor afinidade na faixa estudada e, em pH 5,0, a interação com o DNA promoveu maior alteração estrutural nesses domínios. Podemos concluir que a PrP pode interagir com diferentes ligantes sem prejuízo ao efeito de cada um na conversão estrutural e na agregação. Todos os resultados demonstram que o DNA pode ser uma molécula adjuvante para a conversão estrutural mesmo na presença de cobre que é um ligante fisiológico. Esses resultados nos fornecem novas perspectivas para o papel de Cu²⁺ e DNA na conversão estrutural e na agregação da PrP que são os eventos críticos que levam a neurodegeneração.

ABSTRACT

The conversion of cellular prion protein (PrP) with high content of α -helix structure to a structure with a higher content of β -sheets, the PrP^{Sc}, is a critical step for the development of prion diseases. Beyond this structural difference, PrP^{Sc} is more insoluble and is found in aggregates in the CNS. PrP has six copper binding sites, thus, this protein may be involved in copper metabolism in the CNS. Four sites are located in octarepeat domain and two sites are outside of the octarepeat domain, His-96 and His-111. In this dissertation, we investigate the effect of Cu²⁺ on the aggregation and in the structure of the recombinant native prion protein (PrP^{WT}) and peptides derived from this protein containing one (PrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹), 3 or 4 (octarepeats domains) binding sites through spectroscopic techniques. In addition, we also evaluate the effect of DNA, a previously characterized ligand of PrP in this system. These results show that Cu²⁺ directly affects the structure of PrP and of peptides and with specificity, since other divalent ions (Zn²⁺, Mn²⁺ and Mg²⁺) did not have the same effect. We also characterized for the first time, the structural change of PrP and peptides in the presence of Cu²⁺ and DNA and our results showed that both ligands have the capacity to interact even in the presence of the other and this interaction does not appear to be competitive. Another important point, regarding the structural change of the models used was that DNA and Cu²⁺ binding lead to different conformations. In addition, we have strong evidence that at pH 5.0, Cu²⁺ binds to the peptide PrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹, due to its effects on the structure and in the aggregation of this peptide. Our results also demonstrated a dual role of Cu²⁺ on aggregation: Cu²⁺ can inhibit the aggregation of PrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹ and stimulate the aggregation of PrP^{WT}; as well as Cu²⁺, DNA also generated the same effect, but the aggregates formed presented different morphology and sizes and in the presence of both ligands we observed a mixed population. Another difference observed between Cu²⁺ and DNA binding by PrP^{WT} was the formation of species with highest resistance to digestion by proteinase K (PK) by DNA. We also noted that the interaction between Cu²⁺ and octarepeat domains is dependent of pH, and pH 6.5 that has the best affinity in the range studied and at pH 5.0, the interaction with DNA promoted greater structural change in these domains. We conclude that PrP can interact with both copper and DNA at the same time resulting in structural changes and aggregation. All results show that a DNA molecule can be an adjuvant to structural conversion even in the presence of copper that is a physiological ligand of PrP. These results provide new insights into the role of Cu²⁺ and DNA in the structural conversion and aggregation of PrP, that are critical events leading to neurodegeneration.

1. INTRODUÇÃO

O prion é um agente infeccioso que causa um grupo de doenças neurodegenerativas, invariavelmente fatais, denominadas encefalopatias espongiformes transmissíveis (EETs). Este grupo de doenças foi denominado EET porque podem ser transmitidas para humanos e animais (Tabela 1) e, além disso, a neurodegeneração na forma de vacúolos é uma das características neuropatológicas mais marcantes destas doenças, podendo ocorrer também acúmulo de agregados amiloides (PRUSINER, 1998; AGUZZI & POLYMERIDOU, 2004; WEISSMANN, 2004).

As EETs são causadas por alterações na conformação da proteína prion celular (PrP^C) (PRUSINER, 1982), que, em condições normais, não é patogênica, em uma forma patogênica denominada PrP^{Sc} scrapie (PrP^{Sc}) (CAUGHEY & CHESEBRO, 2001). Essa transição estrutural vem acompanhada de profundas mudanças nas propriedades da PrP que serão discutidas mais a frente. Não existe atualmente diagnóstico conclusivo não invasivo e ainda não há terapia curativa e/ou sintomática para estas doenças (CASHMAN & CAUGHEY, 2004).

A descoberta do caráter infeccioso da proteína do prion e toda história em torno da identificação da natureza proteica do agente envolvido nas EETs foi tão importante e marcante para a ciência que levou à premiação de dois pesquisadores, D. Carleton Gajdusek (1976) e Stanley B. Prusiner (1997) que receberam o prêmio Nobel por pesquisas nessa área.

Tabela 1 – Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis.

<i>Doença</i>	<i>Hospedeiro</i>	<i>Ano*</i>	<i>Etiologia</i>	<i>Frequência</i>
<i>Esporádica</i>				
Doença de Creutzfeldt-Jakob	Humanos	1920	Conversão esporádica da PrP	85%
<i>Origem genética</i>				
Doença de Creutzfeldt-Jakob familiar	Humanos	1920	Mutações no gene da PrP	10 a 15%
Doença de Gerstmann-Sträussler-Scheinker	Humanos	1928	Mutações no gene da PrP	
Insônia Familiar Fatal	Humanos	1986	Mutações no gene da PrP	
<i>Adquirida</i>				
Doença de Creutzfeldt-Jakob iatrogênica	Humanos	1980	Infecção após a exposição iatrogênica a prions humanos a partir de contato médico com hormônios pituitários derivados de cadáveres humanos, extratos teciduais ou instrumentos neurocirúrgicos contaminados	<5% (maioria dos pacientes nos EUA, Reino Unido e Japão)
Kuru	Humanos	1957	Infecção através de rituais e antropofagia	Ocorreu em uma pequena área da Nova Guiné
Doença de Creutzfeldt-Jakob variável	Humanos	1995	Infecção provavelmente pela ingestão de carne bovina contaminada	Maioria no Reino Unido (~150), 6 na França e pacientes individuais em vários outros países
Encefalopatia Espongiforme Bovina	Bovinos	1986	Infecção através de ingestão de ração contendo restos de animais contaminados	-
Encefalopatia Espongiforme Felina	Felinos	1990	Infecção de origem desconhecida	

Tabela adaptada (WECHSELBERGER E COLS., 2002). *Se refere ao ano no qual a doença foi primeiramente identificada.

Aliás, o termo prion só foi cunhado em 1982 por Prusiner e deriva da expressão em inglês '*proteinaceous infectious particle*'. O conceito de prion, por definição, caracteriza uma partícula proteica infecciosa que não apresenta evidências de conter ácidos nucleicos, por ser resistente à inativação por radiação ultravioleta (ALPER E COLS., 1967; EKERT E COLS., 1970; GIBBS E COLS., 1978), mas sensível a agentes que modificam proteínas, como proteases, fenol e dodecilsulfato de sódio (PRUSINER, 1982).

A patogênese dessas doenças é complexa e estas apresentam diferentes etiologias podendo ser categorizadas em esporádicas, onde a alteração da PrP^C em PrP^{Sc} ocorre sem mutação genética e nenhuma fonte de transmissão é identificada; hereditária, que ocorre por mutações individuais no gene *PRNP* que codifica a PrP em humanos; e adquirida ou infecciosa que provém do contato com material contaminado com a PrP^{Sc} (PRUSINER, 1998) (Tabela 1).

As doenças por prions envolvem tanto o mau enovelamento proteico e também a transferência de informação envolvendo apenas proteínas, sem a presença de um ácido nucleico carreador de informação genética. Este segundo ponto é a base fundamental da hipótese *protein-only* (PRUSINER, 1998). As doenças por prions se caracterizam pela agregação e deposição de proteínas mal enoveladas no sistema nervoso central; este é um mecanismo comum a várias doenças neurodegenerativas que apresentam etiologia e progressão diferentes, como a doença de Alzheimer e a doença de Parkinson, que são doenças altamente prevalentes na população idosa (CHITI & DOBSON, 2006). Todas essas doenças são incuráveis e de causas não completamente elucidadas. O que torna as EETs únicas dentre as várias doenças neurodegenerativas causadas por alterações conformacionais 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 (CHANDLER E COLS., 1961; GAJDUSEK E COLS., 1968).

As EETs humanas incluem o kuru, a doença de Creutzfeldt-Jakob (DCJ), a Insônia Familiar Fatal (FFI) e a síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS). Em animais, temos principalmente o scrapie que acomete ovelhas, a encefalopatia espongiforme bovina (EEB) e a doença crônica devastante em cervídeos (WELLS E COLS., 1987). A DCJ pode ser esporádica (DCJs), familiar (DCJf) e adquirida através de fontes iatrogênicas (DCJi) ou pela ingestão de carne de vaca contaminada (DCJv). As manifestações clínicas das doenças por prion em humanos incluem geralmente demência, ataxia (distúrbios na locomoção), insônia, paraplegia, mioclonia (contração involuntária muscular) parestesia (alterações na sensibilidade) e comportamento alterado (WILL, 1999). Já as doenças em animais, como o scrapie e a EEB, são geralmente manifestadas como doenças que afetam a locomoção (doenças atáxicas) (WELLS E COLS., 1987). Em todas essas desordens observa-se degeneração espongiforme (micro-vacuolização) (Figura 1) e gliose astrocítica (crescimento anormal dos astrócitos) do sistema nervoso central, quando examinado ao microscópio óptico (ZLOTNIK & STAMP, 1961). Das doenças animais, apenas a EEB foi comprovadamente transmitida para humanos, resultando na DCJv (SEJVAR E COLS., 2008).

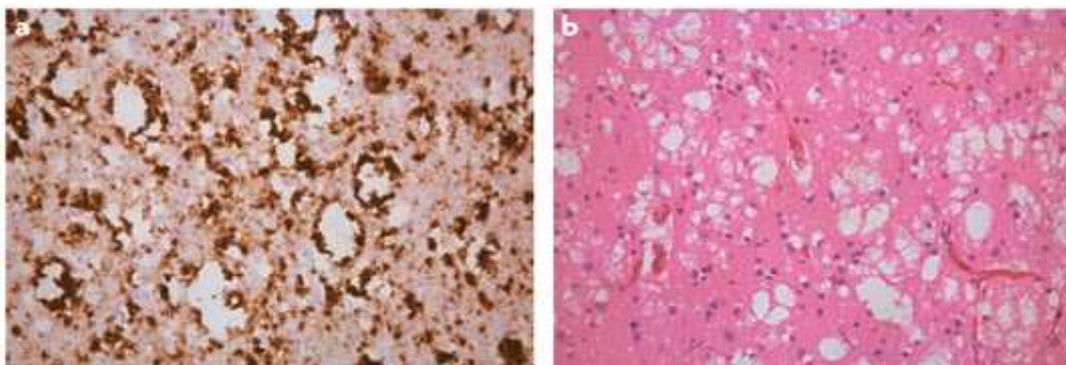


Figura 1: Características histopatológicas das doenças por prion. As doenças por prion são caracterizadas pelo acúmulo difuso de agregados insolúveis da proteína prion celular (PrP^{C}) enovelada na conformação anormal (PrP^{Sc}) no cérebro. (a) Análise imunohistológica do córtex cerebral de um paciente infectado com a doença de prion, marcado com anticorpo específico para a PrP. (b) Corte histológico da região cortical de cérebro humano corado por hematoxilina-eosina (HE) evidenciando a neurodegeneração em forma de vacúolos (espongiose), outra característica marcante desta patologia. (Retirado de (AGUZZI & O'CONNOR, 2010)).

Além disso, de acordo com a Organização Mundial de Saúde, entre os anos de 1996 e 2002, cerca de 200.000 casos de EEB foram registrados na Grã-Bretanha, levando a morte de centenas de rebanhos e grandes danos à economia europeia no final da década de 1980. A partir da descrição da doença de Creutzfeldt-Jakob variante (DCJv) em humanos, em 1995, mais de 200 casos já foram notificados na Inglaterra, França, Irlanda, Itália e EUA (OMS, site oficial: www.who.int).

A primeira doença por prion foi reportada em 1750 no Reino Unido por Johann George Leopoldt, que documentou scrapie em ovelhas. Na época se considerou que animais que apresentassem sintomas de coceira, perda de apetite e fraqueza, deveriam ser afastados dos outros animais, pois a doença era contagiosa. Creutzfeldt e Jakob em 1920-21 realizaram a primeira descrição da doença e estudos de transmissibilidade cérebro a cérebro em ovelhas foram realizados por Cuille e colaboradores em 1939 (CUILLE & CHELLE, 1939).

No início do século XX, foram relatados os primeiros casos da doença de Creutzfeldt-Jakob em humanos (CREUTZFELDT, 1920; JAKOB, 1921; revisto em AGUZZI & POLYMENIDOU, 2004). Em 1950, o kuru foi descrito em tribos da Papua Nova Guiné, sendo classificado como uma EET, após a observação de veterinários sobre a semelhança entre o scrapie e a doença. A incidência teve uma drástica queda após a suspensão dos rituais canibalísticos praticados por este grupo étnico. Independentemente da origem, todas as EETs (Tabela 1) foram atribuídas a um mesmo agente infeccioso relacionado a mudanças conformacionais em uma proteína constitutiva, conhecida como proteína do prion (PrP).

A proteína do prion na sua forma celular (PrP^C) é um constituinte normal da membrana de células de mamíferos, sendo expressa principalmente no sistema nervoso central, no tecido linfático e em junções neuromusculares. A PrP^C madura é formada por 209 resíduos de aminoácidos e se encontra ancorada à membrana celular por uma âncora de glicosil fosfatidil inositol (GPI) através de sua porção carbóxi-terminal. O domínio C-terminal apresenta uma estrutura globular rica em α -hélices, enquanto o domínio amino-terminal não apresenta estrutura definida (Figura 2). Esta proteína sofre glicosilação em dois resíduos de asparagina (Asp181 e 197 na PrP humana) e é encontrada nas formas não-glicosilada, mono-glicosilada ou di-glicosilada *in vivo* (STAHL E COLS., 1987; PRUSINER, 1998).

A PrP^C humana contém um peptídeo sinal (1-22), um domínio hidrofóbico altamente conservado (106-126), 3 α -hélices (compreendidas entre os resíduos: 144-154, 173-194 e 200-228), 2 folhas- β anti-paralelas (compreendida entre os resíduos: 128-131 e 161-164) (LIU E COLS., 1999) e uma sequência sinal para a âncora de GPI (231-

254). O domínio desenovelado inclui o domínio *octarepeat*, ou região octamérica, que contém de 4 a 5 repetições de uma sequência de oito resíduos de aminoácidos que liga cobre fisiologicamente (BROWN E COLS., 1997; VILES E COLS., 1999). Além deste domínio, os resíduos de histidina 96 e 111 também foram identificados como ligantes de Cu^{2+} fora da região octamérica (WALTER E COLS., 2009).

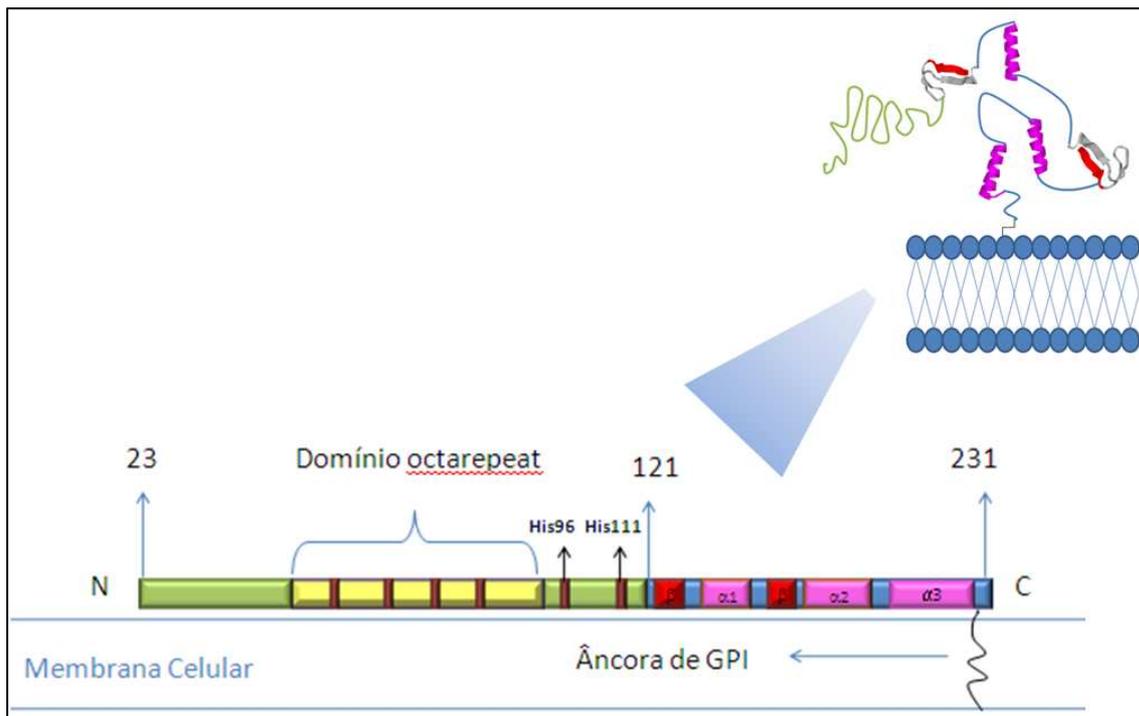


Figura 2: Esquema da estrutura primária da proteína humana do prion. A proteína madura do prion humano consiste dos resíduos 23 a 231. Representado em azul e rosa está o domínio C-terminal estruturado e, em verde e amarelo, o domínio N-terminal desestruturado. Em rosa, temos a representação das estruturas em α -hélice e, em vermelho, folhas- β . Está em destaque, em amarelo, o domínio octarepeat dos resíduos 51 a 91 e, em vinho estão representados os pontos de ligação com íons divalentes.

A estrutura e sequência de aminoácidos da PrP de mamíferos é muito conservada (SCHATZL E COLS., 1995; ZAHN E COLS., 2000), sendo as variações existentes entre as espécies relacionadas à barreira de espécies do prion (TELLING E COLS., 1995; BILLETTER E COLS., 1997; JAMES E COLS., 1997) e ao sistema imune (KORTH E COLS., 1997). A

comparação entre as sequências primárias da PrP humana, da PrP de hamster sírio e da PrP de camundongo estão demonstradas na figura 3.

```

MANLGYWLLALFVTMWTDVGLCKKRPKPGGWNTGGSRYPGQGSPPGGRYP
-----ALFVAMWTDVGLCKKRPKPGGWNTGGSRYPGQGSPPGGRYP
MANLGCWMLVLFVATWSDLGLCKKRPKPGGWNTGGSRYPGQGSPPGGRYP
      .***: *:*:*****

PQGQ-TWGQPHGGGWQPHGGSWGQPHGGSWGQPHGGGWQGGGTHNQWN
PQGGGTWGQPHGGGWQPHGGGWQPHGGGWQPHGGGWQGGGTHNQWN
PQGGGGWGQPHGGGWQPHGGGWQPHGGGWQPHGGGWQGGGTHSQWN
****  ***** .***** .*****

KPSKPKTNLKHVAGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAMSRPMIHFGNDWEDRYY
KPSKPKTNMKHMAGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAMSRPMMHFGNDWEDRYY
KPSKPKTNMKHMAGAAAAGAVVGGLGGYVLSAMSRPIIHFGSDYEDRYY
*****:*:*:*****:*****:***.*:*****

RENMYRYPNQVYYRVPDQYSNQNNFVHDCVNITIKQHTVTTTTTKGENFTE
RENMNRYPNQVYYRVPDQYNNQNNFVHDCVNITIKQHTVTTTTTKGENFTE
RENMHRYPNQVYYRPMDEYSNQNNFVHDCVNITIKQHTVTTTTTKGENFTE
**** *****:*:* .*****

TDVKMMERVVEQMCVTQYQKESQAYYDGRSSSTVLFSSPPVILLISFLI
TDIKIMERVVEQMCTTQYQKESQAYYDGRSS-AVLFSSPPVILLISFLI
TDVKMMERVVEQMCITQYERESQAYYK--RGSSMVLFSPPVILLISFLI
**:*:***** ***:***** .*. * *****

FLIVG
FLIVG
FLIVG
*****

```

Figura 3: Alinhamento das sequências primárias da PrP humana (gi:13879449) (linha superior) da PrP de camundongo (gi:119489920) (linha do meio) e da PrP de hamster sírio (gi:18490397) (linha inferior). Alinhamento dos resíduos 1 a 254 realizado com o programa online CLUSTALW 2.1 Multiple Sequence Alignments. *indica posição que contém um resíduo conservado; :resíduos que apresentam propriedades similares; .propriedades parcialmente similares.

As três sequências são altamente homólogas o que é interessante para o nosso trabalho, uma vez que iremos utilizar domínios provenientes tanto da PrP de camundongo, quanto da PrP de hamster sírio. Quando a estrutura da PrP humana é comparada com as estruturas da PrP de camundongo (RIEK E COLS., 1997) e de hamster

sírio (DONNE E COLS., 1997; LIU E COLS., 1999), o comprimento da hélice 3 coincide mais com o da PrP de hamster (ShaPrP), enquanto que a volta 167-171 é compartilhada com a PrP murina (mPrP).

1.1 Patogênese das doenças por prion

A alteração conformacional da PrP^C, que é um dos fatores determinantes para a ocorrência das EETs, ocorre, na maioria dos casos (85%), sem alterações no gene *PRNP* (PAN E COLS., 1993). Sendo assim, as EETs podem ser classificadas como doenças conformacionais. Outro ponto que desperta grande interesse é o fato do agente infeccioso (o prion) consistir em uma proteína parcialmente enovelada. Além disso, o caráter infeccioso é único – o prion patogênico em contato com prion celular tem a capacidade de modificar a PrP^C, convertendo-a na forma alterada, que apresenta características tóxicas para os neurônios e promove a formação de agregados proteicos (Prusiner, 1982). A PrP^C é convertida em PrP^{Sc} através de um processo pós-tradução, no qual parte de sua estrutura em α -hélice e o entorno é re-enovelada em folhas- β (CAUGHEY E COLS., 1991; PAN E COLS., 1993). Esta conversão estrutural ocorre com substancial mudança no conteúdo de estrutura secundária da proteína e sem a presença de modificações covalentes pós-tradução (CHANDLER E COLS., 1961; CHITI & DOBSON, 2006). A PrP^{Sc} se apresenta como um oligômero insolúvel, que possui resistência parcial à digestão por proteases e pode formar agregados amorfos e amiloides (PRUSINER, 1998; AGUZZI & POLYMENIDOU, 2004; TOYAMA & WEISSMAN, 2011). Amiloides são agregados proteicos fibrilares altamente organizados, revelados pelos corantes vermelho do Congo e tioflavina T e apresentam uma estrutura secundária rica

em folhas- β cruzadas, independente da estrutura nativa da proteína que gerou a fibra (ROCHET & LANSBURY, 2000).

As principais diferenças entre a PrP^C e PrP^{Sc} estão demonstradas na figura 4.

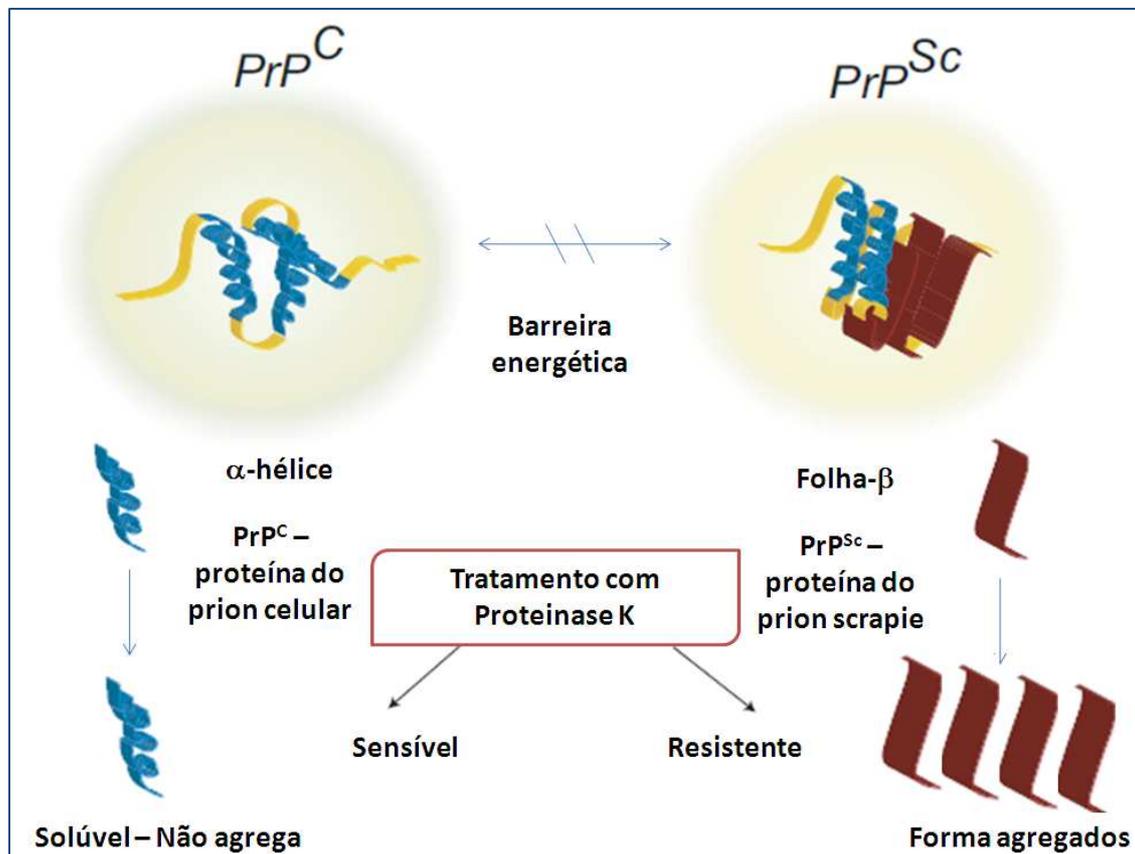


Figura 4: Proteína do prion celular e scrapie. A proteína do prion na sua configuração nativa é designada PrP^C. A forma scrapie (PrP^{Sc}) está ligada à doença. As cadeias polipeptídicas da PrP^C e PrP^{Sc} são idênticas na sua composição mas apresentam estruturas tridimensionais diferentes. A PrP^C tem estrutura predominante em α-hélices (voltas azuis), não forma agregados e é degradada por proteinase K. A estrutura secundária da PrP^{Sc} é abundante em folhas-β (folhas vermelhas) e esta é resistente à digestão por proteinase K e apresenta propensão a agregar. Figura adaptada de (VENNETI, 2010).

Embora as estruturas secundárias da PrP^C e PrP^{Sc} tenham sido determinadas por estudos espectroscópicos (GASSET E COLS., 1992; PAN E COLS., 1993) e já se tenha estruturas tridimensionais obtidas por ressonância magnética nuclear (RMN) para a PrP^C de diversos mamíferos (ZAHN E COLS., 2000), não existem estruturas em alta

resolução disponíveis para a PrP^{Sc} solúvel. Recentemente foi publicada informação sobre a organização de agregados ordenados da PrP de hamster sírio, por ressonância magnética em estado sólido (TYCKO E COLS., 2010). Além disso, existem estruturas propostas para a PrP^{Sc} obtidas por modelagem molecular. Estes estudos sugerem que a formação da isoforma causadora da doença (PrP^{Sc}) envolve o reenovelamento em folhas- β dos resíduos presentes na região 90 a 140 (HUANG E COLS., 1996). Um modelo mais recente utilizou a região flexível da proteína do prion (resíduos 89 a 175), onde foi verificado que esta região pode assumir um enovelamento em hélices- β (GOVAERTS E COLS., 2004).

1.2 Proteína do prion – Papel Fisiológico

Diversos estudos já foram realizados com a PrP, mas sua função fisiológica ainda não foi elucidada. A observação de que camundongos que não expressam a PrP^C apresentam pouca ou nenhuma alteração fenotípica (BUJER E COLS., 1993) dificultou o esclarecimento da fisiologia desta proteína. Este resultado também foi surpreendente na época, uma vez que a PrP^C é encontrada em uma grande variedade de espécies (AGUZZI E COLS., 2008), devendo, portanto, desempenhar um papel fisiológico essencial. Entretanto, muitos achados sugerem que essa proteína está envolvida em diversos processos celulares e fisiológicos nos sistemas nervoso e imune, órgãos linfóides, e no desenvolvimento embrionário, assim como em outros órgãos (CAUGHEY & BARON, 2006; ISAACS E COLS., 2006; WESTERGARD E COLS., 2007; CAETANO E COLS., 2008; KOVACS & BUDKA, 2008). Foi verificado também que a PrP^C se liga a diversas macromoléculas biológicas e sugere-se que estas interações podem estar relacionadas com sua função ou

patogênese (LINDEN E COLS., 2008; BROWN, 2010; MEHRPOUR & CODOGNO, 2010; SILVA E COLS., 2010).

Uma característica interessante desta proteína é a presença de repetições de uma determinada seqüência de oito resíduos de aminoácidos (PHGGGWGQ) na sua região N-terminal, entre os resíduos 51 a 91 (VILES E COLS., 1999). Esta região, conhecida como domínio *octarepeat* ou domínio octamérico é altamente conservada e liga cobre fisiologicamente (BROWN E COLS., 1997; VILES E COLS., 1999), sendo esse o ligante mais estudado da PrP^C. Sugere-se que esta ligação esteja relacionada à função fisiológica hipotética da PrP (LINDEN E COLS., 2008; BROWN, 2010). A ligação do cobre pela PrP pode estar relacionada a um papel neuroprotetor desempenhado por esta proteína, com a regulação do estresse celular (STEVENS E COLS., 2009).

Embora muitos esforços estejam sendo realizados para elucidar o papel fisiológico da PrP^C, sua função específica não está firmemente estabelecida. Muitos parceiros biológicos para a PrP foram identificados e podem estar envolvidos em sua função. Com base nos dados atualmente disponíveis, sugere-se que a PrP se associe a uma proteína transmembrana para transferir um sinal extracelular para o espaço intracelular, devido a presença da âncora de GPI, indicando que a PrP pode funcionar como uma proteína acessória (AGUZZI E COLS., 2008; LINDEN E COLS., 2008). Além dos eventos de sinalização celular já citados acima, muitos estudos sugerem que a PrP^C está envolvida no transporte e metabolismo de cobre (PAULY & HARRIS, 1998; MARTINS E COLS., 2002; MILLHAUSER, 2007; NADAL E COLS., 2009; BROWN, 2010). Uma proposta integrativa para as funções desempenhadas pela PrP é que esta proteína atue como um alicerce na superfície celular, permitindo a interação e aproximação de diversas

moléculas sinalizadoras. Sendo assim, sua interação seletiva com diversos ligantes permite que vias de sinalização transmembrana sejam ativadas, levando a diversos efeitos fisiológicos, como diferenciação e desenvolvimento neuronal (LINDEN E COLS., 2008).

1.3 Proteína do prion e cobre

O ligante mais estudado da proteína do prion é o cobre. Essa proteína liga íons cobre fisiologicamente através do seu domínio N-terminal flexível que inclui o domínio *octarepeat* (BROWN E COLS., 1997; VILES E COLS., 1999). Sugere-se que esta ligação esteja relacionada à função fisiológica putativa da PrP^C (MILLHAUSER, 2007; DAVIES & BROWN, 2008; LINDEN E COLS., 2008).

O cobre é um elemento traço essencial para organismos vivos que participa de diversos aspectos do metabolismo, incluindo a fosforilação oxidativa na mitocôndria, a eliminação de espécies reativas de oxigênio, a síntese e degradação de neurotransmissores, formação de pigmento, síntese de tecido conjuntivo e metabolismo de ferro (PENA E COLS., 1999; WAGGONER E COLS., 1999). No corpo humano, o cobre é encontrado em quantidades relativamente altas: um adulto saudável de 70 kg contém cerca de 110 mg de cobre, 46 mg no esqueleto e medula óssea, 26 mg no músculo esquelético, 10 mg no fígado, 8,8 mg no cérebro e 6 mg no sangue (LINDER & HAZEGH-AZAM, 1996). Apenas 10^{-18} M desses íons estão livres no organismo, ou seja, sem estar ligado a uma proteína carreadora ou a aminoácidos. Isto significa menos de 1 cobre (um átomo de cobre) livre por célula (VALENTINE & GRALLA, 1997). A absorção de cobre se dá no estômago, no duodeno e no intestino delgado (LINDER & HAZEGH-AZAM,

1996). O cobre é essencial para o metabolismo cerebral, servindo como um co-fator para as proteínas superóxido dismutase, dopamina- β -hidroxilase, proteína precursora amiloide, ceruloplasmina, metaloproteínas e outras essenciais para a função normal do cérebro. Muitos cátions divalentes presentes na dieta atuam competitivamente na absorção intestinal de cobre (WAPNIR, 1998). Apesar dos mecanismos da homeostase do cobre ainda não estarem completamente esclarecidos, diversos achados sobre o metabolismo do cobre já foram publicados cerca de 80 anos após a descoberta de seu papel no metabolismo humano. A necessidade de cobre em adultos geralmente é relatada como 1 mg por dia. O valor de referência para o cobre em água para uso humano é 2 mg/L (WHO directivas World Health Organization, Guidelines for Drinking-Water Quality: Incorporating First Addendum. Vol. 1, Recommendations, 3rd ed., Geneva, 2008.). As principais fontes alimentares de cobre são chocolate, fígado, crustáceos, marisco, vegetais verdes, frutas secas e castanhas.

