



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DA INTERAÇÃO DA PROTEÍNA PRION COM
APTÂMEROS DE DNA**

Carolina Oliveira Matos

Orientador: Prof. Dr. Anderson de Sá Pinheiro

Co-Orientadora: Profa. Dra. Yraima Cordeiro

Rio de Janeiro

2019

À Deus, que sem o qual eu nada seria, por estar comigo em todos os momentos, iluminando meus caminhos, sendo meu refúgio e fortaleza. À Ele, minha eterna gratidão.

À minha família, em especial a minha mãe Maria Inês, que tanto se sacrificou – e sacrifica – para que eu chegasse onde estou. Sem você, jamais conseguiria.

AGRADECIMENTOS

O doutorado, bem mais que um período de aprimoramento técnico, é uma parte do processo de formação do indivíduo que coincide com uma fase da vida cheia de questionamentos, incertezas quanto ao futuro, necessidade de afirmação profissional e rica em decisões de efeito perene na vida pessoal. A parte mais difícil da pós-graduação não é seu *strictu sensu*, a redação da tese e de artigos, as disciplinas ou as questões científicas sobre as quais nos debruçamos. A parte mais difícil é aprender gerenciar o tempo, tornar-se intelectualmente independente, conviver com a instabilidade inerente à posição profissional e, sobretudo, manter a mente sã em meio a todo esse caos. Tudo isso sem esquecer que existe família, amigos, casa e uma vida inteira do lado de fora do laboratório. Essa é uma tarefa árdua sobre a qual a banca não vai falar e cuja parte experimental jamais poderia ser reproduzida. Trata-se de lições que não se pode ensinar apenas aprender, pela própria experiência, num experimento que jamais termina. Sou muito grata a todas as pessoas que participaram dessa etapa da minha vida, passiva ou voluntariamente, com seus bons e/ou maus exemplos. Aprendi e ainda estou aprendendo algo com cada um deles e isso tornou o processo de doutoramento muito rico. Deixo aqui o meu MUITO OBRIGADA:

Ao meu orientador Prof. Dr. Anderson de Sá Pinheiro por todo apoio ao longo desses quatro anos presente no laboratório. Obrigada pela paciência em todos os meus momentos de desânimo, pela orientação, cuidado por esse trabalho e por todos os conselhos científicos.

A minha co-orientadora Prof. Dra. Yraima Cordeiro, obrigada por me conceder um espaço especial em seu laboratório e fazer desses dois anos e meio no LABIME uma etapa cheia de boas lembranças. Obrigada pela orientação, confiança e carinho.

A minha amiga e irmã científica Carolina Lixa, por me acompanhar nos meus primeiros meses de doutorado e me ensinar quase tudo que sei de bancada. Pelas infinitas conversas de desabafo e encorajamento, por todos os momentos compartilhados dentro e fora do laboratório. Você é um ser de luz e muito especial pra mim.

Aos amigos do LABEP:

- Beatriz, pela amizade, apoio, por ser uma ótima companhia no show do Molejo e por sempre ceder sua casa para as nossas comemorações.
- Bianca, pela amizade, carinho e por me ensinar a fazer compras no Saara.
- Guilherme, pela amizade, apoio, pelas catuabas divididas e companhia nas madrugadas no centro.
- Leonardo, por me ensinar a mexer no Corel e pelo seu humor sarcástico nas minhas infundáveis histórias. Obrigada pela amizade e companhia de sempre.
- Luísão, por ser sempre tão presente mesmo quando ausente. Pelos abraços apertados e pelo coração gigante.
- Aos demais, Bruna, Luízinho, João, professoras Cris, Dani e Lúcia. Obrigada pela amizade, por tornar o laboratório um espaço acolhedor e amigo, pelas dezenas de festas e comemorações e pelo apoio em cada momento que precisei.

Aos amigos antigos e atuais do LABMOL:

- Kleber, por não me deixar ser a única química do laboratório, pela companhia, amizade e pelas várias histórias inusitadas.
- Márcia (em memória), pela amizade, pelas inúmeras conversas sobre filosofia e por me dar chocolate sempre que me percebia triste. Aprendi lições grandiosas com você. Obrigada por tudo, você faz muita falta.
- Daniel, pelos bons momentos compartilhados, seja com experimentos ou com conversas sobre futuro, finanças e desenvolvimento pessoal.
- Aos demais Luiza, Nathalia, Germana, Clara, Karina e Igor. Obrigada pelos momentos de boa convivência dentro e fora do laboratório.

Aos amigos antigos e atuais do LABIME:

- Nathália, por todas as discussões sobre prion e carreira profissional. Por adorar experimentar as minhas receitas fit, mas odiar o gosto de todas elas. Saudades de você no laboratório.
- Lucas, por toda a ajuda com experimentos, nas trocas de diálise tarde da noite, pelas várias discussões científicas e filosóficas e por sempre concordar comigo que todos os nossos encontros deveriam ter uma torta de limão da Yulli.

- Gabriel, por me deixar copiar todas as poses das fotos dele, pelos abraços demorados, pelos jantares *home made* e por me apresentar os melhores restaurantes e eventos gastronômicos do Rio.
- Jonatan, por me ensinar de formas controversas o poder da fé. Obrigada por todas as nossas conversas e as várias indicações de livros. Você é um cara admirável.
- Letícia, pela companhia até tarde da noite no laboratório e pelas inúmeras gordisses compartilhadas. Obrigada pela amizade e por todo o apoio nos momentos em que precisei.
- Yulli por me ensinar a fazer a minha torta preferida da vida. Por toda a ajuda nessa reta final do doutorado, com os experimentos de microscopia e por dar continuidade a esse trabalho tão lindo.
- Aos demais, Heloísa, Felipe, Yngrid e Priscila. Obrigada por tornarem a rotina mais agradável. Vocês tornaram os meus dias mais leves e alegres.

A Patrícia por me receber tão bem no LABIME e se tornar uma grande amiga. Por me ajudar na purificação de PrP e a encontrar as coisas escondidas no laboratório. Por me apresentar a região dos lagos, pelas aventuras em Terezópolis e pelos incontáveis momentos compartilhados, bons e ruins.

A Faby, minha *flat mate* que me acolheu e me recebeu tão bem na nossa casinha. Obrigada por todos os choros e risadas e pelos inúmeros momentos compartilhados. Eu aprendi muito com você. Além de amiga você foi ainda minha *personal trainer* e *personal style*. Obrigada ainda por dividir a Raica comigo, não tenho dúvidas que vocês serão a minha maior falta do Rio. Amo muito vocês duas!

A Mariana Juliani, pela amizade e grande ajuda nos experimentos de microscopia. Além da enorme disposição e paciência após várias horas no microscópio. Obrigada pela contribuição e apoio nessa jornada.

Ao Adolfo e Ramon, amigos especiais que fiz no CnRMN e que contribuíram tanto pra minha formação profissional e pessoal.

Ao CENABIO por proporcionar a realização dos experimentos de DIC e RMN.

Ao CNPEM pelo auxílio concedido as minhas idas a Campinas para a aquisição dos experimentos de SAXS.

Aos membros que compõem a banca examinadora, professora Luciana Pizzatti, professor Marcelo Fantappié, Marcos Dias e em especial ao professor Fábio Almeida. Uma pessoa admirável que tenho muito carinho e respeito desde as suas arguições na minha primeira apresentação oral na AUREMN (2012) sobre o meu trabalho de iniciação científica. Obrigada a todos por aceitarem o convite e por contribuírem para o enriquecimento desse trabalho.

Ao Dr. Marco Antônio Alves Brasil, professor associado, chefe do departamento de psiquiatria da faculdade de medicina da UFRJ *AND* meu médico. Obrigada por todo cuidado, pelas conversas enriquecedoras e pelo apoio nos momentos em que quase surtei. Sempre bom saber que existe alguém de prontidão pra te ajudar nos momentos difíceis. Sem o senhor na minha vida eu realmente não sei o que seria de mim.

A toda a minha família, que está distante e mesmo de longe me dão carinho e suporte. Em especial a minha avó Mariza, que sempre esteve ao meu lado, me dando todo o apoio necessário.

A CAPES, CNPq, FAPERJ e FUJB pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que de alguma maneira compartilharam o trilhar de mais esse caminho percorrido, contribuindo, direta ou indiretamente, para que eu realizasse esta pesquisa, auxiliando-me no meu desenvolvimento pessoal e profissional e me dando forças nos momentos em que mais precisei.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Martin Luther King)

RESUMO

A conversão estrutural e agregação da proteína prion (PrP) são eventos-chave para o surgimento de Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis (EETs). A hipótese ‘*protein-only*’ propõe que o agente etiológico dessas doenças é uma conformação anormal da PrP, a PrP infecciosa (PrP^{Sc}), que pode converter a PrP celular (PrP^C) na contraparte desdobrada. Entretanto, evidências experimentais sustentam o papel de cofatores moleculares, além da PrP^{Sc}, que podem auxiliar no processo de conversão proteica. Entre estes cofatores, os ácidos nucleicos (NA) foram implicados na ligação e conversão de PrP em espécies semelhantes a PrP^{Sc}. Além disso, os aptâmeros de NA também foram propostos para abordagens diagnósticas e terapêuticas para TSEs. Para entender melhor a interação de PrP com NAs e fornecer informações estruturais sobre o complexo PrP:NA, foi estudada a interação do domínio globular da PrP recombinante murina (rPrP⁹⁰⁻²³¹) com aptâmeros de DNA selecionados por SELEX. Foi confirmado por calorimetria de titulação isotérmica (ITC) a interação de rPrP, tanto da proteína inteira quanto no domínio C-terminal, com duas seqüências aptaméricas de DNA de 25 nucleotídeos (A1 e A2). A estrutura dos aptâmeros foi caracterizada por predições teóricas, dicróismo circular (CD), RMN e SAXS, revelando que A1 adota uma estrutura em *hairpin*. A ligação ao aptâmero provocou o desenovelamento parcial da rPrP⁹⁰⁻²³¹ resultando em agregação dinâmica, altamente dependente da razão molar de proteína:DNA. Com base nesta observação, foi investigado a capacidade de rPrP⁹⁰⁻²³¹ de sofrer separação de fase líquido-líquido (LLPS) por si só e induzida pelos aptâmeros. Foi observado separação de fases para rPrP⁹⁰⁻²³¹ sozinha e na presença de A1 e A2. Enquanto a proteína livre rPrP⁹⁰⁻²³¹ se separou em gotículas grandes, os aptâmeros aumentaram a quantidade mas reduziram o tamanho dos condensados ricos em proteína. Surpreendentemente, um aptâmero A1 modificado que não adota uma estrutura em *hairpin* induziu a transição para um estado ordenado, sugerindo a formação de amilóide na superfície de gotículas líquidas. Esta transição de estado líquido para sólido é uma característica de outras IDPs envolvidas em doenças neurodegenerativas. Os resultados descrevem pela primeira vez a interação PrP:NA levando a LLPS e a modulação desse efeito dependendo da estrutura de NA e da estequiometria de ligação, destacando o papel dos NAs no enovelamento da PrP e nas TSEs.

ABSTRACT

Prion protein (PrP) structural conversion and aggregation are key events for the onset of Transmissible Spongiform Encephalopathies (TSEs). The ‘protein-only’ hypothesis proposes that the etiological agent of these diseases is an abnormal conformation of PrP, the scrapie PrP (PrP^{Sc}) that can convert cellular PrP (PrP^C) into the misfolded counterpart. However, experimental evidences support the role of molecular cofactors, besides PrP^{Sc}, that can assist the protein conversion process. Among these cofactors, nucleic acids (NA) have been implicated in PrP binding and conversion into PrP^{Sc}-like species. In addition, NA aptamers were also proposed for diagnostic and therapeutic approaches for TSEs. To further understand PrP interaction with NAs and to provide structural information about the PrP:NA complex, the interaction of recombinant murine PrP (rPrP⁹⁰⁻²³¹) with DNA aptamer selected by SELEX was studied. We confirmed by isothermal titration calorimetry (ITC) the interaction of rPrP, both full-length and the C-terminal globular domain, with two identified 25-mer aptameric sequences (A1 and A2). Aptamers structure was characterized by theoretical predictions, circular dichroism (CD), NMR and SAXS, revealing that A1 adopts a hairpin structure. Aptamer binding caused partial unfolding of rPrP⁹⁰⁻²³¹ resulting in dynamic aggregation, highly dependent on the protein:DNA molar ratio. Based on this observation, we investigated the ability of rPrP⁹⁰⁻²³¹ to undergo liquid-liquid phase separation (LLPS) by itself and induced by the aptamers. We observed phase separation for rPrP⁹⁰⁻²³¹ alone and in the presence of A1 and A2. While free rPrP⁹⁰⁻²³¹ phase separated into large droplets, aptamers increased the amount but reduced the size of the protein-rich condensates. Strikingly, a modified A1 aptamer that does not adopt a hairpin structure induced transition to an ordered state, suggestive of amyloid formation on the surface of liquid droplets. This liquid-to-solid state transition is a hallmark of other IDPs involved in neurodegenerative diseases. Our results describe for the first time PrP:NA interaction leading to LLPS and modulation of this effect depending on NA structure and binding stoichiometry, shedding light on the role of NAs in PrP misfolding and TSEs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Características histológicas e imuno-histoquímicas das EETs.....	4
Figura 2. Ressonância magnética por imagem (RMI) crânio-encefálica da doença de Creutzfeldt-Jakob variante (vCJD).	5
Figura 3. Estrutura tridimensional da PrP ^C humana (HuPrP ^C) ancorada à membrana celular.	7
Figura 4. Conversão de PrP ^C para PrP ^{Sc}	10
Figura 5. Modelos propostos para a conversão de PrP ^C em PrP ^{Sc}	11
Figura 6. Estrutura tridimensional representativa de PrP ^{Sc}	13
Figura 7. Arquitetura β -solenóide de quatro degraus (4R β S) de PrP ^{Sc}	13
Figura 8. Diagrama de energia livre da conversão de PrP ^C em PrP ^{Sc}	14
Figura 9. Representação esquemática do processo de SELEX.	19
Figura 10. Organelas livres de membranas formadas por LLPS.....	21
Figura 11. Interações que dirigem a LLPS.....	25
Figura 12. Ensaio de separação de fases com RBPs na presença de RNA total.	26
Figura 13. A regulação e direcionamento da separação de fase líquido-líquido.	27
Figura 14. Espectros de CD de proteínas e DNAs.....	35
Figura 15. Intensidade de espalhamento para diferentes formas geométricas.	37
Figura 16. Gráfico de Kratky para três construções de Src quinase.	38
Figura 17. Purificação de rPrP ⁹⁰⁻²¹ por cromatografia de afinidade a níquel	42
Figura 18. Análise de pureza por SDS-PAGE de rPrP ⁹⁰⁻²³¹	43
Figura 19. Termogramas da interação de rPrP ⁹⁰⁻²³¹ com A1.....	44
Figura 20. Termogramas de ligação de rPrP ⁹⁰⁻²³¹ aos aptâmeros A1e A2.....	45
Figura 21. Termogramas de ligação de rPrP ⁹⁰⁻²³¹ aos aptâmeros A1 e A2 na presença de diferentes concentrações de NaCl.	47
Figura 22. Investigação da estrutura secundária de A1 e A2 por dicroísmo circular.	49
Figura 23. Espectro 1D de ¹ H RMN dos aptâmeros A1 e A2.....	50
Figura 24. Curvas de espalhamento obtidas para os aptâmeros A1 e A2 e para a proteína albumina de soro bovino (BSA).	51
Figura 25. Análise de globularidade através do gráfico de Kratky.....	52

Figura 26. Regressão linear do domínio de Guinier para o aptâmero A1.....	52
Figura 27. Perfis de desnaturação térmica dos aptâmeros A1 e A2..	53
Figura 28. Predição da estrutura secundária de A1.....	54
Figura 29. Predição da estrutura secundária de A1 com as bases modificadas destacadas em vermelho..	54
Figura 30. Caracterização estrutural de A1_mut..	55
Figura 31. Perfis das curvas de desnaturação térmica de A1_mut..	56
Figura 32. Calorimetria de titulação isotérmica com injeção única de rPrP ⁹⁰⁻²³¹ :A1_mut..	57
Figura 33. rPrP ⁹⁰⁻²³¹ perde conteúdos de estrutura secundária com a ligação a aptâmeros.	58
Figura 34. Aumento da turbidez de rPrP ⁹⁰⁻²³¹ com a adição do aptâmero A1.....	59
Figura 35. Espectro de RMN de rPrP ⁹⁰⁻²³¹ na ausência e na presença de A1 (10:1).....	59
Figura 36. Sequência de oligonucleotídeos derivados de A1.....	60
Figura 37. Termogramas da interação de rPrP ⁹⁰⁻²³¹ com os derivados de A1.....	61
Figura 38. Sequência de rPrP ⁹⁰⁻²³¹	62
Figura 39. Predição de determinantes moleculares envolvidos na separação de fases de rPrP ⁹⁰⁻²³¹ pelo PONDR.....	63
Figura 40. Predição de determinantes moleculares envolvidos na separação de fases de rPrP ⁹⁰⁻²³¹ por ferramentas de bioinformática.....	40
Figura 41. Separação de fases de rPrP ⁹⁰⁻²³¹ <i>in vitro</i>	65
Figura 42. rPrP ⁹⁰⁻²³¹ sofre separação de fases líquido- líquido <i>in vitro</i> ..	67
Figura 43. Aptâmeros modulam a separação de fases de rPrP ⁹⁰⁻²³¹	69
Figura 44. Microscopia DIC dos controles usados nos ensaios de LLPS de rPrP ⁹⁰⁻²³¹ ..	70
Figura 45. rPrP ⁹⁰⁻²³¹ na presença de A1_mut mostra separação de fase anômala..	72
Figura 46. A1_mut promove a transição de condensados líquidos de rPrP ⁹⁰⁻²³¹ para espécies auto-fluorescentes sugestivas de amiloides.	73
Figura 47. rPrP ⁹⁰⁻²³¹ incubada com A1_mut forma agregados que ligam a SYPRO Orange e exibem auto-fluorescência típica de proteínas amiloidogênicas.	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Doenças priônicas que afetam seres humanos e animais.....	3
Tabela 2. Funções atribuídas à proteína prion a níveis molecular, celular e sistêmico. ...	9
Tabela 3. Sequência dos oligonucleotídeos estudados.....	32
Tabela 4. Parâmetros termodinâmicos obtidos dos experimentos de ITC para rPrP:aptâmeros.....	46
Tabela 5. Afinidade de ligação e estequiometria medidas para os oligonucleotídeos 12-mer por ITC.	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Trifosfato de adenosina
BSE	Encefalopatia espongiforme bovina (<i>bovine spongiform encephalopathy</i>)
CD	Dicroísmo Circular (<i>Circular Dichroism</i>)
CJD	Doença de Creutzfeldt-Jakob (<i>Creutzfeldt-Jakob disease</i>)
DIC	Contraste diferencial de interferência (<i>Differential interference contrast</i>)
DLS	Espalhamento de luz dinâmico (<i>dynamic light scattering</i>)
ER	Retículo endoplasmático (<i>endoplasmic reticulum</i>)
HSQC	Coerência heteronuclear de simples-quantum (<i>Heteronuclear single quantum coherence</i>)
IDPs	Proteínas Intrinsecamente Desordenadas (<i>intrinsically disordered proteins</i>)
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
ITC	Calorimetria de Titulação Isotérmica (<i>Isothermal Titration Calorimetry</i>)
K_d	Constante de dissociação
LLPS	Separação de fases líquido-líquido (<i>Liquid liquid Phase Separation</i>)
MLOs	Organelas livres de membrana (<i>Membraneless organelles</i>)
NA	Ácido nucleico (<i>Nucleic acid</i>)
PCR	Reação em cadeia de polimerase (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PK	Proteinase K
PrLDs	Domínios príon-like (<i>prion-like domains</i>)

PrP	Proteína prion
PrP ^C	Proteína prion celular
PrP ^{Sc}	Proteína prion <i>scrapie</i>
RBPs	Proteínas ligantes de RNA (<i>RNA-binding proteins</i>)
RMN	Ressonância magnética nuclear
rPrP	Proteína prion recombinante
SAXS	Espalhamento de raios-x a baixo ângulo (<i>Small-angle X-ray scattering</i>)
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (<i>SDS-polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SELEX	Evolução Sistemática de Ligantes por Enriquecimento Exponencial (<i>Systematic evolution of ligands by exponential enrichment</i>)
SLiMs	Motivos lineares curtos (<i>Short linear motifs</i>)
SNC	Sistema Nervoso Central
TSE	Encefalopatia espongiforme transmissível (<i>transmissible spongiform encephalopathy</i>)
UV	Ultravioleta
vCJD	Doença de Creutzfeldt-Jakob variante (<i>variant Creutzfeldt-Jakob disease</i>)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xiii
SUMÁRIO.....	xv
1. Introdução	1
1.1 Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis	2
1.2 A proteína prion celular	5
1.3 O papel fisiológico da PrP ^C	7
1.4 Conversão estrutural da PrP	9
1.5 Proteína prion <i>scrapie</i>	12
1.6 Interação PrP:Ácidos nucleicos.....	15
1.7 Seleção de aptâmeros por SELEX.....	18
1.8 Separação de fases líquido-líquido (LLPS)	20
1.8.1 Consequências biológicas da separação de fases	22
1.8.2 Linguagem molecular da separação de fases	22
1.8.3 Separação de fases e doenças neurodegenerativas	25
2. Objetivos.....	29
2.1 Objetivo geral.....	29
2.2 Objetivos específicos	29
3. Material e Métodos.....	30
3.1 Expressão do domínio C-terminal da proteína prion recombinante (rPrP ⁹⁰⁻²³¹)	30
3.2 Purificação do domínio rPrP ⁹⁰⁻²³¹	30
3.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS PAGE)	31
3.4 Oligonucleotídeos.....	31
3.5 Desnaturação térmica.....	32

3.6	Calorimetria de Titulação Isotérmica	32
3.7	Ressonância Magnética Nuclear	33
3.8	Dicroísmo Circular	34
3.9	Espalhamento de raios-X a baixo ângulo.....	36
3.10	Espalhamento de luz dinâmico.....	39
3.11	Análises de bioinformática para predição de separação de fases.....	39
3.12	Microscopia de contraste diferencial de interferência (DIC) e microscopia de fluorescência	40
4.	Resultados.....	41
4.1	Purificação do domínio rPrP ⁹⁰⁻²³¹	41
4.2	Determinação da afinidade e especificidade de ligação de A1 e A2 a rPrP ⁹⁰⁻²³¹ e rPrP ²³⁻²³¹	43
4.3	Caracterização estrutural dos aptâmeros A1 e A2.....	48
4.4	Caracterização estrutural de uma forma mutante de A1	54
4.5	Caracterização das mudanças estruturais em rPrP ⁹⁰⁻²³¹ promovidas pela interação com os aptâmeros de DNA	57
4.6	Investigação da região mínima de A1 responsável pela interação com rPrP ⁹⁰⁻²³¹	58
4.7	Investigação da separação de fase líquido-líquido sofrida por rPrP ⁹⁰⁻²³¹	61
4.8	Modulação da separação de fase líquido-líquido de rPrP ⁹⁰⁻²³¹ pelos aptâmeros ...	67
4.9	Os condensados envelhecidos de rPrP:A1_mut evoluem para agregados fibrilares	70
5.	Discussão	76
6.	Conclusões	80

1. Introdução

No início do século XVIII, as substâncias que hoje chamamos de proteínas despertaram grande interesse dos químicos devido à associação com processos celulares. O francês Antoine Fourcroy descreveu pela primeira vez três proteínas de origem animal; albumina, fibrina e gelatina. Quase um século depois, o químico holandês Gerhardus Johannes Mulder e o sueco Jakob Berzelius caracterizaram bioquimicamente as proteínas, as quais chamaram inicialmente de ‘*grundstoff*’ e, posteriormente, de ‘proteína’, do grego a palavra ‘*prota*’ significa ‘importância primária’ (HARTLEY, 1951; KYLE; STEENSMA, 2018; TANFORD; REYNOLDS, 2001). As teorias iniciais sobre as estruturas das proteínas, seu enovelamento e suas funções foram amplamente estudadas e prever o enovelamento proteico continua sendo um desafio nos dias de hoje. Não seria surpreendente então pesquisar sobre uma proteína que desafie paradigmas biológicos e bioquímicos, como a proteína prion (PrP) que revela uma história fascinante e controversa que desafia o dogma da biologia molecular.

Essa história também começa no século XVIII com o surgimento de uma estranha doença em ovelhas, causando um comportamento anormal nos animais afetados, como movimentos alterados, lambidas excessivas e coceira intensa, fazendo com que as ovelhas se raspassem nas cercas. Essa patologia foi chamada *scrapie* e, mais tarde, seria designada como o primeiro membro de uma nova classe de distúrbios neurológicos conhecidos como encefalopatias espongiformes transmissíveis (TSEs) (STOCKMAN; LONDON, 1913). Alguns cientistas, incluindo T. Alper, I.H. Pattison e J.S. Griffith especularam que o agente causador do *scrapie* poderia ser de origem proteica. Em 1966, Alper usou radiação para inativar o agente *scrapie* e descobriu que ele não foi facilmente inativado com alta quantidade de radiação UV e, portanto, poderia ser replicado sem ácidos nucleicos (ALPER et al., 1967). Pattison também adicionou evidências sobre a origem proteica do agente *scrapie* com base na tentativa de isolamento a partir de tecidos fixados em formalina (PATTISON; JONES, 1967). Mas J.S. Griffith foi o primeiro cientista a especular que o agente de *scrapie* era, de fato, proteico. Ele apresentou propostas para tentar explicar o mecanismo pelo qual uma proteína poderia ser infecciosa e como esta infecção poderia ser controlada geneticamente. Em seu artigo, Griffith discutiu que a ocorrência de um agente proteico

não seria necessariamente estranha, embora fosse muito mais interessante (GRIFFITH 1967).

Vários pesquisadores seguiram os passos de Griffith sugerindo que o agente de *scrapie* era um agente proteico (CHO, 1980; HUNTER et al., 1969; MERZ et al., 1981; PRUSINER, 1998). Carleton Gajdusek, médico e pesquisador, estudou o Kuru, doença incurável que afetou a tribo *Fore* em Nova Guiné. A doença apresenta longos períodos de incubação e rápida progressão após os primeiros sintomas, além disso, não provoca resposta imune e não pode ser destruída pelo calor ou radiação. Gajdusek chamou o agente de vírus lento e mostrou que o Kuru estava relacionado com a doença de Creutzfeldt-Jakob em humanos e *scrapie* em ovelhas. Em 1976, ele foi agraciado com o Prêmio Nobel pelas suas descobertas. No entanto, foi Stanley Prusiner que estudou profundamente o agente infeccioso depois que um dos seus pacientes morreu de doença de Creutzfeldt-Jakob. Prusiner criou o termo '*prion*', anagrama de *pro in (proteinaceous infectious particle)*, expressão que designa o caráter proteico e infeccioso. Mais tarde, em 1997, ele ganharia o Prêmio Nobel por essa descoberta. Prusiner e colaboradores isolaram uma proteína amiloide infecciosa de animais doentes e inativaram-na com sucesso, reforçando a hipótese do agente *scrapie* ser proteico (BOLTON, MCKINLEY E PRUSINER 1982).

1.1 Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis

As encefalopatias espongiformes transmissíveis (TSEs) ou doenças priônicas são um grupo de distúrbios neurodegenerativos raros e invariavelmente fatais causados pelo enovelamento incorreto da proteína prion, que afetam várias espécies, incluindo a humana (**Tabela 1**). As doenças priônicas são caracterizadas por três patologias típicas (**Figura 3**): formação de vacúolos nos neurônios que dão ao tecido uma aparência esponjosa (alteração espongiforme), proliferação e hipertrofia das células gliais astrocíticas (gliose astrocitária) e acúmulo de depósitos extracelulares da proteína prion mal enovelada. Outra característica importante dessas doenças é a inexistência de qualquer tipo de resposta inflamatória, uma resposta típica de doenças infecciosas (ERAÑA; VENEGAS; MORENO, 2016; FIELD; PEAT, 1969; MASTERS et al., 1976). As doenças priônicas ocorrem em formas esporádicas, familiares e adquiridas. Doenças priônicas esporádicas acontecem devido ao enovelamento incorreto espontâneo

da proteína príon no cérebro. Doenças priônicas familiares ocorrem quando a base genética predispõe o indivíduo a desenvolver a doença, enquanto a forma adquirida ocorre com a introdução de material infeccioso de uma fonte externa, como exposição médica ou ingestão de tecido infectado pela doença (WHITECHURCH et al., 2017).

No início dos anos 90, o Reino Unido enfrentou uma grande epidemia da encefalopatia espongiforme bovina (BSE), que ficou conhecida como o mal da vaca louca com quase 40 mil casos confirmados. A doença scrapie em ovelhas e cabras já era conhecida há séculos, mas o efeito devastador da epidemia de BSE com a possível contaminação da cadeia alimentar humana aumentou a preocupação com a saúde pública (HARRISON; ROBERTS, 1992).

Tabela 1. Doenças priônicas que afetam seres humanos e animais

Espécie	Doença	Causa
Humana	Creutzfeldt Jakob	Esporádica ou familiar
	Síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker	Familiar
	Insônia familiar fatal	Familiar
	Insônia fatal esporádica	Esporádica
	Kuru	Adquirida
	CJD variante	Adquirida
	CJD iatrogênica	Adquirida
	Ovelhas/cabras	<i>Scrapie</i>
	<i>Scrapie</i> atípica	Esporádica
Gado	Encefalopatia espongiforme bovina (BSE)	Adquirida
	BSE atípica	Esporádica
	Doença debilitante crônica	Adquirida
Veado/alce	Doença debilitante crônica	Adquirida
Vison	Encefalopatia espongiforme transmissível	Adquirida

*(B.C. Whitechurch et al, 2017)

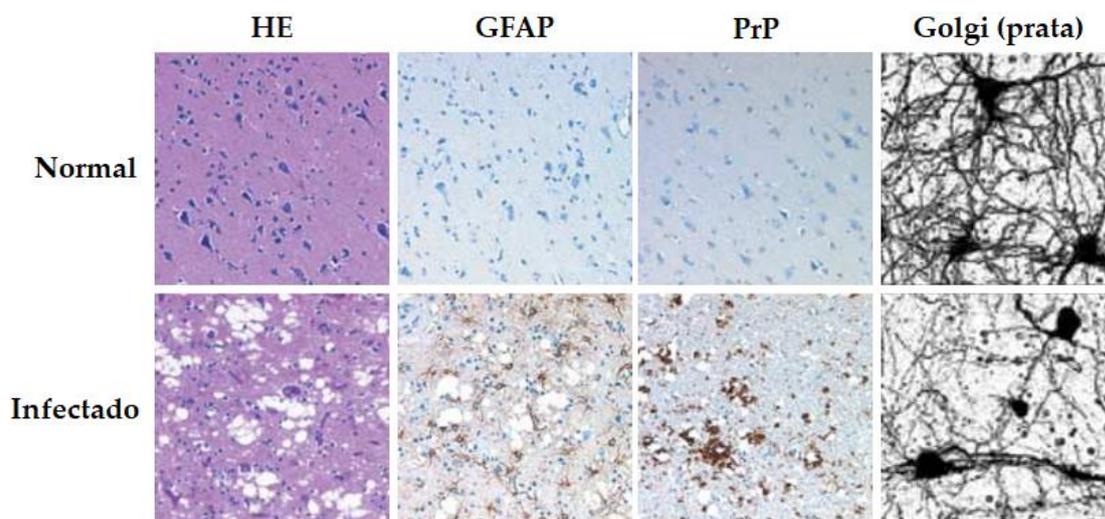


Figura 3. Características histológicas e imuno-histoquímicas das EETs. Imagens do córtex frontal humano coradas com hematoxilina e eosina (HE, primeira coluna), anticorpos contra a proteína ácida fibrilar glial (GFAP, segunda coluna), anticorpos anti-PrP (PrP, terceira coluna) e prata (Golgi, quarta coluna). As imagens superiores exibem um tecido nervoso normal e as imagens inferiores mostram o tecido nervoso de um paciente com CJD. É possível notar, em cada coluna, o aspecto esponjoso do tecido, a proliferação de astrócitos reativos, a deposição de agregados de PrP e a perda de dendritos e conexões sinápticas. Imagens adaptadas de AGUZZI et al., 2001; SOTO; SATANI, 2011.

As TSEs são de difícil diagnóstico, pois apresentam um longo período de incubação que, em grande parte, é assintomático. No entanto, uma vez atingido o estágio clínico, a progressão é tipicamente rápida, levando a morte do paciente de 6 a 14 meses após o aparecimento dos primeiros indícios. Os principais sintomas incluem a demência, ataxia (distúrbios de locomoção), mioclonia (contração involuntária muscular), parestesia (alterações na sensibilidade), insônia e paraplegia (WILL; IRONSIDE, 2016). Atualmente, não há tratamento disponível para pacientes afetados e a detecção da doença pré-clínica permanece problemática (MORENO; TELLING, 2017). O exame de ressonância magnética propõe um diagnóstico específico e não invasivo na vCJD mostrando como principais características a alta intensidade do sinal no tálamo posterior (sinal pulvinar, **Figura 4B**), e os núcleos talâmicos dorsomediais (sinal de ‘hockey stick’, **Figura 4C**) (COLLIE et al., 2003; WILL; IRONSIDE, 2016). Independente da origem, todas as TSEs são atribuídas ao mesmo agente infeccioso, relacionado a mudanças conformacionais na proteína prion (COHEN et al., 1994;

COHEN; PRUSINER, 1998; PRUSINER, 1998). Outra técnica que tem sido utilizada para diagnóstico é a conversão induzida por agitação em tempo real (RT-QuIC, do inglês *real time quaking-induced conversion*), que permite a detecção ultrasensível de PrP^{Sc} de forma rápida e específica (ATARASHI et al., 2011; SCHMITZ et al., 2016).

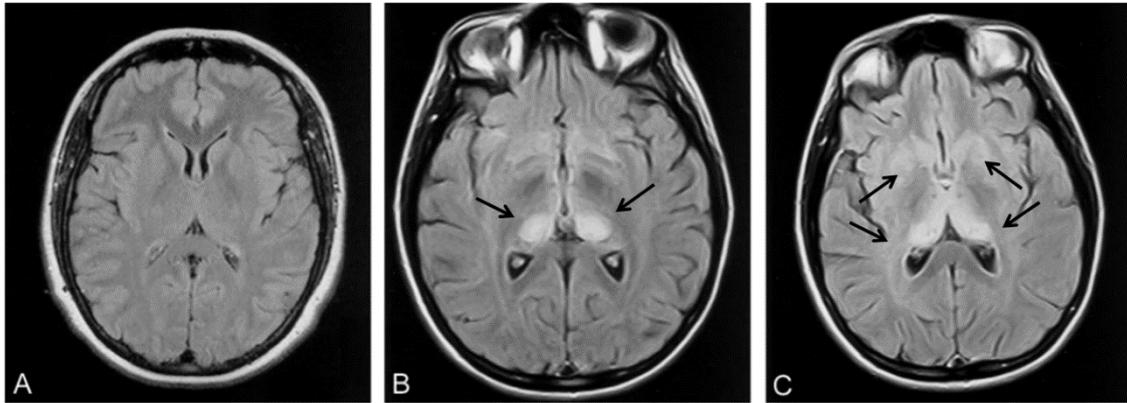


Figura 4. Ressonância magnética por imagem (RMI) crânio-encefálica da doença de Creutzfeldt-Jakob variante (vCJD). (A) Imagem de um cérebro normal. (B) Sinal pulvinar de vCJD. A imagem mostra hiperintensidade e simetria dos núcleos talâmicos pulvinares (indicado pelas setas) (C) Sinal de ‘hockey-stick’ de vCJD. A imagem mostra hiperintensidade nuclear simétrica do tipo pulvinar e dorsomedial do tálamo (indicado pelas setas). Essa combinação dá uma aparência semelhante a um taco de hóquei, presente em 93 % dos casos de vCJD (COLLIE et al., 2003).

