

La unión del azul de metileno a una hendidura superficial inhibe la oligomerización y la fibrilación de la proteína priónica.

Los enlaces de autor abren el panel de superposición [Paola Cavaliere](#)^{a,b,1} [Adriana](#)^b [joan torrent](#)^c

[Mostrar más](#)

[Esquema](#)

[Cuota](#)

[Citar](#)

<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.09.005> [Obtener derechos y contenido](#)

Bajo una [licencia de usuario de Elsevier](#)

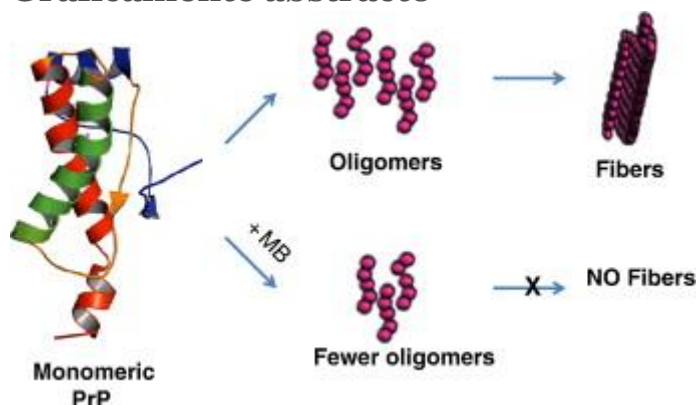
Archivo abierto

Resumen

Las enfermedades de plegamiento incorrecto de proteínas neurodegenerativas, incluidas las prionopatías, comparten la característica común de acumular proteínas mal plegadas específicas, con un mecanismo molecular estrechamente relacionado. La proteína priónica mal plegada (PrP) genera oligómeros solubles que, a su vez, se agregan en fibras amiloides. La prevención de la formación de estas entidades, crucialmente asociadas con las propiedades neurotóxicas y/o infecciosas de la PrP anormal resultante, representa una estrategia terapéutica atractiva para mejorar las prionopatías. Centramos nuestra atención en el azul de metileno (MB), un fármaco bien caracterizado, que está en estudio contra la enfermedad de Alzheimer y otros trastornos neurodegenerativos. Aquí, hemos realizado un estudio in vitro sobre los efectos de MB en la oligomerización y fibrilación de PrP humana, ovina y murina. Demostramos que MB afecta la cinética de oligomerización de PrP y reduce la cantidad de oligómero en aproximadamente un 30%, de manera dependiente del pH, mediante el uso de metodologías SLS y DSC. Además, las imágenes TEM mostraron que MB suprime por completo la formación de fibras en una relación molar PrP:MB de 1:2. Finalmente, la RMN reveló una interacción directa entre PrP y MB, que se mapeó en una hendidura superficial que incluía una región fibrilogénica de la proteína. Nuestros resultados permitieron suponer un mecanismo de acción en el que la unión de MB a la superficie de PrP interfiere notablemente con la vía hacia los oligómeros y las fibras. Por lo tanto, el MB podría considerarse como

un compuesto antiagregante general, que actúa contra las proteinopatías. Las imágenes TEM mostraron que MB suprime por completo la formación de fibras en una relación molar PrP:MB de 1:2. Finalmente, la RMN reveló una interacción directa entre PrP y MB, que se mapeó en una hendidura superficial que incluía una región fibrillogénica de la proteína. Nuestros resultados permitieron suponer un mecanismo de acción en el que la unión de MB a la superficie de PrP interfiere notablemente con la vía hacia los oligómeros y las fibras. Por lo tanto, el MB podría considerarse como un compuesto antiagregante general, que actúa contra las proteinopatías. Nuestros resultados permitieron suponer un mecanismo de acción en el que la unión de MB a la superficie de PrP interfiere notablemente con la vía hacia los oligómeros y las fibras. Por lo tanto, el MB podría considerarse como un compuesto antiagregante general, que actúa contra las proteinopatías. Nuestros resultados permitieron suponer un mecanismo de acción en el que la unión de MB a la superficie de PrP interfiere notablemente con la vía hacia los oligómeros y las fibras. Por lo tanto, el MB podría considerarse como un compuesto antiagregante general, que actúa contra las proteinopatías. Nuestros resultados permitieron suponer un mecanismo de acción en el que la unión de MB a la superficie de PrP interfiere notablemente con la vía hacia los oligómeros y las fibras. Por lo tanto, el MB podría considerarse como un compuesto antiagregante general, que actúa contra las proteinopatías. Nuestros resultados permitieron suponer un mecanismo de acción en el que la unión de MB a la superficie de PrP interfiere notablemente con la vía hacia los oligómeros y las fibras. Por lo tanto, el MB podría considerarse como un compuesto antiagregante general, que actúa contra las proteinopatías. Nuestros resultados permitieron suponer un mecanismo de acción en el que la unión de MB a la superficie de PrP interfiere notablemente con la vía hacia los oligómeros y las fibras. Por lo tanto, el MB podría considerarse como un compuesto antiagregante general, que actúa contra las proteinopatías.

Gráficamente abstracto



1. [Descargar](#) : [Descargar imagen de alta resolución \(151KB\)](#)
2. [Descargar](#): [Descargar imagen a tamaño completo](#)

Reflejos

► MB se encuentra actualmente en estudio para enfermedades neurodegenerativas. ► MB afecta significativamente la cinética de oligomerización de PrP. ► MB reduce la cantidad de oligómero de PrP y suprime por completo la formación de fibras. ► RMN reveló que PrP alberga MB en una hendidura superficial. ► MB puede considerarse un compuesto antiagregante frente a proteinopatías.

- **Anterior**
- **próximo**

abreviaturas

PrP

proteína priónica

MEGABYTE

azul de metileno

peso-OvPrP

PrP de longitud completa recombinante ovina de tipo salvaje (23–234)

Δ OvPrP

PrP truncada recombinante ovina (103–234)

MoPrP

PrP de longitud completa recombinante murina (23–231)

peso-HuPrP

PrP de longitud completa recombinante humana de tipo salvaje (23–231)

ANUNCIO

enfermedad de alzheimer

Palabras clave

Proteína amiloidogénica

oligómero de PrP

fibra PrP

Agente anti-prion

Enfermedad neurodegenerativa

1 . Introducción

Los trastornos neurodegenerativos tales como la enfermedad de Alzheimer (EA), las enfermedades de Parkinson y de Huntington, la demencia frontotemporal y las enfermedades priónicas se incluyen en la familia general de patologías de plegamiento incorrecto de proteínas. Estas enfermedades muestran una superposición sustancial en sus mecanismos patológicos [1] , [2] , siendo su principal característica común la formación de oligómeros seguida de una disposición fibrilar y el depósito de proteínas mal plegadas en el cerebro [3] , [4] .

En particular, las enfermedades priónicas son una familia de patologías raras pero mortales que afectan a los seres humanos, por ejemplo, la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob y varias especies animales, por ejemplo, la tembladera en ovejas y cabras, y las encefalopatías espongiiformes bovinas en el ganado. Se acepta comúnmente que estas enfermedades son causadas por un cambio conformacional de la proteína priónica celular (PrP^c), que es rica en hélice α , a su conformero insoluble rico en hojas β , llamado scrapie PrP (PrP^{sc}) [5] . Cómo se produce esta transición conformacional aún no está claramente aclarado, a pesar de la plétora de estudios [5] , [6] , [7] . Todos los mecanismos propuestos para describir la conversión de PrP^c en PrP^{sc} sugiere un proceso de varios pasos que incluye un paso de oligomerización/polimerización [7] , [8] . Basado en la suposición de que uno o más de los diferentes estados conformacionales de PrP involucrados (es decir, oligómeros, protofibrillas, fibrillas de amiloide) corresponden a la entidad infecciosa y/o tóxica, actualmente se exploran varios enfoques dirigidos a dichas especies anormales para intervenciones terapéuticas. .

El tratamiento de las enfermedades priónicas sigue siendo un desafío para la comunidad científica y médica. Aunque se ha identificado una gran cantidad de agentes antipriónicos, ninguno representa una cura eficaz. Por razones pragmáticas, y dado que los mecanismos moleculares básicos en los trastornos del plegamiento de proteínas están estrechamente relacionados, parece razonable suponer que algunos compuestos, con potencia antiagregación en

varios sistemas modelo de enfermedad y plegamiento de proteínas, también podrían ser efectivos para las enfermedades priónicas. En consecuencia, dirigimos nuestra búsqueda de nuevos agentes antipriónicos a compuestos que están bien caracterizados con respecto a sus cualidades similares a las de las drogas. Nos enfocamos en el azul de metileno (MB), que se ha utilizado comúnmente para el tratamiento de varias afecciones médicas durante al menos 120 años [9] y actualmente se está probando en ensayos clínicos de fase II en AD [10].

MB es un colorante soluble en agua, perteneciente a la clase de fenotiazina. Este compuesto está aprobado por la Administración de Drogas y Alimentos para administración oral o intravenosa para varias patologías. Desde un punto de vista toxicológico, se sabe que el MB es poco tóxico [10] y, lo que es más importante, el MB puede atravesar la barrera hematoencefálica [11], [12]; por lo tanto, es adecuado para alcanzar objetivos neuronales.

MB ha atraído recientemente una atención cada vez mayor, porque se ha demostrado que ralentiza la progresión de los pacientes con EA con una mejora neta de la función cognitiva [10]. Sin embargo, su mecanismo de acción sigue sin estar claro. A nivel molecular, se encontró que MB interfiere, in vitro, con la agregación de los péptidos $A\beta_{42}$ [13], $A\beta_{40}$ y proteínas tau [14]. Además, MB puede antagonizar otras proteínas amiloidogénicas; de hecho, MB puede modular la degradación de poliglutamina, de una manera dependiente de la maquinaria de chaperonas hsp70/hsp90 [15], y perjudica la deposición de la proteína de unión al ADN TAR (TDP-43) en un modelo de cultivo celular que sobreexpresa un TDP-43 variante [16].