O cobre é um metal de transição caracterizado por um baixo potencial redox entre Cu^{2+} e Cu^+ que reflete a sua capacidade de troca de elétrons com outros compostos químicos. A função biológica do cobre deriva principalmente dessa aptidão para alternar entre suas formas oxidada e reduzida. Por esta razão, o cobre é utilizado por um grande número de enzimas, aproximadamente mais de 300 em seres humanos, envolvidas nas reações oxidativas. O cobre circulante existe na forma complexada, sendo as principais moléculas carreadoras a ceruloplasmina e a albumina. A ceruloplasmina é responsável por quelar de 70 a 90% do cobre presente no plasma e é sugerido que esta proteína desempenhe o papel de doador de cobre para o consumo nos tecidos. Diferentes estudos sugerem que o cobre deve ser reduzido para entrar na

célula (LINDER & HAZEGH-AZAM, 1996; KNOPFEL & SOLIOZ, 2002). Foi levantada a hipótese que o cobre em excesso pode desencadear danos celulares oxidativos por produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e conseqüente dano oxidativo (FARINATI E COLS., 2003). Várias doenças neurodegenerativas estão ligadas ao íon cobre devido a alterações no seu metabolismo como as doenças de Menkes, Wilson e Esclerose Amiotrófica Lateral ou devido a alterações conformacionais como Alzheimer e doenças por prions (ROTILO E COLS., 2000).

Devido a habilidade da PrP^C de ligar cobre sugere-se que esta proteína deve ter um papel fisiológico na homeostase de cobre (VILES E COLS., 1999). A PrP^C é constitutivamente captada da superfície da célula para o interior da célula através de endocitose e a adição de Cu²⁺ rapidamente estimula este processo, tendo por resultado uma internalização significativa de PrP^C (PAULY & HARRIS, 1998; PERERA & HOOPER, 2001). Cérebro de ratos nocaute para PrP^C apresentam reduzido conteúdo de cobre quando comparados ao tipo selvagem, e demonstraram alta sensibilidade ao estresse oxidativo induzido pelo cobre (BROWN E COLS., 1997; BROWN E COLS., 1998; WONG E COLS., 2001).

Acredita-se que a PrP^C pode atuar como um neuroprotetor, prevenindo os eventos deletérios provocados pelo cobre livre no sistema nervoso central (SNC) (BROWN E COLS., 1998). Ainda, foi visto que neurônios em cultura são capazes de seqüestrar Cu²⁺ da membrana plasmática em concentrações ditadas pelo nível da expressão de PrP^C (RACHIDI E COLS., 2003). No SNC, a PrP^C é concentrada em membranas pré-sinápticas, onde o cobre também se encontra altamente concentrado (BROWN E COLS., 1997; HERMS E COLS., 1999). O cobre move-se do interior da célula para a fenda

sináptica através de exocitose e despolarização neuronal. O efluxo de cobre pode ser considerado um evento obrigatório associado à fusão vesicular, que guia a liberação de neurotransmissores (VASSALLO & HERMS, 2003). Existem experimentos em andamento que visam determinar a exata concentração de cobre na sinapse. As melhores medidas sugerem que a concentração seja de aproximadamente 1 μM e picos de concentração entre 3 μM e 250 μM (KARDOS E COLS., 1989; HOPT E COLS., 2003).

O desbalanço metálico é uma das características das doenças por prions (Brown, 2002). Em tecido cerebral com a doença, foi encontrado PrP^{Sc} sendo ocupada com metal (COLLINGE, 1999). A ligação metálica à proteína do prion é alterada em humanos com EET (BROWN, 2001). Já em modelos animais da doença, níveis celulares de cobre foram afetados pela infecção por PrP^{Sc} (PEOC'H E COLS., 2003) e a progressão da doença em camundongos foi retardada mediante tratamento com quelantes de cobre (SIGURDSSON E COLS., 2003). Foi reportado que o Cu^{2+} pode causar dano oxidativo na PrP^{C} . Essas modificações químicas poderiam promover a amiloidose observada nas doenças por prion esporádicas (RUIZ E COLS., 2000; REQUENA E COLS., 2001; NADAL E COLS., 2007).

Apesar de ser a principal região de ligação ao cobre, o domínio *octarepeat* não é necessário para a infecciosidade e propagação da PrP^{Sc} (FLECHSIG E COLS., 2000). Já a região do peptídeo neurotóxico da PrP (JOBLING E COLS., 2001), que contém dois sítios de ligação a cobre (JONES E COLS., 2004; JONES E COLS., 2005; NADAL E COLS., 2007) é essencial para a replicação do prion. É proposto que a presença ou a ausência de cobre pode gerar múltiplas conformações de prions com implicações na patogênese das EETs (WADSWORTH E COLS., 1999; QIN E COLS., 2000).

Existem estudos controversos com relação à atividade do cobre e de outros metais no processo de agregação, que é um passo chave no desenvolvimento das EETs, e sobre a participação do cobre na conversão PrP^C em PrP^{Sc}. Foi mostrado, por exemplo, que a agregação de um peptídeo derivado da PrP, o PrP (106-126), conhecido pela sua neurotoxicidade, foi aumentada pela adição de cobre, zinco e ferro e que a agregação foi reduzida após a sua retirada (JOBILING E COLS., 2001). Além disso, o cobre foi demonstrado como um facilitador da conversão da PrP^C em um peptídeo parcialmente resistente a protease (QIN E COLS., 2000; QUAGLIO E COLS., 2001). Em contraste, foi verificado que, em células infectadas com scrapie, a presença de cobre reduziu a acumulação de PrP^{Sc}. Também foi demonstrado através desse estudo que a ligação de PrP^{Sc} em células normais foi menor na presença de cobre. Juntamente com os resultados obtidos *in vitro*, a administração de cobre em hamsters resultou em um significativo aumento de PrP^C observado nas células de Purkinje e em suas árvores dendríticas e foi observado que a administração de cobre em ratos infectados com scrapie retardou o aparecimento dos sintomas (HIJAZI E COLS., 2003). Sendo assim, é evidente que resultados obtidos investigando o efeito do cobre na conversão conformacional e agregação da PrP são ainda pouco esclarecedores a respeito do papel do cobre na fisiopatologia das EETs.

Além de estudos controversos com relação à ligação do cobre à proteína do prion, existem estudos controversos também com relação à ligação da PrP com outros metais, como é o caso do íon manganês. Foi mostrado que esse íon apresenta um efeito pró-agregante forte e específico que poderia ser bloqueado por íons Cu²⁺ (GIESE E COLS., 2004). Esse efeito do Mn²⁺ é rapidamente revertido através do uso de ácido

etileno diamino tetraacético (EDTA), quelante de íons divalentes, indicando que o Mn^{2+} induz reversivelmente a ligação intermolecular da PrP, enquanto que o Cu^{2+} liga com alta afinidade à histidina, afetando a estrutura da PrP^C e, finalmente, sua habilidade em agregar (LEVIN E COLS., 2005). Em contraste, já foi reportado que Mn^{2+} não liga ao domínio *octarepeat* da proteína do prion (GARNETT & VILES, 2003). No geral, é consenso na literatura que a PrP^C liga especificamente Cu^{2+} e Zn^{2+} , mas não necessariamente coordena Mg^{2+} ou Mn^{2+} (HORNSHAW E COLS., 1995; LEHMANN, 2002; GARNETT & VILES, 2003; BOCHAROVA E COLS., 2005), apesar dos efeitos já reportados acima para o íon manganês.

Os diferentes modos de coordenação do cobre com a PrP^C dependem também da estequiometria desta interação. Esta observação pode estar relacionada aos diferentes resultados obtidos nos estudos da interação prion:cobre. Além disso, o papel da região não-octapeptídica, His-96 e His-111, ainda não está elucidado (GRALKA E COLS., 2008; RIVILLAS-ACEVEDO E COLS., 2011). Com relação aos diferentes modos de coordenação, ainda não existe um consenso na literatura, devido às diferentes condições experimentais empregadas e a relação PrP: Cu^{2+} que gera distintos modos de ocupação do cobre nos centros de histidina. Por exemplo, Millhauser e colaboradores demonstraram que diferentes estequiometrias PrP: Cu^{2+} levam a diferentes modos de coordenação pela PrP (Figura 5). Em uma baixa relação cobre:PrP, a coordenação múltipla de um íon com diversas histidinas do domínio *octarepeat* é favorecida. Por outro lado, uma alta relação cobre:PrP promove a coordenação individual de cada íon cobre com uma histidina e os nitrogênios amídicos (MILLHAUSER, 2007).

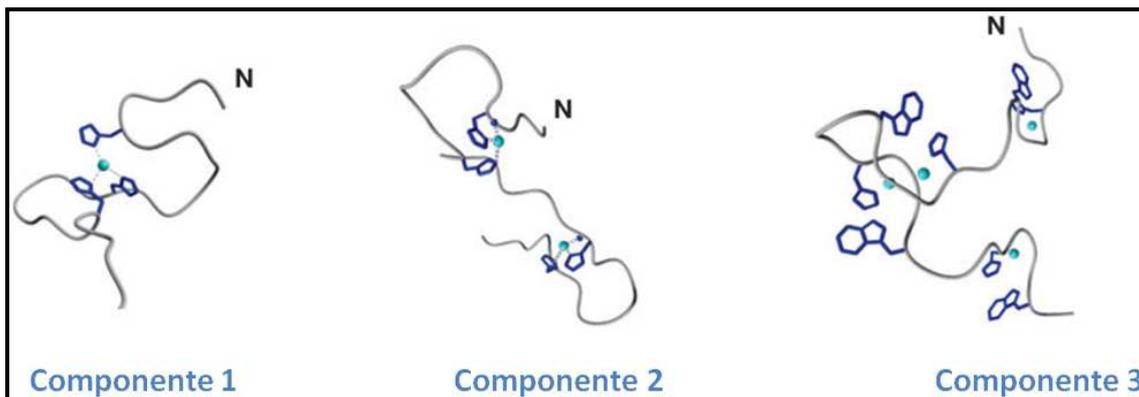


Figura 5: Diferentes modos de coordenação de Cu^{2+} ao domínio octarepeat, através de uma, duas ou três histidinas simultaneamente. Baixa concentração de Cu^{2+} favorece a formação do componente 1; alta concentração de cobre favorece a formação do componente 3 (Figura adaptada de Millhauser, 2007).

Através da avaliação de peptídeos contendo o *octarepeat* por ressonância eletrônica paramagnética (EPR), foi demonstrado que os resíduos HGGGW, em cada repetição, constituem a unidade responsável pela ligação com o cobre, onde dois resíduos de glicina seguidos de histidina, em cada segmento octarepetido, coordenam cobre através dos nitrogênios das amidas (MILLHAUSER, 2007; RIVILLAS-ACEVEDO E COLS., 2011). Através da espectroscopia de Raman, também já foi identificada a coordenação no nitrogênio da amida, através de estudos de modelos envolvendo o segundo e terceiro resíduo de glicina, seguidos da histidina (MIURA E COLS., 1999). Além disso, a ligação a cobre pode ser influenciada pelo padrão glicosilação da PrP como visto em estudos *ex vivo* (MOUDJOU E COLS., 2007).

A elucidação das características estruturais dos centros de cobre na PrP é essencial para o entendimento da função e também para testar hipóteses correlacionadas com a patogênese. Apesar da difração de raios-X e da RMN serem as técnicas mais utilizadas para determinação da estrutura de proteínas em resolução

atômica, cada método encontra desafios quando aplicados na observação da ocupação do cobre na PrP^C. É difícil obter cristais da PrP que difratem satisfatoriamente e, até o momento, apenas duas estruturas de raios-X foram reportadas, ambas de domínios C-terminais de ovino (EGHIAIAN E COLS., 2004; HAIRE E COLS., 2004). Medidas de RMN podem ser prejudicadas pela presença de Cu²⁺, que é paramagnético, levando a um significativo alargamento dos picos.

Apesar de estudos sugerirem que a administração de sais de cobre a roedores pode conter a propagação de prions *in vivo*, a administração contínua de cobre em altas concentrações é também tóxica em pacientes com doenças por prions (HAIGH & BROWN, 2006). Com isso, é importante elucidar os mecanismos pelos quais o cobre interfere na patogenia das EETs. Dessa forma, os resultados apresentados acima sugerem que o cobre deve participar na fisiopatologia das encefalopatias espongiformes transmissíveis.

1.4 Interação da proteína do prion com ácidos nucleicos

A interação da proteína do prion com ácidos nucleicos vem sendo estudada nos últimos 15 anos (NANDI, 1997; CORDEIRO E COLS., 2001; DELEAULT E COLS., 2005; SILVA E COLS., 2008). Foi mostrado que a ligação de PrP com ácidos nucleicos pode levar a mudança conformacional na PrP (CORDEIRO E COLS., 2001; LIMA E COLS., 2006). Estudos realizados por Lima e colaboradores mostraram que o domínio globular C-terminal da PrP é importante para a formação do complexo entre a rPrP e DNA (LIMA E COLS., 2006). Mais recentemente, foi observado que o domínio N-terminal, principalmente a região contida entre os resíduos 50 a 90, é essencial para a interação da PrP com ácidos

ribonucleicos (GOMES E COLS., 2008B). Foi também sugerido que a PrP está envolvida com o metabolismo de ácidos nucleicos *in vivo* (GABUS E COLS., 2001; GUICHARD E COLS., 2011) e, com base em todos os resultados obtidos até o momento, é proposto que ácidos nucleicos atuem como catalisadores e/ou chaperonas moleculares na conversão da PrP em PrP^{Sc} (CORDEIRO E COLS., 2001; LIMA E COLS., 2006; SILVA E COLS., 2008).

Apesar da hipótese *protein-only* afirmar que o agente infeccioso causador das EETs consiste em uma proteína que não apresenta evidências de conter ácidos nucleicos (PRUSINER, 1982), muitas doenças neurodegenerativas, incluindo a Doença de Alzheimer, Doença de Parkinson e Esclerose Lateral Amiotrófica apresentam como característica comum a capacidade de formar agregados amorfos ou fibrilares mediante a interação com ácidos nucléicos (YIN E COLS., 2009; JIMENEZ, 2010), assim como proposto para a proteína do prion por Cordeiro e cols., em 2001.

Além disso, a alteração conformacional sofrida pela PrP^C, influenciada pela presença da forma scrapie, e sua alteração espontânea, que iniciam a acumulação de PrP^{Sc}, permanecem sem explicação. Algumas evidências suportam a idéia da existência de um catalisador para a conversão (CORDEIRO & SILVA, 2005): as doenças por prion não são necessariamente de natureza infecciosa, existe a forma esporádica da doença que ocorre após a conversão espontânea de PrP^C em PrP^{Sc} por um mecanismo ainda desconhecido (GLATZEL E COLS., 2005; FORNAI E COLS., 2006); nem todas as formas da PrP que sofrem agregação são infecciosas (GROSSMAN E COLS., 2003); a eficiência de transmissão do prion scrapie é baixa (1:100.000); existe uma barreira energética que previne a conversão espontânea de PrP^C em PrP^{Sc} (COHEN & PRUSINER, 1998); estudos com camundongos transgênicos evidenciaram a participação de um cofator, ainda

desconhecido, que permitiria a transmissão da PrP^{Sc} entre espécies (TELLING E COLS., 1995).

O grande número de pesquisas que ratificam o papel de ácidos nucleicos como catalisadores da conversão de PrP^C em PrP^{Sc} (DELEAULT E COLS., 2007; GOMES E COLS., 2008A; SILVA E COLS., 2010; SILVA E COLS., 2011) juntamente com as evidências do envolvimento desse ligante em outras doenças neurodegenerativas (JIMENEZ, 2010), tornam essa interação importante para o entendimento das bases moleculares das doenças por prion.

1.5 Interação da proteína do prion com cobre e ácidos nucleicos

Com base no que foi discutido anteriormente, objetivamos identificar o comportamento da PrP^C na presença de ácidos nucleicos e de seu ligante mais estudado, o cobre. Apesar de praticamente não existir cobre livre no ambiente intracelular, a concentração extracelular de Cu²⁺ no SNC é estimada em > 10 µM (MILLHAUSER, 2004), corroborando a capacidade da PrP^{WT} ligar cobre quando ancorada na porção externa da membrana celular.

Íons cobre interagem fisiologicamente com a PrP (BROWN E COLS., 1997) e favorecem a sua internalização, comprometendo o metabolismo celular (PRADO E COLS., 2004; FORNAI E COLS., 2006). A avaliação do efeito conjunto destes dois ligantes da PrP pode contribuir para o entendimento das implicações destes na agregação e conversão estrutural da PrP^C, uma vez que, no ambiente celular, esta proteína estaria em contato tanto com íons cobre, quanto com ácidos nucleicos (Figura 6). Avaliaremos, portanto,

de que forma sequências específicas de ácidos nucleicos irão atuar no processo de conversão conformacional da PrP, quando em presença de cobre, na tentativa de compreender a patogênese das encefalopatias espongiformes transmissíveis.

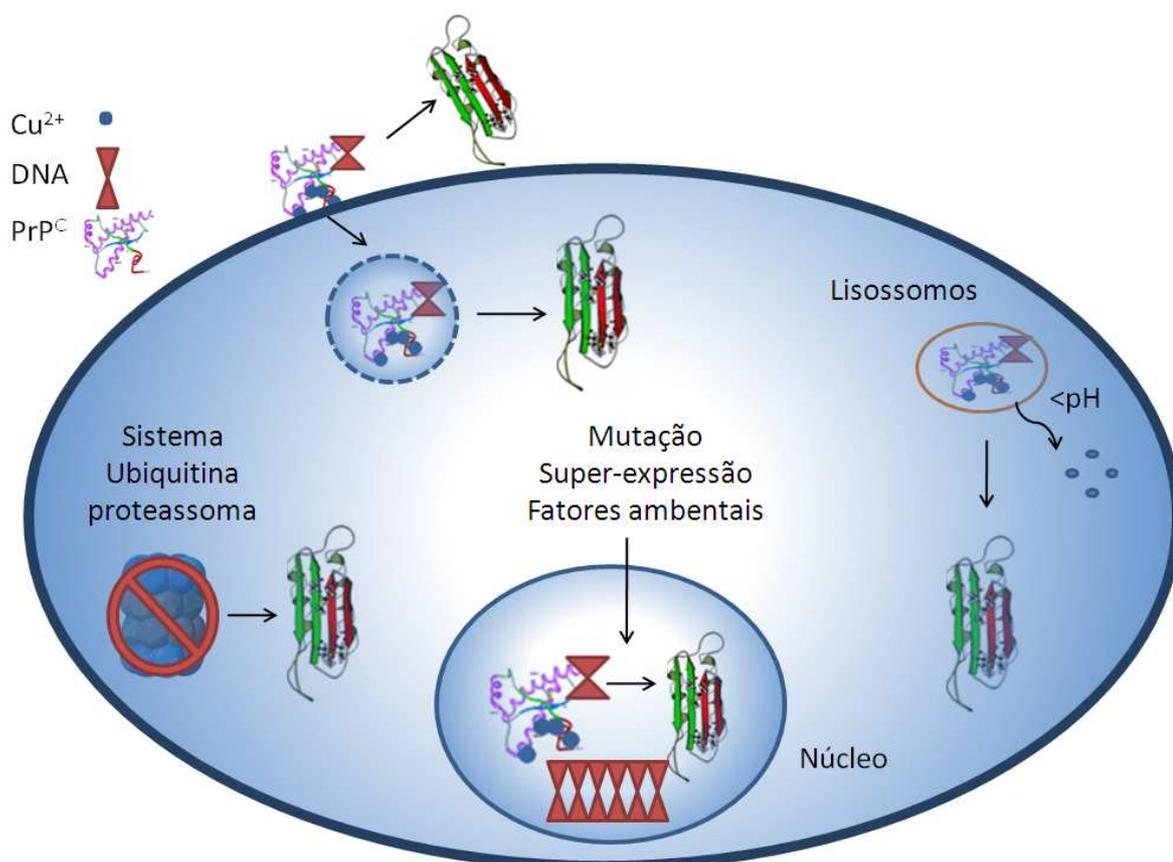


Figura 6: Representação dos possíveis locais de interação da PrP^C com cobre e DNA. A PrP^C pode interagir com ácidos nucleicos e cobre no meio extracelular, formando agregados extracelulares. A PrP^C é internalizada na presença de cobre, podendo interagir com o DNA em vesículas ou no citosol. Além disso, pode haver interação de ambos ligantes em lisossomos e estudos recentes demonstraram a interação do PrP^C no núcleo com a cromatina (MANGE E COLS., 2004; STROM E COLS., 2011).

Além disso, é proposto que a conversão espontânea da PrP^C em PrP^{Sc} seja prevenida por uma barreira energética elevada e somente alterações no equilíbrio, como a presença de um catalisador, por exemplo, levariam a esta conversão (COHEN & PRUSINER, 1998). E este catalisador poderia ser uma molécula de ácido nucleico,

glicosaminoglicano ou também Cu^{2+} (GOMES E COLS., 2008A; GOMES E COLS., 2008B; SILVA E COLS., 2010) como previamente proposto (Figura 7).

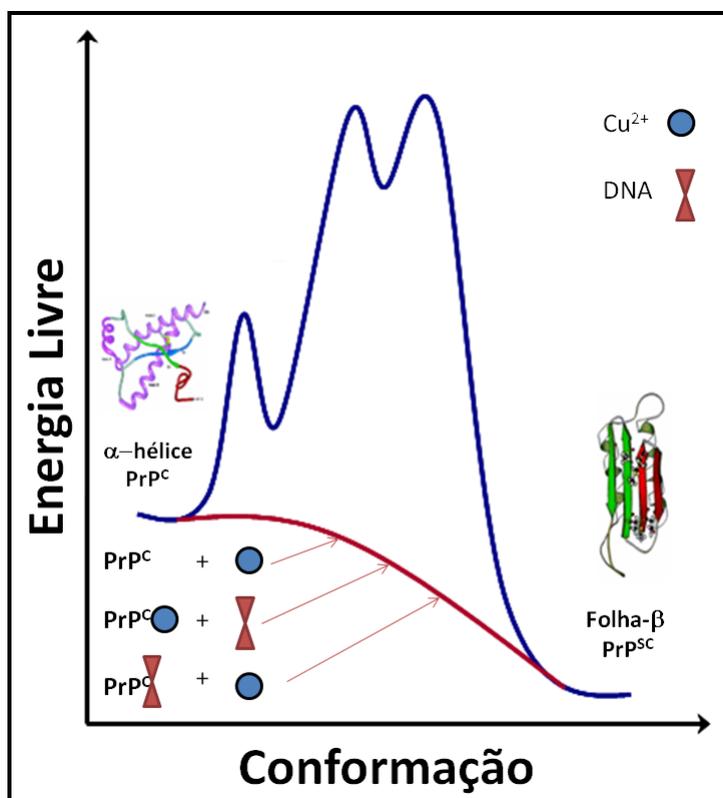


Figura 7: Barreira energética para conversão da proteína do prion (PrP^{C}): O mau enovelamento da PrP^{C} leva a formação da espécie patogênica PrP^{Sc} . As duas formas se diferenciam principalmente pelas suas estruturas secundárias, porém a conversão espontânea não é favorável, tendo que ultrapassar uma barreira energética. Na figura, está representado o efeito catalítico de ambos ligantes que visamos caracterizar nesse trabalho (SILVA E COLS., 2010).

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos de cobre e de outros metais divalentes e de sequências de ácidos nucleicos na modulação da agregação e na estrutura de domínios isolados da proteína do prion e da PrP recombinante de camundongo inteira (PrP^{WT}). Tanto cobre quanto ácidos nucleicos são ligantes previamente caracterizados da PrP, mas o efeito conjunto de ambos sobre a proteína do prion não foi reportado. Monitoramos mudanças conformacionais da PrP^{WT}, do peptídeo PrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹ e do domínio octarepeat e caracterizamos os agregados formados.

2.2 Específicos

- Avaliar a atividade moduladora da agregação de um domínio hidrofóbico da PrP (peptídeo PrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹) por íons cobre, zinco, magnésio e manganês, através de técnicas espectroscópicas, como espalhamento de luz (EL) e ligação a tioflavina-T.
- Avaliar o efeito conjunto de cobre(II) e ácidos nucleicos na agregação/oligomerização de peptídeos da PrP e da rPrP23-231, através da avaliação do espalhamento de luz estático e dinâmico.
- Avaliar alterações na estrutura terciária e secundária da proteína PrP^{WT} e dos domínios isolados da PrP na presença de íons cobre através de medidas de fluorescência, dicroísmo circular e infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).
- Avaliar o efeito dos complexos PrP:DNA e PrP:Cu²⁺ sobre células de neuroblastoma em cultura, através de ensaios de disfunção celular.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais: Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. A água destilada foi deionizada e filtrada a 0,22 μm em sistema de purificação Millipore. Quando não especificado, os reagentes foram obtidos da empresa Sigma Co. Chemicals (EUA).

Peptídeos. Os peptídeos correspondentes à região hidrofóbica e ao domínio *octarepeat* da PrP foram adquiridos da empresa GeneMed Synthesis Inc. (San Antonio, TX, EUA). Estes foram obtidos por síntese química em fase sólida e posteriormente purificados por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC). Todos apresentaram pureza maior do que 90%. Utilizamos o peptídeo PrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹, que apresenta apenas um sítio de ligação com o cobre, a His-111. Este peptídeo está envolvido na conversão em folhas- β (HUANG E COLS., 1996; GOVAERTS E COLS., 2004) e agrega prontamente em solução aquosa quando diluído de uma condição desnaturante (CORDEIRO E COLS., 2001; CORDEIRO E COLS., 2004). Também obtivemos os peptídeos 3OR e 4OR, contendo 3 e 4 repetições octaméricas, respectivamente. Todos os peptídeos encomendados apresentaram as extremidades N-terminal e C-terminal protegidas (acetilado no N-terminal e amidado no C-terminal) para impedir coordenação não-específica a Cu^{2+} (tabela 2).

Tabela 2 - Peptídeos da PrP que serão avaliados neste projeto

Nome do Peptídeo	Sequência	Sítios de ligação a cobre
Peptídeo 3OR	Ac-PQGGT W GQ P HGGG W GQ PHGG W GQ P HGG W GQ-NH ₂ (51-90)	3
Peptídeo 4OR	Ac-GQ P HGGG W GQ P HGGG W GQ PHGGG W GQ P HGGG W GQ-NH ₂ (57-90)	4
Peptídeo PrP ¹⁰⁹⁻¹⁴⁹	Ac-MK H MAGAAAAGAVVGG L GG W MLGSAMSRPMM H FGNDWED R Y-NH ₂ (109-149)	1

Em negrito estão marcados os resíduos de histidina, triptofano e tirosina. Em parênteses estão indicados os resíduos da PrPWT que compreendem a região estudada.

Oligonucleotídeos sintéticos. Utilizamos várias sequências de DNA fita-dupla (DNA-df), anelados no laboratório a partir de sequências de oligonucleotídeos fita-simples purificados por cromatografia líquida de alta eficiência, adquiridos da empresa Prodimol (Brasil). As sequências utilizadas foram: E2DBS-18 (5'-GTAACCGAAATCGGTTGA-3'); E2DBS-36 (5'-GTAACCGAAATCGGTTGA-GTAACCGAAATCGGTTGA-3') 34-bp poli(AT) e 21-bp poli(GC) (5' AAA GGACGCGCGCGCGTTA 3').

Indução da expressão recombinante em *E. coli* e purificação proteica. A PrP^{WT} foi expressa heterologicamente em *E. coli*. A indução da expressão foi efetuada adicionando-se isopropil tiogalactopiranosídeo (IPTG) a 1 mM após o crescimento bacteriano atingir a fase log (Abs: 0,6 a 600 nm). Após 8 horas sob agitação a 37 °C, as células foram precipitadas por centrifugação (15 min a 5.644,8 g, 4°C) e, em seguida, o pellet foi ressuspendido em 80 ml de tampão (preparado na hora) 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 2 mM PMSF. Para o isolamento dos corpos de inclusão, essa solução foi submetida a dois ciclos de rompimento com ultra-som de 30 min cada. Após essa etapa, realizamos uma nova centrifugação a 26.964 g / 20 min a 4°C e o

sobrenadante foi descartado, separando-se assim a fração insolúvel (corpos de inclusão). A fração insolúvel foi ressuspensa num tampão contendo ureia (6M ureia, 10 mM Tris e 100 mM Na₂HPO₄, pH 8,0, adicionando, no momento do uso, 10 mM de glutatona reduzida, e 2 mM de fenil-metano(sulfonil)fluoreto (PMSF)) para solubilização e para total homogeneização da solução, utilizou-se um homogeneizador tipo Potter. Essa amostra foi sonicada por 30 min e, em seguida, centrifugada a 26.964 g / 20min a 4°C e a PrP^{WT} foi imobilizada à 5mL de resina de agarose (NTA-Sepharose, Sigma) previamente carregada com níquel e equilibrada com o mesmo tampão utilizado para a solubilização dos corpos de inclusão. Essa mistura foi incubada *overnight* e mantida sobre agitação a 4°C. A mistura foi empacotada em uma coluna e, em seguida, foi lavada com 30 mL de tampão de solubilização para remoção das proteínas não ligadas. Para o re-enovelamento da proteína foi aplicado um gradiente com 80 mL do tampão de solubilização e 80 mL do mesmo tampão sem a presença do agente desnaturante (10 mM Tris, 100 mM Na₂HPO₄, pH 8.0) para retirada da ureia do meio. Em seguida, a resina foi lavada com mais 20 mL do tampão sem ureia. As impurezas protéicas ligadas fracamente a resina foram eluídas com 50 mL de tampão contendo imidazol 20 mM, pH 8,0. Em seguida, a proteína PrP foi eluída com tampão de eluição (10 mM Tris, 100 mM Na₂HPO₄, 500 mM imidazol, pH 5.8) e frações de ~ 2 mL foram coletadas. O conteúdo protéico em cada fração foi dosado através da leitura de absorvância a 280 nm. Após análise das frações com maior absorvância a 280 nm e por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 15%, as frações selecionadas foram dialisadas contra 4 L de água milli-Q por 4 horas a 4°C para remoção do imidazol. A pureza das proteínas foi determinada por SDS-PAGE 15% e suas

concentrações aferidas através do coeficiente de extinção molar a 280 nm. As amostras foram então alíquotadas e mantidas a -20°C.

Espectrometria. Utilizamos técnicas espectroscópicas rotineiramente para verificar tanto a pureza das proteínas purificadas, e também para aferir sua concentração.

Espalhamento de luz estático: As medidas de espalhamento de luz (EL) foram realizadas em espectrofluorímetro Jasco FP-6300 (Jasco Corp. Tóquio, Japão) (Lab. Biotecnologia Farmacêutica, FF, Professor Luís Maurício T. R. Lima). O espalhamento de luz das amostras foi monitorado a 90° em relação à incidência da luz de excitação, e os valores de EL estão diretamente relacionados ao tamanho médio das partículas em solução. Sendo assim, uma vez ocorrendo agregação, observa-se um aumento nos valores de EL. As amostras foram iluminadas a 450 nm e os valores de EL foram coletados de 430 a 470 nm.

Para os ensaios de cinética de agregação, diluímos o peptídeo da PrP de hamster previamente desnovelado em tampão ácido 2-[N-morfolino] etanossulfônico (MES) a pH 5,0 na ausência de agente desnaturante. O peptídeo PrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹ liofilizado foi ressuspendido em tampão MES 50 mM, ureia 6 M e SDS (dodecil sulfato de sódio) 10mM, pH 5,0, centrifugado a 11.356,8 g /10min e seu sobrenadante foi dosado a 280 nm para cálculo da sua concentração, utilizando seu coeficiente de extinção molar ($\epsilon_{280} = 12.490 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (calculado a partir de sua seqüência primária no site www.expasy.ch, programa ProtParam).

Os valores de espalhamento de luz a 450 nm foram coletados em função do tempo. Como controle negativo, a solução estoque de peptídeo foi diluída na presença

de uréia a 6 M, caracterizando a condição não agregada (MACEDO E COLS., 2010). Padronizamos esta técnica na tentativa de identificarmos compostos moduladores da agregação, e então procederemos as cinéticas na presença de metais divalentes e de oligonucleotídeos, que são os objetos de estudo desta dissertação.

Espalhamento de luz dinâmico (ELD): O espalhamento de luz dinâmico foi realizado no equipamento DynaPro NanoStar (Wyatt Technology, CA, EUA) com laser de He-Ne no comprimento de onda de 690 nm e força na faixa de 10-50 mW. As amostras foram dispostas em cubeta de quartzo em temperatura ambiente e toda manipulação foi realizada no fluxo laminar. Foram realizadas 3 medidas com 10 acumulações cada. Os valores de raio hidrodinâmico reportados representam a média das 3 medidas. Esta técnica determina o perfil de distribuição de tamanho de partículas em suspensão, gerando informações sobre o raio hidrodinâmico das partículas (BERNE, 1976).

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 (LAKOWICZ, 2006). Nos ensaios de fluorescência, as amostras foram monitoradas através de sua fluorescência intrínseca, conferida pelos resíduos aromáticos triptofano e tirosina. A excitação foi realizada a 280 nm e a emissão coletada de 300 a 420 nm. Os peptídeos 3OR e 4OR foram ressuspensos em água e dosados a 280 nm para cálculo da sua concentração, utilizando seu coeficiente de extinção molar ($\epsilon_{280}(3OR) = 22.000$

$M^{-1} cm^{-1}$ e ($\epsilon_{280}(4OR) = 22.000 M^{-1} cm^{-1}$) (calculado a partir de sua seqüência primária no site www.expasy.ch, programa ProtParam).