1.2 A proteína prion celular

A proteína prion (PrP), na sua isoforma celular (PrP^C), é uma glicoproteína ancorada a glicosilfosfatidilinositol (GPI), encontrada na face externa da membrana plasmática, altamente conservada em espécies de mamíferos, sugerindo que PrP^C desempenha um papel funcional vital (SCHA et al., 1995; WOPFNER et al., 1999). Embora a PrP^C seja altamente expressa no SNC, quantidades substanciais foram encontradas no coração, músculos esqueléticos, útero, intestino e testículos. A PrP^C também é expressa no sistema imunológico, em células tronco hematopoéticas e em compartimentos linfóides e mielóides maduros (ISAACS; JACKSON; ALTMANN, 2006; MOREL et al., 2004; TANJI et al., 1995). Proteínas homólogas a PrP^C são expressas em espécies de vertebrados, incluindo anfíbios, aves, peixes e répteis (WOPFNER et al., 1999).

A PrP^C humana é codificada pelo gene *PRNP*, um gene de cópia única localizado no cromossomo 20 (em murina é localizado no cromossomo 2) que produz um precursor de 253 aminoácidos contendo uma sequência sinal de translocação para o retículo endoplasmático. Posteriormente, a proteína é modificada pela clivagem do peptídeo sinal (1-22) e a adição de uma âncora de GPI no resíduo de serina 231, resultando na proteína madura de 208 aminoácidos (YUSA; SUGITA-KONISHI; KIKUCHI, 2012). Na sua forma madura, a PrP^C humana é monomérica, possui dois potenciais sítios de N-glicosilação localizados em resíduos de asparagina nas posições 181 e 197 (180 e 196 na PrP^C de murinos) e pode existir em um dos três estados de glicosilação, não glicosilado, mono- ou diglicosilado (DIGESTIONS et al., 1999).

As estruturas resolvidas por ressonância magnética nuclear (RMN) da PrP recombinante sugerem que a região C-terminal é globular, contendo três α -hélices (α 1, α 2 e α 3) e duas pequenas fitas- β antiparalelas, com as hélices α 2 e α 3 conectadas por uma ponte dissulfeto entre os resíduos de cisteína nas posições 179 e 214 (RIEK et al., 2002) (**Figura 5**). A região N-terminal da PrP (23-121) não possui estrutura secundária definida, porém contém elementos que são relevantes para o seu papel fisiológico e patológico que inclui uma região de repetição octapeptídica, contendo uma sequência de oito aminoácidos ricos em glicina (PHGGGWGQ - resíduos 51-91) que possui alta afinidade a íons Cu²⁺. Essa ligação é dependente do pH e na presença de Cu²⁺ a PrP^C torna-se mais estruturada, contribuindo para a sua conformação. Além disso, o domínio N-terminal possui também uma região neurotóxica e altamente fibrilogênica, que induz morte celular tanto *in vitro* quanto *in vivo* (KTNMKHMAGAAAAGAVVGGLG - resíduos 106-126) e um domínio hidrofóbico (MAGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAMS - resíduos 112-135) que funciona como um sítio catalítico de clivagem durante o metabolismo de PrP^C e pode também estar envolvido na sua dimerização (COHEN; PRUSINER, 1998; FORLONI et al., 2019; LINDEN et al., 2008; RIEK et al., 2002; YUSA; SUGITA-KONISHI; KIKUCHI, 2012).

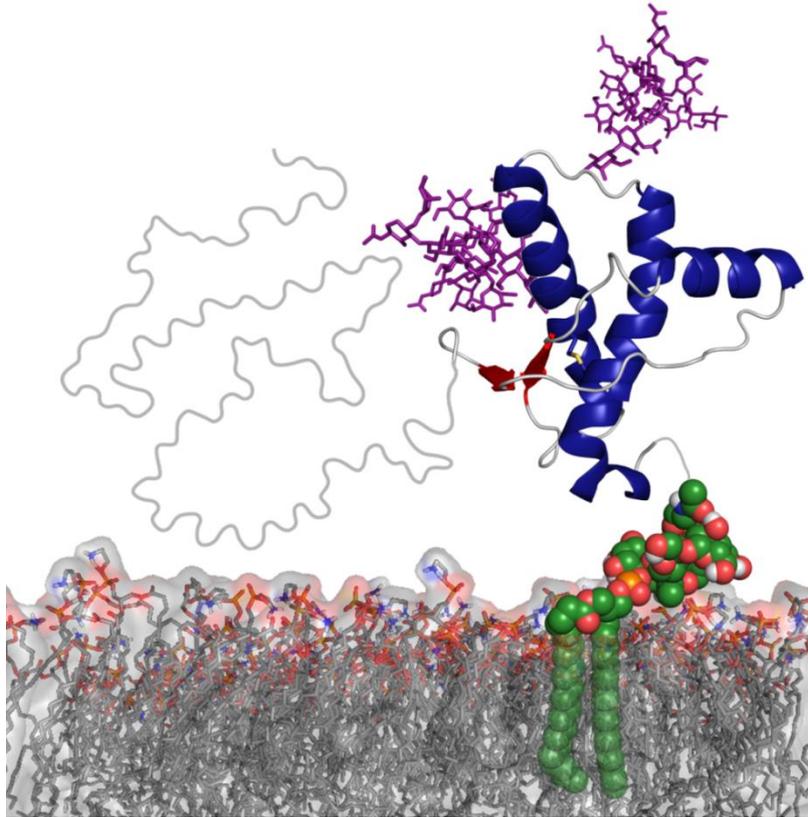


Figura 5. Estrutura tridimensional da PrP^C humana (HuPrP^C) ancorada à membrana celular. O domínio globular (resíduos 126–230) possui 3 α -hélices (azul) e 2 fitas- β (vermelho). O domínio N-terminal (resíduos 23–125, linha cinza) é intrinsecamente desordenado. A proteína está representada em sua forma diglicosilada (glicosídeos em roxo). A extremidade C-terminal está ligada a uma âncora de GPI (verde) que, por sua vez, está inserida na membrana plasmática. (PDB 1AG2) (TCC Ascari, L. 2018).

1.3 O papel fisiológico da PrP^C

Para compreender o papel fisiológico de PrP^C foram conduzidos experimentos com camundongos nocaute para o gene *Prnp*. Esses animais se desenvolveram normalmente e não apresentaram alterações em relação aos camundongos normais (BÜELER et al., 1992). Porém, foram pontuadas pequenas alterações de fenótipos, como alterações na função olfativa e desmielização de neurônios (BREMER et al., 2010), déficit de aprendizado e alterações no ritmo circadiano (CRIADO et al., 2005). Vários estudos avaliaram como a PrP^C afeta a resposta celular à estaurosporina, um potente inibidor da quinase competitiva à base de trifosfato de adenosina que induz sinalização apoptótica (GIULIANO et al., 2004). Foi relatado que a expressão de PrP^C protege os neurônios hipocâmpais primários da morte celular mediada por

estaurosporina, possivelmente através da interação com a fosfoproteína 1 induzida por estresse (STI1), uma proteína secretada que supõem interagir com PrP^C, levando à ativação da via de sinalização da proteína pró-sobrevivência quinase A (PKA) (OSTAPCHENKO et al., 2013). Além dos efeitos diretos sobre a apoptose, a PrP^C supostamente protege as células do estresse oxidativo. Níveis basais de espécies reativas de oxigênio (ROS) e peroxidação lipídica foram menores em neuroblastoma transfectadas com PrP^C e linhagens de células epiteliais em comparação com controles não transfectados. Além disso, a expressão de PrP^C por neurônios primários, astrócitos e linhagens de células tem sido associada a níveis mais baixos de danos após a exposição a várias toxinas oxidativas. Um possível mecanismo é que a PrP^C modula as atividades das enzimas antioxidantes que convertem ROS em produtos menos tóxicos (PATERSON; CURTIS; MACLEOD, 2008; RACHIDI et al., 2003).

Várias outras funções foram ainda propostas como mecanismos de neuroproteção, contribuição em respostas imunes, metabolismo energético, câncer e condições de estresse em geral. As funções apresentadas para PrP^C variam desde o nível sistêmico, como o desenvolvimento da memória, passando pelo celular como a citoproteção, até o nível subcelular, como a homeostase do cobre (**Tabela 2**) (CASTLE; GILL, 2017; LINDEN, 2017; LINDEN et al., 2008). Recentemente, foi apontada a hipótese de que PrP^C possa funcionar como uma plataforma de interação dinâmica, aproximando diferentes proteínas e moléculas para formar uma estrutura macromolecular, promovendo interações de vários módulos de sinalização.(LINDEN, 2017). A PrP^C é bem conhecida por se ligar a muitas moléculas envolvidas em diversos processos fisiológicos, mas a importância dessas interações continua desconhecida e podem estar envolvidas na patogênese das doenças priônicas (MACEDO; CORDEIRO, 2017).

Tabela 2. Funções atribuídas à proteína prion a níveis molecular, celular e sistêmico.

Nível	Funções
Molecular	Homeostase de cobre Fluxo de íons Transporte de metabólitos Homeostase redox
Celular	Proliferação celular Transmissão sináptica Diferenciação celular Manutenção da mielina
Sistêmico	Memória Sono Embriogênese Fisiologia muscular

Adaptada de (LINDEN, 2017).

1.4 Conversão estrutural da PrP

Nas TSEs, PrP^C sofre uma conversão estrutural produzindo a isoforma patogênica (PrP^{Sc}). O desenovelamento de PrP^C e sua conversão em PrP^{Sc} é acompanhado por alterações nas propriedades bioquímicas da proteína. Enquanto PrP^C é solúvel e rica em α -hélices, PrP^{Sc} é insolúvel, rica em folhas- β e possui alta tendência a polimerização, formando agregados proteicos na forma de fibrilas e placas amiloides que se acumulam e são depositados no cérebro. Esses agregados comprometem as funções dos órgãos afetados, levando a morte celular e degeneração do tecido (KELLY, 1998; SIPE, 1992). Além disso, PrP^C é completamente digerida pelo tratamento com proteinase K, enquanto uma região C-terminal de PrP^{Sc} (27-30 kDa) permanece totalmente resistente à proteólise (HUANG; PRUSINER; COHEN, 1996). Recentemente, foi proposto o primeiro modelo com resolução atômica coerente da conversão de PrP^C-PrP^{Sc} baseado na arquitetura β -solenoide de quatro degraus (4R β S) (**Figura 4**). A estabilidade do modelo foi avaliada por simulações de dinâmica

molecular, sugerindo que a PrP^{Sc} não contém α -hélices como proposto em trabalhos prévios (SPAGNOLLI et al., 2018).

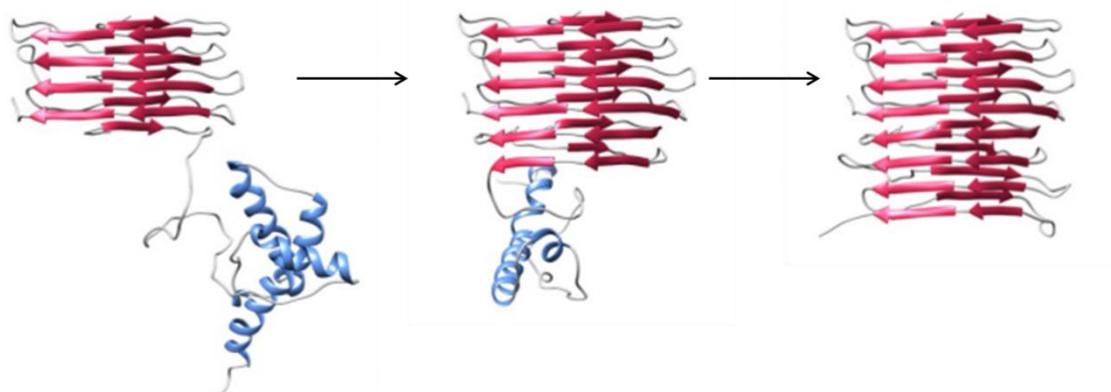


Figura 6. Conversão de PrP^C para PrP^{Sc}. O processo de conversão destaca o progressivo desenovelamento de PrP^C no modelo 4R β S, que inicialmente envolve a região não estruturada, seguido pela perda das α -hélices e a formação progressiva de folhas- β . Adaptado de SPAGNOLLI et al., 2018.

Foram sugeridas hipóteses sobre a espécie tóxica nas EETs como o ganho e a perda de função tóxica. A PrP^{Sc} possui novas propriedades tóxicas que não estão relacionadas com a função fisiológica de PrP^C. Os agregados de PrP^{Sc} podem bloquear o transporte axonal, interferir nas funções sinápticas ou desencadear vias apoptóticas. Por outro lado, a PrP^C possui uma atividade biológica que é perdida na conversão ou contato com PrP^{Sc} e a perda da função de PrP^C causaria, então, a neurodegeneração. Uma terceira hipótese possível para a patogênese do prion envolve uma subversão da função neuroprotetora normal de PrP^C. Neste mecanismo, a interação com PrP^{Sc} converte PrP^C de um transdutor de sinais neuroprotetores em um transdutor de sinais neurotóxicos (CAUGHEY et al., 2009; WESTERGARD; CHRISTENSEN; HARRIS, 2007).

O mecanismo exato de conversão estrutural de PrP^C em PrP^{Sc} ainda não é totalmente entendido, embora saiba-se que a incubação de PrP^C com grandes quantidades de PrP^{Sc} confere resistência à digestão por proteases, sugerindo que a PrP^{Sc} catalisa a conversão de PrP^C em PrP^{Sc} recém formada. Conseqüentemente, a forma *scrapie* induz a conversão de PrP^C em mais PrP^{Sc} e, portanto, é responsável por sua própria propagação (BIIELER et al., 1993; PAN et al., 1993; SARNATARO; PEPE; ZURZOLO, 2017). Dois modelos foram propostos: (i) modelo de conversão assistido por molde e (ii) modelo de nucleação mediada por semente. O primeiro modelo é o mais

aceito e postula uma interação direta entre PrP^{C} e PrP^{Sc} , que é induzida a se converter em mais PrP^{Sc} . O ponto crítico da conversão é a formação de um dímero entre PrP^{C} e PrP^{Sc} ou um intermediário enovelado parcialmente desestabilizado de PrP^{C} . Eventualmente, PrP^{Sc} atua como um modelo que catalisa o re-enovelamento de PrP^{C} para uma conformação de PrP^{Sc} termodinamicamente mais estável. Uma barreira de alta energia pode impedir a conversão espontânea de PrP^{C} em PrP^{Sc} (**Figura 7A**). O segundo modelo de “semeadura” estabelece que PrP^{C} e PrP^{Sc} estejam em equilíbrio termodinâmico reversível. Várias moléculas de PrP^{Sc} monoméricas (menos estáveis que PrP^{C}) são montadas em sementes altamente ordenadas, mais PrP^{Sc} monomérica é recrutada e o agregado pode formar uma estrutura amiloide. A etapa limitante desse mecanismo não é a conversão conformacional em si, mas a etapa de nucleação. A fragmentação dos agregados de PrP^{Sc} aumenta o número de núcleos, o que pode recrutar mais PrP^{Sc} e assim replicar o agente infeccioso nas TSEs (**Figura 7B**) (AGUZZI; LAKKARAJU, 2016; AULIĆ; BOLOGNESI; LEGNAME, 2013; COHEN; PRUSINER, 1998).

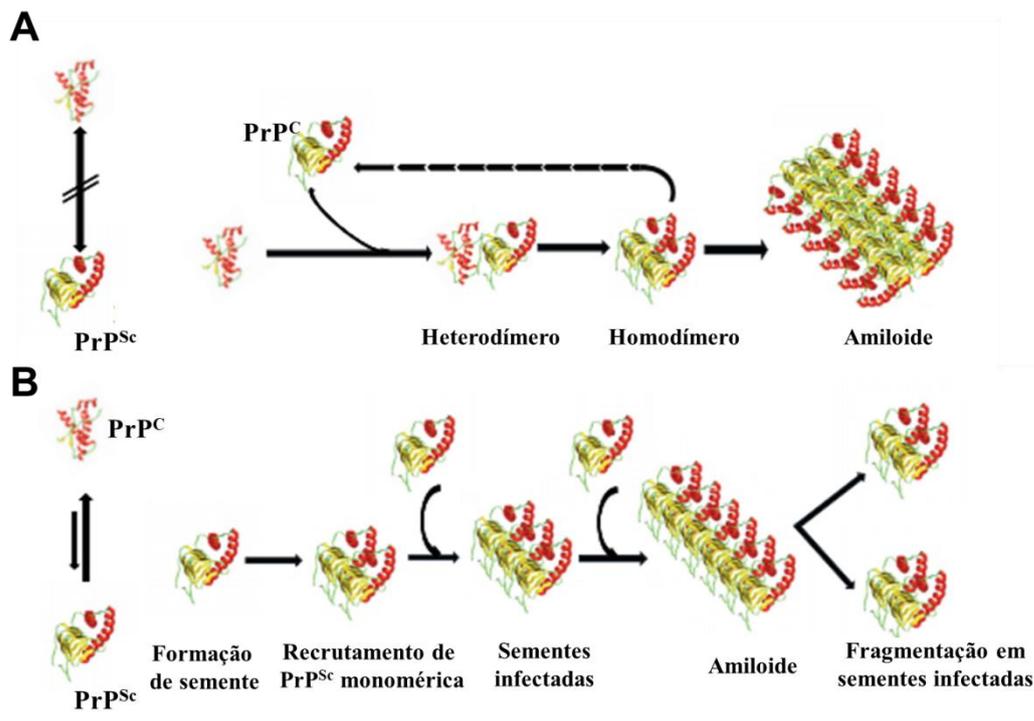


Figura 7. Modelos propostos para a conversão de PrP^{C} em PrP^{Sc} . (A) Modelo de conversão assistido por molde e (B) modelo de nucleação mediada por semente. Adaptado de Aulic *et al* 2013.

1.5 Proteína prion *scrapie*

Como descrito anteriormente, a PrP^{Sc} apresenta-se como uma proteína insolúvel, com alta tendência a agregação e parcialmente resistente a digestão por proteases. Por essa razão, também é chamado de PrP^{Res} (PAN et al., 1993). O núcleo resistente à protease forma fibrilas amiloide e agregados amorfos (PRUSINER et al., 1983). Devido à tendência de formar agregados, a determinação estrutural da PrP^{Sc} por técnicas de alta resolução ainda permanece como um grande desafio (GROVEMAN et al., 2014). Diversos modelos de PrP^{Sc} já foram propostos, todos envolvendo um alto conteúdo de folhas- β (HYANT; ΠΡΥΣΙΝΕΡ; XOHEN, 1996). Estudos de ressonância magnética nuclear (RMN) no estado sólido e dinâmica molecular propuseram um modelo em que rPrP^{Res} produzidas em reações de conversão *in vitro* apresentavam uma conformação de folhas- β intermoleculares paralelas (*parallel in-register intermolecular β -sheet* (PIRIBS)) (GROVEMAN et al., 2014) nas quais os resíduos dos monômeros estão perfeitamente alinhados (**Figura 8**). Porém estudos mais recentes mostraram que o modelo PIRIBS era incompatível com as medidas de altura da fibra observada em experimentos de difração de raios-x e microscopia de crio-eletrônica. Através dessas técnicas e reconstruções tridimensionais, foi proposto que estrutura de PrP^{Sc} é baseada em uma arquitetura de β -solenoide de quatro degraus (4R β S) com uma altura de 19,2 Å (**Figura 7**). Em contrapartida, no modelo de PIRIBS afirma que as fibrilas de PrP^{Sc} não são compostas por dois protofilamentos, mas sim por um único filamento mais largo que apresenta dois subdomínios separados por uma fenda. Além disso, uma única molécula de PrP contribui apenas com 4,8 Å de altura para o surgimento de uma fibrila amiloide e o empilhamento denso desse modelo não poderia acomodar a maior parte das cadeias laterais de glicosilação, o que resultaria em excessivos choques estéricos. No entanto, deve-se ressaltar que a baixa resolução dos dados experimentais disponíveis ainda não permite descartar qualquer opção (BASKAKOV; KATORCHA, 2016; WILLE; REQUENA, 2018).

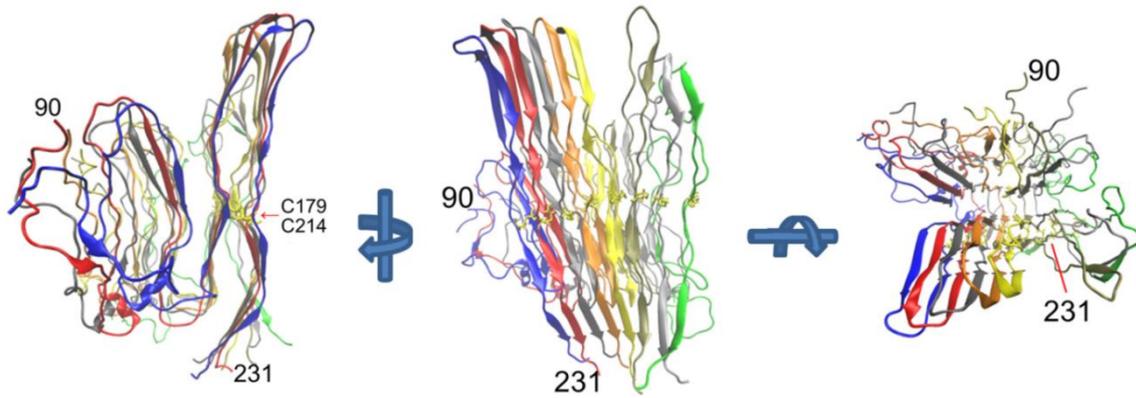


Figura 8. Estrutura tridimensional representativa de PrP^{Sc}. Modelo *parallel in-register* intermolecular β -sheet de menor energia. Os monômeros de PrP^{Res} são mostrados em cores distintas. Imagens adaptadas de Groveman *et al*, 2014.

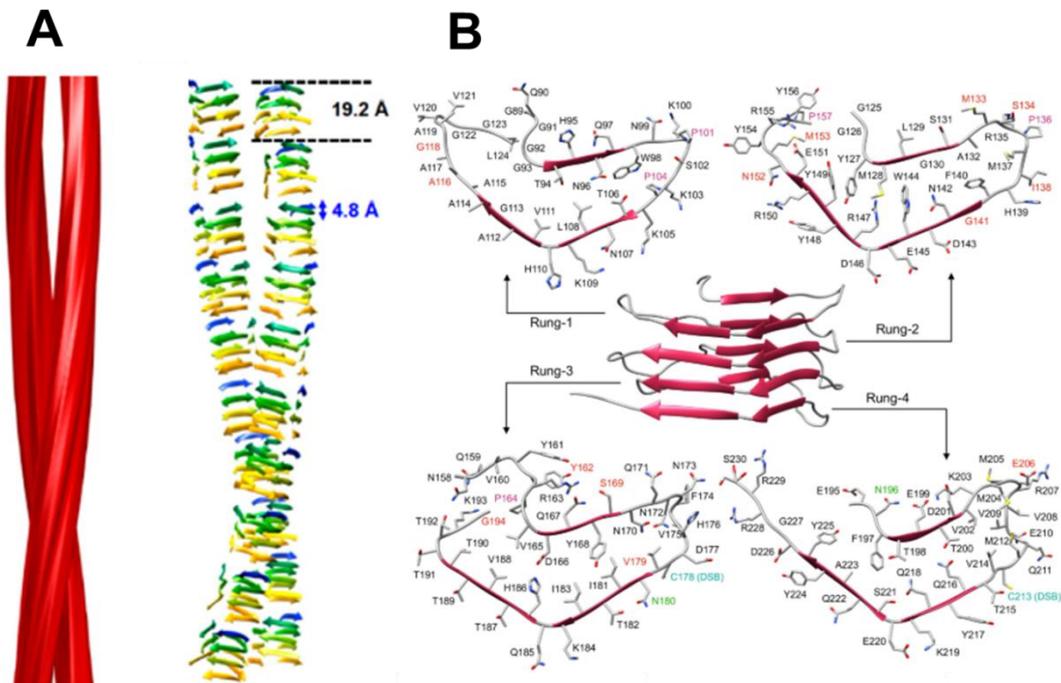


Figura 9. Arquitetura β -solenóide de quatro degraus (4R β S) de PrP^{Sc}. (A) Reconstrução tridimensional da fibrilação amilóide de PrP^{Sc} com dois protofilamentos. O espaçamento de 4,8 Å dos β filamentos correndo perpendicularmente ao eixo da fibrila é indicado, assim como a altura de 19,2 Å de uma molécula individual de PrP^{Sc}. (B) Estrutura de PrP^{Sc} modelada como um 4R β S é representada no centro da figura. Os resíduos são exibidos em degraus individuais (1-4). Os sítios de clivagem de PK identificados por espectrometria de massas estão coloridos em vermelho e os locais de glicosilação estão coloridos em verde. Imagens adaptadas de (SPAGNOLLI *et al.*, 2018; VÁZQUEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2016).

Devido a grande barreira energética que impede a conversão espontânea de PrP^C em PrP^{Sc}, foi sugerido a hipótese de que cofatores moleculares poderiam iniciar ou modular o processo de interconversão estrutural da PrP, diminuindo a barreira de energia livre (CORDEIRO; SILVA, 2005) (**Figura 10**). A PrP é capaz de se ligar a diferentes classes de moléculas, que podem atuar como cofatores, como íons metálicos, glicosaminoglicanos, lipídeos e moléculas polianiónicas, incluindo ácidos nucleicos (NAs). Moléculas com cargas negativas foram propostas como parceiras de PrP durante a conversão e já é bem conhecida a agregação de PrP na presença de ácidos nucleicos. Além disso, prions infecciosos formam complexos proteína-nucleotídeos resistentes a nucleases e proteases *in vitro* (ADLER et al., 2003; CAUGHEY, 1994; CORDEIRO et al., 2001; CORDEIRO; SILVA, 2005; DELEAULT; LUCASSEN; SUPATTAPONE, 2003)

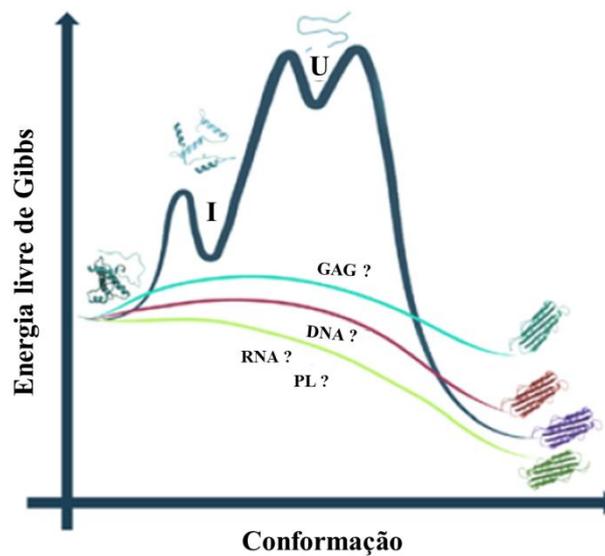


Figura 10. Diagrama de energia livre da conversão de PrP^C em PrP^{Sc}. A transição conformacional é separada por uma grande barreira energética que está associada ao desenovelamento e oligomerização. I e U representam os estágios intermediários do enovelamento e a forma desenovelada da PrP, respectivamente. Um cofator, como moléculas de ácidos nucleicos (DNA, RNA), fosfolipídeos (PL) ou glicosaminoglicanos (GAG) parece ser crucial para diminuir a barreira de energia que previne a conversão, levando a formação de PrP^{Sc} (SILVA; CORDEIRO, 2016).

1.6 Interação PrP:Ácidos nucleicos

A PrP pode interagir com diversas sequências de DNA e RNA *in vitro* e *in vivo* (CORDEIRO et al., 2001; SILVA; CORDEIRO, 2016), indicando um papel importante na fisiopatologia da PrP. Muitos estudos avaliaram os efeitos de NAs como cofatores moleculares para a conversão de PrP em espécies semelhantes a PrP^{Sc}. Por outro lado, também foi mostrado que os NAs podem prevenir a agregação e acumulação de PrP em cultivo de células (DAUDE, 2003; KARPUIJ et al., 2007; MACEDO; CORDEIRO, 2017). A participação de ácidos nucleicos como cofatores de PrP foi descrito pela primeira vez em 1991. Weissmann sugeriu a hipótese de que uma molécula como um ácido nucleico, poderia ter um papel crucial na propagação de proteínas priônicas. A ligação de PrP recombinante com NAs foi descrita por Nandi e Leclerc, que através de medidas de fluorescência mostraram que o peptídeo neurotóxico da PrP humana (resíduos 106-126) era capaz de se ligar a pequenas sequências de DNA derivados do vírus papiloma com afinidade de micromolar e essa ligação era capaz de induzir mudanças conformacionais no DNA (NANDI, 1997). Posteriormente, Nandi mostrou que o mesmo peptídeo neurotóxico da PrP era capaz de se polimerizar em agregados amiloides na presença de DNA e que a PrP inteira recombinante de murina também sofria polimerização quando ligada a DNA (CORDEIRO et al., 2014; MACEDO; CORDEIRO, 2017; NANDI, 1998; NANDI; LECLERC, 1999).

Em 2001, trabalhos prévios de Silva, Cordeiro e colaboradores forneceram a primeira evidência experimental do duplo papel de NAs na modulação e agregação de rPrP. A interação rPrP com oligonucleotídeos de DNA dupla fita alterava sua conformação nativa rica em α -hélices para uma conformação rica em folhas- β . Por outro lado, a incubação com esses mesmos oligonucleotídeos com o peptídeo hidrofóbico da PrP (resíduos 109-149) foi capaz de inibir a agregação de maneira dependente da concentração (CORDEIRO et al., 2001). Em 2003, a partir da técnica de PMCA (*Protein Misfolding Cyclic Amplification*), foi descrito o papel de moléculas de RNA em estimular a conversão de PrP (DELEAULT; LUCASSEN; SUPATTAPONE, 2003). Deleault e colaboradores mostraram que a presença de RNA era capaz de inibir a amplificação de PrP^{Res} de forma dose-dependente, e que o RNA era necessário para a propagação de PrP (DELEAULT; LUCASSEN; SUPATTAPONE, 2003; MACEDO; CORDEIRO, 2017).

Em 2012, trabalhos prévios de Cordeiro e colaboradores mostraram que diferentes seqüências pequenas de dsDNA podem se ligar à rPrP, induzindo agregação protéica em uma estrutura supramolecular semelhante a fibrilas amiloides. O complexo PrP:DNA resultante era tóxico para linhas celulares de neuroblastoma murino (N2a), dependendo da seqüência de DNA, mas não causava toxicidade a linhas celulares de rim humano (HK-2) (MACEDO et al., 2012). Em 2013, Cavaliere e colaboradores mostraram que o DNA com estrutura em G-quadruplex pode se ligar a diferentes formas de PrP com afinidade de nanomolar e, que a interação PrP:DNA levou a perda da estrutura secundária tanto da PrP quanto do DNA, levando a mudanças conformacionais recíprocas após o DNA se ligar a PrP, sugerindo que a estrutura secundária do DNA desempenha um papel central na ligação com a PrP (CAVALIERE et al., 2013; MACEDO et al., 2012).

A PrP pode se ligar a diferentes moléculas de RNA com alta afinidade, promovendo a formação de agregados de PrP, em que a PrP se torna resistente à digestão com proteinase K (PK) e os RNAs ligados ao complexo são resistentes ao ataque de ribonuclease (RNase) (ADLER et al., 2003; DELEAULT; LUCASSEN; SUPATTAPONE, 2003; GOMES et al., 2008). Essa interação é desfeita com a construção de PrP inteira (resíduos 23-231) sugerindo que a região N-terminal flexível é importante para estabelecer a interação com o RNA (GOMES et al., 2008; LIMA et al., 2006; MACEDO; CORDEIRO, 2017). Em 2003, foi descrito o papel das moléculas de RNA em estimular a conversão de PrP *in vitro* usando a técnica de PMCA. A presença de RNA foi capaz de inibir a amplificação de PrP^{Res} de maneira dose-dependente, mostrando que o RNA era necessário para a propagação de PrP. Além disso, somente a adição de RNAs específicos, isolados de cérebros de mamíferos, foi capaz de reiniciar o processo de conversão (DELEAULT; LUCASSEN; SUPATTAPONE, 2003). Trabalhos prévios de Silva, Cordeiro e colaboradores mostraram que a extração de RNA de diferentes fontes (células de mamíferos, fungos ou bactérias) pode estimular a conversão e agregação de rPrP murina, e que os agregados formados após a incubação desses RNAs com células de neuroblastoma murina (N2a) se mostraram tóxicas para essas células (GOMES et al., 2008).

Três regiões ao longo da PrP íntegra (PrP²³⁻²³¹) apresentam capacidade de ligação a NAs: o domínio N-terminal possui dois conjuntos de lisinas (resíduos 23-27 e 101-110) que interagem com DNA e RNA, enquanto o domínio globular C-terminal

(resíduos ~ 121-231) está envolvido apenas na ligação ao DNA (CAVALIERE et al., 2013; GOMES et al., 2008; LIMA et al., 2006; YIN et al., 2008). Assim, com base na literatura atual, ainda é discutível se a especificidade de ligação de PrP:NA e o resultado biológico desta interação são dados pela sequência, estrutura e/ou tamanho do DNA/RNA. Além disso, a estequiometria de ligação parece ser crucial para a oligomerização de PrP induzida por NAs (CORDEIRO et al., 2001, 2019), pois baixas relações de proteína:NA aumentam a agregação. Todos esses resultados reforçam a proposta do nosso grupo de que NAs podem participar do desenovelamento de PrP, alterando o equilíbrio entre PrP^C e PrP^{Sc} reduzindo a mobilidade das proteínas e favorecendo as interações proteína-proteína (CORDEIRO et al., 2001, 2019; CORDEIRO; SILVA, 2005; MACEDO; CORDEIRO, 2017).

A interação PrP:NA pode parecer inusitada visto que a PrP^C se encontra ancorada a superfície da membrana plasmática das células, porém outras topologias de PrP já foram identificadas no núcleo de células neuronais e endócrinas onde seriam capazes de interagir com elementos da cromatina (STROM et al., 2011). Além disso, foi mostrado também a translocação e deposição de PrP na sua forma mal enovelada no núcleo de células infectadas por príons (MANGÉ et al., 2004) e a translocação de PrP^C para o núcleo em resposta a danos no DNA induzidos por estresse oxidativo e ativa diretamente a via de reparo de excisão de base, interagindo com AP endonuclease e aumentando sua atividade (BRAVARD et al., 2015). Essas localizações atípicas de PrP podem facilitar o seu encontro com parceiros moleculares que podem estar envolvidos na sua patogênese.