Aunque estos hallazgos respaldan la idea de que MB muestra propiedades antiagregantes, aún no se ha explorado la posibilidad de una interacción entre PrP y MB. Un estudio importante centrado en las relaciones estructura-actividad de la fenotiazina y realizado en células infectadas con priones ScN2a de neuroblastoma mostró que MB era citotóxico para las células ScN2a y no podía inhibir la formación de PrP^{sc} [17]. Sin embargo, su acción no pudo ser examinada de forma fiable debido a su toxicidad hacia estas células. Por otro lado, en un estudio reciente, los glóbulos rojos suspendidos en plasma tratado con MB se prepararon para transfusión de intercambio neonatal [18].

En este escenario, el escaso conocimiento de la acción del MB sobre la proteína priónica, con respecto a otras proteínas amiloidogénicas, nos impulsó a estudiar los efectos de este compuesto en el proceso de agregación de la PrP, mediante el uso de un conjunto de metodologías biofísicas. Reportamos una interacción directa entre MB y PrP, que involucra principalmente el extremo C-terminal de

la hélice H2 y una pequeña región alrededor de la hélice H1, que demostraron poseer una alta propensión a la agregación [19]. Al diseccionar la acción de MB a lo largo de la reacción de polimerización de monómeros a fibrillas, demostramos la efectividad de este compuesto para antagonizar tanto la oligomerización como la fibrilación de PrP, al ralentizar la formación de oligómeros de PrP, reducir su cantidad y suprimir por completo la formación de fibras. En conjunto, estos resultados nos permiten suponer un mecanismo de acción de MB que bloquea el proceso de conversión de PrP.

2 . materiales y métodos

2.1 . Materiales

MB y tioflavina T (ThT), con una pureza $\geq 95\%$, se adquirieron de Sigma Aldrich. MB se disolvió en el mismo tampón utilizado para la proteína, según los experimentos (ver más abajo). Las soluciones madre se filtraron con un filtro de 0,2 μm , se mantuvieron a 4 $^{\circ}\text{C}$ y se prepararon frescas para cada experimento independiente.

2.2 . Producción de proteínas monoméricas y oligoméricas.

La PrP de longitud completa de oveja OvPrP (variante A¹³⁶ R¹⁵⁴ Q¹⁷¹), la forma truncada ΔOvPrP (103–234), la PrP de ratón de longitud completa (MoPrP) y la PrP humana de longitud completa (HuPrP) se expresaron en *Escherichia coli* y se purifica como se ha descrito previamente [20]. Todos los mutantes de oveja, OvPrP_H190A, OvPrP_H190KI208M se obtuvieron introduciendo las respectivas mutaciones en el gen ARQ clonado en un vector pET22bC utilizando el kit de mutagénesis QuickChange (Stratagene, La Jolla, CA).

Se usaron diferentes tampones para desalar la proteína en una columna de desalinización HiPrep usando un equipo de cromatografía AKTA FPLC (GE Healthcare): citrato de sodio 20 mM, pH 3,4; acetato de sodio 20 mM, pH 4,6; MOPS 20 mM, pH 7,0. La concentración de proteína final se midió por densidad óptica a 280 nm usando un coeficiente de extinción de 58718 $\text{M}^{-1} \text{cm}^2$ para wt-OvPrP, wt-MoPrP y wt-HuPrP y todos los mutantes y un coeficiente de extinción de 18005 $\text{M}^{-1} \text{cm}^2$ para ΔOvPrP , deducida de la secuencia de aminoácidos.

2.3 . Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)

La ruta de oligomerización del mutante OvPrP_H190KI208M se analizó por SEC utilizando una columna de filtración en gel TSK 4000SW (60 \times 0,78 cm), en citrato de sodio 20 mM, pH 3,4, a 20 $^{\circ}\text{C}$. Varias soluciones de PrP, a la misma concentración, 40 μM , se calentaron a 50 $^{\circ}\text{C}$ durante tiempos de incubación que oscilaron entre 0 y 90 min, en un termociclador Perkin Elmer GenAmp2400.

La formación de los oligómeros O1 y O3 se obtuvo calentando una solución de wt-OvPrP y wt-MoPrP (100 μ M), en citrato de sodio 20 mM pH 3.4, a 60 °C por 12 h y 50 °C por 8 min, respectivamente. Se recogieron fracciones homogéneas de cada oligómero.

2.4 . Dispersión de luz estática (SLS)

Los experimentos de cinética SLS se realizaron en un dispositivo casero con cuatro láseres (407, 473, 533 y 633 nm) usando una cubeta de 2 mm. La oligomerización de wt-OvPrP, wt-MoPrP y los mutantes OvPrP_H190A y OvPrP_H190KI208M se controló en ausencia y presencia de MB a 50 °C y en citrato de sodio 20 mM, pH 3,4 o MOPS 20 mM, pH 7,0. La concentración de las muestras de proteínas estuvo en el rango de 30 a 50 μ M y se analizaron varias proporciones molares de PrP:MB. Para estimar el porcentaje de disminución de la intensidad de SLS en presencia de MB con respecto a aquella sin MB, se consideraron los valores de SLS, después de 60 min, para cada curva.

Para los experimentos de despolimerización, los oligómeros O1 y O3 se incubaron en el dispositivo SLS en ausencia y presencia de MB a 75 y 55 °C, respectivamente. La concentración de oligómeros utilizada fue de 8 μ M y la despolimerización se realizó utilizando una relación molar oligómero:MB de 1:4. El procesamiento de la señal se logró mediante un programa MatLab casero.

2.5 . Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Los termogramas de DSC se obtuvieron mediante un instrumento MicroCal DSC con volúmenes de celda de 0,5 ml, a una velocidad de exploración de 60 y 90 °C/h. Todos los experimentos se realizaron con wt-OvPrP de longitud completa a 50 μ M, utilizando tres condiciones de pH diferentes: citrato de sodio 20 mM, pH 3,4; acetato de sodio 15 mM, pH 4,6 y MOPS 20 mM, pH 7,0. Para cada condición, se registraron al menos dos termogramas con y sin MB, en una relación molar PrP:MB de 1:4. Los termogramas DSC se analizaron con el software ORIGINLab. La desconvolución de las curvas DSC obtenidas a pH 7,0 se logró mediante un programa MatLab casero aplicando el modelo Lumry-Eyring para procesos irreversibles [21]. Para estimar el porcentaje de oligómeros formados en ausencia y presencia de MB, calculamos el área de los picos desconvolucionados correspondientes a la segunda transición.

2.6 . Resonancia magnética nuclear (RMN)

Las titulaciones de MB fueron seguidas por el registro de espectros de RMN de $^1\text{H} - ^{15}\text{N}$ HSQC de muestras de 0,2 mM de Δ OvPrP marcada con ^{15}N en acetato de sodio 20 mM, pH 4,6 y MOPS 5 mM, pH 7,0, a 25 °C en un Varian de 600 MHz . espectrómetro. La señal de agua fue suprimida por la secuencia

de pulsos WATERGATE. Se realizaron adiciones de MB a partir de una solución madre para alcanzar las proporciones molares finales de PrP:MB de 1:1, 1:2, 1:5 y 1:10.

2.7 . Fibrilación de PrP y microscopía electrónica de transmisión (TEM)

La cinética de formación de fibrillas se controló utilizando un ensayo de unión a ThT. Los disolventes y las soluciones se filtraron utilizando filtros de 0,02 μm antes de su uso. Se disolvieron wt-HuPrP y wt-OvPrP liofilizados en MES 50 mM, pH 6,0. MB se disolvió en agua hasta una concentración final de 22–220 μM . La reacción de fibrilación se inició diluyendo la solución madre de PrP a una concentración final de 22 μM en GdnHCl 2,0 M y MES 0,5 mM, pH 6,0. Se preparó una muestra de control sin MB y varias muestras, en diferentes relaciones molares PrP:MB, y se incubaron inmediatamente a 37 °C. Durante la incubación, se recogieron alícuotas de las soluciones a intervalos de tiempo regulares y se diluyeron en acetato de sodio 10 mM, pH 5,0 hasta una concentración final de PrP de 0,3 μM . Luego, se añadió ThT a una concentración final de 10 μM . Para cada muestra, los espectros de emisión se registraron utilizando un espectrofluorímetro Jasco 6200 con una cubeta de paso óptico de 2 mm \times 10 mm y una longitud de onda de excitación de 445 nm. Tanto las rendijas de excitación como las de emisión fueron de 5 nm. Se promediaron los espectros y se determinó la intensidad de fluorescencia en el máximo de emisión (482 nm). Para evaluar si MB podría interferir con la emisión de ThT, se registraron los espectros de fluorescencia de las soluciones que contenían alternativamente solo ThT y tanto ThT como MB, a la concentración máxima utilizada para las muestras PrP-MB. La emisión de ThT fue la misma con y sin MB.

La morfología de las fibrillas se analizó mediante TEM utilizando un microscopio Zeiss EM902 (80 kV). Brevemente, se adsorbieron 10 μL de las muestras de proteínas en rejillas Formvar recubiertas de carbono (Agar Scientific). Luego, cada rejilla se lavó tres veces con agua, se tiñó con acetato de uranilo al 2% y finalmente se secó al aire.

