

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Instituto de Bioquímica Médica



**Enovelamento e Agregação da Cadeia Leve da Imunoglobulina
Envolvida na Amiloidose Primária**

Karinne Marieta Pimenta de Carvalho

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) como um dos requisitos para a obtenção do grau de mestre em ciências.

**Rio de Janeiro- RJ
2007**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Karinne Marieta Pimenta de Carvalho

**Enovelamento e Agregação da Cadeia Leve da Imunoglobulina
Envolvida na Amiloidose Primária**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Instituto de Bioquímica Médica da
Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)
como um dos requisitos para a obtenção do
grau de mestre em ciências.

Orietadora: Débora Foguel

Professora adjunta-IBqM-URFJ

Rio de Janeiro

2007

Carvalho, Karinne Marieta Pimenta,

Enovelamento e agregação da cadeia leve da imunoglobulina envolvida na Amiloidose Primária / Karinne Marieta Pimenta de Carvalho. Rio de Janeiro: UFRJ/ IBqM, 2007

xvii, 107 f.: il.

Orientador: Débora Foguel

Dissertação de Mestrado- UFRJ/ Instituto de Bioquímica Médica/ Programa de Pós- Graduação em Química Biológica,2007.

Referências Bibliográficas: f. 97- 106

I.Foguel, Débora(Orient.). II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Bioquímica Médica, Programa de Pós- graduação em Química Biológica. III. Título.

O trabalho experimental desta tese foi realizado no Laboratório de Agregação Protéica e amiloidoses do Instituto de Bioquímica Médica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a orientação da Profa. Débora Foguel, com recursos da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Karinne Marieta Pimenta de Carvalho

Enovelamento e agregação da cadeia leve da imunoglobulina envolvida na Amiloidose Primária

Tese submetida ao corpo docente do Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em ciências.

Orientador:

- Dra. Débora Foguel

Doutora 1993, pela Universidade federal do Rio de Janeiro
(Profa. Adjunta do Instituto de Bioquímica Médica/CCS/ UFRJ).

Revisor:

- Dr. Robson Queiroz Monteiro

Doutor 2001, pela Universidade Federal do Rio de Janeiro
(Prof. Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica/CCS/ UFRJ).

Membros Titulares da Banca:

- Dra. Margaret Haiganouch Magdesian,

Doutora 2001, pela Universidade de São Paulo
(Profa. Adjunta do Instituto de Bioquímica Médica/CCS/ UFRJ)

-Dr. José Ricardo Murari Pires,

Doutor 1998 pela Universidade de São Paulo
(Prof. adjunto do Instituto de Bioquímica Médica/CCS/ UFRJ)

-Dr. Cristian Follmer,

Doutor 2004, pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul
(Prof. Adjunto da Universidade de Federal do Rio de Janeiro/IQ/UFRJ)

Membros Suplentes da Banca:

-Dr. Robson Queiroz Monteiro,

Doutor 2001, pela Universidade federal do Rio de Janeiro (Prof. Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica/CCS/ UFRJ);

-Dra. Yraima Moura Lopes Cordeiro,

Doutor 2005, pela Universidade federal do Rio de Janeiro
(Prof. Adjunto do Departamento de Fármacos, Faculdade de Farmácia /CCS/ UFRJ)

**À Deus,
Minha abençoada família,
Minha amada Ana Clara
E a duas amigas inimagináveis,
Mônica e Ana Paula,
Dedico.**

O Senhor é meu pastor,
Por isso, nada em minha vida
Faltará
Salmo 22.

Fica sempre um pouco de perfume nas mãos que oferecem rosas!!!

Agradeço imensamente a todas as mãos perfumadas que Deus colocou em meu caminho.

- À Deus pela grandiosidade que és em minha vida, por me carregar no colo quando eu não suportava mais a caminhada, por me fazer forte e persistente. Obrigada pela dor que me aproximou de ti e restabeleceu a minha fé, mesmo ainda sendo tão pequena quanto um grão de mostarda. Obrigada pela minha vida maravilhosa, pela minha saúde, por tantas pessoas lindas que sempre colocou em minha jornada. Esta obra jamais seria possível sem a tua presença. Obrigada por fazer a sua vontade em minha vida, pois o meu caminho é totalmente guiado pelo senhor. Obrigada meu Deus por nunca permitir que eu fracassasse.

- Á minha querida orientadora Débora, obrigada pela oportunidade, pelo incentivo, pela força sempre. Obrigada por ter sido uma orientadora maravilhosa, uma amiga maravilhosa e também uma mãe para mim. Te admiro pelo que és como pessoa, como profissional, como mãe. Te admiro por dar conta de tantos compromissos com grande êxito. Você pra mim é um exemplo maravilhoso de competência, de amor, de luta, inteligência e vitória. Deus não poderia ter me proporcionado melhor orientadora. Obrigada por estes anos de crescimento e de insistência e obrigada principalmente por nunca ter desistido de mim.

- Á minha grande amiga, colaboradora e mestre, Moniquinha, (Jimmi Nêutron) você é um ser humano absurdamente iluminado por Deus, por sua generosidade, por sua doação, por sua inteligência, humildade e dedicação. Para você eu queria abusar de palavras bonitas e difíceis, mas você sabe que não sou boa nisso né? E também eu não conseguiria expressar tudo o que você representa para mim, então vai ao meu mineirês mesmo. À todos os meus amigos eu sou grata, mas você é única, é especial, é demais, muitos me deram força e ajuda, mas você foi mais além, me deu o tempo que não tinha, a dedicação que não precisava, a importância que eu não imaginava que eu tinha. Você me deu a auto-estima, o positivismo, a alegria. Sempre entendendo a minha vida, me apoiando, me guiando, me estimulando. Você sabia a hora em que eu precisava de um café, de uma palavra, de um amigo. Você realmente foi além, muito além. Muito obrigada querida amiga, pelo carinho incondicional que nunca me deixou faltar, pela forte presença que sempre teve em minha vida, principalmente nos momentos mais difíceis. Obrigada por me ajudar em tudo o que precisei. Seu caminho será repleto de flores e frutos porque você é uma cientista apaixonada pelo que faz e não se hesita em gastar o maior tempão ensinando, ensinando e ensinando de novo, principalmente pra mim. Vou sentir saudades demais de você, e feliz das pessoas que tiverem, como eu, a oportunidade de conviver com um ser inimaginável como você. Agradeço á Deus todos os dias por ter colocado você em meu caminho, pois sua amizade e ensinamentos foram essenciais, aliás foram vitais, para a conclusão deste trabalho e para a minha vida. Obrigada por me ensinar que existem quatro coisas na vida que não se recuperam: A pedra depois de atirada, a palavra depois de proferida, a ocasião depois de perdida e o tempo depois de passado. Que tudo o que faz pelas pessoas retorne para você em dobro. Valeu amiga!!!!!!

- À minha querida e grande amiga Ana Paula Dinis (com S) tudo de bom. Obrigada por ser assim exatamente como você é, uma amiga linda que Deus me deu. Ana Você é muito mais do que acha que é, nem se essa tese toda fosse sobre você eu conseguiria te definir. Pois é uma pessoa muito linda, de conteúdo interno, idealismo nos olhos e dois pés no chão da realidade. É um ser humano grandioso que se emociona com um gesto de carinho, um abraço. Você é aquela amiga que curte saudade, que gosta verdadeiramente dos amigos, que fala e escuta principalmente me escuta. Sua alma é tão linda que tem tempo de sorrir bondade, compartilhar vivência e se doar, sempre se preocupando comigo mesmo com uma vida cheia de compromissos difíceis e inadiáveis, muitas vezes desgastantes, mas que você realiza com grande perseverança, pois é altamente competente. Você é uma pessoa que entende, aconselha, busca a verdade e quer sempre aprender, mesmo que seja de uma criança, de um pobre, de um analfabeto, pois é absurdamente humilde. Dona de um enorme coração, desarmado, com muito amor dentro de si. Erra, reconhece, cai e se levanta, tirando lições dos erros. Você é muito especial Ana e não gostar de você é uma missão impossível. Obrigada amiga por nunca ter permitido que eu ficasse só. Levo você comigo pra onde quer que eu vá.

-À minha querida e inteligentíssima aluna de iniciação científica Luana, obrigada por me ajudar neste trabalho, sempre com muita competência e responsabilidade. Por ser essa menininha linda, minha filhinha grande, sempre meiga, devoradora de livros, muito culta e amável. Você ainda vai voar muito alto, pois coloca amor e seriedade em tudo o que faz, será uma grande médica, e quem sabe também uma grande pesquisadora né?? Linda, pode contar comigo sempre em tudo o que precisar, estarei sempre aqui, na torcida por sua vitória. Valeu mesmo!!!

- Ao Fábio, aluno de iniciação científica pela sua contribuição a este trabalho.

- Ao meu amigo Cristian (Doc), muito obrigada por todo o carinho que sempre teve por mim. Meu primeiro amigo no Rio, que já me recebeu de braços abertos e que sempre torceu por mim. Obrigada por me ensinar tantas coisas sobre a vida e o que realmente importa, por me mostrar que a luta precisa ser constante e que tudo sempre tende a melhorar. Você é possuidor de um coração absurdamente generoso, e eu me sinto muito feliz por ter tido a oportunidade de conviver com você. Te admiro pelo que és, pelo seu trabalho e profissionalismo, pela sua inteligência que me fascina, pela sua trajetória de vida...Você é muito especial e obrigada simplesmente por tudo.

- Quero agradecer a professora Andréa, ou melhor, Dedéia, por tanto carinho e consideração, por ser uma pessoa tão linda, meiga e atenciosa. Eu já gostava muito de você antes mesmo de te conhecer, depois que conheci então, nem se fale... Só confirmei todas as maravilhas que falavam sobre você e pude compreender tamanha saudade, pois alguém assim, a gente quer carregar junto pra sempre. Obrigada mesmo.

- A Jujú Cortines, que saudade!!!! Obrigada sempre por tamanho carinho. Com seu jeito único e sincero, que te faz um ser absurdamente especial. Obrigada pelas caronas constantes, por me apresentar Joss Stone e Jack Johnson, tudo de bom. Obrigada pelo carinho que sempre teve comigo e com a Ana clara desde a gravidez, por sempre me alegrar com sua risada gostosa. O lab. não é mais o mesmo sem você e volta logo porque aqui você faz muita falta.

- A querida Carolina Álvares da cunha de Azeredo e Braga, minha amiga caroli, grandiosa como o nome, muito obrigada pela contribuição que deu ao meu trabalho, sempre tirando um tempinho para me ajudar, sempre generosa, humana, alegre, amiga. Com seu jeitinho patricinha que eu acho lindo demais. Carol, você é uma pessoa linda em todos os sentidos, e muito, muito especial pra mim. Vou sentir saudades, muitas saudades, valeu Carolinda!!!!!!!!!!!!!!!

-À Patrícia, obrigada pelo enorme carinho, pela gentileza, por sempre estar de prontidão para ajudar as pessoas, por realizar as festas mais legais, por ser este ser humano lindo que te diferencia sempre. Amiga justa, sincera, divertida, valeu Patinha, você é uma amiga para vida toda.

- A Theo Luiz, né Theo??? Meu amigo mineiro, pessoa absurdamente dedicada ao que faz, companheiro de 485, sempre disposto a ajudar. Um ser humano fantástico, que admiro muito e que merece ser muito feliz pois esbanja bondade! Você ainda vai longe meu amigo, muito obrigada mesmo!!!!

- A Ygara, agora mamãe Ygara, obrigada por todo carinho que sempre teve comigo, por sempre estar de prontidão pra ajudar, pelas altas figurinhas trocadas sobre maternidade, como é gostoso falar disso né? Parece que só temos esse assunto. Yga desejo que você e a família linda que Deus te deu sejam muito felizes, pois vocês merecem tudo de bom e espero ver o lindo do Pedrinho grande e brincando com o meu docinho. Muito obrigada!!!

-Ao Ivan, uma pessoa alegre que sempre me recebe tão bem, muito obrigada por tamanho carinho.

-À Ana Cris, por ser uma pessoa otimista, alegre, forte. Obrigada por todo carinho que sempre teve comigo, por sempre me entender e estar disposta a ajudar. Obrigada por tudo.

-Ao professor Robson que gentilmente revisou minha tese, colaborando com grandes sugestões a este trabalho.

-Aos membros da banca examinadora que gentilmente aceitaram fazer parte desta dissertação.

-À Roseany, por sempre estar nos ajudando, facilitando e dinamizando o nosso trabalho. Sempre gentil e carismática. Futura grande artista. Obrigada Rose.

-Ao professor Gilberto por nos proporcionar fazer as imagens de AFM.

-Ao Alexandre, sempre dedicando seu tempo a realização das imagens de AFM, contribuindo com seu conhecimento para este trabalho, me ajudando a fazer diferentes protocolos de preparação da mica até chegarmos às imagens. Muito obrigada e boa sorte na sua jornada.

-Ao Emerson e Dona Silvia, pela ajuda sempre, pelo carinho.

-À Wal e Rafa, que estão fazendo vôos mais altos mas que sempre me acolheram com grande carinho e consideração. Espero sempre nos encontrarmos, obrigada e saudades.

-Aos futuros Mestrados Gui e Carlos, obrigada sempre pelo carinho. Podem ter certeza que a dedicação e competência de vocês trará muito frutos. Valeu!!!

-À todos os alunos de IC do lab, especialmente Nathália e Susanna. Nathália por ser sempre meiga e atenciosa e Sú por sempre dividir a Moniquinha comigo. Obrigada meninas.

-Aos amigos maravilhosos que fiz aqui e que tenho um enorme carinho, Latgé, Shanna, Priscila, Mari, Thiago, Jú, Dani e Gi, Fernando, Palmieri, Nathália, Ricardo, Yanina, Daniel.

-Aos professores Jerson e André, muito obrigada pelo carinho.

- À minha amada família LTPV/LAPA, obrigada por me receberem com enorme carinho, por me ensinarem tantas coisas. Obrigada por contribuírem para minha formação de maneira tão generosa, dando cada um, um pouquinho de si para a realização deste trabalho. Obrigada por cuidarem de mim sempre e pelo enorme carinho que todos vocês tem com Ana Clara. Aqui é o meu segundo lar e vocês são também a minha família, minha grande família.

-À todos os amigos do RMN, principalmente Catarina, Cris Ano Bom e Renata, muito obrigada pelo enorme carinho de vocês.

-Ao Pablo, meu amigo Pablito, obrigada por sempre me ajudar em tudo o que preciso, por ser tão gentil e obrigada principalmente por fazer a minha amiga Ana feliz!!!

-À Yraima, por ser sempre tão gentil, muito inteligente e dedicada, obrigada sempre Yra.

-À minha doce Maria Fernanda, que divide com a gente o seu espaço, que sempre aparece com novidades, curiosa, adora o Stryer. Você é muito linda e inteligente querida e obrigada por sempre alegrar minha vida com seu sorriso, suas perguntas e por querer ser pesquisadora quando crescer só pra descobrir uma solução para as doenças né?????

-Aos meus Tios Evandro e Mariângela, muito obrigada por cuidarem de mim e da Ana clara, pelo carinho com que nos recebe em sua casa, pelo coração bondoso que possuem, por dividirem comigo o computador, muitas vezes abrindo mão do seu trabalho. Sempre muito justos e caridosos. Esta tese jamais estaria pronta se não fosse o amor de vocês. Nada que eu faça pagará o que fazem por nós, por isso peço a Deus para que sempre os abençoe, enchendo suas vidas de alegrias e realizações e que tudo o que fazem pelos outros retornem á vocês em dobro. Sou muito, muito grata.

-À minha vovó linda, que tem linda até no nome, que esbanja bondade, semeia alegrias e tem um lugarzinho direto ao lado de Deus. Tenho muito orgulho de ser sua neta, a pessoa que sou hoje eu devo á você, ao seu amor ao seu carinho. Sempre na luta né vovó??? E Deus sempre ali nos dando o pão de cada dia. Suas orações e o seu amor foram muito importantes para que eu não desistisse e assim chego até aqui, aos trancos e barrancos, não foi fácil, mas está sendo muito, muito abençoado. Obrigada alma mais linda por ser parte da minha vida.

-Às minhas titias Soraia e Cristina, obrigado é pouco pra agradecer tudo que sempre fizeram e fazem por mim. Muitas vezes abrindo mão dos seus sonhos em função dos meus. Obrigada por sempre me mostrarem que tenho capacidade para crescer, para me desenvolver. Obrigada por todas as orações, por sempre estarem grandemente presentes em minha vida, me mostrando o caminho, me fazendo ir mais além. Obrigada por me ensinarem que é sempre melhor ficar no pior quarto do melhor hotel do que no melhor quarto do pior hotel, nunca me esqueço destas opções sempre que vou fazer uma escolha importante e é por isso que estou aqui hoje e um dia ainda estarei no melhor quarto do melhor hotel, vocês são a minha base,

meu exemplo de luta e dedicação, obrigada por existirem em minha vida e por me fazerem voar alto.

-À alma pura da minha mãezinha amada, que saudade!!!! Fico imaginando a alegria que está sentindo neste momento ao me ver chegar tão longe. Sinto todos os dias o seu amor que me acalenta, as suas mãos em minha cabeça, o seu olhar sereno, me trazendo tranquilidade e me fazendo erguer a cabeça e continuar minha luta. Tantos anos já se passaram desde que você se foi, tanta vitória eu queria compartilhar com você, sinto tanta saudade!!!! Obrigada mamãe por estar sempre junto de mim e eu sei e sinto que você está aqui hoje, sentada no auditório como deveria ser. Te amo.

-Ao meu avô, meu exemplo de luta, de caráter, de força. Saudades demais sinto de ti, mas sei que está junto da minha mãe olhando por mim. Obrigada.

-À minha querida família, essência das minhas vitórias, aconchego dos momentos difíceis, razão da minha vida, obrigada por sempre entenderem a distancia, a ausência, a atenção que muitas vezes não pude dar, as datas que não conseguimos comemorar juntos, as alegrias e tristezas que não compartilhamos, Amo todos vocês!!!!

-À Ana Flávia, minha amada irmã, obrigada por entender a minha constante ausência.

-À eterna Lumiar, estou sempre com vocês em minhas lembranças, minhas doces lembranças.

“Um coração, de mel de melão, de sim e de não, é feito um bichinho, no sol da manhã, novelo de lã, no peito da mãe, bate o coração de Ana Clara e quem mais chegar, água, terra, fogo e ar.”

-À minha princesa Ana Clara, vida da minha vida, razão da minha existência!!!

Para você, minha linda, eu darei sempre o melhor pedaço do bolo, o maior espaço de tempo, todo o meu carinho e o meu amor, pois você é a melhor parte de mim. É, e sempre será para você e por você. Obrigada meu doce mais doce que o doce de batata doce, por alegrar a minha vida e fazer meu mundo mais colorido, por me fazer forte a cada dia e principalmente por ter me feito mãe, pois é o papel que eu desenvolvo com maior competência e amor. Estarei sempre junto de você, em todos os seus passos, todas as suas conquistas!!! Amo ter você no meu colo, te dando todo carinho do mundo, pois é uma obra linda de Deus em minha vida, me tornou criança de novo, e eu amo isso!!! Quero que você seja para sempre o meu carrapatim e ficar bem junto de mim, bem grudadim. Te amo muito, muito, muito...

-À Creche escola Criativa, muito obrigada a direção, professores e funcionários, por terem cuidado com tamanha competência e amor da minha boneca para eu poder concluir este trabalho, obrigada pelo carinho e atenção que nunca nos deixaram faltar. Que Deus abençoe sempre todos vocês!!!!!!!!!!!!!!

-Aos grandes amigos que fiz no Rio de Janeiro, todos muito especiais.

-Às amigas do coração, Bia, Lola, Ani e Kamila que mesmo longe estão sempre junto de mim, Obrigada sempre!!!

-A todos que direto ou indiretamente me ajudaram na realização deste trabalho meu muito obrigado.

Resumo

A amiloidose primária (AL) é caracterizada pela deposição de agregados compostos predominantemente pela região variável (VL) da cadeia leve da imunoglobulina em órgãos e tecidos, em especial nos rins. O subgrupo $\lambda 6$ das cadeias leves parece ser o mais associado a esta doença. Tem sido observado que a proteína de cadeia leve de pacientes com AL acumula mais de 10-12 mutações simultaneamente, que podem estar associadas com a doença. Nesta tese foram estudados vários mutantes pontuais que foram desenhados com a finalidade de reproduzir o efeito destas mutações. Nós comparamos a estabilidade termodinâmica da proteína 6aJL2 e dos variantes F2S, F2W, H8S, R25G, F2P, P7S, Wil and Jto, utilizando o triptofano 35 como sonda. Este triptofano apresenta baixo rendimento quântico quando a proteína se encontra no seu estado nativo, mas sua fluorescência sofre um grande aumento mediante desnaturação. Utilizamos a alta pressão hidrostática como ferramenta para perturbar o sistema e os experimentos foram realizados a 37 e a 25°C. Através das curvas de desnaturação por pressão foi possível calcular os parâmetros termodinâmicos (ΔG e ΔV) de enovelamento das cadeias leves. Através dos nossos dados foi possível dividir os variantes em três famílias que apresentam baixa (Wil), média (F2S, F2W, R25G, F2P, P7S e Jto.) e alta (6aJL2 e H8S) estabilidade termodinâmica. Esses dados foram confrontados com as propriedades amiloidogênicas apresentadas por estes variantes, onde observamos haver uma correlação inversa entre estabilidade termodinâmica e amiloidogenicidade. Estudos de desnaturação térmica também foram realizados onde a estrutura secundária foi avaliada. Para finalizar, estudos de estabilidade das fibras amilóides constituídas pelas variantes 6aJL2, R25G e F2S crescidas tanto por extensão como por agitação foram realizados. Foi observado que existe uma notável diferença de resposta destas fibras frente ao emprego de alta temperatura e alta pressão hidrostática. Estes estudos estruturais vem a contribuir na melhor compreensão dos processos moleculares que desencadeiam a amiloidose primária.

Abstract

Primary amyloidosis (AL) is characterized by the deposition in vital organs and tissues of aggregates composed predominantly of the variable region (VL) of immunoglobulin light chains, especially in the kidneys. The $\lambda 6$ subgroup has been found to be preferentially associated with this disease. It has been observed that the LC protein from patients with AL accumulates more than 10-12 mutations simultaneously along its sequence, which could be associated with the disease. In the present study, several point mutants were used aiming to mimic the effect of all these mutations. In order to compare the thermodynamic stability of the proteins 6aJL2 and its variants F2S, F2W, H8S, R25G, F2P, P7S, Wil and Jto, we followed the Trp35 fluorescence. This residue is a good probe to follow structural changes, since its quantum yield is environment dependent. In the native state is observed a residual fluorescence emission owing to the presence of cysteins near to Trp 35, however in the denaturated state the quenching induced by cysteins is interrupted and an increase in the Trp fluorescence is observed. We used high hydrostatic pressure as a tool to disturb the system and the experiments were done at 25 or 37°C. The folding thermodynamic parameters of the LCs (ΔG and ΔV) were calculated. Based on these data it was possible to separate the variants in three families which present low (Wil), medium (F2S, F2W, R25G, F2P, P7S and Jto.) and high (6aJL2 and H8S) thermodynamic stability. These differences in stability can be related with the amyloidogenic properties presented by these variants, where we observe an inverse correlation between thermodynamic stability and amyloidogenicity. Studies of thermal denaturation were performed and the secondary structure was evaluated. Also, we observed that the amyloid fibrils formed by the variants 6aJL2, R25G and F2S grown by extension or by agitation present great differences in stability. These structural studies are important to understand the molecular mechanism involved in the primary amyloidosis pathology.

Lista de abreviaturas

AFM: Microscopia de Força Atômica.

AL: Amiloidose Primária.

APH: Alta Pressão Hidrostática.

bis-ANS: bis 8-anilinaftaleno-1-sulfonado.

C_L: Domínio constante da cadeia leve.

D.A: Doença de Alzheimer

D.P: Doença de Parkinson

DTT: Ditioneítrito

IgA: Imunoglobulina A

IgD: Imunoglobulina D

IgE: Imunoglobulina E

IgG: Imunoglobulina G

IgM: Imunoglobulina M

K_d: Constante de dissociação.

LC: Cadeia leve da Imunoglobulina.

P_{1/2}: Pressão capaz de induzir a metade do processo de desnaturação.

ThT: Tioflavina – T

ThS: Tioflavina- S

Trp: Triptofano

V_L: domínio variável da cadeia leve

ΔG: Variação de energia livre de Gibbs.

ΔV: Variação de volume.