Espectroscopia de Absorção no Infravermelho por Transformada de Fourier

(FTIR): Esta técnica permite o monitoramento de estruturas protéicas secundárias e terciárias, em especial de matéria agregada. A banda amídica I do espectro de IR (região de 1600 a $1700 cm^{-1}$) é referente à vibração da carbonila (C=O) e é sensível a estrutura secundária adotada pela proteína analisada (Byler & Susi, 1986). Avaliamos o conteúdo de estrutura secundária da PrP^{WT} na presença de cobre, DNA e de ambos os ligantes em conjunto. As amostras secas foram depositadas sobre a superfície do cristal do dispositivo de ATR (refletância total atenuada) e os espectros de infravermelho coletados com resolução de $4 cm^{-1}$ em 256 varreduras. Todas as amostras foram secas e analisadas em base de ATR. Os espectros foram gerados pelo acúmulo de 256 interferogramas coletados com $4 cm^{-1}$ de resolução. A deconvolução da região da amida I foi realizada com o programa OMNIC (Thermo Corp. EUA) e foi empregado um incremento de 1,8 x e a largura da banda foi fixada em $\sim 20 cm^{-1}$. A determinação da posição dos picos e o ajuste das curvas foram feitos utilizando o programa OMNIC.

Espectropolarimetria de dicroísmo circular (CD): Esta técnica permite o monitoramento e caracterização de estruturas protéica secundária em solução, e utilizamos esta técnica para acompanhar mudanças conformacionais das proteínas estudadas quando coordenadas com os íons estudados. Para avaliar a estrutura secundária foram realizadas medidas na região do ultravioleta distante. As aquisições foram realizadas em espectropolarímetro Chirascan (Applied Photophysics, Reino

Unido) e os espectros foram coletados a 50 nm por minuto com subtração adequada dos espectros de linha de base e os mesmos parâmetros de aquisição (3 acumulações). As análises foram realizadas abrangendo comprimentos de onda de 190 a 320 nm. Os resultados foram expressos como valores de elipicidade bruta (em miligraus) ou elipicidade molar ($\text{mgra} \times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$).

Avaliação de disfunção celular – Redução de MTT: A redução do sal de tetrazolium MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio) é um dos métodos mais utilizados para medir a proliferação celular e citotoxicidade neural. O MTT é reduzido pela atividade mitocondrial em células vivas e é confinado em vesículas intracelulares na forma de cristais de formazan (LIU & SCHUBERT, 1997). Para o ensaio de avaliação de disfunção celular incubamos o peptídeo PrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹ na concentração final de 5 μM (estado agregado) ou na presença de CuCl_2 ou DNA (sequência poliGC21-df) em razão molar peptídeo:ligante 1:1 em linhagem de célula de neuroblastoma (N2a). Após 48 h de incubação, adicionamos o reagente MTT e monitoramos sua redução a partir de leitura da absorbância a 540 nm em um leitor de ELISA, como previamente descrito (GOMES E COLS., 2008B). Expressamos os resultados como porcentagem de sobrevivência celular relativa àquela vista no controle, ou seja, dos poços contendo células sem adição de rPrP ou de rPrP na presença de ligantes. Esta avaliação foi realizada em colaboração com a Dra. Luciana Rangel, do Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ.

Ensaio de digestão por proteinase K : As amostras de PrP^{WT} na ausência e na presença dos ligantes (Cu^{2+}) foram incubadas com proteinase K (PK) (Sigma, EUA) por 60 min a 37°C e posteriormente analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida

desnaturante SDS-PAGE 15%. Foi utilizado um padrão de peso molecular e a PrP^{WT} foi identificada pela sua posição no gel que correspondeu a uma banda de ~ 24kDa do padrão de peso molecular. O gel foi corado por prata e as bandas foram avaliadas através do programa Image J.

Microscopia eletrônica (MET): Avaliamos a ultraestrutura dos agregados formados por microscopia eletrônica de transmissão em colaboração com a Prof^a. Dr^a. Carolina Braga, do Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ, pólo Xerém. Para as medidas de MET as amostras analisadas foram diluídas em tampão MES 50 mM pH 5,0. 20 µL de amostra foram aplicados em uma grade de cobre forrada com carbono e, após 5 min, a grade foi lavada com água Milli Q e, em seguida, as amostras foram contrastadas negativamente com acetato de uranila 2%, sendo o excesso removido com papel de filtro. As grades foram então observadas em um microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1200 (Boston, MA, EUA) sob uma voltagem de 80 kV.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação do efeito de Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} e DNA sobre o peptídeo PrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹

A função biológica da PrP ainda não foi desvendada, mas muitos estudos sugerem que essa função pode estar ligada à habilidade desta proteína em ligar íons Cu^{2+} com alta afinidade *in vivo* (BROWN E COLS., 1997). Já foram propostas inúmeras funções para a PrP em decorrência dessa interação, como regulação da homeostase de cobre (LEWIS & HOOPER, 2011) ou, ainda, que a PrP desempenhe uma função antioxidante dependente de cobre (NADAL E COLS., 2007), atuando como uma superóxido-dismutase, reduzindo o Cu^{2+} a Cu^+ nesse processo (VILES E COLS., 1999).

Além disso, estudos também demonstram que o cobre pode estar envolvido na patogênese das doenças por prion (PATTISON E COLS., 1971; BROWN E COLS., 1997; HIJAZI E COLS., 2003; SIGURDSSON E COLS., 2003). Nesse caso, os estudos apresentam resultados controversos. Apesar do cobre modular diversos processos bioquímicos, ainda não está claro se íons Cu^{2+} tem efeito benéfico ou deletério na progressão das doenças por prion ou ainda se é um excesso ou uma carência de Cu^{2+} que pode contribuir para o aparecimento da doença (QIN E COLS., 2000; QUAGLIO E COLS., 2001; HIJAZI E COLS., 2003; MILLHAUSER, 2004).

Todos esses resultados, apesar de contraditórios, indicam que o íon Cu^{2+} está envolvido na fisiopatologia das doenças por prion. Com o intuito de entender o papel do cobre na formação de PrP^{Sc} e na formação de agregados, estudamos o efeito desse íon sobre um peptídeo derivado da proteína do prion de hamster sírio, PrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹, que compreende os resíduos 109 a 149 desta proteína (ver Figura 3) e corresponde ao

domínio desenovelado e à primeira α -hélice da região N-terminal da PrP (ZHANG E COLS., 1995). Essa região está envolvida na conversão em folhas- β quando da formação de PrP^{Sc} (HUANG E COLS., 1996; GOVAERTS E COLS., 2004). Escolhemos trabalhar com este domínio da PrP, pois este peptídeo agrega prontamente em solução aquosa em pH abaixo de 6,0 quando diluído de uma condição desnaturante (CORDEIRO E COLS., 2001; CORDEIRO E COLS., 2004). Além disso, esse domínio contém um sítio de ligação a cobre já caracterizado, a histidina 111 que não faz parte do domínio octarepeat (BURNS E COLS., 2003). A região da His111 é também de grande importância, uma vez que, além de ligar cobre, também é uma região crítica para a transmissão da doença (PRUSINER E COLS., 1983; AGUZZI, 1996). Foi também demonstrado de que a His111 é importante para modular a mobilidade conformacional de peptídeos da PrP dependente de alterações no pH (RAGG E COLS., 1999). Mais recentemente, verificou-se que as metioninas adjacentes à His111 também são importantes para a coordenação do íon cobre neste sítio de ligação (SHEARER E COLS., 2008; RIVILLAS-ACEVEDO E COLS., 2011).

O peptídeo PrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹ apresenta um resíduo de triptofano que possibilita seu uso em medidas fluorimétricas. Quando incubado em ureia de 5 a 6M, este peptídeo mantém-se solúvel e não agregado; a agregação é alcançada quando ele é diluído em solução aquosa sem ureia em pH 4,0 ou 5,0 (CORDEIRO E COLS., 2001).

Avaliamos a agregação do PrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹ monitorando os valores de espalhamento de luz (EL) em função do tempo. Como controle negativo, a solução estoque do peptídeo foi diluída na presença de ureia a 6M, caracterizando a condição não agregada. Monitoramos o EL a 450 nm, pois nenhum dos componentes avaliados absorve luz nesse comprimento de onda.

A figura 8 mostra o resultado das cinéticas de agregação realizadas com o peptídeo PrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹ em várias concentrações onde o valor de 3,0 μM apresentou significativa agregação, apresentando um incremento nos valores de EL de aproximadamente 8 vezes maior do que o controle negativo de agregação (em 6M de ureia). Com base neste resultado, utilizamos o peptídeo na faixa de 3,0 a 5,0 μM para realizar as cinéticas de agregação ao longo deste trabalho.

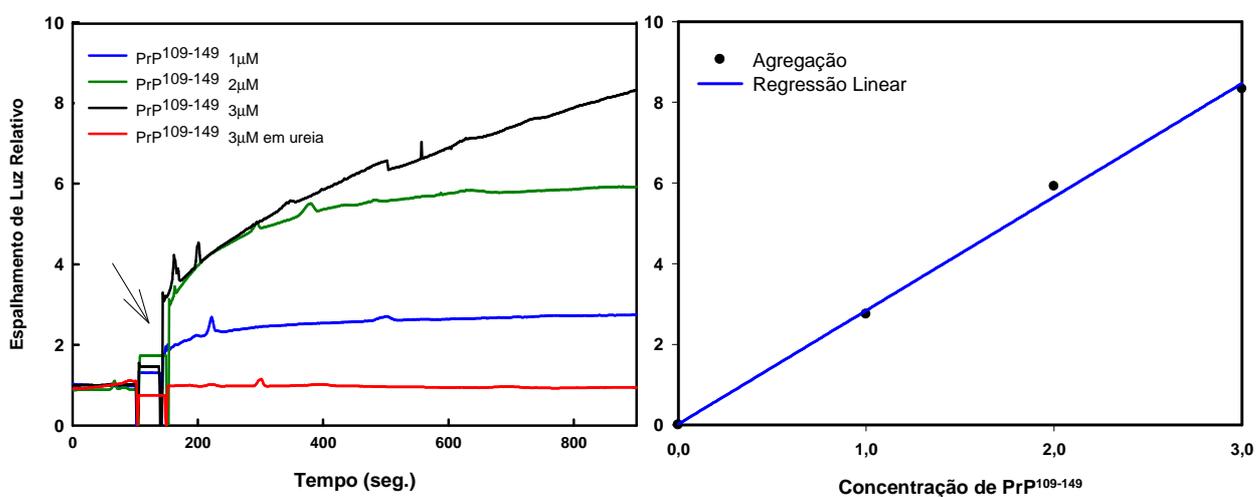


Figura 8: Agregação do peptídeo PrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹ em várias concentrações monitorada através de mudanças no espalhamento de luz. A, PrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹ foi diluído de uma solução contendo 6M de ureia em tampão a pH 5,0 com (linha vermelha) ou sem ureia (linha preta). A seta indica o momento em que o peptídeo foi adicionado na solução. Em B, temos a regressão linear dos dados obtidos em A. A agregação, avaliada através dos valores de EL, aumenta linearmente em função da concentração de peptídeo, $r^2=0,97$.

Após a padronização do ensaio de agregação, avaliamos a influência do cobre na agregação do peptídeo PrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹. A linha de base foi determinada a partir dos valores de EL da solução tampão com adição de CuCl_2 nas devidas concentrações em cada cinética. Em todas as concentrações de cobre empregadas (3 μM , 6 μM , 12 μM e 30 μM) houve a diminuição dos valores de EL (em relação ao peptídeo agregado), refletindo uma diminuição da agregação. Os valores de EL se mantiveram constantes

após a adição de CuCl_2 a $6 \mu\text{M}$, conforme demonstrado na figura 9.

Os resultados das cinéticas de agregação foram expressos em porcentagem de agregação ou de inibição deste processo em função da concentração de cobre (Figura 10). 100% de agregação corresponde ao valor máximo de EL quando o peptídeo é diluído em tampão na ausência de agentes desnaturantes ou de cobre e 0% de agregação quando o peptídeo é diluído em MES pH 5 na presença de 6 M de ureia.

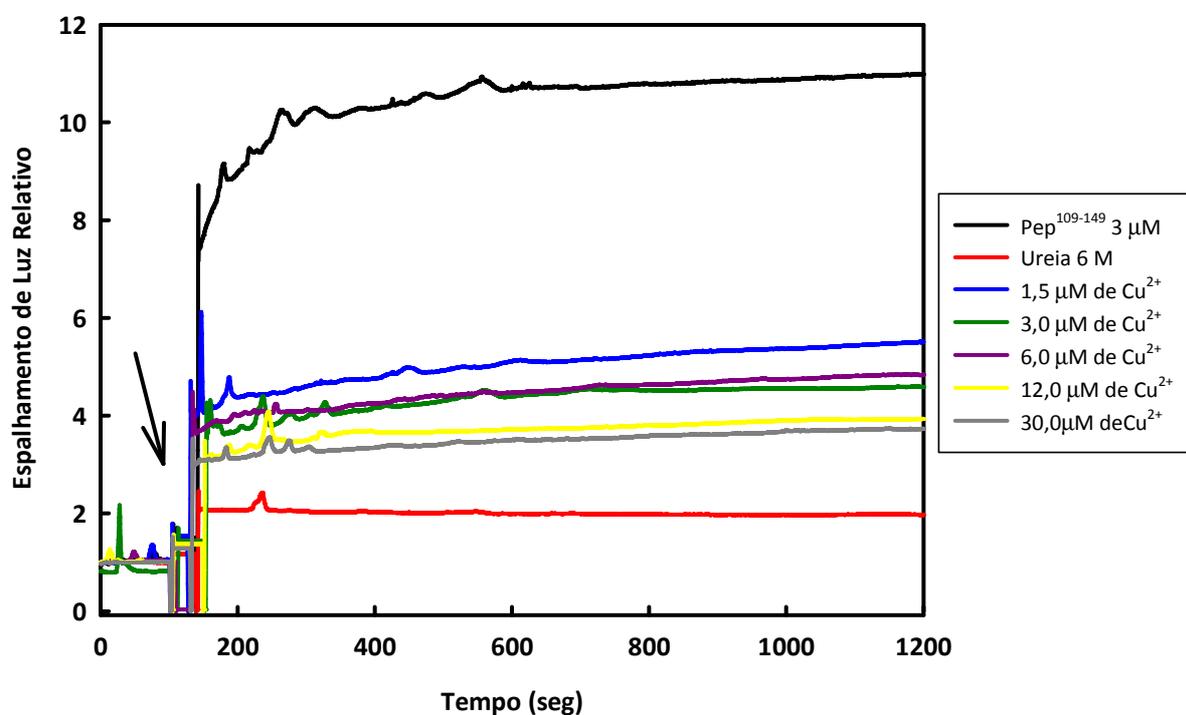


Figura 9: Cinética de agregação do peptídeo PrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹ na presença de Cu²⁺ (em várias concentrações) em função do tempo. O peptídeo foi mantido em solução de MES pH 5, SDS 10 mM, uréia 6 M, onde não se encontrava agregado. Para o início da cinética, ele foi diluído desta solução estoque na solução de medida (momento indicado pela seta no gráfico) a concentração final de $3 \mu\text{M}$ em diversas concentrações de CuCl_2 e os valores de EL a 450 nm foram coletados em função do tempo.

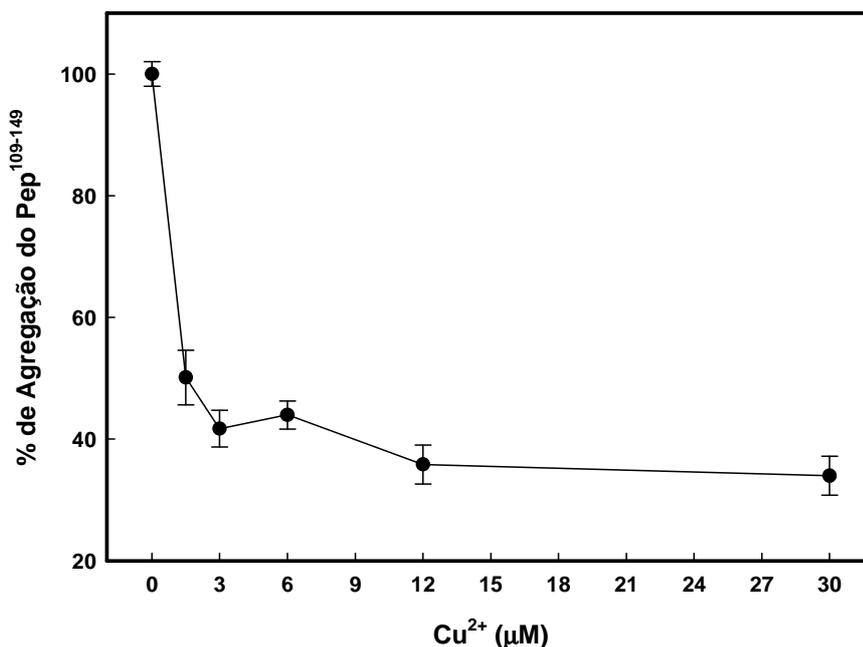


Figura 10: Extensão da inibição da agregação do peptídeo PrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹ em função da concentração de CuCl₂. O valor máximo de espalhamento de luz (a 450 nm) obtido em cada cinética (Figura 9) foi medido e normalizado relativo a um controle (valor de EL do peptídeo a 3μM sem uréia ou sem adição de CuCl₂) tomado como 100% de agregação (ou 0% de inibição). A barra de erro apresenta o valor do erro padrão médio.

Para avaliarmos se o efeito inibitório na agregação do peptídeo PrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹ era decorrente exclusivamente da presença de íons Cu²⁺ em solução, realizamos alguns controles. Avaliamos inicialmente a agregação do PrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹ na presença de cloreto de cobre, porém adicionando EDTA (ácido etileno diamino tetra-acético) e BCS (ácido batocuproíno dissulfônico) como agentes quelantes. O BCS (2,9-Dimetill-4,7-difenil-1,10-fenantrolina) é um quelante de Cu⁺ (LOWE E COLS., 2004) e o EDTA quelante de Cu²⁺ (DING E COLS., 2011).

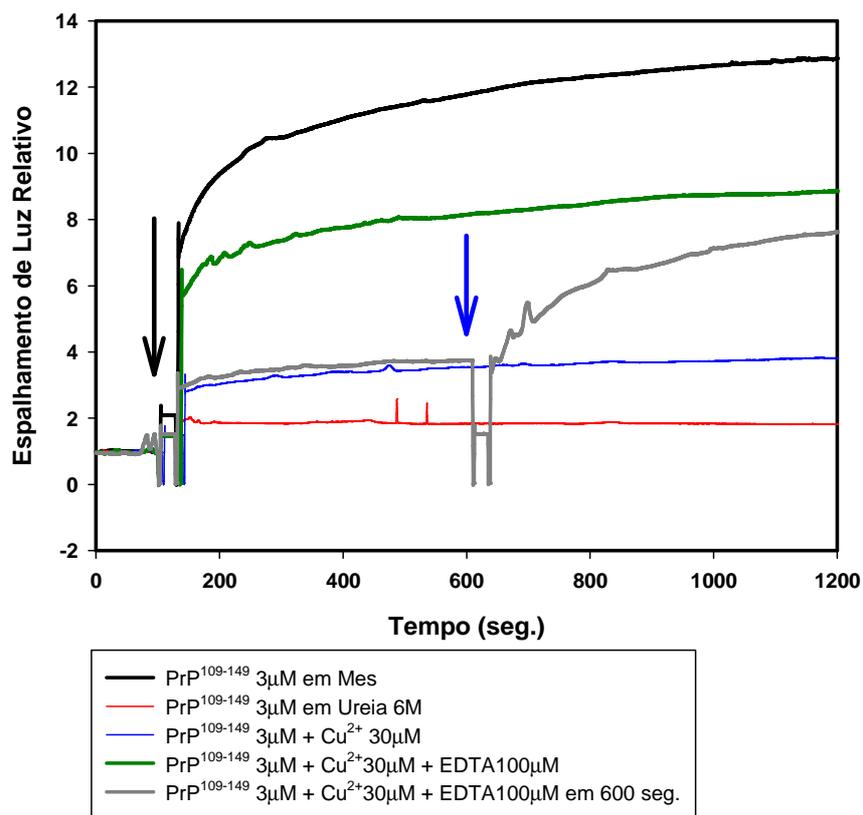


Figura 11: Cinética de agregação do peptídeo PrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹ na presença de Cu²⁺ a 30 μM na presença de EDTA. O peptídeo foi mantido em solução de MES pH 5,0, SDS 10 mM, uréia 6 M, onde não se encontrava agregado. Para o início da cinética, foi diluído desta solução estoque na solução de medida (momento indicado pela seta no gráfico) a concentração final de 3 μM e os valores de EL foram coletados em função do tempo. A seta azul indica o momento em que foi adicionado EDTA a 100 μM. Os resultados dos experimentos foram separados para melhor visualização. Os resultados foram normalizados e relativizados com relação à agregação do peptídeo em tampão MES sem adição de outros compostos.

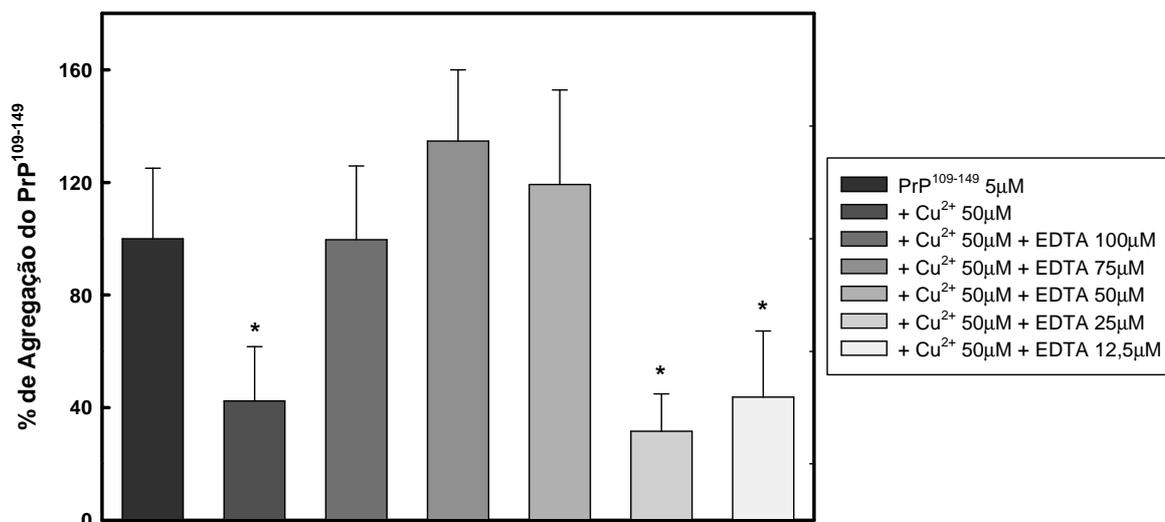


Figura 12: EDTA inibe o efeito anti-agregante de Cu²⁺ sobre o PrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹. Os resultados obtidos nas cinéticas são apresentados aqui assumindo-se 100% de agregação os valores de EL finais quando o peptídeo é diluído a 5 µM em tampão a pH 5,0 na ausência de Cu²⁺ ou EDTA. Foram realizados 3 experimentos e as barras de erro representam o erro padrão médio. A redução da agregação só foi significativa nas amostras que continham cobre livre * p<0.05, representa valores estatisticamente diferentes.

Os resultados demonstram claramente um efeito na inibição da agregação do peptídeo PrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹ que pode ser atribuído especificamente ao íon Cu²⁺, uma vez que a adição de EDTA e BCS preveniu o efeito anti-agregante do Cu²⁺ quando adicionados simultaneamente na solução inicial (Figura 11 e Figura 12).

Além disso, o EDTA foi ainda capaz de reverter a atividade anti-agregante do Cu²⁺ quando adicionado durante a cinética (Figura 11). Observamos também que em uma concentração abaixo da estequiométrica (1:1 EDTA:Cu²⁺), o EDTA não apresentou efeito sobre a atividade anti-agregante do Cu²⁺ (Figura 12). Ainda vimos que não se tratava de um efeito de força iônica, pois ao adicionar NaCl até 30 µM, não ocorreu nenhuma inibição significativa na agregação do peptídeo e o efeito do íon Cu²⁺ foi independente do sal de cobre utilizado, pois a inibição da agregação utilizando CuCl₂

ou CuSO_4 foi estatisticamente igual (Figura 13).

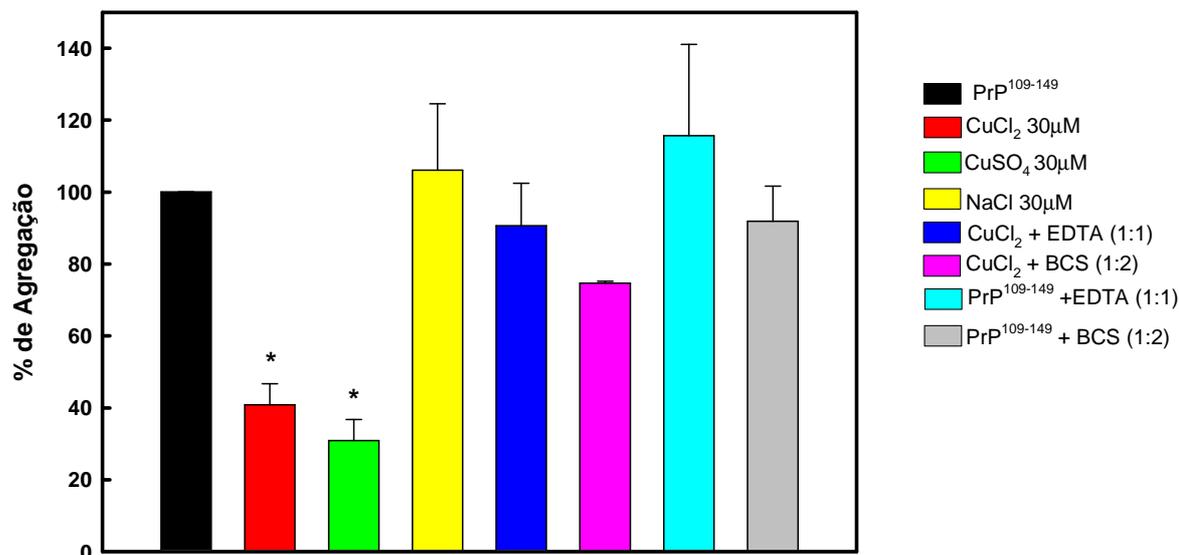


Figura 13: Controles para comprovação do efeito do Cu^{2+} na inibição da agregação do peptídeo PrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹. Os resultados obtidos nas cinéticas são apresentados aqui assumindo-se 100% de agregação os valores de EL finais quando o peptídeo é diluído a 5μM em tampão a pH 5,0 na ausência de qualquer ligante. Os resultados obtidos nas cinéticas foram subtraídos da cinética da ureia e foram normalizados em relação aos valores de EL iniciais (antes da adição do peptídeo). Foram realizados 3 experimentos e a barra de erro demonstra o valor do erro padrão médio. * $p < 0.05$, representa valores estatisticamente diferentes em comparação com o peptídeo PrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹.

Apesar do BCS ser um quelante de Cu^+ , quando o Cu^{2+} encontra-se ligado a biomoléculas (principalmente proteínas com resíduos de histidina, triptofano, tirosina e cisteína), esse pode ser capturado pelo BCS formando o complexo: $(\text{BCS})_2\text{-Cu}^{2+}$ (LIU E COLS., 2011), ou seja, provavelmente o BCS está conseguindo formar um complexo com o Cu^{2+} e com isso, vemos a inibição da sua atividade sobre o peptídeo PrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹ (Figura 13).

Já foi descrito por vários grupos de pesquisa que o íon Cu^{2+} pode interagir com a PrP e com domínios isolados da PrP em diferentes faixas de pH e em diferentes concentrações de cobre. A afinidade de fragmentos peptídicos da PrP correspondendo

à região octarepeat e da PrP inteira à Cu^{2+} foi reportada na faixa de 0,5 a $15\mu\text{M}$ (HORNSHAW E COLS., 1995; STOCKEL E COLS., 1998). Embora diversos grupos tenham reportado que a PrP perde afinidade à cobre em valores de $\text{pH} < 6,0$ (VILES E COLS., 1999; RIVILLAS-ACEVEDO E COLS., 2011), nós verificamos que a agregação e estrutura do peptídeo PrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹ é afetada por Cu^{2+} em $\text{pH} 5,0$. Apesar de não termos realizado medidas comprobatórias que mostrem a coordenação a cobre pelo peptídeo, como EPR, voltametria cíclica, ou absorção atômica, nossos resultados sugerem fortemente que tal interação ocorre. Além disso, existem dados na literatura que suportam os efeitos observados ao longo desta dissertação. Trabalhos de Klewpatinond e Viles apresentaram evidências de que em valores de pH abaixo de 4,0 pode ser formado um complexo com a histidina (KLEWPATINOND & VILES, 2007). Em pH neutro (7,4), o Cu^{2+} se ligaria individualmente em cada histidina e também seria coordenado pela amida da glicina (Figura 14). Diferentes valores de pH (que ocorrem naturalmente nos ambientes intra e extracelular) e diferentes concentrações de Cu^{2+} podem afetar o modo de coordenação, o que implicaria na afinidade, na estrutura e nas propriedades redox dessa interação (MILLHAUSER, 2007; NADAL E COLS., 2007). Também foi observado que a região entre os resíduos 106 e 114 é responsável pela alta afinidade da PrP ao íon cobre (SHEARER & SOH, 2007).

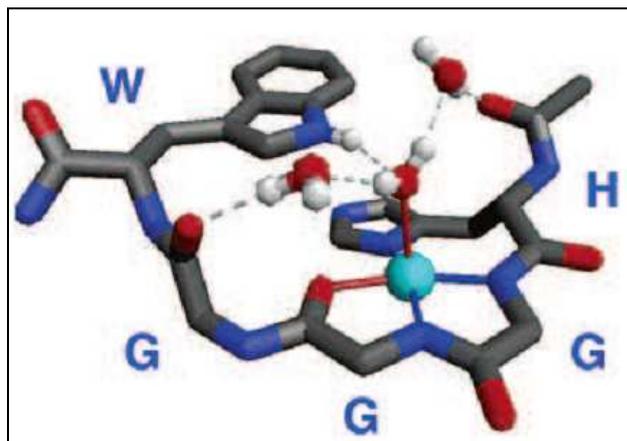


Figura 14: Estrutura cristalográfica do complexo Cu-HGGGW. Em pH 7,4 o Cu^{2+} é coordenado equatorialmente pelo imidazol da His, por amidas deprotonadas das glicinas vizinhas e pela carbonila da segunda glicina. Além disso, o NH do indol está a uma distância passível de realizar ligação de H com o oxigênio da H_2O axial. Duas águas ordenadas intramolecularmente estão também representadas (Figura retirada de (MILLHAUSER, 2004)).

Foi verificado também, através de medidas de potenciometria, que peptídeos da PrP coordenavam Cu^{2+} a pH abaixo de 5,5 (OSZ E COLS., 2007). Esse mesmo grupo calculou os valores de pKa das cadeias laterais de His (imidazol) do peptídeo PrP(84-114) e obteve valores médios de 6,18 a 6,28, ou seja, as histidinas podem estar desprotonadas em faixa de pH de 5 a 7 (OSZ E COLS., 2007). Com base neste resultado, foi proposto que, abaixo de pH 5,5, os nitrogênios doadores do imidazol são os sítios exclusivos de ligação ao metal e (Figura 15), acima deste valor de pH, a coordenação se daria também através da amida da cadeia polipeptídica (Figura 14). Ainda, apesar de Cu^{2+} livre ter sido a espécie majoritária quando o pentapeptídeo GGGTH (contendo a His96) foi incubado com cobre a pH < 6,0, foi identificada também a presença de um complexo equimolar (peptídeo:cobre) (HUREAU E COLS., 2006).

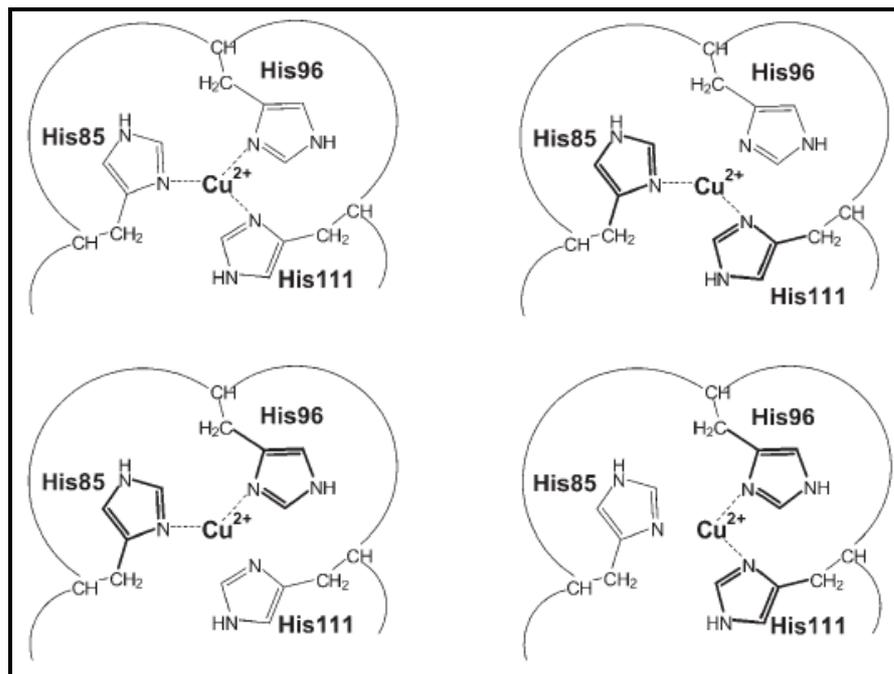


Figura 15: Esquema para possíveis modos de coordenação a cobre pelo peptídeo Hu(84-114) em valores de pH $\leq 5,5$. (Figura retirada de (OSZ E COLS., 2007).