Outros estudos têm explorado a capacidade de ligação a NA de PrP para selecionar e caracterizar sequências de NA capazes de se ligar a PrP^C ou à forma *scrapie* com alta afinidade e especificidade (MACEDO; CORDEIRO, 2017; SAYER et al., 2004; TAKEMURA et al., 2006; WEISS et al., 1997), sendo valiosas para abordagens terapêuticas ou diagnósticas. Essas sequências, denominadas aptâmeros, foram identificadas principalmente por SELEX (Evolução Sistemática de Ligantes por Enriquecimento Exponencial). Alguns dos aptâmeros de NA identificados reduziram significativamente a formação de PrP^{Sc} em ensaios celulares; aptâmeros que se ligam fortemente e estabilizam a PrP^C tendem a bloquear a conversão e, assim, poderiam prevenir doenças priônicas (MACEDO; CORDEIRO, 2017; TUERK; GOLD, 1990; WEISS et al., 1997; ZHOU et al., 2017). Quase todos os aptâmeros selecionados através

de SELEX exibem alta especificidade e afinidade aos alvos com uma constante de dissociação (K_d) na faixa de micromolar a picomolar, estabelecida por diferentes forças intermoleculares. (DARMOSTUK et al., 2015; LAURIDSEN et al., 2018; NIMJEE et al., 2018).

1.7 Seleção de aptâmeros por SELEX

A técnica de SELEX consiste na incubação de uma biblioteca randômica sintética de DNA ou RNA simples fita contendo $\sim 10^{15}$ sequências diferentes com o alvo molecular e, conseqüente, separação dos ligantes de alta afinidade. Para seleção dos aptâmeros, os NAs ligados aos alvos imobilizados são eluídos e amplificados por PCR e os moldes de DNA resultantes são transcritos. Este novo conjunto de NAs é enriquecido para a proteína alvo e o processo é repetido ~ 10 vezes até que um conjunto de NAs que se ligam com alta afinidade à molécula alvo seja isolado. O conjunto de NAs é então sequenciado e caracterizado para identificar os aptâmeros que exibem maior afinidade (NAKAMURA, 2018; TUERK; GOLD, 1990) (**Figura 9**).

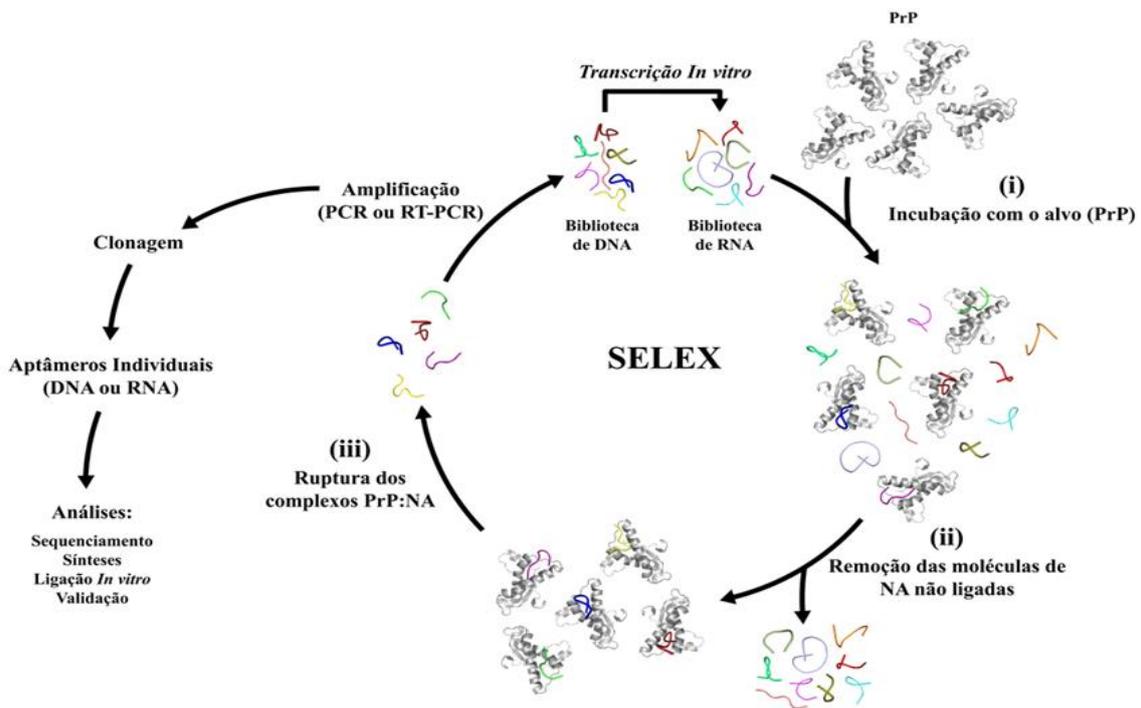


Figura 11. Representação esquemática do processo de SELEX. Um ciclo de SELEX consiste nos seguintes passos: (i) ligação após a incubação de uma biblioteca randômica de DNA ou RNA sintéticos (contendo $\sim 10^{15}$ seqüências diferentes) com o alvo molecular (PrP); (ii) remoção das espécies de NA não ligadas; (iii) eluição das seqüências de NA de maior afinidade; (iv) amplificação das seqüências NA eluídas; (v) volta ao passo (i) para garantir mais afinidades e especificada contra o alvo molecular. Os NAs selecionados são clonados, sequenciados e validados (MACEDO; CORDEIRO, 2017).

Os aptâmeros de DNA e RNA são funcionalmente semelhantes, mas cada um com propriedades e aplicações específicas. Os aptâmeros de DNA são mais estáveis e apresentam menores custos de produção, enquanto os aptâmeros de RNA possuem conformações tridimensionais mais diversificadas e interações RNA-RNA intra-cadeia mais fortes, o que provavelmente aumenta a afinidade e especificidade de ligação (LAURIDSEN et al., 2018; NIMJEE et al., 2018; ZHOU et al., 2017).

As moléculas de NA podem desempenhar um papel duplo na biologia da proteína prion, seja promovendo ou impedindo a conversão e agregação de PrP. Compreender essa intrigante parceria pode ser fundamental para explicar como surgem as TSEs e para desenvolver metodologias diagnósticas e terapêuticas eficazes. Em termos do aspecto patológico, a ligação de NAs a PrP poderia levar a mudanças

conformacionais, tanto na estrutura de PrP quanto na do NA, promovendo modos de polimerização distintos. Possivelmente, a neutralização de cargas positivas do domínio N-terminal da PrP após a ligação ao NA favorece a associação entre moléculas de PrP, o que poderia explicar a imediata agregação de PrP induzida por NA (MASHIMA et al., 2013; SAYER et al., 2004; WEISS et al., 1997).

Atualmente, não existe terapia ou vacina efetiva para TSEs devido a longos períodos de incubação que variam de meses a décadas, sem mostrar nenhum sinal da doença. Além disso, todos os compostos terapêuticos identificados até o momento falharam na fase clínica. Conseqüentemente, numerosos estudos têm sido direcionados para o desenvolvimento de terapias para prevenir a conversão de PrP^C em PrP^{Sc}. Até o momento, vários compostos como acridina, quinacrina e compostos estruturalmente relacionados (BARRET et al., 2003; KORTH et al., 2001), estatinas (KEMPSTER; BATE; WILLIAMS, 2007), pirazolonas (KIMATA et al., 2007), glioxilamidas (THOMPSON et al., 2009) e piridil hidrazonas (KAWASAKI et al., 2007), mostrou reduzir o acúmulo de PrP^{Sc} em modelo de cultura de células. Posteriormente, o composto de pirazolona mostrou ser até 130 vezes mais eficaz em comparação com a quinacrina na inibição do acúmulo de PrP^{Sc} (B CAUGHEY et al., 2006). Além disso, moléculas polianiónicas ou policatiônicas já foram descritas por exibir atividade anti-prion nas células (PAGADALA; SYED; BHAT, 2017; YUDOVIN-FARBER et al., 2005). As informações apresentadas fornecem uma base sólida e promissora para a criação de novas moléculas de NA com estruturas distintas e elevado potencial terapêutico. Uma molécula capaz de se ligar e estabilizar o estado nativo de uma proteína amiloidogênica seria, em princípio, capaz de controlar o acúmulo de proteínas e a progressão de muitos distúrbios neurodegenerativos, incluindo as doenças de Alzheimer e Parkinson (CAMERO; BENÍTEZ; JIMÉNEZ, 2013; MACEDO; CORDEIRO, 2017; NIMJEE et al., 2018).

1.8 Separação de fases líquido-líquido (LLPS)

Em 1899, o biólogo Edmund Wilson esmagou ovos de estrelas do mar sob um microscópio e observou o que acontecia quando o material celular se derramou entre duas lamínulas de vidro. Ele notou que a ‘gosma’ celular continha glóbulos esféricos que se fundiam em glóbulos maiores, comportamento característico de gotículas

líquidas suspensas em outro líquido quimicamente distinto. Também foi observado que apenas gotículas do mesmo tipo fundiam-se em contato umas com as outras. Essas observações levaram Wilson a concluir que “o protoplasma vivo” contém numerosas gotículas que variam em sua natureza química (WILSON, 1899). Apesar de ter sido negligenciado na época, na última década os pesquisadores descobriram, que o que Wilson observou foram organelas livres de membrana (MLOs) se formando por um processo de separação de fases líquido-líquido (LLPS) (LI et al., 2012; MITREA; KRIWACKI, 2016; UVERSKY, 2017).

Recentemente, foi demonstrado que determinadas proteínas relacionadas a distúrbios neurodegenerativos são constituintes de MLOs (BOEYNAEMS et al., 2018; RAMASWANI; TAYLOR; PARKER, 2013). As MLOs são complexos supramoleculares sem membranas que permitem que se concentrem moléculas de forma dinâmica e local e, assim, regule as reações que ocorrem dentro das células. As MLOs estão presentes no núcleo e no citoplasma, incluindo corpúsculos P, grânulos de estresse, nucléolo, e corpos de Cajal (

Figura 12) (SHORTER, 2019).

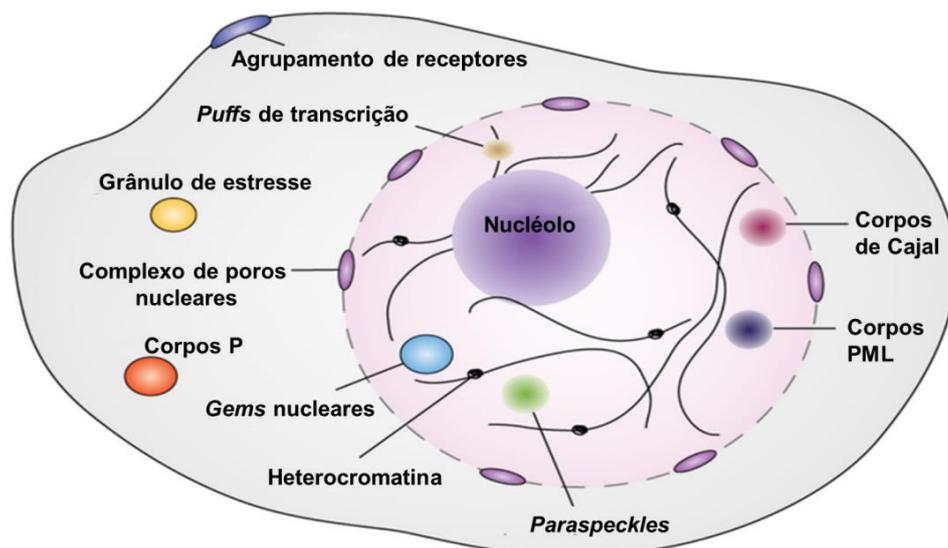


Figura 12. Organelas livres de membranas formadas por LLPS. Exemplos de MLOs presentes no núcleo e no citoplasma formadas através da separação de fases líquido-líquido. (GOMES; SHORTER, 2019).

1.8.1 Consequências biológicas da separação de fases

As principais propriedades biológicas de compartimentos separados de fase são: (i) organização espaço-temporal celular; que permite as células compartimentarem, permitindo tanto o rearranjo interno quanto a difusão de biomoléculas dentro e fora do condensado (BOEYNAEMS et al., 2018); (ii) reações de *tuning*; as MLOs sintonizam e aceleram as reações bioquímicas *in vivo* de maneira semelhante a reações químicas sintéticas *in vitro*. O microambiente específico dentro da fase líquida pode auxiliar o ajuste das taxas de reação e atividades bioquímicas dentro das MLOs. A separação de fases também pode aumentar a concentração de certas moléculas dentro dos condensados líquidos em até duas ordens de grandeza em relação à solução circundante (LI et al., 2012). (STROBERG; SCHNELL, 2018); (iii) citoproteção e resposta ao estresse; o fenômeno de LLPS pode ser ajustado de acordo com o ambiente e em resposta ao estresse (BOEYNAEMS et al., 2018). O enovelamento de proteínas é dificultado dentro do ambiente intracelular altamente empacotado. Esta dificuldade é acentuada por estresses celulares que podem desencadear o enovelamento incorreto da proteína (CHUANG et al., 2018). A formação de estruturas reversíveis separadas de fase permite que as células armazenem temporariamente suas proteínas de maneira a permitir sua rápida recuperação após a dissipação do estresse. Em levedura, a proteína priônica Sup35 atua como um sensor de pH e forma condensados líquidos que evoluem para fase gel em resposta a queda do pH citoplasmático induzida por estresse. Sob estresse, a formação dos géis de Sup35 é citoprotetora e permite que a levedura se recupere do estresse (FRANZMANN et al., 2018).

1.8.2 Linguagem molecular da separação de fases

Uma característica das proteínas que separam de fase é a multivalência. Li e colaboradores demonstraram este princípio criando proteínas modelo compostas de repetições em série de um ligante ou em seu parceiro de ligação. A combinação de repetições de um domínio SH3 e seu parceiro de ligação a um motivo rico em prolina (PRM) promoveu a separação de fases da proteína em gotículas líquidas. O aumento da força de interação entre as proteínas a partir do aumento do número de repetições dos dois domínios levou à gelificação das gotículas líquidas (LI et al., 2012). Nesse sistema,

as interações proteína-proteína multivalentes específicas determinam a separação de fases. A multivalência pode surgir de interações proteína-proteína entre domínios ordenados. No entanto, os domínios intrinsecamente desordenados representam outra maneira de se alcançar a multivalência e muitas vezes contêm múltiplos motivos lineares curtos (SLiMs) que medeiam as interações proteína-proteína (LI et al., 2012). Os domínios *prion-like* (PrLDs) representam um subconjunto de domínios de baixa complexidade. Estes domínios são enriquecidos em aminoácidos polares, não carregados, tais como asparagina (Asn), glutamina (Gln), tirosina (Tyr) e serina (Ser), bem como glicina (Gly) (ALBERTI et al., 2009; KING; GITLER; SHORTER, 2012; MARCH; KING; SHORTER, 2016).

Evidências experimentais mostram que os PrLDs podem interagir com outro tipo de domínio intrinsecamente desordenado, denominado RGG, a fim de conduzir a separação de fases (SUN et al., 2011; YOSHIZAWA et al., 2018). Os domínios RGG são enriquecidos em resíduos de arginina e glicina (THANDAPANI et al., 2013). Estes domínios conhecidamente interagem com RNA e são frequentemente encontrados em proteínas ligantes de RNA (RBP – *RNA-binding proteins*) contendo PrLDs. Para a proteína FUS e outras RBPs relacionadas, a LLPS é promovida através de interações multivalentes entre as tirosinas do domínio PrLD e as argininas presentes no domínio RGG (HARRISON; SHORTER, 2017; WANG et al., 2018b; YOSHIZAWA et al., 2018). Esses contatos são, por sua vez, modulados por resíduos carregados negativamente. Glicinas conferem liquidez ao condensado proteico, enquanto glutaminas e serinas provocam a gelificação (WANG et al., 2018b). As RBPs representam uma classe especial de proteínas que possuem comportamentos de fase biologicamente relevantes. Muitas dessas proteínas purificadas sofrem LLPS sozinhas *in vitro* (MOLLIEX et al., 2015) e suas regiões intrinsecamente desordenadas são suficientes para a formação de gotículas (CONICELLA et al., 2016; RYAN et al., 2018). No entanto, a separação de fases mediada apenas pela região intrinsecamente desordenada pode não apresentar os níveis adicionais de regulação que surgem da presença de domínios multivalentes, como RRM, domínios RGG e domínios de oligomerização que aumentam a valência proteica (GUO et al., 2018; WANG et al., 2018b).

Concentrar moléculas em um espaço limitado pode ter um custo energético e inúmeras interações fracas trabalham juntas para diminuir a entropia da separação de

fases. As interações moleculares mais importantes para a separação de fases incluem (i) interações de empilhamento π - π ; resíduos aromáticos de tirosina (Tyr), triptofano (Trp) e fenilalanina (Phe), bem como cadeias laterais de resíduos de arginina (Arg), glutamina (Gln), asparagina (Asn), ácido aspártico (Asp) e ácido glutâmico (Gln) contém elétrons deslocalizados que podem interagir entre si. (ii) interações cátion- π ; ocorrem entre aminoácidos com carga positiva (lisina e arginina) e grupos aromáticos ricos em elétrons. (iii) interações carga-carga; polímeros com cargas opostas quando juntos podem coacervar em condensados líquidos através da neutralização das cargas, porém as interações não ocorrem apenas pela presença de resíduos carregados, mas sim o arranjo de cargas em trechos importantes para a separação de fases. (iv) contatos β -cruzados transientes; várias proteínas que sofrem LLPS contém domínios prion-like (PrLD). Na proteína FUS, um segmento do PrLD forma fibrilas, nas quais trechos de aminoácidos se agrupam em folhas- β cruzadas intermoleculares, tipicamente encontradas em fibras amiloides (CHUANG et al., 2018; MURRAY et al., 2017). No entanto, recentes estudos cristalográficos de fibrilas formadas por segmentos curtos de PrLD que sofrem LLPS descobriram uma diferença estrutural em comparação com as fibrilas amiloides clássicas (HUGHES et al., 2018). Foi visto que essas fibrilas possuem folhas- β cruzadas torcidas, chamados LARKS (*low-complexity aromatic-rich kinked segments*) dobrados em camadas cruzadas. Essas folhas- β torcidas são termodinamicamente menos estáveis do que as folhas- β de fibrilas amiloides, e proteínas contendo PrLDs enriquecidas por LARKS são encontradas em MLOs que são formadas por LLPS (HUGHES et al., 2018) (**Figura 11**).

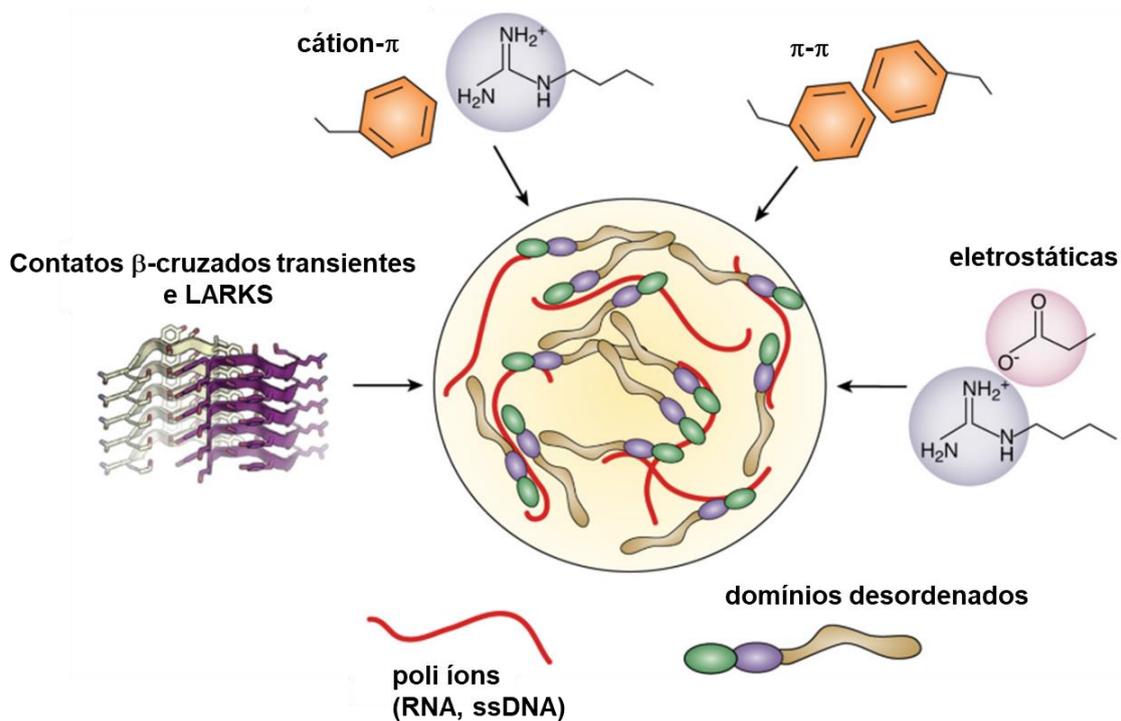


Figura 13. Interações que dirigem a LLPS. As interações importantes para a LLPS incluem π - π , cátion- π , eletrostáticos e contatos β -cruzados transientes. (GOMES; SHORTER, 2019).

1.8.3 Separação de fases e doenças neurodegenerativas

As recentes descobertas acerca da LLPS apontam para um novo caminho para estratégias terapêuticas relacionadas a doenças neurodegenerativas. Já foram relatados vários casos de fibras amiloides reversíveis e/ou funcionais (KATO et al., 2012; OMER et al., 2018). Dentre as proteínas que estão fortemente relacionadas a essas doenças destacam-se *Fused in Sarcoma* (FUS), *Transactive DNA-binding protein 43* (TDP-43), *TATA-Box Binding Protein Associated Factor 15* (TAF15), *Ewing Sarcoma Breakpoint Region 1* (EWSR1), *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 e A2* (hnRNPA1, hnRNPA2) e *Nucleolysin TIA-1* (TIA-1) todas elas envolvidas em separação de fases que podem sofrer uma transição aberrante do estado líquido para agregados sólidos (KING; GITLER; SHORTER, 2012; LI et al., 2012; MAHARANA et al., 2018). A proteína TDP-43 contém um domínio N-terminal que forma oligômeros. Recentemente, Wang et al. estabeleceram que a polimerização do domínio N-terminal promove a LLPS de TDP-43 *in vitro* e que um único mutante fosfomimético no domínio N-terminal pode

reduzir a propensão de TDP-43 a separar de fase (AFROZ et al., 2017; WANG et al., 2018a). Maharana e colaboradores mostraram que o núcleo é um sistema tamponado no qual altas concentrações de RNA mantêm as RBPs solúveis e que alterações nos níveis de RNA ou na capacidade de ligação das RBPs causam transições de fases aberrantes. Eles demonstraram ainda que RBPs contendo domínios *prion-like* como FUS, TDP43, hnRNPA1 e EWSR1 sofrem separação de fases em concentrações fisiológicas e que o processo de separação de fases é regulado pela concentração de RNA. Com o aumento na razão proteína:RNA, os condensados líquidos se tornaram menores até serem completamente dissolvidos (**Figura 12**). Altas concentrações de proteína:RNA impedem a separação de fases, enquanto baixas concentrações promovem a separação de fases. Além disso, experimentos de FRAP (*Fluorescence recovery after photobleaching*) em células *HeLa* mostraram que o RNA mantém os condensados em um estado dinâmico e impede a formação de agregados sólidos responsáveis pelas doenças neurodegenerativas (MAHARANA et al., 2018; PATEL et al., 2015).

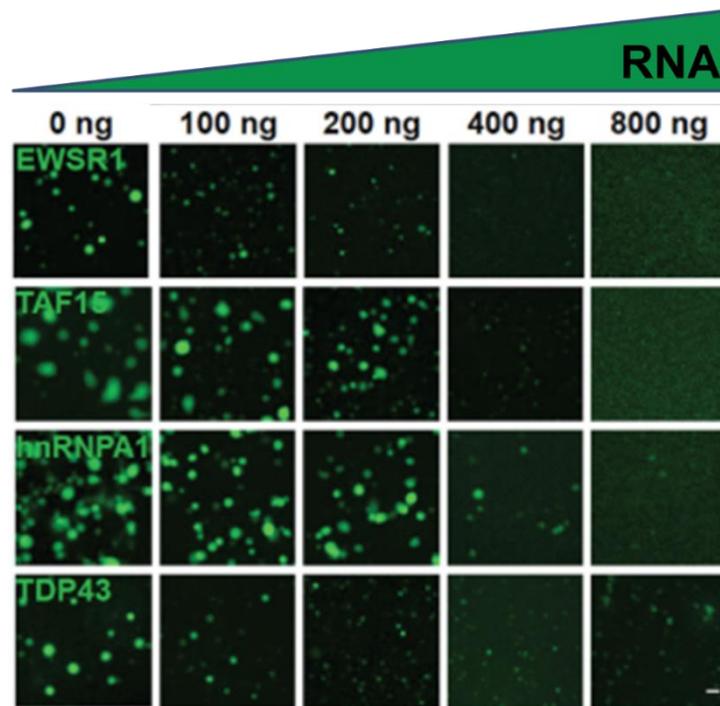


Figura 14. Ensaio de separação de fases com RBPs na presença de RNA total. As proteínas EWSR1, TAF15, hnRNPA1 e TDP43 fusionadas a GFP na presença de concentrações crescentes de RNA total. Imagem extraída de MAHARANA et al., 2018

Nesse sentido, o papel da LLPS na neurodegeneração pode ser descrita em três modos de ação: (a) a propensão à separação de fases, (b) as propriedades do material que separa de fases e (c) a nucleação de fibras (**Figura 15**).

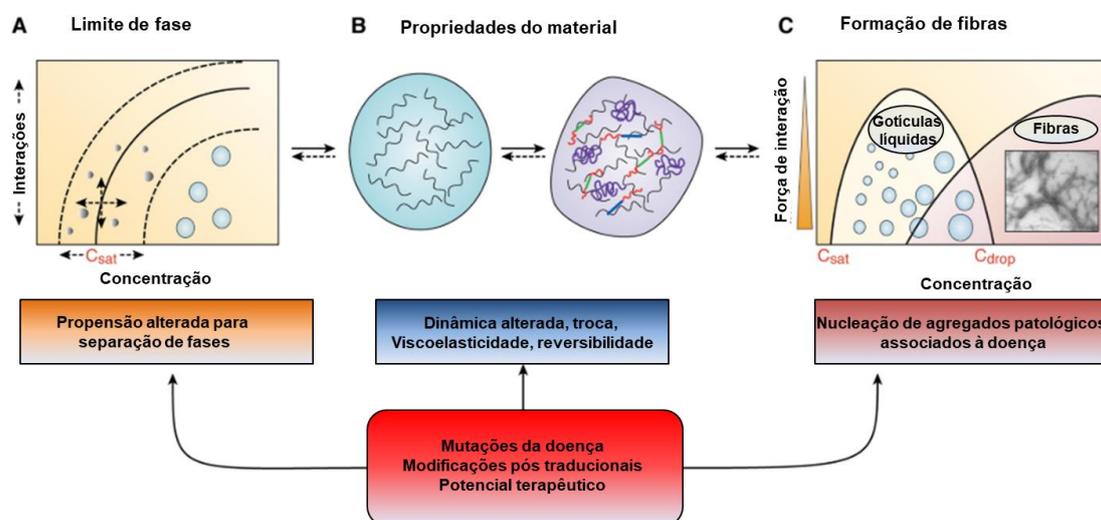


Figura 15. A regulação e direcionamento da separação de fase líquido-líquido. Atualmente, três modos de ação ligam a separação de fases à patologia com o potencial de intervenção. **(A)** O limite de fase, uma métrica para a propensão a separação de fases, é definida pela concentração de saturação e as forças de interação relativas entre moléculas. **(B)** As propriedades do material das fases condensadas incluem viscoelasticidade, reversibilidade de troca e a dinâmica e mobilidade de moléculas dentro e através das gotículas. **(C)** A formação de fibras pode ser nucleada dentro das gotículas, potencialmente dando origem a condições patológicas. Esses três modos de ação destacam caminhos distintos de regulação e direcionamento terapêutico da separação de fases em doenças (ELBAUM-GARFINKLE, 2019).

Recentemente foi descrito que a PrP^C íntegra pode sofrer separação de fases induzida por oligômeros β -amiloide ($A\beta$). Na presença de $A\beta$, PrP^C forma um hidrogel com estequiometria de $\sim 1:1$, reversível na presença de excesso de $A\beta$. Dentro do hidrogel $A\beta$ mostra pouca mobilidade, enquanto PrP^C apresenta uma maior flexibilidade. RMN no estado sólido mostrou que a PrP^C em hidrogel apresenta conformações helicoidais em sua região N-terminal intrinsicamente desordenada. Além disso, foi observado na autópsia de cérebros com doença de Alzheimer (AD) que a PrP^C em hidrogel pode aprisionar $A\beta$, e um potente antagonista de PrP^C desfaz os condensados de $A\beta$:PrP^C endógenos do cérebro com AD. Dessa forma, as transições de fase de PrP^C juntamente com as mudanças conformacionais são desencadeadas por

espécies β -amiloide das doenças de Alzheimer (KOSTYLEV et al., 2018). Considerando que a LLPS é uma marca registrada de proteínas ligantes de ácidos nucleicos, incluindo proteínas envolvidas em doenças neurodegenerativas (MAHARANA et al., 2018), o presente trabalho tem como objetivo investigar se os aptâmeros A1 e A2 (25 nucleotídeos) selecionados por SELEX induzem o domínio globular da proteína prion murina recombinante (rPrP⁹⁰⁻²³¹) a sofrer LLPS. Os aptâmeros foram caracterizados e estudos de calorimetria de titulação isotérmica (ITC) foram realizados para confirmar a alta afinidade de A1 e A2 a rPrP⁹⁰⁻²³¹. Além disso, foi investigada a interação rPrP⁹⁰⁻²³¹:DNAs por diferentes técnicas biofísicas.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a estrutura de aptâmeros de DNA selecionados por SELEX, bem como estudar a interação destes com o domínio globular da proteína prion murina recombinante (rPrP⁹⁰⁻²³¹), a fim de melhor compreender o papel dos NAs na conversão e agregação da PrP no contexto da patologia das TSEs.

2.2 Objetivos específicos

1. Purificação do domínio rPrP⁹⁰⁻²³¹;
2. Determinação da afinidade e especificidade de ligação de A1 e A2 a rPrP⁹⁰⁻²³¹ e PrP²³⁻²³¹;
3. Caracterização estrutural dos aptâmeros A1 e A2;
4. Investigação do papel da estrutura tridimensional dos aptâmeros de DNA na interação com rPrP⁹⁰⁻²³¹;
5. Caracterização das mudanças estruturais em rPrP⁹⁰⁻²³¹ promovidas pela interação com os aptâmeros de DNA;
6. Investigação da região mínima de A1 responsável pela interação com PrP⁹⁰⁻²³¹;
7. Investigação da separação de fases líquido-líquido (LLPS) sofrida por rPrP⁹⁰⁻²³¹ e da modulação desses processos pelos aptâmeros de DNA.

3. Material e Métodos

3.1 Expressão do domínio C-terminal da proteína prion recombinante (rPrP⁹⁰⁻²³¹)

Células de *Escherichia coli* BL21 (DE3) foram transformadas com o plasmídeo pET28b-PrP⁹⁰⁻²³¹ que codifica o domínio C-terminal da proteína prion murina recombinante (rPrP⁹⁰⁻²³¹). O plasmídeo contém ainda uma sequência de seis histidinas e um sítio de clivagem para trombina (MGSSHHHHHSSGLVPRGSHM), a fim de facilitar a purificação. A cultura bacteriana foi cultivada em 1L de meio Luria Bertani (triptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L e NaCl 5 g/L) a 37 °C até atingir densidade óptica a 600 nm de 0,6. A expressão da proteína recombinante foi induzida por isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) 0,5 mM a 37 °C por 4 horas. A cultura foi recolhida por centrifugação a 10000 X g por 30 min a 4 °C. Para a produção de amostras enriquecidas com ¹⁵N, a expressão foi realizada em meio mínimo de cultura M9 (Na₂HPO₄.12H₂O 17g/L, KH₂PO₄ 3 g/L, NaCl 0,5 g/L, NH₄Cl 1g/L, MgSO₄, glicose 3g/L, CaCl₂.2H₂O 14,7 g/L, tiamina 1 g/L) contendo ¹⁵NH₄Cl (Cambridge Isotope) como única fonte de nitrogênio. As células foram cultivadas a 37°C até que atingissem densidade óptica a 600 nm de 1,0. A indução da expressão de rPrP⁹⁰⁻²³¹ foi realizada com IPTG 0,5 mM a 30 °C por 18 horas. A expressão da proteína recombinante foi avaliada por eletroforese em gel de poliácridamida 15 % sob condições desnaturantes (SDS PAGE).

3.2 Purificação do domínio rPrP⁹⁰⁻²³¹

A cultura de células contendo a proteína expressa foi ressuspensa em tampão de lise (Na₂HPO₄ 100 mM, Tris 10 mM, ureia 6M, glutatona reduzida 10 mM (pH 8,0)) e lisadas por sonicação durante uma hora (ciclos de sonicação durante 1 s com 1 s de intervalo a potência de 50%). O *debris* celulares foram removidos por centrifugação a 10000 X g por 30 min a 4 °C e o sobrenadante foi aplicado em uma coluna de afinidade a níquel His-Trap (GE Healthcare) acoplada a um sistema de purificação de proteínas FPLC ÄKTA prime (GE Healthcare). Após o carregamento da proteína na coluna, foi realizado o re-enovelamento oxidativo da rPrP⁹⁰⁻²³¹ através do gradiente do tampão de

lise com tampão B contendo Na_2HPO_4 100 mM, Tris 10 mM (pH 8,0). A proteína de interesse foi eluída aplicando um novo gradiente com tampão B e tampão C (Na_2HPO_4 100 mM, Tris 10 mM, imidazol 750 mM (pH 5,8)). Em seguida a proteína eluída foi dialisada contra água deionizada a 4 °C por 18 h para a remoção do imidazol e posteriormente liofilizada e estocada em -20°C. Todas as etapas da purificação e o grau de pureza de rPrP⁹⁰⁻²³¹ foram acompanhados por SDS-PAGE a 15 %. A concentração de proteína foi estimada através do coeficiente de extinção molar em água ($27515 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) a 280 nm obtido calculado a partir da sequência primária da proteína utilizando a ferramenta de bioinformática protparam (www.expasy.ch/protparam).

3.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS PAGE)

A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS PAGE) foi realizada conforme descrito por Laemmli (1970) (LAEMMLI, 1970) utilizando o sistema MiniPROTEAN Tetra (BioRad). Os géis foram formados pela polimerização de monômeros de acrilamida na presença de pequenas quantidades de N,N'-metilenobis-acrilamida (29:1) catalisada por radicais livres, TEMED e persulfato de amônio. O gel de separação (15 %) foi preparado na presença de Tris-HCl 380 mM, SDS 0,1% (p/v) (pH 8,8) e o gel de empilhamento (4%) foi preparado na presença de Tris-HCl 380 mM, SDS 0,1% (p/v) (pH 6,8). As amostras foram previamente incubadas com tampão de amostra (Tris-HCl 40 mM, glicerol 8%, SDS 2%, DTT 50 mM, azul de bromofenol 0,005% (pH 6,8)) e foram aquecidas a 95 °C por 5 min. Os géis foram corridos a 180 V por 1h e 30 min em tampão de corrida (Tris-HCl 25 mM, Glicina 250 mM, SDS 0,1% (p/v) (pH 8,3)). Após a separação eletroforética, as proteínas foram visualizadas por coloração com Comassie Blue R-250 (Sigma Aldrich).