ÍNDICE

1. Introdução	1
1.1. Enovelamento protéico	1
1.2. Doenças amiloidogênicas	7
1.3. Características morfológicas dos agregados amiloidogênicos	10
1.4. Amiloidose Primária	13
1.5. Imunoglobulinas	14
1.6. O Mieloma Múltiplo	19
1.7. A estabilidade termodinâmica do V _L (domínio variável) e a agregação amilóide	21
1.8. A associação preferencial do subgrupo λ VI na Amiloidose AL	22
2.0. Objetivos	25
2.1. Objetivo Geral	25
2.2. Objetivos específicos	25
3.0. Materiais e Métodos	27
3.1. Reagentes	27
3.2. Proteínas utilizadas	27
3.3. Medidas espectroscópicas	28
3.3.1. Medidas de fluorescência intrínseca	29
3.3.2. Medidas de fluorescência extrínseca	30
3.3.3. Espalhamento de luz	33
3.4. Análise da importância das pontes de enxofre na estabilidade protéica	34
3.5. Dicroísmo circular	35
3.6. Preparo de fibras amilóides de cadeia leve	36

3.7. Agentes físicos desnaturantes	38
3.7.1. Alta Pressão Hidrostática	38
3.8. Microscopia de força atômica	42
4.0. Resultados	45
4.1. Comparação da estabilidade da cadeia leve da imunoglobulina tipo selvagem e variantes frente ao emprego de alta pressão hidrostática: o efeito da temperatura e da ponte dissulfeto	45
4.2. Formação de intermediários de enovelamento sob pressão- o uso da sonda bis-ANS	62
4.3. Desnaturação térmica da cadeia leve da imunoglobulina monitorada pela perda de estrutura secundária: forma selvagem versus variantes	65
4.4. Estudos de força atômica com as fibras amilóides da cadeia leve da imunoglobulina	69
4.5. Estudo de estabilidade das fibras amilóides da cadeia leve da imunoglobulina – efeito da alta pressão e da alta temperatura	72
5.0. Discussão	80
5.1. Estabilidade termodinâmica da cadeia leve da imunoglobulina	80
5.2. Estabilidade <i>versus</i> Amiloidogenicidade	89
5.3. Pressão e alta temperatura parecem levar as fibras amilóides da cadeia leve da imunoglobulina para uma nova conformação	91
6.0. Conclusão	95
7.0. Bibliografia	97

1. INTRODUÇÃO

1.1 Enovelamento protéico

As proteínas são polímeros formados por aminoácidos, estando presentes em todos os seres vivos. A seqüência desses aminoácidos corresponde à estrutura primária de uma proteína e sua composição determina a estrutura secundária (α -hélices, folhas- β e voltas), cuja disposição tridimensional no espaço determinará a estrutura terciária. Em alguns casos, a proteína pode possuir mais de uma subunidade e a reunião dessas subunidades origina a estrutura quaternária. A conformação final adequada e funcional da proteína chama-se de estrutura nativa (Anfinsen, 1973). As proteínas são as responsáveis pela construção e manutenção das células e estão envolvidas em todas as funções fisiológicas, desde o transporte do oxigênio que respiramos até a interpretação das imagens que vemos.

Os primeiros trabalhos de grande importância que começaram a abordar questões relativas ao enovelamento das proteínas foram realizados ainda no início do século XX. A desnaturação de proteínas foi mostrada em 1911 através do uso de agentes físicos (Chick e Martin, 1911), e em 1931 mostrou-se que este processo podia ser reversível (Anson e Mirsky, 1931). A desnaturação pode, ainda, ser irreversível, como por exemplo, no caso da ovalbumina, que quando aquecida desnatura e coagula (Tanford, 1970). Em 1961, Anfisen e colaboradores mostraram que toda a informação necessária para o enovelamento

de uma proteína estava contida na sua estrutura primária e isso lhe rendeu o prêmio Nobel, em 1972.

A estrutura nativa de uma proteína é alcançada quando todas as interações possíveis são formadas entre os domínios da proteína e a água é excluída de dentro da estrutura protéica (Dobson, 2003). Tal estrutura nativa é mantida pelo somatório de interações fracas (pontes de hidrogênio, interações iônicas, interações hidrofóbicas e interações de van der Waals), altamente específicas que se estabelecem entre diferentes regiões da proteína. Além disso, ainda podem ser formadas as pontes dissulfeto, que são ligações covalentes e, portanto, fortes, que, quando presentes, também desempenham papel importante na manutenção da conformação nativa (Creighton, 1990). Conseqüentemente, mutações na estrutura primária de uma determinada proteína podem ser capazes de afetar o enovelamento e o estado nativo, o que pode ser evidenciado em estudos que empregam mutantes das proteínas (Wetzel, 1994; Foguel e cols, 1995 Brown e cols, 1997).

Quando exposta a uma condição adversa (pH e temperaturas extremas, solventes orgânicos, alta pressão hidrostática e outros) uma proteína pode perder parcial ou totalmente sua estrutura, passando do estado nativo para o estado desnaturado, perdendo por conseguinte sua função. Baldwin e Zimm sugerem que as proteínas nunca alcançam um estado completamente desnaturado (random coil ou estrutura randômica), já que elementos de estrutura secundária tênues e flutuantes parecem existir, mesmo quando na presença de altas

concentrações de agentes caotrópicos. Esta estrutura flutuante poderia auxiliar no enovelamento, já que facilitaria a chegada ao estado nativo (Baldwin e Zimm, 2000). A desnaturação protéica, em geral, não envolve mudanças nas ligações covalentes, embora o rompimento de pontes dissulfeto possa, muitas vezes, levar à desnaturação. São as interações fracas, como pontes de hidrogênio, interações de van der Waals e interações iônicas, que mantêm as proteínas no estado nativo sendo afetadas no processo de desnaturação (Lehninger e cols, 1993).

O processo de enovelamento protéico deve ser rápido o suficiente de modo a evitar que a cadeia polipeptídica se direcione para vias alternativas e não produtivas (Creighton, 1990). Vários resultados com diversas proteínas detectaram a presença de intermediários em sua via de enovelamento sugerindo que estes seriam passos obrigatórios para todas as proteínas (Kim e Baldwin, 1990; Silva e cols, 1992). Contudo, estudos com proteínas pequenas mostraram que estas possuem um enovelamento muito rápido com provável ausência de intermediários (Jackson, 1998). Estes intermediários podem levar a proteína a assumir sua conformação nativa (enovelamento produtivo) ou ainda podem levar ao aparecimento de agregados protéicos (enovelamento não produtivo), conforme discutido mais a frente.

Nos anos 70, experimentos onde se monitorava a cinética de enovelamento da Ribonuclease A mostraram a presença de intermediários parcialmente estruturados na sua via de enovelamento (Tsong e cols, 1971).

Posteriormente, foi mostrado que estas espécies parcialmente enoveladas eram compactas e possuíam parte da estrutura secundária presente no estado nativo, mas apresentavam estrutura terciária flutuante (Ptitsyn, 1991). A estas espécies foi atribuído o nome de “molten globule”, ou seja, glóbulo fundido (Ohgushi e Wada, 1983).

O modelo mais aceito atualmente para descrever o enovelamento protéico é o do funil energético. Este modelo pode ser usado para enovelamentos protéicos com ou sem intermediários. Na parte superior do funil estariam as conformações desenoveladas com maior energia livre, menor número de contatos por resíduos e o menor número de interações nativas. À medida que o enovelamento prossegue, a proteína passaria pelo funil, alcançando o estado nativo localizado na região mais estreita, onde a energia livre é menor e a proteína já possui o número máximo de contatos entre os resíduos. Para o enovelamento em um único passo, o funil seria liso e a proteína passaria do estado desenovelado ao estado enovelado sem passar por conformações intermediárias persistentes (Figura 1a). Já no enovelamento através de intermediários, o funil apresentaria rugosidades que seriam percorridas pelas proteínas e que representariam conformações alternativas (Figura 1b). Esses intermediários direcionam a proteína ao estado nativo, já que evitam que esta visite caminhos não produtivos (Wolynes e cols, 1995; Onuchic e cols, 1995; Horwich, 2002).

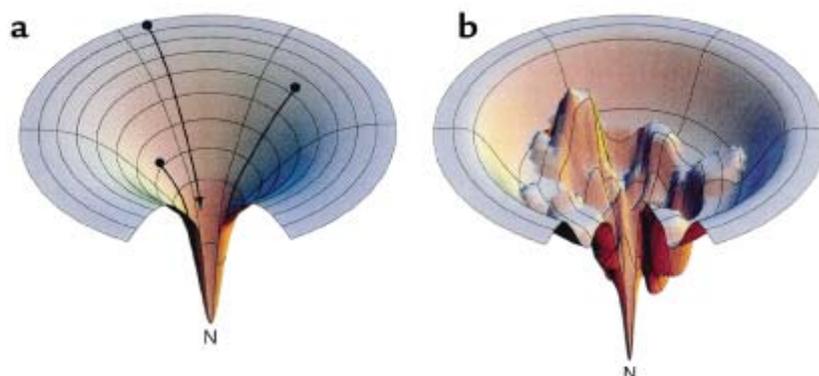


Figura 1. Esquema representativo da barreira energética envolvida no enovelamento protéico. **a-** representa o enovelamento em que a proteína passa do estado desenovelado para o enovelado sem formação de intermediários. **b-** representa o enovelamento através de intermediários, com a existência de rugosidades que seriam percorridas pelas proteínas até o estado enovelado. N, estado nativo. (Horwich, 2002).

A caracterização destas estruturas parcialmente enoveladas é de grande importância, principalmente devido ao papel desempenhado por elas no processo de conversão de proteínas celulares solúveis e funcionais em agregados protéicos, conforme esquematizado na figura 2 (Kelly, 1998; Dobson, 2004). Fica claro perceber que esses intermediários representam verdadeiras encruzilhadas podendo ser afunilados na rota produtiva, que gera a proteína nativa, ou na rota improdutiva, que gera oligômeros e agregados de diferentes morfologias. As doenças amiloidogênicas que são causadas pela presença de agregados fibrilares de proteínas celulares normalmente solúveis são exemplos de enovelamento não produtivo ou incorreto (Harper e Lansbury, 1997).

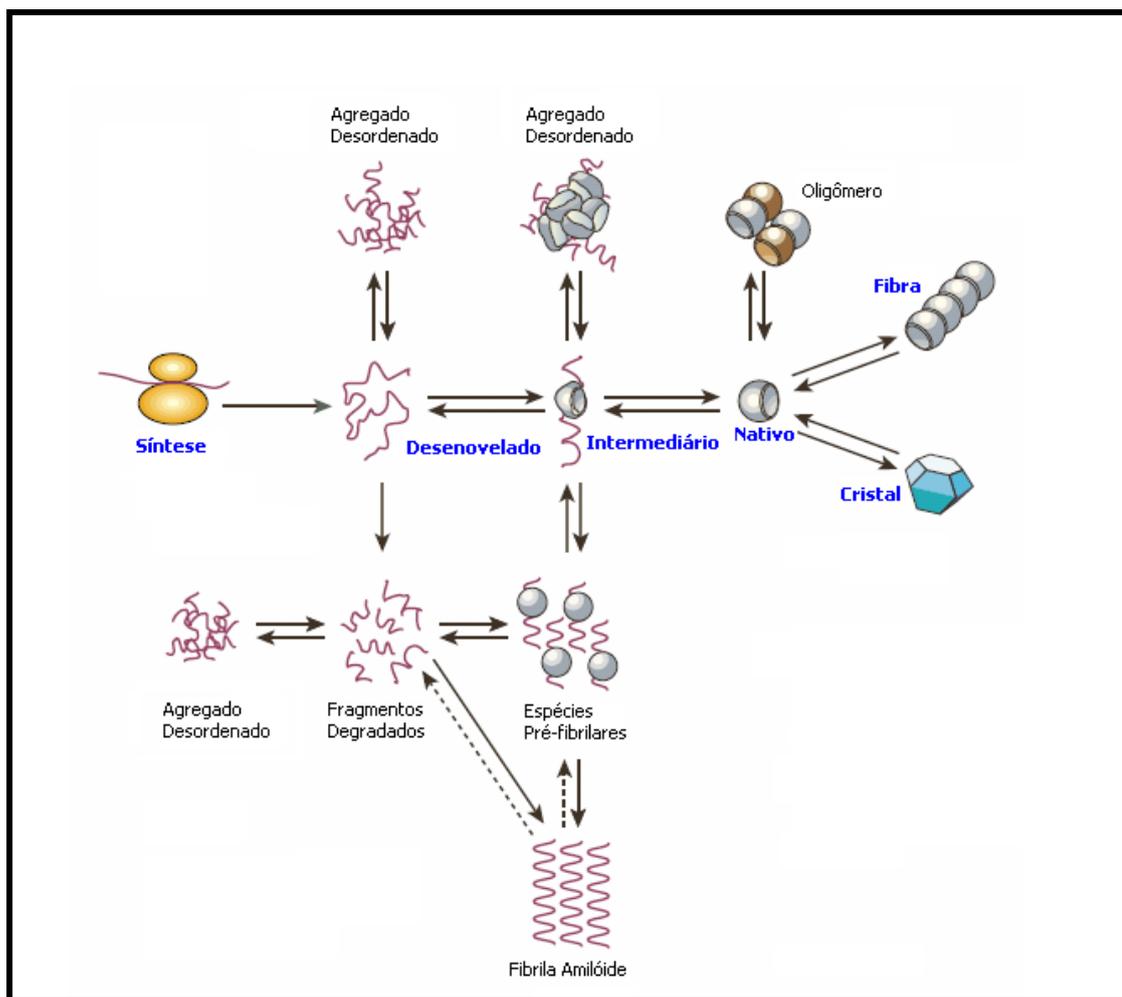


Figura 2. Vias de enovelamento protéico. O enovelamento protéico pode apresentar duas vias principais: a produtiva, que culmina na produção de proteínas nativas, e a improdutiva, que resulta em agregados e na degradação de proteínas não fisiológicas. As espécies pertencentes a via produtiva estão destacados em azul e as da via não produtiva em preto. O destino funcional de uma proteína é ser sintetizada e enovelada corretamente, passando ou não pela formação de intermediários. Uma vez enovelada corretamente, a proteína em questão pode formar oligômeros, fibras ou cristais. Estes complexos podem ser representados, respectivamente, pela hemoglobina, colágeno ou por cristais utilizados na difração de raios-X. O resultado mais comum do desvio do enovelamento produtivo é a formação de agregados amorfos e não funcionais. Estes agregados podem ser formados a partir de intermediários de enovelamento ou de fragmentos de proteínas degradadas. Em alguns casos, esses agregados podem se organizar como fibras amilóides, que são responsáveis por inúmeras doenças. Figura adaptada de DOBSON, 2003.

A formação de agregados protéicos tem um papel importante na patogênese de diversas doenças amiloidogênicas, incluindo doença de Alzheimer, encefalopatias espongiiformes transmissíveis, Amiloidose sistêmica senil, polineuropatia amiloidogênica familiar, doença de Parkinson, Amidose primária, dentre outras. Por mecanismos ainda não completamente elucidados, acredita-se que uma determinada proteína passe a assumir uma conformação patogênica causando a doença.

1.2 Doenças amiloidogênicas

O balanço entre o enovelamento correto e incorreto tem um papel importante em eventos fisiológicos e patológicos. Muitos estudos vem demonstrando que diversas doenças estão relacionadas ao mal-enovelamento de proteínas (Ferrão-Gonzales e cols, 2000, Cordeiro e cols, 2001, Horwich, 2002). Atualmente são conhecidas cerca de 20 proteínas envolvidas em doenças causadas por depósitos protéicos fibrilares (Kelly, 1996 e Tabela 1). Curiosamente, estas proteínas não são semelhantes com relação ao seu conteúdo de estrutura primária, secundária, terciária, ou mesmo no que diz respeito à função. Entretanto, elas são capazes de assumir uma conformação rica em folhas β que se empacotam formando as chamadas fibras amilóides (Kelly, 1996). Por este motivo, são chamadas de doenças amiloidogênicas.

Dentro do grupo destas doenças existem aquelas que causam neurodegeneração, uma vez que os agregados protéicos se depositam no cérebro.

Dentre estas estão, por exemplo, as doenças de Alzheimer (DA) e Parkinson (DP). A DA foi descoberta no início do século XIX quando o médico alemão Alois Alzheimer (1864-1915), ao fazer uma autópsia, descobriu no cérebro de seu paciente, lesões que nunca haviam sido observadas. Tratava-se de uma lesão cerebral onde os neurônios apareciam atrofiados em varias regiões do cérebro que se mostrava cheias de placas e fibras retorcidas enroscadas umas nas outras. Desde então, esse tipo de depósito extracelular ficou conhecido como placas senis, característica fundamental da DA.

Os mecanismos que envolvem a produção desses agregados amilóides vêm sendo estudados intensamente por diversos pesquisadores com o propósito de se conseguir descobrir um método/agente capaz de evitar a sua formação ou mesmo sua eliminação nos pacientes já acometidos por essas doenças.

Proteína	Amiloidose associada	Distribuição
Imunoglobulina de cadeia leve	Amiloidose de cadeia leve	Sistêmica
Lipoproteínas Apo-SAA Apo-AI	Amiloidose sistêmica reativa	Sistêmica
Transtirretina	Amiloidose sistêmica senil Polineuropatia amiloidótica familiar	Sistêmica
Polipeptídeo amiloide das ilhotas (IAPP)	Diabetes do tipo II	Pâncreas
Calcitonina	Carcinoma medular da tireóide	Tireóide
Fator Atrial Natriurético	Amiloidose cardíaca senil	Coração
Beta 2- microglobulina	Complicações para pacientes com deficiência renal	Músculo esquelético
Peptídeo beta amiloide Prion Cistatina C	Doença de Alzheimer GSS, FFI, CJD Angiopatia hereditária amiloidótica	Cérebro
Gelsolina	Amiloidose familiar tipo finlandês	Sistêmica
Queratina	Amiloidose cutânea	Pele
Fibrinogênio	Amiloidose hereditária renal	Rins
Prolactina	Amiloidose da glândula pituitária	Glândula pituitária

Tabela 1: Proteínas amiloidogênicas e amiloidoses (Adaptada de Rochet e Lansbury, 2000).

1.3. Características morfológicas dos agregados amiloidogênicos

O termo “amilóide” foi cunhado em 1853 por Virchow para definir os depósitos encontrados em tecidos, que, inicialmente se pensava serem compostos por carboidratos (Virchow, 1853). Algum tempo depois, Friedrich e Kekule mostraram que os depósitos amilóides eram, na verdade, compostos de proteínas. Contudo, somente em 1959, com a melhor caracterização desses agregados e o uso da técnica de microscopia eletrônica, foi possível verificar a existência de fibras protéicas nestes depósitos (Cohen e Calkins, 1959). As fibras amilóides podem ser formadas por diferentes proteínas, conforme apontado anteriormente, mas, em geral, sua estrutura tridimensional possui algumas características comuns. As fibras amilóides são formadas por vários filamentos protéicos associados lateralmente (Shirahama e Cohen, 1967) que possui tamanho e comprimento variáveis (Koo e cols, 1999). Os pesquisadores Blake e Serpel usaram técnicas mais avançadas, como a radiação de luz síncroton e a difração de raios-X, e propuseram um modelo para a fibra amilóide que consiste em fitas β cruzadas que correm perpendicularmente ao eixo da fibra, onde as pontes de hidrogênio que estabilizam as folhas β se arranjam paralelamente ao eixo da fibra (Blake e Serpel, 1996) (Figura 3). A fibra apresenta, em média, um diâmetro compreendido entre 40 a 120 Å bem como capacidade de ligar vermelho de congo e tioflavina T (Sipe, 1994; Blake e Serpel, 1996; Ramirez-Alvarado, 2000), dois corantes específicos para agregados amilóides.

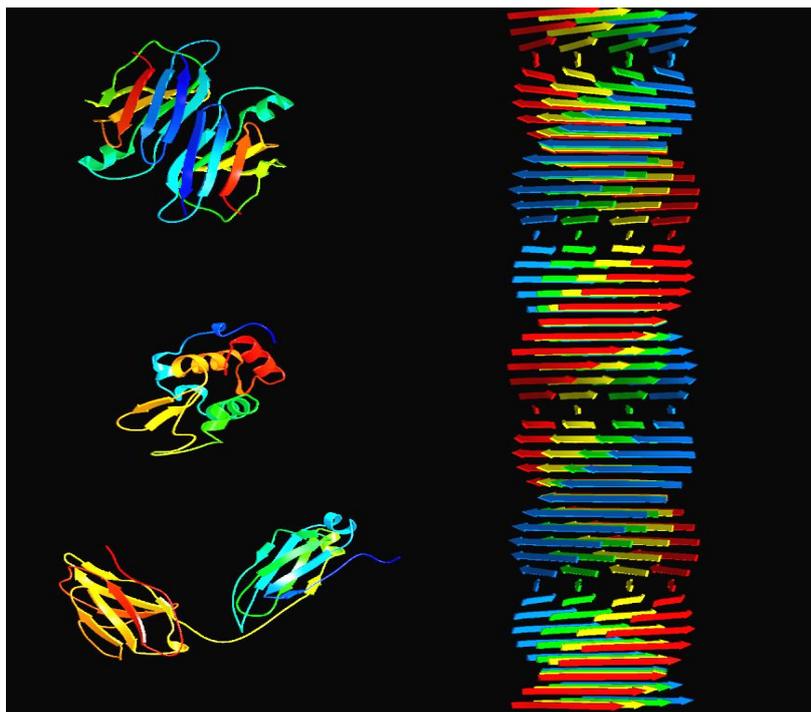


Figura 3: Estrutura da fibra amilóide, grande concentração de folhas beta. (Blake e Serpell,1996)

Recentemente, através do uso das técnicas de ressonância magnética do estado sólido e de cristalografia foi possível se conhecer a nível atômico detalhes das fibras amilóides utilizando-se um heptapeptídeo derivado da proteína Sup 35 (príon de levedura) (Eisenberg e cols, 2006). Estes estudos revelaram importantes aspectos da estrutura fibrilar, como por exemplo, a ausência de água em seu interior, a presença de contatos iônicos que seriam importantes para estabilizar as fibras, dentre outros.

A presença de folhas β parece estar intimamente ligada ao processo de fibrilogênese. Algumas proteínas amiloidogênicas apresentam em sua estrutura nativa maior conteúdo de folhas β e uma menor porção de α -hélice, como no caso da transtirretina e imunoglobulina de cadeia leve. Por outro lado, algumas

proteínas, antes de formarem a fibra amilóide, precisam sofrer profundos rearranjos conformacionais. No caso da alfa sinucleína (proteína envolvida na doença de Parkinson), por exemplo, sua estrutura randômica é convertida em folhas β que passam, então, a formar as fibras amilóides. No caso da proteína do prion, a mudança conformacional que antecede a agregação requer a conversão de α hélices em fitas β (Pan e cols, 1993).

Conforme dito anteriormente, a melhor caracterização e isolamento das espécies intermediárias encontradas durante o processo de enovelamento protéico têm permitido compreender a forma com que algumas proteínas são desviadas da via normal de enovelamento culminando na agregação (Wetzel, 1994). Sendo assim, condições que favoreçam o aparecimento destes intermediários, tais como pHs ácidos, temperatura ou força iônica, aliadas a uma alta concentração protéica, podem favorecer a formação de espécies agregadas, em detrimento da forma nativa (Kelly, 1997).

A caracterização e o conhecimento dos tipos de interações envolvidas na formação de agregados protéicos são de vital importância para o desenvolvimento de estratégias que visam à prevenção das amiloidoses (Rudolph e Lilie, 1996).

1.4- Amiloidose Primária

A amiloidose primária (AL) é a forma mais comum de amiloidose sistêmica. É uma desordem incomum das células plasmáticas, caracterizada pela transformação de imunoglobulinas de cadeia leve em depósitos amilóides (Roshini cols, 2003). As manifestações clínicas da doença são causadas pela presença dessas fibras amilóides em diversos órgãos, como intestinos, rins, fígado, coração, tireóide e língua. A idade média do diagnóstico é em torno dos 65 anos. Uma vez que a doença se torna sintomática, ela pode se tornar rapidamente progressiva sendo fatal, com uma sobrevida média de 12 a 18 meses (Kyle e cols, 1992). A morbidade ocorre devido à deposição extracelular de fibras de imunoglobulina de cadeia leve nos principais órgãos como rins e coração (Muller e cols, 2006). A deposição destas fibras nos rins causa proteinúria em 73% dos casos, insuficiência renal em 50% deles e síndrome nefrótica ou falha renal em 28%.