Estes resultados apóiam nossos dados que sugerem que o peptídeo PrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹, que contém a His111, liga Cu^{2+} a pH 5,0. Como neste valor de pH as amidas da cadeia polipeptídica estão protonadas, provavelmente a coordenação a cobre pelo peptídeo deve ocorrer através de grupamentos imidazóis da His111 de mais de um peptídeo, que compartilhariam o mesmo íon. Além disso, a His140, que não é reportada como sítio de ligação a Cu^{2+} na PrP, pode estar participando também da coordenação a cobre nos nossos ensaios. Este resultado é interessante, pois é um forte indício de que em pH 5,0 está ocorrendo coordenação a cobre pelo peptídeo da PrP. A inibição da agregação mediada por Cu^{2+} indica que esta região hidrofóbica da PrP é estabilizada pela interação com este íon, impedindo que interações proteína-proteína sejam majoritárias.

A inibição da agregação é um evento desejável, pois esta região da PrP

contribui fortemente para a infecciosidade das doenças por prion e a agregação é um dos fatores ligados a patogênese (PRUSINER, 1998). Em concordância com nossos resultados, foi verificado que Cu^{2+} inibiu a formação de fibras amiloides por uma forma truncada da PrP (PrP89-230) (BOCHAROVA E COLS., 2005).

Outros trabalhos demonstraram um efeito inverso do papel do Cu^{2+} na agregação da proteína do prion, como em 2007, onde foi reportado que o domínio 90-231 da PrP forma duas espécies oligoméricas de aproximadamente 25 e 100 monômeros na presença de cobre (REDECKE E COLS., 2007). Nossos estudos reforçam o quanto controverso ainda é o papel do cobre na fisiopatologia da PrP. Porém, com o nosso modelo de estudo, ficou claro a inibição da agregação, o que nos motivou a procurar as respostas para esses resultados, os quais serão apresentados ao longo do trabalho.

Como a alteração da estrutura da PrP em uma estrutura rica em folhas- β é o ponto chave para a formação dos agregados, resolvemos observar o efeito do Cu^{2+} na estrutura do peptídeo PrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹. Através da técnica de dicroísmo circular avaliamos alterações na estrutura secundária do peptídeo PrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹ na presença de CuCl_2 . Quando avaliamos o peptídeo em solução tampão pH 5,0 na ausência de cobre, observamos um valor de elipicidade negativo a ~ 220 nm, que sugere a presença de uma estrutura em folhas- β (JOHNSON, 1988); (YANG E COLS., 1996). Este resultado era esperado, uma vez que esse peptídeo está agregado nesta condição. Após a adição de 5 equivalentes de cobre podemos observar uma pronunciável perda de estrutura secundária, conforme mostrado na figura 16.

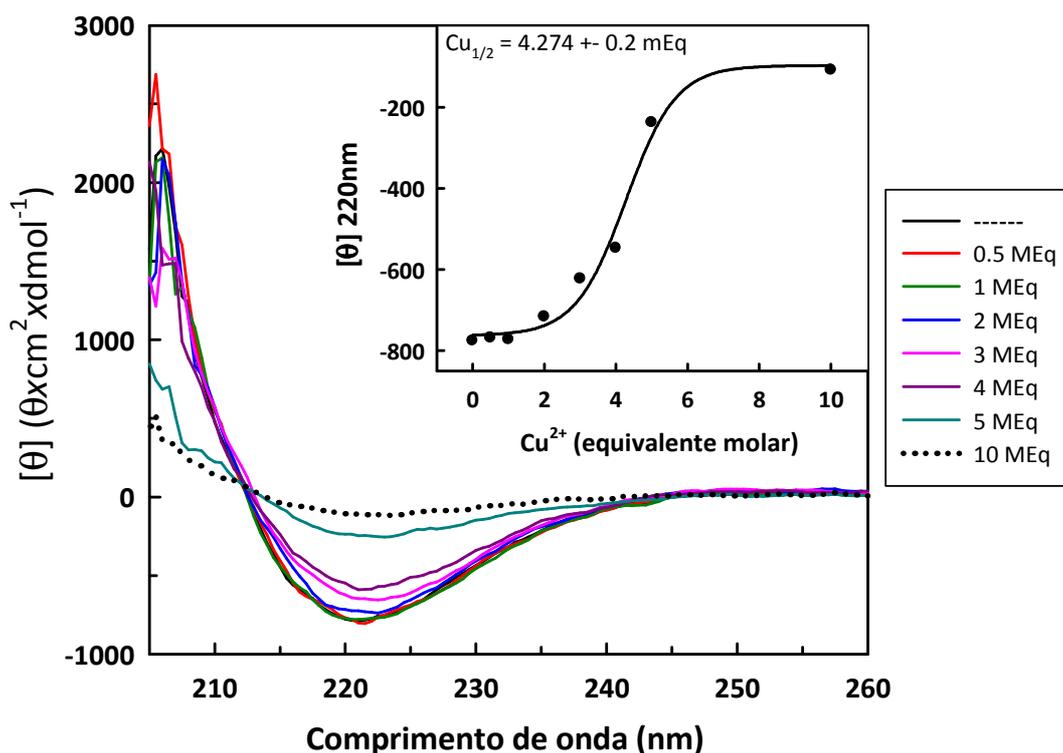


Figura 16: Estrutura secundária do peptídeo PrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹ na presença de concentrações crescentes de **cobre**. No gráfico temos a elipicidade molar do peptídeo em função do comprimento de onda. Inseto: elipicidade a 220 nm em função da concentração de Cu²⁺. O peptídeo foi avaliado a 100 μM em tampão Mes pH 5,0. Foi utilizada cubeta de 1,0 mm de caminho óptico. Os espectros mostram a média de 3 acumulações e foram subtraídos do respectivo espectro do tampão.

Alguns trabalhos demonstram que o íon Cu²⁺ apresenta alta afinidade por peptídeos fora do domínio octarepeat e que esse íon se liga às His111 e 96 (revisto em Walter e cols., 2009). Foi verificado que a coordenação a cobre pelo peptídeo compreendendo resíduos 91 a 115 da PrP induziu um ganho de estrutura em folhas-β (JONES, 2004), o que não foi verificado por nós para o peptídeo PrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹. Entretanto, é importante ressaltar que este grupo realizou as medidas de CD a pH 8,4, o que certamente altera a afinidade por cobre pela construção protéica. Como já discutido acima, fatores diversos como a faixa de pH e a concentração de Cu²⁺ utilizada levam a interpretações diferentes sobre o modo de coordenação e sobre a geração de uma

estrutura rica em folhas- β (JONES E COLS., 2004; VILES E COLS., 2008).

Como já discutido ao longo desta dissertação, o papel do Cu^{2+} na conversão estrutural permanece obscuro. Além do entendimento sobre o efeito do Cu^{2+} no processo de conversão $\text{PrP}^{\text{C}}\text{-PrP}^{\text{Sc}}$, temos que levar em consideração o efeito do Cu^{2+} em uma estrutura já agregada, ou seja, que já apresenta uma estrutura rica em folhas- β . No resultado apresentado acima, investigamos o efeito de íons cobre a pH 5,0, pois queríamos manter o peptídeo $\text{PrP}^{109-149}$ em uma condição agregada, uma vez que esse domínio é de extrema importância para a conversão estrutural que leva à agregação (HUANG E COLS., 1996; GOVAERTS E COLS., 2004). O Cu^{2+} , além de diminuir a agregação (Figura 9), também causou perda de conteúdo de estrutura secundária da PrP, ratificando sua ação nesse sistema (Figura 16).

Já está bem estabelecido que a proteína do prion é uma metaloproteína (BROWN E COLS., 1997; COLLINGE, 1999; KRETZSCHMAR E COLS., 2001; NADAL E COLS., 2009) e que a ligação à cobre ocorre principalmente no domínio N-terminal, principalmente na região octamérica e também em outros dois sítios fora do domínio octarepeat (His96 e His111) (WALTER E COLS., 2009). Além disso, foi recentemente caracterizado um sítio de ligação a cobre na região C-terminal, a His186 da PrP de camundongo (WATANABE E COLS., 2010). Entre os metais estudados, o cobre é o íon mais estudado e apresenta estudos que demonstram a sua ligação, afinidade e efeitos na proteína do prion através de diversas técnicas e modelos experimentais (BROWN E COLS., 1997; COLLINGE, 1999; BROWN, 2005; WALTER E COLS., 2006; BROWN, 2009B), além de uma grande variedade de fragmentos da PrP (VILES E COLS., 1999; GAGGELLI E COLS., 2005). Entretanto, outros artigos reportam a interação da PrP com outros íons metálicos que também

estão presentes no sistema nervoso central. Com isso, resolvemos avaliar a interação do peptídeo PrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹ com Zn²⁺, Mn²⁺ e Mg²⁺ em comparação com o efeito do Cu²⁺ visto previamente. As cinéticas foram realizadas nas mesmas condições já descritas para as cinéticas com o Cu²⁺ (Figura 17).

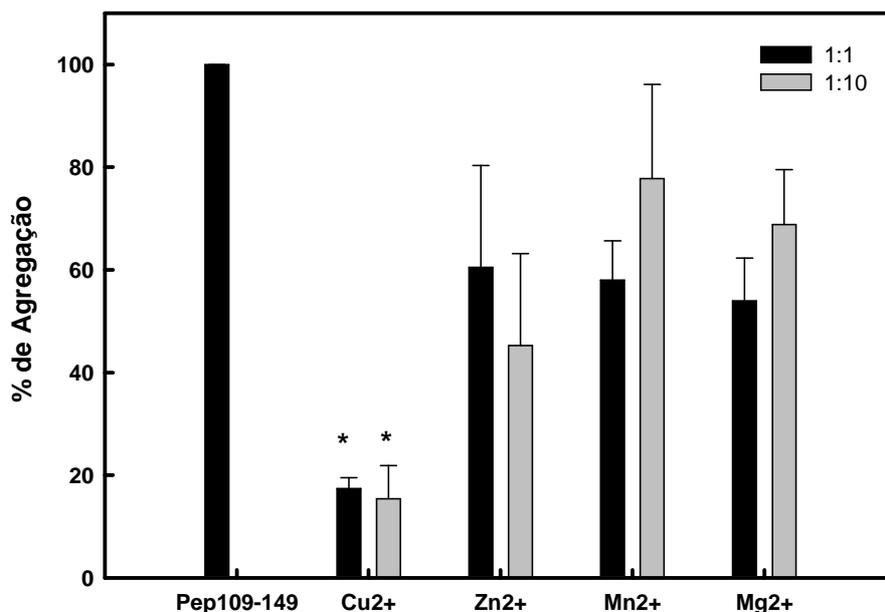


Figura 17: Efeito do Cu²⁺, Zn²⁺, Mn²⁺ e Mg²⁺ na agregação do PrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹ através da avaliação do espalhamento de luz. O peptídeo PrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹ (a 5 μM) foi testado na presença de todos os íons, todos na concentração de 5 μM e 50 μM e na forma de cloreto. Os dados foram normalizados em relação aos valores de EL do peptídeo em Mes pH 5,0 e subtraídos do espalhamento do peptídeo diluído em ureia. * P<0.05.

Os resultados sugerem que os íons avaliados apresentam efeito semelhante, reduzindo a agregação do peptídeo PrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹, porém este efeito é mais pronunciado com o íon Cu²⁺ e o resultado para os demais íons não foi significativo.

Esses resultados mostram que somente íons Cu²⁺ inibem significativamente a agregação do domínio 109-149 da PrP. Os demais íons estudados não foram capazes de gerar o mesmo efeito nem em concentrações 10 x maiores. Através desse resultado não podemos afirmar que não haja ligação entre os demais íons e o PrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹, pois esta

interação pode estar ocorrendo mas sem resultar no efeito causado pelo íon Cu^{2+} .

Sobre a interação da PrP com Zn^{2+} , Mn^{2+} e Mg^{2+} temos que Zn^{2+} também pode induzir a internalização da PrP, porém a afinidade de ligação da PrP ao zinco é menor do que ao Cu^{2+} (BROWN, 2009A). Para o Mn^{2+} , alguns estudos demonstraram a interação desse íon com um peptídeo similar ao PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ e que essa interação está centrada na His111 (JACKSON E COLS., 2001; GAGGELLI E COLS., 2005). Entretanto, não existem evidências de que a esse íon esteja relacionado à função da PrP e nem que cause alterações estruturais específicas na PrP, assim como o Mg^{2+} (CHOI E COLS., 2010).

Como observamos acima (Figuras 9 e 10), a adição de cobre provocou uma diminuição na formação de agregados. Com isso, avaliamos se a interação do cobre e dos demais íons teria influência na formação de agregados amiloides através de um ensaio com o fluoróforo tioflavina T (TioT). A tioflavina T é um fluoróforo que se liga a fibras amiloides que são ricas em folhas- β e, nas doenças por prions, como em outras doenças neurodegenerativas, é característica a formação desse tipo de agregado proteico (NAIKI E COLS., 1989; CHITI & DOBSON, 2006). Quando a tioflavina T está ligada à fibra amiloide, há um considerável incremento em sua emissão de fluorescência a 482 nm (NAIKI E COLS., 1989), quando excitada a 450 nm.

Ao incubarmos a TioT com amostras do peptídeo PrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹ incubadas com os diferentes íons metálicos, verificamos que somente na presença de Cu^{2+} houve redução significativa da emissão de fluorescência da TioT (Figura 18).

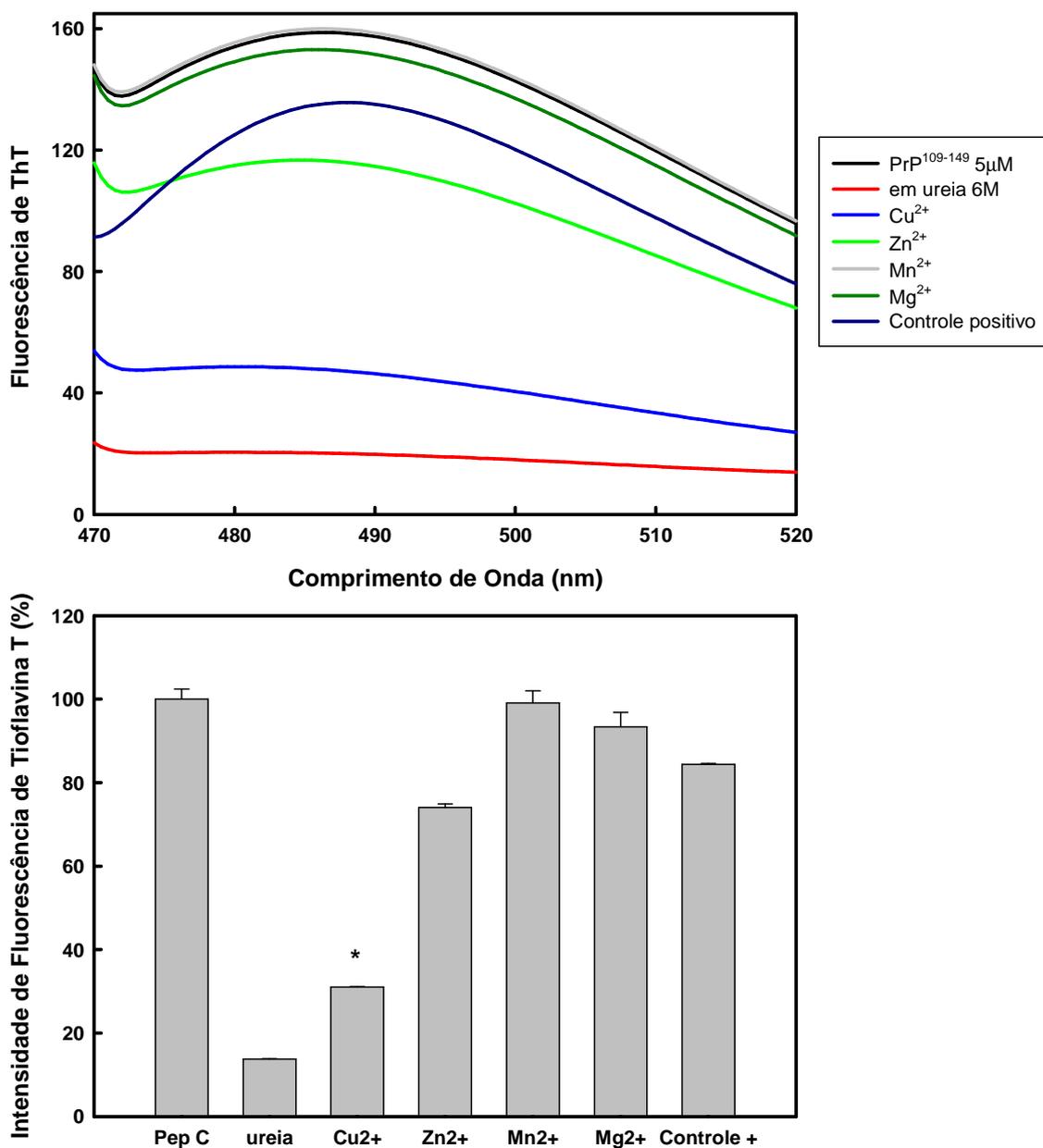


Figura 18: Análise da ligação a tioflavina T pelo peptídeo PrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹. **A)** A TioT foi incubada com as amostras em concentração final de 20μM. As amostras foram excitadas a 450 nm e a emissão de fluorescência de TioT foi monitorada de 470 a 520 nm. As medidas foram realizadas em tampão MES 50mM pH 5,0 e os peptídeos foram adicionados na concentração final de 5μM, e os íons todos na forma de sais de cloreto. **B)** Área de emissão de fluorescência da TioT subtraída pela emissão de TioT na presença do peptídeo em 6M de ureia (controle negativo de agregação). Como controle positivo, utilizamos a proteína α-sinucleína previamente agregada em fibras amiloides. * P<0.05.

Esse resultado corrobora o efeito de íons cobre na redução da agregação vista nos experimentos anteriores. Podemos verificar que há diminuição da formação de agregados amiloides especificamente, mas não podemos descartar que há formação de agregados amorfos, que não são revelados pela TioT. É importante ressaltar que, apesar das doenças por prion serem caracterizadas como doenças amiloidogênicas (que envolvem a presença de fibras amiloides), na grande maioria dos casos não há a detecção de fibras amiloides no SNC de indivíduos/animais acometidos pelas EETs, e sim se observa agregados amorfos (Prusiner, 1998).

De acordo com esses resultados, a diminuição da agregação promovida por Cu^{2+} não se resume apenas a uma diminuição da formação de agregados amorfos, mas também de agregados mais organizados que se ligam à TioT. Temos um efeito discreto também promovido pelo íon Zn^{2+} , porém esse resultado não foi tão evidente quando comparado ao efeito do Cu^{2+} , o que confere com as informações da literatura, onde foi visto que a PrP^C liga Cu^{2+} e Zn^{2+} , porém não apresenta indícios de interação específica com Mg^{2+} e Mn^{2+} (LEHMANN, 2002). Outro indício também foi visto em um trabalho com a PrP recombinante onde foi avaliado o efeito dos íons na sua conversão em fibras amiloides verificou-se que apenas Cu^{2+} e Zn^{2+} apresentaram efeito inibitório, enquanto Mn^{2+} não (BOCHAROVA E COLS., 2005).

Em suma, nossos dados mostram claramente que a agregação do peptídeo $\text{PrP}^{109-149}$ é influenciada pelo íon Cu^{2+} especificamente, o que foi visto através das medidas de espalhamento de luz e ligação à TioT e ainda vemos que esse efeito está ligado a uma perda de estrutura secundária em folhas- β (Figura 19).

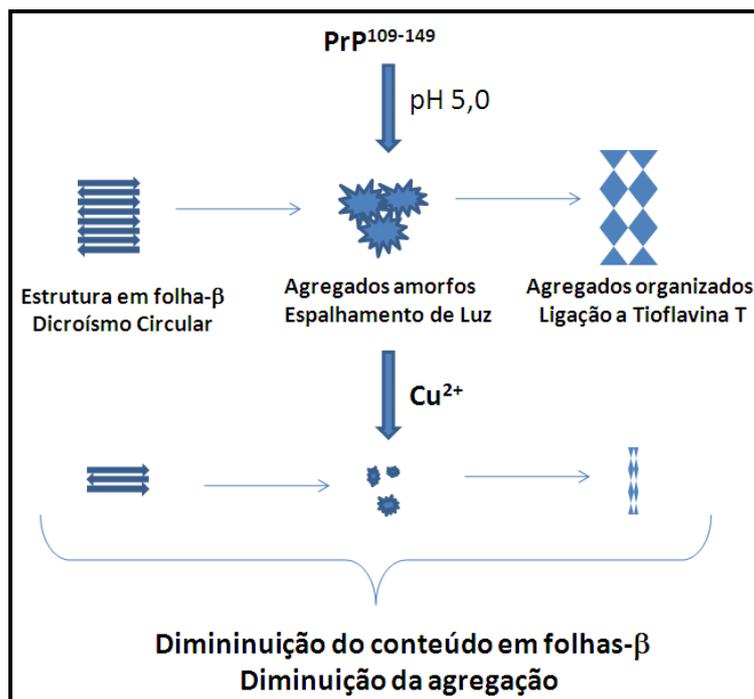


Figura 19: Resumo dos efeitos do íon Cu^{2+} na estrutura e na agregação do peptídeo $\text{PrP}^{109-149}$. Na primeira parte do esquema podemos observar que o peptídeo $\text{PrP}^{109-149}$ agrega a pH 5,0 e apresenta uma estrutura rica em folhas- β ; além disso, o agregado formado é capaz de se ligar à TioT, demonstrando que não ocorre a formação apenas de agregados amorfos mas também de agregados mais organizados. A presença de Cu^{2+} , demonstrada na segunda parte do esquema, inibe todos esses processos, reduzindo a agregação e gerando uma estrutura com menor conteúdo de folhas- β .

Como o íon Cu^{2+} se mostrou capaz de modular a agregação do peptídeo $\text{PrP}^{109-149}$, avaliamos também como esse sistema se comporta na presença de DNA. Ácidos nucleicos já foram caracterizados com ligantes da PrP tanto no domínio C-terminal (Lima e cols., 2006) quanto no domínio N-terminal (GOMES E COLS., 2008A). Foi demonstrado que a ligação da PrP^C ao Cu^{2+} favorece a internalização da proteína (PAULY & HARRIS, 1998; PERERA & HOOPER, 2001; YIN E COLS., 2009). Com isso, é importante avaliar o efeito na estrutura e agregação da PrP promovido pela sua interação com o Cu^{2+} na presença também de ácidos nucleicos, uma vez que, no ambiente celular, ambos ligantes poderiam interagir com a PrP. É provável que a interação da PrP^C com

ácidos nucleicos se dê com a mesma já ligada a Cu^{2+} e nosso objetivo, portanto, foi verificar se o efeito de um ligante sobre a PrP é modulado pela presença do outro ligante (DNA ou íons cobre).

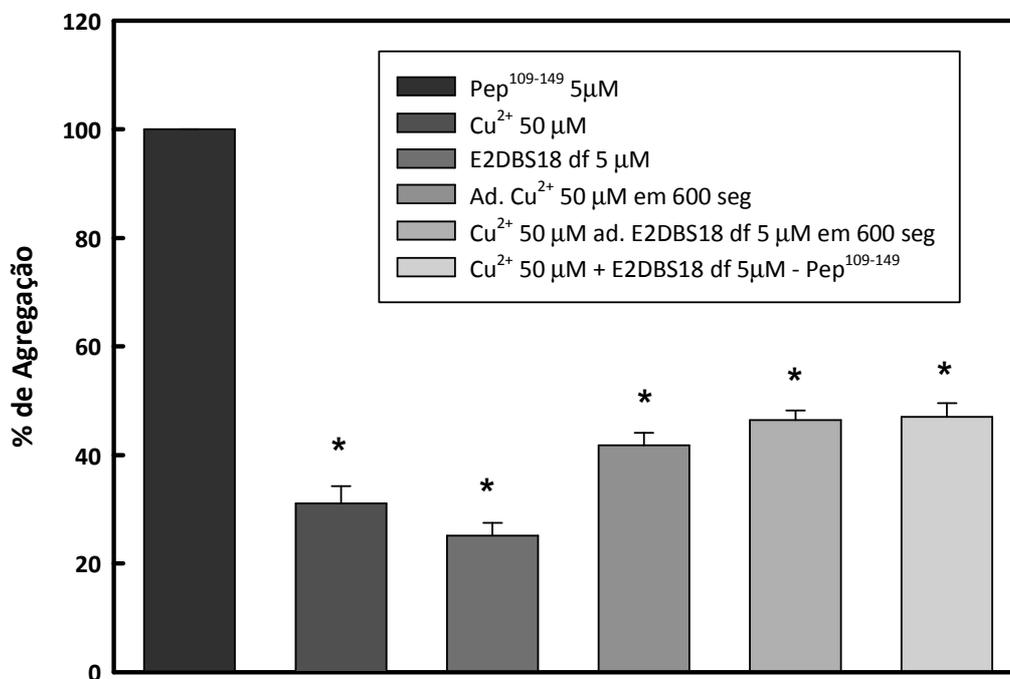


Figura 20: Avaliação da agregação do peptídeo PrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹ na presença de Cu^{2+} e DNA. A agregação foi avaliada na presença de DNA (E2DBS18 DF), de íons Cu^{2+} e na presença de DNA e Cu^{2+} , todos na mesma concentração do peptídeo (5μM). As barras mostram o % de agregação obtido em relação ao valor de 100% (considerado para o peptídeo em MES pH 5,0 na ausência de ligantes). Todos os dados foram subtraídos do valor de EL do peptídeo na presença de ureia a 6M. * P<0.05.

Utilizamos ao longo deste trabalho sequências de DNA fita-dupla já descritas como ligantes da PrP recombinante (CORDEIRO E COLS., 2001; LIMA E COLS., 2006; MARQUES E COLS., 2009). Como podemos observar na Figura 20, o efeito do DNA na inibição da agregação do PrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹ é mais evidente do que o de íons Cu^{2+} . Quando adicionamos os dois ligantes, independente da ordem de adição, vemos uma inibição da agregação menos pronunciada quando comparada ao efeito de cada ligante individualmente (Figura 18). Este resultado pode ser explicado pela possível interação entre os ligantes

(Cu^{2+} e DNA) onde o efeito final na agregação do peptídeo se torna antagônico. Ainda, a formação de um complexo cobre:DNA pode ocasionar a redução de atividade do DNA na agregação do PrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹, pela redução da interação do DNA com o peptídeo.

Como já havia sido reportado que a tioflavina T interage com DNA, apresentando incremento em sua emissão de fluorescência (CANETE E COLS., 1987), não pudemos utilizar o ensaio de ligação a TioT para avaliar a morfologia dos agregados na presença de ácidos nucleicos. Avaliamos, então, a morfologia dos agregados por microscopia eletrônica de transmissão (MET) (Figura 21).

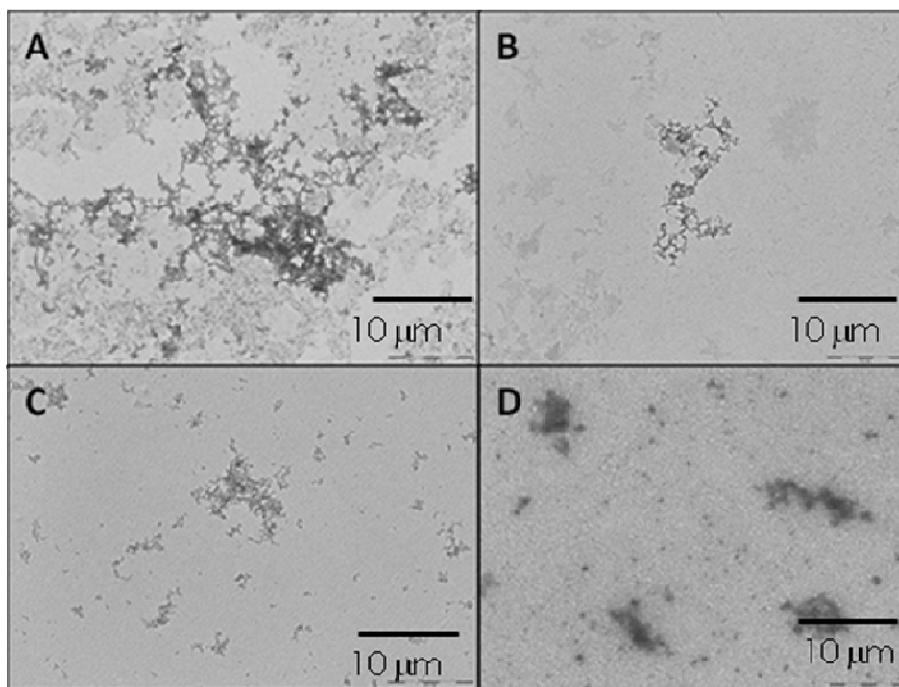


Figura 21: Análise da morfologia dos agregados por microscopia de transmissão eletrônica. A) Agregados do peptídeo PrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹ em pH 5,0. **B)** Peptídeo: Cu^{2+} (1:1). **C)** Peptídeo:DNA poliGC21-df (1:1). **D)** Peptídeo na presença de 1 equivalente molar de cobre e DNA (Poli GC 21 DF). Em todos os painéis a concentração do peptídeo foi 10 μM . Barras de escala = 10 μm .

Vimos que o peptídeo PrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹ forma agregados amorfos (porém com uma estrutura organizada e com pequenas fibrilas) (Figura 21A). Na presença de Cu^{2+} esses agregados foram menos evidentes e com uma morfologia diferente (menos

organizada) (Figura 21B). Na presença de DNA sozinho (Figura 21C) e de Cu^{2+} e DNA (Figura 21D), a agregação foi reduzida drasticamente e apenas alguns agregados foram observados, além disso, interessante, vemos a presença de pequenos oligômeros. Os resultados observados por MET corroboraram os obtidos nas cinéticas de agregação.

Como ambos os ligantes investigados interferem na agregação e na morfologia do peptídeo $\text{PrP}^{109-149}$, avaliamos a presença de ambos na estrutura desse peptídeo através de dicroísmo circular (DC).

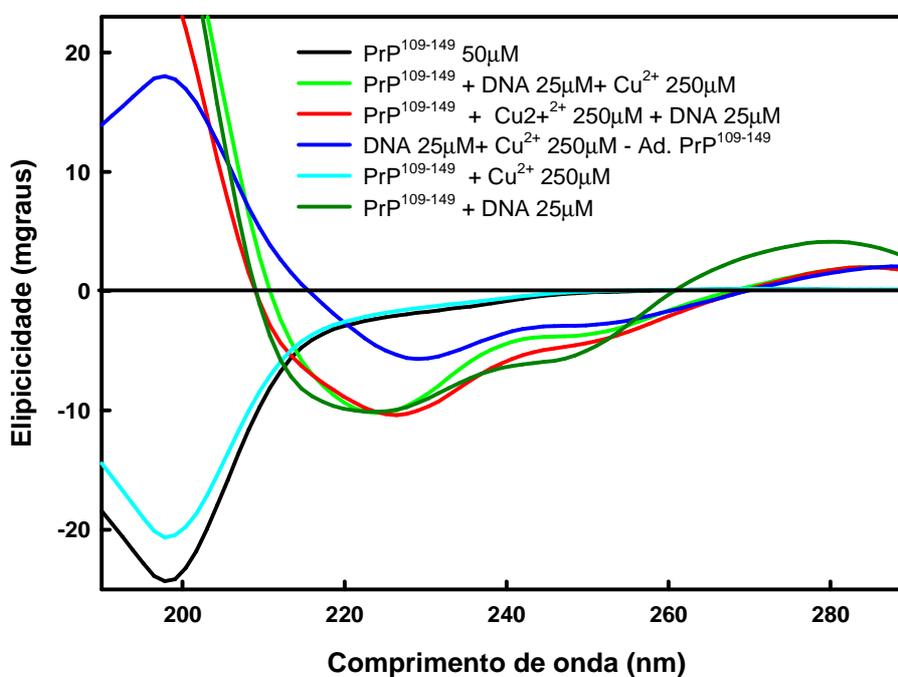


Figura 22: O efeito do Cu^{2+} e DNA na estrutura secundária do peptídeo $\text{PrP}^{109-149}$. O peptídeo $\text{PrP}^{109-149}$ foi preparado na concentração de $50\mu\text{M}$ em tampão MES pH 5,0, A solução de cobre foi analisada numa concentração de $250\mu\text{M}$ e o DNA (E2DBS36-df) na concentração de $25\mu\text{M}$. Foi utilizada cubeta de 2,0 mm de caminho óptico. Os espectros mostram a média de 3 acumulações.

Nessa análise mantivemos o peptídeo em uma condição não agregada, onde este apresentou uma estrutura desordenada (Figura 22). Com a adição de 5 equivalentes de Cu^{2+} , não observamos alterações significativas no perfil de DC,

somente observamos uma redução no sinal a ~ 198 nm (Figura 22, ciano). Com a adição de DNA a esse complexo (peptídeo:cobre), vimos a formação de uma estrutura rica em folhas- β (Figura 22, vermelho). Realizamos também a adição dos ligantes em diferentes ordens, para verificar se a adição de um segundo ligante ao peptídeo já carregado poderia gerar um resultado diferente, como o deslocamento de um ligante e reversão do efeito observado. Neste caso, porém, observamos que, independente da ordem de adição do DNA, na presença ou na ausência de cobre, o efeito do DNA sobre o peptídeo foi preponderante (Figura 22).

É importante citar que o Cu^{2+} altera o espectro de DC do DNA (Figura 23), indicando que ocorre uma interação entre os ligantes. Entretanto, somente a alteração do espectro de DNA não foi responsável pela diferença vista no espectro do peptídeo PrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹, pois a soma dos espectros individuais (peptídeo e DNA:cobre) (não mostrado) não demonstrou uma sobreposição com o espectro do peptídeo incubado com os ligantes (DNA e cobre).