3.4 Oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos de fita simples estudados foram adquiridos da empresa *Integrated DNA Technologies* (EUA). Todos os oligonucleotídeos (**Tabela 3**) foram anelados em tampão cacodilato de sódio 20 mM (pH 7,0) por aquecimento a 95 °C durante 5 minutos seguido de resfriamento lento a temperatura ambiente por 16 horas. A concentração dos DNAs foi determinada pela absorbância a 260 nm usando os

coeficientes de extinção molar correspondentes medindo a concentração para os estados enovelados e desenovelados de acordo com o protocolo descrito por (VILLAR-GUERRA; GRAY; CHAIRES, 2018).

Tabela 3. Sequência dos oligonucleotídeos estudados

DNA	Sequence 5' → 3'
A1	5' -CCGCGTACAATCGAGCTCGGGTGTC-3'
A1_mut	5' -CCGCGTACAATCGAGCTC AGGTGAC -3'
A2	5' -TGGTGGTAACAGACCCTTCCACGGC-3'
A1_1	5' -CCGCGTACAATC-3'
A1_2	5' -CGTACAATCGAG-3'
A1_3	5' -ACAATCGAGCTC-3'
A1_4	5' -ATCGAGCTCGGG-3'
A1_5	5' -GAGCTCGGGTGT-3'

3.5 Desnaturação térmica

Experimentos de desnaturação térmica foram realizados em um espectrofotômetro UV-1800 Shimadzu equipado com um banho termostático TE-2005. Os aptâmeros de DNA (A1 a 1.95 μM ; A2 a 2.2 μM ; A1_mut a 2.6 μM) foram dissolvidos em 20 mM de tampão cacodilato de sódio (pH 7,0) com ou sem 100 mM NaCl. As medidas foram realizadas em cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico com volume de 700 μL , cobertas com óleo mineral para evitar evaporação. A temperatura foi aumentada de 20 $^{\circ}\text{C}$ a 85 $^{\circ}\text{C}$ a uma taxa de 0.5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e os perfis de absorvância foram monitorados a 260 nm.

3.6 Calorimetria de Titulação Isotérmica

A calorimetria de titulação isotérmica baseia-se na medida do calor envolvido no processo de interação entre duas espécies químicas colocadas em contato de modo

gradual e contínuo em uma cela calorimétrica mantida a uma temperatura definida. A adição de uma espécie química contida em uma seringa (titulante) na espécie contida na cela calorimétrica (titulado) possibilita a medida da energia envolvida na interação química entre as mesmas. A energia medida é global, isto é, inclui a energia da interação entre as espécies químicas colocadas em contato como também a energia devido ao fenômeno da solvatação, reorganização molecular e mudanças conformacionais, a energia de diluição das espécies envolvidas no experimento, além da energia devido à agitação mecânica (LADBURY; DOYLE, 2004; SALIM; FEIG, 2009).

Estudos de calorimetria de titulação isotérmica (ITC) foram realizados a 25 °C usando um microcalorímetro MicroCal ITC200 (Malvern MicroCal, USA). As soluções de proteína e DNA foram preparadas em tampão cacodilato de sódio 20 mM (pH 7,0). Para a titulação de A1, A2 e A1_mut, a seringa foi preenchida com 33, 33 e 100 µM, respectivamente; enquanto a célula foi preenchida com 5 µM de rPrP. A célula de referência foi preenchida com água ultrapura. Durante as titulações, a solução foi agitada com uma seringa a 750 rpm. Alíquotas de 1,5 µL de A1 e A2 foram adicionadas sequencialmente em intervalos de 200 s. Para A1_mut foi realizada uma injeção única de 10 µL aplicada à célula em um intervalo de 180 s. Para a titulação dos oligonucleotídeos derivados de A1 (A1_1, A1_2, A1_3, A1_4 e A1_5), a célula foi preenchida com 10 µM de rPrP, enquanto a seringa foi preenchida com 50 µM dos respectivos DNAs. A quantidade de calor gerada por titulação foi determinada pela integração da área sob os picos. O calor absorvido ou liberado em cada injeção foi registrado. Os termogramas de diluição dos DNAs em tampão foram medidos separadamente e subtraídos dos dados de titulação. Os parâmetros termodinâmicos foram calculados a partir da 2ª a 20ª injeção (a primeira injeção é descartada para minimizar erros de artefatos de equilíbrio). A análise dos dados de ITC foi realizada usando o programa *Origin 7.0* empregando o modelo de um sítio de ligação para ajuste de curva.

3.7 Ressonância Magnética Nuclear

Os experimentos de RMN foram realizados a 25 °C nos espectrômetros Bruker Avance III 600, 800 e 900 MHz equipados com sondas de tripla ressonância TXI de

detecção inversa e amplificadores de quatro canais de gradiente (Bruker Biospin). Os espectrômetros estão localizados no Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear Jiri Jonas do Instituto de Bioquímica Médica da UFRJ. Para os oligonucleotídeos A1, A2 e A1_mut a 100 μM , foram coletados espectros 1D de ^1H em tampão cacodilato de sódio 20 mM (pH 7,0), D_2O 5% (v/v) na presença e ausência de NaCl 100 mM. Para os experimentos de titulação por RMN, concentrações decrescentes de A1 (2 a 20 μM) foram tituladas em 200 μM de ^{15}N -rPrP⁹⁰⁻²³¹ em tampão fosfato de potássio 10 mM, KCl 10 mM, D_2O 5% (v/v) (pH 6,5) e espectros 2D [^1H , ^{15}N] HSQC (20 acumulações por incremento em t_1 , 2048 pontos coletados na dimensão F_2 e 256 pontos em F_1) foram coletados em cada ponto da titulação. A aquisição e o processamento dos espectros de RMN foram realizados com o programa Top Spin 3.1 e CcpNmr.

3.8 Dicroísmo Circular

A técnica de dicroísmo circular (CD) é um método muito utilizado para a determinação de estruturas secundárias de proteínas e ácidos nucleicos e baseia-se na absorção da luz circularmente polarizada à direita (E_R) e à esquerda (E_L). Quando E_R e E_L são absorvidos em extensões diferentes, a luz passa a apresentar uma diferença de fase denominada elipticidade (θ), que assume valores positivos ou negativos, dependendo da componente preferencialmente absorvida. Esse efeito ocorre quando moléculas contêm cromóforos quirais (óticamente ativos) ou quando colocados em um ambiente assimétrico (KELLY; JESS; PRICE, 2005; SCARLETT; SILIGARDI; KNEALE, 2015).

Macromoléculas biológicas são compostas de muitas unidades óticamente ativas que provocam alteração na polarização da luz incidente. Contudo, as absorções devido a transições eletrônicas associadas a ligações peptídicas são as mais importantes e o efeito de elipticidade pode ser observado na região do UV distante (240-180 nm). (Sreerama et al. 2001). Em ácidos nucleicos, as bases purínicas e pirimidínicas são as responsáveis pelas transições eletrônicas que começam em 300 nm e continuam na região UV. (FASMAN, 1996; JOHNSON, 1996; WOODY, 1995).

Desta maneira, o perfil do espectro de CD de proteínas e ácidos nucleicos depende do tipo e do conteúdo de estrutura secundária preferencial da molécula em um determinado meio (SAXENA AND WETLAUFER, 1971). A **Figura 16** apresenta espectros característicos de CD das estruturas secundárias de proteínas e DNAs.

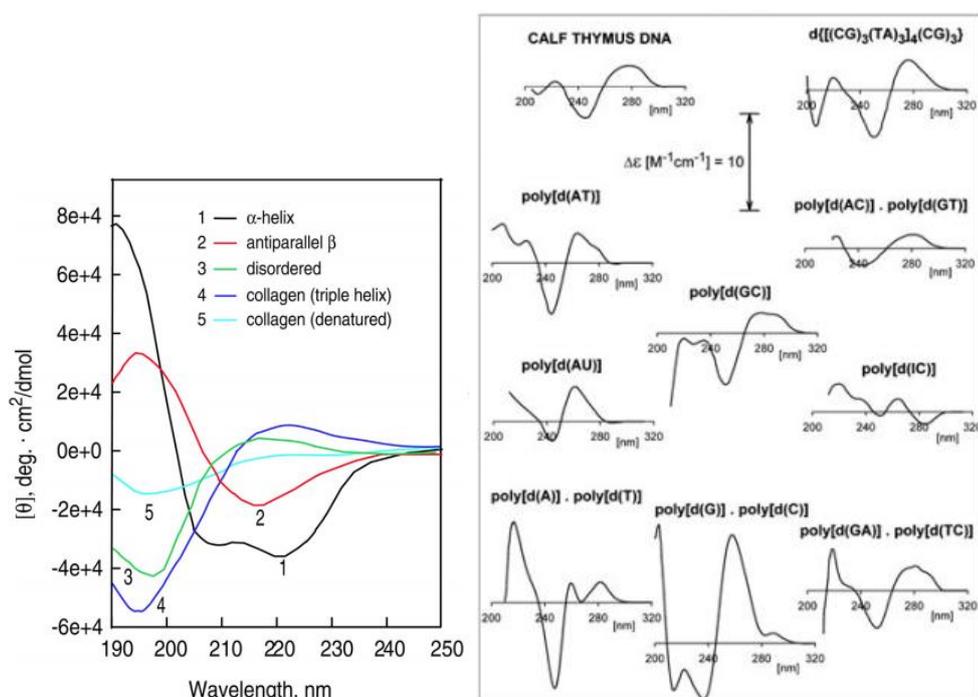


Figura 16. Espectros de CD de proteínas e DNAs. (A) Espectros de CD característicos de proteínas; (1) α -hélice. (2) fitas- β antiparalelas. (3) estruturas desenoveladas. (4) colágeno (tripla hélice). (5) colágeno (desnaturado). (B) Espectros de CD característicos de DNAs na forma B. (Adaptado de (VORLICKOVA et al., 2012; YAO et al., 2018))

A espectropolarimetria de dicroísmo circular (CD) foi usada para investigar as preferências conformacionais de A1, A2 e A1_mut e de seus complexos com a rPrP⁹⁰⁻²³¹. Os espectros de CD foram adquiridos em um espectropolarímetro Chirascan (Applied Photophysics, Surrey, Reino Unido). Os oligonucleotídeos foram anelados em cacodilato de sódio 20 mM (pH 7,0) e coletados a 50 μ M (A1 e A2) e 100 μ M (A1_mut) na presença e ausência de NaCl 100 mM. Para os estudos de interação proteína:DNA, concentrações crescentes dos aptâmeros de DNA (2, 5 e 10 μ M) foram tituladas em 10 μ M de rPrP⁹⁰⁻²³¹ em cacodilato de sódio 20 mM (pH 7,0). As amostras foram transferidas para uma cubeta com volume de 300 μ L e caminho óptico de 1 mm. Os espectros foram obtidos a 25 °C entre os comprimentos de onda de 340 a 210 nm, para os oligonucleotídeos livres, e de 260 a 200 nm, para os complexos rPrP⁹⁰⁻

²³¹:aptâmero. Foram utilizados os seguintes parâmetros de aquisição: velocidade de varredura de 100 nm.min⁻¹, coleta de dados de 1 nm, 2s de resposta, 1 nm de largura de banda e 4 acumulações. Depois de coletados, os espectros foram subtraídos dos respectivos brancos para correção da linha de base. Os dados de elipicidade bruta foram convertidos em elipicidade molar de acordo com a equação:

$$[\theta]_{mrw} = \frac{(MRW \times \theta_{obs})}{10 \times d \times c}$$

Em que *MRW* é o peso médio do resíduo, calculado a partir do peso molecular da proteína/(N-1), onde N é o número de aminoácidos. θ_{obs} é a elipicidade observada; *d* é o caminho óptico em cm e *c* é a concentração em g/mL (SREERAMA; WOODY, 2000).

3.9 Espalhamento de raios-X a baixo ângulo

A técnica de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS) surgiu como um método importante para estudar as propriedades estruturais de proteínas, ácidos nucleicos e complexos macromoleculares em solução (BERNADÓ et al., 2007; SVERGUN; KOCH, 2003). Uma solução de macromoléculas é irradiada com um feixe de raios-X monocromático e a intensidade de luz espalhada é registrada por um detector bidimensional, originando em um gráfico de espalhamento em função do vetor de espalhamento, *q*. Onde *q* é a magnitude do vetor de espalhamento definido por $q = 4\pi \sin(\theta)/\lambda$ (sendo 2θ , o ângulo de espalhamento). As diferenças nos padrões de espalhamento permitem determinar o formato e grau de oligomerização de macromoléculas em solução. Moléculas muito anisotrópicas possuem padrão de espalhamento com um decaimento bem menor comparado com moléculas globulares (**Figura 15**).

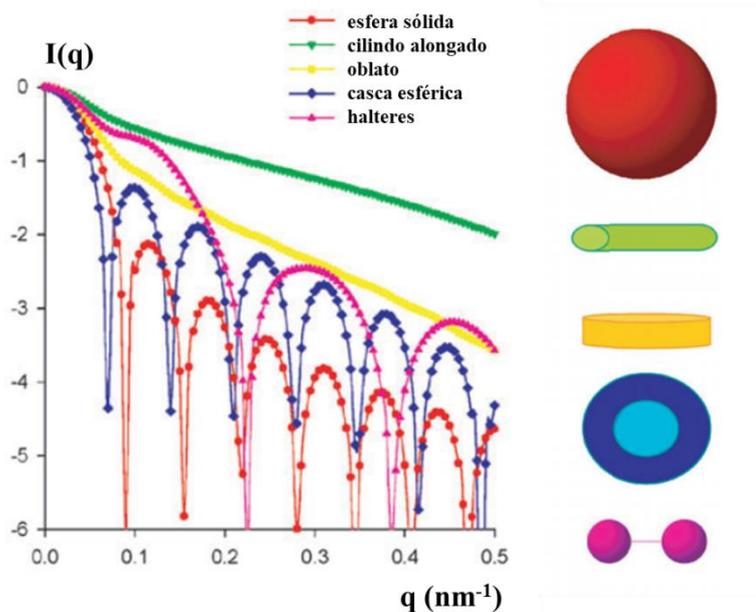


Figura 17. Intensidade de espalhamento para diferentes formas geométricas. Imagem adaptada de SVERGUN;KOCH, 2003.

As curvas de SAXS fornecem três regiões que dão diferentes informações. Na região dos ângulos próximos de zero (região de Guinier) é possível determinar o raio de giro (R_g) da molécula. Na região central, a razão $I(0)/q$ pode fornecer informações acerca do volume e forma e a região de mais alto ângulo é possível obter a relação superfície/volume da molécula (FEIGIN; SVERGUN, 1987).

O gráfico de Kratky é muito usado para distinguir qualitativamente estados desenovelados e estruturados e mostra o grau de compactação da molécula (ALLEC et al., 2015; BERNADÓ; BLACKLEDGE, 2009). O gráfico de Kratky ($I(q) \times q^2$ em função de q) para moléculas globulares apresenta um formato sinusóide com um máximo bem definido. As curvas para moléculas desestruturadas ou parcialmente desenoveladas exibem um patamar ao longo de um intervalo específico de q , seguido por um aumento uniforme em valores de q elevados (BERNADÓ; BLACKLEDGE, 2009; DONIACH, 2001; OLIVEIRA et al., 2016). Gráficos experimentais típicos de Kratky para proteínas globulares, parcialmente desenoveladas e completamente desordenadas estão mostrados na **Figura 18**.

Outra forma de detectar proteínas desenoveladas é baseada na comparação do raio de giro (R_g) obtido experimentalmente com estimativas teóricas para proteínas globulares ou desordenadas. Assumindo o caso ideal, em que as partículas esféricas não

interagem em solução, Guinier mostrou que para $q \rightarrow 0$, a curva de Intensidade pode ser descrita como uma função exponencial (ALLEC et al., 2015; RICE, 1956):

$$I(q) = I(0)e^{-q^2 R_g^2 / 3}$$

Onde R_g corresponde a distância média quadrática dos elétrons da partícula até o seu centro de gravidade. Para um sistema monodisperso, o gráfico de Guinier $\ln I(q) \times q^2$ demonstra uma linha reta a qual intercepta $I(0)$, a inclinação dessa reta é proporcional ao R_g . A aproximação de Guinier só é válida para ângulos próximos de 0, respeitando a equação $q < 1,3/R_g$ (RICE, 1956).

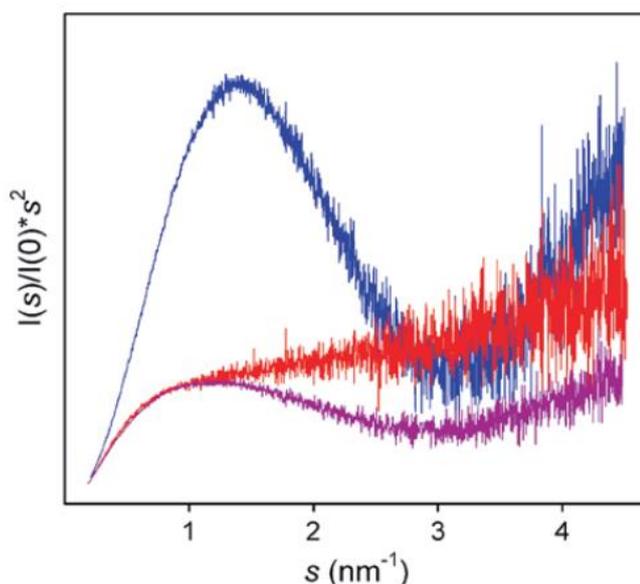


Figura 18. Gráfico de Kratky para três construções de Src quinase. Domínio globular de SH3 (azul), domínio totalmente desordenado (vermelho) e uma construção que une ambos os domínios (roxo) (KACHALA; VALENTINI; SVERGUN, 2015).

Os dados de SAXS foram coletados na linha de luz SAXS1 no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (CNPEM, LNLS, Campinas, Brasil). O espalhamento foi adquirido com um detector bidimensional (Pilatus 300K) e uma porta-amostra de aço contendo janelas de mica. A distância da amostra até o detector foi de 1 m, resultando em uma faixa de vetor de espalhamento de $0.01 < q < 0.45 \text{ nm}^{-1}$. Os dados foram coletados a 25 °C com 2 mg/mL de A1, A2 e A1_mut em cacodilato de sódio 20 mM (pH 7,0). O espalhamento do tampão foi subtraído da curva de espalhamento da amostra. O raio de giro (R_g) para o aptâmero A1 foi obtido a partir da regressão linear de Guinier na faixa de q apropriada ($q < 1,3/R_g$). A globularidade das amostras foi inferida a partir dos gráficos de Kratky ($q^2 \cdot I(q)$ vs. q). (DONIACH, 2001)

3.10 Espalhamento de luz dinâmico

A técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS), também conhecida como espectroscopia de correlação de fótons ou dispersão de luz quase-elástica permite identificar o perfil de distribuição de tamanho de partículas em solução a partir do raio hidrodinâmico e polidispersividade da amostra (BHATTACHARJEE, 2016). Os experimentos de DLS foram realizados em um analisador de partículas DynaPro NanoStar (Wyatt, CA, EUA). Os dados de A1 e A2 a 100 μM foram coletados em cacodilato de sódio 20 mM (pH 7,0) a 25 °C. As amostras foram submetidas ao espalhamento de luz monocromático (662 nm) e a intensidade de luz espalhada foi medida em um ângulo de espalhamento de 90°.

3.11 Análises de bioinformática para predição de separação de fases

Foram utilizados algoritmos para analisar as propriedades físico-químicas de rPrP⁹⁰⁻²³¹ a fim de investigar a origem do comportamento de fases. O software PONDR (*Predictor of Naturally Disordered Regions*) (<http://www.pondr.com/>) prediz as proteínas que possuem regiões intrinsecamente desordenadas. O resultado é fornecido como um gráfico; valores próximos de 0,5 sugerem resíduos desordenados (ROMERO et al., 2001). O algoritmo CatGranule prevê a formação de grânulos com base na sequência primária da proteína, desordem estrutural e propensão a ácidos nucleicos (BOLOGNESI et al., 2016). Regiões de baixa complexidade de proteínas que conduzem a separação de fases contêm resíduos com alto potencial para interagir através de contatos pi-pi, como resíduos aromáticos (empilhamento $\pi-\pi$), arginina e glutamina (interações planares $\pi-\pi$). O programa *Pi-pi predictor* com PScore > 4 indica possíveis interações pi-pi envolvidas na separação de fases (VERNON et al., 2018). Por último, o programa CIDER (*Classification of Intrinsically Disordered Ensemble Regions*) fornece a distribuição de carga e hidrofobicidade da proteína de interesse (ALBERTI; GLADFELTER; MITTAG, 2019; SHAMMAS et al., 2015).

3.12 Microscopia de contraste diferencial de interferência (DIC) e microscopia de fluorescência

A propensão a separação de fases foi investigada através de microscopia de contraste diferencial (DIC) e microscopia de fluorescência. Amostras de rPrP⁹⁰⁻²³¹ a 10 μ M foram incubadas com 2 a 10 μ M de A1, A2 e A1_mut. Para investigar as características físico-químicas dos condensados ricos em proteínas, PEG-4000 10% (w/v) (Thermo Scientific, USA) ou 1,6-hexanediol 10% (w/v) (Merck, Germany) foram incubados com 10 μ M rPrP⁹⁰⁻²³¹ em tampão Tris 10 mM, NaCl 100 mM (pH 7.4). As amostras foram mantidas a temperatura ambiente por 10 min antes da aquisição das imagens, a menos que especificado. As imagens foram adquiridas posicionando-se uma camada de fita dupla face no centro de uma lâmina de vidro. Posteriormente, uma lamínula foi suavemente posicionada em cima das fitas adesivas gerando um espaçamento com espessura uniforme. Após homogeneização, foram pipetados 20 μ L de amostra no espaço entre a lâmina e a lamínula e a amostra foi incubada por 10 min com a lamínula virada para baixo. As micrografias foram adquiridas sob iluminação de Köhler em um microscópio confocal invertido (Leica TCS SPE, Leica Microsystems, Alemanha) com uma objetiva de 63 x (imersão em óleo). Para DIC, um laser de argônio de 488 nm foi usado. Para investigar a autofluorescência amiloide, as amostras foram excitadas em 405 nm e os sinais de fluorescência foram coletados na faixa de 450-500 nm. A presença de resíduos hidrofóbicos expostos ao solvente foi avaliada por coloração com *SYPRO Orange* (Sigma-Aldrich, EUA). O reagente *SYPRO Orange* foi diluído (1:100 v/v) em 44 μ M de rPrP⁹⁰⁻²³¹ em tampão Tris 10 mM, NaCl 100 mM (pH 7.4) e incubado por 1 hora antes da aquisição das imagens (excitação a 488 nm; emissão na faixa de 500-650 nm). Todas as imagens foram coletadas a temperatura ambiente e processadas utilizando o programa Fiji (ImageJ, EUA), usando alongamento do histograma para melhorar o contraste. Para quantificar o número de condensados em cada condição experimental, uma área central de 0,1 mm² foi igualmente posicionada em três campos de visão de cada amostra. Em seguida, os condensados dentro desta área foram marcados manualmente e identificados e contados automaticamente usando o Fiji. O diâmetro dos condensados foi determinado utilizando 50 gotículas compreendidas em 5 a 10 imagens.

4. Resultados

4.1 Purificação do domínio rPrP⁹⁰⁻²³¹

Após a lise celular, o sobrenadante contendo a proteína rPrP⁹⁰⁻²³¹ foi submetido a uma cromatografia de afinidade a níquel, uma vez que a construção de rPrP⁹⁰⁻²³¹ possui uma cauda de seis histidinas. Os anéis imidazólicos da histidina são grupos doadores de elétrons que se coordenam com o níquel imobilizado na coluna, a proteína fica retida na coluna e posteriormente é eluída ajustando o pH do tampão ou adicionando imidazol livre (BORNHOSRST; FALKE, 2000). O perfil de eluição e a avaliação do conteúdo proteico são apresentados na **Figura 19**. O cromatograma verificou a presença de quatro picos, os quais tiveram suas frações coletadas e analisadas por SDS-PAGE. A proteína rPrP⁹⁰⁻²³¹ foi eluída da coluna com 630 mM de imidazol, correspondendo ao último pico do cromatograma (**Figura 19A**) e as bandas 5-7 no gel de eletroforese (**Figura 19B**).

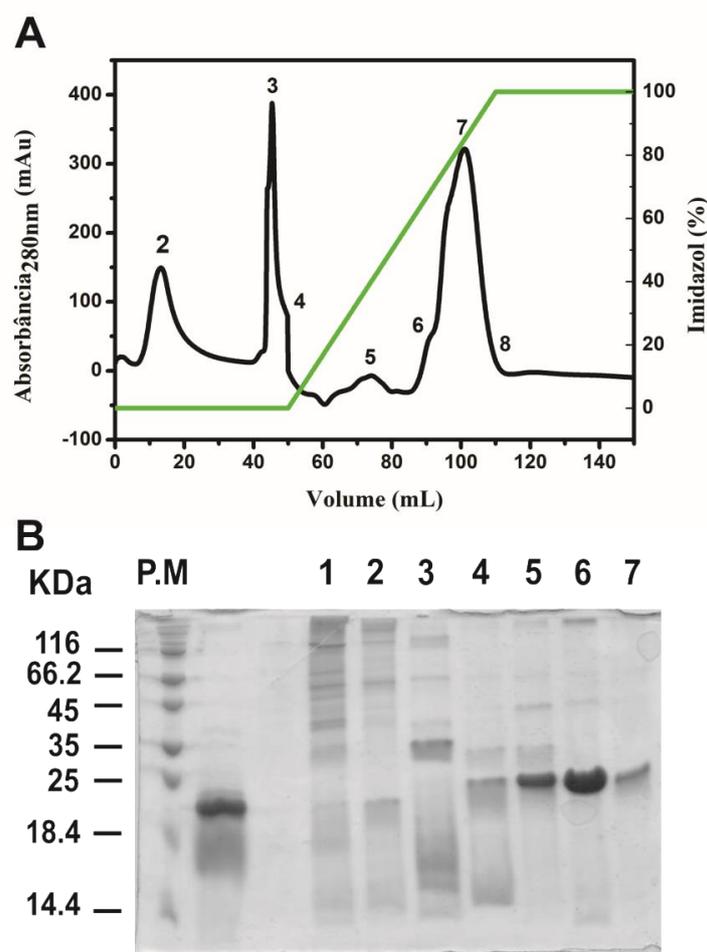


Figura 19. Purificação de rPrP⁹⁰⁻²³¹ por cromatografia de afinidade a níquel. (A) Perfil de eluição de rPrP⁹⁰⁻²³¹ da coluna de afinidade His-Trap HP (GE Healthcare). A linha preta representa o traçado de absorvância em 280 nm e a linha verde representa o gradiente de imidazol. (B) Avaliação do conteúdo proteico das frações coletadas durante a purificação por SDS-PAGE. (P.M) Padrão de massa molecular. (1-4) Frações coletadas durante a etapa de lavagem da coluna (Tris-HCl 10 mM, NaH₂PO₄ 100 mM (pH 8,0)). (5-7) Frações eluídas durante o gradiente de imidazol (Tris-HCl 10 mM, NaH₂PO₄ 100 mM, imidazol 750 mM (pH 8,0)). O último pico no cromatograma e as bandas 5-7 se referem à proteína de interesse com a banda em ~ 19 kDa. rPrP⁹⁰⁻²³¹ foi eluída com 630 mM de imidazol.

A construção rPrP⁹⁰⁻²³¹ possui um sítio de clivagem para trombina e a próxima etapa no processo de purificação seria submeter a amostra à clivagem com trombina (1:1000) a temperatura ambiente por 2 h. Em seguida, a amostra seria submetida novamente a uma segunda purificação de afinidade a níquel para a remoção da cauda de poli histidinas. Porém, com a clivagem, ocorreu uma perda de ~50 % de proteína. Como a proteína já elui com alto grau de pureza da primeira etapa cromatográfica (**Figura 20**), optou-se por trabalhar com a construção rPrP⁹⁰⁻²³¹ contendo a cauda de histidinas e o sítio de clivagem para a trombina. Isso confere à rPrP⁹⁰⁻²³¹ 21 resíduos a mais em sua

sequência (MGSSHHHHHSSGLVPRGSHM). A purificação ocorreu com um rendimento final de 12-19 mg/L de meio de cultura.

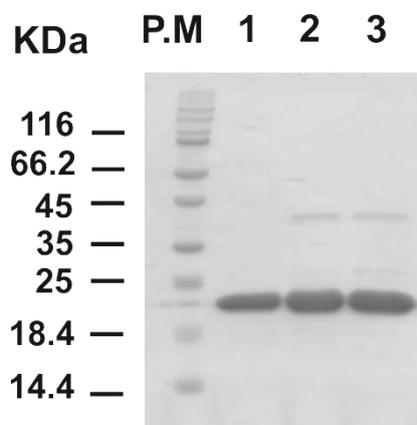


Figura 20. Análise de pureza por SDS-PAGE de rPrP⁹⁰⁻²³¹. (P.M) Padrão de massa molecular. (1-3) Fração de proteína coletada após 18h de diálise e filtrada em filtro de 0.22 mm.

4.2 Determinação da afinidade e especificidade de ligação de A1 e A2 a rPrP⁹⁰⁻²³¹ e rPrP²³⁻²³¹

A afinidade dos aptâmeros selecionados por SELEX (MACEDO, 2016) e os parâmetros termodinâmicos da interação com rPrP foram determinados por calorimetria de titulação isotérmica (ITC). Para avaliar se os 21 resíduos a mais na sequência da proteína iriam interferir na afinidade de ligação aos aptâmeros, foram conduzidos experimentos de ITC nos quais A1 foi titulada em rPrP⁹⁰⁻²³¹ contendo ou não a cauda de poli-histidinas e as afinidades foram comparadas (**Figura 21**). As isotermas de ligação não apresentaram diferenças significativas. Em ambos os termogramas, a interação rPrP⁹⁰⁻²³¹:A1 ocorre com afinidade na faixa de nM (4,03 nM para rPrP⁹⁰⁻²³¹ não clivada:A1 e 2,32 nM para rPrP⁹⁰⁻²³¹ clivada:A1) e estequiometria de ~5:1, sugerindo que o tag de histinas e o link de clivagem para a trombina presente na sequência de rPrP⁹⁰⁻²³¹ não interferem na interação com o aptâmero e, portanto, a proteína não clivada foi usada na condução dos experimentos posteriores.

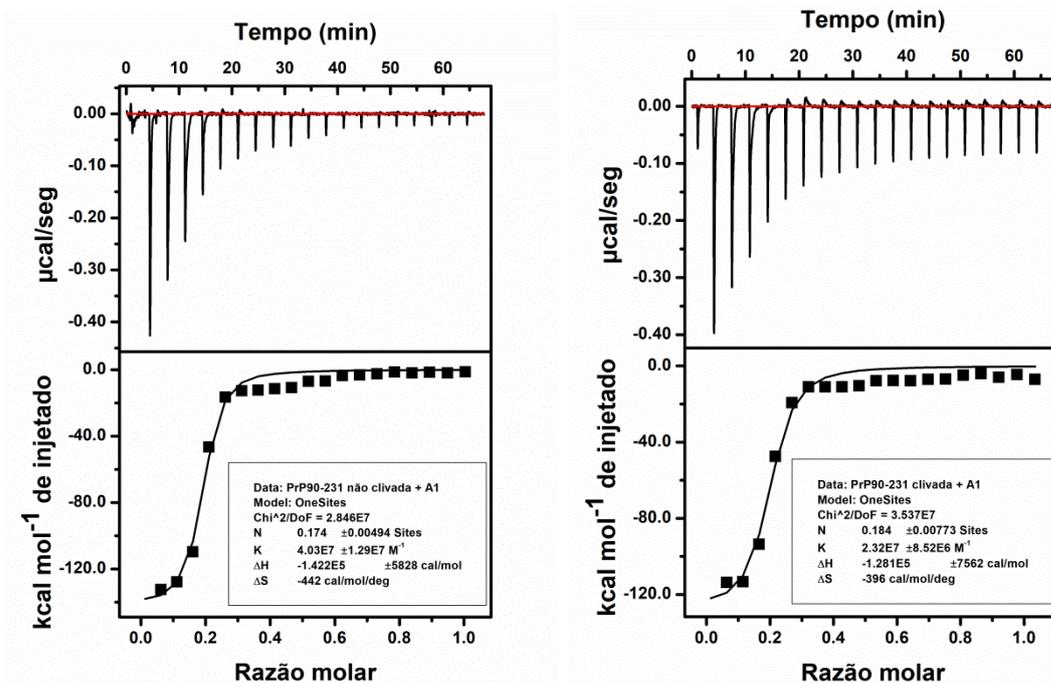


Figura 21. Termogramas da interação de rPrP⁹⁰⁻²³¹ com A1. O perfil bruto da curva de ITC (painel superior) e os valores integrados de calor em função da razão molar rPrP⁹⁰⁻²³¹:A1 (painel inferior) estão mostrados juntamente com os parâmetros termodinâmicos da interação (inset painel inferior). Os experimentos foram realizados com 5 µM de rPrP⁹⁰⁻²³¹ em cacodilato de sódio 20 mM (pH 7,0) a 25 °C. **(A)** rPrP⁹⁰⁻²³¹ não clivada:A1 **(B)** rPrP⁹⁰⁻²³¹ clivada:A1. Ambos os termogramas da interação rPrP⁹⁰⁻²³¹:A1 apresentam afinidade na faixa de nM e estequiometria de ~5:1.

A interação com os aptâmeros foi investigada utilizando ambas as construções rPrP²³⁻²³¹ e rPrP⁹⁰⁻²³¹, correspondentes à proteína íntegra e ao domínio C-terminal globular, respectivamente. A titulação de A1 em rPrP²³⁻²³¹ e rPrP⁹⁰⁻²³¹ revelou constantes de dissociação (K_d) de 838 e 232 nM, respectivamente (

Figura 22, A e B). A similaridade nas afinidades de ligação para ambas as construções de rPrP sugere que a região N-terminal intrinsecamente desordenada não contribui significativamente para a interação com o aptâmero. Portanto, podemos concluir que o domínio C-terminal globular representa a região de ligação de alta afinidade do aptâmero a rPrP. Para A2, a interação com a rPrP íntegra (rPrP²³⁻²³¹) gerou um K_d de 1,47 µM, enquanto a interação com a construção C-terminal (rPrP⁹⁰⁻²³¹) gerou um K_d de 1,93 µM (

Figura 22, C e D). A afinidade de ligação para A1 é ~10 vezes maior do que para A2, sugerindo um reconhecimento específico de A1 pelo domínio globular de rPrP,

que pode estar relacionado tanto à sequência quanto à conformação do aptâmero. As estequiometrias de ligação foram variáveis (de 3:1 a 6:1 razão molar proteína:DNA). A interação de alta afinidade de rPrP⁹⁰⁻²³¹ com A1 ocorreu com uma estequiometria de 5:1. A **Tabela 4** resume os parâmetros termodinâmicos obtidos a partir dos dados de calorimetria.