Pacientes que sofrem de mieloma múltiplo apresentam concentração alta de cadeias leves livres no sangue e na urina e o mesmo ocorre em indivíduos sãos em idade avançada. Porém, só uma parcela desses indivíduos padece de amiloidose AL (Aguzzi e cols, 1992). Isto indica que nem todas as cadeias leves são amiloidogênicas e que o fato das mesmas estarem no estado livre é uma condição necessária, no entanto não suficiente para acarretar a enfermidade (Stevens e Argon, 1999).

1.5 Imunoglobulinas

As imunoglobulinas são definidas como proteínas de origem animal com reconhecida atividade imunológica sendo os produtos antígeno-específico das células B. A molécula do anticorpo em si tem duas funções separáveis: uma é a ligação específica ao agente patogênico que induziu a resposta imune e a outra é o recrutamento de outras células e moléculas com o fim de destruir o patógeno, uma vez que o anticorpo tenha se unido a ele (Janeway e Travers, 1996).

As imunoglobulinas são produzidas pelo sistema linfóide de vertebrados e circulam livremente pelo sangue, podendo ser encontradas também em outros fluidos biológicos. A figura 4 mostra a estrutura simplificada de um anticorpo, onde duas cadeias leves idênticas se associam com duas cadeias pesadas também idênticas para dar lugar a uma proteína de aproximadamente 150,000 Da, que possui dois sítios de reconhecimento para o mesmo antígeno. São conhecidos cinco tipos de cadeias pesadas convencionalmente denominadas de γ , α , μ , δ e ϵ , que caracterizam as cinco classes de imunoglobulinas: IgG, IgA, IgM, IgD, IgE (Janeway e Travers, 1996). As cadeias leves e as cadeias pesadas das imunoglobulinas são sintetizadas separadamente. A organização na unidade estrutural monomérica se realiza depois da sua liberação do retículo endoplasmático (Stevens e Argon, 1999).

No caso dos humanos e outros mamíferos, as cadeias leves podem ser de dois tipos, κ e λ , não existindo qualquer diferença funcional entre as mesmas (Janeway e Travers, 1996). Os segmento de genes das cadeias leves κ se

localizam no cromossoma 2 e os λ no cromossomo 22 (Williams e cols, 1996). As cadeias leves são proteínas com peso molecular entre 21,000-23,000 Da com aproximadamente 214 resíduos e possuem dois domínios denominados Variável (V_L) e Constante (C_L). Estes domínios possuem uma estrutura de β -sanduíche, típico das imunoglobulinas, cuja base é o motivo estrutural denominado “chave grega”. Estruturalmente, cada domínio é composto por duas folhas β , formadas por 3-4 fitas, respectivamente, que se organizam em torno de um núcleo hidrofóbico que forma o cerne da proteína. Além das numerosas interações fracas apolares e polares que dão estabilidade ao domínio, este é estabilizado adicionalmente por uma ponte dissulfeto entre os resíduos de cisteína 23 e 88, os quais são muito conservados em todos os domínios de imunoglobulinas. Diariamente são produzidos cerca de 500 mg de cadeias leves no estado livre que são filtradas pelo glomérulo, reabsorvidas e metabolizadas pelos túbulos renais. Apesar da eficiência deste sistema, excretamos diariamente cerca de 5 a 10 mg de cadeias leves na urina, que é considerada uma quantidade normal (Solomon e cols, 1964).

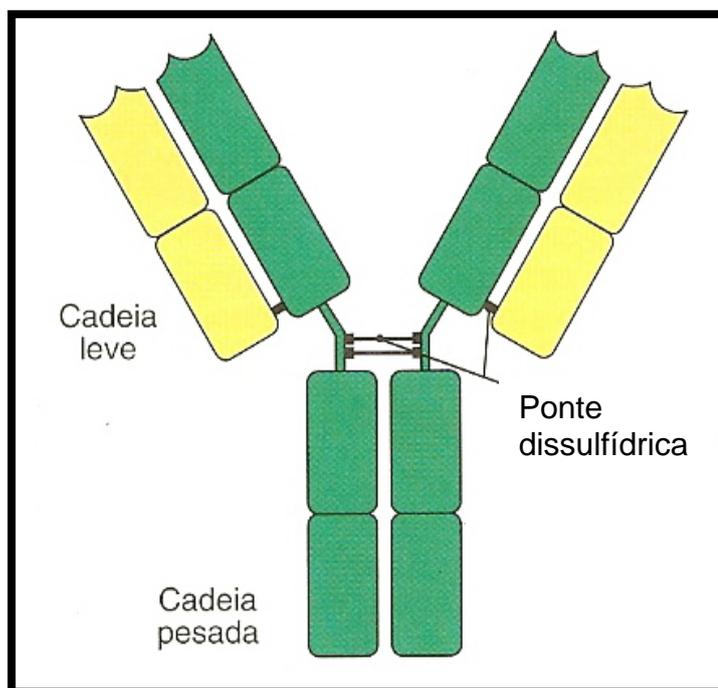


Figura 4: A molécula de imunoglobulina tem duas cadeias polipeptídicas diferentes, chamadas cadeia pesada e cadeia leve. Cada molécula de imunoglobulina é constituída por duas cadeias pesadas (verde) e duas cadeias leves (amarelo), unidas por pontes de enxofre, de modo que cada cadeia pesada se liga a uma cadeia leve, e as duas cadeias pesadas entre elas. (Adaptado de Janeway e Travers, 1996).

Para muitos tipos de amiloidoses, como as provocadas pelas proteínas transtirretina e lisozima, têm-se identificado mutações que causam o comportamento anormal da proteína precursora, o que representa um passo muito importante na compreensão das causas moleculares da doença (Buxbaum e Tagoe, 2000; Dobson, 1999; Chiti e Dobson, 2006). No caso da AL, devido à alta heterogeneidade de seqüência que caracteriza a cadeia leve da imunoglobulina, se torna difícil identificar mutações específicas ou padrões de seqüência que possam ser responsabilizados claramente pelo comportamento

patológico das mesmas (Stevens e Argon, 1999; Bellotti e cols, 2000). No entanto, algum progresso foi alcançado nos últimos 30 anos (Skinner, 2000), onde determinados fatores parecem estar associados à amiloidogenicidade destas proteínas. Como exemplo, é sabido que o isotipo λ é duas a três vezes mais freqüente nas cadeias leves amiloidogênicas do que o κ (Kyle e Gertz, 1995), o que contrasta com a proporção de ambos os anticorpos do repertório policlonal de indivíduos normais, onde a relação $\kappa:\lambda$ é de 2:1 (Stevens e Argon, 1999; Bellotti e cols, 2000).

Algumas mutações que são freqüentes nas cadeias leves amiloidogênicas têm sido identificadas, sendo estas raras na seqüência das cadeias leves não amiloidogênicas (Hurle e cols, 1994). Curiosamente, quando algumas dessas mutações são introduzidas no sítio homólogo da seqüência de uma cadeia leve não amiloidogênica, esta se torna menos estável e aumenta sua tendência a sofrer agregação na forma de amilóide *in vitro* (Hurle e cols, 1994; Raffin e cols, 1999). Estes estudos permitiram estabelecer uma correlação direta entre o efeito desestabilizador das mutações e sua capacidade para favorecer a agregação amilóide *in vitro*.

A estabilidade termodinâmica também tem sido apontada como um possível fator que determina a tendência à agregação amilóide das cadeias leves e de outras proteínas (Kelly, 1998; Raffin e cols, 1999; Kim e cols, 2000; Wall e cols, 2004). O estudo comparativo da estabilidade entre diferentes variantes da cadeia leve foi um dos objetivos dessa dissertação, conforme detalhado a frente.

A afinidade pelo antígeno e a capacidade de formar um complexo suficientemente estável para ser expresso na membrana como um receptor funcional, são as forças de seleção que determinam a seqüência e a conformação das regiões variáveis dos anticorpos (Stevens e Argon, 1999). Tem sido demonstrado que as interações entre os domínios variáveis das cadeias leves e pesadas dos anticorpos podem exercer um efeito cooperativo de estabilização sobre a estrutura da molécula como um todo e especificamente sobre o domínio variável da cadeia leve (Worn e Plucktun, 1998). Isto sugere que as interações entre os resíduos da interface cadeia pesada-cadeia leve (V_H - V_L) podem compensar o efeito desestabilizador de mutações e poderia explicar porque é possível encontrar anticorpos do repertório imune de indivíduos normais cujas V_L possuem mutações que são muito instáveis quando se encontram no estado livre (Stevens e Argon, 1999; Belloti e cols, 2000; Wetzel, 1997). A amiloidogenicidade das cadeias leves se dá unicamente quando estas são secretadas no estado livre, o qual parece ser a resultante do efeito desestabilizador de mutações somáticas acumuladas durante a ontogenia do linfócito b, sobre uma proteína que se apresenta fora do contexto funcional e

estrutural para a qual tem sido naturalmente selecionada (Stevens e Argon, 1999).

1.6 - O Mieloma Múltiplo

O primeiro diagnóstico de mieloma, denominado “*mollities e fragilitas ossium*” (ossos moles e frágeis), foi feito em 1845 pelo Dr. Willian Macintyre. O problema urinário incomum por ele descoberto foi minuciosamente investigado pelo Dr. Henry Bence Jones. O que chamou a atenção do Dr. Bence Jones foi a presença de um sedimento na urina que se dissolvia ao ser aquecido, mas que precipitava novamente ao ser resfriado. Em 1848, Bence Jones publicou suas observações, e as proteínas por ele descobertas na urina foram chamadas, em sua homenagem, de proteínas de Bence Jones. E hoje a presença de proteínas de Bence Jones na urina serve como um dos diagnósticos da doença (Durie, 2006).

O mieloma múltiplo é uma doença maligna da medula óssea sendo a segunda doença onco-hematológica mais comum no mundo, perdendo apenas para os linfomas (Bataille, 1997). Ao contrário da maioria dos cânceres, o mieloma não se apresenta como um tumor maciço ou nódulo, ao invés disso, as células de mieloma estão espalhadas na medula óssea. Os plasmocitomas podem ser únicos ou múltiplos e podem ficar restritos à medula óssea e ao osso medular ou se desenvolver fora do osso em tecidos moles. Os plasmocitomas fora do osso são denominados extramedulares. A existência de plasmocitomas dentro e fora do osso é que classifica o mieloma como sendo múltiplo. Trata-se de uma

doença com evolução heterogênea, cuja sobrevida dos pacientes pode variar de alguns meses até mais de uma década (Perez-Simon e cols, 1998). A maioria dos casos evolui com anemia grave, lesões ósseas, insuficiência renal e infecções recorrentes. Esse quadro é resultado de uma infiltração maciça da medula óssea, reabsorção óssea estimulada por citocinas produzidas pelas células tumorais, depósitos de cadeias leves monoclonais nos túbulos renais e imunoglobulina monoclonal ineficiente (Bacal e cols, 2005).

O Mieloma Múltiplo é uma doença caracterizada pela proliferação descontrolada de plasmócitos na medula óssea com freqüente produção de imunoglobulinas anômalas monoclonais (proteína M, proteína do mieloma ou paraproteína). Sua prevalência é maior a partir dos 50 anos de vida (Greenlee e cols, 2001) e mais comum em negros do que em brancos. A proporção entre homens e mulheres é de 3:2. As proteínas monoclonais são produtos dos plasmócitos malignos, anormais por seu caráter monoclonal e equivalente aos anticorpos normais (Díaz-Maqueo, 2006). Portanto, a seqüência de aminoácidos e a estrutura das proteínas do mieloma são anormais. Caracteristicamente, ocorre perda da função normal da imunoglobulina como anticorpo. Essa alteração de função acarreta um excesso da proteína M na corrente sanguínea e/ou secretada na urina, maior produção de cadeias leves do que a necessária para combinação com as cadeias pesadas e, conseqüente, formação de uma molécula inteira de imunoglobulina. As moléculas monoclonais anormais podem se aderir umas às outras e/ou aos tecidos, tais como células sanguíneas, parede dos vasos

sanguíneos e outros componentes do sangue. Com isso, a circulação e o fluxo do sangue diminuem, causando a síndrome da hiperviscosidade, com a ligação à fatores de coagulação sanguíneos normais com o concomitante aumento da tendência à sangramento. As proteínas de Bence Jones livres também podem se associar umas as outras formando agregados, mais especificamente nos vasos sanguíneos de pequeno porte dos olhos e rins, e esses depósitos constituem a amiloidose primária, foco desta dissertação.

1.7- A estabilidade termodinâmica do V_L (domínio variável) e a agregação amilóide

Alguns estudos têm atribuído um importante papel à diferença de estabilidade termodinâmica existente entre a forma selvagem de uma determinada proteína e seus mutantes como fator que governa sua maior ou menor tendência em sofrer agregação (Merlini e Belotti, 2005). O mesmo tem sido proposto para a cadeia leve da imunoglobulina (Hurle e cols, 1994; Wetzel, 1997). Em geral, as cadeias leves amiloidogênicas possuem menor estabilidade termodinâmica do que as não amiloidogênicas do seu mesmo subgrupo e esta diferença parece ser a consequência de numerosas mutações somáticas que caracterizam a seqüência destas proteínas. O efeito destas mutações sobre a estabilidade da estrutura V_L depende da sua natureza e da sua posição. Algumas mutações aumentam a estabilidade do domínio enquanto outras são neutras. No entanto, muitas delas parecem desempenhar um efeito desestabilizador e que, se

não são compensadas por mutações de efeito contrário, podem comprometer a estabilidade do domínio (Wall e cols, 1999; Wetzel, 1997).

1.8. A associação preferencial do subgrupo λ VI na Amiloidose AL.

Tem sido observado a associação de certos genes do domínio variável da cadeia leve de imunoglobulinas com a amiloidose AL. Destes segmentos de genes, o *3r* e o *6a* estão envolvidos em 40% dos casos de amiloidose AL por cadeias leves λ (Perfetti e cols, 2002). Na verdade, praticamente todas as cadeias leves monoclonais λ VI (proteínas de Bence Jones) obtidas de pacientes com mieloma múltiplo estão implicadas em algum tipo de agregação amilóide (Ozaki e cols, 1994). Essas cadeias leves λ VI possuem forte tendência a agregar-se seletivamente nos rins (Comenzo e cols, 2001; Perfetti e cols, 2002).

Uma possível explicação para a expressão preferencial do gene *6a* na amiloidose AL poderia ser porque a seqüência de resíduos codificada por eles é intrinsecamente amiloidogênica. A seqüência da linha germinal *6a* possui algumas características que podem explicar sua associação com a amiloidose. A comparação da seqüência de resíduos codificada neste gene com os outros genes de domínio variável λ indicam que o gene *6a* possui resíduos nas posições 2, 8, 13, 17, 25, 39, 45, 66, 79 e 80 que diferem por sua carga ou polaridade dos que ocupam igual posição nos outros genes λ de V_L (Chang e cols, 1994; Willians e cols, 1996), além de dois resíduos adicionais na posição 68 e 69. Deste modo, o caráter amiloidogênico das cadeias leves depende primariamente da seqüência

da linha germinal para o V_L e do efeito desestabilizador das mutações somáticas incorporadas no V_L durante a fase de maturação da afinidade de anticorpos (Hurle e cols, 1994; Wetzel, 1997). Uma forma de demonstrar a possível responsabilidade da informação da linha germinal no comportamento amiloidogênico das cadeias leves λVI é determinado pelas propriedades biofísicas e pelo comportamento amiloidogênico *in vitro* de um domínio variável da seqüência da linha germinal 6a.

A estrutura cristalográfica de duas cadeias leves λVI foi determinada (Pokkuluri e cols, 1999). Uma delas foi a da proteína denominada Wil, que é menos estável e mais amiloidogênica que a proteína considerada selvagem e a outra foi a Jto, mais estável e menos amiloidogênicas. Esta última é a única proteína Bence Jones não amiloidogênica documentada até o momento. Curiosamente, a comparação das estruturas cristalográficas não revelou nenhuma alteração importante que pudesse explicar as diferenças entre as duas proteínas. A determinação da estrutura cristalográfica revelou que o anel fenólico da fenilalanina 2 e o grupo guanidino da arginina 25 estão próximos fazendo interação do tipo empilhamento planar (Richardson e Richardson, 2002). Essa arginina 25 parece ser crucial para a manutenção da estrutura da cadeia leve.

O Grupo do Dr. Baltazar Becerril da Universidade Autônoma do México com quem mantemos colaboração neste projeto observou que em 25% das

seqüências de cadeia leves λ VI há glicina na posição 25 em substituição à arginina e que essa substituição pode contribuir de alguma forma para o enovelamento do domínio e, conseqüentemente, na sua amiloidogenicidade. A seqüência das proteínas 6aJL2, jto e Wil segue abaixo:

	(1)	1	10	20	30	40	50	60	70	88	Section 1																																																																													
JTO_A	(1)	N	F	M	L	N	Q	P	H	S	V	S	E	S	P	G	K	T	V	T	I	S	C	T	R	S	S	G	N	I	D	S	N	Y	V	Q	W	Y	Q	R	P	G	S	A	P	I	T	V	I	Y	E	D	N	Q	R	P	S	G	V	P	D	R	F	A	G	S	I	D	R	S	S	N	S	A	S	L	T	I	S	G	L	K	T	E	D	E	A	D
Wil_A	(1)	N	F	L	L	T	Q	P	H	S	V	S	E	S	P	G	K	T	V	T	I	S	C	T	R	S	S	G	S	I	A	N	N	V	H	W	Y	Q	R	P	G	S	S	P	T	T	V	I	F	E	D	D	H	R	P	S	G	V	P	D	R	F	A	G	S	V	D	T	S	S	N	S	A	S	L	T	I	S	G	L	K	T	E	D	E	A	D	
6aJL2	(1)	N	F	M	L	T	Q	P	H	S	V	S	E	S	P	G	K	T	V	T	I	S	C	T	R	S	S	G	S	I	A	S	N	Y	V	Q	W	Y	Q	R	P	G	S	S	P	T	T	V	I	Y	E	D	N	Q	R	P	S	G	V	P	D	R	F	A	G	S	I	D	R	S	S	N	S	A	S	L	T	I	S	G	L	K	T	E	D	E	A	D
Consensus	(1)	N	F	M	L	T	Q	P	H	S	V	S	E	S	P	G	K	T	V	T	I	S	C	T	R	S	S	G	S	I	A	S	N	Y	V	Q	W	Y	Q	R	P	G	S	S	P	T	T	V	I	Y	E	D	N	Q	R	P	S	G	V	P	D	R	F	A	G	S	I	D	R	S	S	N	S	A	S	L	T	I	S	G	L	K	T	E	D	E	A	D

	(89)	89	100	112	Section 2																					
JTO_A	(89)	Y	Y	C	Q	S	Y	D	A	R	N	-	V	V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L	G	
Wil_A	(89)	Y	Y	C	Q	S	Y	D	H	N	N	-	Q	V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L	G	
6aJL2	(89)	Y	Y	C	Q	S	Y	D	S	S	N	H	-	V	V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L	G
Consensus	(89)	Y	Y	C	Q	S	Y	D	A	N	N	-	V	V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L	G	

Figura 5. Comparação da seqüência de aminoácidos das proteínas Jto, Wil e 6aJL2. A seqüência da proteína selvagem 6aJL2 é alinhada com as seqüências das proteínas Jto e Wil. Os locais de conservação são representados em amarelo. Os locais aonde ocorre divergência nas seqüências está mostrado em azul e em verde.

Podemos observar que a proteína JTO apresenta 10 mutações em relação a 6aJL2: T5N/ S28N/ A30D/ S44A/ T46I/ S64A/ S69R/ S96A/ S97R/ K107R, e a proteína Wil apresenta 11 mutações em relação a 6aJL2: M3L/ S31N/ Q35H/ Y50F/ N53D/ Q54H/ I67V/ S69T/ S96H/ S97N/ V100Q.

O fato do subgrupo λ VI estar associado à amiloidose AL, e que esta enfermidade leva à falência de órgãos e conseqüentemente à morte (Perfetti e cols, 2002) mostra a importância e o interesse de se estudar a caracterização das propriedades estruturais das cadeias leves pertencente a este subgrupo.

2-OBJETIVOS

2.1-Objetivo Geral:

Esta dissertação teve como objetivo geral estudar o processo de enovelamento da imunoglobulina de cadeia leve, forma selvagem (6aJL2) e mutantes (R25G, F2S, H8S,P7S, F2P, F2W, Wil e Jto), através do emprego de alta pressão hidrostática e alta temperatura. Utilizamos para tal, espectroscopia de fluorescência e dicroísmo circular. Também visamos comparar a estabilidade dos mutantes estudados, bem como tentar estabelecer um paralelo entre a estabilidade termodinâmica e a amiloidogenicidade.

2.2- Objetivos específicos:

- Estudar o processo de enovelamento da imunoglobulina de cadeia leve frente ao emprego de alta pressão hidrostática à 37 ou 25 °C, através de técnicas espectroscópicas utilizando as proteínas 6aJL2 e os mutantes R25G, F2S, H8S,P7S, F2P, F2W, Wil e Jto como modelos experimentais;
- Calcular os parâmetros termodinâmicos de enovelamento (ΔG e ΔV) para a forma selvagem e variantes da cadeia leve da imunoglobulina;

- Estudar o papel da ponte dissulfeto na estabilidade da cadeia leve na desnaturação induzida por alta pressão;
- Detectar a presença de intermediários de enovelamento sob pressão pelo uso da sonda hidrofóbica bis- ANS;
- Estudar o desnaturação térmica da imunoglobulina de cadeia leve através de dicroísmo circular.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Reagentes

Todos os reagentes utilizados neste trabalho são de grau analítico. A água foi destilada e deionizada em um sistema de purificação Milli-Q (Millipore Corp., Bedford, MA). O ditioneitol (DTT) foi obtido da Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA). O bis-ANS foi obtido da Molecular Probes (Eugene, OR). As amostras foram diluídas em tampão A, que consiste de Tris-HCl (Tris-hidroximetil aminometano) 25 mM, NaCl 100 mM, pH 7,5 previamente filtrados em membrana Millipore com poro de 0,22 μm . O tampão Tris-HCl foi escolhido como um tampão ideal, pois seu pH não varia significativamente sob pressão. A 3,0 kbar, o valor de pKa aumenta apenas 0,1 unidade. O ΔV para a ionização protônica do Tris é positivo e igual a 4,3 cm^3/mol (Kitamura e Itoh, 1978).

3.2 – Proteínas utilizadas

As variantes da cadeia leve de imunoglobulina Jto, Wil, 6ajl2 e as mutantes pontuais da 6ajl2 foram previamente purificadas pelo Doutor Baltazar Becerril e Luis Del Pozo Yauner da National Autonomus University of México e gentilmente cedidas. O grau de pureza foi analisado por filtração em gel na coluna TSK 3000 (TosoHaas, Southborough, MA). As amostras foram mantidas em tampão A à 4 °C.

3.3- Medidas espectroscópicas.

Os experimentos de espectroscopia de fluorescência foram realizados no espectrofluorímetro ISS K2 (ISS Inc., Champaign, IL) contendo como fonte de luz uma lâmpada de xenônio de 300 watts e utilizando-se fendas de 1 mm para excitação e 2 mm para emissão. As medidas realizadas à pressão atmosférica foram feitas em cubetas de quartzo retangular, com caminho óptico de 1 cm. As medidas realizadas sob alta pressão hidrostática foram feitas em cubetas de quartzo em forma de garrafa, e fechada com um tubo compressível de polietileno. Os experimentos foram realizados à 37° C ou 25 °C, como indicado em cada figura, exceto nas curvas de temperatura, em que houveram variações entre 20°C e 80°C, com incrementos de 3 graus e com 10 minutos de incubação em cada temperatura.

3.3.1 – Medidas de fluorescência intrínseca.

Através da emissão de fluorescência de resíduos aromáticos como triptofano, tirosina e fenilalanina, torna-se possível monitorar as mudanças conformacionais na estrutura das proteínas ao longo do tratamento com diferentes agentes físicos como alta pressão hidrostática e alta temperatura, ou químicos como a adição de uréia ou cloridrato de guanidina. Como o rendimento quântico do triptofano é o maior dentre os aminoácidos aromáticos, este marcador foi utilizado em nossas análises, apesar da cadeia leve da imunoglobulina apresentar um único triptofano localizado na posição 35 (Wall e cols, 1999; Souillac e cols, 2002). No entanto, uma vez que este resíduo localiza-se próximo à ponte dissulfeto, no estado nativo a proteína apresenta uma baixa emissão de fluorescência. À medida que a proteína sofre desnaturação com o concomitante afastamento do resíduo de triptofano da ponte dissulfeto, há um enorme incremento na sua emissão que pode ser usado para monitorar o grau de desnaturação da proteína. Dessa forma, as análises das amostras, preparadas a 2 μ M, foram feitas pela medida da emissão de fluorescência no comprimento de onda de 350 nm, quando a amostra foi excitada em 278 nm. Não avaliamos, portanto o deslocamento máximo da emissão do triptofano, como em outros modelos, uma vez que no estado nativo a proteína praticamente não apresenta espectro de emissão (ver mais a frente em Resultados).