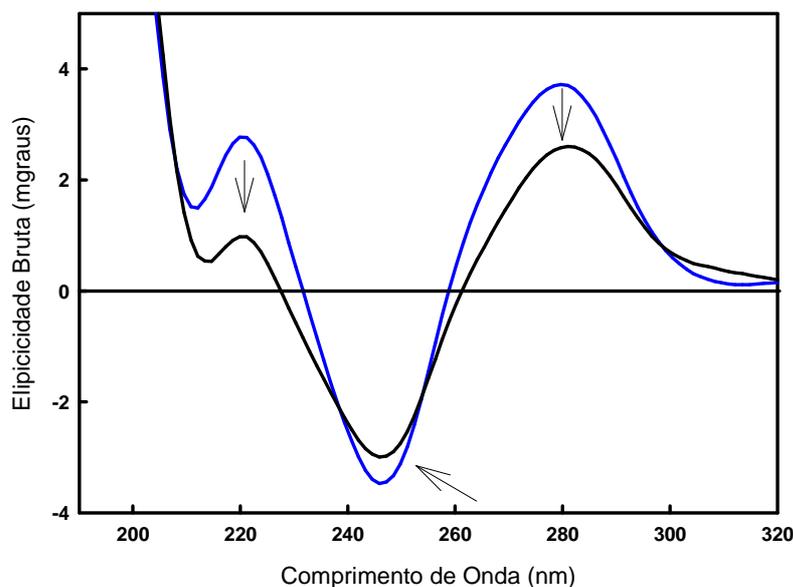


Figura 23: Efeito do íon Cu^{2+} no espectro de DC do DNA. Em azul está representado o espectro de DNA livre (E2DBS36 df – $50\mu\text{M}$) e, em preto, o espectro de DNA na presença de Cu^{2+} . As setas indicam o sinal de DC do DNA e as respectivas mudanças em função da adição de cobre. A solução de cobre foi diluída em tampão Mes pH 5,0 numa concentração de $250\mu\text{M}$ e o DNA (E2DBS36-df) na concentração de $25\mu\text{M}$. Foi utilizada cubeta de 2,0 mm de caminho óptico. Os espectros mostram a média de 3 acumulações.

É importante investigar se o DNA é capaz de modificar a interação do peptídeo com cobre, ou ainda de deslocar o cobre já ligado ao $\text{PrP}^{109-149}$. Realizamos ensaios com o reagente Zincon (SABEL E COLS., 2010) para determinarmos a quantidade de cobre livre em cada caso (peptídeo agregado, solúvel ou na presença de DNA). Entretanto, na faixa de concentração investigada por nós, não foi possível detectar cobre livre no sobrenadante, após a precipitação do peptídeo previamente agregado. Sendo assim, até o momento, não temos como precisar se o DNA, ao se ligar ao peptídeo carregado com cobre, desloca o cobre ligado. Outra possibilidade é de que na presença de DNA, o modo de coordenação a cobre pelo peptídeo seja alterado. Essa informação pode ser obtida a partir de ensaios de ressonância paramagnética eletrônica (EPR) que estão sendo realizados em colaboração com o grupo da Profa. Liliana Quintanar, CINVESTAV,

México.

A ligação da PrP com ácidos nucleicos, especificamente com sequências de DNA, foi reportada pelo nosso grupo (CORDEIRO E COLS., 2001) e, desde então, diversos trabalhos foram publicados sugerindo a importância dessa interação (CAUGHEY & KOCISKO, 2003; DELEAULT E COLS., 2005; SILVA E COLS., 2008). Sendo o íon Cu^{2+} um ligante fisiológico da PrP e visto que efeitos individuais de Cu^{2+} e DNA são diferentes na estrutura e similares na agregação do peptídeo PrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹ (CORDEIRO E COLS., 2001), faz-se importante o entendimento acerca da interação e do efeito gerado mediante a presença de ambos ligantes. O mecanismo preciso pelo qual Cu^{2+} e também DNA modulam a agregação da PrP e de peptídeos derivados desta proteína ainda não está entendido. Além disso, ambos os ligantes induzem alterações conformacionais na PrP e em seus peptídeos. Sendo assim, se faz necessário investigar estas interações em um ambiente no qual a proteína do príon e seus domínios sejam expostos a ambos ligantes; esses experimentos demonstram como o efeito individual de cada ligante é alterado na presença do segundo componente (cobre ou DNA). Os fenômenos observados quando a presença de ambos ligantes como, por exemplo, a diminuição da agregação e formação de pequenos oligômeros solúveis podem nortear os diversos caminhos para a conversão estrutural e as potenciais implicações na neurodegeneração e na infecciosidade das doenças por prion.

Visando estender nossa compreensão sobre os complexos PrP: Cu^{2+} :DNA, avaliamos seu efeito sobre células de neuroblastoma (N2a) em cultura. Nosso grupo já havia descrito que complexos da rPrP com RNA podem ser tóxicos para estas células (GOMES E COLS., 2008B), mas este ensaio não foi realizado na presença de cobre.

Realizamos então estudos de disfunção celular em células N2a em cultura através de ensaio de redução de MTT, como descrito em Material e Métodos. As células foram expostas ao PrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹ a 5µM agregado ou pré-incubado na presença de Cu²⁺ e DNA (PoliGC 21-df) em uma razão molar peptídeo:ligante de 1:1.

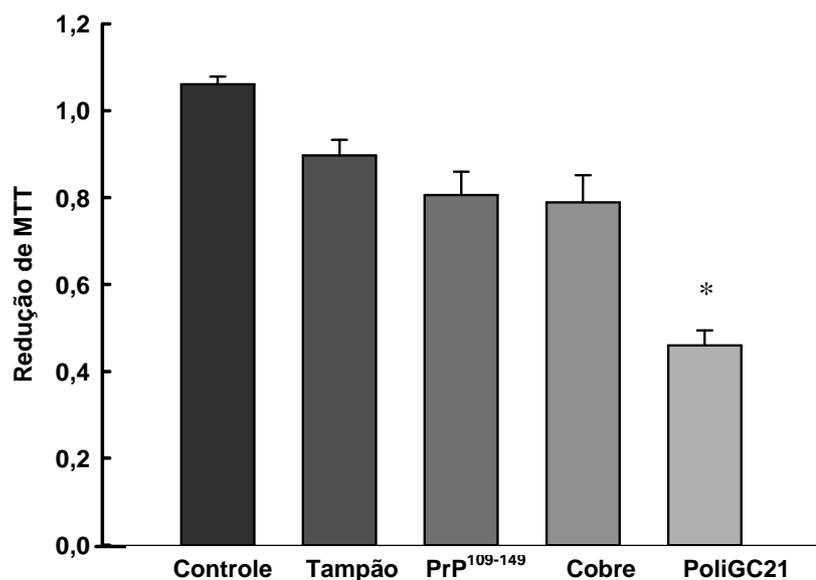


Figura 24: Avaliação de viabilidade celular por redução do MTT em células N2a. As amostras foram aplicadas à monocamada de células N2a e o ensaio foi revelado 48h após a incubação, como descrito na sessão Material e Métodos. As barras representam a média de triplicatas e as barras de erro representam o erro padrão médio. Foi observada diferença significativa apenas entre o controle e a amostra contendo DNA. * $p < 0,05$.

Os resultados foram expressos relativos à absorvância do controle, que representa a viabilidade das células em cultura sem adição de peptídeo ou de ligantes (Figura 24). Os resultados observados demonstraram que o peptídeo quando agregado ou quando o mesmo está complexado a Cu²⁺ não causou disfunção celular significativa, mas quando complexado com o DNA a viabilidade foi significativamente reduzida, similar ao que foi observado com a interação de PrP^{WT} com RNA (GOMES E COLS., 2008B). Estão em andamento novas medidas para avaliarmos o efeito de complexos

peptídeo:cobre:DNA sobre as células N2a em cultura.

4.2 Avaliação do efeito de Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} e Mg^{2+} e DNA em domínios octarepeats

A PrP é uma metaloproteína que apresenta duas regiões distintas de ligação a cobre. A região N-terminal apresenta um domínio altamente conservado que contém 4 a 5 repetições de oito aminoácidos (PHGGGWGQ) em humanos (HORNSHAW E COLS., 1995; BROWN E COLS., 1997; BONOMO E COLS., 2000), o domínio octarepeat da PrP. Foi demonstrado que a ligação de cobre nesse domínio desempenha um papel protetor contra o estresse oxidativo, possivelmente por exercer uma atividade similar a superóxido dismutase (BROWN E COLS., 1999; BROWN, 2008), por participar do metabolismo de cobre (BROWN E COLS., 1997) ou atuar como um supressor/quelante de cobre livre (VILES E COLS., 2008). Evidências obtidas a partir de estudos *in vivo* e *in vitro* sugerem que o processo de conversão deve exigir a participação de um co-fator como uma proteína, ácido nucleico ou glicosaminoglicanos (GAGs) (TELLING E COLS., 1995; CAUGHEY & KOCISKO, 2003; SILVA E COLS., 2010). Tendo em vista que a PrP quando ancorada à face externa da membrana celular está muito provavelmente carregada com íons cobre, resta saber se este íon também pode atuar como um co-fator neste processo de conversão.

Resultados anteriores reportados por nosso grupo de pesquisa demonstraram que o domínio octarepeat não é sítio principal de ligação ao DNA (LIMA E COLS., 2006), mas essa região é importante na agregação e na alteração estrutural da PrP induzida por RNA e por heparina (GOMES E COLS., 2008B; SILVA E COLS., 2011) . Com base nestas informações investigamos se a ligação de Cu^{2+} pode ser afetada pela presença de DNA

e se há algum ganho de atividade do DNA nesse domínio na presença de Cu^{2+} . Esta análise foi realizada com dois domínios da PrP, um contendo 3 (3OR) e outro contendo 4 (4OR) repetições do domínio *octarepeat*. Além disso, investigamos também se outros íons divalentes (Zn^{2+} , Mn^{2+} e Mg^{2+}) são capazes de interagir com esses domínios em diferentes valores de pH.

Os peptídeos 3OR e 4OR, que contém 3 e 4 domínios de ligação ao cobre, respectivamente, não agregam prontamente em solução, na faixa de pH analisada. Sendo assim, avaliamos se íons Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+} alterariam a estrutura terciária dos peptídeos através de medidas de fluorescência intrínseca (cada peptídeo contém 4 Trp) na presença dos íons citados. Os resultados demonstram que o íon cobre apresentou maior efeito frente aos demais íons na supressão de fluorescência dos peptídeos e, ainda, que esse efeito foi dependente da concentração iônica e do pH (Figura 25). Os resultados demonstraram que, em pH 6,5, a alteração da estrutura quando da adição de Cu^{2+} se deu com maior intensidade em todas as concentrações quando comparada com os pHs 5,0 e 7,4.

Já para o Zn^{2+} , não se observou diferença significativa na fluorescência entre os diferentes valores de pH utilizados (Figura 26). Provavelmente, o complexo formado do peptídeo com o íon Cu^{2+} é diferente do formado com os demais íons, ou que a afinidade dos peptídeos pelos íons é diferente. Além disso, a estrutura terciária do peptídeo, avaliada através da sua fluorescência sofreu maior alteração na presença de íons Cu^{2+} do que com os demais (Figura 25 e 26), o que demonstra mais uma vez que a interação com o Cu^{2+} é diferente da com os demais íons metálicos avaliados. Não avaliamos o efeito na agregação dos peptídeos, pois os mesmos não agregam nas

condições empregadas neste trabalho.

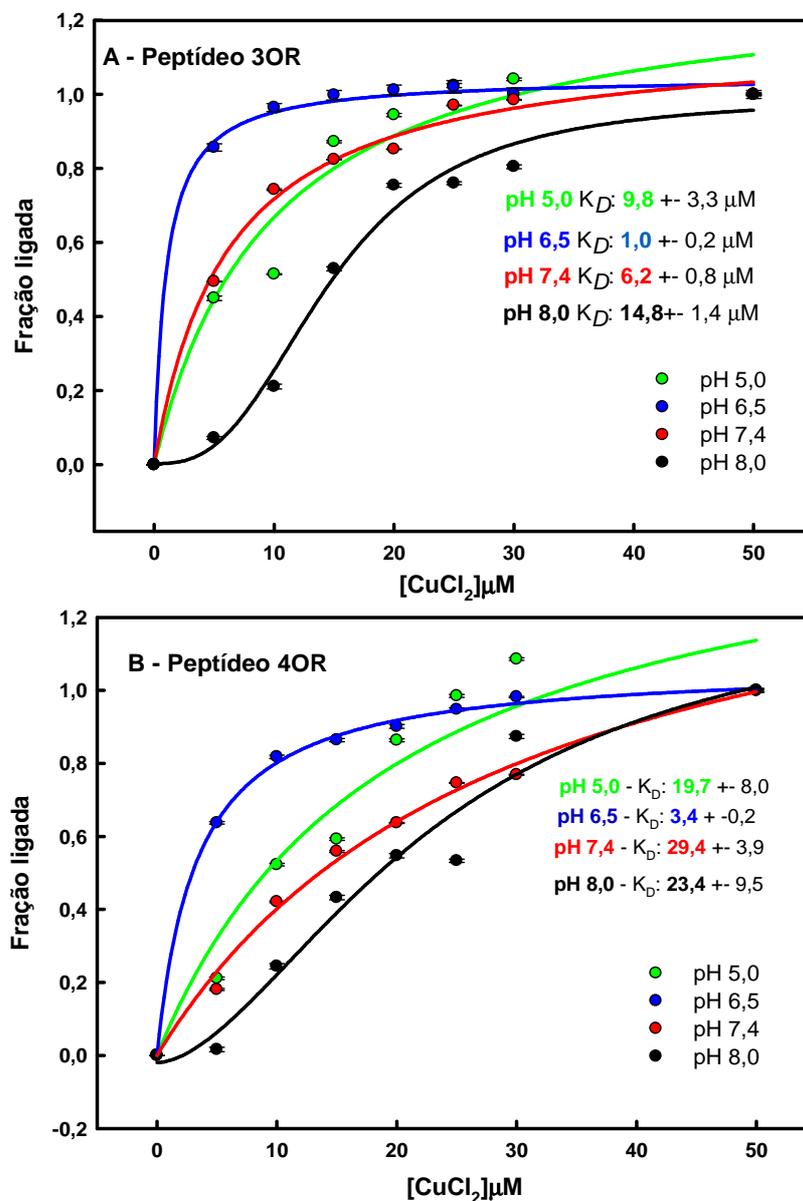


Figura 25: Supressão da fluorescência do triptofano dos peptídeos 3OR e 4OR mediada por Cu^{2+} em diferentes valores de pH. O peptídeo 3OR foi preparado na concentração de $5\mu\text{M}$ e excitado a 280nm . O gráfico mostra a fração de proteína ligada a cobre e foi obtido a partir das intensidades de fluorescência em cada concentração de CuCl_2 . O cálculo de fração ligada utilizado foi: $\text{Fluorescência observada} - \text{Fluorescência inicial} / \text{Fluorescência final} - \text{Fluorescência inicial}$. As medidas foram realizadas em tampão MES 50 mM para o pH 5,0 e 6,5 e HEPES 50 mM e NaCl 100 mM para o pH 7,4 e 8,0. As barras representam o erro padrão médio de 3 análises. Foi realizado um ajuste hiperbólico ou sigmoidal (para pH 8,0) de cada curva para obtenção da constante de dissociação (K_D) em cada caso, utilizando o programa Sigma-Plot.

O pKa do nitrogênio imidazólico dos resíduos de histina é calculado em ~6,0. Sendo assim, é esperado que não ocorra coordenação à Cu^{2+} pela PrP em valores de pH abaixo de 6,0. Como o pKa do imidazol das histidinas é menor do que o dos nitrogênios amídicos das glicinas, estes últimos são os primeiros componentes a perder afinidade pelo metal quando o pH é reduzido. O pKa dos nitrogênios amídicos é > 9,0, sendo assim, como que a pH 7,4 o cobre pode ser coordenado através destes átomos?

A explicação para tal interação incomum proteína-cobre se baseia em estudos realizados na década de 1960, onde foi mostrado que peptídeos não-estruturados contendo histidina coordenavam cobre de forma similar à PrP (BRYCE E COLS., 1966). Como o pKa dos prótons amídicos é elevado, conseqüentemente o nitrogênio amídico não estará ionizado a pH 7. Entretanto, foi visto que Cu^{2+} consegue deslocar um H amídico vizinho nesta faixa de pH (7-7,5) (SUNDBERG E COLS., 1974). Este resultado mostra também a alta seletividade que a PrP tem de ligação à cobre em relação a outros íons divalentes (STOCKEL E COLS., 1998; MILLHAUSER, 2004). A proteína albumina sérica compartilha este mesmo motivo de ligação a cobre, que é a sequência $\text{NH}_2\text{-Xaa-Xaa-His}$ presente na sua região N-terminal (HARFORD & SARKAR, 1997).

Foi reportado que a região octarepeat apresenta baixa afinidade a Cu^{2+} a pH 6,5 (VILES E COLS., 1999; WHITTAL E COLS., 2000; HUREAU E COLS., 2006), o que foi contrário aos resultados que obtivemos para os peptídeos 3OR e 4OR nos ensaios de supressão de fluorescência mediada por cobre. A observação de que Cu^{2+} , e não outros metais divalentes, suprime fortemente a fluorescência de Trp do domínio octarepeat (STOCKEL

E COLS., 1998; SHIELDS & FRANKLIN, 2004) é mais um indício de que estamos vendo um efeito específico do cobre a pH 6,5 em nossos ensaios.

Os demais íons testados não influenciaram na exposição dos resíduos de triptofano dos peptídeos 3OR e 4OR (Figura 26), diferente dos resultados encontrados para o cobre e também não alteraram o centro de massa espectral (Figura 27).

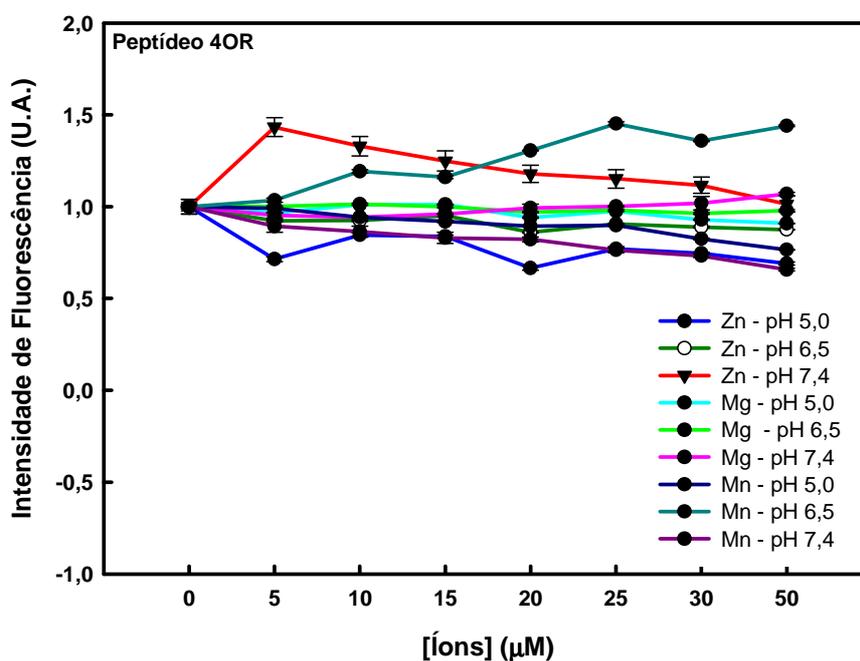


Figura 26: Efeito dos íons Zn^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+} na fluorescência do triptofano do peptídeo 4OR em pH 7,4, 6,5 e 5,0. O peptídeo 4OR foi preparado na concentração de $5\mu M$ e excitado a 280nm. O gráfico mostra a área normalizada dos espectros de emissão de fluorescência do peptídeo 4OR em função da adição dos diferentes íons utilizados. As medidas foram realizadas em tampão MES 50 mM para pH 5,0 e 6,5 e HEPES 50 mM e NaCl 100 mM para o pH 7,4. As barras representam o erro padrão médio de 3 análises separadas.

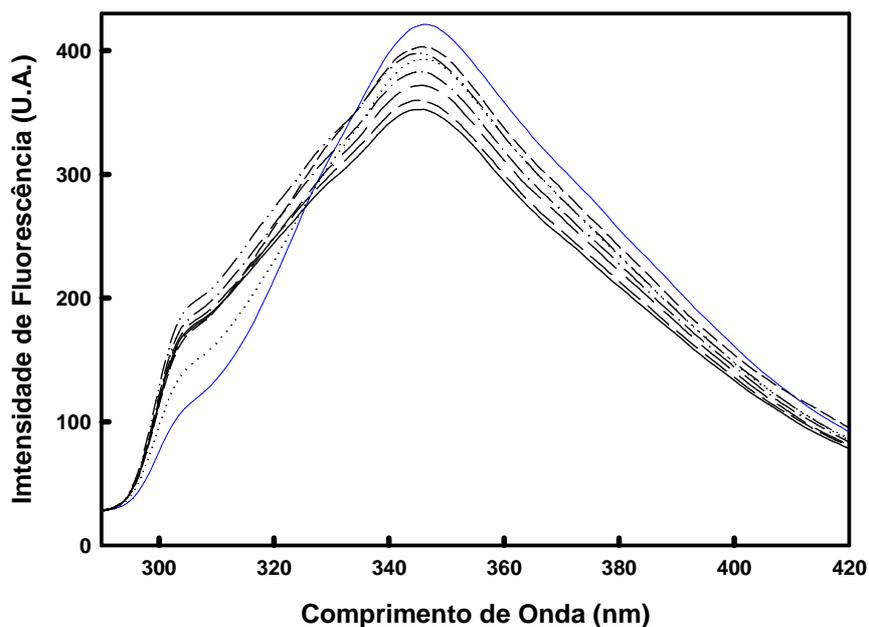


Figura 27: Espectros de emissão de fluorescência do peptídeo 4OR na presença de Mg^{2+} (na forma de $MgCl_2$). Espectros de emissão de fluorescência do peptídeo 4OR 5 μ M (linha azul) diluído em tampão MES pH 5,0 na presença de Mg^{2+} de 5 μ M a 50 μ M (demais linhas). Excitação: 280nm.

Como os outros íons não demonstraram influência significativa na estrutura terciária da região octarepeat, verificamos o efeito conjunto apenas do íon Cu^{2+} na presença de DNA. Os dados apresentados nas figuras 28A e 28B demonstram que o peptídeo tem sua estrutura alterada na presença de ambos ligantes, porém esse efeito é mais acentuado na presença de DNA. Utilizamos duas seqüências diferentes de DNA: E2DBS 36 df e PoliGC 21 df que são seqüências já identificadas pelo nosso grupo de estudo como ligantes da PrP (CORDEIRO E COLS., 2001; LIMA E COLS., 2006; MARQUES E COLS., 2009).

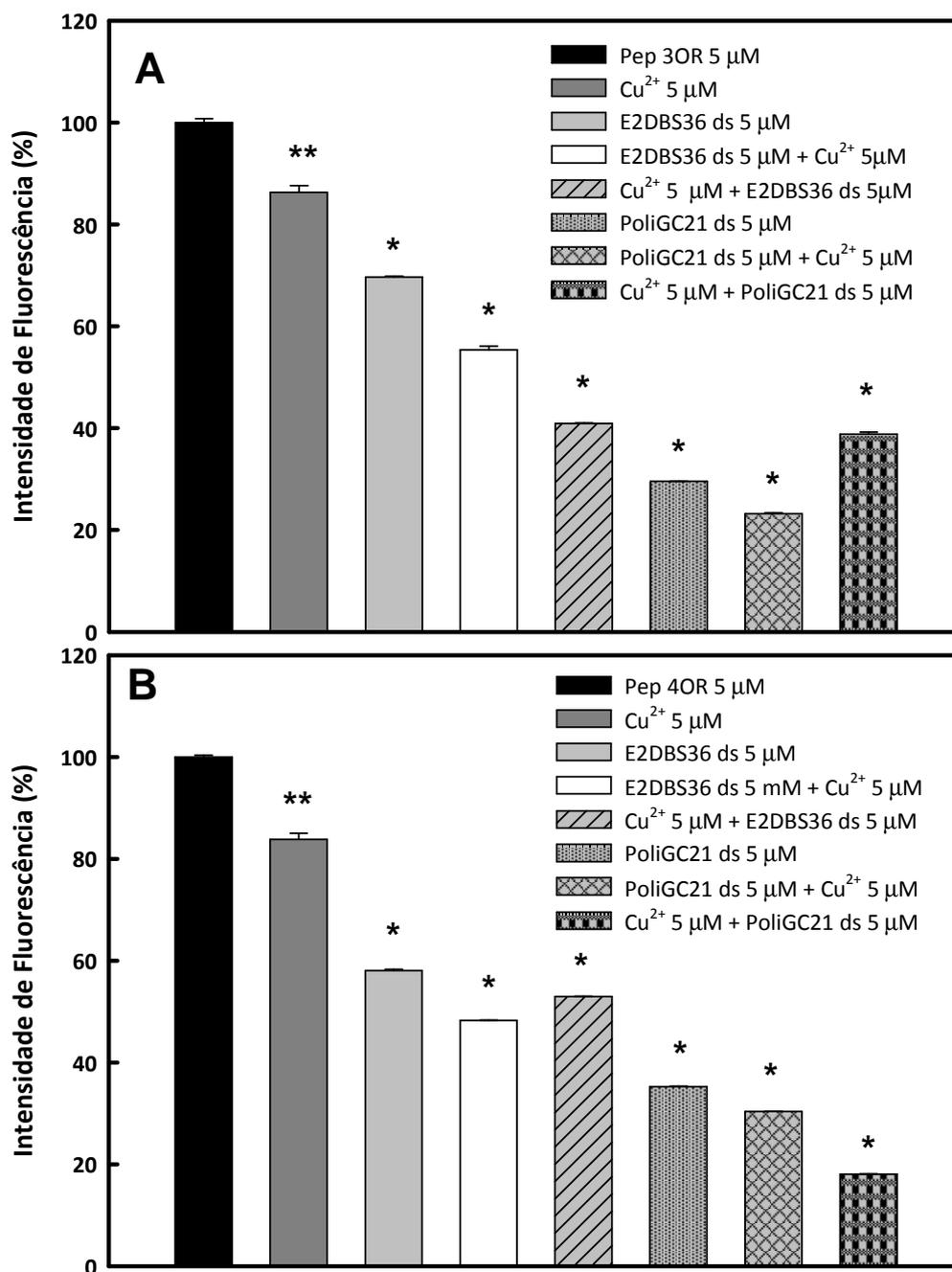


Figura 28: Supressão da fluorescência do peptídeo 3OR (A) e 4OR (B) na presença de Cu²⁺ e DNA. A emissão de fluorescência dos peptídeos foi avaliada na presença de Cu²⁺ sozinho, das sequências de DNA dupla fita: E2DBS-18 e PoliGC-21 e na presença de DNA e Cu²⁺. As concentrações de CuCl₂ e DNA utilizadas foram equimolar em relação à concentração dos peptídeos (5 μ M). O tampão utilizado foi MES pH 5,0 e as barras equivalem a média de 3 análises separadas. As barras de erro representam o valor de Erro padrão médio. *p < 0,05 e **p < 0,001.

Apesar de ficar claro que o Cu^{2+} apresenta um efeito na estrutura terciária dos peptídeos em pH 5,0, esse efeito não é tão proeminente quanto o causado pelas sequências de DNA (E2DBS18 df e PoliGC21 df), onde, mesmo na ausência de Cu^{2+} houve significativa supressão da fluorescência. A ordem de adição dos ligantes (Cu^{2+} e DNA) apresentou diferentes efeitos na estrutura terciária de ambos os peptídeos. Essa diferença é interessante, pois demonstra que um ligante pode afetar o efeito do outro e que a forma adquirida pela interação prévia de um ligante, faz com que o próximo interaja de maneira diferente. Por exemplo, para ambos os peptídeos o efeito do Cu^{2+} e DNA sozinhos não foi maior do que o efeito de ambos em conjunto. Além disso, quando pré-incubado com Cu^{2+} , o PoliGC21 df, que apresentou maior efeito frente ao E2DBS18 df, apresentou diferença significativa frente ao seu efeito sozinho e nas demais ordens de adição (Cu^{2+} antes da adição do DNA ou Cu^{2+} depois da adição do DNA).

4.3 Avaliação do efeito de Cu^{2+} e DNA na PrP^{WT}

Para verificar a interação entre a proteína do prion recombinante inteira (PrP^{WT}), Cu^{2+} e DNA, realizamos medidas de fluorescência intrínseca, espalhamento de luz, microscopia eletrônica de transmissão, dicroísmo circular e testes de resistência a proteinase K.

A Figura 29 mostra o efeito de concentrações crescentes de Cu^{2+} no espalhamento de luz e na fluorescência da PrP^{WT} . As medidas de espalhamento de luz refletem a oligomerização sofrida pela PrP^{WT} em função da concentração de Cu^{2+} e fica bastante evidente a formação de um platô após a adição de quantidade de Cu^{2+}

suficiente para ocupar de todos os sítios de ligação.

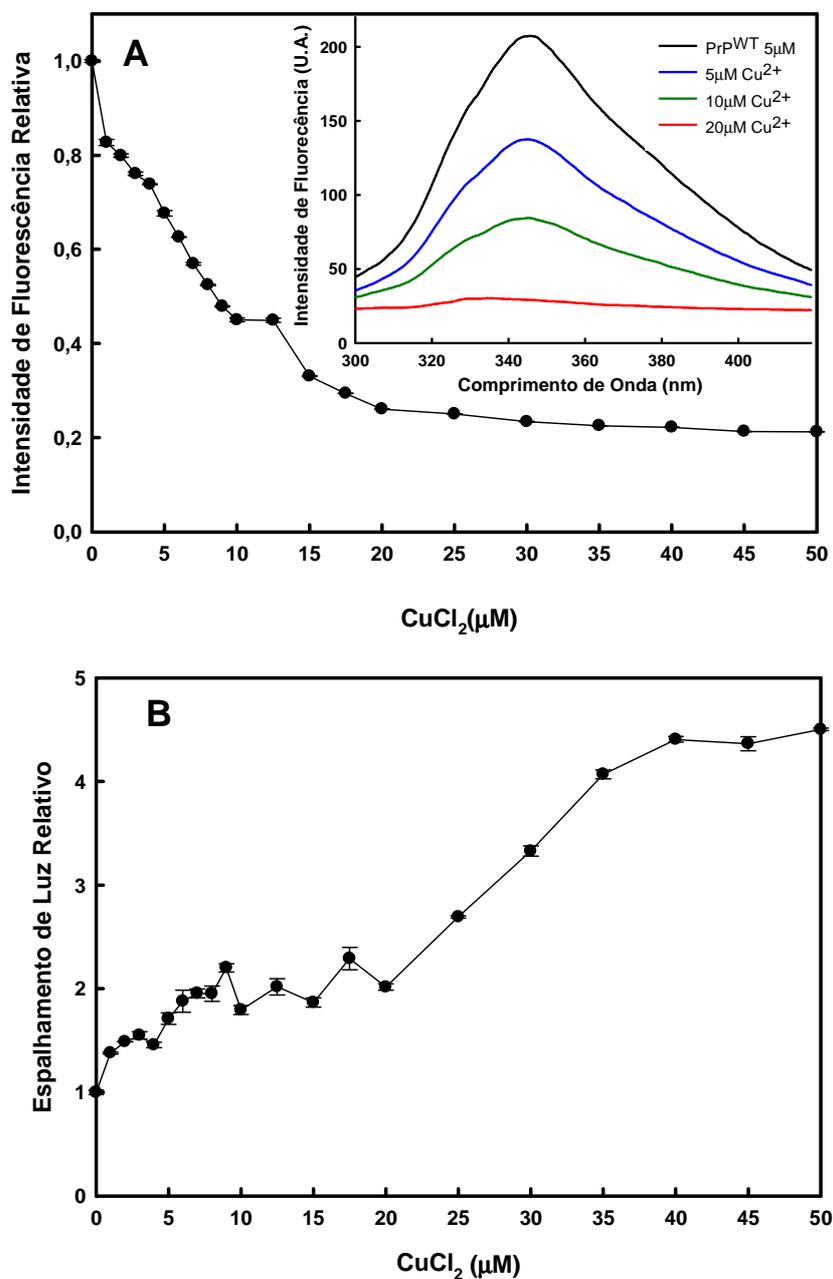


Figura 29: Efeito do Cu²⁺ na agregação e na supressão da emissão de fluorescência da PrP^{WT} (5 μ M). A) As amostras foram excitadas a 280 nm e a emissão foi coletada na faixa de 300-420 nm. Os espectros foram analisados e comparados pela área. **B)** Espalhamento de luz de PrP^{WT} na presença de diferentes concentrações de Cu²⁺. As amostras foram iluminadas a 320 nm e coletou-se o valor de EL de 300 nm a 340 nm. As amostras foram diluídas em tampão HEPES 25 mM e NaCl 100 mM pH 7,4. A área de cada espectro obtido foi normalizada, o gráfico apresenta a média de cada ponto e a barra de erro representa o erro padrão médio.

Esse resultado já foi visto anteriormente por outros trabalhos (QIN E COLS., 2000; JOBLING E COLS., 2001; QUAGLIO E COLS., 2001; YU E COLS., 2008). Juntamente com as medidas de fluorescência intrínseca do triptofano, onde vemos uma diminuição na emissão de fluorescência da PrP^{WT} na presença de baixas concentrações de cobre (1 μ M), podemos sugerir a ocorrência de mudanças na estrutura terciária da PrP^{WT}, pois os resíduos de triptofano na PrP^{WT} estão localizados na região amino-terminal que é bastante flexível (RIEK E COLS., 1997). 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. A alteração no espectro de emissão, mostrado no inserto da figura 29, demonstra que a interação de Cu²⁺ com a PrP^{WT} foi capaz de alterar o ambiente químico do triptofano. Esses resultados sugerem que esta ocorrendo um processo de agregação da proteína induzido pelo cobre e que esta agregação envolve mudanças substanciais na região N-terminal da PrP, que contém o domínio octamérico de ligação à cobre.