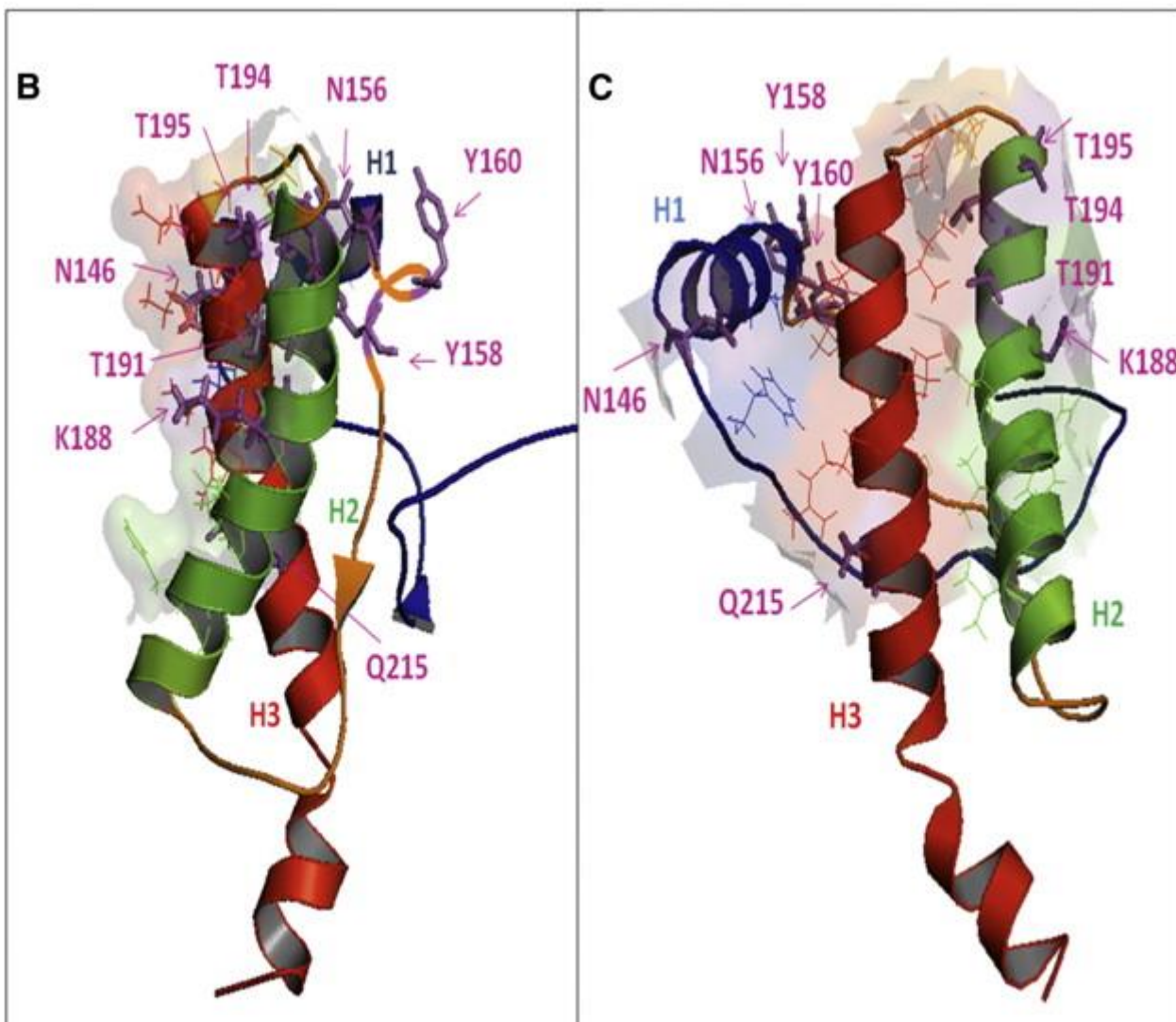
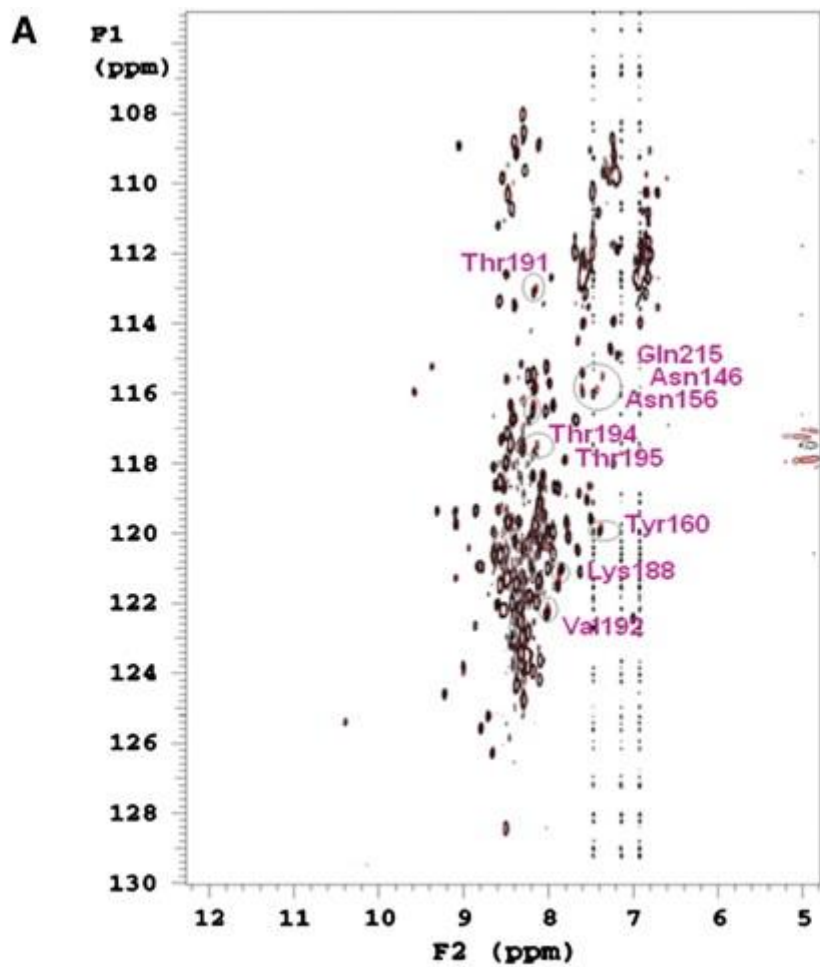
3 . Resultados

3.1 . MB interactúa directamente con el estado fundamental de PrP

Para explorar la interacción de MB con la PrP plegada monomérica nativa, llevamos a cabo experimentos de RMN a pH 4,6 y 7,0. La titulación de ΔOvPrP marcada con ^{15}N (variante ARQ) con MB a pH 4,6 seguida de espectros de ^{15}N -HSQC no produjo variaciones ni en los desplazamientos químicos ni en la intensidad máxima hasta una relación molar PrP:MB de 1:10 (datos no mostrados). Este resultado fue confirmado por experimentos de DSC (Fig. S1 complementaria) realizados en

wt-OvPrP a pH 4.6, que no mostraron variación de la temperatura de fusión en presencia de MB, lo que sugiere que MB no tiene ningún efecto estabilizador o desestabilizador en el nativo. estructura PrP.

Por el contrario, las titulaciones de RMN a pH 7,0 mostraron pequeñas pero claras perturbaciones de desplazamiento químico de hasta nueve resonancias, a saber, N146, N156, Y158, Y160, K188, T191, dos del tramo multitreonina T193-196, presumiblemente T194 y T195 y Q215. ([Figura 1A](#)). La identificación de estos picos nos permitió mapear la interacción en una hendidura bastante extendida en la superficie de la proteína (1024 \AA^3), que podría albergar MB. La hendidura está revestida por alrededor de 20 residuos provenientes de la región alrededor de la hélice H1 y principalmente de la hélice H2 y la región N-terminal de la hélice H3 ([Fig. 1B](#) y C). De los nueve residuos con cambios químicos perturbados por la adición de MB, seis (N146, K188, T191, T194, T195 y Q215) caen en la cavidad, y la mayoría de ellos están ubicados en la punta C-terminal de H2. Los residuos restantes fuera de la cavidad, Y158 e Y160, se encuentran en el bucle que conecta la hélice H1 con la hebra S2, mientras que N156 es el último residuo H1. La presencia dentro de la cavidad de un alto número de residuos ionizables (1 Arg, 2 Lys, 1 His y 5 Glu), que pueden afectar la distribución de carga, explica bien la dependencia del pH de la interacción de la hendidura con la molécula MB positiva ([Figura 1B](#) y C). La carga efectiva de His180 y de cinco Glu (pKa aproximado de 6 y 4, respectivamente) puede desempeñar un papel clave en la atracción de la molécula MB positiva, dentro del intervalo de pH explorado de 4,6 a 7,0, siendo su pKa marcadamente influenciado por el entorno proteico.

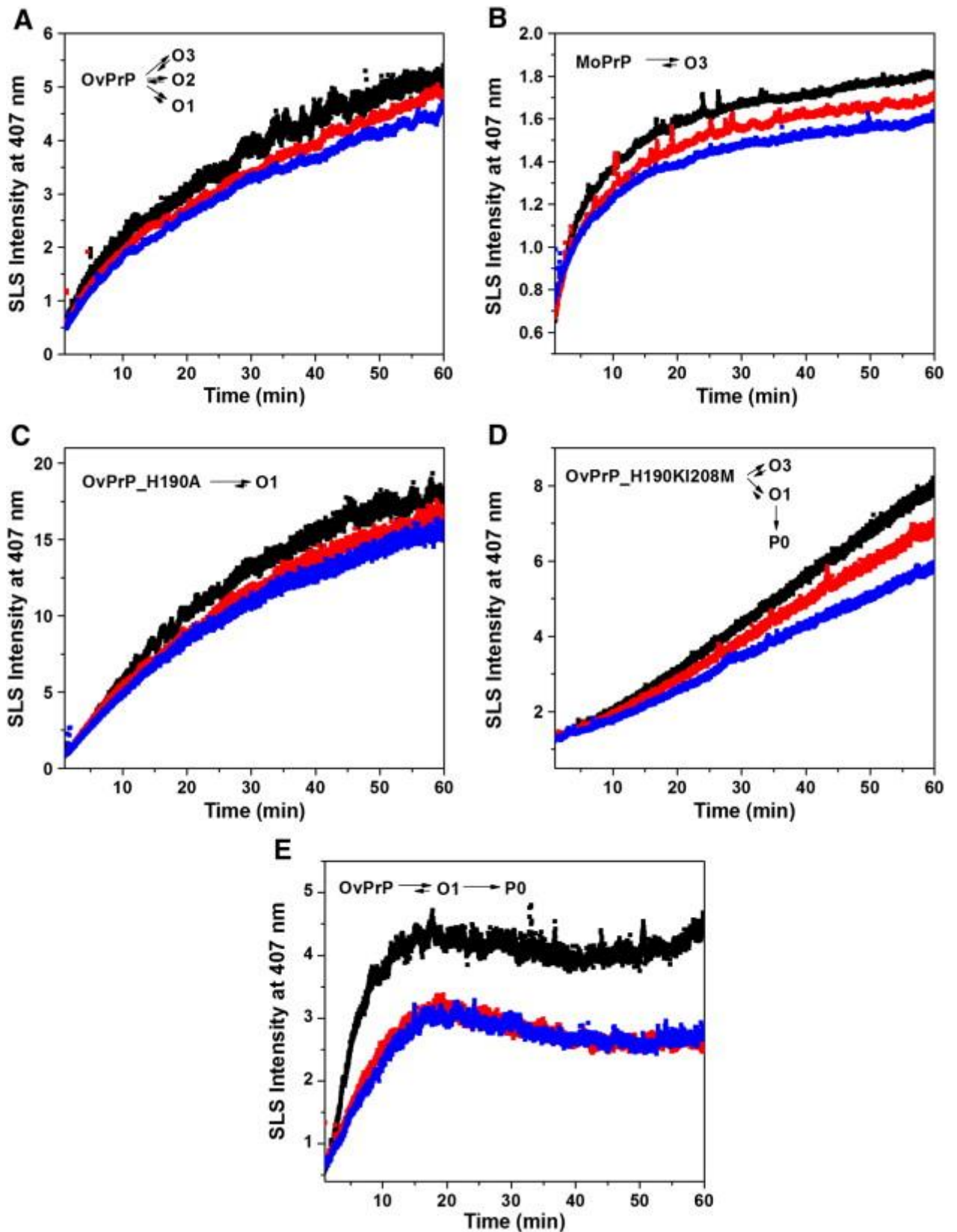


1. [Descargar : Descargar imagen de alta resolución \(463KB\)](#)
2. [Descargar: Descargar imagen a tamaño completo](#)