3.3.2- Medidas de fluorescência extrínseca.

A fluorescência extrínseca é uma ferramenta importante na área de biologia estrutural, pois, geralmente, as informações obtidas com esta análise complementam os dados obtidos com a fluorescência intrínseca. Nesta tese foram utilizados dois fluoróforos, o bis-ANS e a Tioflavina- T. O bis-ANS é uma sonda hidrofóbica composta por duas moléculas de ANS (Figura 6) (Rosen e Weber, 1969). Quando esta molécula está em solução aquosa, a sua emissão de fluorescência é bastante reduzida se comparada a energia liberada quando está molécula encontra-se ligada a regiões hidrofóbicas em proteínas ou em solventes apolares. Por este motivo, o bis-ANS tem sido uma sonda muito importante na análise de mudanças conformacionais com exposição de sítios hidrofóbicos localizados nas proteínas. A solução estoque de bis-ANS foi preparada em água Milli-Q e a sua concentração foi aferida pela medida da densidade ótica (395 nm) de uma pequena fração do estoque diluída em metanol. Para o cálculo foi utilizado o coeficiente de extinção molar de $23.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Os espectros de emissão de fluorescência do bis-ANS foram coletados excitando-se as amostras em 360 nm e coletando-se a emissão de fluorescência entre 400 e 600 nm. A área destes espectros foi utilizada para avaliar se o bis-ANS estava ligado ou não à proteína.

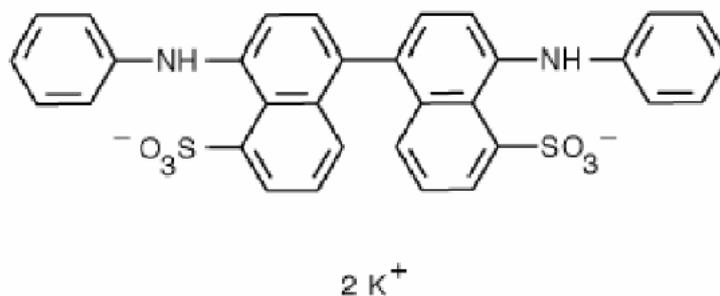


Figura 6: Estrutura química da sonda bis-ANS (bis 8-anilino-1-sulfonado) (www.probes.com)

As tioflavinas T (ThT), (Figura 7), e S (ThS) por sua vez têm sido utilizadas como ótimos marcadores moleculares na caracterização de fibrilas produzidas *in vitro*, devido a sua ligação em estruturas organizadas em folhas- β anti-paralelas, e na detecção de placas amilóides em tecidos, respectivamente (Colon e Kelly, 1992; Come e cols., 1993; Le vine III, 1993 e 1997). A interação da ThT às fibras ocorre de maneira específica e regular, com orientação paralela ao seu eixo maior, em canais existentes ao longo do comprimento das folhas. A especificidade da ThT às fibras amilóides ocorre devido a existência de interações estéricas entre as cadeias laterais dos aminoácidos da folha- β e das moléculas de ThT, que conduzem a maior estabilidade do fluoróforo na conformação planar (Krebs e cols, 2005). A manutenção desta conformação planar durante o estado excitado, conduz a um aumento na emissão de fluorescência. Quando a ThT encontra-se livre em solução (com baixa viscosidade), a sua organização conformacional é bem flutuante, conduzindo a

uma redução da emissão de fluorescência (Krebs e cols, 2005). Por este motivo, a sonda foi empregada nesta tese no acompanhamento da formação de fibras amilóides compostas pelas proteínas de cadeia leve aqui estudadas. A formação de fibras da cadeia leve da imunoglobulina foi monitorada pela excitação da ThT em 433 nm e pela emissão de fluorescência nos comprimentos de onda entre 460 a 600 nm. A concentração de ThT utilizada foi de 20 μM para 8 μM de proteína.

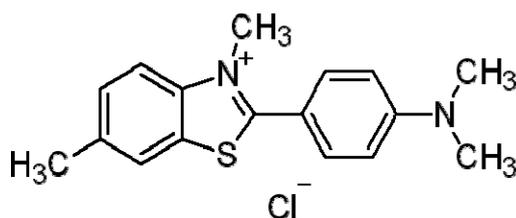


Figura 7: Estrutura da thioflavina-T. (www.sigmaaldrich.com).

3.3.3- Espalhamento de luz

As medidas de espalhamento de luz refletem o tamanho das partículas em solução. A amostra é irradiada em um comprimento de onda em que a absorção é mínima e o espalhamento será diretamente proporcional ao tamanho da partícula. Esta medida foi utilizada neste estudo para acompanhar a agregação protéica, assim como a dissociação de fibras. As medidas de espalhamento de luz foram realizadas também no espectrofluorímetro ISS K2 (ISS Inc.) A amostra foi excitada em 320 nm e a luz espalhada coletada em um ângulo de 90° da luz incidente pela integração da intensidade em uma janela entre 300 e 340 nm. Os valores de espalhamento de luz são obtidos através da integração da área do espectro e são calculados pelo programa fornecido pela ISS. Em muitos experimentos, esses resultados foram expressos na forma de (A_{esp}/A_{esp0}) , que reflete a variação dos valores de espalhamento de luz em determinada condição, onde A_{esp} é a área sob o espectro em uma determinada condição e A_{esp0} é a área do espectro inicial, onde as fibras encontram-se íntegras.

3.4- Análise da importância das pontes de enxofre na estabilidade protéica.

O dithiothreitol (DTT) é um forte e divalente agente redutor cuja fórmula é $C_4H_{10}O_2S_2$ (Figura 8). O DTT é usado frequentemente para desfazer pontes dissulfeto de proteínas e prevenir ligações *intramoleculares* e *intermoleculares* entre resíduos de cisteínas (Cleland, 1964). Em nossos experimentos, utilizamos o DTT para romper as pontes dissulfeto a fim de avaliarmos a contribuição destas pontes na estabilidade das proteínas estudadas. O efeito do DTT foi avaliado através das medidas de fluorescência intrínseca na presença e na ausência deste agente redutor, utilizando-se 2 μ M de proteína e 5 mM de DTT.

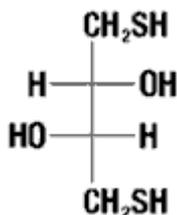


Figura 8: Estrutura do DTT (www.fermentas.com/catalog/reagents/dtt.htm).

3.5 Dicroísmo circular

Através da técnica de dicroísmo circular, foi possível acompanhar mudanças na estrutura secundária das proteínas. As proteínas que adotam estrutura predominantemente em alfa hélice, geralmente apresentam picos negativos em torno de 222 e 208nm. Por outro lado, as proteínas estruturadas em folha β , geralmente, apresentam um único pico em torno de 216 nm. As medidas de dicroísmo circular foram realizadas no espectropolarímetro Jasco J-715, acoplado a um sistema Peltier para a manutenção ou variação da temperatura (Jasco Co; Japão). O caminho ótico utilizado foi de 0,1 cm. As amostras foram preparadas na concentração de 100 μ M e os espectros foram obtidos pelo acompanhamento da elipicidade entre os comprimentos de onda de 190 e 260 nm. A taxa de aquisição foi de 50 nm/min, com resposta de 8 s e com média de 4 acumulações. Todas as leituras foram corrigidas para a absorção do tampão A. Os resultados obtidos foram convertidos para elipicidade molar através da equação 1, onde θ é a elipicidade bruta, c é a concentração molar e l é o caminho ótico.

$$[\theta] = \theta / l c$$

Equação 1

3.6. Preparo de fibras amilóides de cadeia leve

Para formar fibras das cadeias leves de imunoglobulinas, incubamos as proteínas solúveis na concentração de 8 μ M em tubos de plásticos, sob contínua agitação a 37°C (Figura 9A). O tempo de formação das fibras foi relativo às características intrínsecas de cada uma das proteínas estudadas e que nos foi informado pelo nosso colaborador. A proteína 6ajl2 e H8S formam fibras em aproximadamente 17 horas, enquanto que a proteína Wil forma fibras em aproximadamente 1 hora e as demais proteínas formam fibras em cerca de 5 horas.

Geralmente, a formação de fibras segue um perfil bimodal, com uma fase inicial lenta e uma fase exponencial rápida. A etapa lenta do processo de agregação é a formação do que chamamos de núcleo ou sementes que servem como molde para a fase de alongação (mais rápida) onde se formam as fibras maduras (Chien e Weissmann, 2001). Assim, a agregação destas proteínas pode ser acelerada pela adição de semente previamente formadas. Essas sementes são fibras mecanicamente quebradas em pequenos pedaços. Ao adicionarmos sementes, eliminamos então a etapa lenta da reação. Estas fibras formadas pela adição de sementes são denominadas, *fibras formadas por extensão*, enquanto as fibras formadas sem adição de semente são denominadas, *fibras formadas por agitação*. A Figura 9B sumariza o protocolo de formação dessas fibras, no qual adicionamos as sementes numa concentração de 10% v/v em relação a concentração de proteína solúvel.

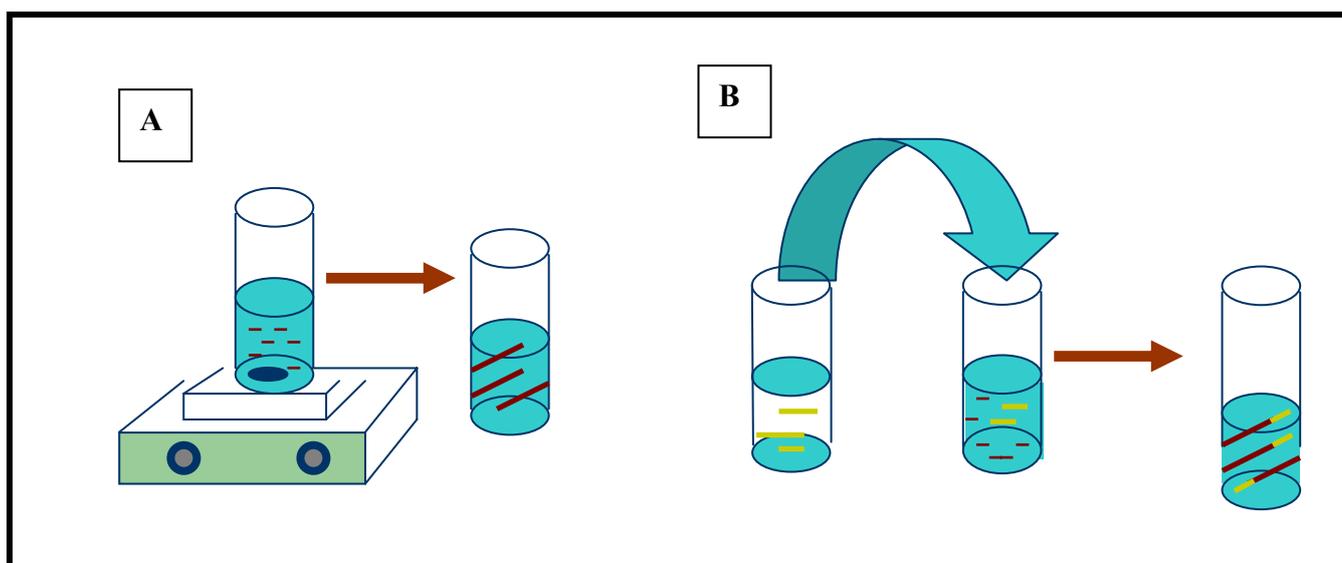


Figura 9. Esquema de preparação das fibras por agitação e por extensão. **(A)** Formação das fibras por agitação. A proteína solúvel (pequenos tracinhos vermelhos, 8 μM) foi colocada em tubo plástico e deixada sob agitação moderada a 37 °C por um determinado tempo. Após este tempo, dá-se a formação das fibras amilóides. **(B)** Formação das fibras por extensão. As fibras formadas por agitação foram sonicadas para formar as sementes (tracinhos amarelos) e, em seguida, essas sementes foram adicionadas a uma solução contendo proteínas solúveis numa proporção de 10% v/v. Após algum tempo, ocorre a extensão dessas sementes pela incorporação de proteínas solúveis levando ao aparecimento de fibras maduras.

3.7. Agentes físicos desnaturantes:

3.7.1. Alta Pressão Hidrostática

O sistema de alta pressão hidrostática possui dois componentes: a bomba ou célula de pressão e o gerador (Figura 10). A bomba de alta pressão consiste de um compartimento de metal inoxidável composto por três janelas de safira que permitem que a luz atinja a amostra e que a emissão de fluorescência seja coletada a 90°. A bomba de pressão foi originalmente descrita por Paladini & Weber em 1981 e atualmente é fabricada pela ISS Inc. (Champaign, IL). O gerador de alta pressão hidrostática é composto por um pistão operado manualmente, que tem por objetivo comprimir o líquido (neste caso, o etanol) no interior da tubulação e, conseqüentemente, na amostra. Esta compressão se dá por duas válvulas que controlam o fluxo de etanol no tubo conectado à bomba. A pressão gerada no sistema é acompanhada por um manômetro.

A alta pressão é um método que nos permite perturbar de forma sutil a estrutura de diversas proteínas, com o objetivo de explorar os fatores que determinam o enovelamento de proteínas. A sua utilização apresenta algumas vantagens sobre as outras formas de perturbação da estrutura de proteínas, principalmente, por ser uma variável física que, ao contrário da temperatura, não altera a energia interna do sistema, afetando somente o volume formado pela proteína e pelo solvente (Weber e Dricamer, 1983; Weber, 1987). As interações que mantêm a estrutura tridimensional de proteínas compreendem ligações de

pontes de hidrogênio, de van der Waals, interações eletrostáticas e interações hidrofóbicas. De forma geral, o enovelamento de uma proteína ou associação de proteínas, gera um aumento no volume devido à formação de cavidades que excluem o solvente das proximidades dos aminoácidos (Silva e Weber, 1993). Estas cavidades são chamadas de espaços mortos e foram observadas por experimentos de cristalografia de raios-X (Collins e cols., 2005). Sendo assim, a pressão hidrostática, quando aplicada a estruturas protéicas, pode afetar as interações entre cadeias diferentes, promovendo a dissociação, ou entre segmentos de uma mesma cadeia, promovendo a desnaturação, justamente por favorecer a acessibilidade das moléculas de água aos espaços mortos (Silva e Weber, 1993, Mozhaev e cols., 1994).

Previamente às medidas de fluorescência, a amostra permaneceu incubada por 5 minutos em cada valor de pressão. A curva de pressão foi realizada, em geral, com intervalos de 200 bar. O grau de desenovelamento (α) foi calculado conforme a seguinte equação:

$$\alpha = [(F_{\text{exp}} - F_0) / (F_{\text{final}} - F_0)] \quad \text{equação 2}$$

Onde F_{exp} são os valores de fluorescência em cada pressão, F_0 e F_{final} são os valores de fluorescência inicial e final, respectivamente. Os cálculos de

(F_{exp}/F_0), que refletem o aumento da intensidade de fluorescência em 350 nm foram realizados por meio da divisão dos valores de intensidade máxima (350 nm) obtida em cada pressão pelo valor da intensidade de fluorescência inicial.

A variação de volume de enovelamento padrão (ΔV_f) e a variação de energia livre de Gibbs (ΔG_f) de enovelamento foram calculados conforme as equações abaixo:

$$\ln \alpha/(1-\alpha) = \Delta V_f/RT p + \ln K_d \quad \text{equação 3}$$

onde T é a temperatura em Kelvin, R é a constante de gases , α o grau de desenovelamento.e K_d é a constante de enovelamento (*folding*).

$$\Delta G_f = -RT (\ln K_d) \quad \text{equação 4}$$

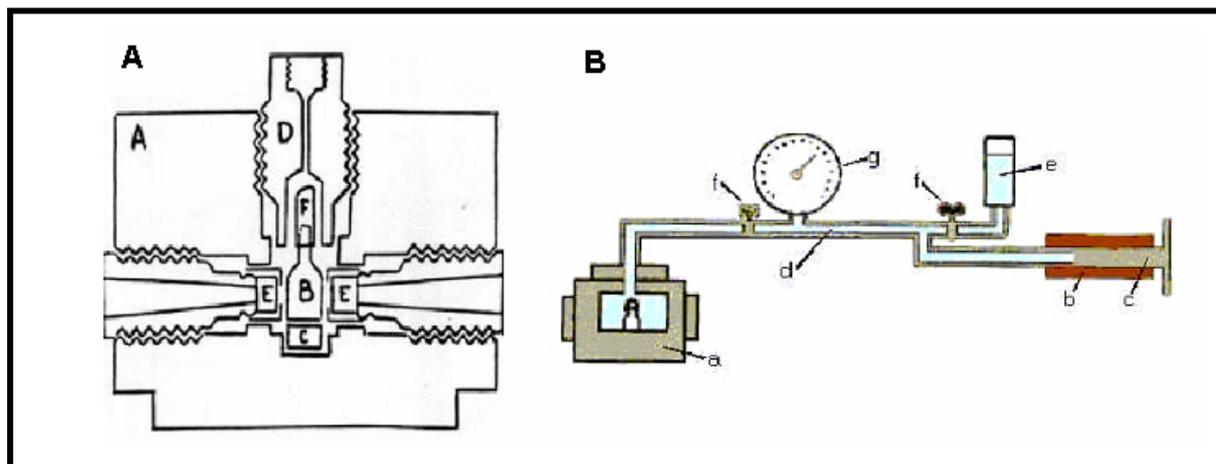


Figura 10: Desenho esquemático do aparelho de alta pressão hidrostática. **(A)** As partes que constituem a bomba são: **(A)**- compartimento de aço; **B**- garrafa de quartzo para amostra; **C**- suporte da célula; **D**- parafuso de conexão com o sistema descrito em **(B)**; **E**- janelas de safira ou quartzo; **F**- tampa compressível para o fechamento da garrafa. **(B)** o sistema gerador de pressão, composto por **a**-compartimento de aço; **b**- gerador de pressão, **c**- pistão; **d**- linha de pressurização preenchida com etanol; **e**- reservatório de etanol, **f**- válvulas de pressão e **g**- manômetro para o controle da pressão exercida sobre o sistema.

3.8. Microscopia de força atômica

A técnica de microscopia de força atômica (AFM) tem sido muito utilizada nos estudos da morfologia das fibras amilóides em várias proteínas incluindo A β (Harper e cols, 1997; Stine e cols, 1996; Blackley e cols, 2000), α -sinucleína (Conway e cols, 2000; Rochet e cols, 2000), domínio SH3, lisozima (Chamberlain e cols, 2000) e β -2 microglobulina (Kad e cols, 2001). Com esta técnica, tem sido possível estudar a superfície celular ou a superfície de fragmentos de membranas e monitorar as modificações induzidas por diferentes biomoléculas, simulando situações patológicas ou diferentes condições funcionais (Weissmuller, 2000). A completa versatilidade do AFM pode ser apreciada ao compreendermos que esta ferramenta permite não apenas a obtenção de imagens topográficas, mas também permite mapear as propriedades adesivas e elásticas de uma superfície (Carneiro e cols, 2002; Prazeres, 2003).

O AFM produz imagens da superfície por meio do posicionamento de um sensor de forças de alta resolução próximo à superfície da amostra. O sensor de força é composto por uma sonda fina (100 Å de diâmetro) montada na extremidade livre de uma mola microscópica triangular (cantiléver) de cerca de 100 a 200 μ m de comprimento, de modo que possa varrer a superfície da amostra. Conforme a amostra é deslocada em relação à ponteira, variações na topografia da superfície resultam em deflexões do cantiléver. O deslocamento do cantiléver, que reflete a topografia local da amostra, é detectado pela

deflexão de um feixe de laser, que atinge o cantiléver na parte superior (espelhada) sendo refletido através de outro espelho (Figura 11), em direção a um detector composto por dois fotodetectores. No estudo de amostras macias, é necessário manter a força de contato constante em toda a região de varredura para evitar danos causados pela sonda.

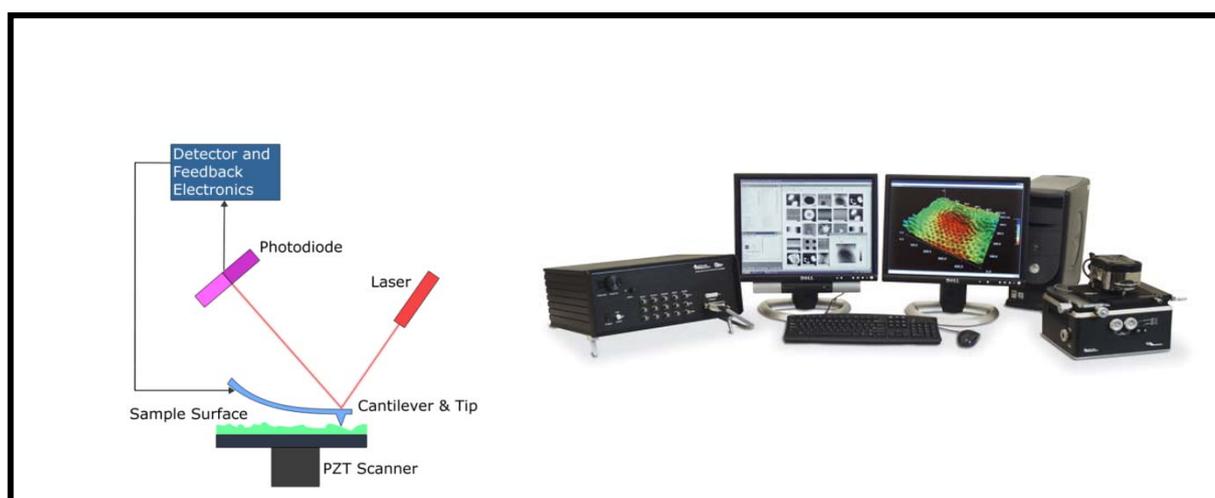


Figura 11: (A) esquema simplificado de um microscópio de força atômica. (B) Foto do microscópio de força atômica utilizado em nossas medidas.

A análise experimental foi realizada no modo “tapping”, pois este método permite analisar amostras consideradas macias onde ocorre a vibração do cantiléver. O cantiléver foi colocado bem próximo da amostra e o deslocamento contínuo e controlado do piezoelétrico fez com que a ponteira (tip) tocasse levemente a amostra. Esta técnica vem sendo aplicada com bons resultados em alguns tipos de amostras consideradas macias, como por exemplo, polímeros e materiais biológicos, pois elimina basicamente a influência da força lateral que pode deformar ou até danificar a amostra (Ionescu-Zanetti e cols, 1999). O

aparelho de AFM utilizado nesta tese foi o MFP3D (Asylum Research) e o cantilever utilizado foi um AC240TS (Olympus) com uma constante de mola de 2 N/m e frequência de ressonância de 70 kHz. Foram aplicados 20 μ l de agregados protéicos na superfície da mica recentemente clivada e incubados por 30 min. Em seguida, a superfície foi lavada duas vezes com 100 μ l de água destilada e seca com baixo fluxo de nitrogênio. As imagens foram feitas com uma resolução de 512 x 512 pontos a taxa de varredura de 0,5 Hz.

4. RESULTADOS

4.1. Comparação da estabilidade da cadeia leve da imunoglobulina tipo selvagem e variantes frente ao emprego de alta pressão hidrostática: o efeito da temperatura e da ponte dissulfeto.

Neste trabalho, foram utilizadas como modelos experimentais as proteínas Jto, Wil e vários mutantes pontuais da V λ 6. A seqüência das proteínas Jto e Wil foram determinadas a partir de pacientes com quadro clínico de mieloma múltiplo, enquanto que a proteína 6aJL2 está presente em indivíduos saudáveis, tendo sido usada aqui, portanto, como controle (proteína selvagem). Conforme mencionado, objetivando-se avaliar o papel de alguns aminoácidos na estabilidade e amiloidogenicidade desta proteína, foram criados os mutantes F2S, F2P, F2W, P7S, H8S e R25G, os quais foram utilizados nesta dissertação.