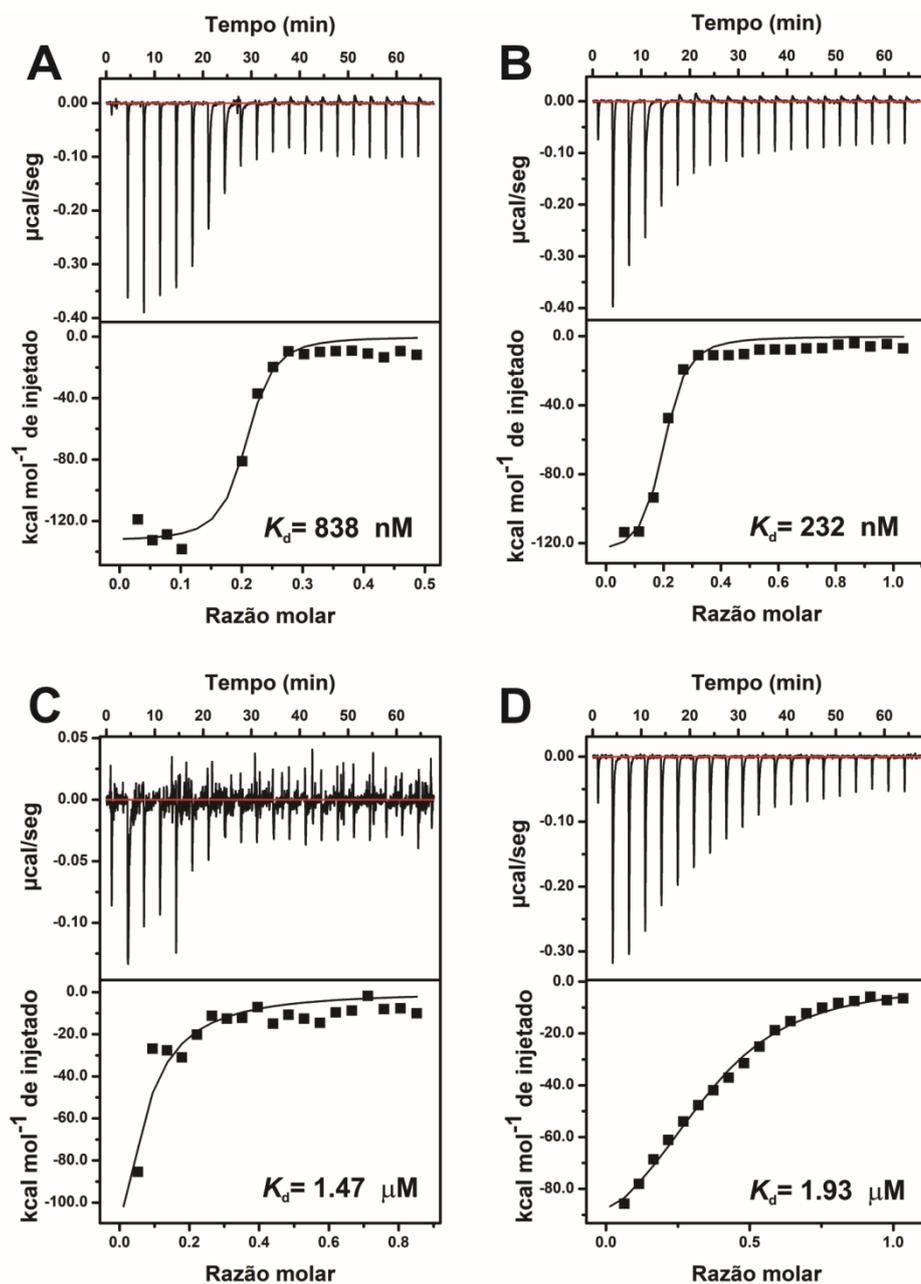


Figura 22. Termogramas de ligação de rPrP⁹⁰⁻²³¹ aos aptâmeros A1 e A2. O perfil bruto da curva de ITC (painel superior) e os valores integrados de calor em função da razão molar rPrP⁹⁰⁻²³¹:aptâmeros (painel inferior) estão mostrados. (A) rPrP²³⁻²³¹:A1. (B) rPrP⁹⁰⁻²³¹:A1. (C) rPrP²³⁻

²³¹:A2. **(D)** rPrP⁹⁰⁻²³¹:A2. Os experimentos foram realizados com 5 μM de rPrP⁹⁰⁻²³¹ em cacodilato de sódio 20 mM (pH 7,0) a 25 °C.

Tabela 4. Parâmetros termodinâmicos obtidos dos experimentos de ITC para rPrP:aptâmeros.

rPrP:aptâmeros	N	$K_d (\times 10^{-6} \text{ M})$	$\Delta H (\text{kcal mol}^{-1})$	$\Delta S (\text{kcal mol}^{-1} \text{ deg}^{-1})$
rPrP ²³⁻²³¹ :A1	0,19	838×10^{-3}	-0,013	-0,41
rPrP ⁹⁰⁻²³¹ :A1	0,18	232×10^{-3}	-0,013	-0,40
rPrP ²³⁻²³¹ :A2	0,35	1,47	$-2,33 \times 10^{-6}$	$-7,79 \times 10^{-3}$
rPrP ⁹⁰⁻²³¹ :A2	0,16	1,93	$-0,11 \times 10^{-6}$	-0,35

A interação proteína:DNA é mediada por contatos eletrostáticos, ligações de hidrogênio e interações de Van der Waals com bases nitrogenadas específicas (RECORD; LOHMAN; HASETH, 1976). Para obter mais informações acerca da especificidade de interação de rPrP⁹⁰⁻²³¹ com os aptâmeros de DNA selecionados por SELEX, as isotermas de ligação foram adquiridas em concentrações crescentes de NaCl (**Figura 23**). O aumento da concentração de NaCl levou a uma diminuição na afinidade de ligação ao DNA, como esperado para sistemas nos quais interações eletrostáticas participam da formação do complexo. No entanto, apesar da redução na afinidade, rPrP⁹⁰⁻²³¹ foi capaz de se ligar a A1 na presença de 100 e 500 mM de NaCl ($K_d \sim 2 \mu\text{M}$ e $\sim 18 \mu\text{M}$, respectivamente; **Figura 23, A, B**), rompendo as ligações apenas com NaCl 800 mM (**Figura 23 C**). A ligação ao A2, nas mesmas condições, não foi mantida (**Figura 23 D**). Essa diferença na susceptibilidade ao sal sugere uma diferença no mecanismo de reconhecimento do aptâmero por rPrP⁹⁰⁻²³¹, sugerindo maior afinidade e especificidade para A1.

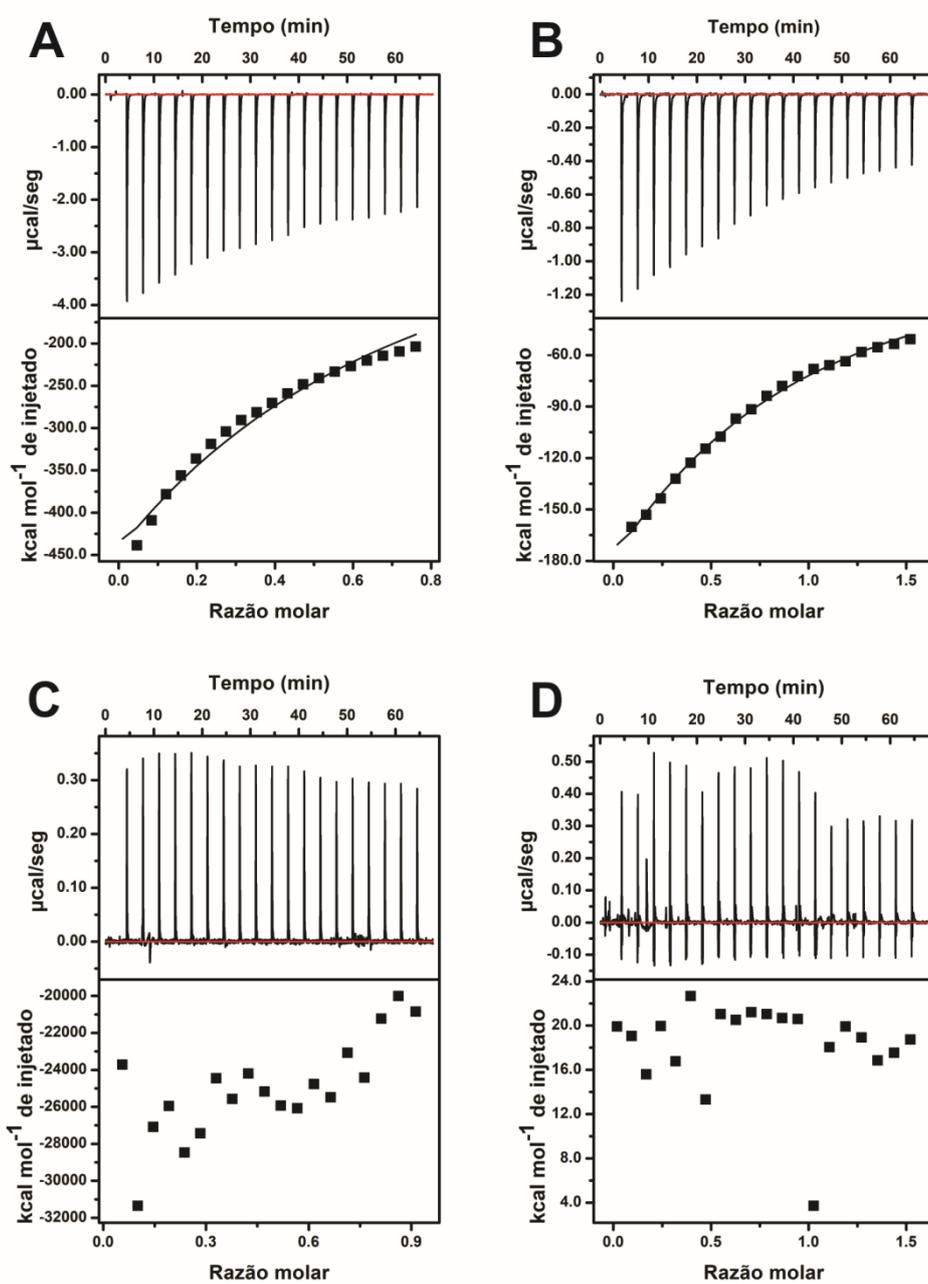


Figura 23. Termogramas de ligação de rPrP⁹⁰⁻²³¹ aos aptâmeros A1 e A2 na presença de diferentes concentrações de NaCl. O perfil bruto da curva de ITC (painel superior) e os valores integrados de calor em função da razão molar rPrP⁹⁰⁻²³¹:aptâmeros (painel inferior) estão mostrados. (A) rPrP⁹⁰⁻²³¹:A1 em NaCl 100 mM. (B) rPrP⁹⁰⁻²³¹:A1 em NaCl 500 mM. (C) rPrP⁹⁰⁻²³¹:A1 em NaCl 800 mM. (D) rPrP⁹⁰⁻²³¹:A2 em NaCl 100 mM. Os experimentos foram realizados com 5 μM de rPrP⁹⁰⁻²³¹ em cacodilato de sódio 20 mM (pH 7,0) a 25 °C.

4.3 Caracterização estrutural dos aptâmeros A1 e A2

Para investigar os mecanismos moleculares relacionados à interação de rPrP⁹⁰⁻²³¹ com A1 e A2, foi conduzido uma caracterização estrutural dos aptâmeros utilizando diferentes técnicas biofísicas. O padrão de estrutura secundária dos aptâmeros A1 e A2 foi investigado através de dicroísmo circular na ausência e presença de NaCl 100 mM. O espectro de CD de A1, obtido na ausência de sal, apresentou dois sinais principais de baixa intensidade, uma banda negativa em 243 nm e uma banda positiva em 282 nm, característicos de uma estrutura em duplex do tipo B (**Erro! Fonte de referência não encontrada.A**, preto). Na forma B, os pares de bases estão orientados quase que perpendicularmente ao eixo principal da hélice, resultando em um sinal de CD com intensidade reduzida (IVANOV; MINCHENKOVA; SCHYOLKINA, 1973). A adição de NaCl a 100 mM alterou o espectro de CD de A1, levando a um aumento de intensidade da banda negativa em 243 nm e ao aparecimento de duas bandas positivas de baixa intensidade em 261 e 288 nm, sugerindo uma transição da hélice B canônica para uma estrutura heterônoma B' não usual (**Erro! Fonte de referência não encontrada.A**, vermelho). Esta forma é caracterizada por uma hélice dupla mais desenrolada, contendo, conseqüentemente, um sulco menor mais estreito (KYPR et al., 2009). Trabalhos anteriores mostraram que a baixa concentração de sal favorece as conformações de DNA que exibem um sulco menor mais estreito devido a maior repulsão dos grupos fosfato (BRAM, 1971; IVANOV; MINCHENKOVA; SCHYOLKINA, 1973). O espectro de CD de A2, independentemente da adição de sal, foi caracterizado por sinais típicos de uma estrutura helicoidal do tipo B: duas bandas de alta intensidade, uma negativa em 243 nm e uma positiva em 277 nm (**Erro! Fonte de referência não encontrada.B**).

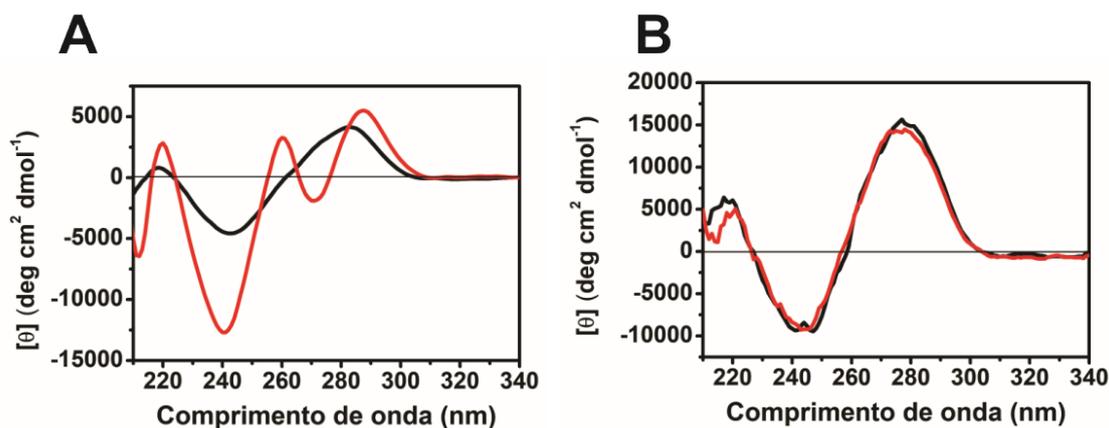


Figura 24. Investigação da estrutura secundária de A1 e A2 por dicroísmo circular. (A) Espectro de CD de A1 (50 μM) em cacodilato de sódio 20 mM (pH 7,0) na ausência (preto) e na presença (vermelho) de NaCl 100 mM. (B) Espectro de CD de A2 (50 μM) em cacodilato de sódio 20 mM (pH 7,0) na ausência (preto) e na presença (vermelho) de NaCl 100 mM. Todos os espectros foram adquiridos a 25 $^{\circ}\text{C}$.

Para obter mais informações acerca das estruturas dos aptâmeros foram realizados experimentos 1D de ^1H RMN. Sinais de ressonância de baixa intensidade de δ 10.8 a 14 ppm são característicos de pareamento de iminas. A região do espectro de δ 10.8 a 12 ppm se refere a ligações hidrogênio entre resíduos de guanina do tipo *Hoogsteen* atribuídos a estruturas em quadruplex. A região entre δ 12 e 14 ppm se refere a sinais de ressonância característicos de ligações hidrogênio do tipo *Watson-Crick* (MARUŠIČ et al., 2017). O espectro 1D de ^1H RMN de A1 revelou a presença de sinais de ressonância característicos de pareamento de iminas do tipo *Watson-Crick* (δ 12.4 a 13.8), indicando pareamento de bases intracadeias e a formação de uma estrutura em *hairpin* (**Figura 25A** preto), uma vez que se trata de um DNA simples fita. Na presença de sal, os sinais de ressonância de iminas pareadas através de ligação hidrogênio do tipo *Watson-Crick* foram mantidos (**Figura 25A** vermelho). O espectro 1D de ^1H RMN de A2 não apresentou evidências de pareamento de iminas (**Figura 25B**), sugerindo uma conformação helicoidal de cadeia simples sem estrutura secundária.

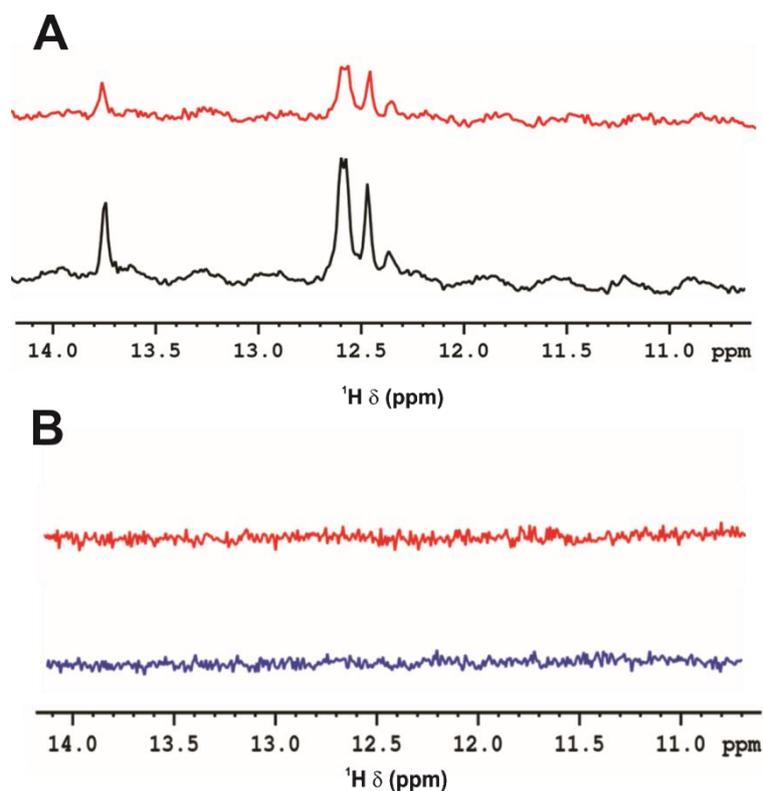


Figura 25. Espectro 1D de ^1H RMN dos aptâmero A1 e A2. Os espectros 1D de ^1H RMN mostram a região de pareamento de iminas. Os experimentos foram adquiridos com 100 μM de aptâmero em cacodilato de sódio 20 mM (pH 7,0) a 25 $^\circ\text{C}$. **(A)** A1 na ausência (preto) e presença (vermelho) de NaCl a 100 mM. **(B)** A2 na ausência (azul) e presença (vermelho) de NaCl a 100 mM.

A técnica de SAXS fornece informações acerca do tamanho, formato global e distribuição oligomérica de biomoléculas em solução. Foram realizadas análises de SAXS para inferir sobre a globularidade dos aptâmeros. As amostras foram irradiadas por um raio-X monocromático e a intensidade de luz espalhada (I) foi registrada em função do vetor de espalhamento q (**Figura 26**).

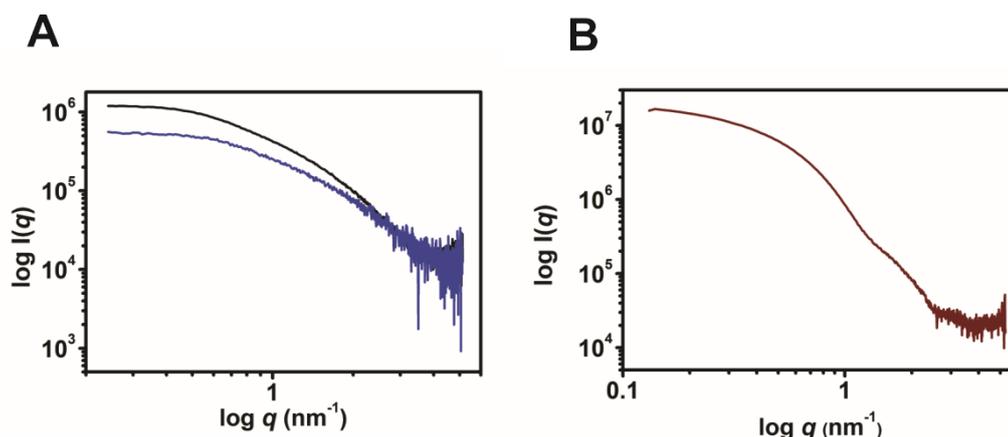


Figura 26. Curvas de espalhamento obtidas para os aptâmeros A1 e A2 e para a proteína albumina de soro bovino (BSA). Os experimentos foram realizados com os aptâmeros e BSA a 2 mg/mL em cacodilato de sódio 20 mM (pH 7,0) a 25 °C. (A) Curva de espalhamento de A1 (preto) e A2 (azul). (B) Curva de espalhamento de BSA.

A partir da curva de espalhamento foi obtido o gráfico de Kratky que fornece informações sobre a globularidade de biomoléculas. A aparência do gráfico mostra o grau de compactação da molécula. O gráfico de Kratky para moléculas globulares apresenta um formato sinusóide com um máximo bem definido. As curvas para moléculas desestruturadas exibem um patamar ao longo de um intervalo específico de q , seguido por um aumento uniforme em valores de q elevados (BERNADÓ; BLACKLEDGE, 2009). Os gráficos de Kratky mostraram que A1 adota uma estrutura globular, enquanto A2 apresenta menor compactação, indicando uma estrutura mais alongada que A1 (**Figura 27A**) ((BERNADÓ; BLACKLEDGE, 2009; DONIACH, 2001; OLIVEIRA et al., 2016). O plot de Kratky obtido para a proteína albumina de soro bovino (BSA) está representado como um controle positivo de globularidade (**Figura 27B**).

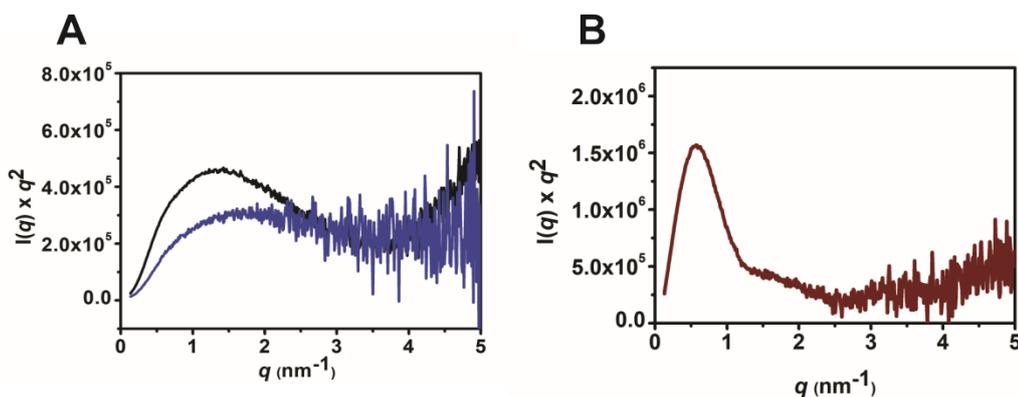


Figura 27. Análise de globularidade através do gráfico de Kratky. (A) Gráfico de Kratky de A1 (preto) e A2 (azul). (B) Gráfico de Kratky de BSA. Os experimentos foram adquiridos utilizando A1, A2 e BSA na concentração de 2 mg/mL em cacodilato de sódio 20 mM (pH 7,0), 25 °C.

A regressão linear do gráfico de Guinier respeitando a região de $q_{\text{máx}} < 1,3/R_g$ fornece o raio de giro da molécula (R_g), que é definida como a média das distâncias quadradas do centro de massa da molécula ponderada pelo contraste. R_g fornece indicações sobre o tamanho e o formato geral da partícula. Valores baixos de R_g correspondem a partículas mais compactas. A **Figura 28** mostra a regressão de Guinier para A1 e o valor de raio de giro estimado de 1.77 nm. Não foi possível estimar o valor de R_g para A2, visto que os dados de espalhamento deste aptâmero não forneceram valores de $\ln I(q)$ lineares em regiões de q^2 baixo.

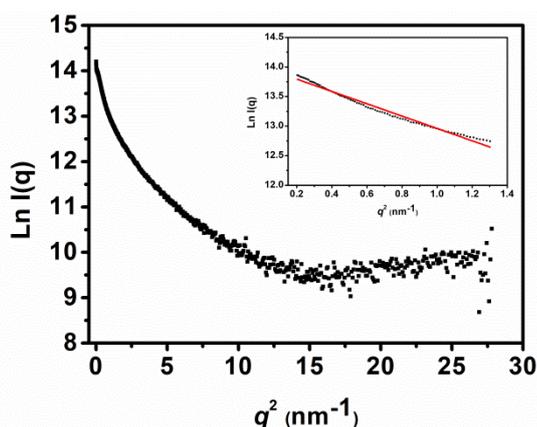


Figura 28. Regressão linear do domínio de Guinier para o aptâmero A1. O raio de giro foi calculado a partir do gráfico de Guinier através da fórmula $\alpha = R_g^2/3$.

Através da técnica de espalhamento de luz dinâmico, foram calculados os raios hidrodinâmicos dos aptâmeros, correspondendo a 2,7 nm para A1 e 4,2 nm para A2.

Além disso, foram realizadas curvas de desnaturação térmica dos aptâmeros na ausência e presença de 100 mM de NaCl (**Figura 29**). A1 apresentou uma curva de desnaturação térmica sigmoide, permitindo calcular uma T_m de 45 °C, independentemente da adição de sal. Para A2, o valor de T_m não pôde ser medido dentro da faixa de temperatura usada no experimento (20-85 °C), sugerindo uma maior estabilidade para o aptâmero A1 estruturado em *hairpin*. Os resultados estão de acordo com a previsão de estrutura secundária para A1, que indicou que a conformação de menor energia livre, -7,80 kcal/mol, encontra-se estruturada em *hairpin* (grampo), formado por um pescoço estabilizado por ligações hidrogênio e uma alça interna contendo 12 nucleotídeos (**Figura 30**) (HOFACKER, 2003).

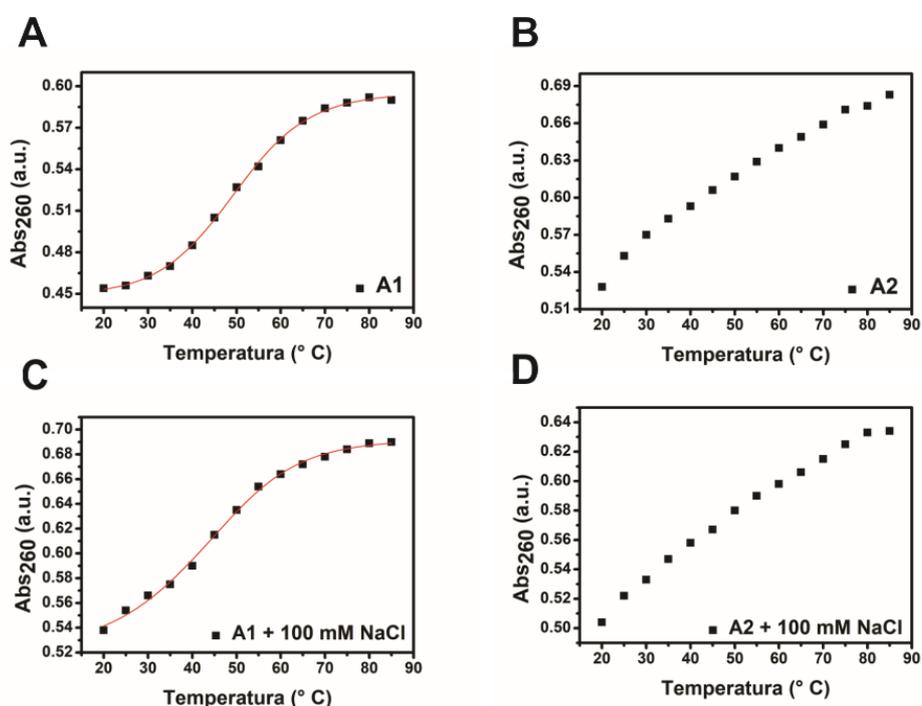


Figura 29. Perfis de desnaturação térmica dos aptâmeros A1 e A2. (A, C) A1 na ausência e na presença, respectivamente, de NaCl a 100 mM. (B, D) A2 na ausência e na presença, respectivamente, de NaCl a 100 mM. A absorvância foi medida a 260 nm e as amostras foram aquecidas de 20 a 85 °C a uma taxa de 0.5 °C/ min. Os experimentos foram realizados a 2 μM de aptâmeros em cacodilato de sódio a 20 mM (pH 7,0).

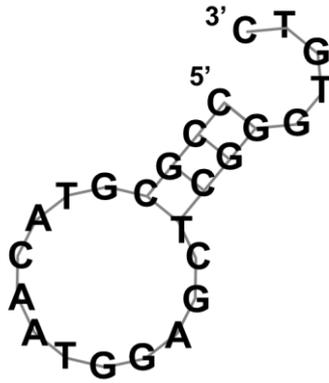


Figura 30. Predição da estrutura secundária de A1. O aptâmero A1 apresenta uma estrutura em *hairpin* formado por um pescoço estabilizado por ligações de hidrogênio e uma alça interna contendo 12 nucleotídeos. A predição foi realizada pelo professor Gerald Weber da UFMG usando o programa Vienna RNAfold.

4.4 Caracterização estrutural de uma forma mutante de A1

Para investigar o papel desempenhado pela estrutura do aptâmero na interação com rPrP⁹⁰⁻²³¹, foi utilizado um mutante de A1 (A1_mut), no qual dois nucleotídeos de A1 foram substituídos com o objetivo de romper o emparelhamento de bases: guanina na posição 19 (G19) e timina na posição 24 (T24) foram substituídas por adeninas (**Tabela 3, Figura 31**). As propriedades estruturais de A1_mut, assim como de A1 e A2, foram avaliadas pelas técnicas biofísicas descritas anteriormente.

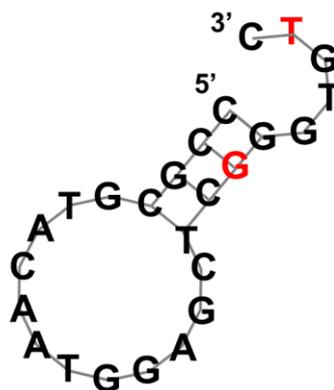


Figura 31. Predição da estrutura secundária de A1 com as bases modificadas destacadas em vermelho. A guanina na posição 19 (G19) e a timina na posição 24 (T24) foram substituídas por adeninas na construção de A1_mut.

O espectro de CD de A1_mut foi muito semelhante ao de A2, caracterizado por uma banda de baixa intensidade em 248 nm e uma banda positiva em 277 nm de alta intensidade (**Figura 32A**). O plot de Kratky obtido a partir dos dados de SAXS sugeriu uma estrutura estendida para A1_mut (**Figura 32B**). O espectro 1D de ^1H RMN de A1_mut, obtido na ausência de sal, não apresentou evidências de pareamento de iminas do tipo *Watson-Crick*, indicando uma conformação helicoidal de cadeia simples. A adição de NaCl 100 mM levou ao aparecimento de sinais de ressonância com uma intensidade relativa muito pequena na região de iminas pareadas (**Figura 32C**), sugerindo um equilíbrio *coil-hairpin*. No entanto, o espectro de CD nesta condição é quase idêntico ao de A1_mut na ausência de sal, sugerindo que o equilíbrio é deslocado no sentido da conformação helicoidal.

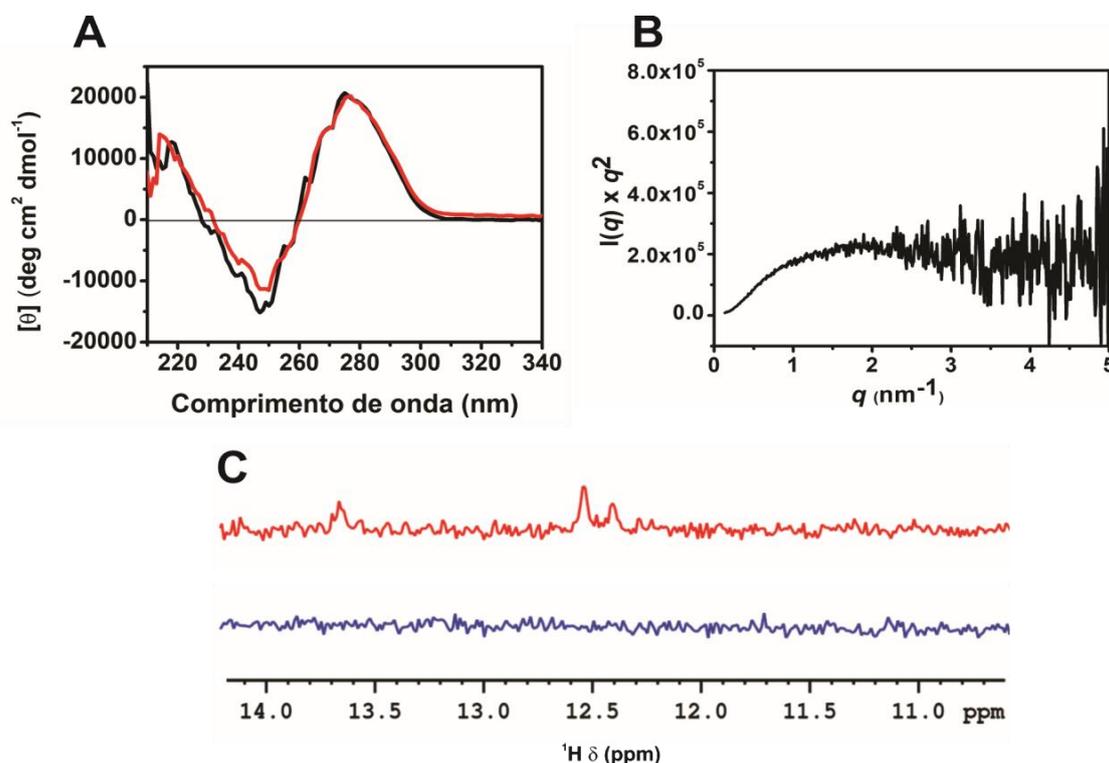


Figura 32. Caracterização estrutural de A1_mut. (A) Espectros de dicroísmo circular de A1_mut a 100 μM (preto) e na presença de NaCl a 100 mM (vermelho). (B) Plot de Kratky de A1_mut a 200 μM . (C) Espectro 1D de ^1H RMN mostrando a região de deslocamento químico de iminas pareadas. Os espectros foram adquiridos com 100 μM de A1_mut (preto) e na presença de NaCl 100 mM (vermelho). Todos os experimentos foram realizados em cacodilato de sódio a 20 mM (pH 7,0), 25 $^{\circ}\text{C}$.

Além disso, a estabilidade de A1_mut também foi investigada por desnaturação térmica (**Figura 33**). Como A2, a curva de desnaturação térmica de A1_mut foi praticamente linear, impedindo a estimativa da T_m dentro das temperaturas testadas (20-85 °C). Esta é outra evidência de que A1_mut não adota estrutura secundária regular.

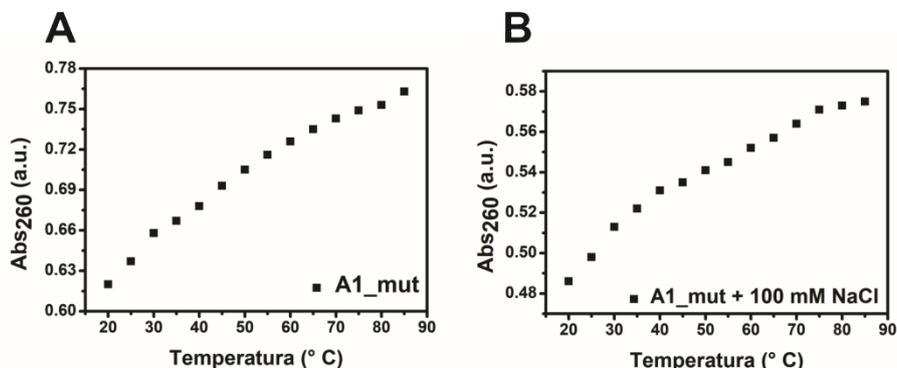


Figura 33. Perfis das curvas de desnaturação térmica de A1_mut. (A) A1_mut na ausência e (B) presença de NaCl 100 mM. A absorbância foi medida a 260 nm e as amostras foram aquecidas de 20 - 85 °C a uma taxa de 0.5 °C/ min. Os experimentos foram realizados a 2 µM de A1_mut em cacodilato de sódio 20 mM (pH 7,0).