Figura 1 . Mapeo de la superficie de interacción con MB en el estado plegado nativo de PrP. (A) Superposición del espectro de ^{15}N -HSQC de ΔOvPrP (negro) con el espectro de ΔOvPrP titulado con MB (magenta) en una proporción molar de PrP:MB de 1:5. Se indica asignación de las resonancias que se desplazan más de 0,03 ppm. (B) Representación de cinta de la estructura ΔOvPrP (pdbcode 1y2s). La hendidura de la superficie de unión está sombreada. La cavidad está revestida por cadenas laterales de aproximadamente 20 residuos provenientes del bucle S1H1 en azul (F144, N146), hélice H1 en azul ([E149](#)), hélice H2 en verde ([H180](#) , V183, N184, V187, [K188](#) , T191, V192, T194, T195), bucle H2H3 en naranja ([E199](#)) y hélice H3 en rojo ([E203](#) , I206, [K207](#), [E210](#), [R211](#), [E214](#) , Q215). Los nueve residuos subrayados son ionizables. Los nueve residuos con resonancias perturbadas por la adición de MB se dibujan como barras en magenta; los restantes se dibujan como líneas del mismo color del elemento de estructura secundaria al que pertenecen. (C) La misma representación que en (B), girada unos 90° . (Para la interpretación de las referencias al color en la leyenda de esta figura, se remite al lector a la versión web de este artículo).

3.2 . El azul de metileno afecta la cinética de la oligomerización de PrP pero no la despolimerización

En trabajos previos se demostró que la PrP sufre un proceso de polimerización tras el tratamiento térmico, acompañado de la formación de diferentes poblaciones de oligómeros, dependiendo de las especies de PrP, mutantes y condiciones experimentales utilizadas [\[22\]](#) , [\[23\]](#) , [\[24\]](#) . En particular, a pH 3,4, se demostró que la wt-OvPrP se oligomeriza en tres oligómeros diferentes, denominados O1, O2 y O3, mientras que la wt-MoPrP y la variante OvPrP_H190A dan lugar principalmente a los oligómeros O3 y O1, respectivamente (consulte el esquema de reacción en la [Fig. 2](#) A–C). Además, hemos diseñado y producido un nuevo mutante, OvPrP_H190KI208M, para el cual el perfil SEC correspondiente reveló la formación de O3 y ensamblajes similares a fibrillas, denominados PO (Figura complementaria S2).



1. [Descargar](#) : [Descargar imagen de alta resolución \(393KB\)](#)

2. [Descargar](#): [Descargar imagen a tamaño completo](#)

figura 2 Cinética de polimerización de las diversas formas de PrP ensayadas, en ausencia y presencia de MB. Curvas SLS de evolución

temporal, registradas monitoreando la señal de intensidad a 407 nm y a pH 3,4 de (A) wt-OvPrP, (B) wt-MoPrP, (C) OvPrP_H190A, (D) OvPrP_H190KI208M, y a pH 7,0 de (E) wt-OvPrP. Las curvas cinéticas registradas en ausencia de MB se representan en negro, las curvas cinéticas registradas con una relación molar PrP:MB de 1:1 en rojo y con una relación molar PrP:MB de 1:3 en azul. El esquema de la reacción de oligomerización también se muestra en cada panel.

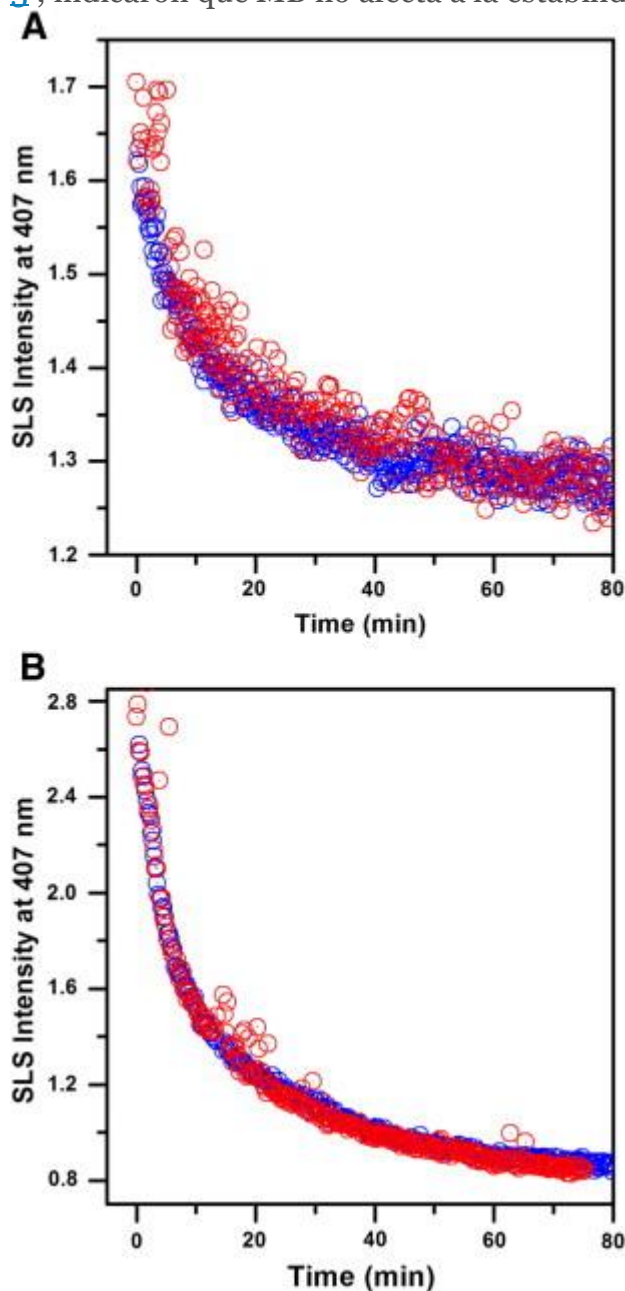
Para evaluar si MB interfiere específicamente en una ruta de oligomerización de PrP en particular, monitoreamos la cinética de polimerización de wt-OvPrP, wt-MoPrP y las variantes OvPrP_H190A y OvPrP_H190KI208M por SLS, en presencia y ausencia de MB, a pH 3.4.

Las curvas cinéticas SLS de todas las formas de PrP probadas se muestran en la [Fig. 2](#) A–D. En todos los casos, los perfiles cinéticos obtenidos en presencia de MB diferían de los obtenidos en ausencia de MB, y cuanto mayor era la concentración de MB, más disminuía la intensidad de la señal de SLS.

Para obtener una estimación cuantitativa del efecto de MB, evaluamos la disminución de la intensidad de SLS, que es indicativa de la tasa de oligomerización o de la disminución en el tamaño de los oligómeros. Los resultados mostraron que, a pH 3,4, MB disminuyó la intensidad de la señal de wt-OvPrP, wt-MoPrP y OvPrP_H190A en aproximadamente un 10 % con una relación molar PrP:MB de 1:1, y en aproximadamente un 15 % con una relación molar de 1 :3. Para la variante OvPrP_H190KI208M, la disminución de la señal de intensidad de SLS fue de aproximadamente un 15 % y un 30 % en comparación con la proteína sola, en proporciones molares de PrP:MB de 1:1 y 1:3, respectivamente.

Teniendo en cuenta que se observó una interacción directa por RMN a pH 7,0, también se realizaron experimentos cinéticos SLS a este pH en wt-OvPrP. Bajo esta condición, el tratamiento térmico de la proteína da lugar a la formación de ensamblajes de fibrillas principalmente O1 y P0 (ver esquema de reacción en la [Fig. 2](#) E), como se describió previamente [\[24\]](#). Curiosamente, la intensidad de SLS disminuyó en aproximadamente un 40 %, ya con una relación molar PrP:MB de 1:1, lo que indica un efecto significativamente mayor que con un pH de 3,4 ([Fig. 2A](#)). Este comportamiento general muestra claramente que MB es capaz de ralentizar la tasa de oligomerización de PrP, tanto a pH 3,4 como a 7,0, aunque el efecto es mucho mayor en condiciones neutras. En conjunto, estos experimentos sugieren que MB afecta de manera más eficiente la ruta de los ensamblajes O1 y P0 que se ven favorecidos a pH neutro. Para determinar si la disminución de ensamblajes de oligómeros se debe a su desestabilización en presencia de MB, llevamos a cabo experimentos de despolimerización SLS en

los dos oligómeros más representativos O1 y O3, en ausencia y presencia de MB. Las curvas de despolimerización isocinética SLS, que se muestran en [la Fig. 3](#), indicaron que MB no afecta a la estabilidad de los conjuntos de oligómeros.