Inicialmente, avaliamos a susceptibilidade desse conjunto de proteínas frente à alta pressão hidrostática. Agentes químicos como uréia e cloridrato de guanidina não foram utilizados nesta tese, já que o grupo do Dr. Baltazar Becerril da Universidade Autônoma do México, nosso colaborador, estava explorando esta abordagem experimental. Os efeitos da alta pressão hidrostática sobre a estrutura da cadeia leve da imunoglobulina foram monitorados por meio de medidas de fluorescência intrínseca, pelo acompanhamento da fluorescência dos resíduos de triptofano e fluorescência extrínseca pelo monitoramento da sonda bis-ANS. Conforme observado na Figura 12, a proteína 6aJL2, quando na

forma nativa, apresenta uma fluorescência intrínseca muito reduzida (espectro em verde). Isso se deve ao fato da existência de uma ponte dissulfeto muito próxima do resíduo de triptofano 35, que suprime a fluorescência deste resíduo (Lakowicz, 1999, Khurana e cols, 2001; Mclaughlin e cols, 2006). Contudo, mediante incremento da pressão, a área do espectro de emissão desta proteína vai aumentando gradativamente, indicando um distanciamento da ponte dissulfeto em relação ao triptofano, ou seja, uma possível perda dos contatos terciários (Figura 12). O aumento da intensidade de fluorescência foi utilizado aqui então para avaliar o estado da proteína. Vale ressaltar que o retorno à pressão atmosférica resultou na completa recuperação do espectro inicial (espectro tracejado), indicando reversibilidade total do efeito da alta pressão. Isto foi observado também com todos os variantes.

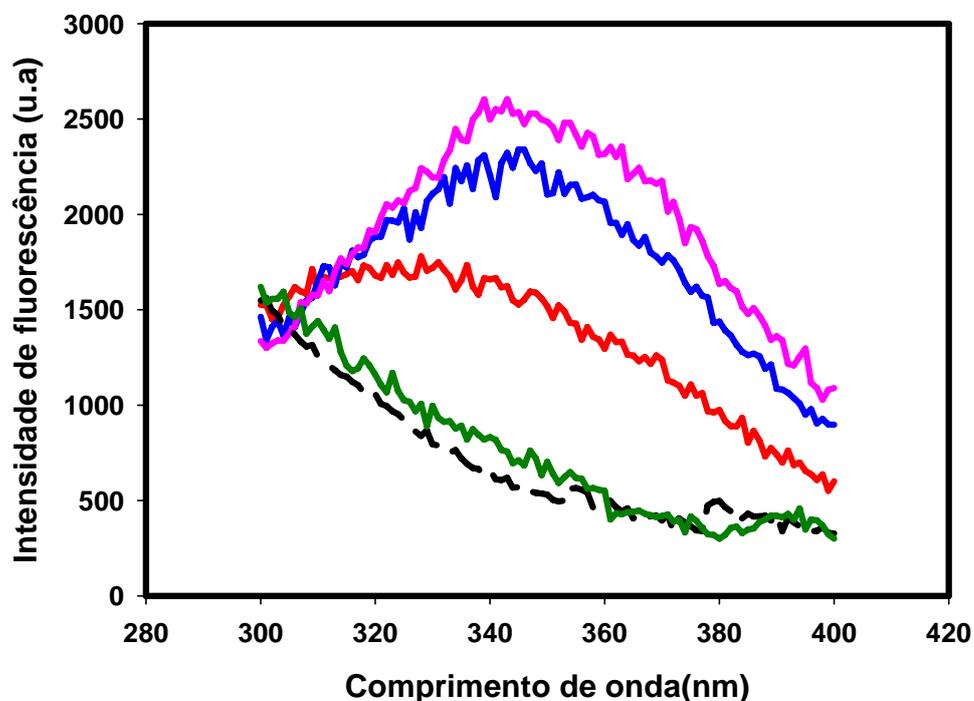


Figura 12: Efeito da alta pressão hidrostática na emissão de fluorescência da proteína 6aJL2. Em (—) espectro de emissão da proteína a pressão atmosférica, (—) a 680 bar, (—) a 2380 bar, (—) a 3060 bar e (--) retorno. Os espectros de fluorescência foram obtidos mediante excitação em 278 nm e varredura da emissão da fluorescência entre 300 e 400 nm. Os espectros foram coletados a 37 °C e a concentração de proteína foi de 2 μ M.

Para melhor visualização dos efeitos induzidos pela alta pressão sobre a cadeia leve da imunoglobulina a 37 °C, forma selvagem e mutantes, os valores de intensidade de fluorescência do triptofano foram normalizados para os valores iniciais (I/I_0) e os dados estão mostrados na Figura 13. Conforme observado, sob pressão, a intensidade de Fluorescência do trp em 350nm aumenta de 2 a 3 vezes na maioria dos casos, a exceção da proteína wil que tem seu sinal aumentado 7 vezes.

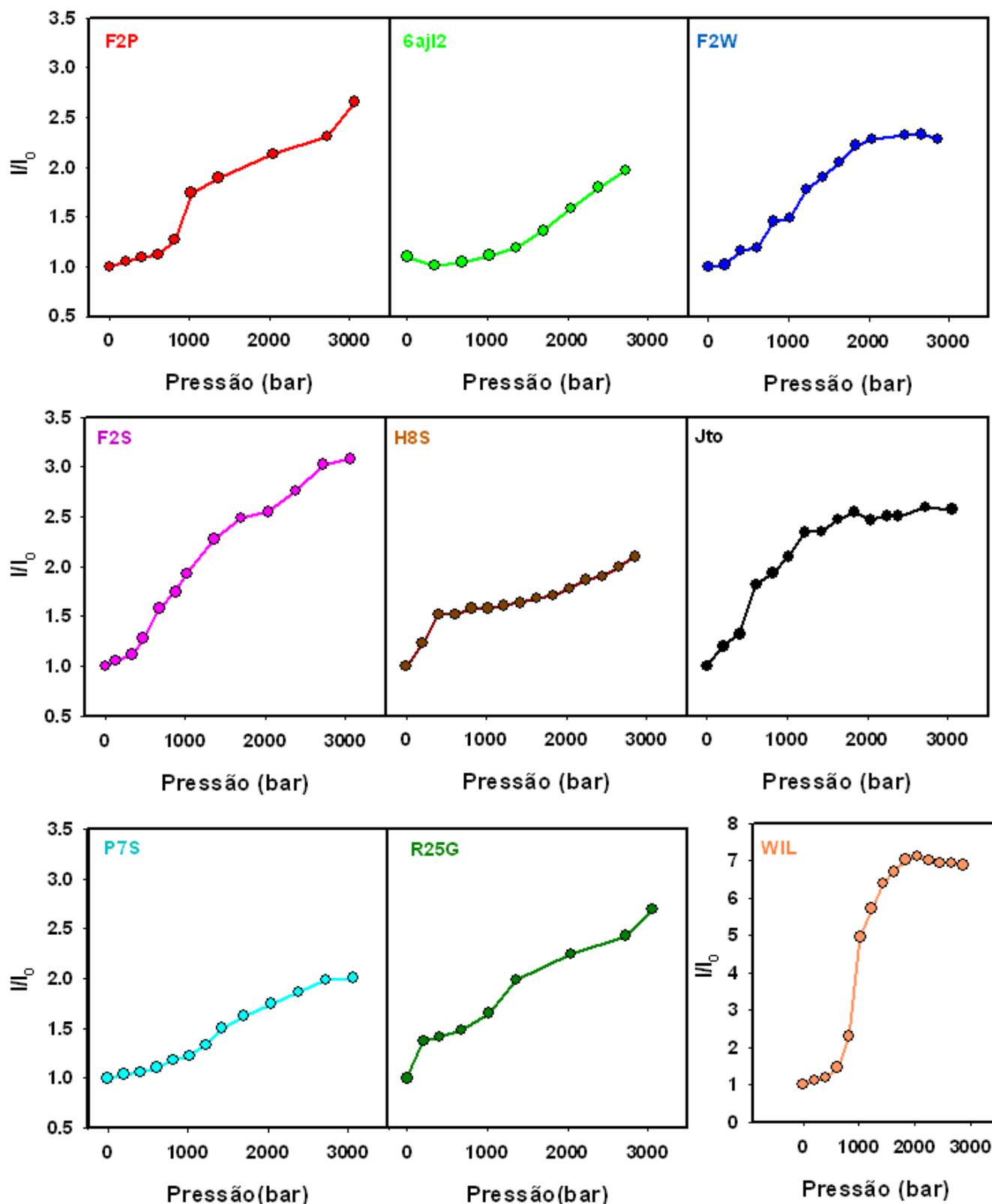
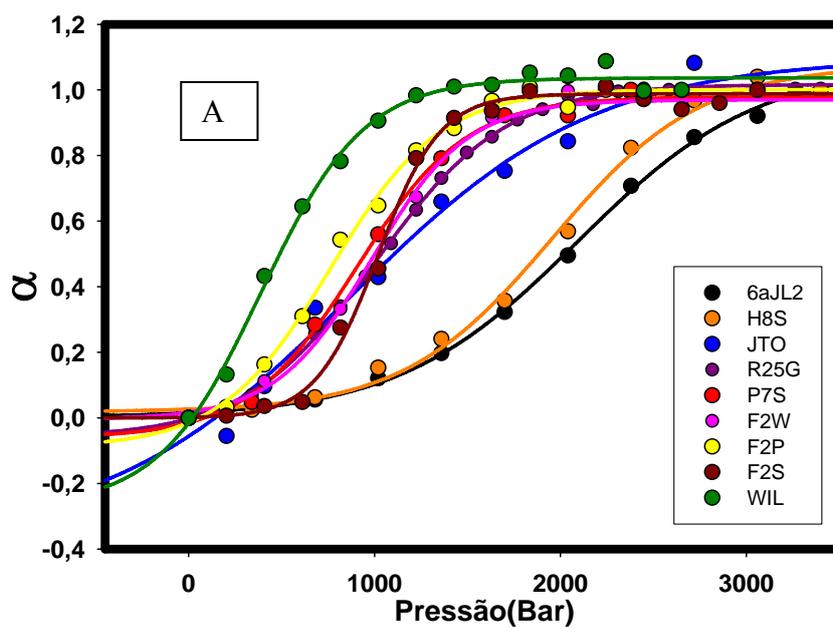


Figura 13: Efeito da alta pressão hidrostática na estabilidade das proteínas monitorada pelo aumento da intensidade de fluorescência do triptofano. Cada uma das proteínas foi submetida a crescentes pressões a 37°C e, após 5 min de incubação, os espectros de emissão foram coletados conforme mencionado na Figura 12. A intensidade de fluorescência em 350 nm em cada valor de pressão foi dividida pelo valor de intensidade a pressão atmosférica (I/I_0). A concentração de proteína em todos os casos foi de 2 μ M.

Na Figura 14 estão mostrados os mesmos dados da Figura 13, porém expressos na forma de grau de desnaturação, que foram calculados conforme equação 2 (Material e Métodos). Como observado, a desnaturação da cadeia leve induzida pela pressão parece não envolver intermediários, já que não foram observadas transições na curva de desnaturação. Os valores de $p_{1/2}$ para cada uma das proteínas estudadas estão mostrados na Tabela 1. A partir desses valores e das curvas apresentadas na Figura 14 e 15, foi possível agrupar essas proteínas em três grupos distintos no que diz respeito a sua susceptibilidade frente à pressão. O primeiro grupo, mais instável, seria composto por um único membro, ou seja, pela proteína Wil, cujo valor de $p_{1/2}$ foi de 500 bar. O segundo grupo, com estabilidade intermediária, seria composto pelas proteínas F2P, F2W, F2S, Jto, R25G e P7S, cujos $p_{1/2}$ variaram entre 700 bar e 1200 bar. O terceiro grupo com maior estabilidade seria constituído pela proteína selvagem, 6aJL2, e pelo mutante H8S, cujos $p_{1/2}$ foram de 2200 e 2000 bar, respectivamente.



B

H8S=6aJL2>F2W=R25G=F2P=P7S=F2S=JTO>Wil

Figura 14. (A) Comparação da estabilidade dos variantes da cadeia leve da imunoglobulina frente à pressão hidrostática. Os dados da Figura 14 foram tratados e expressos como grau de desnaturação (alfa) conforme em Material e Métodos. (B) Ordem de estabilidade das imunoglobulinas de cadeia leve.

A partir da linearização das curvas apresentadas na Figura 14 A, foi possível construir o gráfico $\ln(\alpha/1-\alpha)$ vs pressão (Figura 15), a partir dos quais foi possível calcular os parâmetros termodinâmicos, tais como K_d , ΔG_f e ΔV_f , através das equações 3 e 4 descritas em Material e Métodos (Tabela 2).

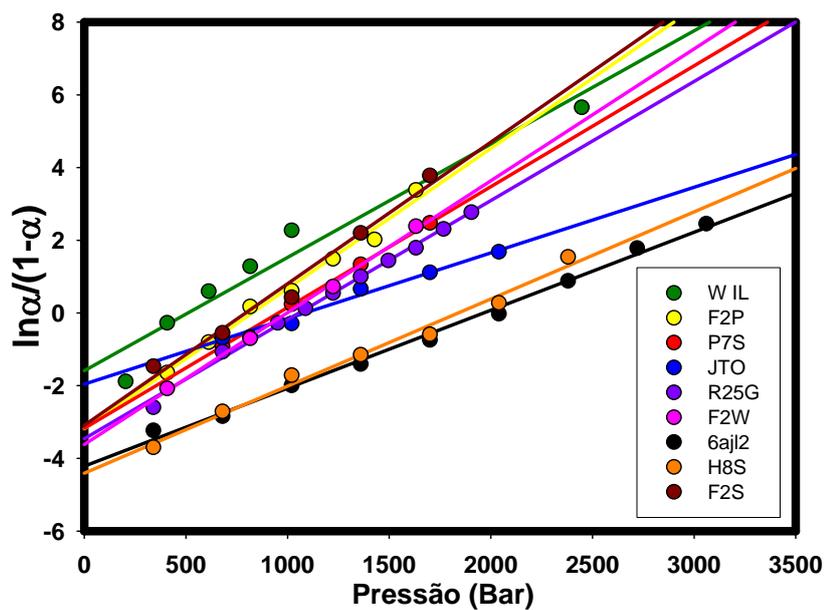


Figura 15. Logaritmização dos dados da Figura 15 conforme equação 3 descrita em Material e Métodos. A inclinação de cada curva fornece a variação de volume (ΔV_f) e o intercepto no eixo y fornece a constante de desnaturação (K_d).

Conforme observado, a variação de energia livre de enovelamento (ΔG_f) da proteína 6aJL2 foi de -2.6 kcal/mol, um valor muito próximo ao da proteína H8S, sua parceira de grupo. Por outro lado, a proteína Wil, mais instável, apresentou ΔG_f igual a -0.98 kcal/mol, o que sugere que as 11 mutações que diferenciam esta proteína da proteína selvagem (6aJL2) decrescem sua estabilidade cerca de 1.6 kcal/mol. Todas as proteínas do grupo intermediário apresentaram ΔG_f em torno de -2 kcal/mol. Uma exceção à regra foi a proteína Jto, que parecia pertencer ao grupo de estabilidade intermediária, mas que apresentou ΔG_f da ordem de -1 kcal/mol, um valor idêntico ao da proteína Wil, a mais instável. Ainda não sabemos ao certo a causa dessa discrepância, mas esse perfil se repetiu em mais de um experimento.

No que diz respeito à variação de volume de enovelamento (ΔV_f), podemos identificar dois grupos de proteínas ao invés de três: um grupo com variação de volume em torno de 45-60 mL/mol, no qual estão Jto, 6aJL2 e H8S e outro grande grupo com as demais variantes, onde a variação de volume oscilou entre 80- 100 mL/mol. Em geral, espera-se que quanto maior a diferença de volume entre a forma nativa e a desnaturada, mais sensível seria a proteína ao emprego de pressão (logo, será uma proteína mais instável). Da mesma forma, quando a variação de volume entre as formas nativa e desnaturada for pequena, espera-se que a proteína seja pouco sensível a pressão (logo, será uma proteína mais estável). Embora não tenha sido possível, através da análise do ΔV , revelar

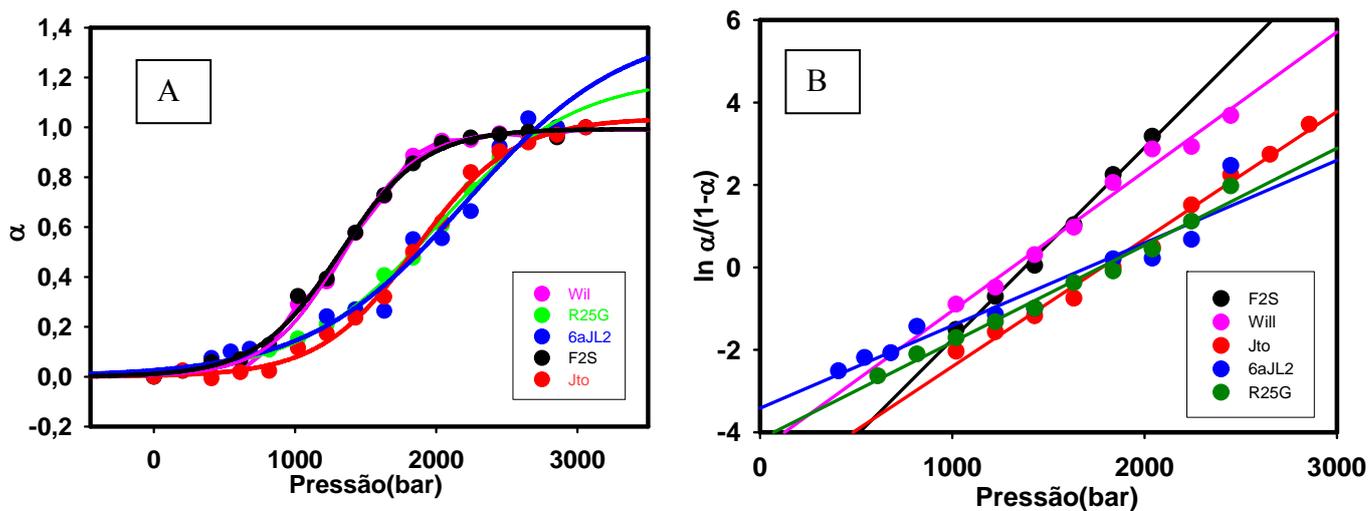
os três grupos de estabilidade anteriormente descritos, foi possível verificar que o grupo mais estável apresentou uma menor variação de volume ao passo que o grupo de estabilidade intermediária e menos estável apresentou uma maior variação de volume.

Proteína	p_{1/2} (bar)	Kd	ΔG_f(Kcal/mol)	ΔV_f(mL/mol)
6ajl2	2200	0.0148	-2.6	55
H8S	2000	0.0122	-2.7	62
Jto	1200	0.1417	-1.2	46
R25G	1000	0.0315	-2.1	85
F2W	1000	0.0269	-2.2	94
F2S	870	0.0454	-1.9	100
P7S	850	0.0419	-1.96	86
F2P	715	0.0414	-1.96	99
Wil	500	0.2046	-0.98	80

Tabela 2. Parâmetros termodinâmicos de enovelamento para as variantes da cadeia leve da imunoglobulina obtidos a partir das curvas de pressão descritas anteriormente com as proteínas Jto, Wil, 6aJL2 e de seus mutantes pontuais.

Até aqui, todos os experimentos relatados foram realizados à 37°C, próximo da temperatura fisiológica. Resolvemos, em seguida, avaliar se a 25°C haveria diferença na estabilidade dessas proteínas. Optamos por trabalhar nessa temperatura ligeiramente menor, já que nesta temperatura a agregação da cadeia leve da imunoglobulina é bem mais lenta. Dessa forma, estudar a desnaturação dessa proteína nessa temperatura nos pareceu também interessante.

A Figura 16 mostra o grau de desnaturação induzida por pressão das proteínas 6aJL2, Wil, F2S, R25G e Jto. Os lotes de alguns dos nossos mutantes haviam terminado, o que nos impossibilitou estudar todo o conjunto de proteínas, conforme havíamos feito a 37 °C. Mais uma vez, a desnaturação da cadeia leve da imunoglobulina mostrou apenas uma transição sugerindo a inexistência de intermediários de enovelamento. Os valores de $p_{1/2}$ dessas curvas estão apresentados na Tabela 3. Quando comparamos esses dados aos dados da Tabela 2, observamos que todas as proteínas mostraram-se mais estáveis a 25°C, com exceção da proteína 6aJL2 que apresentou-se mais instável quando a 25 °C. Seu $p_{1/2}$ foi de 2200 bar a 37°C e 1730 bar a 25 °C. De forma geral, temos que, a 25°C, as proteínas 6aJL2, Jto e R25G poderiam ser agrupadas dentro de um mesmo grupo com estabilidade maior que F2S e Wil. Dessa forma, embora a diferença entre as temperaturas de 25 e 37°C seja pequena, observamos que foi suficiente para mostrar que a 37°C, temperatura fisiológica, os variantes da cadeia leve da imunoglobulina se encontram bastante desestabilizados e isso poderia contribuir para sua maior agregação nessa temperatura.



C

$$R25G = Jto = 6aJL2 > Wil = F2S$$

Figura 16. Comparação da estabilidade dos variantes da cadeia leve da imunoglobulina frente à pressão hidrostática. **(A)** Grau de desnaturação (alfa) calculado conforme equação 2 descrita em Material e Métodos. **(B)** Logaritmização dos dados do painel (A) conforme equações 3 e 4 descritas em Material e Métodos. A inclinação de cada curva fornece a variação de volume de enovelamento (ΔV_f) e o intercepto no eixo y fornece a constante de desnaturação (K_d). **(C)** Sequência de estabilidade das imunoglobulinas de cadeia leve.

Proteína	p_{1/2} (bar)	Kd	ΔGf Kcal/mol	ΔVf mL/mol
6aJL2	1730	0,0328	-2	50
JTO	1830	0,004	-3,2	77
R25G	1930	0,0155	-2,5	58
F2S	1320	0,001	-3,7	115
WIL	1320	0,0119	-2,6	84

Tabela 3. Parâmetros termodinâmicos de enovelamento para as variantes da cadeia leve da imunoglobulina obtidos a partir das curvas de pressão descritas anteriormente nas curvas de pressurização das proteínas Jto, Wil, 6aJL2 e de seus mutantes pontuais.

No que diz respeito a variação de volume de enovelamento a 25°C, observamos que seus valores também foram superiores aos valores obtidos à 37°C, com exceção da proteína 6aJL2. Isso sugere que à 25°C as proteínas estejam mais enoveladas (compactadas) e com mais cavidades em sua estrutura nativa. Essa observação vai ao encontro da maior estabilidade dos variantes a 25°C, uma vez que, por estar mais compactada e enovelada, essas proteínas apresentam também maior estabilidade.

Conforme mencionado anteriormente, a cadeia leve da imunoglobulina apresenta uma ponte de dissulfeto formada pelas cisteínas 23 e 88 (Stevens e Argon, 1999; Khurana e cols, 2001). Esta ponte dissulfeto é a responsável pelo baixo rendimento quântico do triptofano na proteína nativa. Para verificar a contribuição da ponte dissulfeto na estabilidade da cadeia leve da

imunoglobulina foi utilizado um agente redutor, o DTT. Conforme o esperado, na presença deste agente químico, a emissão de fluorescência do triptofano 35 passou a ser menos suprimida, conforme visto na comparação dos espectros de emissão de fluorescência mostrados na Figura 12 para a proteína 6aJL2. Isto sugere que esta ponte esteja acessível ao agente redutor na estrutura nativa. Por este motivo, sempre que o DTT era adicionado à amostra, aguardávamos que a emissão do triptofano se estabilizasse antes de começarmos as curvas de titulação da pressão. Como pode ser observado na Figura 17, a adição de DTT leva a uma desestabilização da estrutura das proteínas 6aJL2 e H8S, ambas proteínas bastante estáveis. As curvas de titulação de pressão foram deslocadas para valores menores, indicando que a presença da ponte dissulfeto seria importante para a estabilidade estrutural destas proteínas.