Em seguida, a interação rPrP⁹⁰⁻²³¹:A1_mut foi investigada por ITC. Apesar de inúmeros esforços, não foi possível obter uma isoterma de ligação confiável para A1_mut nas mesmas condições usadas para A1 e A2, provavelmente devido a menor afinidade de A1_mut por rPrP⁹⁰⁻²³¹. Para contornar este problema, a concentração de proteína foi aumentada; no entanto, isso resultou em agregação dentro da célula do ITC. Assim, uma única injeção de A1_mut na solução de rPrP⁹⁰⁻²³¹ foi realizada, indicando interação entre as duas espécies (**Figura 34**).

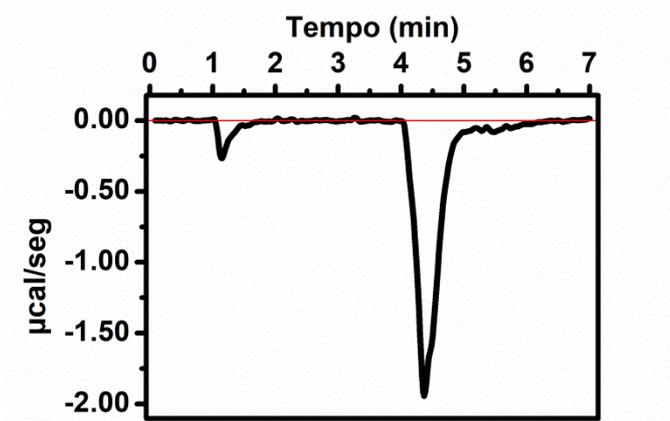


Figura 34. Calorimetria de titulação isotérmica com injeção única de rPrP⁹⁰⁻²³¹:A1_mut. O experimento foi adquirido com 100 μM de A1 na seringa e 10 μM de rPrP⁹⁰⁻²³¹ em cacodilato de sódio 20 mM (pH 7,0) a 25 °C. O calor de diluição de A1_mut em tampão foi medido separadamente e subtraído da titulação da amostra. A razão molar final foi de 1:1.

4.5 Caracterização das mudanças estruturais em rPrP⁹⁰⁻²³¹ promovidas pela interação com os aptâmeros de DNA

Para investigar o efeito da ligação dos aptâmeros na estrutura de rPrP⁹⁰⁻²³¹, foram realizados experimentos de CD com o aumento das razões molares rPrP⁹⁰⁻²³¹:DNA. Para garantir que apenas o sinal da proteína fosse observado, cada espectro de CD foi subtraído do espectro do DNA livre correspondente obtido na concentração específica. A titulação de A1 em rPrP⁹⁰⁻²³¹ causou uma perda da estrutura secundária da proteína de um modo dependente da estequiometria. Surpreendentemente, esta perda de estrutura secundária foi inversamente proporcional à concentração de DNA, de modo que a baixa concentração de DNA (razão molar 5:1 rPrP⁹⁰⁻²³¹:DNA, linha preta) resultou em uma maior desestruturação da proteína (**Figura 35A**). Resultados semelhantes foram obtidos para A2 (**Figura 35B**). Em contraste, a adição de A1_mut não causou mudanças comparáveis na estrutura secundária da proteína nas diferentes relações estequiométricas avaliadas (**Figura 35C**).

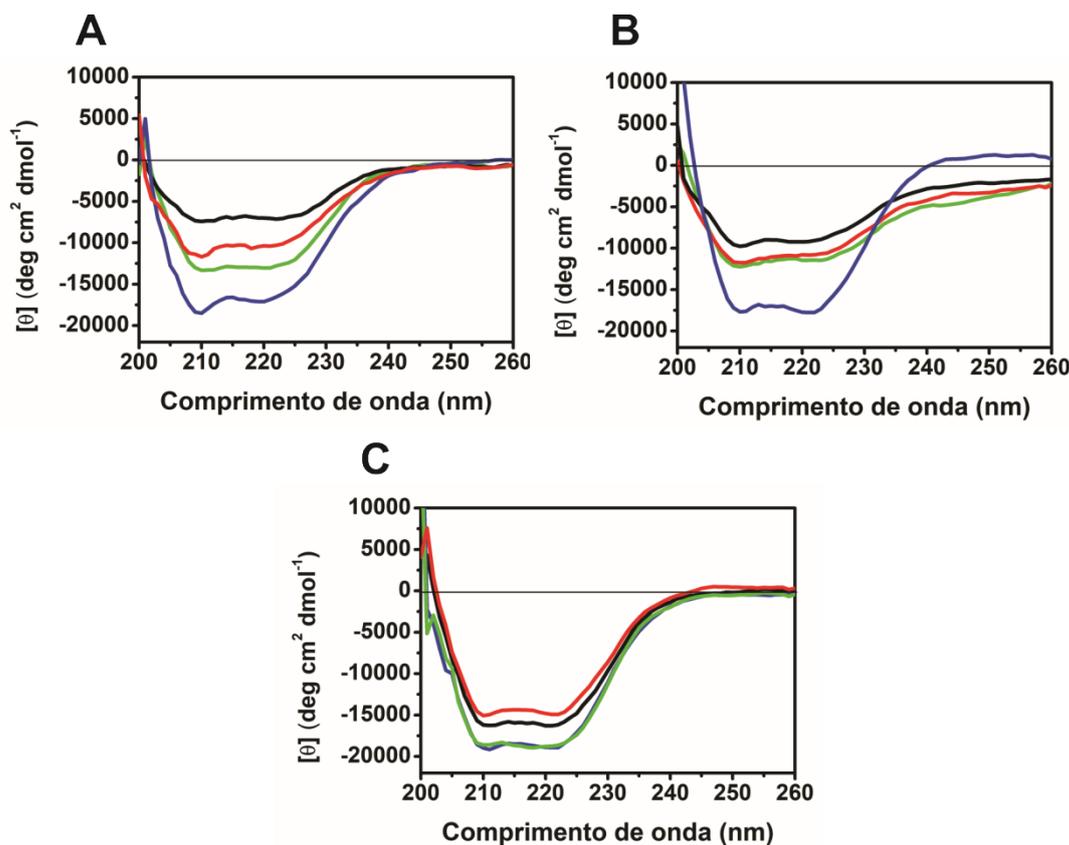


Figura 35. $rPrP^{90-231}$ perde conteúdos de estrutura secundária com a ligação a aptâmeros. Espectros de dicroísmo circular de $rPrP^{90-231}$ (azul) e $rPrP^{90-231}$:DNA nas razões molares de 1:1 (verde), 2:1 (vermelho) e 5:1 (preto). (A) $rPrP^{90-231}$:A1. (B) $rPrP^{90-231}$:A2. (C) $rPrP^{90-231}$:A1_mut. Os experimentos foram adquiridos com $rPrP^{90-231}$ a 10 μ M em tampão cacodilato de sódio 20 mM (pH 7,0) a 25 °C.

4.6 Investigação da região mínima de A1 responsável pela interação com $rPrP^{90-231}$

Durante as tentativas de obtenção de amostras concentradas e solúveis dos complexos $rPrP$:aptâmeros, observou-se uma turbidez imediatamente após a adição de aptâmero às amostras de $rPrP$ (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**). Curiosamente, a incubação à temperatura ambiente por ~ 6 h levou à desagregação da amostra. Resultados semelhantes foram observados para a $rPrP$ inteira na presença de uma sequência de RNA de alta afinidade (GOMES et al., 2008) e para a $rPrP^{90-231}$ de hamster sírio na presença de uma sequência de DNA de 18 nucleotídeos (LIMA et al., 2006).

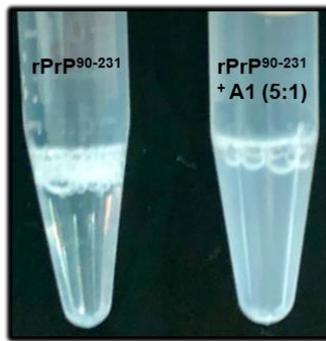


Figura 36. Aumento da turbidez de rPrP⁹⁰⁻²³¹ com a adição do aptâmero A1. Amostras de rPrP⁹⁰⁻²³¹ purificada (eppendorf da esquerda) e com a adição de A1 na razão molar 5:1 rPrP:DNA (eppendorf da direita). A amostra fica turva instantaneamente após a adição de A1 e desagrega após ~6 h a temperatura ambiente.

Foram realizados experimentos de titulação de rPrP⁹⁰⁻²³¹ enriquecidas com ¹⁵N com o aptâmero A1 na razão molar 10:1 (rPrP:A1) (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**). Os espectros mostram a proteína pura (preto) sobrepostas com o espectro do complexo (azul). É observado muita perda de sinal do complexo, devido ao tamanho, a afinidade muito alta ou a agregação da amostra. Embora algumas táticas tenham sido realizadas (como alteração da força iônica e mudanças na estequiometria), não foi possível obter espectros do complexo que pudessem ser analisados e identificados a região de interação com rPrP⁹⁰⁻²³¹.

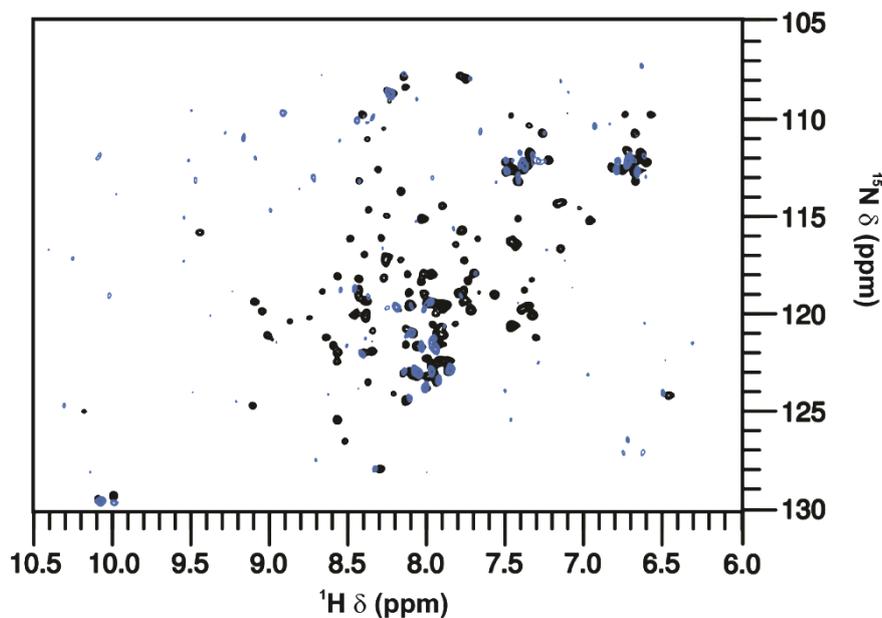


Figura 37. Espectro de RMN de rPrP⁹⁰⁻²³¹ na ausência e na presença de A1 (10:1). Comparação de espectros de [¹H, ¹⁵N] HSQC de 200 μM rPrP⁹⁰⁻²³¹ adquiridos na ausência (preto) e na presença de

20 μ M A1 (10:1 PrP:A1) (azul). Os experimentos foram adquiridos em tampão fosfato de sódio 10 mM (pH 6,5) e KCl 10 mM, 25 °C.

Uma das tentativas para diminuir a agregação e/ou a alta afinidade do complexo e conseqüentemente diminuir a perda dos sinais de ressonância foi dividir a sequência de A1 contendo 25 nucleotídeos em cinco novos DNAs de 12 nucleotídeos (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**).

5'-CGC CGT ACA ATC GAG CTC GGG TGT C-3'	A1
5'-CGC CGT ACA ATC GAG CTC GGG TGT C-3'	A1_1
5'-CGC CGT ACA ATC GAG CTC GGG TGT C-3'	A1_2
5'-CGC CGT ACA ATC GAG CTC GGG TGT C-3'	A1_3
5'-CGC CGT ACA ATC GAG CTC GGG TGT C-3'	A1_4
5'-CGC CGT ACA ATC GAG CTC GGG TGT C-3'	A1_5

Figura 38. Sequência de oligonucleotídeos derivados de A1. O aptâmero A1 contendo 25 nucleotídeos foi fragmentado em cinco novos DNAs de 12 nucleotídeos cada.

Foi investigado a região mínima de A1 que se liga com maior afinidade a rPrP⁹⁰⁻²³¹ usando a calorimetria de titulação isotérmica. Curvas de ITC para os cinco oligonucleotídeos estão apresentadas na **Erro! Fonte de referência não encontrada.** e a afinidade de cada um está apresentada na **Erro! Fonte de referência não encontrada.** A1_4 se ligou com maior afinidade a rPrP⁹⁰⁻²³¹, enquanto A1_2 se ligou com menor afinidade. Foram realizados ainda experimentos de titulação de rPrP⁹⁰⁻²³¹ com esses oligonucleotídeos, porém os problemas anteriores relacionados a turbidez e desaparecimento dos sinais permaneceram.

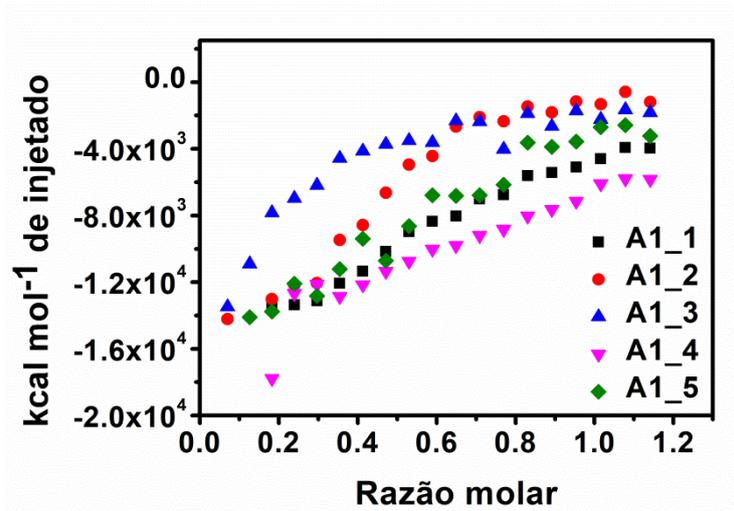


Figura 39. Termogramas da interação de rPrP⁹⁰⁻²³¹ com os derivados de A1. Valores integrados de calor em função da razão molar rPrP⁹⁰⁻²³¹:derivados de A1. rPrP⁹⁰⁻²³¹:A1_1 (preto). rPrP⁹⁰⁻²³¹:A1_2 (vermelho). rPrP⁹⁰⁻²³¹:A1_3 (azul). rPrP⁹⁰⁻²³¹:A1_4 (rosa). rPrP⁹⁰⁻²³¹:A1_5 (verde). Os experimentos foram realizados com 10 μ M de rPrP⁹⁰⁻²³¹ e 50 μ M de DNA em cacodilato de sódio 20 mM (pH 7,0), 25 °C.

Tabela 5. Afinidade de ligação e estequiometria medidas para os oligonucleotídeos 12-mer por ITC.

Oligonucleotídeo	K _D (μ M)	n
A1_1	39	0,67
A1_2	2	0,45
A1_3	6	-
A1_4	721	0,25
A1_5	71	0,63

4.7 Investigação da separação de fase líquido-líquido sofrida por rPrP⁹⁰⁻²³¹

Baseado nas propriedades de dinâmica de agregação dos complexos rPrP⁹⁰⁻²³¹:DNA em função da estequiometria (especificamente na razão molar 5:1), foi investigado se a separação de fase líquido-líquido contribuía para os efeitos observados. Muitas características de proteínas que sofrem LLPS são, de fato, comuns à PrP: a proteína príon é uma IDP, se liga a NAs e possui domínios de baixa complexidade (SILVA; CORDEIRO, 2016). rPrP⁹⁰⁻²³¹ é capaz de formar interações multivalentes com

NAs e contém resíduos polares específicos intercalados com aminoácidos aromáticos que podem mediar a separação de fases (**Figura 40**).

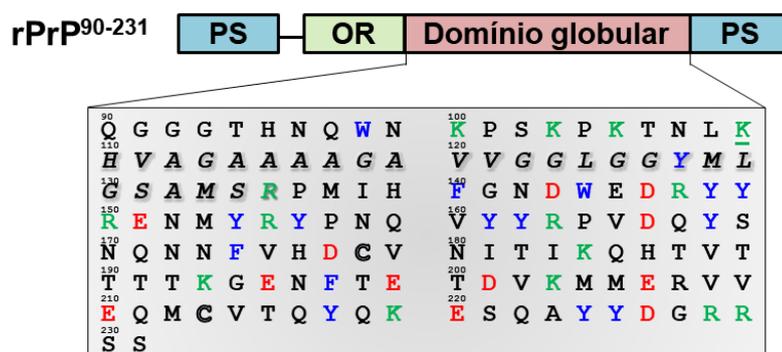


Figura 40. Sequência de rPrP⁹⁰⁻²³¹. A proteína é rica em resíduos positivos (verde), negativos (vermelho) e aromáticos (azul) que podem interagir através de interações cátion- π , π - π , contatos hidrofóbicos e eletrostáticos. A região hidrofóbica (destacada em itálico) é um domínio putativo de dimerização (WARWICKER, 2000) e os dois resíduos Cys178 e Cys213 (destacados em negrito) são conservados. PS, peptídeo sinal; OR, região octapeptídica.

Além disso, rPrP⁹⁰⁻²³¹ exibe outras características típicas de separação de fases, como desordem intrínseca predita (**Figura 41**), forte propensão a sofrer LLPS e regiões alternadas carregadas fracamente (**Figura 42**). Contatos π - π são encontrados em proteínas que separam de fase. O primeiro segmento de PrP⁹⁰⁻²³¹, composto por ~84 resíduos, pode interagir por meio de contatos π - π , selecionados pelo PScore (**Figura 40A**). O algoritmo CatGranule calcula a tendência de formação de grânulos baseado na composição da sequência primária, desordem estrutural e propensão a ligação a ácidos nucleicos, valores maiores que 1 estão associadas a forte capacidade de separar de fase. rPrP⁹⁰⁻²³¹ alcançou um valor de 1,946 usando o algoritmo CatGranule. Além disso, a rPrP⁹⁰⁻²³¹ é um polianfólito fraco, sugerindo transição de fase mediada por interações eletrostáticas (**Figura 40B e C**)

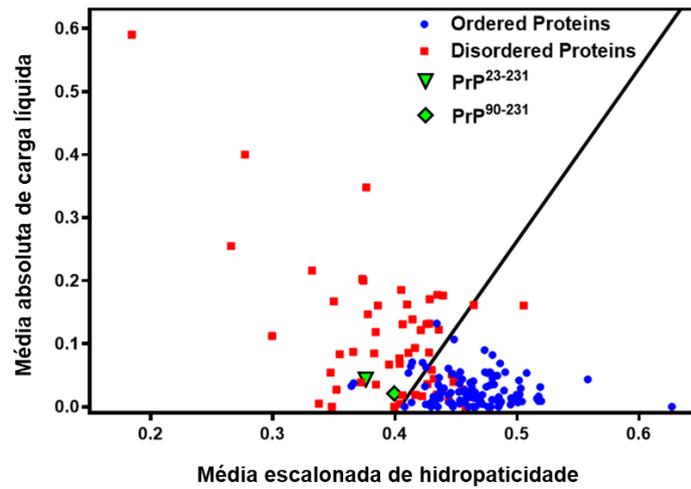


Figura 41. Predição de determinantes moleculares envolvidos na separação de fases de rPrP⁹⁰⁻²³¹ pelo PONDR. Análises de predição baseado na carga-hidropaticidade. O gráfico revela a desordem de PrP inteira e PrP⁹⁰⁻²³¹ (<http://www.pondr.com/>).

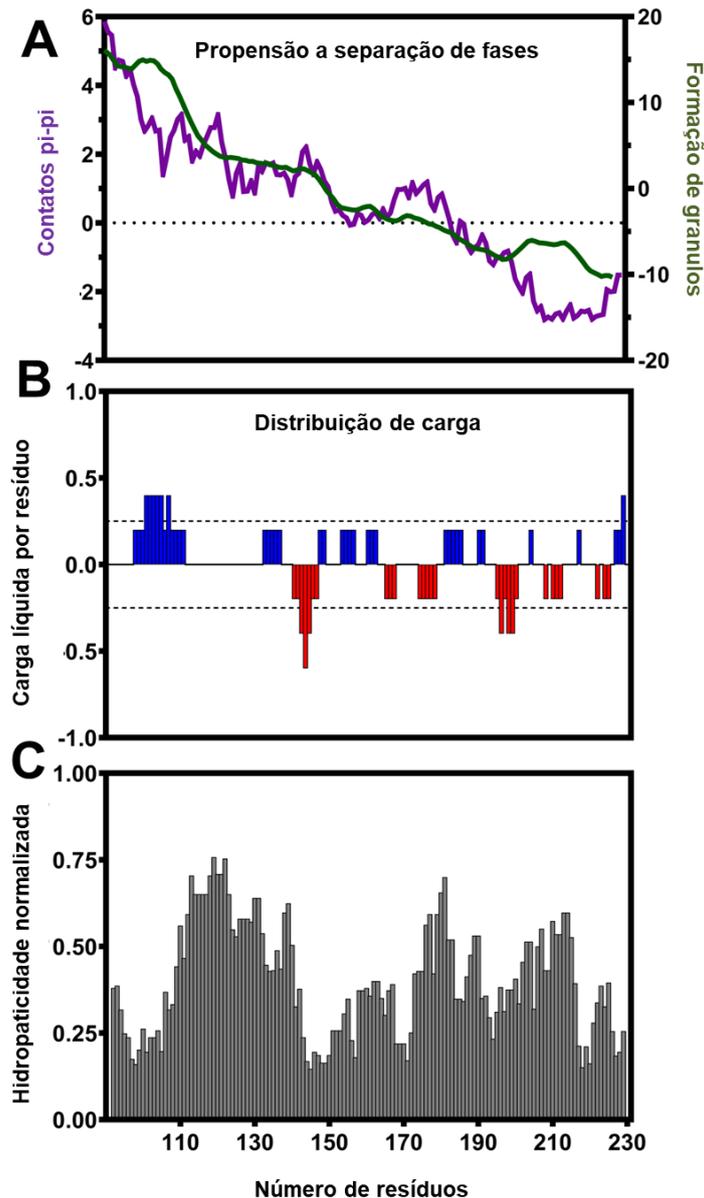


Figura 42. Predição de determinantes moleculares envolvidos na separação de fases de rPrP⁹⁰⁻²³¹ por ferramentas de bioinformática. (A) O primeiro segmento de PrP⁹⁰⁻²³¹, composto por ~84 resíduos, pode interagir por meio de contatos π - π , selecionados pelo PScore. (curva lilás; PScore total significativo ≥ 4). Algoritmo CatGranule (curva verde; score > 0 indica proteínas passíveis de sofrerem LLPS e valores > 1 estão associados a forte capacidade de separar de fase). (B) Segmentos de cargas opostas de rPrP⁹⁰⁻²³¹ evidenciados no gráfico de carga líquida ao longo da sequência primária usando CIDER. (C) Hidropatia ao longo da sequência obtida de uma hidrofobicidade normalizada de *Kyte-Doolittle* variando de 0 (menor hidrofobicidade) a 1 (maior hidrofobicidade) usando CIDER. A proteína príon íntegra (23-231) foi usada como sequência de entrada.

A microscopia de contraste diferencial de interferência (DIC) mostrou que rPrP⁹⁰⁻²³¹ sofre separação de fases *in vitro* em condensados esféricos com diferentes tamanhos em água e tampão (Tris NaCl 10 mM, NaCl 100 mM (pH 7,4)) (**Figura 43**). A separação de fases também ocorreu na presença de 10% de PEG 4000 (p/v), conhecido como agente de *crowding*. Os maiores condensados de rPrP⁹⁰⁻²³¹ chegaram a apresentar ~100 µm de diâmetro (**Figura 43A**). A coalescência em gotículas grandes é favorecida termodinamicamente, uma vez que a tensão superficial da rede é diminuída em relação aos condensados pequenos (maturação de Ostwald) (VOORHEES, 1992). No entanto, o número de gotículas foi significativamente diminuído na presença de tampão e na presença de PEG em comparação com a proteína em água, sugerindo dependência da força iônica na separação de fases (**Figura 43A**). Foram observados eventos de fusão e fissão que são característicos de proteínas que formam condensados líquidos com a rPrP⁹⁰⁻²³¹ supersaturada (**Figura 43B**). Além disso, a incubação de rPrP⁹⁰⁻²³¹ com 1,6-hexanediol a 10 % (v/v), um álcool alifático conhecido por romper contatos hidrofóbicos fracos envolvidos em LLPS, aboliu completamente a formação dos condensados esféricos, confirmando a propensão de rPrP⁹⁰⁻²³¹ a separar de fase (**Figura 43B**).

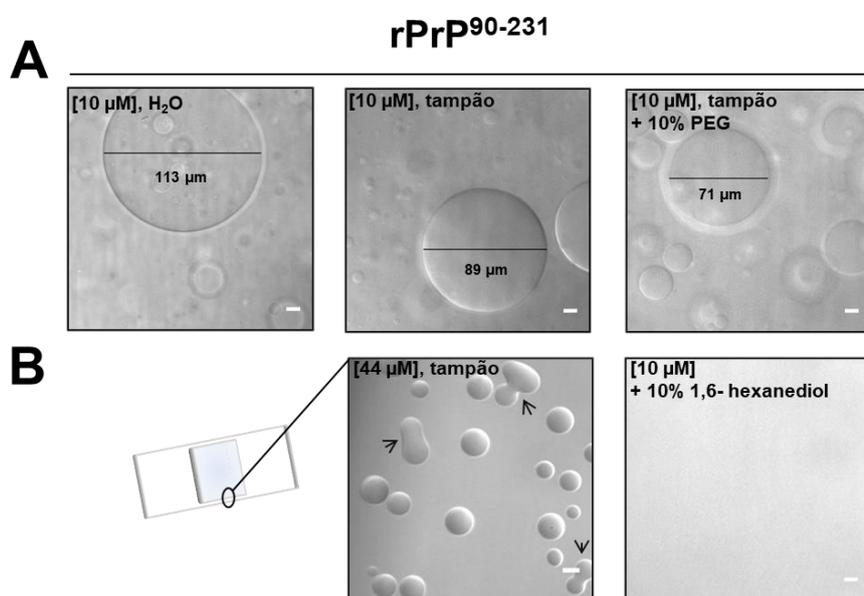


Figura 43. Separação de fases de rPrP⁹⁰⁻²³¹ *in vitro*. (A) Separação de fases de rPrP⁹⁰⁻²³¹ em gotículas com tamanhos variados em baixa concentração (10 µM). Coalescência em gotículas grandes ocorre em água (esquerda), solução tampão [Tris 10 mM, NaCl 100 mM (pH 7,4)] (meio) e após a adição de PEG 4000 10% (p/v) (direita). O diâmetro é representado pelas linhas pretas. (B) No limite líquido-ar do vidro ocorre a supersaturação da proteína na medida em que a exposição ao

laser causa a evaporação. Nessa área, os condensados esféricos ricos em rPrP⁹⁰⁻²³¹ rapidamente se fundem uns com os outros. O álcool alifático 1,6-hexanodiol em baixa concentração (10 %) foi capaz de desfazer as gotículas, uma vez que interações hidrofóbicas fracas são perturbadas.

Os condensados esféricos de rPrP⁹⁰⁻²³¹ em água, tampão e PEG 4000 10 % foram quantificados, assim como as medidas dos diâmetros das gotículas, através das micrografias e estão apresentados na **Figura 42B**. A fim de compreender a estrutura de rPrP⁹⁰⁻²³¹ no estado separado de fase, foi utilizado *SYPRO Orange*, um corante que só exibe fluorescência quando ligado a superfícies hidrofóbicas expostas ao solvente. Após 10 min de incubação, a co-partição de *SYPRO* dentro das gotículas de rPrP⁹⁰⁻²³¹ conduziu a uma discreta fluorescência (**Figura 44C**) e, após 60 min de incubação, um aumento acentuado da fluorescência foi observado (**Figura 44D**). Isso pode ser explicado pelo aumento da viscosidade das gotículas resultando em aumento da fluorescência e/ou o tempo maior de incubação poderia evoluir para um estado mais desenovelado, com sítios mais expostos para a ligação com *SYPRO*. No entanto, a fluorescência dos condensados de rPrP⁹⁰⁻²³¹ sugere a desestruturação parcial da proteína no estado separado de fase. Curiosamente, esses grandes condensados abrigam pequenas gotículas no seu interior, lembrando corpos multi-vesiculares (WEGMANN et al., 2018). Tais condensados vacuolizados de diferentes densidades são formados em resposta a perturbações do sistema (SCHMIDT; ROHATGI, 2016).

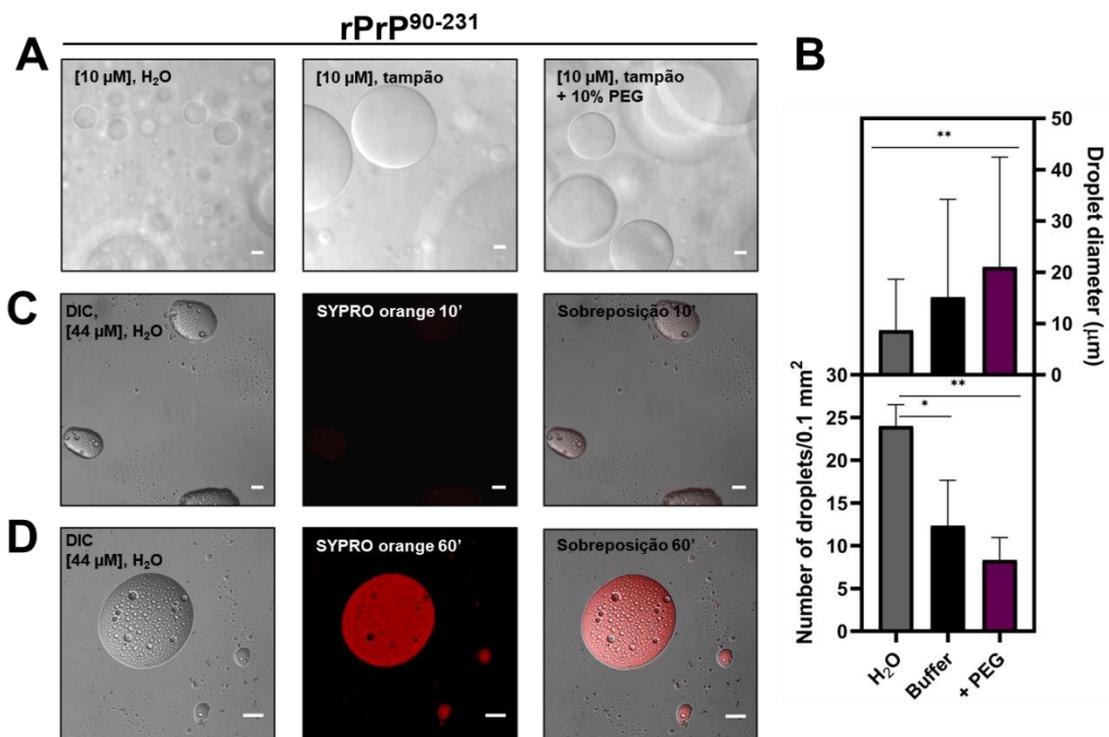


Figura 44. rPrP⁹⁰⁻²³¹ sofre separação de fases líquido- líquido *in vitro*. Imagens representativas de microscopia DIC de (A) 10 μM rPrP⁹⁰⁻²³¹ em água (cima a esquerda) 10 μM rPrP⁹⁰⁻²³¹ em Tris 10 mM (pH 7,4), NaCl 100 mM (superior no meio) e 10 μM rPrP⁹⁰⁻²³¹ em tampão após a adição de PEG 4000 10% (p/v) (superior a direita). O sombreamento retrata gotículas flutuantes em outros planos focais. (B) Quantificação das gotículas de rPrP⁹⁰⁻²³¹ através das análises das micrografias. 10 μM de rPrP⁹⁰⁻²³¹ em água (coluna cinza), em tampão (coluna preta) e em tampão contendo PEG 4000 10% (p/v) (coluna roxa). Medidas dos diâmetros das gotículas (superior). Os dados são representados como a média ± DP (n=50 gotículas). Quantificação do número de gotículas de rPrP⁹⁰⁻²³¹ por 100 μm² de área (inferior). Os dados são representados como a média ± DP (n=3 imagens). **p* < 0,05, ***p* < 0,005. (C) e (D) 44 μM de rPrP⁹⁰⁻²³¹ fluorescente corado com SYPRO orange por 10 min (C) e por 60 min (D) antes da geração das imagens. Barra de escala, 10 μm.

4.8 Modulação da separação de fase líquido-líquido de rPrP⁹⁰⁻²³¹ pelos aptâmeros

Para verificar se os oligonucleotídeos (25-mer) estudados influenciavam a separação de fases de rPrP⁹⁰⁻²³¹, foram realizados ensaios de transição de fase na presença dos aptâmeros. A adição de A1 ou A2 à rPrP⁹⁰⁻²³¹ resultou na diminuição do diâmetro das gotículas (15,12 ± 19,10 *versus* 3,93 ± 1,43 para A1 e 7,20 ± 3,30 para A2, a 5:1 rPrP⁹⁰⁻²³¹:aptâmeros) e no aumento do número de condensados de maneira dependente da concentração (Figura 45). Na estequiometria 5:1 PrP:aptâmero, o

número de gotículas/0,1 mm² foi de 98,33 ± 9,46 para A1 e 73,66 ± 14,97 para A2, respectivamente, contra 12,33 ± 5,31 para rPrP⁹⁰⁻²³¹ em tampão na ausência de aptâmeros. As gotículas líquidas de rPrP⁹⁰⁻²³¹ foram mais abundantes em proporções molares menores de rPrP⁹⁰⁻²³¹:A1 ou A2 (**Figura 45D**). Já foi mostrado anteriormente que a LLPS é altamente dependente da relação molar proteína:NA; razões mais baixas de ácidos nucleicos específicos promovem a separação de fases (MAHARANA et al., 2018). Assim, os resultados apresentados estão de acordo com outras proteínas de ligação a RNA que sofrem LLPS.

Em seguida, investigamos o efeito de A1_mut na transição de fase de rPrP⁹⁰⁻²³¹. Apenas uma única gotícula foi observada em toda a cobertura da lâmina de vidro (**Figura 45C**), indicando que este DNA regula negativamente a formação de condensados. A diminuição da concentração de A1_mut pela metade (razão molar de 2:1 rPrP⁹⁰⁻²³¹:DNA), resultou em algumas estruturas alongadas irregulares consistentes com um estado menos dinâmico, semelhante a gel (**Figura 45C**, setas pretas). Estes condensados permaneceram depositados na lâmina de vidro, indicando uma viscosidade mais alta, em oposto aos condensados de A1 ou A2:rPrP⁹⁰⁻²³¹, que se encontravam em um estado mais fluido e dinâmico. Essa morfologia anormal foi associada a um estado físico diferente que evoluiu para agregados sólidos ao longo do tempo, sofrendo transição de fase líquido-sólido (LIN et al., 2015). Estruturas semelhantes aos agregados foram visualizadas na estequiometria 5:1 rPrP⁹⁰⁻²³¹:A1_mut. Os DNAs isolados ou uma proteína não relacionada, como a BSA, não sofreram separação de fases nas mesmas condições usadas para rPrP⁹⁰⁻²³¹ (**Figura 46**).