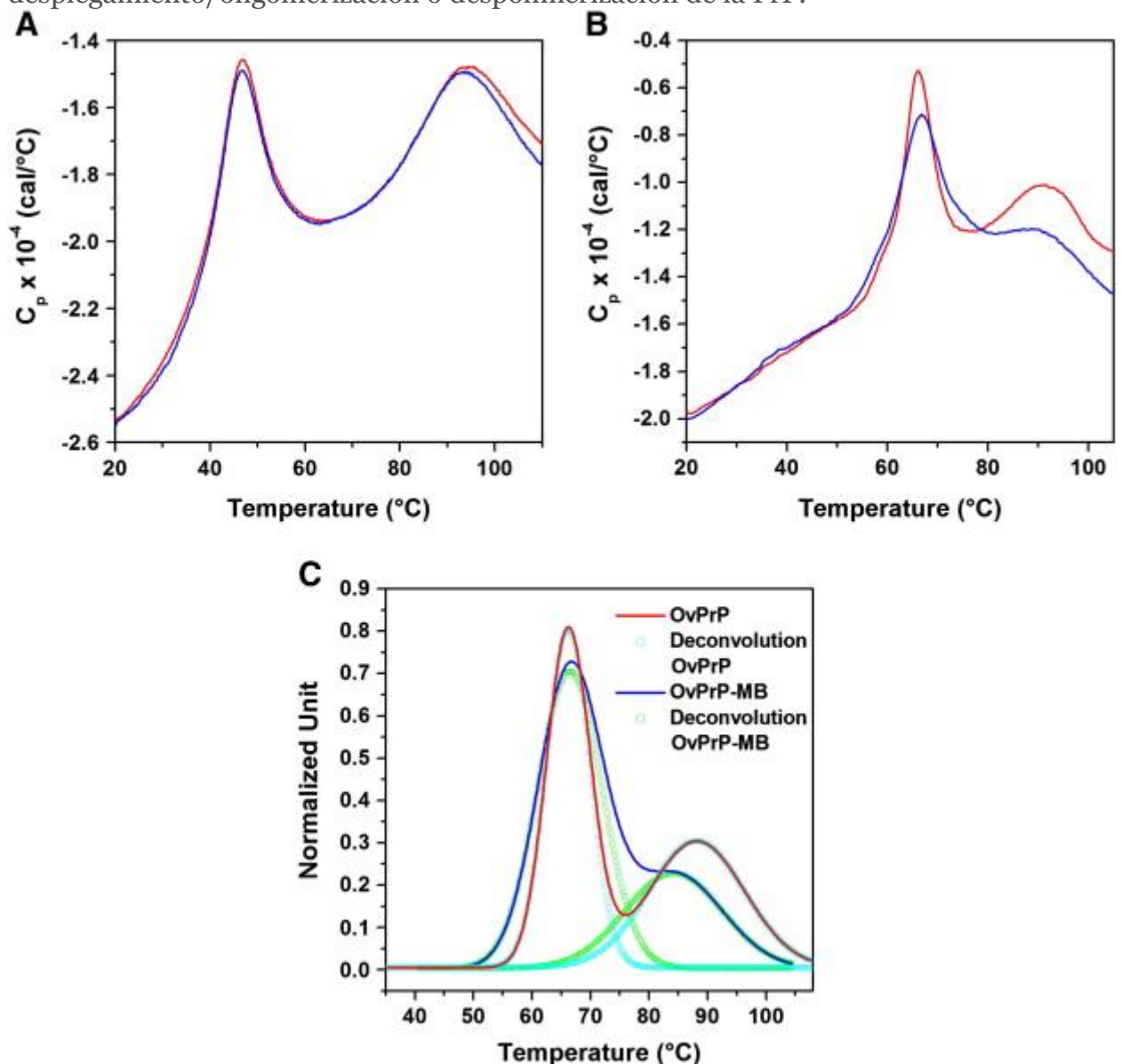
1. [Descargar](#) : [Descargar imagen de alta resolución \(239KB\)](#)
2. [Descargar](#): [Descargar imagen a tamaño completo](#)

Figura 3 . Cinética de despolimerización de oligómeros de PrP. Curvas SLS de evolución temporal, registradas monitorizando la intensidad de la señal en 407 nm, en ausencia y presencia de MB, a pH 3,4 de (A) O3 y (B) O1 oligómero. Las curvas cinéticas registradas en ausencia de MB se representan en azul, y las curvas cinéticas registradas en una relación molar PrP:MB de 1:4 están en rojo.

3.3 . MB limita la cantidad de oligómeros de PrP

Para evaluar los efectos de MB en el proceso de despliegue/oligomerización de PrP, se registraron termogramas DSC de wt-OvPrP, a pH 3,4 y 7,0, en ausencia y presencia de MB. Los termogramas DSC, a ambos pH, mostraron dos picos endotérmicos correspondientes a dos transiciones, en concordancia con experimentos previos [25] , [26] . Estas dos transiciones se explicaron como un proceso de oligomerización/desdoblamiento de PrP, seguido de un proceso de despolimerización [25] .

En condiciones ácidas, los termogramas con y sin MB son muy similares (Fig. 4A) . El área de ambos picos, así como las temperaturas de transición en los dos termogramas, son aproximadamente comparables, detectándose una pequeña reducción del área solo para el segundo pico, en presencia de MB. Este hallazgo indica que, a pH 3,4, el MB apenas influye en el proceso de desplegamiento/oligomerización o despolimerización de la PrP.



1. [Descargar : Descargar imagen de alta resolución \(519KB\)](#)
2. [Descargar: Descargar imagen a tamaño completo](#)

Figura 4 . Termogramas DSC de wt-OvPrP, en ausencia (en rojo) y presencia (en azul) de MB, a (A) pH 3,4 y (B) pH 7,0. (C) Desconvolución de las curvas DSC experimentales obtenidas a pH 7,0. *Las líneas continuas corresponden a los datos C_p experimentales* . Los símbolos representan las curvas C_p predichas (en cian sin MB, en verde con MB) de cada pico de transición en el que las curvas globales se pueden desconvolucionar. La relación molar PrP:MB fue 1:4.

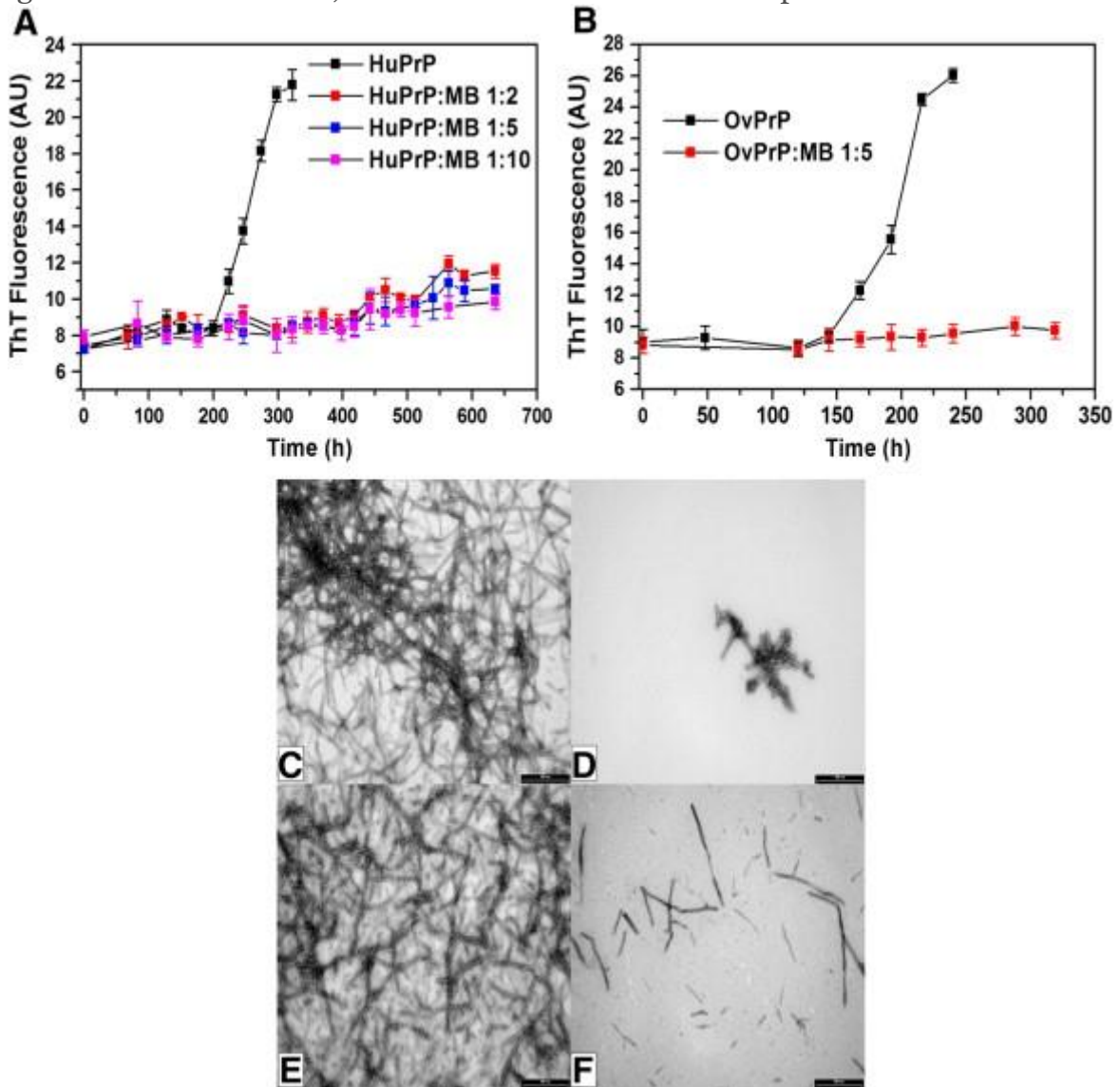
Por el contrario, en condiciones neutras, el termograma de wt-OvPrP con MB es marcadamente diferente al de ausencia de MB. En particular, el área del segundo pico se reduce considerablemente (C, la deconvolución de los primeros picos, obtenidos con y sin MB, no muestra diferencias significativas. A diferencia de la deconvolución de los segundos picos, relativa a la despolimerización de los oligómeros formados en el primero transición, revela diferencias significativas tanto en el área superficial como en la temperatura de transición. De hecho, en presencia de MB, el área del pico se reduce en aproximadamente un 28 %, lo que indica una disminución significativa de la formación de oligómeros, y la temperatura de transición disminuyó en aproximadamente 4 [Fig. 4 B](#)). Dado que esta área es proporcional a la cantidad relativa de oligómeros formados durante la primera transición, los termogramas se han desconvolucionado para obtener una estimación cuantitativa de la reducción de oligómeros observada en presencia de MB. Como se muestra en [la Fig. 4](#) °C, de acuerdo con el modelo de Lumry-Eyring, en el que la concentración de oligómeros es directamente proporcional a la segunda temperatura de transición [\[21\]](#) , [\[26\]](#) .