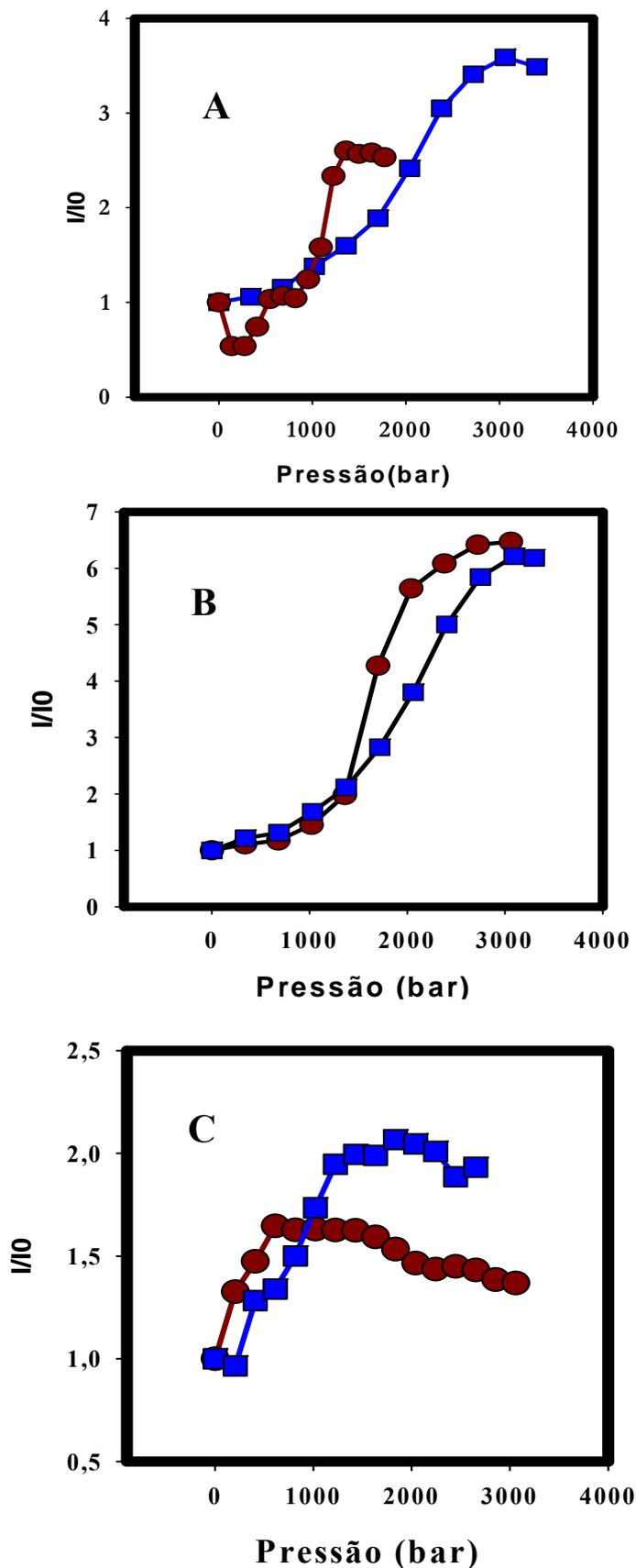


Figura 17. Importância das pontes dissulfetos na estabilidade das proteínas 6aJL2 , H8S e F2S. Em (A) pode ser observada a curva de pressurização da proteína 6aJL2 na ausência (■) e na presença (●) de 5 mM de DTT. Em (B) temos o mesmo para a variante H8S e (C) para F2S. A temperatura experimental foi de 37 °C. A concentração da proteína foi de 2 μM.

A fim de melhor visualizarmos as diferenças na estabilidade da proteína nativa em relação a proteína tratada com DTT, os valores de $p_{1/2}$ foram organizados na Tabela 4. É possível observar que os valores de $p_{1/2}$ apresentaram queda de quase 50 % quando a proteína foi reduzida pelo DTT, mostrando a grande susceptibilidade destas proteínas aos efeitos da pressão, na ausência da ponte dissulfeto.

Proteína	DTT	P_{1/2}
H8S	-	2000
H8S	+	1160
6aJL2	-	2100
6aJL2	+	1380
F2S	-	870
F2S	+	460

Tabela 4. Valores de $p_{1/2}$ obtidos na presença (+) ou ausência (-) de DTT.

4.2. Formação de intermediários de enovelamento sob pressão- o uso da sonda bis-ANS

O bis-ANS é uma sonda fluorescente hidrofóbica amplamente utilizada para mapear estados parcialmente enovelados de proteínas (Silva e cols, 1992; Cordeiro e cols, 2004), já que esta sonda só é capaz de se ligar a cavidades hidrofóbicas acessíveis de proteínas e não a segmentos hidrofóbicos desestruturados. Quando a sonda se liga, sua fluorescência sofre um enorme aumento. Dessa forma, proteínas completamente desnaturadas não ligam bis-ANS. Com o intuito de avaliarmos se a cadeia leve da imunoglobulina, sob pressão à 37°C, estaria completamente desenovelada ou parcialmente enovelada, acompanhamos a ligação da sonda bis-ANS a esta proteína. Conforme observado na Figura 18 A a proteína 6aJL2 apresenta baixa ligação a bis-Ans na sua conformação nativa, sugerindo a presença de poucos sítios hidrofóbicos expostos. Porém, essa ligação aumentou quando a proteína foi submetida a 3060 bar, provavelmente, devido a exposição de regiões hidrofóbicas, previamente inacessíveis ao solvente (Figura 18A). Resultados semelhantes foram observados para os outros mutantes estudados aqui (dados não mostrados). A ligação de bis-ANS sob pressão às proteínas 6aJL2 e aos mutantes pontuais mostrou comportamento semelhante, devido a exposição de regiões de ligação à sonda, mas também distinto devido as diferenças na extensão de ligação(Figura 18B). Enquanto as variantes Jto, F2W e F2S apresentaram aumento de,

aproximadamente, duas vezes na ligação de bis-ANS sob pressão, as variantes R25G, Wil e 6aJL2 ligaram bis-ANS de forma menos pronunciada. Além disto, a variante P7S praticamente não foi capaz de ligar bis-ANS sob pressão, ao passo que a variante F2P, mostrou um perfil de perda de acessibilidade a sonda. Em conjunto, esses dados sugerem que as variantes F2W, Jto e F2S, quando sob pressão, não perdem completamente a sua estrutura terciária, pois ainda são capazes de alojar a sonda bis-ANS. O mesmo poderia ser dito para as proteínas Wil, R25G e 6aJL2, porém de forma menos pronunciada. Curiosamente, a variante F2P parece estar mais desenovelada sobre pressão já que não foi capaz de ligar bis-ANS(Figura 18B).

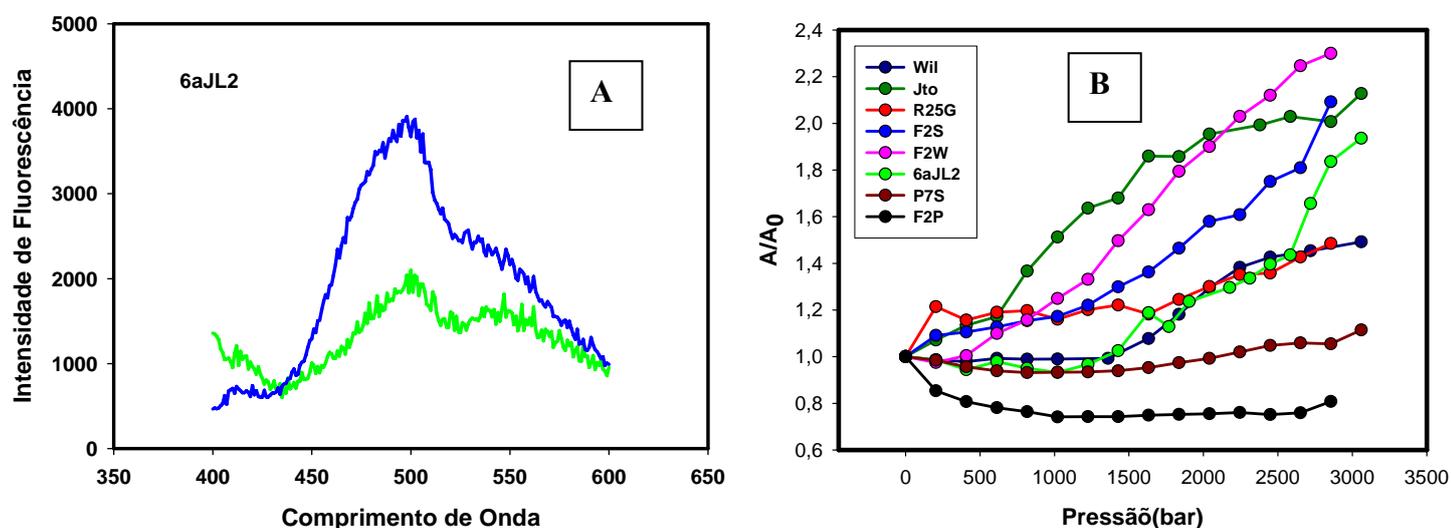


Figura 18: Efeito da alta pressão sobre as proteínas de cadeia leve monitorada pela ligação da sonda bis-ANS. (A) Espectro da proteína 6aJL2 a 0 bar (—) e a 3060 bar (—). (B) Ligação da proteínas a sonda bis-Ans, O espectro de bis-Ans obtido a cada pressão A foi normalizado pelo valor inicial (A_0). A concentração de proteína utilizada foi de 2 μM e a concentração de bis-ANS foi de 4 μM . A ligação da sonda à proteína foi monitorada através das mudanças na intensidade de fluorescência da sonda, excitando-se as amostras em 360 nm e varrendo a emissão entre 400- 600 nm. O tempo de incubação em cada pressão foi de 5 min e a temperatura utilizada foi de 37°C.

4.3. Desnaturação térmica da cadeia leve da imunoglobulina monitorada pela perda de estrutura secundária: forma selvagem versus variantes

Conforme reportado anteriormente por Mclaughlin e colaboradores, o espectro de dicroísmo circular da cadeia leve da imunoglobulina apresenta um perfil bastante atípico (Mclaughlin e cols, 2006) e figura 19. O pico negativo em 235 nm tem sido atribuído à presença de uma grande quantidade de resíduos aromáticos que distorcem o espectro de dicroísmo (Mclaughlin e cols, 2006). No caso da cadeia leve da imunoglobulina, dos 111 resíduos, existem 6 tirosinas, 3 fenilalaninas e 1 triptofano que contribuem para a presença deste pico. A Figura 19 mostra os espectros de dicroísmo circular das proteínas F2P, R25G, P7S e H8S. Conforme esperado, os espectros não apresentaram picos nas regiões atribuídas às α -helices (208 e 222 nm), mas sim duas bandas negativas em torno de 218 nm e 235 nm (Figura 19). O mínimo em 218 nm corresponde às folhas- β e o mínimo em 235 nm, conforme mencionado acima é devido à contribuição dos resíduos aromáticos na faixa do ultravioleta em combinação com a geometria da ponte dissulfeto no interior da proteína (Mclaughlin e cols, 2006).

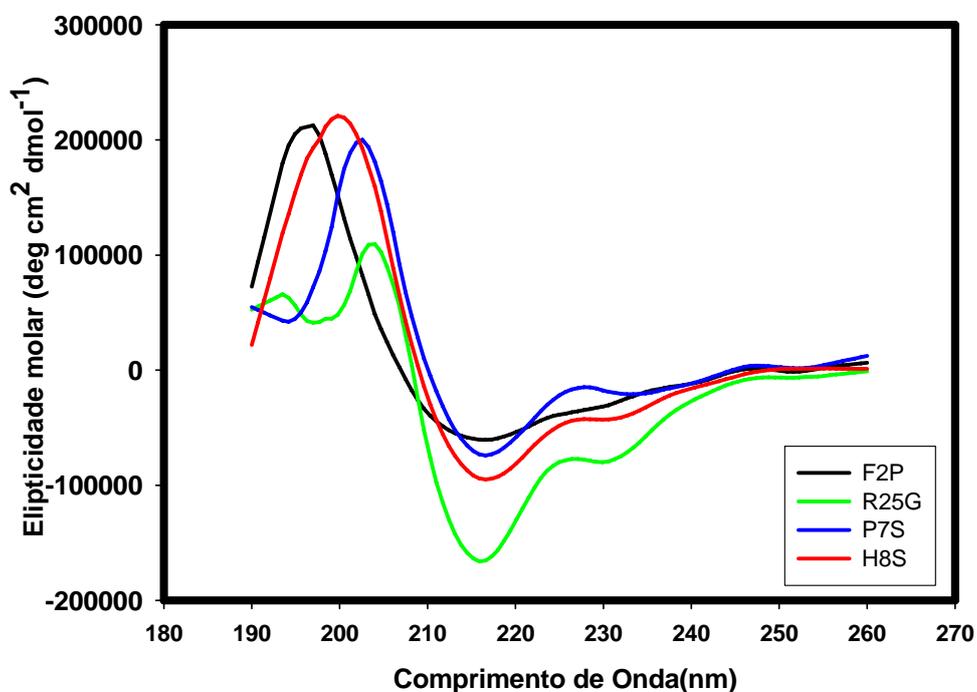


Figura 19: Análise do conteúdo de estrutura secundária das variantes da cadeia leve da imunoglobulina F2P, R25G, P7S e H8S. A concentração das proteínas foi de $2 \mu\text{M}$ em todas as amostras e a temperatura 37°C .

Como já havíamos observado uma diferença nos efeitos induzidos pela alta pressão hidrostática a 25 e 37°C nas proteínas 6aJL2, R25G, Jto, Wil e F2S, resolvemos avaliar o efeito da variação da temperatura no conteúdo de estrutura secundária destas proteínas. Na figura 20A, observa-se que com o aumento da temperatura o pico em 205 nm sofre incremento. Este pico tem sido referido como característico de estrutura aleatória, ou seja, sem estrutura secundária definida. Desta forma, os dados mostram que a proteína H8S ao ser aquecida

apresenta perda de estrutura secundária, compatível com a sua desnaturação. Em adição, o mesmo perfil foi observado para os mutantes F2P, P7S e R25G.

Conforme mostrado na figura 20B, as mudanças de elipticidade em 205 nm (estrutura randômica), ocorreram à medida que as proteínas foram aquecidas. Mais uma vez observamos diferença de estabilidade entre os variantes, onde o mutante R25G mostrou-se o mais instável e o mutante H8S o mais estável (Figura 20B).

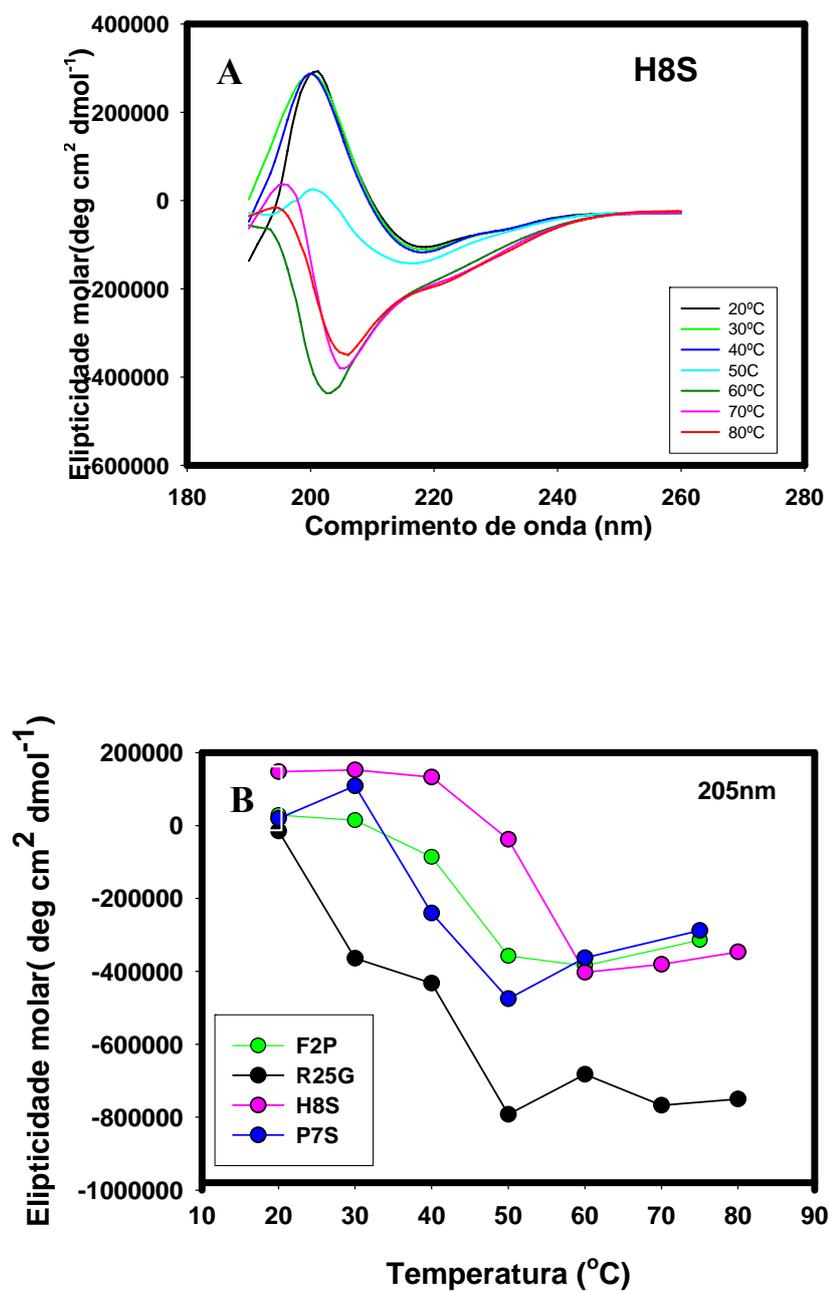


Figura 20: Mudança na estrutura secundária do mutante H8S induzida pela variação na temperatura (A). Curvas de temperatura monitorando a elipticidade molar das proteínas H8S, F2P, R25G e P7S no comprimento de onda de 205 nm (B). A temperatura variou de 20 a 80°C. O tempo de equilíbrio em cada temperatura foi de 5 minutos.

4.4. Estudos de força atômica com as fibras amilóides da cadeia leve da imunoglobulina

Nos últimos anos, tem sido possível estudar amostras biológicas através das imagens de microscopia de força atômica (AFM), particularmente quando a amostra é depositada numa superfície sólida (mica) (Khurana e cols,2003). A AFM é uma técnica que permite a visualização e mensuração das estruturas que compõem as amostras observadas. Entre estas estruturas, as fibras amilóides têm sido bastante estudadas por AFM (Harper e cols, 1997, Ionescu-Zanetti e cols,1999.) Através desta técnica realizamos imagens das fibras formadas *in vitro* pela cadeia leve de imunoglobulinas, tanto a 6aJL2 quanto o mutante R25G. Estas fibras foram formadas como descrito em Material e Métodos, incubando as proteínas na concentração de 8 μ M por 20 horas para proteína 6aJL2 e 5 horas para a R25G sob agitação a 37°C.

As amostras foram colocadas na superfície da mica previamente clivada. A figura 21 mostra a imagem das fibras formadas pela proteína 6aJL2. Para analisar o tamanho das estruturas encontradas, realizamos medidas de altura e comprimento dessas fibras através do programa de análise IGOR PRO (Wavemetrics,OR). A altura das fibras varia entre 5 e 6 nm em média.

Observamos na imagem da Figura 21 que com o tempo de 20 horas de incubação, foi possível notar a presença de algumas fibras longas, com comprimento de até 800 nm, mas também algumas fibras menores.

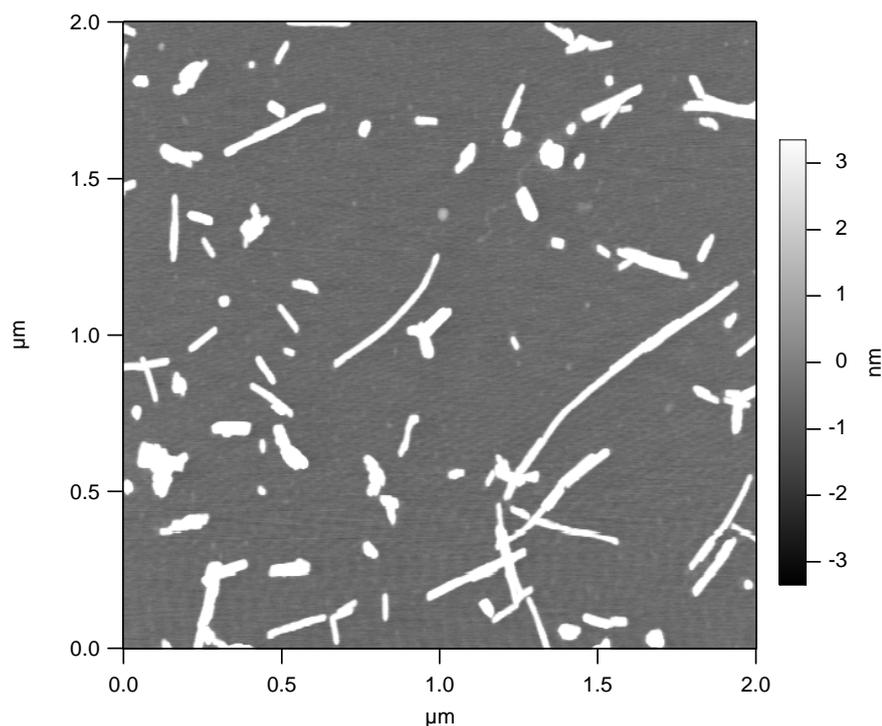


Figura21: Imagem de AFM da imunoglobulina de cadeia leve 6aJL2. Foram colocados 20 μl de amostra na mica pré-clivada e a imagem foi realizada do modo tapping.

As fibras da proteína R25G (Figura 22) foram preparadas do mesmo modo que a 6aJL2, com a diferença no tempo de incubação descrito para formação das fibras e as imagens foram realizadas. As fibras formadas por este mutante apresentaram altura variando entre 4 e 6 nm e comprimentos variados, assim como observado para a 6aJL2.

Não foi possível observar diferenças estruturais evidentes entre as fibras formadas por estes dois mutantes através das imagens obtidas. Porém, pudemos confirmar a formação de fibras do tipo amilóide e, a partir daí, avaliar a estabilidade das fibras formadas entre diferentes mutantes, o que é mostrado na seção a seguir (seção 4.5).

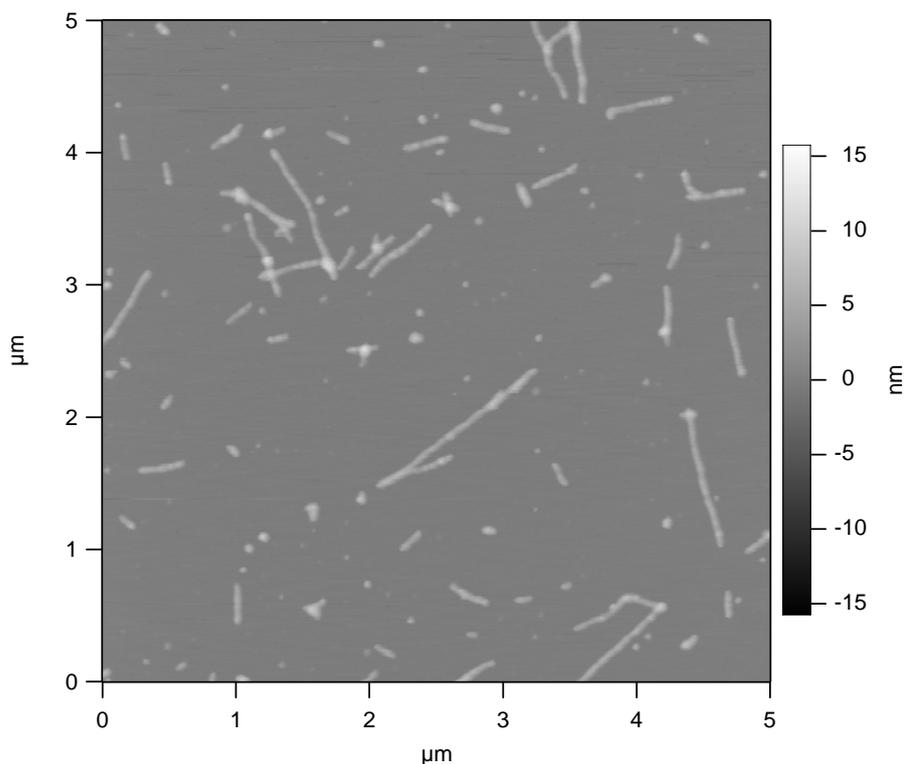


Figura22: Imagem de AFM da imunoglobulina de cadeia leve mutante R25G. A imagem foi realizada do modo tapping onde 20 μl de amostra foram colocados na mica pré clivada.

4.5 Estudo de estabilidade das fibras amilóides da cadeia leve da imunoglobulina – efeito da alta pressão e da alta temperatura

Trabalhos anteriores do nosso grupo demonstraram que a alta pressão hidrostática foi capaz de dissociar agregados protéicos não amilóides da proteína tailspike do bacteriófago p22, na ausência de qualquer agente químico (Foguel e cols, 1999). Recentemente, a alta pressão foi utilizada para dissociar agregados protéicos do tipo amilóide da proteína transtirretina e da α -sinucleína, um processo que se mostrou reversível (Foguel e cols, 2003, Follmer e cols, 2007).