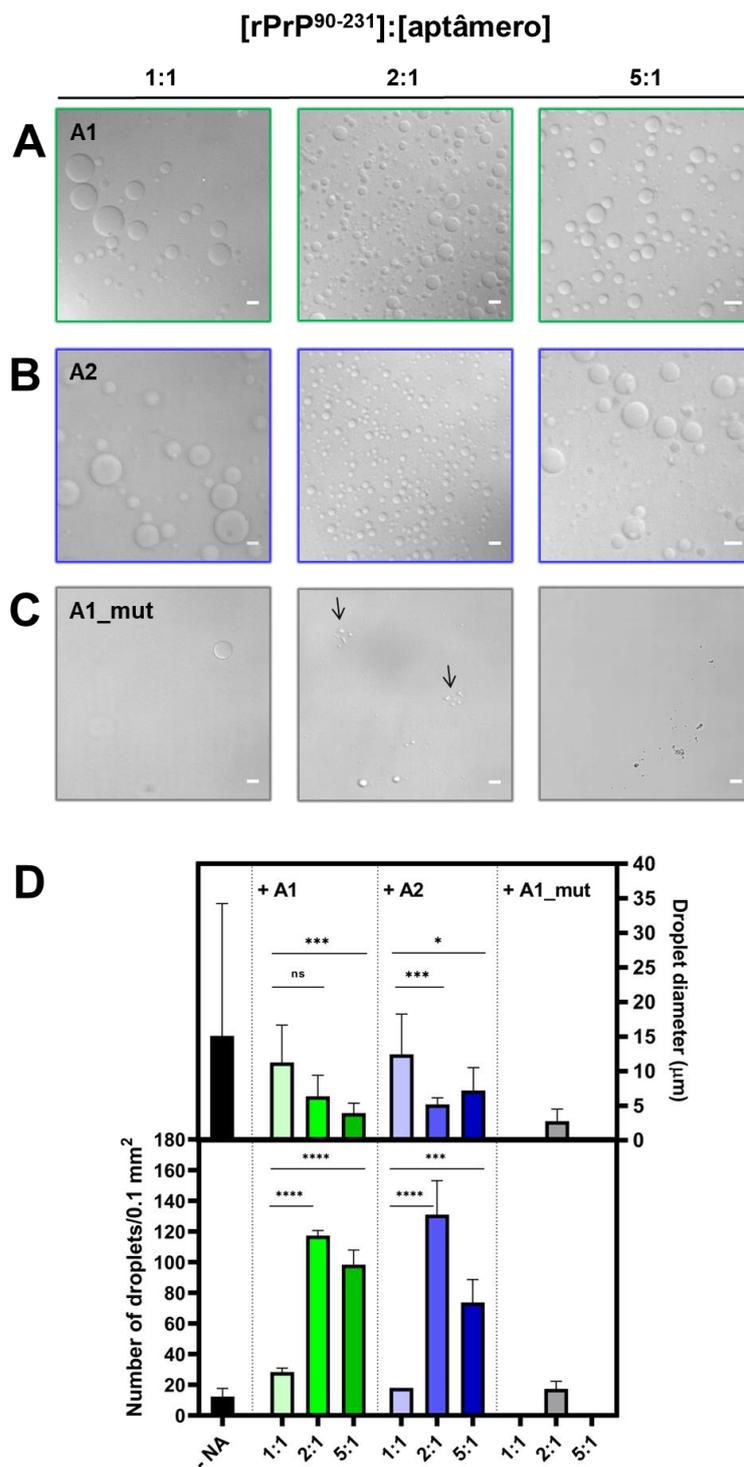


Figura 45. Aptâmeros modulam a separação de fases de rPrP⁹⁰⁻²³¹. Micrografias de DIC representativas de rPrP⁹⁰⁻²³¹:aptâmeros após 10 minutos de incubação a razão molar de 1:1, 2:1 e 5:1, respectivamente, em Tris 10 mM (pH 7,4), NaCl 100 mM, (A) na presença de A1, (B) na presença de A2 e (C) na presença de A1_mut. (D) Os condensados compostos por rPrP⁹⁰⁻²³¹ foram quantificados pelas imagens analisadas de DIC. 10 µM de rPrP⁹⁰⁻²³¹ em tampão sem ácidos nucleicos (preto), 10 µM de rPrP⁹⁰⁻²³¹ com a adição de concentrações crescentes de A1 (verde) ou A2 (azul) ou A1_mut (cinza). Medidas dos diâmetros das gotículas (superior). Os dados estão representados como

a média \pm DP (n=50 gotículas). Quantificação do número de gotículas de rPrP⁹⁰⁻²³¹ por 100 μm^2 de área (inferior). Os dados estão representados como a média \pm DP (n=3 imagens). Análises no One-way ANOVA/Bonferroni mostraram resultados significantes após a incubação de rPrP⁹⁰⁻²³¹ com os aptâmeros. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Barra de escala, 10 μm .

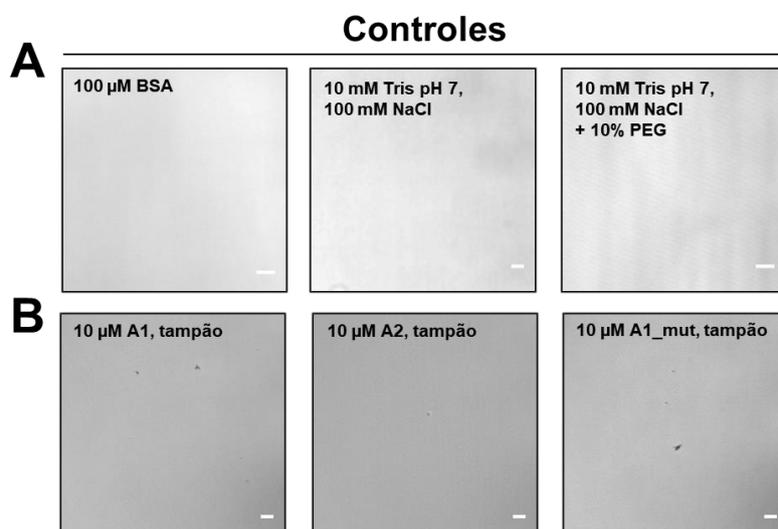


Figura 46. Microscopia DIC dos controles usados nos ensaios de LLPS de rPrP⁹⁰⁻²³¹. (A) Albumina bovina sérica (BSA), mesmo em altas concentrações, não apresenta propriedades semelhantes a líquidos (esquerda). Controle da solução tampão utilizada (meio). Tampão na presença de agente de *crowding* PEG-4000 10% (direita). (B) Micrografias da maior concentração de aptâmeros (10 μM) utilizados nos ensaios. A1 (esquerda), A2 (meio) e A1_mut (direita). Ampliação, 630 \times . Barra de escala, 10 μm .

4.9 Os condensados envelhecidos de rPrP:A1_mut evoluem para agregados fibrilares

Já é bem estabelecido que as gotículas líquidas envelhecidas podem amadurecer para agregados fibrilares *in vitro* (PATEL et al., 2015). Assim, foi verificado se os condensados líquidos de rPrP⁹⁰⁻²³¹ transitam para um material sólido ao longo do tempo. No período de 20 min, foram observados minúsculos pontos brilhantes na superfície das gotículas de rPrP⁹⁰⁻²³¹ em Tris 10 mM (pH 7,4), NaCl 100 mM. Após 60 min, "subestruturas" filamentosas foram evidenciadas na superfície de grandes condensados de rPrP⁹⁰⁻²³¹ em água (**Figura 47A**), portanto, as propriedades biofísicas das gotículas

podem mudar com o tempo. Após 6 horas, os condensados assumiram características de gotículas “envelhecidas”, tais como a aparência escura refratária e a presença de agregados se projetando para fora do condensado (**Figura 47B**). A transição dos condensados líquidos de rPrP⁹⁰⁻²³¹ para agregados foi monitorada em tempo real. Consistentemente, as gotículas envelhecidas se deformam em estruturas sólidas organizadas semelhantes a fibrilas.

Foi demonstrado que uma mistura de DNA pode induzir o desenovelamento e agregação de rPrP¹²¹⁻²³¹ em fibras semelhantes a amiloides (NANDI et al., 2002). Para determinar se A1_mut, que não é estruturado de acordo com os dados biofísicos mostrados, promove a formação de fibras com características amiloides, exploramos a fluorescência intrínseca dos amiloides. Esta abordagem permite a visualização de estruturas amiloides por excitação no UV em um ambiente livre de corantes e sem interferência da ligação extracelular de marcadores (BANERJEE et al., 2017). Após 60 minutos da adição de A1_mut à rPrP⁹⁰⁻²³¹ (razão molar 1:1), as estruturas amiloides colocalizaram com as gotículas envelhecidas (**Figura 48A**). Além disso, em intervalos de tempo mais longos (24 horas) os condensados desapareceram, deixando apenas estruturas semelhantes a fibrilas amiloides (**Figura 48B e C**). Provavelmente, a rPrP⁹⁰⁻²³¹ na ausência de NAs forma principalmente agregados não amiloides ao longo do tempo, uma vez que não foi detectada fluorescência intrínseca sugestiva de formação amiloide (**Figura 47B**). Por outro lado, identificamos gotículas alongadas semelhantes a gel na razão molar 5:1 rPrP⁹⁰⁻²³¹: A1_mut em 10 min de incubação (**Figura 47C**, apontada por setas pretas) que amadureceram para fibrilas do tipo amiloide após 1 h. Adicionalmente, a fluorescência intrínseca de estruturas semelhantes a fibrilas amiloides colocalizaram com a coloração por *SYPRO orange*, confirmando a natureza proteica destas estruturas (**Figura 49A**).

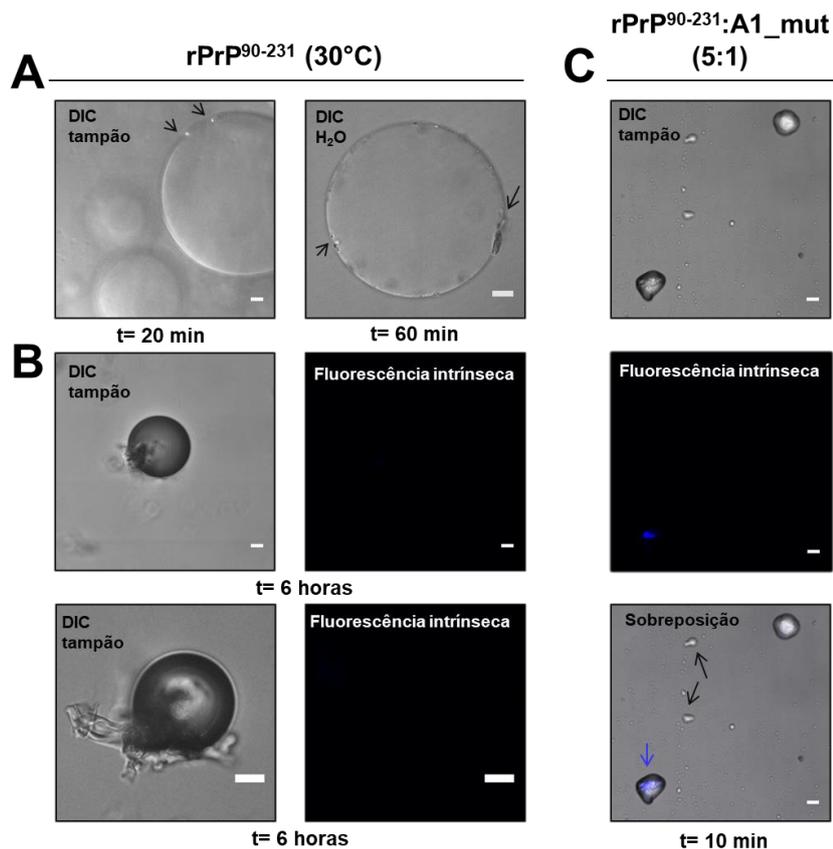


Figura 47. rPrP⁹⁰⁻²³¹ na presença de A1_mut mostra separação de fase anômala. Imagens representativas de DIC e fluorescência intrínseca sugestiva de formação amilóide (excitação a 405 nm; emissão a 450-500 nm). (A) Micrografias de 10 μ M de rPrP⁹⁰⁻²³¹ em Tris 10 mM (pH 7,4), NaCl 100 mM (esquerda) ou em água (direita) incubados a 30°C por intervalos de tempo especificados, evidenciando um material semelhante a fibra que se projeta da superfície do condensado (setas pretas). (B) A mesma amostra obtida após 6 horas não apresentou fluorescência intrínseca. Duas imagens representativas demonstram estruturas retráteis escuras com superfície irregular semelhante a gotículas envelhecidas. (C) rPrP⁹⁰⁻²³¹ na presença de A1_mut (razão molar 5:1) em Tris 10 mM (pH 7,4), NaCl 100 mM. Após 10 min de incubação a 30°C, condensados não esféricos foram detectados. Setas pretas indicam gotículas que não se fundiram completamente. A fluorescência intrínseca de gotículas envelhecidas é marcada por uma seta azul. Barra de escala, 10 μ m.

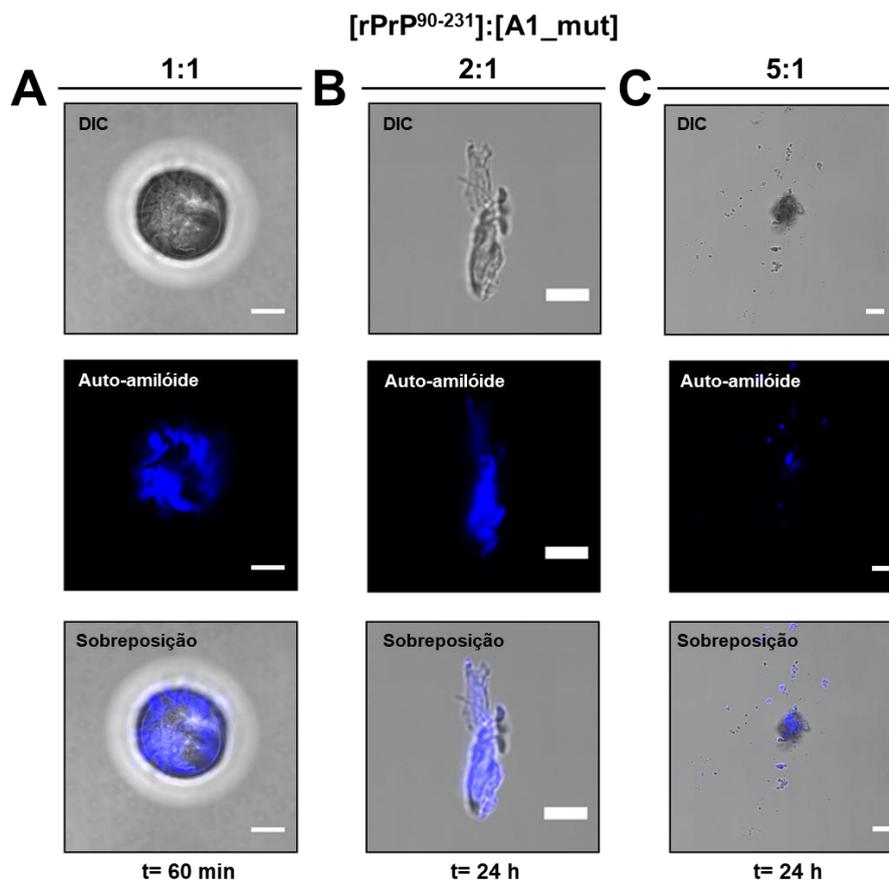


Figura 48. A1_mut promove a transição de condensados líquidos de rPrP⁹⁰⁻²³¹ para espécies auto-fluorescentes sugestivas de amiloides. Micrografias representativas de DIC e fluorescência de rPrP⁹⁰⁻²³¹:A1_mut a 1:1, 2:1 and 5:1, respectivamente, em Tris 10 mM (pH 7,4), NaCl 100 mM. Coluna da esquerda: estequiometria de 1:1, 1 h após a incubação com A1_mut; meio: 2:1 rPrP⁹⁰⁻²³¹:A1_mut, 24 h após a incubação; Coluna da direita: 5:1 rPrP⁹⁰⁻²³¹:A1_mut, 24 h após a incubação. Barra de escala, 10 μ m

Como controle positivo para as espécies auto-fluorescentes, foram usadas fibras de α -sinucleína (**Figura 49B**). A separação de fases de proteínas ligantes de NAs tem sido demonstrada como dependente de contatos específicos entre NAs de alta afinidade que geralmente contêm estrutura secundária complexa (CHAN et al., 2013; MAHARANA et al., 2018). Relevantemente, A1 e A2 mantiveram os condensados de rPrP⁹⁰⁻²³¹ em um estado dinâmico, impedindo a transição para estruturas semelhantes a sólidos no período de tempo examinado. Consistente com os dados de ITC, a ligação de baixa afinidade de A1_mut provocou a transição de gotículas líquidas para espécies amiloides com menor energia que mimetizam agregados sólidos patológicos. Em

conjunto, esses dados indicam que a separação de fases de rPrP⁹⁰⁻²³¹ é modulada pela ligação específica do aptâmero e depende de sua arquitetura estrutural.

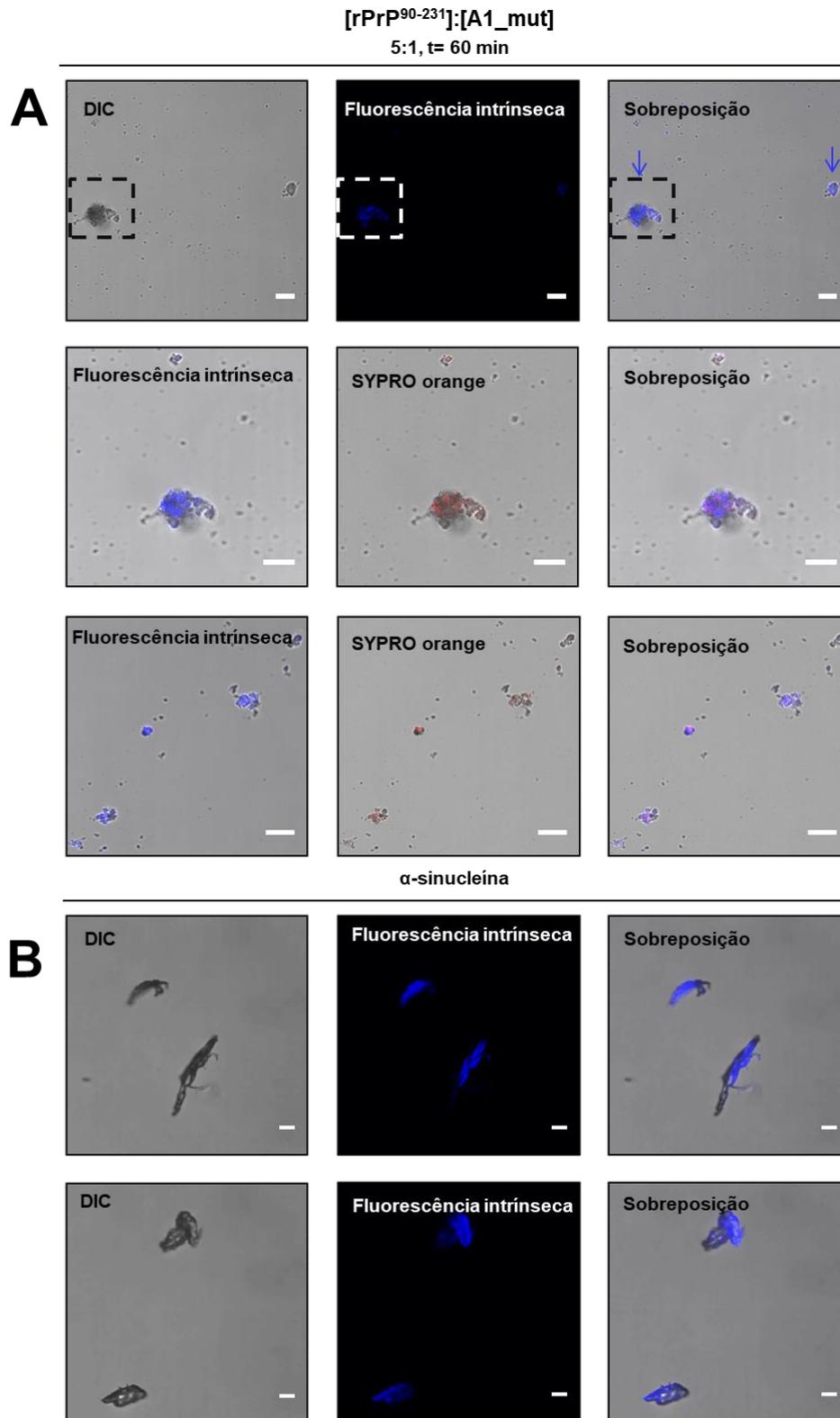


Figura 49. rPrP⁹⁰⁻²³¹ incubada com A1_mut forma agregados que ligam a SYPRO Orange e exibem auto-fluorescência típica de proteínas amiloidogênicas. Imagens representativas de DIC,

coradas com *SYPRO orange* (488 nm excitação; 500-650 nm emissão) e fluorescência intrínseca sugestiva de amiloides (excitação a 405 nm; emissão a 450-500 nm). **(A)** A adição de A1_mut a rPrF⁹⁰⁻²³¹ (razão molar 1:5) em Tris 10 mM (pH 7,4), NaCl 100 mM incubados por 60 min a temperatura ambiente. Superior: Apenas agregados do tipo sólido com fluorescência intrínseca sugestiva de estruturas amiloides foram observados (setas azuis). Meio: Ampliação do quadrado superior tracejado. O agregado corado com *SYPRO orange* também exibe fluorescência intrínseca de amiloide. Inferior: Outra região microscópica que mostra um número significativo de agregados corados com *SYPRO Orange* que possuem autofluorescência sugestiva de proteínas amiloidogênicas. **(B)** Controle positivo de autofluorescência usando agregados fibrilares de α -sinucleína preparados conforme descrito em (OLIVEIRA et al., 2016).

5. Discussão

Trabalhos pioneiros mostraram que organelas livres de membrana (MLOs) se formam por meio de separação de fase líquido-líquido (LANGDON et al., 2018). Estas organelas estão relacionadas a proteínas intrinsecamente desordenadas que, por sua vez, estão associadas à patogênese de doenças degenerativas (NOTT et al., 2015). Há evidências crescentes de que a transição de fase mal regulada pode levar a espécies à agregação (ELBAUM-GARFINKLE, 2019; MURAKAMI et al., 2015; PATEL et al., 2015). A proteína prion possui a maioria das características físico-químicas que podem conduzir a separação de fase líquido-líquido, interagem com NAs (SILVA; CORDEIRO, 2016), são esferas, fundem-se, deformam-se sob tensão de cisalhamento e reorganizam seu conteúdo em segundos (PATEL et al., 2015). A proteína Tau, que também sofre LLPS, forma agregados na superfície das gotículas devido às propriedades físicas da interface dos condensados que alteram suas propriedades moleculares, o que aumenta a propensão à agregação. Essa ideia é apoiada pela observação de que soluções concentradas de Tau (50 μM) sofrem LLPS e a supersaturação intracelular de Tau, incluindo outras proteínas, está associada a agregação e doenças neurodegenerativas (WEGMANN et al., 2018). O mesmo ocorre com a rPrP⁹⁰⁻²³¹ que sofre separação de fases em altas concentrações (44 μM). Além disso, os grânulos de ribonucleoproteínas induzidos por PrP abrigam características das MLOs (MOLLIEX et al., 2015), apontando para uma investigação essencial das propriedades de transição de fase de PrP. Os NAs podem desencadear mudanças conformacionais na PrP e induzir a agregação de proteínas de modo dependente da estrutura, tamanho e sequência do NA (CORDEIRO et al., 2001; MACEDO et al., 2012). Ademais, os efeitos observados na agregação de PrP dependem da estequiometria do complexo PrP:NA (CORDEIRO et al., 2001). A rPrP⁹⁰⁻²³¹ contém um grupo de lisinas que pode interagir com os ácidos nucleicos que, quando neutralizados, resultam na formação de agregados do tipo PrP^{Sc} (GROVEMAN et al., 2014). Assim, é possível que a ligação a cofatores polianiônicos, como ácidos nucleicos, leve à neutralização do grupo de lisinas e, assim, promova a formação de PrP *scrapie* (GROVEMAN et al., 2014).

A presença da PrP no citoplasma das células, incluindo os neurônios, foi demonstrada e, embora o papel biológico exato da interação de PrP com NAs não seja totalmente conhecido, é possível que a conversão estrutural de PrP^C em PrP^{Sc} possa ser catalisada por NAs citoplasmáticos, que podem desempenhar um papel nas doenças priônicas (BERA; NANDI, 2014). De acordo com o que observado para a proteína prion, outras proteínas relacionadas a doenças degenerativas sofrem LLPS induzidas por ligação a ácidos nucleicos de modo dependente da estequiometria (MAHARANA et al., 2018; TUROVEROV et al., 2019). Alta razão proteína:NA, análoga ao ambiente do citosol, induz maior efeito de LLPS, enquanto que a baixas razões de proteína:NA, como no ambiente nuclear, mantêm proteínas em um estado solúvel dinâmico (MAHARANA et al., 2018). Um trabalho recente descreveu LLPS de PrP^C em tampão fisiológico e a adição de oligômeros β -amiloide (oligômeros do peptídeo A β) resultou na formação de hidrogel contendo oligômeros β -amiloide e PrP^C (KOSTYLEV et al., 2018). Com base nesta observação e em trabalhos anteriores mostrando agregação de PrP induzida por ácidos nucleicos, hipotetizamos que NAs podem modular o processo de oligomerização, nucleando conjuntos de maior ordem resultando em condensados biomoleculares.

Mudanças conformacionais no domínio C-terminal, especialmente em sua transição para folha- β , podem expor motivos estruturais ou sequenciais que são capazes de ligar a aptâmeros através de interações mais específicas do que aquelas estabelecidas com a região N-terminal (MACEDO; CORDEIRO, 2017). Neste trabalho experimental de tese, foi investigada a interação de duas sequências de DNA aptaméricas de 25 nucleotídeos (A1 e A2) identificadas por SELEX, e foi usada uma sequência de A1 modificada (A1_mut) para inferir se a estrutura do NA seria relevante para a ligação e desencadeamento de mudanças conformacionais em rPrP. Os parâmetros termodinâmicos da interação PrP:aptâmero foram obtidos por ITC, revelando a interação de alta afinidade de rPrP com A1 e A2. Tanto A1 como A2 induziram o desenovelamento parcial de rPrP⁹⁰⁻²³¹, como observado por CD. Trabalhos anteriores mostram que um aptâmero de RNA com uma estrutura em quadruplex se liga com alta afinidade a PrP bovina e inibe a propagação de doenças priônicas (MASHIMA et al., 2009, 2013). Com base nos dados de CD, que indicaram o desenovelamento da proteína e o fato de que a incubação com os aptâmeros leva a turbidez reversível ao invés da precipitação de proteína, avaliamos se rPrP⁹⁰⁻²³¹ poderia sofrer LLPS e a capacidade dos

aptâmeros na modulação desse efeito. rPrP⁹⁰⁻²³¹ separa de fase sozinha em solução aquosa e a adição de aptâmero induz a formação de condensados líquidos menores e mais abundantes. Por outro lado, a incubação de rPrP⁹⁰⁻²³¹ com o aptâmero mutado que não adota uma estrutura em *hairpin*, A1_mut, não revelou a mesma extensão de LLPS que foi vista para A1 e A2. Foi relatado que ácidos nucleicos específicos contendo estrutura secundária podem nuclear a formação de condensados biomoleculares (CHAN et al., 2013), mesmo em alta concentração de NA (MAHARANA et al., 2018). Em contraste aos NAs altamente estruturados, A1_mut pode não fornecer um suporte para rPrP⁹⁰⁻²³¹ sofrer LLPS. De fato, rPrP:A1_mut na proporção molar de 5:1 se organizou em agregados sólidos com fluorescência intrínseca característica de amiloides. Isso corrobora com os dados de CD que não mostraram perda significativa de conteúdo α -helicoidal na presença de A1_mut, uma mudança conformacional aparentemente relevante para a separação de fases eficiente. Sugerimos que A1_mut interage de maneira não específica com rPrP⁹⁰⁻²³¹, levando a uma transição de fase para agregados amiloides.

PrP é encontrada principalmente na superfície da célula, covalentemente ligada à membrana através de uma âncora de GPI (PRUSINER, 1998). Assim, é discutível como e em qual compartimento biológico PrP^C interagiria com os ácidos nucleicos e sofreria LLPS. A infecção por PrP^{Sc} geralmente é iniciada em órgãos periféricos, mas os mecanismos envolvidos na sua propagação para o cérebro não são claros. Fevrier e colaboradores mostraram que tanto a PrP^C quanto a PrP^{Sc} foram ativamente liberadas no ambiente extracelular antes e depois da infecção com prions de ovelhas. PrP^C e PrP^{Sc} no meio foram associadas a exossomos, vesículas membranosas que são secretas após a fusão de endossomos com a membrana plasmática. Esses dados sugeriram que os exossomos podem contribuir para a troca de membrana intercelular e a propagação de prion por todo o organismo. Além disso, outras proteínas ancoradas a GPI já demonstraram ser incorporadas a exossomos, o que é consistente com a associação descrita (FEVRIER et al., 2004; GASSART et al., 2003). Outra provável associação de PrP a NAs são através de ácidos nucleicos circulantes no soro sanguíneo que podem estar ligados a atividades relacionadas ao estresse em todo o corpo, incluindo a morte neuronal associada a TSEs (ALAIS et al., 2008; GORDON et al., 2009).

Aglomerados de proteínas do tamanho de micrômetros podem ocorrer nas membranas e têm sido associados à atividade sináptica (BANJADE; ROSEN, 2014; ZHANG et al., 2017), abordando um possível papel da separação de fases de PrP^C na formação de centros de sinalização na membrana plasmática. No entanto, como descrito anteriormente, a PrP^C não é encontrada apenas na membrana extracelular. Há relatos de PrP em locais alternativos, incluindo o citosol (MA; LINDQUIST, 2002; ZENG et al., 2016). Para as proteínas ancoradas a GPI, está bem estabelecido que estas circulam ao longo da via secretória, sendo translocadas para o RE após a síntese e transportadas para o aparelho de Golgi antes de serem direcionadas para a membrana plasmática (MA; LINDQUIST, 2002). Em condições específicas, PrP também foi encontrada no núcleo (MANGÉ et al., 2004; MIRONOV et al., 2003), destacando a possibilidade de um encontro de PrP:NA. Além disso, a formação de partículas ribonucleoproteicas induzidas por uma forma citosólica de PrP foi descrita (ZANUSSO et al., 1999). Esses grânulos de ribonucleoproteínas induzidos por PrP abrigam as características das organelas livres de membranas intracelulares (MOLLIEX et al., 2015), apoiando a ideia de que PrP pode sofrer LLPS *in vivo* e sua desregulação pode evoluir para estados patogênicos. A transição de fase conduzida pelos aptâmeros foi dependente da estequiometria, uma característica das proteínas que sofrem LLPS, como FUS e TDP-43 (MAHARANA et al., 2018). Por conseguinte, a localização padronizada dos ácidos nucleicos no interior do meio celular pode proporcionar uma regulação espaço-temporal da separação de fases da PrP.

O envelhecimento associado à doença pode levar a perda da eficiência no trânsito núcleo-citosol, aumentando o tempo de residência da proteína no citosol, cuja relação NA:proteína é baixa. Assim, a separação de fases é promovida e este estado altamente dinâmico pode constituir um evento primário para a maturação em agregados sob estresse, similar à separação de TDP-43 (BEAUDOIN et al., 2009). Da mesma forma, pesquisas promissoras sobre estabilização de PrP^C com uma pequena molécula que mostrou baixa afinidade na faixa de micromolar (BIASINI, 2019) sugerem que os aptâmeros de alta afinidade aqui descritos competiriam com os desencadeadores de estresse. O presente trabalho sobre a modulação de aptâmeros na separação de fases rPrP⁹⁰⁻²³¹ também fornece novas informações sobre o desenvolvimento de terapias anti-agregação.

6. Conclusões

- A interação de rPrP com alta afinidade e especificidade aos aptâmeros A1 e A2 foi confirmada por ITC. A titulação de A1 em rPrP²³⁻²³¹ e rPrP⁹⁰⁻²³¹ revelou constantes de dissociação (K_d) de 838 e 232 nM. Para A2, a interação com rPrP²³⁻²³¹ gerou um K_d de 1,47 μ M, enquanto a interação com rPrP⁹⁰⁻²³¹ gerou um K_d de 1,93 μ M.

- rPrP⁹⁰⁻²³¹ foi capaz de se ligar a A1 na presença de NaCl 500 mM, desfazendo as ligações apenas com NaCl a 800 mM. A ligação de rPrP⁹⁰⁻²³¹ com A2, nas mesmas condições, não foi mantida, sugerindo uma diferença no mecanismo de reconhecimento dos aptâmeros rPrP⁹⁰⁻²³¹.

- A caracterização das estruturas dos aptâmeros foi realizada por predições teóricas, CD, RMN e SAXS, revelando que A1 adota uma estrutura em *hairpin*, enquanto A2 não apresenta uma estrutura definida em solução.

- A estrutura do DNA mutante de A1 (A1_mut), foi caracterizada e se mostrou semelhante ao aptâmero A2 que não possui uma estrutura mais estendida comparada ao A1. Porém não foi possível avaliar a interação rPrP⁹⁰⁻²³¹:A1_mut por ITC provavelmente devido a menor afinidade das espécies.

- A região mínima de A1 que se liga com maior afinidade a rPrP⁹⁰⁻²³¹ foi investigada por ITC, mostrando que A1_4 contendo 12 nucleotídeos é a região de maior afinidade. Curiosamente, essa mesma sequência foi encontrada em mRNAs de vários genes do contexto neuronal.

- Espectros de CD mostraram que a ligação ao aptâmero provocou o desenovelamento parcial de rPrP⁹⁰⁻²³¹ resultando em uma agregação dinâmica, altamente dependente da razão molar proteína:DNA.

- A capacidade de rPrP⁹⁰⁻²³¹ de sofrer separação de fase líquido-líquido (LLPS) sozinha e na presença dos aptâmeros foi avaliada por DIC. Foi observado que a proteína livre se separou em gotículas grandes, enquanto que a ligação aos aptâmeros aumentou a quantidade das gotículas mas reduziu o tamanho dos condensados. Além disso, foi observado que A1_mut, que não forma uma estrutura em *hairpin*, induziu a transição para um estado menos fluido, sugerindo a formação de estruturas sugestivas de amiloide

na superfície das gotículas. Essa transição de estado líquido para sólido é uma característica de outros IDPs envolvidas em doenças neurodegenerativas.

- A interação PrP:NA leva a LLPS e a modulação desse efeito dependendo da estrutura de NA e da estequiometria de ligação, destacando o papel dos NAs no enovelamento da PrP e nas abordagens diagnósticas e terapêuticas para TSEs.