Estos hallazgos confirman completamente que MB interfiere significativamente con la formación de oligómeros de PrP a pH fisiológico, al reducir tanto la tasa de oligomerización, como se observa por SLS, y la cantidad de oligómeros formados a lo largo de la ruta de oligomerización.

3.4 .MB suprime por completo la formación de fibrillas de PrP

Finalmente, también se estudió la acción del MB sobre la formación de fibrillas. Las fibrillas wt-HuPrP y wt-OvPrP se generaron a pH 6,0 en ausencia, como control, y en presencia de MB. La formación de fibrillas de PrP se controló mediante un ensayo de unión a ThT. En la [Fig. 5 A y B](#) se muestran las curvas cinéticas de la formación de fibrillas wt-HuPrP y wt-OvPrP, a diferentes relaciones molares PrP:MB. Para ambas especies de PrP, en ausencia de MB, la intensidad de la señal de ThT aumenta gradualmente con una forma sigmoidea, lo que indica la formación de fibrillas de PrP. Diferentemente, en presencia de

MB, dentro del rango $1:0 < \text{PrP:MB} < 1:2$, se observa una fase de latencia más prolongada, que aumenta de manera dependiente de la dosis (consulte las figuras complementarias S3A y B) y, con proporciones molares de PrP:MB iguales o inferiores a 1:2, la formación de fibrillas fue completamente inhibido



1. [Descargar : Descargar imagen de alta resolución \(360KB\)](#)
2. [Descargar: Descargar imagen a tamaño completo](#)

Figura 5 . Inhibición de la fibrilación de wt-HuPrP y wt-OvPrP mediada por MB. Mediciones de fluorescencia ThT de fibrilación de (A) wt-HuPrP y (B) wt-OvPrP en ausencia y presencia de varias concentraciones de MB. Los resultados representan medias \pm DE ($n = 3$). Imágenes TEM de fibrillas wt-HuPrP formadas (C) en ausencia de MB (como control) y (D) en presencia de MB en una relación molar HuPrP:MB de 1:5. Imágenes TEM de fibrillas wt-OvPrP formadas (E) en ausencia de MB (como control) y (F) en presencia de MB en una relación molar OvPrP:MB de 1:5. Barra de escala: 0,5 μm .

Las imágenes TEM (Fig. 5 C-F) obtuvieron una valiosa confirmación de que la MB suprime la formación de fibrillas . Tanto para wt-HuPrP como para wt-OvPrP, se observaron estructuras fibrilares típicas en ausencia de MB (Fig. 5 C y E). Por otro lado, al inspeccionar toda la cuadrícula de EM, se observó muy poco o ningún material fibrilar para las muestras incubadas con MB en proporciones molares de PrP:MB inferiores a 1:2 (Fig. 5 D y F). Las imágenes TEM de las soluciones en relaciones molares PrP:MB superiores a 1:2 confirman los resultados obtenidos por los ensayos de fluorescencia ThT, que muestran la formación de fibrillas, incluso si se detectó una pequeña disminución en la cantidad de fibrillas (Fig. S3C-F complementaria).).

4 . Discusión

Un campo ampliamente explorado en las enfermedades priónicas es la evaluación, principalmente in vitro, de compuestos que pueden interferir en la conversión de PrP^c → PrP^{sc} y ser potencialmente utilizados como fármacos contra estas enfermedades. Se han informado diferentes estrategias de descubrimiento de fármacos [27] , [28] , [29] , pero para muchos de estos compuestos, la potencialidad clínica no está clara debido a obstáculos farmacológicos. Por estas razones, buscamos una molécula conocida que pudiera cumplir con las características de seguridad requeridas para la administración de fármacos a humanos y animales, y que en realidad podría considerarse para futuras *investigaciones in vivo* . aplicaciones Las propiedades farmacocinéticas y toxicológicas del MB son bien conocidas. Más importante aún, se ha demostrado que MB traspasa la barrera hematoencefálica [11] , [12] y, por lo tanto, es adecuado para atacar a la PrP en el cerebro. Los datos previos sobre los efectos beneficiosos del MB para el tratamiento de la neurodegeneración debida al mal plegamiento y la agregación de proteínas [9] , [10] sugieren una acción general del MB como compuesto antiagregación. En cuanto al prión, el MB ya fue investigado hace una década [17] . En células infectadas con priones ScN2a de neuroblastoma, se demostró que MB es citotóxico para estas células y no afecta la PrP^{sc} formación. De todos modos, cabe señalar que su alta toxicidad para las células ScN2a podría no haber permitido examinar su eficacia contra la formación de PrP^{sc} [17] . Más recientemente, se obtuvieron datos positivos sobre glóbulos rojos filtrados con priones tratados con MB utilizados para transfusiones neonatales para reducir el riesgo de transmisión de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob variante [18] . Por lo tanto, valdría la pena realizar más estudios. En este trabajo, proporcionamos la primera evidencia clara de un efecto de MB en las vías de formación de fibras y oligómeros de PrP, in vitro, y un mecanismo por el cual esto ocurre.

Al diseccionar la acción de MB a lo largo de cada paso de la ruta de agregación de PrP, demostramos que MB (i) se une directamente a una hendidura superficial de PrP nativa, (ii) afecta significativamente la tasa cinética de oligomerización de todas las formas de PrP utilizadas, (iii)) limita la cantidad de oligómeros formados durante el proceso de oligomerización/despliegue inducido por calor, y (iv) suprime completamente la formación de fibrillas. Curiosamente, se observó sistemáticamente una dependencia del pH de la acción de MB, impulsada por la distribución de carga variable de la hendidura en la superficie de PrP, en todos los experimentos de RMN, SLS y DSC, aunque estas técnicas midieron entidades distintas, en condiciones muy diferentes. A pH 3,4 y 50 °C, el análisis SLS mostró un menor efecto de MB en el proceso de oligomerización de PrP con respecto al pH neutro. Por otro lado, solo a pH 7,0, los experimentos de DSC y NMR mostraron una clara influencia de MB. De hecho, DSC reveló un marcado efecto de MB en los procesos inducidos por calor. La titulación por RMN reveló una clara variación del desplazamiento químico de 9 residuos de la PrP monomérica a temperatura ambiente. Los principales efectos se observaron consistentemente a pH fisiológico, lo que indica que MB es adecuado para actuar de manera eficiente *in vivo*. Vale la pena señalar que se observó un mayor efecto de inhibición para la reacción de oligomerización que genera especies similares a fibras, como para el doble mutante. Esto sugiere que MB puede tener una acción inhibitoria dirigida hacia la fibrilación, lo que fue confirmado por experimentos TEM que indicaron claramente la inhibición completa de la formación de fibrillas, por debajo de una relación molar PrP:MB de 1:2.

Nuestros resultados concuerdan con los datos de la literatura sobre otras proteínas amiloidogénicas de las que se desprende que la oligomerización y/o la fibrilación son los pasos afectados por la MB, aunque su forma de acción parece muy variable [13] , [14] , [15] , [16] . De hecho, MB puede tener diferentes objetivos y, por lo tanto, diferentes modos de acción antiagregación. Para el péptido A β ₄₂ , Necula et al. [13] informaron que MB inhibe la oligomerización a través de una estabilización del ensamblaje prenuclear A β ₄₂ . En su investigación de los efectos sobre los oligómeros solubles de A β ₄₂ de MB y otras moléculas aromáticas pequeñas, Ladiwala et al. [30] destacaron su acción de remodelación de agregados de proteínas maduras mediante la conversión de oligómeros solubles en agregados no tóxicos fuera de ruta. Además, se ha demostrado que MB bloquea la interacción de unión tau-tau, lo que inhibe la formación de filamentos de tau *in vitro*, aunque artículos recientes argumentan la falta de efecto de MB sobre la agregación de tau *in vivo* [14] , [31] . MB

también es capaz de inhibir la formación de fibrillas de TDP-43 mediante la unión de dímeros y oligómeros [16].

En cuanto a la PrP, cabe destacar que nuestros resultados in vitro no contradicen los obtenidos por Korth et al. [17], que se obtuvieron en condiciones muy diferentes, específicamente en células de neuroblastoma ScN2a infectadas por una cepa priónica dada. El presente estudio se realizó in vitro usando una variedad de técnicas biofísicas. Creemos que nuestros resultados pueden contribuir a comprender la acción de MB en los distintos pasos en la ruta hacia la formación de fibra.

Los potenciales agentes anti priónicos hasta ahora evaluados actúan a través de diferentes mecanismos. Se demostró que estos compuestos antagonizan la conversión de PrP mediante una interacción directa con la PrP nativa [32], [33], [34] o actuando sobre las especies de PrP formadas a lo largo de la ruta de oligomerización/fibrilación [29] o secuestrando la autoinfectiosa - plantilla de propagación PrP^{sc} [35]. Nuestros resultados indican claramente una interacción directa entre MB y la PrP plegada monomérica nativa, a pH fisiológico, y descartan una interacción directa con las formas oligoméricas de PrP. Específicamente, los experimentos de RMN mostraron que MB se une a una hendidura externa que contiene residuos pertenecientes a la punta C-terminal de la hélice H2 (Fig. 1 B). Esta parte, junto con la región alrededor de la hélice H1, son regiones desprotegidas, que tienen una gran cantidad de enlaces H de la columna vertebral expuestos al solvente [19]. De hecho, estos enlaces H no están protegidos contra la interacción del agua. Como resultado, las regiones que incorporan dichos enlaces H son estructuralmente más lábiles y podrían actuar como *lugares* de agregación, lo que lleva a la polimerización fibrilar [19]. En este escenario, la unión de MB a la hendidura de la proteína puede dificultar la formación de oligómeros y, por lo tanto, bloquear el camino hacia la formación de fibras. Sin embargo, cabe señalar que, aunque nuestros resultados no muestran ninguna interacción directa con las formas oligoméricas de PrP, no descartan la hipótesis de una inferencia de MB en intermediarios tempranos que preceden a la formación de oligómeros.