Tanto nas medidas de espalhamento de luz e de fluorescência, a proteína foi diluída em pH 7,4.

Avaliamos também o efeito de ambos ligantes na agregação da PrP^{WT} através das técnicas de espalhamento de luz estático e dinâmico. No espalhamento de luz estático, vemos que o Cu²⁺ aumenta discretamente a agregação da PrP^{WT} quando comparado com o aumento promovido pelo DNA, porém vemos que a presença de Cu²⁺ estimula ainda mais o efeito observado pelo DNA sozinho (Figura 30). Neste caso, para a PrP^{WT}, observamos um efeito sinérgico de Cu²⁺ e DNA na indução da agregação

proteica.

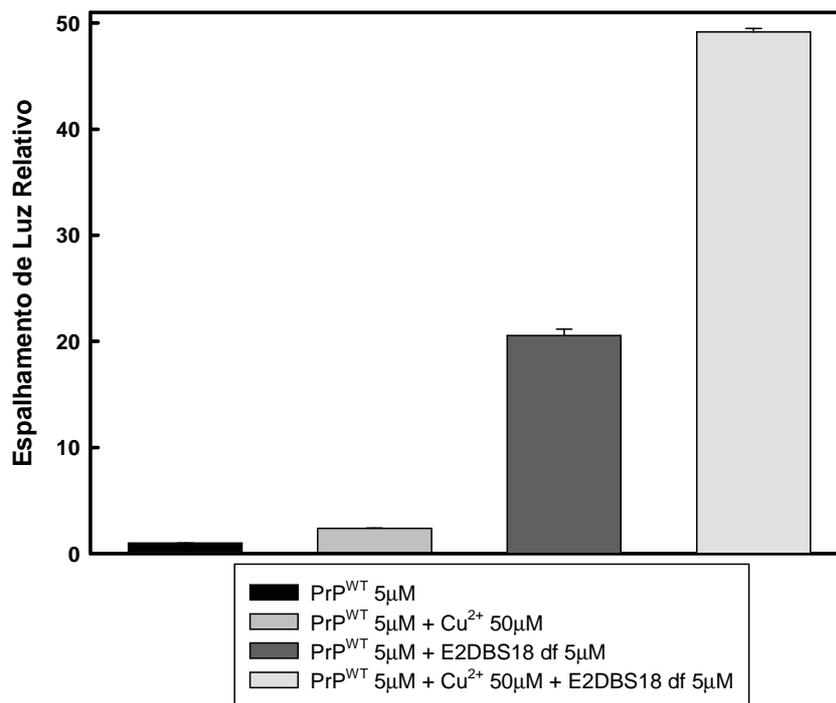


Figura 30: Agregação da PrP^{WT} na presença de Cu²⁺ e DNA avaliada por espalhamento de luz a 320 nm.

Os valores de EL da amostra de PrP^{WT} a 5 μM foram obtidos na presença de DNA (E2DBS18 DF), na presença do íon Cu²⁺ e na presença de DNA e Cu²⁺ conjuntamente. Foram coletados 3 espectros para cada amostra e as barras representam a média das áreas de EL obtidas, já normalizadas pelo valor de área de EL da PrP^{WT} livre. A barra de erro representa o valor do E.P.M. As amostras foram diluídas em tampão Hepes 25 mM e NaCl 10 mM pH 7,4.

Através da técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS), vimos que apenas a PrP^{WT} apresentava-se na forma de uma estrutura monomérica ou dimérica (Rh.: 4,4 nm) em pH 7,4, porém tanto a adição de DNA e Cu²⁺, promoveram o desaparecimento da estrutura monomérica e o aparecimento de oligômeros. A adição de Cu²⁺ formou um oligômero de raio de hidrodinâmico (Rh) de 365,8 nm que calculamos pode ser formado por 80 monômeros; já a adição de DNA, promoveu a formação de oligômeros menores, com Rh = 132,2 nm, ~ 30 unidades monoméricas. A adição de ambos ligantes

em conjunto parece não interferir na maneira que cada ligante interage com a proteína e estimula a sua agregação, pois, nesse caso, o que vemos é a formação de duas populações oligoméricas com tamanhos similares aos formados pelo Cu^{2+} e DNA individualmente (Tabela 3).

Tabela 3 - Caracterização dos oligômeros formados por DLS

Amostra	Monômero Rh (nm)	Oligômero 1 Rh (nm)	Oligômero 2 Rh (nm)
PrP^{WT}	$4,4 \pm 0,8$	-	-
$\text{PrP}^{\text{WT}} + \text{Cu}^{2+}$	-	$365,8 \pm 21,3 (80)^*$	-
$\text{PrP}^{\text{WT}} + \text{E2DBS18 df}$	-	-	$132,2 \pm 13,9 (30)^*$
$\text{PrP}^{\text{WT}} + \text{Cu}^{2+} + \text{E2DBS18 df}$	-	$360,4 \pm 13,8$	$120,5 \pm 6,5$

* Em parênteses está indicado o número de monômeros que formam a espécie agregada. Rh, raio hidrodinâmico.

Através das análises de espalhamento de luz, podemos sugerir que os dois ligam regiões diferentes da PrP^{WT} influenciando sua agregação, mas de maneiras diferentes. Apesar do Cu^{2+} formar oligômeros maiores nas medidas de EL dinâmico, não observamos esse efeito no EL estático e duas hipóteses podem explicar esse fato: os oligômeros podem ser muito grandes que logo precipitam e não são detectados no teste realizado, pois não realizamos o ensaio sob agitação, ou há a formação de um agregado maior do que na presença de DNA, mas os pequenos agregados formados pela adição de DNA são maiores em quantidade e, conseqüentemente, contribuem mais para o espalhamento de luz.

De forma a esclarecermos os resultados obtidos nos experimentos de EL estático e dinâmico, avaliamos a morfologia dos agregados formados pela PrP^{WT} através de sua interação com Cu^{2+} e DNA por MET. Podemos ver claramente que íons Cu^{2+} induzem a agregação da PrP^{WT} (Figura 31B), que não está agregada no controle

(Figura 31A). Corroborando os dados de EL dinâmico, a análise microscópica da PrP^{WT} na presença de DNA (E2DBS18 df) (Figura 31C) mostrou a formação de agregados menores do que na presença de Cu²⁺. Já na presença de DNA e Cu²⁺, temos a formação de uma população mais variada de agregados, que pode conter as duas espécies com Rh distintos observadas nas medidas de EL dinâmico (Figura 31D).

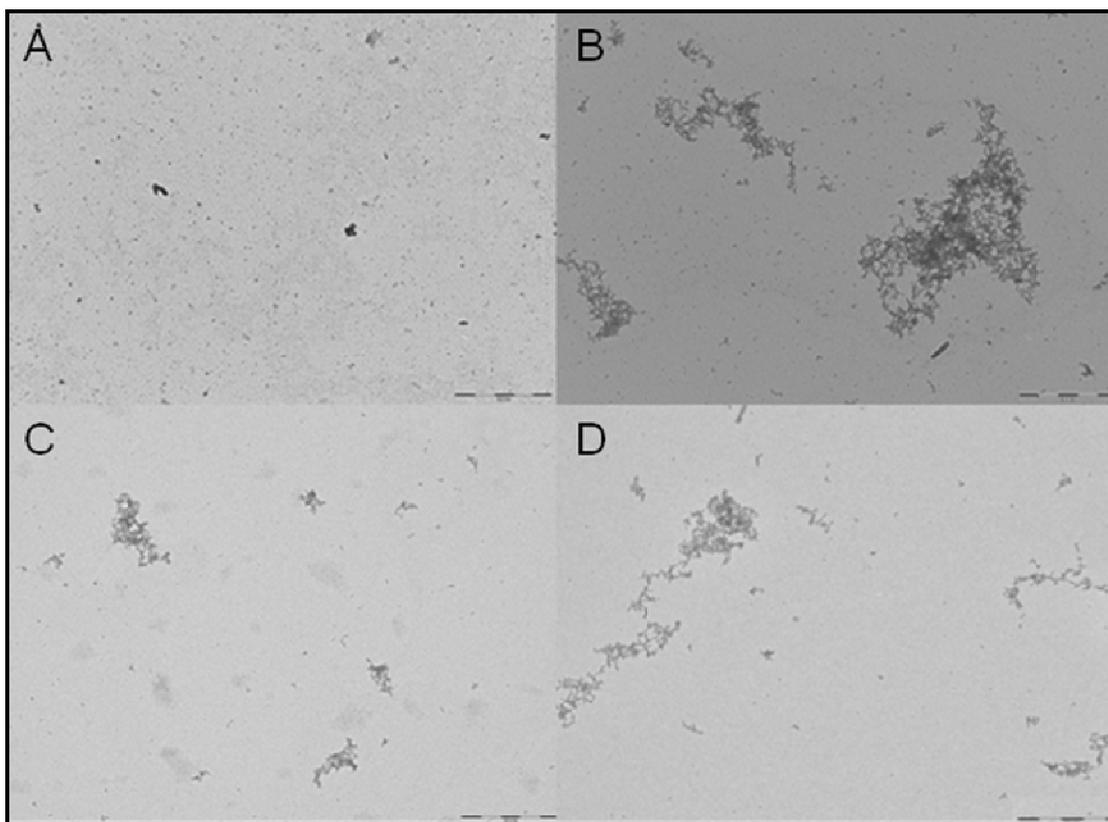


Figura 31: Análise da morfologia dos agregados por microscopia de transmissão eletrônica. A) Agregados da PrP^{WT} em pH 7,4. **B)** PrP^{WT}:Cu²⁺ (1:10). **C)** PrP^{WT}:DNA E2DBS18 df (1:1). **D)** PrP^{WT} na presença de 10 equivalente molar de cobre e DNA (E2DBS18 df). Em todos os painéis a concentração proteína foi 5μM. Barras de escala = 20 μm.

A investigação dos efeitos estruturais induzidos pelo Cu²⁺ e DNA foi também avaliada através de dicroísmo circular (Figura 32) e foi visto que a presença de Cu²⁺ induziu a perda de estrutura secundária da PrP^{WT}, que apresenta estrutura rica em α-

hélices. Foram realizadas duas leituras, uma imediatamente após a diluição e uma após 30 minutos, porém os resultados não foram diferentes entre si. A presença de DNA mesmo após a PrP^{WT} já estar diluída em Cu²⁺ alterou a estrutura da PrP^{WT}. Não observamos apenas perda de estrutura em α -hélice, mas uma conversão estrutural para uma espécie com maior conteúdo de folhas- β , o mesmo foi visto quando diluímos a PrP^{WT} numa solução contendo DNA, que já era esperado a partir de resultados anteriores (CORDEIRO E COLS., 2001). Ao diluir a proteína em solução contendo Cu²⁺ e DNA (Figura 32), observamos também que o efeito do DNA é predominante na estrutura secundária da PrP^{WT}. Portanto, a interação entre a PrP^{WT} e DNA, mesmo quando esta proteína já está ligada a cobre, afeta profundamente suas estruturas terciária e secundária.

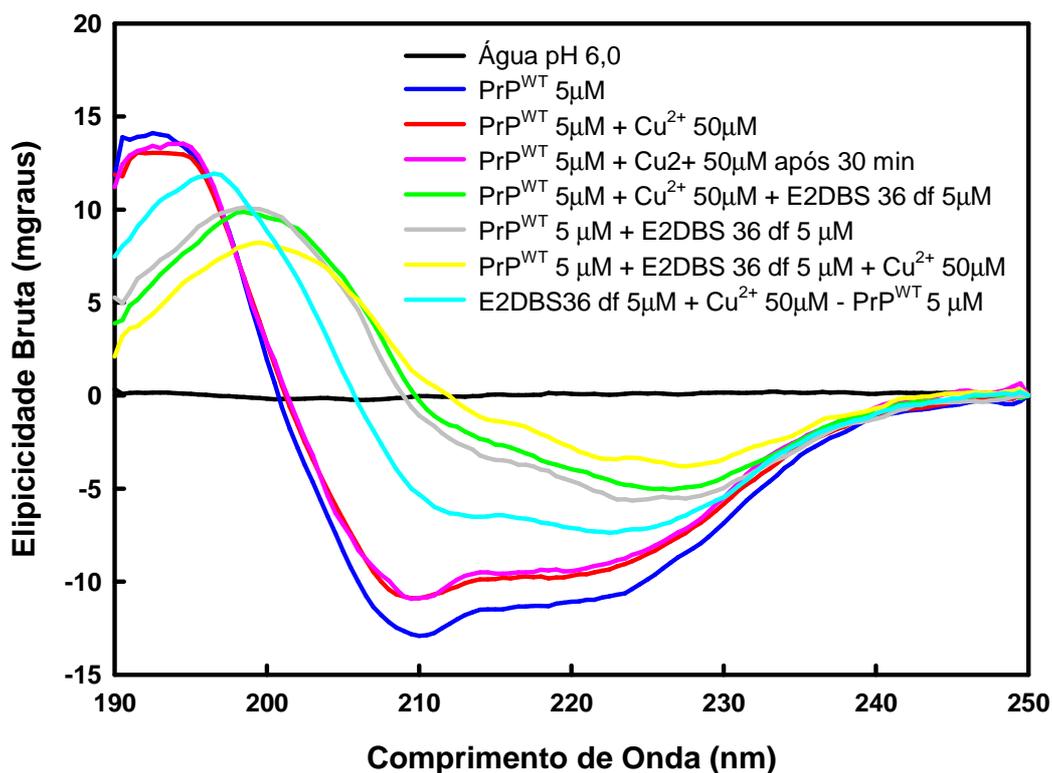


Figura 32: Efeito da presença de Cu^{2+} e DNA na estrutura secundária da PrP^{WT} . PrP^{WT} apresenta uma estrutura em α -hélices (linha azul). Alterações na sua estrutura podem ser vistas após a adição de Cu^{2+} (linhas vermelhas e rosa) e com a adição de DNA (E2DBS36 df) (linha cinza) e ambos ligantes (demais cores). As diluições foram realizadas em água Milli-Q com o pH ajustado para 6,0. A cubeta utilizada foi de 1 mm de caminho óptico.

A deconvolução dos espectros de dicroísmo circular para avaliação e quantificação dos componentes de estrutura secundária foi realizada utilizando o algoritmo CONTIN, disponível no sítio Dichroweb (LOBLEY E COLS., 2002). Os resultados estão expostos na tabela 4.

Tabela 4 - Diferentes componentes de estrutura secundária (%) da PrP^{WT} em pH 6,0 obtido a partir dos dados de dicroísmo circular.

Algoritmo	Amostras	α -Hélice	Folha- β	Voltas	Desord.	Total
CONTIN Set 7	PrP ^{WT}	87,6%	1,9%	8,9%	1,6%	100,0%
	PrP ^{WT} + Cu ²⁺	82,7%	3,8%	9,2%	4,3%	100,0%
	PrP ^{WT} + E2DBS36 df	44,0%	31,9%	4,5%	19,5%	99,9%
	PrP ^{WT} + Cu ²⁺ + E2DBS36 df	37,4%	31,8%	7,6%	23,1%	99,9%
	PrP ^{WT} + E2DBS36 df + Cu ²⁺	22,7%	34,8%	14,5%	28,0%	100,0%
	E2DBS36 df + Cu ²⁺ Ad. PrP ^{WT}	67,1%	3,1%	2,7%	27,1%	100,0%
CONTIN Set 4	PrP ^{WT}	88,0%	1,0%	6,5%	4,5%	100,0%
	PrP ^{WT} + Cu ²⁺	77,7%	1,6%	8,6%	12,1%	100,0%
	PrP ^{WT} + E2DBS36 df	43,1%	30,4%	6,7%	19,8%	100,0%
	PrP ^{WT} + Cu ²⁺ + E2DBS36 df	34,2%	32,9%	6,6%	26,3%	100,0%
	PrP ^{WT} + E2DBS36 df + Cu ²⁺	18,1%	27,2%	19,5%	35,3%	100,1%
	E2DBS36 df + Cu ²⁺ Ad. PrP ^{WT}	67,1%	3,1%	2,7%	27,1%	100,0%

Apesar da quantidade de α -hélice na PrP^{WT} estar sendo superestimada (o conteúdo de α -hélice da PrP^{WT} é de \sim 28%, segundo Cordeiro e cols., 2004) pelo algoritmo CONTIN (α -hélice: 87,6%, folha- β : 1,9%, voltas: 8,9% e estrutura desordenada: 1,6%), podemos observar que apenas a adição de Cu²⁺ não promoveu alteração conformacional significativa na estrutura secundária da PrP^{WT}, apenas pequena perda estrutural (87,6% para 82,7%), mas a adição de DNA sozinho (α -hélice: 44,0%, folha- β : 31,9%, voltas: 4,5% e estrutura desordenada: 19,5%) e mesmo com a proteína já ligada a cobre previamente aumentou significativamente o conteúdo de folhas- β (α -hélice: 34,2%, folha- β : 32,9%, voltas: 6,6% e estrutura desordenada: 26,3%). A adição de Cu²⁺ após a interação de DNA e PrP^{WT} diminuiu ainda mais o conteúdo de α -hélice, mas aumentou o conteúdo de estrutura desordenada sem alterar o conteúdo de folhas- β (α -hélice: 22,7%, folha- β : 34,8%, voltas: 14,5% e estrutura desordenada: 28,0%). Entretanto, quando diluímos a PrP^{WT} numa solução contendo os dois ligantes previamente misturados não temos uma perda acentuada

do conteúdo de α -hélice mas sim um aumento da estrutura desordenada, não ocorre, portanto, a formação de uma estrutura rica em folhas- β (α -hélice: 67,1%, folha- β : 3,1%, voltas: 2,7% e estrutura desordenada: 27,1%).

Avaliamos, em seguida, o perfil de estrutura secundária da PrP^{WT} por FTIR na presença de Cu²⁺, DNA e de ambos os ligantes em conjunto (Figura 33). De maneira qualitativa podemos observar a diferença entre os espectros quando adicionamos cada um dos ligantes (Figura 33). Após realizarmos a deconvolução dos espectros na região da amida I (1700-1600 cm⁻¹), calculamos o percentual de cada componente de estrutura secundária identificado. É importante ressaltar que só é possível fazer uma análise comparativa dos resultados obtidos pela análise de FTIR, já que os dados não são quantitativos. Os resultados foram similares aos obtidos pela análise de dicroísmo circular, ou seja, a PrP^{WT} nativa apresentou predominantemente estrutura em α -hélices (Figura 33, linha preta). Na presença de Cu²⁺, DNA e Cu²⁺ e de DNA, o conteúdo de α -hélice diminuiu, aumentando a quantidade de estruturas em folhas- β . As amostras para análise no FTIR foram liofilizadas para abolir a presença de água, o que gerou uma condição diferente da análise por DC que foi feita em solução. No geral, vemos a diminuição do conteúdo em α -hélice na presença dos ligantes, mas alguns pontos devem ser ressaltados, como o aparecimento de picos entre 1690 a 1680 cm⁻¹ quando DNA é adicionado. Estes picos são assinalados como folhas- β presentes em agregados protéicos (CORDEIRO E COLS., 2004; CORDEIRO & SILVA, 2005) e estão presentes em menor intensidade no espectro de PrP^{WT} na presença Cu²⁺ apenas. Dessa forma, mesmo quando temos os dois ligantes simultaneamente, o efeito do DNA se mostra mais proeminente, assim como visto nos dados de dicroísmo circular.

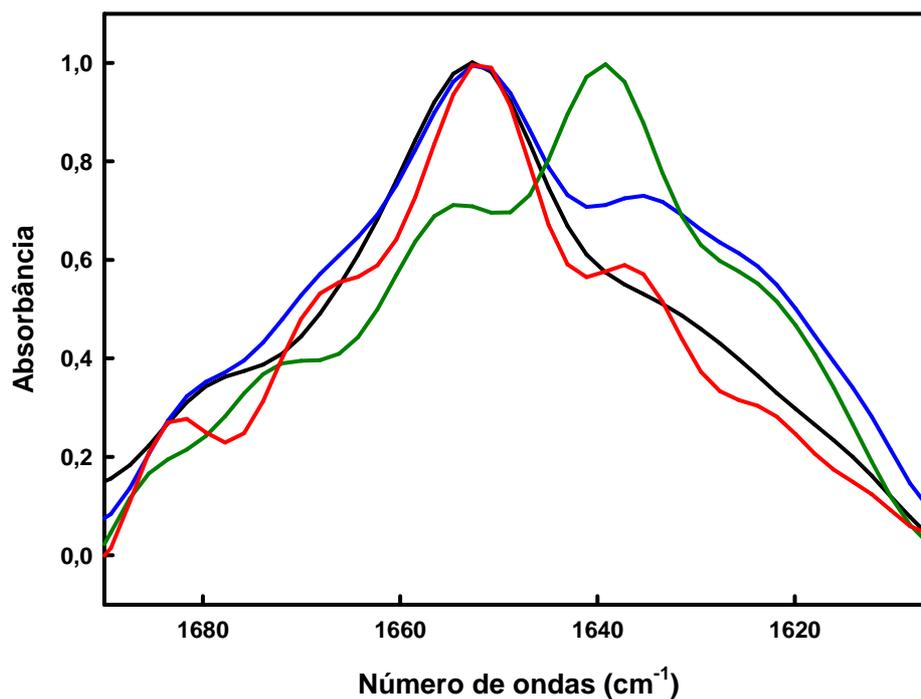


Figura 33: Avaliação da estrutura secundária da PrP^{WT} em diferentes condições. Os espectros de FTIR da PrP^{WT} na ausência (linha preta) e na presença de Cu²⁺ a 1:10 (PrP:CuCl₂) (linha azul), de DNA – E2DBS18 df (linha verde) a 1:1 e na presença de Cu²⁺ e DNA (linha vermelha) (1:10:1, PrP:cobre:DNA) estão representados. Todos os espectros foram normalizados e as amostras secas foram medidas a 25° C em base de ATR. Os espectros foram deconvoluídos como descrito em Materiais e Métodos.

Tabela 5 - Diferentes componentes de estrutura secundária (%) da PrP^{WT} obtido a partir dos dados de Infravermelho.

Análise estrutural	PrP ^{WT}		PrP ^{WT} + Cu ²⁺		PrP ^{WT} + DNA		PrP ^{WT} + Cu ²⁺ + DNA	
	Número de ondas (cm ⁻¹)	Área (%)	Número de ondas (cm ⁻¹)	Área (%)	Número de ondas (cm ⁻¹)	Área (%)	Número de ondas (cm ⁻¹)	Área (%)
Folha-β	1617, 1630	23,4	1621, 1634, 1681	41,6	1630, 1681, 1692	30,2	1624, 1636, 1682	31,9
Voltas	1677	17,1	1669	16,7	1664	27,1	1668	18,4
α-hélice e random	1653	59,0	1652	41,7	1647	-	1651	49,0
random	-	-	1669	-	1647	41,8		-

O processo de conversão estrutural da PrP^C numa estrutura rica em folhas- β é considerado o principal mecanismo para a patogênese das doenças por prion (Prusiner, 1998). A adição de ligantes que podem ser encontrados no meio celular fisiológico estabelece condições mais reais para a conversão *in vitro* e devem ser considerados na elucidação dos processos que envolvem as desordens causadas pela interação dos mesmos. Nesse contexto, a presença de Cu²⁺ e DNA, dois possíveis ligantes fisiológicos mimetizam uma possibilidade real de interação que pode levar à alteração conformacional e ao consequente processo de agregação envolvido nas doenças por prion.

Dois oligômeros distintos foram formados a partir da interação da PrP^{WT} com o Cu²⁺ e DNA, sugerindo que o efeito de cada ligante na PrP^{WT} se dá através de uma via específica de oligomerização. Um oligômero formado por aproximadamente 80 monômeros da PrP foi formado através da interação de PrP^{WT} e Cu²⁺; já a interação com DNA formou um oligômero majoritário com aproximadamente 30 moléculas da PrP na sua forma monomérica.

Essa diversidade de oligômeros da PrP^{WT} pode ser observada em diversos trabalhos e depende das condições empregadas, como pH, temperatura e concentração dos componentes (BASKAKOV E COLS., 2002; LU & CHANG, 2002; BOCHAROVA E COLS., 2005; REZAIE E COLS., 2005; REDECKE E COLS., 2007). Muitos estudos sugerem que a formação de agregados e fibras amiloides está diretamente ligada a toxicidade e neurodegeneração característica das doenças por prion (LEGNONE E COLS., 2004; BOCHAROVA E COLS., 2005). Outros estudos, entretanto, contestam que pequenos

oligômeros seriam responsáveis pela toxicidade (CHESEBRO E COLS., 2005; FIORITI E COLS., 2005), assim como já foi visto para outras doenças que envolvem a agregação de proteínas mal enoveladas (CAUGHEY & LANSBURY, 2003; REIXACH E COLS., 2004). Similar aos nossos resultados de EL dinâmico obtidos com DNA e Cu^{2+} , Redecke e colaboradores observaram uma espécie oligomérica da PrP com ~ 30 monômeros na presença de cobre em ambiente anaeróbico (REDECKE E COLS., 2007); outros também identificaram pequenos oligômeros contendo entre 14-28 moléculas de PrP em tecido cerebral infectado com EET de hamster e com alta infecciosidade (SILVEIRA E COLS., 2005).

Sendo assim, é evidente que Cu^{2+} pode levar à formação de diferentes espécies agregadas de PrP. Observamos, neste trabalho, um oligômero intermediário (30 moléculas de PrP) com a adição de DNA e com a adição de DNA e Cu^{2+} , ao contrário do observado apenas com a adição de Cu^{2+} (80 moléculas de PrP). A avaliação do efeito dos agregados formados na presença de DNA e Cu^{2+} sobre células e tecidos pode ser relevante para a compreensão da neurotoxicidade característica das encefalopatias espongiformes transmissíveis.

A interação da PrP com ácidos nucleicos vem sendo extensivamente estudada nos últimos anos (SILVA E COLS., 2010). Estudos anteriores realizados pelo nosso grupo e por outros pesquisadores, revelaram que a interação da PrP com DNA altera a estrutura da PrP para um estrutura rica em folhas- β e resistente a digestão por proteinase-K (CORDEIRO E COLS., 2001). Assim como o DNA, a interação de PrP e RNA gera ganho de resistência a digestão por proteases *in vitro* (DELEAULT E COLS., 2003). Verificamos então se a PrP^{WT} recombinante iria apresentar resistência a digestão por proteinase K na presença de Cu^{2+} e DNA.

É importante ressaltar que o próprio cobre livre pode inibir a atividade proteolítica da PK. Para nos assegurarmos de que estávamos trabalhando com uma concentração de Cu^{2+} sub-inibitória, realizamos um controle com a proteína BSA e Cu^{2+} em diferentes concentrações (Figura 34). Verificamos que, até a razão molar 1:100 PK:cobre, este íon não inibe a atividade desta protease. Sendo assim, nos ensaios seguintes, só trabalhamos com Cu^{2+} até a concentração de 5 μM e PK a 0,05 μM (concentração 100x menor do que a concentração de PrP^{WT}).

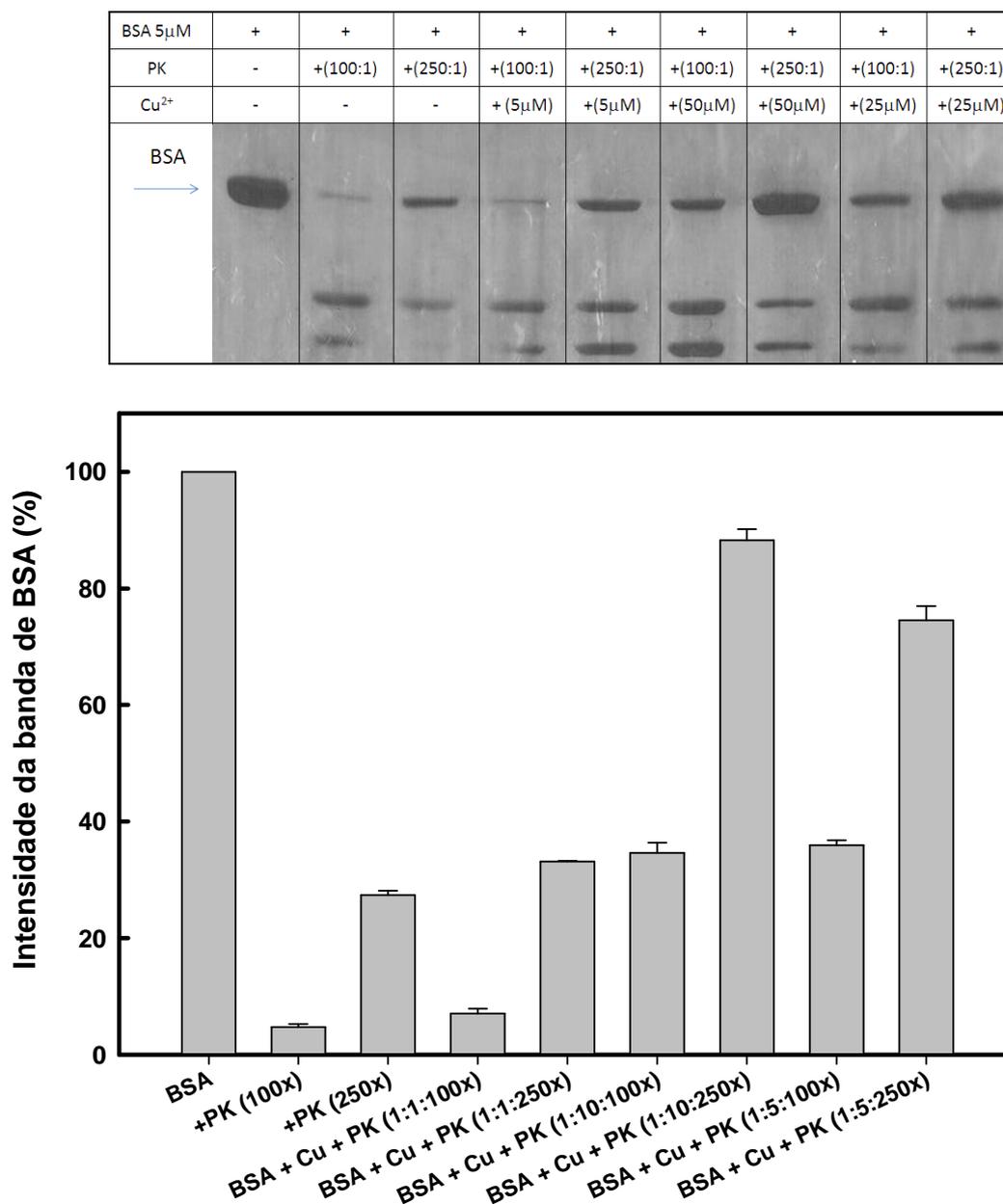


Figura 34: Inibição da PK promovida pelo íon Cu²⁺. SDS-PAGE 15% A concentração de PK foi de 100x (100:1) ou 250x (250:1) menor com relação à BSA. As amostras foram incubadas por 1 h a 37^o C. O Cu²⁺ foi adicionado numa relação BSA:Cu²⁺ de 1:1, 1:10 e 1:5. O gráfico de barras representa a intensidade das bandas calculado através do programa Image J.

Inicialmente testamos várias concentrações de Cu²⁺ e DNA (E2DBS18 df). O Cu²⁺ foi avaliado numa faixa de 0,5 a 50 μ M (Figura 35). É nítido no gel que a degradação da PrP^{WT} pela PK é reduzida com o aumento da concentração de Cu²⁺ (Figura 35), ou seja,

uma espécie com resistência a proteinase K é formada na presença de Cu^{2+} . Porém, só podemos avaliar até a concentração de $5\mu\text{M}$, pois acima dessa concentração o aumento da banda pode não corresponder ao aumento de resistência, mas sim à inibição da PK pelo Cu^{2+} . Podemos também observar uma banda no gel que apresenta menor massa molecular ($\sim 16\text{kDa}$), esta banda está presente já na amostra da PrP^{WT} sem algum tratamento e acreditamos que seja um produto de degradação natural da PrP. É possível observar que esta espécie truncada da PrP apresenta total resistência à digestão por PK, na concentração utilizada neste estudo.