Resolvemos, então, avaliar o efeito da pressão sobre as fibras constituídas pela cadeia leve da imunoglobulina. Para avaliarmos se as fibras estariam sendo desmontadas pela ação da alta pressão, acompanhamos a intensidade de fluorescência da tioflavina-T (Thio-T), uma sonda fluorescente que se liga à fibras amilóides (Khurana e cols, 2005), bem como a queda do espalhamento de luz. As fibras foram preparadas incubando-se 8 μ M das proteínas sob agitação a 37°C, como descrito em Material e Métodos (seção 3.6). Em seguida, as fibras foram diluídas em tampão e a thio-T foi acrescentada a uma concentração final de 20 μ M. Esta amostra foi, então, submetidas a 3060 bar e a fluorescência da thio-T e o espalhamento de luz acompanhados ao longo do tempo (Figura 23).

Como se pode observar na Figura 24, a intensidade de thio-T, ao invés de diminuir pela dissociação das fibras sob pressão, aumenta quando sob pressão. Isto sugere que as fibras formadas pela cadeia leve da imunoglobulina, seja a

forma selvagem ou os variantes F2S ou R25G, não foram desfeitas quando submetidas a alta pressão. Ao contrário, passaram a ligar mais thio-T sugerindo que essas fibras estão assumindo uma nova conformação sob pressão capaz de se ligar ainda mais à sonda. Depois de 5 minutos sob pressão observamos uma queda na intensidade de fluorescência da thio-T no caso da fibra formada pela proteína R25G, o que provavelmente está acontecendo devido à sedimentação das fibras dentro da cubeta de pressurização. Para verificar a ocorrência deste fato, após a retirada da pressão a cubeta de pressurização foi levemente agitada e com isso a intensidade de thioflavina-T aumentou, justificando o fato das fibras estarem se sedimentando.

Cabe ressaltar que os valores de espalhamento de luz não sofreram variação quando as amostras foram submetidas à alta pressão, confirmando a integridade das fibras nessas condições.

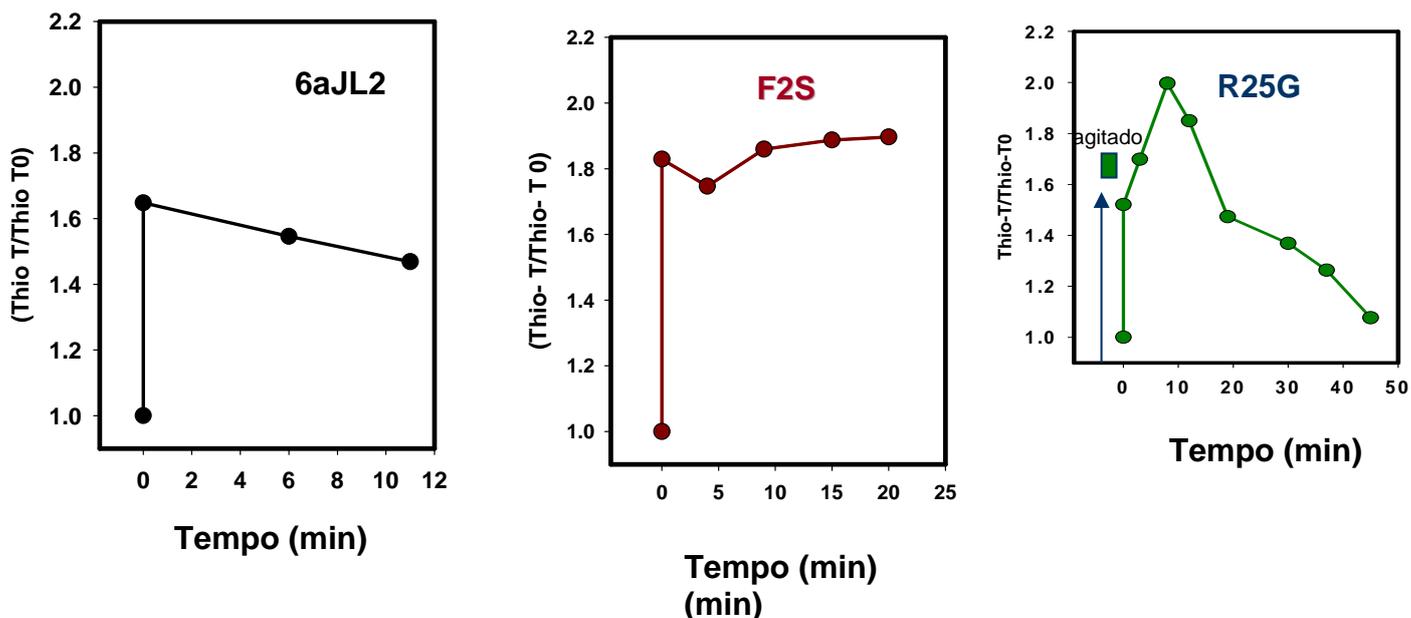


Figura 23: Efeito da alta pressão hidrostática nas fibras amilóides formadas pelas proteínas 6aJL2, F2S e R25G. As fibras foram preparadas sob agitação a 37°C e submetidas a 3060 bar. A concentração de thio-T utilizada foi de 20 μ M. As amostras foram excitadas a 433nm e a emissão foi varrida de 460-600 nm. O símbolo isolado no painel da proteína R25G corresponde à intensidade de thio-T após decompressão e agitação da cubeta de pressurização.

Visto que as fibras amilóides formadas pela cadeia leve da imunoglobulina se mostraram resistentes ao emprego de alta pressão, resolvemos investigar se altas temperaturas levariam a desestabilização dessas fibras. Para tal, as fibras eram preparadas conforme descrito anteriormente, diluídas em tampão na mesma concentração e, em seguida, eram incubadas por 10 min em cada uma das temperaturas mencionadas na abscissa da Figura 24. Após esse tempo, as amostras eram resfriadas a 25 °C e a thio-T era adicionada e sua fluorescência medida sempre a 25 °C. Este protocolo foi adotado uma vez que a fluorescência da thio-T é sensível a temperatura o que nos impossibilitou fazer medidas de fluorescência de thio-T nas temperaturas mencionadas.

Como mostrado na Figura 24, quando analisamos o efeito da alta temperatura nas fibras das proteínas F2S e R25G que foram formadas sob agitação, observamos que a fibra formada pelo mutante F2S mantém a ligação a thio-T, mesmo quando incubada por 10 min a 85°C, sugerindo uma grande estabilidade dessas fibras também frente a alta temperatura. No que diz respeito as fibras formadas pelo mutante F2S, observamos que há um decréscimo da ligação de thio-T somente a 85 °C, sugerindo que nesta temperatura a fibras está se desorganizando.

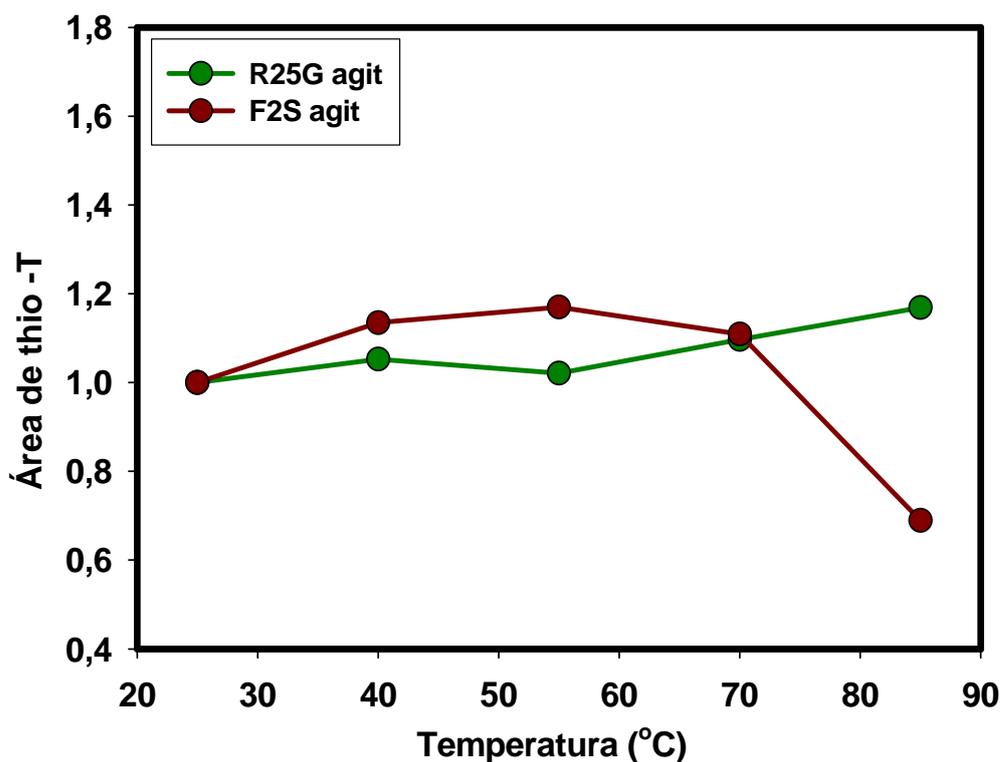


Figura 24: Efeito da alta temperatura nas fibras das imunoglobulinas de cadeia leve R25G e F2S. Os espectros de intensidade de Thioflavina-T foram obtidos mediante excitação em 433 nm e varredura da emissão da fluorescência entre 460 e 600 nm. As fibras foram preparadas conforme material e métodos e utilizou-se uma concentração de 20 μ M de thio-T. As proteínas R25G e F2S foram previamente incubadas por 10 minutos em cada temperatura indicada porém as medidas foram realizadas a temperatura ambiente.

As fibras amilóides podem ser crescidas de duas maneiras: na ausência ou na presença de sementes. No primeiro caso, parte-se da proteína solúvel que é incubada sob agitação em concentração e temperatura adequadas. No segundo caso o que se faz é adicionar pequenas sementes que são obtidas pela sonicação de fibras previamente formadas e que funcionam como agente nucleador e acelerador da agregação. Neste caso, não há necessidade de se agitar a amostra. Dessa forma, resolvemos comparar se havia diferença na sensibilidade à alta temperatura das fibras crescidas na presença de sementes. Cabe ressaltar que os dados mostrados nas Figura 23 e 24 foram feitos com sementes crescidas sob agitação.

Curiosamente, as fibras crescidas na presença de sementes (ditas fibras estendidas), apresentaram um comportamento bastante diferente do apresentado pelas fibras crescidas sob agitação (Figura 25). As fibras formadas pelo variante R25G, quando submetidas às temperaturas de 40, 55 ou 70°C, apresentaram maior ligação a sonda thio-T, sugerindo que essas fibras não estejam sendo desmontadas pelo tratamento térmico, mas, ao contrário, estejam indo para uma conformação capaz de ligar ainda mais thio-T. Somente em 85 °C é que observamos a perda dessa capacidade de se ligar mais fortemente à sonda. Já a fibra formada pelo variante F2S, tem sua capacidade de se ligar a thio-T aumentada em 70°C que fica ainda maior em 85°C.

Nossos resultados sugerem que tanto a alta pressão como altas temperaturas parecem estar induzindo uma mudança conformacional nas fibras formadas pela cadeia leve da imunoglobulina levando-as a um estado capaz de se ligar a mais thio-T.

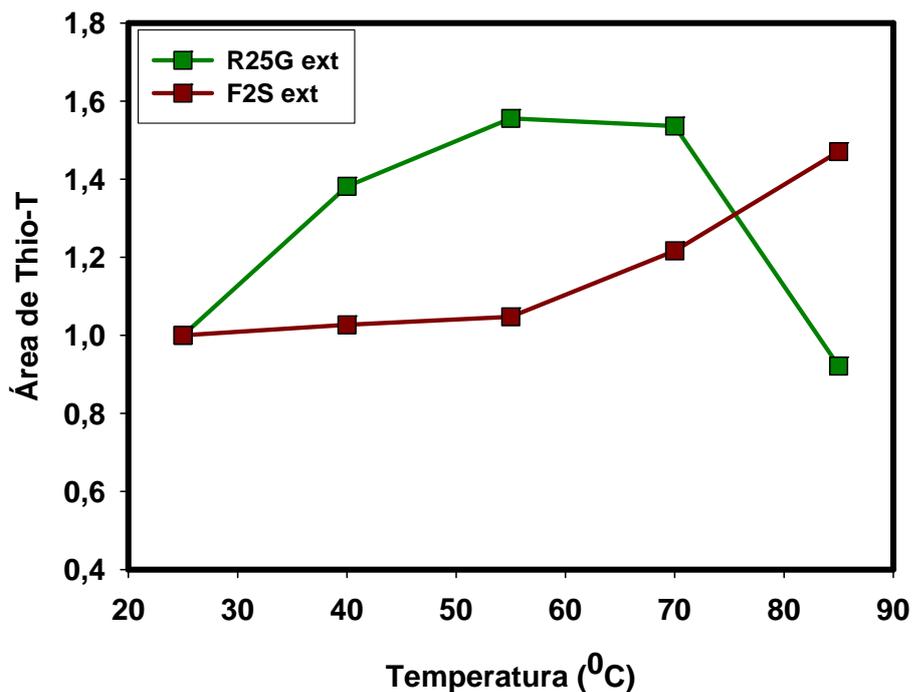


Figura 25: Efeito da alta temperatura nas fibras das imunoglobulinas de cadeia leve R25G e F2S extendidas. Os espectros de intensidade de Thioflavina-T foram obtidos mediante excitação em 433 nm e varredura da emissão da fluorescência entre 460 e 600 nm. As fibras foram preparadas com adição de sementes conforme em material e métodos e utilizou-se uma concentração de 20 μ M de Thio-T. As proteínas R25G e F2S extendidas foram previamente incubadas por 10 minutos em cada temperatura indicada porém as medidas foram realizadas a temperatura ambiente.

5.0. Discussão

5.1. Estabilidade termodinâmica da cadeia leve da imunoglobulina

A amiloidose primária (AL) apresenta como característica o depósito de cadeias leves da imunoglobulina na forma de fibras amilóides em órgãos vitais como os rins e o coração, levando a disfunção e morte dos seus portadores (Hurle e cols, 1994; Wall e cols, 1999; Ionescu-Zanetti e cols, 1999; Belloti e cols, 1999;). Muitas neoplasias de células-B são acompanhadas pela secreção de cadeias leves ou proteína de Bence Jones que são detectadas na urina em grandes quantidades (Stevens and Argon, 1999). Isso ocorre pelo fato da cadeia leve ser produzida em grandes quantidades em relação à cadeia pesada, gerando um excesso de cadeias leves na forma livre (Belloti e cols, 1999; Buxbaum, 2004; Mclaughlin e cols, 2005). Entretanto, não só o excesso de cadeias leves livres explica sua agregação, já que alguns variantes não agregam, embora também estejam em excesso.

A cadeia leve da imunoglobulina possui dois domínios, cada qual possuindo duas folhas beta enoveladas na forma beta sanduíche (Stevens e Argon, 1999). Esses domínios são ligados por uma ponte dissulfeto entre as cisteínas 23 e 88 (Buchner e cols, 2002). A presença de folhas beta é uma constante em todos os agregados amiloidais e, desta forma, diferentemente da proteína do prion que requer um grande rearranjo estrutural quando da formação da fibra amilóide, a cadeia leve já possui o arranjo estrutural encontrados nas fibras (folhas-beta). Entretanto, conforme apontado anteriormente, algumas

mutações parecem tornar alguns variantes da cadeia leve mais ou menos amiloidogênicos. Chiti e cols têm mostrado que mutações que aumentam a hidrofobicidade ou aumentam a carga negativa das proteínas apresentam maior propensão à amiloidogenicidade. Diferentemente do que ocorre com a transtirretina, onde apenas uma mutação pontual está presente em cada família portadora de amiloidose familiar polineuropática (Goldsteins e cols,1997), no caso da cadeia leve há um acúmulo de diversas mutações no mesmo variante. Este grande número de mutações está relacionado ao papel dos anticorpos que são naturalmente heterogêneos. Reproduzir essas mutações no laboratório com proteínas recombinante seria extremamente laborioso e, em função disso, o grupo do Dr. Becerril da Universidade Autônoma do México, através da análise da estrutura cristalográfica deste domínio, resolveu produzir mutantes pontuais que recapitulassem o papel de um conjunto de mutações, seja na estabilidade desse domínio, seja na sua amiloidogenicidade. Este foi então o propósito das mutações desenhadas.

Através da análise da estrutura cristalográfica do domínio selvagem (Figura 27), pode-se perceber que o segmento N-terminal localiza-se entre as fitas beta B e G, com as quais estabelece várias interações. Essas fitas localizam-se na borda da proteína e acredita-se que sejam importantes no estabelecimento de contatos inter-monômeros que poderiam resultar na agregação (Richardson e Richardson, 2002). Conforme observado na estrutura cristalográfica, os resíduos de 1 a 7 do segmento N-terminal estão mais próximos da fita B onde se observa

a presença de um par de pontes de Hidrogênio entre o grupo carbonila e amida da cadeia principal da Asn5 com a Thr24.

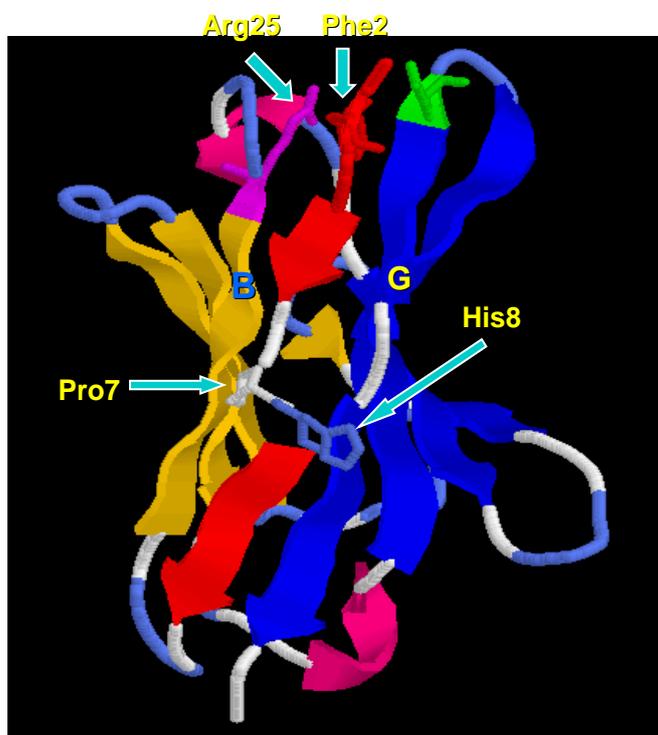


Figura 27: Estrutura cristalográfica da proteína 6aJL2. Em destaque está mostrado os aminoácidos Pro7, His8, Arg25 e Phe2, que são muito importantes para a estabilidade da proteína. (Del Pozo, 2006)

Outra interação importante se dá entre o anel fenólico da Phe2 e o grupo guanidino da Arg25 (esses resíduos são típicos da sequência λ VI). Essas interações parecem cruciais para manter as fitas B e G protegidas do contato com a água e proteínas vizinhas.

Estudos de desnaturação térmica ou de desnaturação com cloreto de guanidina e uréia estão sendo conduzidos pelos nossos colaboradores mexicanos. Esses estudos mostraram que a substituição de Arg25 por Gli leva a uma diminuição de 1,4 kcal de estabilidade, o que indica um importante papel

para a interação Phe2-Arg25 (Tabela 4). No presente estudo, quando comparamos a diferença de estabilidade entre 6aJL2 e R25G à 37 °C, observamos que há perda de apenas 0,5 kcal de estabilidade em decorrência da saída da Arg25. Essa diferença é bem menor do que aquela determinada nos estudos de desnaturação térmica reportados anteriormente. Na verdade, quando comparamos os valores de ΔG_f obtidos no presente estudo com aqueles obtidos pelos nossos colaboradores encontramos uma grande diferença. Conforme tabela abaixo:

Variante	Ligação de bis-ANS, Fig. 18	ΔG_f obtido pelo uso de HHP	ΔG_f obtido pelo uso de alta temperatura ^a ou GdnHCl ^b
6aJL2	(1,2)	-2,6	-5,2 ^a -5,1 ^b
H8S	(n.d)	-2,7	-5,0 ^a
Jto	(2,2)	-1,2	-4,6 ^a -4,6 ^b
R25G	(1,5)	-2,1	-3,8 ^a
F2W	(2,3)	-2,2	-4,3 ^a
F2S	(2,2)	-1,9	-3,5 ^a
P7S	(1,1)	-2,0	-3,7 ^a
F2P	(-0,8)	-2,0	-3,5 ^a
Wil	(2,2)	-1,0	-3,0 ^a -2,2 ^b

Tabela 5: Análise comparativa dos valores de ΔG_f para as proteínas de cadeia leve estudadas na presença de alta pressão hidrostática, alta temperatura e cloreto de guanidina. Os valores em parêntese indicam a ligação de bis-ANS, onde n.d.= não determinado e valor negativo significa desligamento do bis-ANS.

Essas diferenças podem ser devido ao agente desnaturante empregado. Em geral, a alta pressão atua de forma mais branda sobre a estrutura das proteínas do que os demais agentes (Foguel e Silva, 2004). Isso pode ser comprovado pelo fato de que praticamente todos os variantes da imunoglobulina de cadeia leve serem capazes de ligar bis-ANS quando sob pressão (veja valor na tabela 5 que representa o quanto de aumento da ligação de bis-ANS foi observado em cada caso - Figura 18, Resultados) com exceção da proteína F2P, o que sugere fortemente que não se encontrem completamente desenovelados e, sim, numa conformação parcialmente desenovelada. Na presença de alta concentração de guanidina ou altas temperaturas, não há ligação de bis-ANS sugerindo que a proteína esteja completamente desenovelada (dados do colaborador). Isso poderia explicar a diferença do ΔG_f , uma vez que o calculado na presente dissertação refletiria a passagem da proteína nativa para uma conformação intermediária ($N \rightarrow I$), ao passo que os demais agentes estariam levando a proteína nativa para uma conformação desenovelada ($N \rightarrow U$). Dessa forma propomos que, sob pressão, a cadeia leve da imunoglobulina não se encontre totalmente desenovelada, mas sim, com parte da sua estrutura terciária preservada sendo ainda capaz de ligar a sonda bis-ANS.

De qualquer forma, podemos perceber claramente que, embora haja diferenças nos valores de ΔG_f calculados, também podemos separar três grupos

de proteínas em função de suas estabilidades a partir dos dados de nossos colaboradores:

Grupo 1 – mais estável: 6aJL2, H8S e Jto

Grupo 2 – intermediário : Jto, R25G, F2W, F2S, P7S, F2P

Grupo 3 – mais instável : Wil

Jto parece ser o único que fugiu a regra uma vez que por pressão mostrou-se muito instável, mas não frente ao emprego de agentes químicos. No entanto, vale ressaltar que Jto apresenta uma ponte salina entre o D29 e a R68 que poderia explicar esse aumento de estabilidade, devido à interação iônica entre esses dois resíduos opostamente carregados. Por outro lado, a proteína Wil, bastante instável, possui aminoácidos neutros nestas posições (Pokkuluri e cols, 1999; Wall e cols, 2004; Del Pozo e cols, 2006). Curiosamente, a alta pressão é bastante eficaz em romper pontes salinas, uma vez que as cargas isoladas passam a ser hidratadas o que resulta em diminuição de volume (Weber e Drickamer, 1983). Esse fenômeno é conhecido como electrostricção e poderia explicar a grande sensibilidade desse variante frente ao emprego de pressão e o fato dele ter ficado em grupos diferentes quando comparamos alta pressão com cloreto de guanidina.

Na estrutura nativa de 6aJL2, a F2 se encaixa numa cavidade hidrofóbica formada por L4, V97 e R25 (Figura 28).

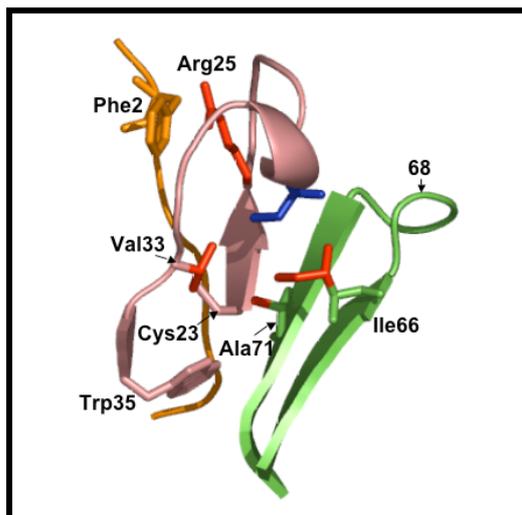


Figura 28: Estrutura da proteína 6aJL2. (Del Pozo, 2006)

Com o intuito de se avaliar a contribuição das interações feitas pela F2, foram construídos os mutantes F2S, F2P e F2W. Conforme observado, a substituição F2W resultou na perda de apenas 0,4 kcal/mol, o que é esperado, pois tanto a fenilalanina quanto o triptofano são resíduos apolares e volumosos que podem, de maneira geral, serem intercambiados sem grande custos energéticos. Pela desnaturação térmica, também a diferença entre 6aJL2 foi a menor ($\Delta\Delta G_f = 0,9$ kcal/mol).