En resumen, nuestro trabajo es el primero que muestra la gran potencialidad del MB como compuesto antiagregante para la conversión de priones. La hendidura expuesta al solvente (Fig. 1 B y C) que encontramos alojando MB encarna la punta C-terminal de la hélice H2, una región PrP estructuralmente inestable conocida que puede favorecer estructuras parcialmente desplegadas con un potencial resultante de agregación [19]. Un fármaco como MB, que encaja bien en la cavidad, puede comportarse entonces como un obstáculo

eficaz para la agregación. En particular, se avala la eficacia del MB en condiciones fisiológicas, antagonizando tanto los procesos de oligomerización como los de fibrilación. Esta es una característica muy valiosa de MB porque interfiere con ambas formas de PrP que transmiten la toxicidad y la infectividad en las enfermedades priónicas. De hecho, se informó que los oligómeros solubles o las fibrillas insolubles son neurotóxicos *in vitro* e *in vivo* [36] , [37] , mientras que las fibrillas de PrP también demostraron ser infecciosas. *in vivo* [38] . En conclusión, estos resultados allanan el camino para la evaluación de MB en estudios *in vivo* y pruebas preclínicas para enfermedades priónicas.

Agradecimientos

El apoyo financiero para este trabajo fue proporcionado por el PRIN 2007, MIUR, Roma, por el Universidad de Nápoles "Federico II", Italia y por el Instituto Nacional Francés de Investigación Agronómica (INRA) , incluido INRA-Package, Alliance Biosecure. AP y KP recibieron el apoyo de MRC (subvención ref. U117584256).

Apéndice A.Dato suplementario

[Descargar : Descargar archivo PDF de Acrobat \(394KB\)](#)

Cifras complementarias.

Artículos recomendados

Referencias

[1]

SJ DeArmond

Enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Creutzfeldt-Jakob: superposición de mecanismos patogénicos

actual Opinión Neurol. , 6 (1993) , págs. 872 - 881

[_View PDF](#)

[Referencia cruzadaVer registro en ScopusGoogle Académico](#)

[2]

Prusificador SB

Charla de Shattuck: enfermedades neurodegenerativas y priones

N. ingl. J.Med. , 344 (2001) , págs. 1516 - 1526

[Ver registro en ScopusGoogle Académico](#)

[3]

A. Aguzzi , C. Haass

Juegos jugados por proteínas rebeldes en trastornos priónicos y enfermedad de Alzheimer

Ciencia , 302 (2003) , págs. 814 - 818

[Ver registro en ScopusGoogle Académico](#)

[4]

KF Winklhofer , J. Tatzelt , C. Haass

Las dos caras del mal plegamiento de proteínas: ganancia y pérdida de función en enfermedades neurodegenerativas

EMBO J. , 27 (2008) , págs. 336 - 349

[_View PDF](#)

[Referencia cruzadaVer registro en ScopusGoogle Académico](#)

[5]

Prusificador SB

priones

proc. nacional Academia ciencia EE . UU . , 95 (1998) , págs. 13363 - 13383

[Google Académico](#)

[6]

B. Caughey , PT Lansbury

Protofibrillas, poros, fibrillas y neurodegeneración: separando los agregados proteicos responsables de los transeúntes inocentes

año Rev. Neurosci. , 26 (2003) , págs. 267 - 298

[_Ver PDF](#)

[Referencia cruzadaVer registro en ScopusGoogle Académico](#)

[7]

H.Rezaei _

Oligomerización de proteínas priónicas

actual Alzhéimer Res. , 5 (2008) , págs. 572 - 578

[_Ver PDF](#)

[Referencia cruzada](#)[Ver registro en Scopus](#)[Google Académico](#)

[8]

jw kelly

Las conformaciones alternativas de las proteínas amiloidogénicas y sus vías de ensamblaje de múltiples pasos

actual Opinión Estructura. Biol. , 8 (1998) , págs. 101 - 106

[Artículo](#)[Descargar PDF](#)[Ver registro en Scopus](#)[Google Académico](#)

[9]

RH Schirmer , H. Adler , M. Pickhardt , E. Mandelkow

Para que no te olvidemos, azul de metileno...

Neurobiol. Envejecimiento , 32 (2011) , pp. 2325.e7 - 2325.e16

[Artículo](#)[Descargar PDF](#)[Google Académico](#)

[10]

M.Oz , DE Lorke , GA Petroianu _

Azul de metileno y enfermedad de Alzheimer

Bioquímica Farmacol. , 78 (2009) , págs. 927 - 932

[Artículo](#)[Descargar PDF](#)[Ver registro en Scopus](#)[Google Académico](#)

[11]

JL O'Leary , J. Petty , AB Harris , J. Inukai

Tinción supravital de cerebro de mamífero con azul de metileno intraarterial seguido de oxígeno presurizado

Tecnología de manchas. , 43 (1968) , págs. 197 - 201

[_Buscando PDF...](#)

[Referencia cruzada](#)[Ver registro en Scopus](#)[Google Académico](#)

[12]

C. Peter , D. Hongwan , A. Kupfer , BH Lauterburg

Farmacocinética y distribución en órganos del azul de metileno intravenoso y oral

EUR. J. Clin. Farmacol. , 56 (2000) , págs. 247 - 250

[Ver registro en Scopus](#)[Google Académico](#)

[
[1](#)
[3](#)
]

M. Necula , L. Breydo , S. Milton , R. Kayed , WE van der Veer , P. Tone , CG Glabe

El azul de metileno inhibe la oligomerización de amiloide A β al promover la fibrilación

Bioquímica , 46 (2007) , págs. 8850 - 8860

[View PDF](#)

[Referencia cruzada](#)[Ver registro en Scopus](#)[Google Académico](#)

[
[1](#)
[4](#)
]

S. Taniguchi , N. Suzuki , M. Masuda , S. Hisanaga , T. Iwatsubo , M. Goedert , M. Hasegawa

Inhibición de la formación de filamentos de tau inducida por heparina por fenotiazinas, polifenoles y porfirinas

J. Biol. química , 280 (2005) , págs. 7614 - 7623

[Artículo](#)[Descargar PDF](#)[Ver registro en Scopus](#)[Google Académico](#)

[
[1](#)
[5](#)
]

AM Wang , Y. Morishima , KM Clapp , HM Peng , WB Pratt , JE Gestwicki , Y. Osa wa , AP Lieberman

La inhibición de hsp70 por el azul de metileno afecta la función de la proteína de señalización y la ubiquitinación y modula la degradación de la proteína poliglutamina

J. Biol. química , 285 (2010) , págs. 15714 - 15723

[Artículo](#)[Descargar PDF](#)[Ver registro en Scopus](#)[Google Académico](#)

M. Yamashita , T. Nonaka , T. Arai , F. Kametani , VL Buchman , N. Ninkina , SO B
achurin , H. Akiyama , M. Goedert , M. Hasegawa

**El azul de metileno y el dimebón inhiben la agregación de TDP-43 en modelos
celulares**

FEBS Lett. , 14 (2009) , págs. 2419 - 2424

[Artículo](#)[Descargar PDF](#)[Referencia cruzada](#)[Ver registro en Scopus](#)[Google
Académico](#)

C. Korth , BC May , FE Cohen , SB Prusiner

**Derivados de acridina y fenotiazina como farmacoterapéuticos para la
enfermedad priónica**

proc. nacional Academia ciencia EE . UU . , 98 (2001) , págs. 8936 - 8941

[Google Académico](#)

VS Hornsey , C. Casey , K. McColl , H. Young , O. Drummond , L. McMillan , A. Mo
rrison , CV Prowse

**Características de los glóbulos rojos filtrados con priones suspendidos en
plasma inactivado de patógenos (tratado con MB o tratado con disolvente-
detergente) para la exanguinotransfusión neonatal**

Vox cantó. , 101 (2010) , págs. 28 - 34

[Google Académico](#)

A. De Simone , A. Zagari , P. Derreumauxz

Propiedades estructurales y de hidratación de los estados parcialmente desplegados de la proteína priónica

Biografía. J. , 93 (2007) , págs. 1284 - 1292

[Artículo](#)[Descargar PDF](#)[Referencia cruzada](#)[Ver registro en Scopus](#)[Google Académico](#)

H. Rezaei , D. Marc , Y. Choiset , M. Takahashi , G. Hui Bon Hoa , T. Haertlé , J. Grosclaude , P. Debey

Purificación de alto rendimiento y propiedades fisicoquímicas de variantes alélicas recombinantes de longitud completa de proteína priónica de oveja vinculadas a la susceptibilidad a la tembladera

EUR. J. Bioquímica. , 267 (2000) , págs. 2833 - 2839

[_View PDF](#)

[Ver registro en Scopus](#)[Google Académico](#)

JM Sánchez-Ruiz

Análisis teórico de los modelos de Lumry-Eyring en calorimetría diferencial de barrido

Biografía. J. , 61 (1992) , págs . 921-935

[Artículo](#)[Descargar PDF](#)[Ver registro en Scopus](#)[Google Académico](#)

N. Chakroun , S. Prigent , CA Dreiss , S. Noinville , C. Chapuis , F. Fraternali , H. Rezaei

Las propiedades de oligomerización de la proteína priónica están restringidas al dominio H2H3

FASEB J. , 24 (2010) , págs. 1 - 10

[Ver registro en ScopusGoogle Académico](#)

F. Eghiaian , T. Daubenfeld , Y. Quenet , M. van Audenhaege , AP Bouin , G. van der Rest , J. Grosclaude , H. Rezaei

La diversidad en las vías de oligomerización de proteínas priónicas resulta de la expansión del dominio como lo revela el intercambio de hidrógeno/deuterio y el enlace disulfuro

proc. nacional Academia ciencia Estados Unidos , 104 (2007) , págs. 7414 - 7419

[_Buscando PDF...](#)

[Referencia cruzadaVer registro en ScopusGoogle Académico](#)