6. Referências bibliográficas

- ADLER, V. et al. Small, highly structured RNAs participate in the conversion of human recombinant PrP^{Sc} to PrP^{Res} in vitro. **Journal of Molecular Biology**, v. 332, n. 1, p. 47–57, 2003.
- AFROZ, T. et al. Functional and dynamic polymerization of the ALS-linked protein TDP-43 antagonizes its pathologic aggregation. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 1–14, 2017.
- AGUZZI, A. et al. Interventional strategies against prion diseases. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, n. 10, p. 745–749, 2001.
- AGUZZI, A.; LAKKARAJU, A. K. K. Cell Biology of Prions and Prionoids: A Status Report. **Trends in Cell Biology**, v. 26, n. 1, p. 40–51, 2016.
- ALAIS, S. et al. Mouse neuroblastoma cells release prion infectivity associated with exosomal vesicles. **Biology of the Cell**, v. 100, n. 10, p. 603–618, 2008.
- ALBERTI, S. et al. A Systematic Survey Identifies Prions and Illuminates Sequence Features of Prionogenic Proteins. **Cell**, v. 137, n. 1, p. 146–158, abr. 2009.
- ALBERTI, S.; GLADFELTER, A.; MITTAG, T. Primer Considerations and Challenges in Studying Liquid-Liquid Phase Separation and Biomolecular Condensates. **Cell**, v. 176, n. 3, p. 419–434, 2019.
- ALLEC, N. et al. Small-angle X-ray scattering method to characterize molecular interactions: Proof of concept. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1–12, 2015.
- ALPER, T. et al. Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? **Nature**, v. 214, p. 764–66, 1967.
- ATARASHI, R. et al. Ultrasensitive human prion detection in cerebrospinal fluid by real-time quaking-induced conversion. **Nature Medicine**, v. 17, n. 2, p. 175–178, 2011.
- AULIĆ, S.; BOLOGNESI, M. L.; LEGNAME, G. Small-Molecule Theranostic Probes: A Promising Future in Neurodegenerative Diseases. **International Journal of Cell Biology**, v. 2013, n. April 2014, p. 1–19, 2013.
- B CAUGHEY et al. Prions and Transmissible Spongiform Encephalopathy (TSE) Chemotherapeutics: A Common Mechanism for Anti-TSE Compounds? **Accounts of Chemical Research**, v. 39, n. 9, p. 646–653, 2006.
- BANERJEE, A. et al. Differential Gene Expression Using RNA Sequencing Profiling in a

- Reconstituted Airway Epithelium Exposed to Conventional Cigarette Smoke or Electronic Cigarette Aerosols. **Applied In Vitro Toxicology**, v. 3, n. 1, p. 1–15, 2017.
- BANJADE, S.; ROSEN, M. K. Phase transitions of multivalent proteins can promote clustering of membrane receptors. **eLife**, p. 1–24, 2014.
- BARRET, A. et al. Evaluation of Quinacrine Treatment for Prion Diseases. **Journal of Virology**, v. 77, n. 15, p. 8462–8469, 2003.
- BASKAKOV, I. V; KATORCHA, E. Multifaceted Role of Sialylation in Prion Diseases. **Frontiers in Neuroscience**, v. 10, n. August, p. 1–15, 2016.
- BEAUDOIN, S. et al. Biochimica et Biophysica Acta A large ribonucleoprotein particle induced by cytoplasmic PrP shares striking similarities with the chromatoid body , an RNA granule predicted to function in posttranscriptional gene regulation. **BBA - Molecular Cell Research**, v. 1793, n. 2, p. 335–345, 2009.
- BERA, A.; NANDI, P. K. Nucleic acid induced unfolding of recombinant prion protein globular fragment is pH dependent. **The Protein Society**, v. 23, p. 1780–1788, 2014.
- BERNADÓ, P. et al. Structural characterization of flexible proteins using small-angle X-ray scattering. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 17, p. 5656–5664, 2007.
- BERNADÓ, P.; BLACKLEDGE, M. A self-consistent description of the conformational behavior of chemically denatured proteins from NMR and small angle scattering. **Biophysical Journal**, v. 97, n. 10, p. 2839–2845, 2009.
- BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not ? **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 337–351, 2016.
- BIASINI, E. A designer chaperone against prion diseases. **Nature Biomedical Engineering**, v. 3, n. March, p. 167–168, 2019.
- BIJELER, H. et al. Mice Devoid of PrP Are Resistant to Scrapie. **Cell**, v. 73, p. 1339–1347, 1993.
- BOEYNAEMS, S. et al. Protein Phase Separation : A New Phase in Cell Biology. **Trends in Cell Biology**, v. xx, p. 1–16, 2018.
- BOLOGNESI, B. et al. Article A Concentration-Dependent Liquid Phase Separation Can Cause Toxicity upon Increased Article A Concentration-Dependent Liquid Phase Separation Can Cause Toxicity. **CellReports**, v. 16, n. 1, p. 222–231, 2016.
- BORNHORSST, J. A.; FALKE, J. J. Purification of Proteins Using Polyhistidine Affinity Tags.

- Methods Enzymol**, v. 326, p. 245–54, 2000.
- BRAM, S. The Secondary Structure of DNA in Solution and in Nucleohistone. **J. Mol. Biol.**, v. 58, p. 277–288, 1971.
- BRAVARD, A. et al. The prion protein is critical for DNA repair and cell survival after genotoxic stress. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 2, p. 904–916, 2015.
- BREMER, J. et al. Axonal prion protein is required for peripheral myelin maintenance. **Nature Neuroscience**, v. 13, n. 3, p. 310–318, 2010.
- BÜELER, H. et al. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. **Nature**, v. 356, n. 6370, p. 577–582, abr. 1992.
- CAMERO, S.; BENÍTEZ, M. J.; JIMÉNEZ, J. S. Anomalous protein-DNA interactions behind neurological disorders. **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology**, v. 91, p. 37–63, 2013.
- CASTLE, A. R.; GILL, A. C. Physiological Functions of the Cellular Prion Protein. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 4, n. April, p. 1–25, 2017.
- CAUGHEY, B. Protease-resistant PrP accumulation and scrapie agent replication : a role for sulphated glycosaminoglycans ? Biosynthesis of protease-resistant PrP in scrapie-infected cells Normal metabolism of PrP Conformation of protease-resistant PrP amyloid. **Biochemical Society Transactions**, v. 22, n. 1, p. 163–167, 1994.
- CAUGHEY, B. et al. Getting a Grip on Prions: Oligomers, Amyloids, and Pathological Membrane Interactions. **Annual Review of Biochemistry**, v. 78, n. 1, p. 177–204, jun. 2009.
- CAVALIERE, P. et al. Cross-talk between prion protein and quadruplex-forming nucleic acids: A dynamic complex formation. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 1, p. 1–13, 2013.
- CHAN, F. T. S. et al. Protein amyloids develop an intrinsic fluorescence signature during aggregation †. **Analyst**, v. 138, n. 7, p. 2156–2162, 2013.
- CHO, J. H. Requirement of a protein component for scrapie infectivity. **Intervirology**, v. 14, p. 213–16, 1980.
- CHUANG, E. et al. Amyloid assembly and disassembly. **Journal of Cell Science**, v. 131, n. 8, p. jcs189928, 2018.
- COHEN, F. E. et al. Structural Clues to Prion Replication. **Science**, v. 264, n. April, p. 530–532, 1994.
- COHEN, F. E.; PRUSINER, S. B. Pathologic Conformations of Prion Proteins. **Annu. Rev.**

Biochem, v. 67, p. 793–819, 1998.

COLLIE, D. A. et al. Diagnosing Variant Creutzfeldt-Jakob Disease with the Pulvinar Sign : MR Imaging Findings in 86 Neuropathologically Confirmed Cases. **AJNR**, n. October 2002, p. 1560–1569, 2003.

CONICELLA, A. E. et al. ALS Mutations Disrupt Phase Separation Mediated by α -Helical Structure in the TDP-43 Low-Complexity C-Terminal Domain. **Structure**, v. 24, n. 9, p. 1537–1549, set. 2016.

CORDEIRO, Y. et al. DNA Converts Cellular Prion Protein into the β -Sheet Conformation and Inhibits Prion Peptide Aggregation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 52, p. 49400–49409, 2001.

CORDEIRO, Y. et al. Pathological implications of nucleic acid interactions with proteins associated with neurodegenerative diseases. **Biophysical Reviews**, v. 6, n. 1, p. 97–110, 2014.

CORDEIRO, Y. et al. Modulation of p53 and prion protein aggregation by RNA. **BBA - Proteins and Proteomics**, 2019.

CORDEIRO, Y.; SILVA, J. The Hypothesis of the Catalytic Action of Nucleic Acid on the Conversion of Prion Protein. **Protein & Peptide Letters**, v. 12, n. 3, p. 251–255, 2005.

CRIADO, J. R. et al. Mice devoid of prion protein have cognitive deficits that are rescued by reconstitution of PrP in neurons. **Neurobiology of Disease**, v. 19, n. 1–2, p. 255–265, 2005.

DARMOSTUK, M. et al. Current approaches in SELEX : An update to aptamer selection technology. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 1141–1161, 2015.

DAUDE, N. Specific inhibition of pathological prion protein accumulation by small interfering RNAs. **Journal of Cell Science**, v. 116, n. 13, p. 2775–2779, 2003.

DELEAULT, N. R.; LUCASSEN, R. W.; SUPATTAPONE, S. RNA molecules stimulate prion protein conversion. **Nature**, v. 425, n. October, p. 717–720, 2003.

DIGESTIONS, E. et al. Site-Specific Characterization of the N-Linked Glycans of Murine Prion Protein by High-Performance Liquid Chromatography / Electrospray Mass Spectrometry and Exoglycosidase Digestions. **Biochemistry**, v. 38, p. 4885–4895, 1999.

DONIACH, S. Changes in Biomolecular Conformation Seen by Small Angle X-ray Scattering. **Chem. Rev.**, v. 101, p. 1763–1778, 2001.

ELBAUM-GARFINKLE, S. Matter over mind : Liquid phase separation and neurodegeneration. **J. Bio. Chem.**, v. 294, n. 18, p. 7160–7168, 2019.

- ERAÑA, H.; VENEGAS, V.; MORENO, J. Prion-like disorders and Transmissible Spongiform Encephalopathies : An overview of the mechanistic features that are shared by the various disease-related misfolded proteins. **Biochemical and biophysical research communications**, p. 1–12, 2016.
- FASMAN, G. D. **Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules**. [s.l: s.n.]. v. 118
- FEIGIN, L. A.; SVERGUN, D. I. **Structure Analysis by Small-Angle X-Ray and Neutron Scattering**. Boston, MA: Springer US, 1987.
- FEVRIER, B. et al. Cells release prions in association with exosomes. **PNAS**, v. 101, n. 26, p. 9683–9688, 2004.
- FIELD, E. J.; PEAT, A. Structural Changes in Scrapie-Affected Brain. **Proceedings of the Biochemical Society**, 1969.
- FORLONI, G. et al. Review: PrP 106-126 – 25 years after. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, p. 0–1, 2019.
- FRANZMANN, T. M. et al. Phase separation of a yeast prion protein promotes cellular fitness. **Science**, v. 359, n. 6371, 2018.
- GASSART, A. DE et al. Lipid raft-associated protein sorting in exosomes. **Blood**, v. 102, n. 13, p. 4336–4345, 2003.
- GIULIANO, M. et al. Staurosporine-induced apoptosis in Chang liver cells is associated with down-regulation of Bcl-2 and Bcl-XL. **International journal of molecular medicine**, v. 13, n. 4, p. 565–571, 2004.
- GOMES, E.; SHORTER, X. J. The molecular language of membraneless organelles. **JBC**, v. 294, p. 7115–7127, 2019.
- GOMES, M. P. B. et al. Prion protein complexed to N2a cellular RNAs through its N-terminal domain forms aggregates and is toxic to murine neuroblastoma cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 28, p. 19616–19625, 2008.
- GORDON, P. M. K. et al. Disease-specific motifs can be identified in circulating nucleic acids from live elk and cattle infected with transmissible spongiform encephalopathies. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 2, p. 550–556, 2009.
- GROVEMAN, B. R. et al. Parallel In-register Intermolecular β -Sheet Architectures for Prion-seeded Prion Protein (PrP) Amyloids*. **The Journal of biological chemistry**, v. 289, n. 35, p. 24129–24142, 2014.

- GUO, L. et al. Nuclear-Import Receptors Reverse Aberrant Phase Transitions of RNA-Binding Proteins with Prion-like Domains. **Cell**, v. 173, n. 3, p. 677- 692.e20, abr. 2018.
- HARRISON, A. F.; SHORTER, J. RNA-binding proteins with prion-like domains in health and disease. **Biochemical Journal**, v. 474, n. 8, p. 1417–1438, 2017.
- HARRISON, P. J.; ROBERTS, G. W. How now mad cow? **BMJ**, v. 304, n. 6832, p. 929–930, 11 abr. 1992.
- HARTLEY, H. Origin of the Word “Protein”. **Nature**, v. 169, p. 244, 1951.
- HOFACKER, I. L. Vienna RNA secondary structure server. **Nucleic acids research**, v. 31, n. 13, p. 3429–3431, 2003.
- HUANG, Z.; PRUSINER, S. B.; COHEN, F. E. Scrapie prions: A three-dimensional model of an infectious fragment. **Folding and Design**, v. 1, n. 1, p. 13–19, 1996.
- HUGHES, M. P. et al. Atomic structures of low-complexity protein segments reveal kinked β sheets that assemble networks. **Science**, v. 359, n. 6376, p. 698–701, 2018.
- HUNTER, G. D. et al. FURTHER STUDIES OF THE AND STABILITY OF EXTRACTS AND HOMOGENATES DERIVED FROM AFFECTED MOUSE BRAINS. **J. Comp. Path.**, v. 79, p. 101– 07, 1969.
- ISAACS, J. D.; JACKSON, G. S.; ALTMANN, D. M. The role of the cellular prion protein in the immune system. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 146, n. 1, p. 1–8, 2006.
- IVANOV, V. I.; MINCHENKOVA, L. E.; SCHYOLKINA, A. K. Different Conformations of Double-Stranded Nucleic Acid in Solution as Revealed by Circular Dichroism. **Biopolymers**, v. 12, p. 89–110, 1973.
- JOHNSON, W. C. **Determination of the Conformation of Nucleic Acids by Electronic CD**. [s.l: s.n.].
- KACHALA, M.; VALENTINI, E.; SVERGUN, D. I. **Application of SAXS for the Structural Characterization of IDPs**. [s.l.] Springer, 2015.
- KARPUJ, M. V. et al. Phosphorothioate Oligonucleotides Reduce PrP^{Sc} Levels and Prion Infectivity in Cultured Cells. **Molecular Medicine**, v. 13, n. 3–4, p. 190–198, 1 mar. 2007.
- KATO, M. et al. Cell-free Formation of RNA Granules: Low Complexity Sequence Domains Form Dynamic Fibers within Hydrogels. **Cell**, v. 149, n. 4, p. 753–767, maio 2012.
- KAWASAKI, Y. et al. Orally Administered Amyloidophilic Compound Is Effective in Prolonging the Incubation Periods of Animals Cerebrally Infected with Prion Diseases in a

Prion Strain-Dependent Manner. **Journal of Virology**, v. 81, n. 23, p. 12889–12898, 2007.

KELLY, J. W. The alternative conformations of amyloidogenic proteins and their multi-step assembly pathways. **Current Opinion in Structural Biology**, p. 101–106, 1998.

KELLY, S. M.; JESS, T. J.; PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism. v. 1751, p. 119–139, 2005.

KEMPSTER, S.; BATE, C.; WILLIAMS, A. Simvastatin treatment prolongs the survival of scrapie-infected mice. **NeuroReport**, v. 18, n. 5, p. 479–482, 2007.

KIMATA, A. et al. New series of antiprion compounds: Pyrazolone derivatives have the potent activity of inhibiting protease-resistant prion protein accumulation. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, n. 21, p. 5053–5056, 2007.

KING, O.; GITLER, A.; SHORTER, J. The tip of the iceberg: RNA-binding proteins with prion-like domains in neurodegenerative disease. **Brain Research Reviews**, v. 1462, p. 61–80, 2012.

KORTH, C. et al. Acridine and phenothiazine derivatives as pharmacotherapeutics for prion disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 17, p. 9836–9841, 14 ago. 2001.

KOSTYLEV, M. A. et al. Liquid and Hydrogel Phases of PrP^C Linked to Conformation Shifts and Triggered by Alzheimer's Article Liquid and Hydrogel Phases of PrP^C Linked to Conformation Shifts and Triggered by Alzheimer's Amyloid- β Oligomers. **Molecular Cell**, p. 1–18, 2018.

KYLE, R. A.; STEENSMA, D. P. Jöns Jacob Berzelius e A Father of Chemistry. **Stamp Vignette on Medical Science**, v. 93, n. May, p. 2017–2018, 2018.

KYPR, J. et al. Circular dichroism and conformational polymorphism of DNA. **Nucleic acids research**, v. 37, n. 6, p. 1713–1725, 2009.

LADBURY, J. E.; DOYLE, M. L. **Biocalorimetry 2 Applications of Calorimetry in the biological sciences**. [s.l: s.n.].

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.

LANGDON, E. M. et al. mRNA structure determines specificity of a polyQ-driven phase separation. **Science**, v. 7432, n. April, p. 1–12, 2018.

LAURIDSEN, L. H. et al. **A Capture-SELEX Strategy for Multiplexed Selection of RNA**

Aptamers Against Small Molecules. [s.l: s.n.]. v. 1671

LI, P. et al. Phase Transitions in the Assembly of Multi-Valent Signaling Proteins. **Nature**, v. 483, n. 7389, p. 336–340, 2012.

LIMA, L. M. T. R. et al. Structural Insights into the Interaction between Prion Protein and Nucleic Acid †. **Biochemistry**, v. 45, p. 9180–9187, 2006.

LIN, Y. et al. Formation and Maturation of Phase-Separated Liquid Droplets by RNA-Binding Proteins Article Formation and Maturation of Phase-Separated Liquid Droplets by RNA-Binding Proteins. **Molecular Cell**, v. 60, n. 2, p. 208–219, 2015.

LINDEN, R. et al. Physiology of the Prion Protein. **Physiol. Rev.**, v. 88, p. 673–728, 2008.

LINDEN, R. The Biological Function of the Prion Protein : A Cell Surface Scaffold of Signaling Modules. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 10, n. March, p. 1–19, 2017.

MA, J.; LINDQUIST, S. Conversion of PrP to a Self-Perpetuating PrP Sc -like Conformation in the Cytosol. **Science**, v. 298, n. November, p. 1785–1789, 2002.

MACEDO, B. et al. Non-Specific Prion Protein-Nucleic Acid Interactions Lead to Different Aggregates and Cytotoxic Species. **Biochemistry**, v. 51, n. 27, p. 5402–13, 2012.

MACEDO, B. **ESTUDOS IN VITRO E IN VIVO DE CONVERSÃO E AGREGAÇÃO DA PROTEÍNA PRION: EFEITO DE ÁCIDOS NUCLEICOS E A PROPOSTA DE UM MODELO DE AGREGAÇÃO AMILOIDE.** [s.l.] Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2016.

MACEDO, B.; CORDEIRO, Y. Unraveling Prion Protein Interactions with Aptamers and Other PrP-Binding Nucleic Acids. **International journal of molecular sciences**, v. 18, p. 1–22, 2017.

MAHARANA, S. et al. RNA buffers the phase separation behavior of prion-like RNA- binding proteins. **Science**, v. 360, n. 6391, p. 918–921, 2018.

MANGÉ, A. et al. Scrapie-like prion protein is translocated to the nuclei of infected cells independently of proteasome inhibition and interacts with chromatin. **Journal of Cell Science**, v. 117, p. 2411–2416, 2004.

MARCH, Z. M.; KING, O. D.; SHORTER, J. Prion-like domains as epigenetic regulators, scaffolds for subcellular organization, and drivers of neurodegenerative disease. **Brain Research**, v. 1647, n. 24, p. 9–18, set. 2016.

MARUŠIČ, M. et al. THE EFFECT OF SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS IN G-RICH REGIONS OF HIGH-RISK HUMAN PAPILLOMAVIRUSES ON STRUCTURAL

- DIVERSITY OF DNA. **BBA - General Subjects**, v. 1861, p. 1229–36, 2017.
- MASHIMA, T. et al. Unique quadruplex structure and interaction of an RNA aptamer against bovine prion protein. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 18, p. 6249–6258, 2009.
- MASHIMA, T. et al. Anti-prion activity of an RNA aptamer and its structural basis. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 2, p. 1355–1362, 2013.
- MASTERS, C. L. et al. Preclinical lesions and their progression in the experimental spongiform encephalopathies (Kuru and Creutzfeldt-Jakob disease) in primates. **Journal of Neuro pathology e Experimental Neurology**, v. XXXV, p. 593–605, 1976.
- MERZ, P. A. et al. Abnormal Fibrils from Scrapie-infected Brain. **Acta Neuropathol**, v. 54, p. 63–74, 1981.
- MIRONOV, V. et al. Organ printing : computer-aided jet-based 3D tissue engineering. **Trends in Biotechnology**, v. 21, n. 4, p. 157–161, 2003.
- MITREA, D. M.; KRIWACKI, R. W. Phase separation in biology ; functional organization of a higher order. **Cell Communication and Signaling**, p. 1–20, 2016.
- MOLLIEX, A. et al. Phase separation by low complexity domains promotes stress granule assembly and drives pathological fibrillization. **Cell**, v. 163, n. 1, p. 123–133, 2015.
- MOREL, E. et al. The Cellular Prion Protein PrP^c Is Expressed in Human Enterocytes in Cell-Cell Junctional Domains. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 2, p. 1499–1505, 2004.
- MORENO, J. A.; TELLING, G. C. **Insights into mechanisms of transmission and pathogenesis from transgenic mouse models of prion diseases**. [s.l.: s.n.].
- MURAKAMI, T. et al. ALS FTD Mutation-Induced Phase Transition of FUS Liquid Droplets and Reversible Hydrogels into Irreversible Hydrogels Impairs RNP Granule Function. **Neuron**, v. 88, p. 678–690, 2015.
- MURRAY, D. T. et al. Structure of FUS Protein Fibrils and Its Relevance to Self-Assembly and Phase Separation of Low-Complexity Domains. **Cell**, v. 171, n. 3, p. 615- 627.e16, out. 2017.
- NAKAMURA, Y. Biochimie Aptamers as therapeutic middle molecules. **Biochimie**, v. 145, p. 22–33, 2018.
- NANDI, P. K. Interaction of prion peptide HuPrP106-126 with nucleic acid: Brief report. **Archives of Virology**, v. 142, n. 12, p. 2537–2545, 1997.
- NANDI, P. K. Polymerization of human prion peptide HuPrP 106-126 to amyloid in nucleic acid solution. **Archives of Virology**, v. 143, n. 7, p. 1251–1263, 1998.

NANDI, P. K. et al. DNA-induced Partial Unfolding of Prion Protein Leads to its Polymerisation to Amyloid. **J. Mol. Biol.**, v. 2836, n. 02, p. 153–161, 2002.

NANDI, P. K.; LECLERC, E. Polymerization of murine recombinant prion protein in nucleic acid solution. **Archives of Virology**, v. 144, n. 9, p. 1751–1763, 1999.

NIMJEE, S. M. et al. Aptamers as Therapeutics. **Annu. Rev. Pharmacol Toxicol.**, p. 61–79, 2018.

NOTT, T. J. et al. Phase Transition of a Disordered Nuage Protein Generates Environmentally Responsive Article Phase Transition of a Disordered Nuage Protein Generates Environmentally Responsive Membraneless Organelles. **Molecular Cell**, v. 57, n. 5, p. 936–947, 2015.

OLIVEIRA, G. A. P. DE et al. Structural basis for the dissociation of α -synuclein fibrils triggered by pressure perturbation of the hydrophobic core. **Nature Publishing Group**, n. August, p. 1–15, 2016.

OMER, A. et al. Stress granules counteract senescence by sequestration of PAI-1. **EMBO reports**, v. 19, n. 5, p. e44722, 2018.

OSTAPCHENKO, V. G. et al. The Prion Protein Ligand, Stress-Inducible Phosphoprotein 1, Regulates Amyloid- Oligomer Toxicity. **Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 42, p. 16552–16564, 2013.

PAGADALA, N. S.; SYED, K.; BHAT, R. In silico strategies on prion pathogenic conversion and inhibition from PrPC –PrPSc. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 12, n. 3, p. 241–248, 2017.

PAN, K. et al. Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 90, n. December, p. 10962–10966, 1993.

PATEL, A. et al. A Liquid-to-Solid Phase Transition of the ALS Protein FUS Accelerated by Disease Mutation. **Cell**, v. 162, n. 5, p. 1066–1077, 2015.

PATERSON, A. W. J.; CURTIS, J. C.; MACLEOD, N. K. Complex I specific increase in superoxide formation and respiration rate by PrP-null mouse brain mitochondria. **Journal of Neurochemistry**, v. 105, n. 1, p. 177–191, 2008.

PRUSINER, S. B. et al. Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. **Cell**, v. 35, n. 2 PART 1, p. 349–358, 1983.

PRUSINER, S. B. Prions. **Proc. Natl. Acad. Sci**, v. 95, n. November, p. 13363–13383, 1998.

RACHIDI, W. et al. Expression of prion protein increases cellular copper binding and

antioxidant enzyme activities but not copper delivery. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 11, p. 9064–9072, 2003.

RAMASWANI, M.; TAYLOR, J. P.; PARKER, R. Altered “Ribostasis”: RNA-protein granule formation or persistence in the development of degenerative disorders. **Cell**, v. 154, n. 4, p. 1–17, 2013.

RECORD, T.; LOHMAN, T.; HASETH, D. P. Ion Effects on Ligand-Nucleic Acid Interactions Department of Chemistry. **J. Mol. Biol.**, v. 107, p. 145–158, 1976.

RICE, S. A. Small angle scattering of X-rays. A. Guinier and G. Fournet. Translated by C. B. Wilson and with a bibliographical appendix by K. L. Yudowitch. Wiley, New York, 1955. 268 pp. \$7.50. **Journal of Polymer Science**, v. 19, n. 93, p. 594–594, mar. 1956.

RIEK, R. et al. Prion protein NMR structure and familial human spongiform encephalopathies. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 20, p. 11667–11672, 2002.

ROMERO, P. et al. Sequence complexity of disordered protein. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 42, n. 1, p. 38–48, 2001.

RYAN, V. H. et al. Mechanistic View of hnRNPA2 Low-Complexity Domain Structure, Interactions, and Phase Separation Altered by Mutation and Arginine Methylation. **Molecular Cell**, v. 69, n. 3, p. 465- 479.e7, fev. 2018.

SALIM, N. N.; FEIG, A. L. Isothermal titration calorimetry of RNA. **Methods**, v. 47, n. 3, p. 198–205, mar. 2009.

SARNATARO, D.; PEPE, A.; ZURZOLO, C. **Cell Biology of Prion Protein**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2017. v. 150

SAYER, N. M. et al. Structural Determinants of Conformationally Selective, Prion-binding Aptamers. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 13, p. 13102–13109, 2004.

SCARLETT, G.; SILIGARDI, G.; KNEALE, G. G. Circular Dichroism for the Analysis of Protein–DNA Interactions. **Springer Science**, v. 1334, p. 299–312, 2015.

SCHA, H. M. et al. Prion Protein Gene Variation Among Primates. **J. Mol. Biol.**, v. 245, p. 362–374, 1995.

SCHMIDT, H. B.; ROHATGI, R. In vivo formation of vacuolated multi-phase compartments lacking membranes. **Cell Rep.**, v. 16, n. 5, p. 1228–1236, 2016.

SCHMITZ, M. et al. The real-Time quaking-induced conversion assay for detection of human prion disease and study of other protein misfolding diseases. **Nature Protocols**, v. 11, n. 11, p.

2233–2242, 2016.

SHAMMAS, S. L. et al. CIDER: Classification of Intrinsically Disordered Ensemble Regions. **Biophysj**, v. 108, n. 2, p. 228a, 2015.

SHORTER, J. Phase separation of RNA-binding proteins in physiology and disease : An introduction to the JBC Reviews thematic series. **JBC**, v. 294, n. 3, p. 7113–7114, 2019.

SILVA, J. L.; CORDEIRO, Y. The “ Jekyll and Hyde ” Actions of Nucleic Acids on the Prion-like Aggregation of Proteins *. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 30, p. 15482–15490, 2016.

SIPE, J. D. Amyloidosis. **Annual Review of Biochemistry**, v. 61, n. 1, p. 947–975, jun. 1992.

SOTO, C.; SATANI, N. The intricate mechanisms of neurodegeneration in prion diseases. **Trends in Molecular Medicine**, v. 17, n. 1, p. 14–24, 2011.

SPAGNOLLI, G. et al. Full Atomistic Model Of Prion Structure And Conversion. **bioRxiv**, p. 505271, 2018.

SREERAMA, N.; WOODY, R. W. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. **Analytical biochemistry**, v. 287, n. 2, p. 252–60, 15 dez. 2000.

STOCKMAN, S. S.; LONDON, M. R. C. V. S. Scrapie: An Obscure Disease of Sheep. **Journal of Comparative Pathology and Therapeutics**, v. 26, n. October, p. 317–327, 1913.

STROBERG, W.; SCHNELL, S. Do Cellular Condensates Accelerate Biochemical Reactions? Lessons from Microdroplet Chemistry. **Biophysical Journal**, v. 115, n. 1, p. 3–8, 2018.

STROM, A. et al. Cellular prion protein localizes to the nucleus of endocrine and neuronal cells and interacts with structural chromatin components. **European Journal of Cell Biology**, v. 90, n. 5, p. 414–419, 2011.

SUN, Z. et al. Molecular determinants and genetic modifiers of aggregation and toxicity for the als disease protein fus/tls. **PLoS Biology**, v. 9, n. 4, 2011.

SVERGUN, D. I.; KOCH, M. H. J. Small-angle scattering studies of biological macromolecules in solution. **Reports on Progress in Physics**, v. 66, n. 10, p. 1735–1782, 1 out. 2003.

TAKEMURA, K. et al. DNA Aptamers That Bind to PrPC and Not PrPSc Show Sequence and Structure Specificity. **Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 231, p. 204–214, 2006.

TANFORD, C.; REYNOLDS, J. **Nature’s Robots: A History of Proteins**. [s.l: s.n.].

- TANJI, K. et al. Analysis of PrP^c mRNA by in situ Hybridization in Brain, Placenta, Uterus and Testis of Rats. **Intervirology**, v. 38, n. 6, p. 309–315, 1995.
- THANDAPANI, P. et al. Defining the RGG/RG Motif. **Molecular Cell**, v. 50, n. 5, p. 613–623, 2013.
- THOMPSON, M. J. et al. Design, synthesis, and structure - Activity relationship of indole-3-glyoxylamide libraries possessing highly potent activity in a cell line model of prion disease. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52, n. 23, p. 7503–7511, 2009.
- TUERK, C.; GOLD, L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. **Science.**, n. 9, p. 505–10, 1990.
- TUROVEROV, K. K. et al. Stochasticity of Biological Soft Matter : Emerging Concepts in Intrinsically Disordered Proteins and Biological Phase Separation. **Trends in Biochemical Sciences**, p. 1–13, 2019.
- UVERSKY, V. N. Intrinsically disordered proteins in overcrowded milieu : Membrane-less organelles , phase separation , and intrinsic disorder. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 44, p. 18–30, 2017.
- VÁZQUEZ-FERNÁNDEZ, E. et al. The Structural Architecture of an Infectious Mammalian Prion Using Electron Cryomicroscopy. **PLoS Pathogens**, p. 1–21, 2016.
- VERNON, R. M. et al. Pi-Pi contacts are an overlooked protein feature relevant to phase separation. **eLife**, p. 1–48, 2018.
- VILLAR-GUERRA, R.; GRAY, R. D.; CHAIRES, J. B. Quadruplex DNA Structure Characterization by Circular Dichroism. **Curr Protoc Nucleic Acid Chem**, 2018.
- VOORHEES, P. W. OSTWALD RIPENING OF TWO-PHASE MIXTURES. **Annu. Rev. Mater. Sci.**, v. 22, p. 197–215, 1992.
- VORLICKOVA, M. et al. Circular Dichroism Spectroscopy of DNA : From Duplexes to Quadruplex. **Chirality**, 2012.
- WANG, A. et al. A single N-terminal phosphomimic disrupts TDP-43 polymerization, phase separation, and RNA splicing. **The EMBO Journal**, v. 37, n. 5, p. e97452, 2018a.
- WANG, J. et al. A Molecular Grammar Governing the Driving Forces for Phase Separation of Prion-like RNA Binding Proteins. **Cell**, v. 174, n. 3, p. 688- 699.e16, 2018b.
- WARWICKER, J. Modeling a Prion Protein Dimer: Predictions for Fibril Formation. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 278, p. 646–652, 2000.

- WEGMANN, S. et al. Tau protein liquid – liquid phase separation can initiate tau aggregation. **The EMBO Journal**, v. 37, p. 1–21, 2018.
- WEISS, S. et al. RNA Aptamers Specifically Interact with the Prion Protein PrP. **Journal of Virology**, v. 71, n. 11, p. 8790–8797, 1997.
- WESTERGARD, L.; CHRISTENSEN, H. M.; HARRIS, D. A. The cellular prion protein (PrPC): Its physiological function and role in disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1772, n. 6, p. 629–644, jun. 2007.
- WHITECHURCH, B. C. et al. **Prion Diseases**. [s.l: s.n.].
- WILL, R. G.; IRONSIDE, J. W. Sporadic and Infectious Human Prion Diseases. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, p. 1–22, 2016.
- WILLE, H.; REQUENA, J. The Structure of PrP^{Sc} Prions. **Pathogens**, v. 7, n. 1, p. 20, 2018.
- WILSON, E. B. THE STRUCTURE OF PROTOPLASM. **Science**, v. 10, n. 237, p. 33–45, 14 jul. 1899.
- WOODY, R. Circular Dichroism. v. 246, p. 34–71, 1995.
- WOPFNER, F. et al. Analysis of 27 Mammalian and 9 Avian PrPs Reveals High Conservation of Flexible Regions of the Prion Protein. **J. Mol. Biol.**, v. 289, p. 1163–78, 1999.
- YAO, H. et al. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Circular dichroism in functional quality evaluation of medicines. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 147, p. 50–64, 2018.
- YIN, S. et al. Binding of Recombinant but Not Endogenous Prion Protein to DNA Causes DNA Internalization and Expression in Mammalian Cells *. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 37, p. 25446–25454, 2008.
- YOSHIZAWA, T. et al. Nuclear import receptor inhibits phase separation of FUS through binding to multiple sites. **Cell**, v. 173, n. 3, p. 693–705, 2018.
- YUDOVIN-FARBER, I. et al. Cationic polysaccharides as anti-prion agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 5, p. 1414–1420, 2005.
- YUSA, S.; SUGITA-KONISHI, Y.; KIKUCHI, Y. Cellular Prion Protein: From Physiology to Pathology. **Viruses**, v. 4, p. 3109–3131, 2012.
- ZANUSSO, G. et al. Proteasomal Degradation and N-terminal Protease Resistance of the Codon 145 Mutant Prion Protein. **The Journal of biological chemistry**, v. 33, p. 23396–404, 1999.

ZENG, M. et al. Phase Transition in Postsynaptic Densities Underlies Formation of Syaptic Complexes and Synaptic Plasticity. **Cell**, v. 166, n. 5, p. 1163–1175, 2016.

ZHANG, X. et al. RNA stores tau reversibly in complex coacervates. **PLoS ONE**, v. 15, n. 7, p. 1–28, 2017.

ZHOU, J. et al. Aptamers as targeted therapeutics: current potential and challenges. **Nat Rev Drug Discov.**, v. 16, n. 3, p. 181–202, 2017.