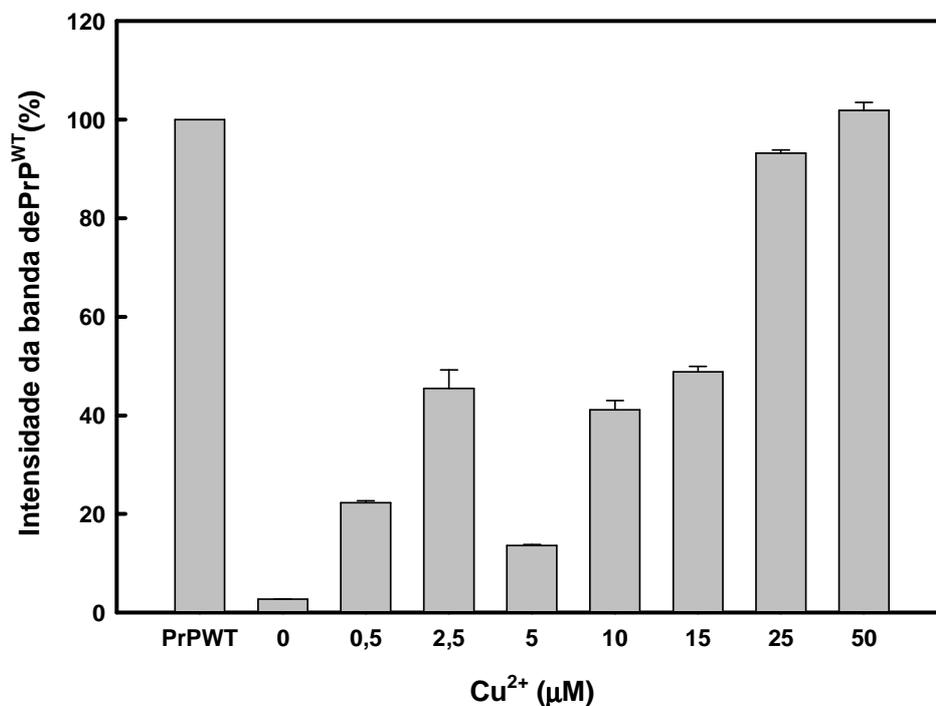
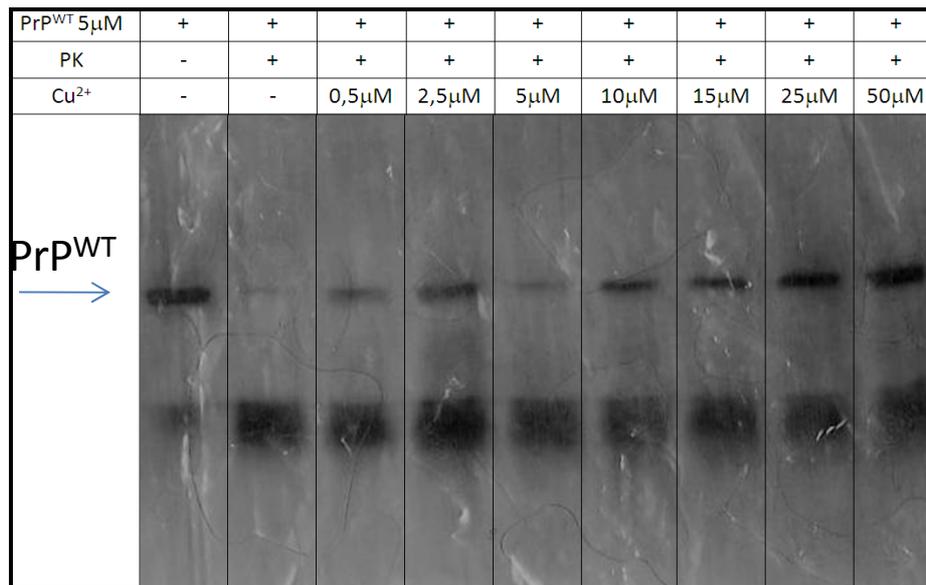


Figura 35: Ganho de resistência à digestão por proteinase K pela PrP^{WT} na presença de Cu²⁺. SDS-PAGE 15% A concentração de PK foi de 100x menor com relação à PrP^{WT}. As amostras foram incubadas por 1 h a 37°C. O gráfico de barras representa a intensidade das bandas calculado através do programa Image J.

Através da análise densitométrica do gel podemos observar que ocorre uma grande proteção à digestão por proteinase K. Esse resultado está de acordo com dados da literatura que avaliaram a PrP 90-231, ou seja, apenas com o sítio de ligação a cobre

que se encontra fora do domínio *octarepeat* (His96 e His111). Foi verificado que a interação com Cu^{2+} promoveu profundas modificações na estrutura dessa região da PrP e que gerou resistência à PK (COLLINGE, 1999; QIN E COLS., 2000; QUAGLIO E COLS., 2001). Entender como o cobre produz essa alteração estrutural é uma questão fundamental para o entendimento do processo patológico das doenças por prion.

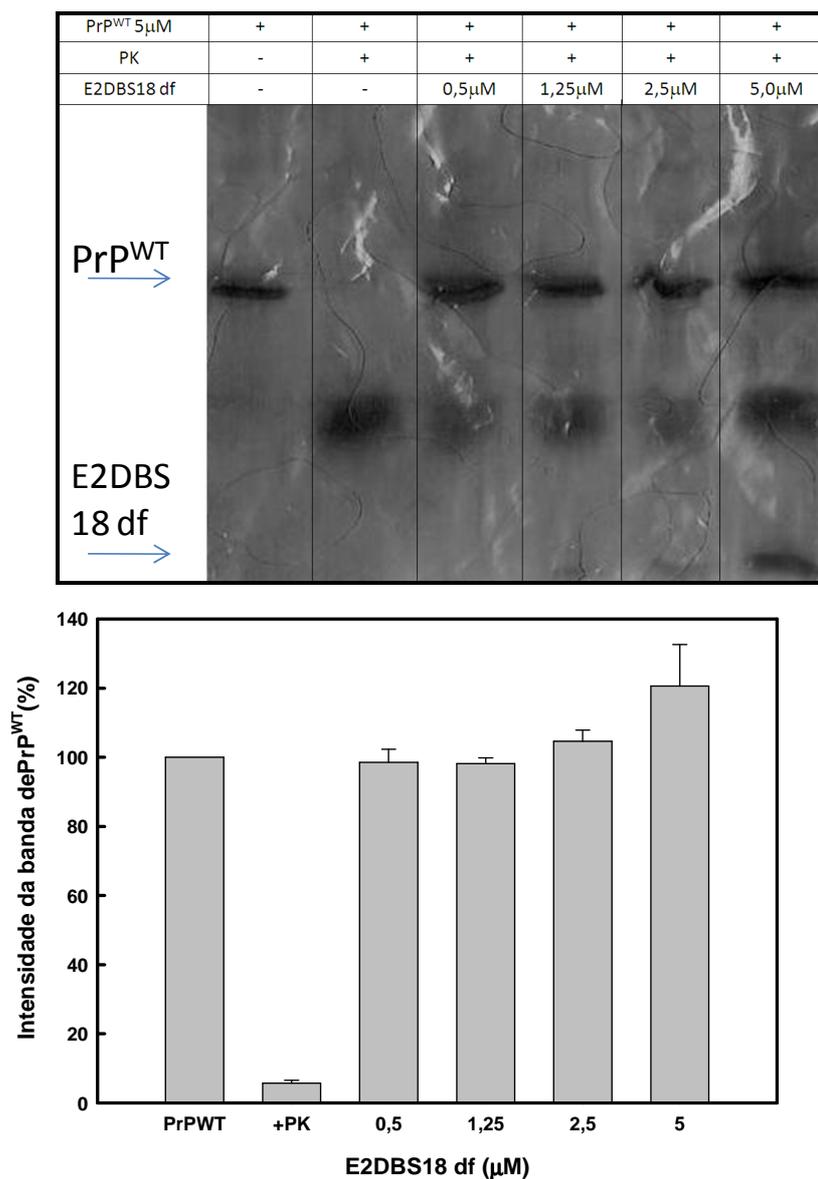


Figura 36: Resistência à digestão por proteinase K pela PrP^{WT} na presença de DNA (E2DBS18 df). SDS-PAGE 15% A concentração de PrP^{WT} usada foi de 5 μ M. A proporção de PrP:PK foi de 100:1. As amostras foram incubadas por 1 h a 37^o C. O gráfico de barras representa a intensidade das bandas calculada através do programa Image J.

A presença de DNA também promoveu proteção contra a degradação pela PK, porém foi uma proteção muito mais evidente do que a observada apenas pelo íon Cu^{2+} (comparar as figuras 35 e 36). Avaliamos também o ganho de resistência a degradação por PK das duas sequências de DNA (PoliGC21 df e E2DBS18 df) na presença de Cu^{2+} em concentrações equimolares (Figura 37).

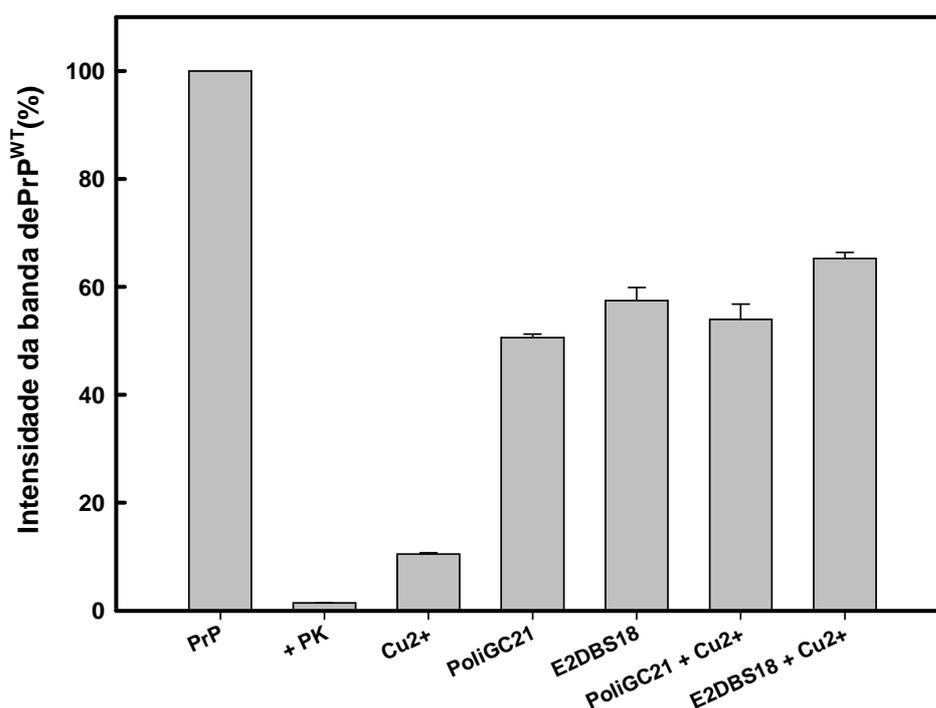


Figura 37: Resistência à digestão por proteinase K pela PrP^{WT} na presença de DNA (E2DBS18 df). SDS-PAGE 15% A concentração de PrP^{WT} usada foi de 5 μM . A proporção de PrP:PK foi de 100:1. As amostras foram incubadas por 1 h a 37^o C. O gráfico de barras representa a intensidade das bandas calculada através do programa Image J.

O resultado apresentado acima confirma que as duas sequências de DNA (PoliGC21 df e E2DBS18 df) alteram a estrutura da PrP^{WT} para uma estrutura com maior resistência à digestão por PK quando comparado ao efeito promovido pelo íon Cu^{2+} . Além disso, o efeito do DNA não é afetado quando o Cu^{2+} está presente no meio.

Como vimos nos resultados de dicroísmo circular a ordem de adição dos ligantes pode influenciar na alteração estrutural (Tabela 3). Nas amostras preparadas para o gel a PrP^{WT} foi diluída numa solução contendo os dois ligantes previamente misturados. Segundo os dados de CD, essa estrutura resistente à PK apresentaria alto conteúdo de estrutura desordenada, porém é importante discutir que, para o teste de proteinase K, o tempo de incubação é de 1 hora numa temperatura de 37° C, todas essas variantes não foram testadas no dicroísmo circular. E, de qualquer maneira, uma espécie protéica que não tenha estrutura rica em folhas- β , pode apresentar resistência à digestão por proteases. Os espectros de CD também mostraram que apenas a adição de DNA promovia uma modificação estrutural na PrP^{WT} para uma forma com maior conteúdo de folhas- β (Figura 33). Resultados similares foram descritos por Qin e colaboradores, onde foi visto que o Cu²⁺ induziu a conversão da PrP^C numa espécie resistente a digestão por PK, mas que essa espécie tem uma conformação diferente da PrP^{SC} (QIN E COLS., 2000). Para os resultados da PrP com Cu²⁺ e DNA, vemos que o efeito é mantido.

A partir dos resultados observados em todos os testes podemos verificar que a PrP^{WT}, mesmo previamente carregada com cobre, tem capacidade de interação com ácidos nucleicos e que essa interação não parece ser competitiva, ou seja, não parece se dar num mesmo sítio. Foi interessante observar a formação de oligômeros com diferentes tamanhos e morfologias, dependendo se a agregação foi induzida por Cu²⁺, DNA ou ambos ligantes em conjunto. Este fato indica que a PrP^{WT} pode seguir vias de agregação diversas o que pode resultar em diferentes fenótipos das doenças por prions. Apesar de não termos observado competição pela ligação à PrP entre cobre e

DNA, não é ainda evidente se está ocorrendo algum efeito alostérico. A formação de diferentes agregados também pode ser explicada pelas diferentes alterações conformacionais que ambos produzem na PrP^{WT}. A interação da PrP^{WT} com o DNA e com o Cu²⁺ provoca mudanças na estrutura da proteína, mas tais mudanças são características de cada ligante, seja cobre ou DNA. Os resultados obtidos nessa dissertação mostram que a interação da PrP^{WT} com Cu²⁺ e DNA leva a uma complexa via de agregação e alteração conformacional, sendo assim é importante avaliar mais detalhadamente as características estruturais e funcionais (tóxicas) dos agregados formados nas diferentes condições empregadas.

5. CONCLUSÕES

Avaliamos os efeitos de cobre e de ácidos nucleicos, que são ligantes previamente caracterizados da proteína do prion, na modulação da agregação e na estrutura de domínios isolados da PrP e da PrP^{WT}, através de diferentes sistemas e abordagens bioquímicas. A alteração estrutural, seguida de agregação são etapas fundamentais para a patogenia das doenças por prion e, por isso, a investigação de como Cu²⁺ e DNA atuam nessas etapas é primordial.

Utilizamos ao longo da dissertação quatro modelos de estudo, com base nos domínios de ligação ao íon Cu²⁺, para a avaliação do efeito de ambos ligantes na estrutura e agregação da PrP e de domínios isolados. Estes modelos foram o peptídeo PrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹, com apenas um sítio de ligação a Cu²⁺, dois peptídeos contendo 3 (Pep 3OR) ou 4 (Pep 4OR) octarepeats e a proteína PrP recombinante inteira, PrP^{WT}.

Investigamos o efeito causado pela presença de diferentes íons divalentes (Cu²⁺, Zn²⁺, Mn²⁺ e Mg²⁺), pelo DNA e na presença de Cu²⁺ e DNA simultaneamente nos 4 modelos investigados e pudemos observar que, em todos os casos, Cu²⁺ e DNA foram capazes de alterar a estrutura proteica; os demais íons não tiveram essa capacidade. Esses resultados demonstram que tanto Cu²⁺ quanto sequências de DNA interagem com a PrP^{WT} e com domínios isolados desta proteína, sendo capazes de promover alteração conformacional e, em alguns casos, modulação da agregação. Não podemos afirmar que não ocorre ligação da PrP^{WT} e dos demais domínios com os outros íons avaliados (além do cobre), mas sim, mesmo tendo ocorrido interação, a mesma não se demonstrou capaz de alterar as vias estudadas através das técnicas utilizadas.

Verificamos também que a interação da PrP^{WT} e dos peptídeos estudados com o Cu²⁺ pode ser afetada pelo pH do meio, gerando afinidades diferentes, principalmente no domínio octarepeat. Sendo assim, *in vivo*, onde a proteína pode desfrutar de diferentes ambientes químicos, é possível que a interação com o Cu²⁺ não ocorra sempre da mesma forma.

Ainda com relação ao pH, vimos que o peptídeo PrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹, que apresenta um sítio de ligação já caracterizado para Cu²⁺, pode interagir com este íon em pH 5,0, promovendo a inibição da agregação desse peptídeo e alteração conformacional. Esses resultados demonstram nesse sistema um papel benéfico do Cu²⁺ em etapas primordiais para a patogênese das doenças por prion. Assim como visto para o Cu²⁺, a presença de DNA apenas e a presença dos dois ligantes (Cu²⁺ e DNA) foi também capaz de promover esse efeito benéfico (inibição da agregação), porém provavelmente por vias diferentes, uma vez que, a diminuição da agregação promovida gerou agregados menores, porém a morfologia desses agregados foi diferente, como visto por microscopia. A presença de ambos ligantes induziu a formação de espécies oligoméricas. Tais espécies oligoméricas merecem investigação futura, pois a agregação e a formação de oligômeros estão diretamente envolvidas no processo neurodegenerativo observado nas doenças por prion. A alteração conformacional promovida por cada ligante também foi diferente, sendo o efeito do DNA prevalente sobre o efeito do Cu²⁺.

Já para a proteína do prion nativa, PrP^{WT}, vemos que o tanto Cu²⁺ quanto o DNA apresentam efeitos inversos na agregação quando comparados com o peptídeo PrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹. Essa diferença mostra como a interação dos mesmos ligantes com domínios

diferentes levam a respostas diferentes. Essas diferenças podem explicar o papel antagônico do Cu^{2+} nos diferentes estudos realizados com esse íon. Uma explicação possível obtida através desses resultados é de que seu papel na proteína inteira seja deletério, mas que, na presença de formas truncadas da PrP, que ocorrem nas EETs, o papel de Cu^{2+} seja benéfico, devido a estabilização da forma solúvel do peptídeo.

Além disso, ficou claro nessa dissertação que ambos ligantes interagem em conjunto com os domínios da PrP estudados, inclusive com a PrP nativa. As diferentes conformações e agregados formados por cada ligante e o seu efeito em conjunto indicam que a interação *in vivo* de ambos com a PrP é possível, o que deve ser levado em consideração, já que tanto Cu^{2+} quanto DNA estão presentes no ambiente celular.

6. REFERÊNCIAS

AGUZZI, A. (1996). "PATHOGENESIS OF SPONGIFORM ENCEPHALOPATHIES: AN UPDATE." INT ARCH ALLERGY IMMUNOL 110(2): 99-106.

AGUZZI, A., BAUMANN, F. E BREMER, J. (2008). "THE PRION'S ELUSIVE REASON FOR BEING." ANNU REV NEUROSCI 31: 439-477.

AGUZZI, A. E O'CONNOR, T. (2010). "PROTEIN AGGREGATION DISEASES: PATHOGENICITY AND THERAPEUTIC PERSPECTIVES." NAT REV DRUG DISCOV 9(3): 237-248.

AGUZZI, A. E POLYMENIDOU, M. (2004). "MAMMALIAN PRION BIOLOGY: ONE CENTURY OF EVOLVING CONCEPTS." CELL 116(2): 313-327.

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.

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.

BILLETER, M., RIEK, R., WIDER, G., HORNEMANN, S., GLOCKSHUBER, R. E WUTHRICH, K. (1997). "PRION PROTEIN NMR STRUCTURE AND SPECIES BARRIER FOR PRION DISEASES." PROC NATL ACAD SCI U S A 94(14): 7281-7285.

BOCHAROVA, O. V., BREYDO, L., SALNIKOV, V. V. E BASKAKOV, I. V. (2005). "COPPER(II) INHIBITS IN VITRO CONVERSION OF PRION PROTEIN INTO AMYLOID FIBRILS." BIOCHEMISTRY 44(18): 6776-6787.

BONOMO, R. P., IMPERLIZZERI, G., PAPPALARDO, G., RIZZARELLI, E. E TABBI, G. (2000). "COPPER(II) BINDING MODES IN THE PRION OCTAPEPTIDE PHGGGWGQ: A SPECTROSCOPIC AND VOLTAMMETRIC STUDY." CHEMISTRY 6(22): 4195-4202.

BROWN, D. R. (2001). "COPPER AND PRION DISEASE." BRAIN RES BULL 55(2): 165-173.

BROWN, D. R. (2005). "NEURODEGENERATION AND OXIDATIVE STRESS: PRION DISEASE RESULTS FROM LOSS OF ANTIOXIDANT DEFENCE." FOLIA NEUROPATHOL 43(4): 229-243.

BROWN, D. R. (2009A). "BRAIN PROTEINS THAT MIND METALS: A NEURODEGENERATIVE PERSPECTIVE." DALTON TRANS(21): 4069-4076.

BROWN, D. R. (2010). "METALLOPROTEINS AND NEURONAL DEATH." METALLOMICS 2(3): 186-194.

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, D. R., SCHMIDT, B. E. KRETZSCHMAR, H. A. (1998). "EFFECTS OF COPPER ON SURVIVAL OF PRION PROTEIN KNOCKOUT NEURONS AND GLIA." J NEUROCHEM 70(4): 1686-1693.

BROWN, D. R., WONG, B. S., HAFIZ, F., CLIVE, C., HASWELL, S. J. E JONES, I. M. (1999). "NORMAL PRION PROTEIN HAS AN ACTIVITY LIKE THAT OF SUPEROXIDE DISMUTASE." BIOCHEM J 344 PT 1: 1-5.

BROWN, P. (2008). "TRANSMISSIBLE SPONGIFORM ENCEPHALOPATHY IN THE 21ST CENTURY: NEUROSCIENCE FOR THE CLINICAL NEUROLOGIST." NEUROLOGY 70(9): 713-722.

BROWN, P. (2009B). "REFLECTIONS ON A HALF-CENTURY IN THE FIELD OF TRANSMISSIBLE SPONGIFORM ENCEPHALOPATHY." FOLIA NEUROPATHOL 47(2): 95-103.

BRYCE, G. F., ROESKE, R. W. E GURD, R. N. (1966). "L-HISTIDINE-CONTAINING PEPTIDES AS MODELS FOR THE INTERACTION OF COPPER (II) AND NICKEL (II) IONS WITH SPERM WHALE APOMYOGLOBIN." J BIOL CHEM 241(5): 1072-1080.

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.

BURNS, C. S., ARONOFF-SPENCER, E., LEGNAME, G., PRUSINER, S. B., ANTHOLINE, W. E., GERFEN, G. J., PEISACH, J. E MILLHAUSER, G. L. (2003). "COPPER COORDINATION IN THE FULL-LENGTH, RECOMBINANT PRION PROTEIN." BIOCHEMISTRY 42(22): 6794-6803.

CAETANO, F. A., LOPES, M. H., HAJJ, G. N., MACHADO, C. F., PINTO ARANTES, C., MAGALHAES, A. C., VIEIRA MDE, P., AMERICO, T. A., MASSENSINI, A. R., PRIOLA, S. A., VORBERG, I., GOMEZ, M. V., LINDEN, R., PRADO, V. F., MARTINS, V. R. E PRADO, M. A. (2008). "ENDOCYTOSIS OF PRION PROTEIN IS REQUIRED FOR ERK1/2 SIGNALING INDUCED BY STRESS-INDUCIBLE PROTEIN 1." J NEUROSCI 28(26): 6691-6702.

CANETE, M., VILLANUEVA, A., JUARRANZ, A. E STOCKERT, J. C. (1987). "A STUDY OF INTERACTION OF THIOFLAVINE T WITH DNA: EVIDENCE FOR INTERCALATION." CELL

MOL BIOL 33(2): 191-199.

CASHMAN, N. R. E CAUGHEY, B. (2004). "PRION DISEASES--CLOSE TO EFFECTIVE THERAPY?" NAT REV DRUG DISCOV 3(10): 874-884.

CAUGHEY, B. (2000). "FORMATION OF PROTEASE-RESISTANT PRION PROTEIN IN CELL-FREE SYSTEMS." CURR ISSUES MOL BIOL 2(3): 95-101.

CAUGHEY, B. E BARON, G. S. (2006). "PRIONS AND THEIR PARTNERS IN CRIME." NATURE 443(7113): 803-810.

CAUGHEY, B. E CHESEBRO, B. (2001). "TRANSMISSIBLE SPONGIFORM ENCEPHALOPATHIES AND PRION PROTEIN INTERCONVERSIONS." ADV VIRUS RES 56: 277-311.

CAUGHEY, B. E KOCISKO, D. A. (2003). "PRION DISEASES: A NUCLEIC-ACID ACCOMPLICE?" NATURE 425(6959): 673-674.

CAUGHEY, B. E LANSBURY, P. T. (2003). "PROTOFIBRILS, PORES, FIBRILS, AND NEURODEGENERATION: SEPARATING THE RESPONSIBLE PROTEIN AGGREGATES FROM THE INNOCENT BYSTANDERS." ANNU REV NEUROSCI 26: 267-298.

CAUGHEY, B. W., DONG, A., BHAT, K. S., ERNST, D., HAYES, S. F. E CAUGHEY, W. S. (1991). "SECONDARY STRUCTURE ANALYSIS OF THE SCRAPIE-ASSOCIATED PROTEIN PRP 27-30 IN WATER BY INFRARED SPECTROSCOPY." BIOCHEMISTRY 30(31): 7672-7680.

CHANDLER, H. W., BECK, W. C., CARLSON, W. W. E RENTSCHLER, G. (1961). "THE EPIDEMIOLOGY OF SURGICAL INFECTIONS. II. BACTERIAL DENSITIES IN AN OPERATING ROOM AREA." GUTHRIE CLIN BULL 30: 38-50.

CHESEBRO, B., TRIFILO, M., RACE, R., MEADE-WHITE, K., TENG, C., LACASSE, R., RAYMOND, L., FAVARA, C., BARON, G., PRIOLA, S., CAUGHEY, B., MASLIAH, E. E OLDSTONE, M. (2005). "ANCHORLESS PRION PROTEIN RESULTS IN INFECTIOUS AMYLOID DISEASE WITHOUT CLINICAL SCRAPIE." SCIENCE 308(5727): 1435-1439.

CHITI, F. E DOBSON, C. M. (2006). "PROTEIN MISFOLDING, FUNCTIONAL AMYLOID, AND HUMAN DISEASE." ANNU REV BIOCHEM 75: 333-366.

CHOI, C. J., ANANTHARAM, V., MARTIN, D. P., NICHOLSON, E. M., RICHT, J. A., KANTHASAMY, A. E KANTHASAMY, A. G. (2010). "MANGANESE UPREGULATES CELLULAR PRION PROTEIN AND CONTRIBUTES TO ALTERED STABILIZATION AND PROTEOLYSIS: RELEVANCE TO ROLE OF METALS IN PATHOGENESIS OF PRION DISEASE." TOXICOL SCI 115(2): 535-546.

COHEN, F. E. E PRUSINER, S. B. (1998). "PATHOLOGIC CONFORMATIONS OF PRION PROTEINS." ANNU REV BIOCHEM 67: 793-819.

COLLINGE, J. (1999). "VARIANT CREUTZFELDT-JAKOB DISEASE." LANCET 354(9175): 317-323.

CORDEIRO, Y., LIMA, L. M., GOMES, M. P., FOGUEL, D. E SILVA, J. L. (2004). "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(7): 5346-5352.

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.

CORDEIRO, Y. E SILVA, J. L. (2005). "THE HYPOTHESIS OF THE CATALYTIC ACTION OF NUCLEIC ACID ON THE CONVERSION OF PRION PROTEIN." PROTEIN PEPT LETT 12(3): 251-255.

DAVIES, P. E BROWN, D. R. (2008). "THE CHEMISTRY OF COPPER BINDING TO PRP: IS THERE SUFFICIENT EVIDENCE TO ELUCIDATE A ROLE FOR COPPER IN PROTEIN FUNCTION?" BIOCHEM J 410(2): 237-244.

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., HARRIS, B. T., REES, J. R. E SUPATTAPONE, S. (2007). "FORMATION OF NATIVE PRIONS FROM MINIMAL COMPONENTS IN VITRO." PROC NATL ACAD SCI U S A 104(23): 9741-9746.

DELEAULT, N. R., LUCASSEN, R. W. E SUPATTAPONE, S. (2003). "RNA MOLECULES STIMULATE PRION PROTEIN CONVERSION." NATURE 425(6959): 717-720.

DING, X., XIE, H. E KANG, Y. J. (2011). "THE SIGNIFICANCE OF COPPER CHELATORS IN CLINICAL AND EXPERIMENTAL APPLICATION." J NUTR BIOCHEM 22(4): 301-310.

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 FULL-LENGTH HAMSTER PRION PROTEIN PRP(29-231): THE N TERMINUS IS HIGHLY FLEXIBLE." PROC NATL ACAD SCI U S A 94(25): 13452-13457.

EGHIAIAN, F., GROSCLAUDE, J., LESCEU, S., DEBEY, P., DOUBLET, B., TREGUER, E.,

REZAEI, H. E. KNOSSOW, M. (2004). "INSIGHT INTO THE PRPC-->PRPC CONVERSION FROM THE STRUCTURES OF ANTIBODY-BOUND OVINE PRION SCRAPIE-SUSCEPTIBILITY VARIANTS." PROC NATL ACAD SCI U S A 101(28): 10254-10259.

EKERT, B., MUEL, B. E. LATARJET, R. (1970). "[ULTRAVIOLET IRRADIATION OF RIBOSOMES: ACTION SPECTRUM OF INACTIVATION OF THE SYNTHESIS FUNCTION]." BIOCHIM BIOPHYS ACTA 204(1): 275-277.

FARINATI, F., CARDIN, R., D'INCA, R., NACCARATO, R. E. STURNIOLO, G. C. (2003). "ZINC TREATMENT PREVENTS LIPID PEROXIDATION AND INCREASES GLUTATHIONE AVAILABILITY IN WILSON'S DISEASE." J LAB CLIN MED 141(6): 372-377.

FIORITI, L., QUAGLIO, E., MASSIGNAN, T., COLOMBO, L., STEWART, R. S., SALMONA, M., HARRIS, D. A., FORLONI, G. E. CHIESA, R. (2005). "THE NEUROTOXICITY OF PRION PROTEIN (PRP) PEPTIDE 106-126 IS INDEPENDENT OF THE EXPRESSION LEVEL OF PRP AND IS NOT MEDIATED BY ABNORMAL PRP SPECIES." MOL CELL NEUROSCI 28(1): 165-176.

FLECHSIG, E., SHMERLING, D., HEGYI, I., RAEBER, A. J., FISCHER, M., COZZIO, A., VON MERING, C., AGUZZI, A. E. WEISSMANN, C. (2000). "PRION PROTEIN DEVOID OF THE OCTAPEPTIDE REPEAT REGION RESTORES SUSCEPTIBILITY TO SCRAPIE IN PRP KNOCKOUT MICE." NEURON 27(2): 399-408.

FORNAI, F., FERRUCCI, M., GESI, M., BANDETTINI DI POGGIO, A., GIORGI, F. S., BIAGIONI, F. E. PAPARELLI, A. (2006). "A HYPOTHESIS ON PRION DISORDERS: ARE INFECTIOUS, INHERITED, AND SPORADIC CAUSES SO DISTINCT?" BRAIN RES BULL 69(2): 95-100.

GABUS, C., AUXILIEN, S., PECHOUX, C., DORMONT, D., SWIETNICKI, W., MORILLAS, M., SUREWICZ, W., NANDI, P. E. DARLIX, J. L. (2001). "THE PRION PROTEIN HAS DNA STRAND TRANSFER PROPERTIES SIMILAR TO RETROVIRAL NUCLEOCAPSID PROTEIN." J MOL BIOL 307(4): 1011-1021.

GAGGELLI, E., BERNARDI, F., MOLTENI, E., POGNI, R., VALENSIN, D., VALENSIN, G., REMELLI, M., LUCZKOWSKI, M. E. KOZŁOWSKI, H. (2005). "INTERACTION OF THE HUMAN PRION PRP(106-126) SEQUENCE WITH COPPER(II), MANGANESE(II), AND ZINC(II): NMR AND EPR STUDIES." J AM CHEM SOC 127(3): 996-1006.

GAJDUSEK, D. C., GIBBS, C. J., JR., ASHER, D. M. E. DAVID, E. (1968). "TRANSMISSION OF EXPERIMENTAL KURU TO THE SPIDER MONKEY (ATELES GEOFFREYI)." SCIENCE 162(854): 693-694.

GARNETT, A. P. E. VILES, J. H. (2003). "COPPER BINDING TO THE OCTAREPEATS OF THE PRION PROTEIN. AFFINITY, SPECIFICITY, FOLDING, AND COOPERATIVITY: INSIGHTS FROM CIRCULAR DICHROISM." J BIOL CHEM 278(9): 6795-6802.

GASSET, M., BALDWIN, M. A., LLOYD, D. H., GABRIEL, J. M., HOLTZMAN, D. M., COHEN, F., FLETTERICK, R. E PRUSINER, S. B. (1992). "PREDICTED ALPHA-HELICAL REGIONS OF THE PRION PROTEIN WHEN SYNTHESIZED AS PEPTIDES FORM AMYLOID." PROC NATL ACAD SCI U S A 89(22): 10940-10944.

GIBBS, C. J., JR., GAJDUSEK, D. C. E LATARJET, R. (1978). "UNUSUAL RESISTANCE TO IONIZING RADIATION OF THE VIRUSES OF KURU, CREUTZFELDT-JAKOB DISEASE, AND SCRAPIE." PROC NATL ACAD SCI U S A 75(12): 6268-6270.

GIESE, A., LEVIN, J., BERTSCH, U. E KRETZSCHMAR, H. (2004). "EFFECT OF METAL IONS ON DE NOVO AGGREGATION OF FULL-LENGTH PRION PROTEIN." BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN 320(4): 1240-1246.

GLATZEL, M., STOECK, K., SEEGER, H., LUHRS, T. E AGUZZI, A. (2005). "HUMAN PRION DISEASES: MOLECULAR AND CLINICAL ASPECTS." ARCH NEUROL 62(4): 545-552.

GOMES, M. P., CORDEIRO, Y. E SILVA, J. L. (2008A). "THE PECULIAR INTERACTION BETWEEN MAMMALIAN PRION PROTEIN AND RNA." PRION 2(2): 64-66.

GOMES, M. P., MILLEN, T. A., FERREIRA, P. S., E SILVA, N. L., VIEIRA, T. C., ALMEIDA, M. S., SILVA, J. L. E CORDEIRO, Y. (2008B). "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.

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.

GRALKA, E., VALENSIN, D., PORCIATTI, E., GAJDA, C., GAGGELLI, E., VALENSIN, G., KAMYSZ, W., NADOLNY, R., GUERRINI, R., BACCO, D., REMELLI, M. E KOZLOWSKI, H. (2008). "CUII BINDING SITES LOCATED AT HIS-96 AND HIS-111 OF THE HUMAN PRION PROTEIN: THERMODYNAMIC AND SPECTROSCOPIC STUDIES ON MODEL PEPTIDES." DALTON TRANS(38): 5207-5219.

GROSSMAN, A., ZEILER, B. E SAPIRSTEIN, V. (2003). "PRION PROTEIN INTERACTIONS WITH NUCLEIC ACID: POSSIBLE MODELS FOR PRION DISEASE AND PRION FUNCTION." NEUROCHEM RES 28(6): 955-963.