S. Prigent , H. Rezaei

Ensamblados de PrP: detección de las regiones responsables en la propagación de priones

Prión , 5 (2011) , págs. 69 - 75

[_View PDF](#)

[Referencia cruzadaVer registro en ScopusGoogle Académico](#)

H. Rezaei , Y. Choiset , F. Eghiaian , E. Treguer , P. Mentre , P. Debey , J. Grosclaude , T. Haertle

Los intermedios de despliegue amiloidogénico diferencian las variantes de la proteína priónica de oveja

J. Mol. Biol. , 322 (2002) , págs. 799 - 814

[Artículo](#)[Descargar PDF](#)[Ver registro en Scopus](#)[Google Académico](#)

H. Rezaei , F. Eghiaian , J. Perez , B. Doublet , Y. Choiset , T. Haertle , J. Grosclaude

Generación secuencial de dos oligómeros solubles de proteína priónica ovina estructuralmente distintos que muestran diferentes reactividades bioquímicas

J. Mol. Biol. , 347 (2005) , págs. 665 - 679

[Artículo](#)[Descargar PDF](#)[Ver registro en Scopus](#)[Google Académico](#)

DA Kocisko , GS Baron , R. Rubenstein , J. Chen , S. Kuizon , B. Caughey

Nuevos inhibidores de la formación de proteínas priónicas asociadas a la tembladera en una biblioteca de 2000 fármacos y productos naturales

J. Virol. , 77 (2003) , págs. 10288 - 10294

[_View PDF](#)

[Ver registro en Scopus](#)[Google Académico](#)

V. Perrier , AC Wallace , K. Kaneko , J. Safar , SB Prusiner , FE Cohen

Imitar la inhibición negativa dominante de la replicación de priones a través del diseño de fármacos basado en la estructura

proc. nacional Academia ciencia Estados Unidos , 97 (2000) , págs. 6073 - 6078

[_View PDF](#)

[Ver registro en ScopusGoogle Académico](#)

BE Roberts , ML Duennwald , H. Wang , C. Chung , NP Lopreiato , EA Sweeny , M N Knight , J. Shorter

Una combinación sinérgica de moléculas pequeñas erradica directamente diversas estructuras de cepas de priones

Nat. química Biol. , 5 (2009) , págs. 936 - 946

[_View PDF](#)

[Referencia cruzadaVer registro en ScopusGoogle Académico](#)

AR Ladiwala , JS Dordick , PM Tessier

Pequeñas moléculas aromáticas remodelan oligómeros solubles tóxicos de beta amiloide a través de tres vías independientes

J. Biol. mol. , 286 (2011) , págs. 3209 - 3218

[ArtículoDescargar PDFReferencia cruzadaVer registro en ScopusGoogle Académico](#)

CM Wischik , PC Edwards , RY Lai , M. Roth , CR Harrington

Inhibición selectiva de la agregación de tau similar a la enfermedad de Alzheimer por fenotiazinas

proc. nacional Academia ciencia EE . UU ., 93 (1996) , págs. 11213 - 11218

[_View PDF](#)

[Ver registro en ScopusGoogle Académico](#)

B. Caughey , RE Raza

Inhibición potente de la acumulación de PrP asociada a la tembladera por el rojo congo

J. Neuroquímica. , 59 (1992) , págs. 768 - 771

[_View PDF](#)

[Referencia cruzadaVer registro en ScopusGoogle Académico](#)

K. Kuwata , N. Nishida , T. Matsumoto , YO Kamatari , J. Hosokawa-
Muto , K. Kodama , HK Nakamura , K. Kimura , M. Kawasaki , Y. Takakura , S. Shir-
abe , J. Takata , Y. Kataoka , S. Katamina

Puntos calientes en la proteína priónica para la conversión patogénica

proc. nacional Academia ciencia EE . UU ., 104 (2007) , págs. 11921 - 11926

[_View PDF](#)

[Referencia cruzadaVer registro en ScopusGoogle Académico](#)

AJ Nicoll , CR Trevitt , MH Tattum , E. Risse , E. Quarterman , AA Ibarra , C. Wright
, GS Jackson , RB Sessions , M. Farrow , JP Waltho , AR Clarke , J. Colling

Chaperona farmacológica para el dominio estructurado de la proteína priónica humana

proc. nacional Academia ciencia Estados Unidos , 107 (2010) ,
págs. 17610 - 17615

[_View PDF](#)

[Referencia cruzadaVer registro en ScopusGoogle Académico](#)

S. Caspi , M. Halimi , A. Yanai , SB Sasson , A. Taraboulos , R. Gabizon

La actividad antiprionica del rojo Congo. mecanismo putativo

J. Biol. química , 273 (1998) , págs. 3484 - 3489

[ArtículoDescargar PDFVer registro en ScopusGoogle Académico](#)

YJ Lee , R. Savtchenko , VG Ostapchenko , N. Makarava , I. Baskakov

**La estructura molecular de las fibrillas de amiloide controla la relación entre
el tamaño fibrilar y la toxicidad**

PLoS One , 6 (2011) , pág. e20244

[_View PDF](#)

[Referencia cruzadaVer registro en ScopusGoogle Académico](#)

M. Stefani , CM Dobson

**Agregación de proteínas y toxicidad agregada: nuevos conocimientos sobre
el plegamiento de proteínas, enfermedades de plegamiento incorrecto y
evolución biológica**

J. Mol. Medicina. (Berl.) , 81 (2003) , págs. 678 - 699

[Ver registro en ScopusGoogle Académico](#)

G. Legname , IV Baskakov , HO Nguyen , D. Riesner , FE Cohen , SJ DeArmond , SB Prusiner

Priones de mamíferos sintéticos

Ciencia , 305 (2004)

[Google Académico](#)

Citado por (29)

•

La α -sinucleína y la tau, dos dianas de la demencia

2021, Estudios en Química de Productos Naturales

[Mostrar resumen](#)

•

Exploración de la influencia del azul brillante G en la formación de fibrillas de amiloide de lisozima

2019, Revista Internacional de Macromoléculas Biológicas

Extracto de la cita:

Estas pequeñas moléculas inhibitorias incluyen los polifenoles que contienen anillos fenólicos aromáticos naturales o sintéticos [32,49,50], el colorante sulfonado rojo Congo y compuestos a base de benzofurano [51,52], compuestos a base de acridina [53,54] y flavona derivados [55–57]. También se observaron capacidades de supresión y/o modulación de fibrillas en algunos compuestos biocompatibles de bajo peso molecular, incluidos el azul de metileno [58,59], el azul brillante FCF [12,60] y la eritrosina B [22]. El azul brillante G (BBG) no es tóxico, es biocompatible y es muy permeable a través de la barrera hematoencefálica [61].

[Mostrar resumen](#)

•

Tauopatías de cuatro repeticiones

2019, Avances en Neurobiología

Extracto de la cita:

No en vano, varios inhibidores de este tipo de agregación proteica son efectivos sobre diversos agregados proteicos asociados a enfermedades, lo que permite clasificarlos como inhibidores de agregación de amplio espectro (antiagregantes). Varios antiagregantes de amplio espectro se sometieron a evaluación clínica, por ejemplo, leucometiltioninio (LMTM, azul de leucometileno), que inhibe la formación de agregados de amiloide beta (Irwin et al., 2013), proteína priónica (Cavaliere et al., 2013), tau (Hochgrafe et al., 2015) y TDP-43 (Arai et al., 2010). El LMTM y sus derivados (p. ej., azul de metileno) no mostraron beneficios clínicos en la EA y la FTD de leves a moderadas (Gauthier et al., 2016).

[Mostrar resumen](#)

- **Explorando los efectos del azul de metileno en la fibrillogénesis amiloide de la lisozima**

2018, Revista Internacional de Macromoléculas Biológicas

Extracto de la cita:

Es importante destacar que el azul de metileno se identificó previamente para inhibir la agregación de la proteína tau y evitar que los péptidos A β (1–40) formen fibrillas de amiloide in vitro [62]. Además, la adición de azul de metileno condujo a la supresión tanto de la oligomerización como de la fibrillogénesis de la proteína priónica [63]. Por el contrario, se informó que el azul de metileno ralentiza la oligomerización pero mejora la formación de fibrillas de los péptidos A β (1–42) [45].

[Mostrar resumen](#)

- **Investigación de los efectos de la eritrosina B en la formación de fibrillas de amiloide derivadas de la lisozima**

2017, Revista Internacional de Macromoléculas Biológicas

Extracto de la cita:

Se sugirió que la diacetilcurcumina (un derivado sintético de la curcumina) es capaz de inhibir la generación de fibrillas amiloides derivadas de la lisozima de gallina a través de la interacción de sus grupos acetilo con el residuo Trp 63 de la lisozima [47]. Además, se ha demostrado que varios colorantes biocompatibles de bajo peso molecular, como el azul de metileno [48], el azul brillante FCF [49] y el verde rápido FCF [50], tienen la capacidad de modular las fibrillas de amiloide y/o anular la formación de especies fibrilares derivadas de lisozima de gallina. La eritrosina B, también conocida como FD&C Red No. 3, es un tinte de tetrayodofluoresceína, se utiliza ampliamente como colorante biológico y aditivo de color en alimentos y medicamentos.

[Mostrar resumen](#)

- **El potencial de las moléculas pequeñas para prevenir la formación y toxicidad de oligómeros de tau**

2017, Neuroprotección en la Enfermedad de Alzheimer

[Mostrar resumen](#)

Ver todos los artículos que citan en Scopus

1

Dirección actual: Unité de Génétique Moléculaire, Institut Pasteur, Paris Cedex 15, Francia.

2

Dirección actual: VIB Department of Structural Biology, Vrije Universiteit Brussel, Brussel, Bélgica.

- [Acerca de ScienceDirect](#)
- [Acceso remoto](#)
- [Carrito de compras](#)
- [Anunciar](#)
- [Contacto y soporte](#)
- [Términos y condiciones](#)
- [Política de privacidad](#)

Usamos cookies para ayudar a proporcionar y mejorar nuestro servicio y personalizar el contenido y los anuncios. Al continuar, acepta el **uso de cookies** .

Copyright © 2022 Elsevier BV o sus licenciantes o colaboradores. ScienceDirect® es una marca registrada de Elsevier BV