GUICHARD, C., IVANYI-NAGY, R., SHARMA, K. K., GABUS, C., MARC, D., MELY, Y. E DARLIX, J. L. (2011). "ANALYSIS OF NUCLEIC ACID CHAPERONING BY THE PRION PROTEIN AND ITS INHIBITION BY OLIGONUCLEOTIDES." NUCLEIC ACIDS RES.

HAIGH, C. L. E BROWN, D. R. (2006). "PRION PROTEIN REDUCES BOTH OXIDATIVE AND NON-OXIDATIVE COPPER TOXICITY." J NEUROCHEM 98(3): 677-689.

HAIRE, L. F., WHYTE, S. M., VASISHT, N., GILL, A. C., VERMA, C., DODSON, E. J., DODSON, G. G. E BAYLEY, P. M. (2004). "THE CRYSTAL STRUCTURE OF THE GLOBULAR DOMAIN OF SHEEP PRION PROTEIN." J MOL BIOL 336(5): 1175-1183.

HERMS, J., TINGS, T., GALL, S., MADLUNG, A., GIESE, A., SIEBERT, H., SCHURMANN, P., WINDL, O., BROSE, N. E KRETZSCHMAR, H. (1999). "EVIDENCE OF PRESYNAPTIC LOCATION AND FUNCTION OF THE PRION PROTEIN." J NEUROSCI 19(20): 8866-8875.

HIJAZI, N., SHAKED, Y., ROSENMANN, H., BEN-HUR, T. E GABIZON, R. (2003). "COPPER BINDING TO PRPC MAY INHIBIT PRION DISEASE PROPAGATION." BRAIN RES 993(1-2): 192-200.

HOPT, A., KORTE, S., FINK, H., PANNE, U., NIESSNER, R., JAHN, R., KRETZSCHMAR, H. E HERMS, J. (2003). "METHODS FOR STUDYING SYNAPTOSOMAL COPPER RELEASE." J NEUROSCI METHODS 128(1-2): 159-172.

HORNSHAW, M. P., MCDERMOTT, J. R., CANDY, J. M. E LAKEY, J. H. (1995). "COPPER BINDING TO THE N-TERMINAL TANDEM REPEAT REGION OF MAMMALIAN AND AVIAN PRION PROTEIN: STRUCTURAL STUDIES USING SYNTHETIC PEPTIDES." BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN 214(3): 993-999.

HUANG, Z., PRUSINER, S. B. E COHEN, F. E. (1996). "STRUCTURES OF PRION PROTEINS AND CONFORMATIONAL MODELS FOR PRION DISEASES." CURR TOP MICROBIOL IMMUNOL 207: 49-67.

HUREAU, C., CHARLET, L., DORLET, P., GONNET, F., SPADINI, L., ANXOLABEHRE-MALLART, E. E GIRERD, J. J. (2006). "A SPECTROSCOPIC AND VOLTAMMETRIC STUDY OF THE PH-DEPENDENT CU(II) COORDINATION TO THE PEPTIDE GGGTH: RELEVANCE TO THE FIFTH CU(II) SITE IN THE PRION PROTEIN." J BIOL INORG CHEM 11(6): 735-744.

ISAACS, J. D., INGRAM, R. J., COLLINGE, J., ALTMANN, D. M. E JACKSON, G. S. (2006). "THE HUMAN PRION PROTEIN RESIDUE 129 POLYMORPHISM LIES WITHIN A CLUSTER OF EPITOPES FOR T CELL RECOGNITION." J NEUROPATHOL EXP NEUROL 65(11): 1059-1068.

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.

JAMES, T. L., LIU, H., ULYANOV, N. B., FARR-JONES, S., ZHANG, H., DONNE, D. G., KANEKO, K., GROTH, D., MEHLHORN, I., PRUSINER, S. B. E COHEN, F. E. (1997). "SOLUTION STRUCTURE OF A 142-RESIDUE RECOMBINANT PRION PROTEIN CORRESPONDING TO THE INFECTIOUS FRAGMENT OF THE SCRAPIE ISOFORM." PROC NATL ACAD SCI U S A 94(19): 10086-10091.

JIMENEZ, J. S. (2010). "PROTEIN-DNA INTERACTION AT THE ORIGIN OF NEUROLOGICAL DISEASES: A HYPOTHESIS." J ALZHEIMERS DIS 22(2): 375-391.

JOBLING, M. F., HUANG, X., STEWART, L. R., BARNHAM, K. J., CURTAIN, C., VOLITAKIS, I., PERUGINI, M., WHITE, A. R., CHERNY, R. A., MASTERS, C. L., BARROW, C. J., COLLINS, S. J., BUSH, A. I. E CAPPAL, R. (2001). "COPPER AND ZINC BINDING MODULATES THE AGGREGATION AND NEUROTOXIC PROPERTIES OF THE PRION PEPTIDE PRP106-126." BIOCHEMISTRY 40(27): 8073-8084.

JOHNSON, W. C., JR. (1988). "SECONDARY STRUCTURE OF PROTEINS THROUGH CIRCULAR DICHROISM SPECTROSCOPY." ANNU REV BIOPHYS BIOPHYS CHEM 17: 145-166.

JONES, C. E., ABDELRAHEIM, S. R., BROWN, D. R. E VILES, J. H. (2004). "PREFERENTIAL CU²⁺ COORDINATION BY HIS96 AND HIS111 INDUCES BETA-SHEET FORMATION IN THE UNSTRUCTURED AMYLOIDOGENIC REGION OF THE PRION PROTEIN." J BIOL CHEM 279(31): 32018-32027.

JONES, C. E., KLEWPATINOND, M., ABDELRAHEIM, S. R., BROWN, D. R. E VILES, J. H. (2005). "PROBING COPPER²⁺ BINDING TO THE PRION PROTEIN USING DIAMAGNETIC NICKEL²⁺ AND ¹H NMR: THE UNSTRUCTURED N TERMINUS FACILITATES THE COORDINATION OF SIX COPPER²⁺ IONS AT PHYSIOLOGICAL CONCENTRATIONS." J MOL BIOL 346(5): 1393-1407.

JONES, T. (2004). ""MAD COW" AND PRION DISEASES." TENN MED 97(9): 413-414.

KARDOS, J., KOVACS, I., HAJOS, F., KALMAN, M. E SIMONYI, M. (1989). "NERVE ENDINGS FROM RAT BRAIN TISSUE RELEASE COPPER UPON DEPOLARIZATION. A POSSIBLE ROLE IN REGULATING NEURONAL EXCITABILITY." NEUROSCI LETT 103(2): 139-144.

KLEWPATINOND, M. E VILES, J. H. (2007). "FRAGMENT LENGTH INFLUENCES AFFINITY FOR CU²⁺ AND NI²⁺ BINDING TO HIS96 OR HIS111 OF THE PRION PROTEIN AND SPECTROSCOPIC EVIDENCE FOR A MULTIPLE HISTIDINE BINDING ONLY AT LOW PH." BIOCHEM J 404(3): 393-402.

KNOPFEL, M. E SOLIOZ, M. (2002). "CHARACTERIZATION OF A CYTOCHROME B(558) FERRIC/CUPRIC REDUCTASE FROM RABBIT DUODENAL BRUSH BORDER MEMBRANES." BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN 291(2): 220-225.

KORTH, C., STIERLI, B., STREIT, P., MOSER, M., SCHALLER, O., FISCHER, R., SCHULZ-SCHAEFFER, W., KRETZSCHMAR, H., RAEBER, A., BRAUN, U., EHRENSPERGER, F., HORNEMANN, S., GLOCKSHUBER, R., RIEK, R., BILLETER, M., WUTHRICH, K. E OESCH, B. (1997). "PRION (PRPSC)-SPECIFIC EPITOPE DEFINED BY A MONOCLONAL ANTIBODY."

NATURE 390(6655): 74-77.

KOVACS, G. G. E BUDKA, H. (2008). "PRION DISEASES: FROM PROTEIN TO CELL PATHOLOGY." AM J PATHOL 172(3): 555-565.

KRETZSCHMAR, H. A., TINGS, T., MADLUNG, A., GIESE, A. E HERMS, J. (2001). "PRION PROTEIN AS COPPER-BINDING PROTEIN AT THE SYNAPSE." METHODS MOL MED 59: 17-30.

LAKOWICZ, J. R. (2006). "PLASMONICS IN BIOLOGY AND PLASMON-CONTROLLED FLUORESCENCE." PLASMONICS 1(1): 5-33.

LEGNAGE, 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.

LEHMANN, S. (2002). "[THE PRION PROTEIN]." J SOC BIOL 196(4): 309-312.

LEVIN, J., BERTSCH, U., KRETZSCHMAR, H. E GIESE, A. (2005). "SINGLE PARTICLE ANALYSIS OF MANGANESE-INDUCED PRION PROTEIN AGGREGATES." BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN 329(4): 1200-1207.

LEWIS, V. E HOOPER, N. M. (2011). "THE ROLE OF LIPID RAFTS IN PRION PROTEIN BIOLOGY." FRONT BIOSCI 16: 151-168.

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. E SILVA, J. L. (2006). "STRUCTURAL INSIGHTS INTO THE INTERACTION BETWEEN PRION PROTEIN AND NUCLEIC ACID." BIOCHEMISTRY 45(30): 9180-9187.

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.

LINDER, M. C. E HAZEGH-AZAM, M. (1996). "COPPER BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY." AM J CLIN NUTR 63(5): 797S-811S.

LIU, A., RIEK, R., ZAHN, R., HORNEMANN, S., GLOCKSHUBER, R. E WUTHRICH, K. (1999). "PEPTIDES AND PROTEINS IN NEURODEGENERATIVE DISEASE: HELIX PROPENSITY OF A POLYPEPTIDE CONTAINING HELIX 1 OF THE MOUSE PRION PROTEIN STUDIED BY NMR AND CD SPECTROSCOPY." BIOPOLYMERS 51(2): 145-152.

LIU, L., JIANG, D., MCDONALD, A., HAO, Y., MILLHAUSER, G. L. E ZHOU, F. (2011). "COPPER REDOX CYCLING IN THE PRION PROTEIN DEPENDS CRITICALLY ON BINDING MODE." J AM CHEM SOC.

LIU, Y. E SCHUBERT, D. (1997). "CYTOTOXIC AMYLOID PEPTIDES INHIBIT CELLULAR 3-(4,5-DIMETHYLTHIAZOL-2-YL)-2,5-DIPHENYLTETRAZOLIUM BROMIDE (MTT) REDUCTION BY ENHANCING MTT FORMAZAN EXOCYTOSIS." J NEUROCHEM 69(6): 2285-2293.

LOBLEY, A., WHITMORE, L. E WALLACE, B. A. (2002). "DICHROWEB: AN INTERACTIVE WEBSITE FOR THE ANALYSIS OF PROTEIN SECONDARY STRUCTURE FROM CIRCULAR DICHROISM SPECTRA." BIOINFORMATICS 18(1): 211-212.

LOWE, J., VIEYRA, A., CATTY, P., GUILLAIN, F., MINTZ, E. E CUILLEL, M. (2004). "A MUTATIONAL STUDY IN THE TRANSMEMBRANE DOMAIN OF CCC2P, THE YEAST CU(I)-ATPASE, SHOWS DIFFERENT ROLES FOR EACH CYS-PRO-CYS CYSTEINE." J BIOL CHEM 279(25): 25986-25994.

LU, B. Y. E CHANG, J. Y. (2002). "ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A POLYMERIZED PRION PROTEIN." BIOCHEM J 364(P1): 81-87.

MACEDO, B., KASCHULA, C. H., HUNTER, R., CHAVES, J. A., VAN DER MERWE, J. D., SILVA, J. L., EGAN, T. J. E CORDEIRO, Y. (2010). "SYNTHESIS AND ANTI-PRION ACTIVITY EVALUATION OF AMINOQUINOLINE ANALOGUES." EUR J MED CHEM 45(11): 5468-5473.

MANGE, A., CROZET, C., LEHMANN, S. E BERANGER, F. (2004). "SCRAPIE-LIKE PRION PROTEIN IS TRANSLOCATED TO THE NUCLEI OF INFECTED CELLS INDEPENDENTLY OF PROTEASOME INHIBITION AND INTERACTS WITH CHROMATIN." J CELL SCI 117(P11): 2411-2416.

MARQUES, A. F., CORDEIRO, Y., SILVA, J. L. E LIMA, L. M. (2009). "ENHANCED PRION PROTEIN STABILITY COUPLED TO DNA RECOGNITION AND MILIEU ACIDIFICATION." BIOPHYS CHEM 141(2-3): 135-139.

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.

MEHRPOUR, M. E CODOGNO, P. (2010). "PRION PROTEIN: FROM PHYSIOLOGY TO CANCER BIOLOGY." CANCER LETT 290(1): 1-23.

MILLHAUSER, G. L. (2004). "COPPER BINDING IN THE PRION PROTEIN." ACC CHEM RES 37(2): 79-85.

MILLHAUSER, G. L. (2007). "COPPER AND THE PRION PROTEIN: METHODS, STRUCTURES, FUNCTION, AND DISEASE." ANNU REV PHYS CHEM 58: 299-320.

MIURA, T., HORI-I, A., MOTOTANI, H. E TAKEUCHI, H. (1999). "RAMAN SPECTROSCOPIC STUDY ON THE COPPER(II) BINDING MODE OF PRION OCTAPEPTIDE AND ITS PH DEPENDENCE." BIOCHEMISTRY 38(35): 11560-11569.

MOUDJOU, M., BERNARD, J., SABUNCU, E., LANGEVIN, C. E LAUDE, H. (2007). "GLYCAN CHAINS MODULATE PRION PROTEIN BINDING TO IMMOBILIZED METAL IONS." NEUROCHEM INT 50(5): 689-695.

NADAL, R. C., ABDELRAHEIM, S. R., BRAZIER, M. W., RIGBY, S. E., BROWN, D. R. E VILES, J. H. (2007). "PRION PROTEIN DOES NOT REDOX-SILENCE CU²⁺, BUT IS A SACRIFICIAL QUENCHER OF HYDROXYL RADICALS." FREE RADIC BIOL MED 42(1): 79-89.

NADAL, R. C., DAVIES, P., BROWN, D. R. E VILES, J. H. (2009). "EVALUATION OF COPPER²⁺ AFFINITIES FOR THE PRION PROTEIN." BIOCHEMISTRY 48(38): 8929-8931.

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.

NANDI, P. K. (1997). "INTERACTION OF PRION PEPTIDE HUPRP106-126 WITH NUCLEIC ACID." ARCH VIROL 142(12): 2537-2545.

OSZ, K., NAGY, Z., PAPPALARDO, G., DI NATALE, G., SANNA, D., MICERA, G., RIZZARELLI, E. E SOVAGO, I. (2007). "COPPER(II) INTERACTION WITH PRION PEPTIDE FRAGMENTS ENCOMPASSING HISTIDINE RESIDUES WITHIN AND OUTSIDE THE OCTAREPEAT DOMAIN: SPECIATION, STABILITY CONSTANTS AND BINDING DETAILS." CHEMISTRY 13(25): 7129-7143.

PAN, K. M., BALDWIN, M., NGUYEN, J., GASSET, M., SERBAN, A., GROTH, D., MEHLHORN, I., HUANG, Z., FLETTERICK, R. J., COHEN, F. E. E ET AL. (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.

PATTISON, I. H., CLARKE, M. C., HAIG, D. A. E JEBBETT, J. N. (1971). "BRAIN CELL CULTURES FROM MICE AFFECTED WITH SCRAPIE OR FED WITH CUPRIZONE." RES VET SCI 12(5): 478-480.

PAULY, P. C. E HARRIS, D. A. (1998). "COPPER STIMULATES ENDOCYTOSIS OF THE PRION PROTEIN." J BIOL CHEM 273(50): 33107-33110.

PENA, M. M., LEE, J. E THIELE, D. J. (1999). "A DELICATE BALANCE: HOMEOSTATIC CONTROL OF COPPER UPTAKE AND DISTRIBUTION." J NUTR 129(7): 1251-1260.

PEOC'H, K., VOLLAND, H., DE GASSART, A., BEAUDRY, P., SAZDOVITCH, V., SORGATO, M. C., CREMINON, C., LAPLANCHE, J. L. E LEHMANN, S. (2003). "PRION-LIKE PROTEIN

DOPPEL EXPRESSION IS NOT MODIFIED IN SCRAPIE-INFECTED CELLS AND IN THE BRAINS OF PATIENTS WITH CREUTZFELDT-JAKOB DISEASE." FEBS LETT 536(1-3): 61-65.

PERERA, W. S. E HOOPER, N. M. (2001). "ABLATION OF THE METAL ION-INDUCED ENDOCYTOSIS OF THE PRION PROTEIN BY DISEASE-ASSOCIATED MUTATION OF THE OCTAREPEAT REGION." CURR BIOL 11(7): 519-523.

PRADO, M. A., ALVES-SILVA, J., MAGALHAES, A. C., PRADO, V. F., LINDEN, R., MARTINS, V. R. E BRENTANI, R. R. (2004). "PRPC ON THE ROAD: TRAFFICKING OF THE CELLULAR PRION PROTEIN." J NEUROCHEM 88(4): 769-781.

PRUSINER, S. B. (1982). "NOVEL PROTEINACEOUS INFECTIOUS PARTICLES CAUSE SCRAPIE." SCIENCE 216(4542): 136-144.

PRUSINER, S. B. (1984). "PRIONS: NOVEL INFECTIOUS PATHOGENS." ADV VIRUS RES 29: 1-56.

PRUSINER, S. B. (1998). "THE PRION DISEASES." BRAIN PATHOL 8(3): 499-513.

PRUSINER, S. B., MCKINLEY, M. P., BOWMAN, K. A., BOLTON, D. C., BENDHEIM, P. E., GROTH, D. F. E GLENNER, G. G. (1983). "SCRAPIE PRIONS AGGREGATE TO FORM AMYLOID-LIKE BIREFRINGENT RODS." CELL 35(2 PT 1): 349-358.

QIN, K., YANG, D. S., YANG, Y., CHISHTI, M. A., MENG, L. J., KRETZSCHMAR, H. A., YIP, C. M., FRASER, P. E. E WESTAWAY, D. (2000). "COPPER(II)-INDUCED CONFORMATIONAL CHANGES AND PROTEASE RESISTANCE IN RECOMBINANT AND CELLULAR PRP. EFFECT OF PROTEIN AGE AND DEAMIDATION." J BIOL CHEM 275(25): 19121-19131.

QUAGLIO, E., CHIESA, R. E HARRIS, D. A. (2001). "COPPER CONVERTS THE CELLULAR PRION PROTEIN INTO A PROTEASE-RESISTANT SPECIES THAT IS DISTINCT FROM THE SCRAPIE ISOFORM." J BIOL CHEM 276(14): 11432-11438.

RACHIDI, W., VILETTE, D., GUIRAUD, P., ARLOTTO, M., RIONDEL, J., LAUDE, H., LEHMANN, S. E FAVIER, A. (2003). "EXPRESSION OF PRION PROTEIN INCREASES CELLULAR COPPER BINDING AND ANTIOXIDANT ENZYME ACTIVITIES BUT NOT COPPER DELIVERY." J BIOL CHEM 278(11): 9064-9072.

RAGG, E., TAGLIAVINI, F., MALESANI, P., MONTICELLI, L., BUGIANI, O., FORLONI, G. E SALMONA, M. (1999). "DETERMINATION OF SOLUTION CONFORMATIONS OF PRP106-126, A NEUROTOXIC FRAGMENT OF PRION PROTEIN, BY 1H NMR AND RESTRAINED MOLECULAR DYNAMICS." EUR J BIOCHEM 266(3): 1192-1201.

REDECKE, L., VON BERGEN, M., CLOS, J., KONAREV, P. V., SVERGUN, D. I., FITTSCHEN, U. E., BROEKAERT, J. A., BRUNS, O., GEORGIEVA, D., MANDELKOW, E., GENOV, N. E BETZEL, C. (2007). "STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF BETA-SHEETED OLIGOMERS

FORMED ON THE PATHWAY OF OXIDATIVE PRION PROTEIN AGGREGATION IN VITRO." J STRUCT BIOL 157(2): 308-320.

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.

REQUENA, J. R., GROTH, D., LEGNAME, G., STADTMAN, E. R., PRUSINER, S. B. E LEVINE, R. L. (2001). "COPPER-CATALYZED OXIDATION OF THE RECOMBINANT SHA(29-231) PRION PROTEIN." PROC NATL ACAD SCI U S A 98(13): 7170-7175.

REZAI, P., PONTIKIS, C. C., HUDSON, L., CAIRNS, N. J. E LANTOS, P. L. (2005). "EXPRESSION OF CELLULAR PRION PROTEIN IN THE FRONTAL AND OCCIPITAL LOBE IN ALZHEIMER'S DISEASE, DIFFUSE LEWY BODY DISEASE, AND IN NORMAL BRAIN: AN IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY." J HISTOCHEM CYTOCHEM 53(8): 929-940.

RIEK, R., HORNE MANN, 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.

RIVILLAS-ACEVEDO, L., GRANDE-AZTATZI, R., LOMELI, I., GARCIA, J. E., BARRIOS, E., TELOXA, S., VELA, A. E QUINTANAR, L. (2011). "SPECTROSCOPIC AND ELECTRONIC STRUCTURE STUDIES OF COPPER(II) BINDING TO HIS111 IN THE HUMAN PRION PROTEIN FRAGMENT 106-115: EVALUATING THE ROLE OF PROTONS AND METHIONINE RESIDUES." INORG CHEM 50(5): 1956-1972.

ROCHET, J. C. E LANSBURY, P. T., JR. (2000). "AMYLOID FIBRILLOGENESIS: THEMES AND VARIATIONS." CURR OPIN STRUCT BIOL 10(1): 60-68.

ROTILIO, G., CARRI, M. T., ROSSI, L. E CIRIOLO, M. R. (2000). "COPPER-DEPENDENT OXIDATIVE STRESS AND NEURODEGENERATION." IUBMB LIFE 50(4-5): 309-314.

RUIZ, F. H., SILVA, E. E INESTROSA, N. C. (2000). "THE N-TERMINAL TANDEM REPEAT REGION OF HUMAN PRION PROTEIN REDUCES COPPER: ROLE OF TRYPTOPHAN RESIDUES." BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN 269(2): 491-495.

SABEL, C. E., NEUREUTHER, J. M. E SIEMANN, S. (2010). "A SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR THE DETERMINATION OF ZINC, COPPER, AND COBALT IONS IN METALLOPROTEINS USING ZINCON." ANAL BIOCHEM 397(2): 218-226.

SCHATZL, H. M., DA COSTA, M., TAYLOR, L., COHEN, F. E. E PRUSINER, S. B. (1995). "PRION PROTEIN GENE VARIATION AMONG PRIMATES." J MOL BIOL 245(4): 362-374.

SEJVAR, J. J., SCHONBERGER, L. B. E BELAY, E. D. (2008). "TRANSMISSIBLE

- SPONGIFORM ENCEPHALOPATHIES." J AM VET MED ASSOC 233(11): 1705-1712.
- SHEARER, J. E SOH, P. (2007). "THE COPPER(II) ADDUCT OF THE UNSTRUCTURED REGION OF THE AMYLOIDOGENIC FRAGMENT DERIVED FROM THE HUMAN PRION PROTEIN IS REDOX-ACTIVE AT PHYSIOLOGICAL PH." INORG CHEM 46(3): 710-719.
- SHEARER, J., SOH, P. E LENTZ, S. (2008). "BOTH MET(109) AND MET(112) ARE UTILIZED FOR CU(II) COORDINATION BY THE AMYLOIDOGENIC FRAGMENT OF THE HUMAN PRION PROTEIN AT PHYSIOLOGICAL PH." J INORG BIOCHEM 102(12): 2103-2113.
- SHIELDS, S. B. E FRANKLIN, S. J. (2004). "DE NOVO DESIGN OF A COPPER(II)-BINDING HELIX-TURN-HELIX CHIMERA: THE PRION OCTAREPEAT MOTIF IN A NEW CONTEXT." BIOCHEMISTRY 43(51): 16086-16091.
- SIGURDSSON, E. M., BROWN, D. R., ALIM, M. A., SCHOLTZOVA, H., CARP, R., MEEKER, H. C., PRELLI, F., FRANGIONE, B. E WISNIEWSKI, T. (2003). "COPPER CHELATION DELAYS THE ONSET OF PRION DISEASE." J BIOL CHEM 278(47): 46199-46202.
- SILVA, J. L., GOMES, M. P., VIEIRA, T. C. E CORDEIRO, Y. (2010). "PRP INTERACTIONS WITH NUCLEIC ACIDS AND GLYCOSAMINOGLYCANS IN FUNCTION AND DISEASE." FRONT BIOSCI 15: 132-150.
- SILVA, J. L., LIMA, L. M., FOGUEL, D. E CORDEIRO, Y. (2008). "INTRIGUING NUCLEIC-ACID-BINDING FEATURES OF MAMMALIAN PRION PROTEIN." TRENDS BIOCHEM SCI 33(3): 132-140.
- SILVA, J. L., VIEIRA, T. C., GOMES, M. P., RANGEL, L. P., SCAPIN, S. M. E CORDEIRO, Y. (2011). "EXPERIMENTAL APPROACHES TO THE INTERACTION OF THE PRION PROTEIN WITH NUCLEIC ACIDS AND GLYCOSAMINOGLYCANS: MODULATORS OF THE PATHOGENIC CONVERSION." METHODS 53(3): 306-317.
- SILVEIRA, J. R., RAYMOND, G. J., HUGHSON, A. G., RACE, R. E., SIM, V. L., HAYES, S. F. E CAUGHEY, B. (2005). "THE MOST INFECTIOUS PRION PROTEIN PARTICLES." NATURE 437(7056): 257-261.
- STAHL, N., BORCHELT, D. R., HSIAO, K. E PRUSINER, S. B. (1987). "SCRAPIE PRION PROTEIN CONTAINS A PHOSPHATIDYLINOSITOL GLYCOLIPID." CELL 51(2): 229-240.
- STEVENS, D. J., WALTER, E. D., RODRIGUEZ, A., DRAPER, D., DAVIES, P., BROWN, D. R. E MILLHAUSER, G. L. (2009). "EARLY ONSET PRION DISEASE FROM OCTAREPEAT EXPANSION CORRELATES WITH COPPER BINDING PROPERTIES." PLOS PATHOG 5(4): E1000390.
- STOCKEL, J., SAFAR, J., WALLACE, A. C., COHEN, F. E. E PRUSINER, S. B. (1998). "PRION PROTEIN SELECTIVELY BINDS COPPER(II) IONS." BIOCHEMISTRY 37(20): 7185-7193.

STROM, A., WANG, G. S., PICKETTS, D. J., REIMER, R., STUKE, A. W. E SCOTT, F. W. (2011). "CELLULAR PRION PROTEIN LOCALIZES TO THE NUCLEUS OF ENDOCRINE AND NEURONAL CELLS AND INTERACTS WITH STRUCTURAL CHROMATIN COMPONENTS." EUR J CELL BIOL 90(5): 414-419.

SUNDBERG, M. W., MEARES, C. F., GOODWIN, D. A. E DIAMANTI, C. I. (1974). "CHELATING AGENTS FOR THE BINDING OF METAL IONS TO MACROMOLECULES." NATURE 250(467): 587-588.

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.

TOYAMA, B. H. E WEISSMAN, J. S. (2011). "AMYLOID STRUCTURE: CONFORMATIONAL DIVERSITY AND CONSEQUENCES." ANNU REV BIOCHEM 80: 557-585.

TYCKO, R., SAVTCHENKO, R., OSTAPCHENKO, V. G., MAKARAVA, N. E BASKAKOV, I. V. (2010). "THE ALPHA-HELICAL C-TERMINAL DOMAIN OF FULL-LENGTH RECOMBINANT PRP CONVERTS TO AN IN-REGISTER PARALLEL BETA-SHEET STRUCTURE IN PRP FIBRILS: EVIDENCE FROM SOLID STATE NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE." BIOCHEMISTRY 49(44): 9488-9497.

VALENTINE, J. S. E GRALLA, E. B. (1997). "DELIVERING COPPER INSIDE YEAST AND HUMAN CELLS." SCIENCE 278(5339): 817-818.

VASSALLO, N. E HERMS, J. (2003). "CELLULAR PRION PROTEIN FUNCTION IN COPPER HOMEOSTASIS AND REDOX SIGNALLING AT THE SYNAPSE." J NEUROCHEM 86(3): 538-544.

VENNETI, S. (2010). "PRION DISEASES." CLIN LAB MED 30(1): 293-309.

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.

VILES, J. H., KLEWPATINOND, M. E NADAL, R. C. (2008). "COPPER AND THE STRUCTURAL BIOLOGY OF THE PRION PROTEIN." BIOCHEM SOC TRANS 36(Pt 6): 1288-1292.

WADSWORTH, J. D., HILL, A. F., JOINER, S., JACKSON, G. S., CLARKE, A. R. E COLLINGE, J. (1999). "STRAIN-SPECIFIC PRION-PROTEIN CONFORMATION DETERMINED BY METAL IONS." NAT CELL BIOL 1(1): 55-59.

WAGGONER, D. J., BARTNIKAS, T. B. E GITLIN, J. D. (1999). "THE ROLE OF COPPER IN NEURODEGENERATIVE DISEASE." NEUROBIOL DIS 6(4): 221-230.

WALTER, E. D., CHATTOPADHYAY, M. E MILLHAUSER, G. L. (2006). "THE AFFINITY OF COPPER BINDING TO THE PRION PROTEIN OCTAREPEAT DOMAIN: EVIDENCE FOR NEGATIVE COOPERATIVITY." BIOCHEMISTRY 45(43): 13083-13092.

WALTER, E. D., STEVENS, D. J., SPEVACEK, A. R., VISCONTE, M. P., DEI ROSSI, A. E MILLHAUSER, G. L. (2009). "COPPER BINDING EXTRINSIC TO THE OCTAREPEAT REGION IN THE PRION PROTEIN." CURR PROTEIN PEPT SCI 10(5): 529-535.

WAPNIR, R. A. (1998). "COPPER ABSORPTION AND BIOAVAILABILITY." AM J CLIN NUTR 67(5 SUPPL): 1054S-1060S.

WATANABE, Y., HIRAOKA, W., IGARASHI, M., ITO, K., SHIMOYAMA, Y., HORIUCHI, M., YAMAMORI, T., YASUI, H., KUWABARA, M., INAGAKI, F. E INANAMI, O. (2010). "A NOVEL COPPER(II) COORDINATION AT HIS186 IN FULL-LENGTH MURINE PRION PROTEIN." BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN 394(3): 522-528.

WECHSELBERGER, C., WURM, S., PFARR, W. E HOGLINGER, O. (2002). "THE PHYSIOLOGICAL FUNCTIONS OF PRION PROTEIN." EXP CELL RES 281(1): 1-8.

WEISSMANN, C. (2004). "THE STATE OF THE PRION." NAT REV MICROBIOL 2(11): 861-871.

WELLS, G. A., SCOTT, A. C., JOHNSON, C. T., GUNNING, R. F., HANCOCK, R. D., JEFFREY, M., DAWSON, M. E BRADLEY, R. (1987). "A NOVEL PROGRESSIVE SPONGIFORM ENCEPHALOPATHY IN CATTLE." VET REC 121(18): 419-420.

WESTERGARD, L., CHRISTENSEN, H. M. E HARRIS, D. A. (2007). "THE CELLULAR PRION PROTEIN (PRP(C)): ITS PHYSIOLOGICAL FUNCTION AND ROLE IN DISEASE." BIOCHIM BIOPHYS ACTA 1772(6): 629-644.

WHITTAL, R. M., BALL, H. L., COHEN, F. E., BURLINGAME, A. L., PRUSINER, S. B. E BALDWIN, M. A. (2000). "COPPER BINDING TO OCTAREPEAT PEPTIDES OF THE PRION PROTEIN MONITORED BY MASS SPECTROMETRY." PROTEIN SCI 9(2): 332-343.

WILL, R. G. (1999). "PRION RELATED DISORDERS." J R COLL PHYSICIANS LOND 33(4): 311-315.

WONG, B. S., LIU, T., PAISLEY, D., LI, R., PAN, T., CHEN, S. G., PERRY, G., PETERSEN, R. B., SMITH, M. A., MELTON, D. W., GAMBETTI, P., BROWN, D. R. E SY, M. S. (2001). "INDUCTION OF HO-1 AND NOS IN DOPPEL-EXPRESSING MICE DEVOID OF PRP: IMPLICATIONS FOR DOPPEL FUNCTION." MOL CELL NEUROSCI 17(4): 768-775.

YANG, P. W., KUMAR, T. K., JAYARAMAN, G. E YU, C. (1996). "EFFECT OF ORGANIC ACIDS IN THE PREVENTION OF AGGREGATION ON RAPID REFOLDING OF PROTEINS." BIOCHEM MOL BIOL INT 38(2): 393-399.

YIN, J., CHEN, R. E LIU, C. (2009). "NUCLEIC ACID INDUCED PROTEIN AGGREGATION AND ITS ROLE IN BIOLOGY AND PATHOLOGY." FRONT BIOSCI 14: 5084-5106.

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 GARCIA, 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.

ZHANG, H., KANEKO, K., NGUYEN, J. T., LIVSHITS, T. L., BALDWIN, M. A., COHEN, F. E., JAMES, T. L. E PRUSINER, S. B. (1995). "CONFORMATIONAL TRANSITIONS IN PEPTIDES CONTAINING TWO PUTATIVE ALPHA-HELICES OF THE PRION PROTEIN." J MOL BIOL 250(4): 514-526.

ZLOTNIK, I. E STAMP, J. T. (1961). "SCRAPIE DISEASE OF SHEEP." WORLD NEUROL 2: 895-907.