A estrutura cristalográfica do mutante F2S mostrou a presença de uma cavidade que passa a ser parcialmente ocupada pela metionina 3 que se

movimenta nessa direção. De fato, das três mutações nesta posição, essa foi a que mais trouxe decréscimos energéticos ($\Delta\Delta G_f = 0,7$ kcal/mol), muito provavelmente pela cavidade desocupada gerada e pelo movimento que a metionina faz para tentar ocupá-la. Curiosamente, estes foram os mutantes que apresentaram maior variação de volume quando da sua desnaturação por pressão e valores na faixa de 100 mL/mol foram observados. Estas observações estão de acordo com os dados cristalográficos (só disponível para o F2S) que revelaram a presença de uma cavidade gerada pela substituição da fenilalanina pela serina com o concomitante movimento da fita em torno da metionina 3 para esta direção. No momento, não entendemos por que o variante F2P foi o único que perdeu acessibilidade ao bis-ANS sob pressão, mas esse resultado se repetiu em mais de um experimento.

Depois de avaliarmos a estabilidade da cadeia leve da imunoglobulina à 37°C, decidimos fazer uma análise similar à 25°C. Infelizmente, não dispúnhamos nesse momento de todo o repertório de mutantes. Curiosamente, todos os variantes estudados mostraram-se mais estáveis a 25°C quando comparado à 37°C, o que sugere que à temperatura fisiológica eles devam apresentar-se mais instáveis. Essa observação é bastante relevante se lembrarmos que a amiloidogenicidade parece ser maior quanto mais instável for a proteína. De forma antagônica, a proteína selvagem 6aJL2 mostrou maior estabilidade à 37 °C. Esta proteína também apresentou menor tendência em sofrer agregação à 37°C, apresentando uma fase lag de aproximadamente 17

horas (dados do nosso colaborador. Para comparação, Wil apresenta esse valor igual a 1 hora).

Na tentativa de avaliar o papel da ponte dissulfeto na estabilidade da cadeia leve da imunoglobulina, utilizamos o DTT, pois tem sido mostrado que a conformação nativa da imunoglobulina é fortemente estabilizada pela ponte dissulfeto localizada no core hidrofóbico do domínio do anticorpo (Goto e cols, 1979; Buchner e cols, 2002). Utilizamos as proteínas 6aJL2, F2S e H8S. Nossos dados mostraram que na presença do DTT estas proteínas se desnaturam mais rapidamente, sugerindo que o rompimento da ponte pelo DTT facilita o processo de desnaturação (Figura 17).

Estudos de desnaturação térmica também foram por nós realizados, mas, nesse caso, resolvemos avaliar o conteúdo de estrutura secundária. Como previamente mostrado para outros tipos de imunoglobulinas o aumento de temperatura leva a uma perda do mínimo, de elipicidade, em 235 nm e o aparecimento de um pico em 205 nm, característico de estrutura aleatória, como observado por dicroísmo circular (Mclaughlin e cols., 2006). O mesmo perfil foi observado para todas as proteínas estudadas nesta tese. Contudo, foi notado um maior ganho na elipicidade em 205 nm para o mutante R25G, do que para os outros mutantes ilustrados na Figura 20C. Este dado nos mostra que a ruptura da interação estabelecida na proteína 6aJL2 pela interação do resíduo R25 com o F2, estabiliza não somente a estrutura terciária mas também a estrutura secundária já que o mutante R25G foi muito instável estruturalmente, quando

acompanhado pela fluorescência intrínseca do triptofano e por dicroísmo circular (Figura 14A e 20C).

5.2. Estabilidade *versus* Amiloidogenicidade:

Conforme sugerido anteriormente e conforme demonstrado neste estudo, parece existir uma correlação inversa entre estabilidade termodinâmica e amiloidogenicidade (Raffen e cols, 1999; Kim e cols, 2000; Wall e cols, 2004), ou seja, quanto menos estável for um determinado variante, maior será sua propensão em sofrer agregação. Isto se deve ao fato que, de forma geral, as proteínas agregam a partir de um estado conformacional não nativo que exporia superfície apolar ao solvente (Dobson, 1998) que serviriam de sítio de contato inter cadeia. Quanto mais instável fosse um variante, mais facilmente ele experimentaria essa conformação alterada e mais facilmente ele iria para a forma agregada.

Nossos estudos mostraram que à 37°C, a seqüência de estabilidade observada frente ao emprego de alta pressão foi:

H8S = 6aJL2 > F2W = R25G = F2P = P7S = F2S = Jto > Wil

A figura 29 mostra o perfil de agregação desses variantes que foi obtido pelo nosso colaborador no México.

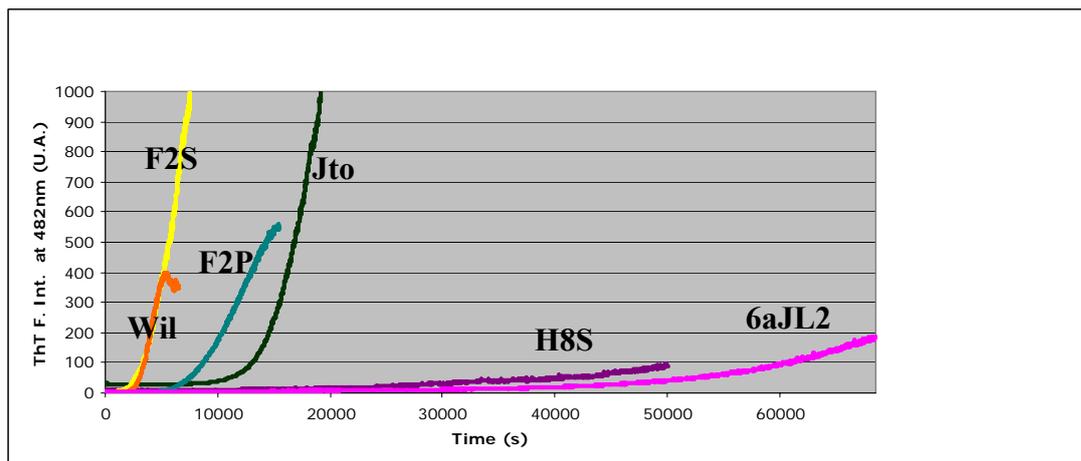


Figura 29: Cinética de agregação amilóide. Agregação das proteínas 6aJL2 e seus mutantes analisada através da intensidade de ligação da tioflavina-T às fibras formadas ao longo do tempo. (Del pozo).

Conforme observado, a seqüência de amiloidogenicidade é a seguinte:

$$\text{Wil} = \text{F2S} > \text{R25G} > \text{F2P} > \text{Jto} > \text{6aJL2} = \text{H8S}$$

Esses dados mostram que, de fato, Wil, a mais instável das proteínas estudadas, mostrou ser a mais amiloidogênica, enquanto que as proteínas selvagem e H8S, ambas muito estáveis, mostraram-se pouco amiloidogênicas.

Os dados de amiloidogenicidade também sugerem que a quebra da interação entre F2 e R25 faz a proteína mais instável e mais amiloidogênica, de fato, alguns autores vem mostrando a importância de mutações nestas posições para a desestabilização da proteína e conseqüente formação de agregado amilóide (Pokkuluri e cols, 1999; Del Pozo e cols, 2006).

Perfil semelhante tem sido observado para a transtirretina, embora, recentemente, o grupo do Dr. Kelly com que colaboramos, tenha mostrado que, além da instabilidade termodinâmica, a amiloidogenicidade de um determinado

variante também sofre influência da sua taxa de expressão e secreção pela célula. Dessa forma, mutantes muito instáveis, que seriam altamente amiloidogênicos, por não passarem pelo controle de qualidade no retículo endoplasmático, ficam lá aprisionados e degradados, sendo secretados em baixa quantidade pela célula resultando numa baixa agregação (Alberts, 1994).

5.3. Pressão e alta temperatura parecem levar as fibras amilóides da cadeia leve da imunoglobulina para uma nova conformação

Solomon e cols fizeram um ensaio de agregação e formação das fibras da cadeia leve usando agitação à 37°C, essas fibras exibiram características amiloidogênicas como ligação á Thio-T e vermelho de congo e apresentaram estruturas fibrilares quando examinadas por microscopia eletrônica (Solomon e cols, 1998). Fibras crescidas a partir da proteína solúvel são ditas fibras de agitação, ao passo que fibras produzidas na presença de sementes são ditas fibras de extensão. Utilizando esses protocolos, produzimos fibras amilóides da cadeia leve tanto por extensão quanto por agitação e as submetemos a alta pressão, e a altas temperaturas. Alguns estudos têm mostrado que a pressão induz ao desenovelamento da fibra amilóide (Torrent e cols, 2003; Foguel e cols, 2003). Em contrapartida outros autores têm demonstrado que a pressão induz a formação das fibras (Smeller e cols, 1999; Jansen e cols, 2004). Nosso intuito era dissociar essas fibras e ver se haveria diferença na sua estabilidade em função do variante que lhe deu origem. Estudo similar havia sido feito com a

TTR e alfa sinucleína (Foguel e cols, 2003, Follmer e cols, 2007), onde observamos que a seqüência primária dessas proteínas parecia contribuir com a estabilidade das fibras amilóides.

Diferentemente do que aconteceu com a TTR e alfa sinucleína, as fibras amilóides formadas pela cadeia leve da imunoglobulina mostraram-se resistentes ao emprego de alta pressão (Figura 23), independente do variante que lhe deu origem. Na verdade, quando sob pressão, as fibras constituídas pela cadeia leve passaram a ligar mais Thio- T, sugerindo que a alta pressão estava promovendo um rearranjo interno na estrutura das fitas beta-cruzadas presente nas fibras amilóides. Propusemos, então, que as fibras também parecem existir em mais de uma conformação que foram por nós denominadas Fibras 1 e Fibras 2. No entanto, uma vez que as Fibras 2 só existem sob pressão, retornando a conformação Fibra 1 quando se retira esta variável, não nos foi possível caracterizar melhor a estrutura morfológica dessas fibras por técnicas como microscopia eletrônica ou AFM. Na verdade, quando submetemos a fibra formada pelo variante R25G à alta pressão, observamos que após o retorno à pressão atmosférica havia ainda uma maior ligação de Thio-T, sugerindo persistência dessa conformação nova. Pretendemos agora estudar se há mudanças estruturais nas fibras R25G após o tratamento com pressão com o intuito de caracterizar melhor estas alterações.

A observação de que fibras amilóides podem passar a uma nova conformação quando sob pressão não foi primeiramente observada no presente caso, mas sim

quando o grupo do Dr. Yuji Goto, estudando as fibras formadas pela beta2 microglobulina, as submeteu à alta pressão. Esses resultados mostraram que as fibras se reorganizavam sob pressão, Pois foi observado um aumento da intensidade de Thio-T, mais resíduos de Trp inacessíveis e um significativo quenching da fluorescência do Trp pela ponte dissulfeto que se tornava mais próxima do Trp na fibra reorganizada (Chatani e cols, 2005).

Em seguida, resolvemos utilizar a alta temperatura na tentativa de romper as fibras amilóides e comparar a sua estabilidade. Utilizamos apenas as fibras R25G e F2S, pois eram os variantes que ainda dispúnhamos no laboratório. O efeito da alta temperatura mostrou-se bastante curioso: Fibras agitadas R25G ou F2S, quando aquecidas por 10 minutos em 40, 55 e 70°C, praticamente não se mostraram capaz de ligar mais Thio-T, ou seja, não passaram à conformação de Fibra 2. Ao contrário, 10 minutos a 85°C resultou na desmontagem parcial das fibras compostas pelo variante F2S com manutenção da estrutura das fibras formada pelo variante R25G, mostrando claramente diferença de estabilidade entre essas duas fibras. Isso sugere que a estrutura primária da proteína contribua de alguma forma para a estabilidade das fibras amilóides.

Curiosamente, altas temperaturas também não levaram à desmontagem das fibras da cadeia leve da imunoglobulina crescidas por extensão. Da mesma forma que o observado frente ao emprego de alta pressão, essas fibras, quando aquecidas em temperaturas na faixa de 25 a 85°C por 10 minutos, também apresentaram um aumento acentuado da ligação a Thio-T, principalmente as

fibras R25G que já quando aquecidas a 40°C passam a ligar mais Thio-T. As fibras formadas por extensão do variante F2S foram também capazes de ligar mais Thio-T sob pressão, porém somente a 85°C, temperatura onde a fibra R25G começa a ser perturbada pela temperatura.

Esses dados sugerem que a forma de se obter as fibras amilóides também parece determinar sua estabilidade final, onde a presença de um molde ou semente deve indicar um arranjo estrutural que passa a ser adotado pelo restante da fibra. No momento, pretendemos investigar se a presença de um determinado molde ou semente acrescido a um outro variante, pode, por exemplo, determinar o comportamento frente ao emprego de temperatura.

CONCLUSÃO:

- As imunoglobulinas de cadeia leve podem ser agrupadas em três grupos de estabilidade estrutural, quando submetidas à alta pressão hidrostática;
- As imunoglobulinas de cadeia leve mutantes apresentaram uma maior estabilidade estrutural a 25°C, do que a 37 °C. Por outro lado, a proteína selvagem (6aJL2) apresentou uma maior estabilidade na temperatura fisiológica (37 °C), sugerindo uma forte correlação entre estabilidade e fibrilogênese;
- As pontes de enxofre são importantes na manutenção da estabilidade da estrutura tridimensional das proteínas de cadeia leve.
- A ligação de bis-ANS sob pressão em alguns mutantes sugere a persistência de contatos terciários.
- Os espectros de dicroísmo circular mostraram um aumento no conteúdo de estrutura aleatória (205 nm) das proteínas de cadeia leve, induzido por altas temperaturas.

- As fibras formadas pela cadeia leve da imunoglobulina mostraram-se resistentes a alta pressão hidrostática e a altas temperaturas;
- A alta pressão hidrostática e altas temperaturas conduzem essas fibras para uma conformação modificada que liga mais Thio-T;
- As fibras amilóides do “tipo 1”, quando submetidas á alta pressão hidrostática ou altas temperaturas, passam a assumir uma nova conformação sendo assim as fibras amilóides do “tipo 2”.
- As condições onde as fibras são crescidas alteram sua conformação tornando-as mais resistentes ou sensíveis ao emprego de altas temperaturas;

BIBLIOGRAFIA:

- AGUZZI, F., BERGAMI, M. R; GASPARRO, C; BELLOTI, V; MERLINI, G. (1992)
Occurrence of monoclonal components in general practice: Clinical implication. Eur J Haematol. 48, 192-195.
- ALBERTS B; BRAY D; LEWIS J; RAFF M; ROBERTS K; E WATSON J. D. (1994).
Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing Inc., New York, NY, pp 279.
- ANFINSSEN, C.B. (1973) Principles that govern the folding of protein chains. Science.181, 223-229.
- ANFINSSEN, C.B; HARBER, E; SELA, M; AND WITE, F.H. (1961). The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain. Proc.Natl.Acad.sci. 47, 1309.
- ANSON, M.L. AND MIRSKY, A.E. (1931) The reversibility of protein coagulation. J.Phys. Chem 35,185.
- BACAL, N.S; FUNARI, M.F.A; GUERRA, J.C.C; FERREIRA, E; PASTERNAK, J;
BOROVNIK, C.L; KANAYAMA, R.H; NOZAWA, S.T; MENDES, C.E.A; BRITO, A.A.M;
FAULHABER, M.H.W.(2005). Multiple Myeloma: 50 cases diagnosed by flow cytometry. Rev.Bras.Hematol.Hemoter 27, 31-36.
- BALDWIN, R.L; ZIMM, B.H.(2000) Are denatured proteins ever random coils?
Proc.Natl.Acad.sci., USA.97,12391-12392.
- BATAILLE, R. (1997). New insights in the clinical biology of multiple myeloma. Seminars in Hematology 34, 23-28.
- BELLOTTI, V; MANGIONE, P; MERLINI, G. (2000). Immunoglobulin light chain amyloidosis-The archetype of structural and pathogenic variability. J. of Struct. Biol. 130, 280-289.
- BLAKE, C AND SERPELL, L. (1996). Synchrotron X-ray studies suggest that the core of transthyretin amyloid fibril is a continuous β -sheet helix. Structure 4, 989-998.
- BLACKLEY, H.K; SANDERS, G.H; DAVIS, M.C; ROBERTS, C.J; TENDLER, S.J;
WILKINSON, M.J.(2000). In situ atomic force microscopy study of beta-amyloid fibrillization. J.Mol.Biol. 298, 833-840.
- BROWN, C.R; HONG-BROWN, L.Q; WELCH, W.J. (1997). Correcting temperature-sensitive protein folding defects. J.clin.Invest. 99, 1432-1444.
- BUCHNER, J; RUDOLPH, R; HAUKE, L. (2002). Intradomain Disulfide bonds formation of the alternative folded state of antibody chains. J. Mol. Biol. 318, 829-836.

- BUXBAUM J. N. AND TAGOE C. E. (2000). The genetic of the amyloidoses. *Annu. Rev. Med.* 51, 543-569.
- CARNEIRO, F.A; BIANCONI, M.L; STAUFFER, F; WEISMULLER, G; Da POIAN, A. (2002). Membrane Recognition by Vesicular Stomatitis Virus Involves Enthalpy-Driven Protein-Lipid Interactions. *J. Virology* 76, 3756-3764.
- CHAMBERLAIN, A.K; MACPHEE, C.E; ZURDO,J; MOROZOVA-ROCHE, L.A; HILL,H.A; DOBSON,C.M; DAVIS,J.J.(2000). Ultrastructural organization of amyloid fibrils by atomic force microscopy. *Biophys.J.* 79, 3282-3293.
- CHANG, L-Y; YEN, C-P; BESL, L; SCHELL, M; SOLOMON, A. (1994). Identification and characterization of a functional human Ig V λ_{VI} germline gene. *Mol. Immunol.* 31, 531-536.
- CHATANI, E; KATO, M; KAWAI, T; NAIKI, H; GOTO, Y. (2005). Main-chain dominated amyloid structures demonstrated by the effect of high pressure. *J. Mol. Biol.* 352, 941-951.
- CHICK.H. AND MARTIN.C.J. (1911). On the “heat-coagulation” of proteins.
- CHIEN, P AND WEISSMAN, J.S(2001) Conformational Diversity in a Yeast Prion Dictates its Seeding Specificity. *Nature* 410, 223-227.
- CHITI, F. AND DOBSON, C.M. (2006). Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu. Rev. Biochem.* 75, 333-366.
- CLELAND, W.W. (1964). Dithiothreitol, a new protective reagent for SH groups. *Biochemistry* 3, 480-482.
- COHEN, A.S. AND CALKINS, E. (1959) Electron microscopic observation on a fibrous component in amyloid of diverse origins 183, 1202-1203.
- COLLINS, K.D; HUMMER, G; QUILLIN, M.L; MATTHEWS, B.W; GRUNER, S.M. (2005) Cooperative water filling of a nonpolar protein cavity observed by high pressure crystallography and simulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*102, 16668-16671.
- COLON, W. AND KELLY, J.F. (1992). Partial denaturation of transthyretin is sufficient for amyloid fibril formation in vitro. *Biochemistry* 31, 8654-8660.
- COME, J. H; FRASER, P.E; LANSBURY,P.T. (1993). A Kinetic model for amyloid formation in the prion diseases: importance of seeding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90,5959-5963.
- COMENZO R. L., ZHANG, Y., MARTINEZ, C., OSMA, K., HERRERA, G. (2001) The tropism of organ involvement primary systemic amyloidosis: contributions of Ig V L germ line gene use and clonal plasma cell burden. *Blood* 98, 714-720.

- CONWAY, K.A; HARPER, J.D; LANSBURY, P.T.JR. (2000). Fibrils formed in vitro from alpha-synuclein and two mutant forms linked to Parkinson's disease are typical amyloid. *Biochemistry* 39, 2552-2563.
- CORDEIRO, Y; MACHADO, F; JULIANO, L. JULIANO, M. A; BENTANI,R. R; FOGUEL,D AND SILVA, J. L. (2001). DNA converts cellular prion protein into the beta-sheet conformation and inhibits prion peptide aggregation. *J.Biol. Chem.* 28, 49400-49409.
- CORDEIRO, Y; LIMA, L.M; GOMES, M.P; FOGUEL, D AND SILVA, J. L. (2004). Modulation of prion protein oligomerization, aggregation, and beta-sheet conversion by 4,4'-dianilino-1,1'-binaphthyl-5,5'-sulfonate (bis-ANS).*J Biol Chem.* 279,5346-5352.
- CREIGHTON, T.E. (1990) Protein Folding. *Biochem.J.* 270, 1-16.
- DEL POZO YAUNER, L; ORTIZ, E; BECERRIL, B. (2006) The CDR1 of the human λ VI light chains adopts a new canonical structure. *Proteins*, 62, 122-129.
- DÍAZ-MAQUEO, J. C. (2006) História del mieloma múltiple.*Rev.Biomed.* 17,225-229.
- DOBSON, C. M. (2003). Protein folding and misfolding. *Nature* 426,884-890.
- DOBSON,C.M. (2004). Experimental investigation of protein folding and misfolding. *Methods* 34, 4-14.
- DOBSON. C. M. (1999). Protein misfolding, evolution and disease. *Trends in biochemical sciences* 24, 329-332.
- DURIE, B.G.M. (2006). Multiple Myeloma, Cancer of the Bone Marrow: Concise Review of the Disease and Treatment Options. North Hollywood, Ca: International Myeloma Foundation.
- EISENBERG,D; NELSON,R; SAWAYA,M.R; BALBIRNE,M; SAMBASHIVAN,S; IVANOVA,M.I; MADSEN,A; RIEKEL,C. (2006). The Structural Biology of Protein Aggregation Diseases: Fundamental Questions and Some Answers. *Accounts of Chemical Research* 39, 568-575.
- FERRÃO-GONZALES, A.D., SOUTO, S.O, SILVA, J.L AND FOGUEL, D. (2000) The preaggregated state of an amyloidogenic protein: Hydrostatic pressure converts native transthyretin into the amyloidogenic state. *Proc.Natl.Acad.Sci* 65, 6445-6450.
- FOGUEL, D; TESCHKE, C.M; PREVELIGE, P. E. M; SILVA, J. L. (1995). Role of entropic interactions in viral capsids: Single amino acid substitutions P22 bacteriophage coat protein resulting in loss of capsid stability. *Biochemistry* 34, 1120-1126.

- FOGUEL,D; ROBINSON,C.R; DE SOUZA,P.C.JR; SILVA,J.L; ROBINSON,A.S. (1999) Hydrostatic pressure rescues native protein from aggregates. *Biotechnol. Bioeng.* 63, 552-558.
- FOGUEL, D AND SILVA, J.L. (2004) New insights into the mechanisms of protein misfolding and aggregation in amyloidogenic diseases derived from pressure studies. *Biochemistry* 43, 1361-1370.
- FOGUEL, D; SUAREZ, M.C; FERRAO-GONZALES, A.D; PORTO, T.C; PALMIERI, L; EINSIEDLER, C.M; ANDRADE, L.R; LASHUEL, H.A; LANSBURY, P.T; KELLY, J.W; SILVA, J.L. (2003). Dissociation of amyloid fibrils of alpha-synuclein and transthyretin by pressure reveals their reversible nature and the formation of water-excluded cavities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100,9831-9836.
- FOLLMER, C; ROMAO,L; EINSIEDLER,C.M; PORTO,T.C; LARA,F.A; MONCORES,M; WEISSMULLER,G; LASHUEL,H.A; LANSBURY,P; NETO,V.M; SILVA,J.L; FOGUEL,D. (2007). Dopamine affects the stability, hydration, and packing of protofibrils of the wild type and variants of alpha-synuclein. *Biochemistry.* 46,472-82.
- GOLDSTEINS, G; ANDERSSON, K; OLOFSSON, A; DACKLIN, I; EDVINSSON, A; BARANOV, V; SANDGREN, O; THYLEN, C; HAMMARSTROM, S; LUNDGREN, E.(1997). Characterization of two highly amyloidogenic mutants of transthyretin. *Biochemistry* 36, 5346-5352.
- GREENLEE, R.T; HILL-HARMOM, M.B; MURRAY, T. (2001) Cancer Statistics. *Ca Cancer J. Clin.* 51, 15-36.
- HARPER, J.D AND LANSBURY, P. T. Jr. (1997). Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins. *Annu Rev Biochem.* 66, 385-407.
- HARPER, J.D; LIEBER, C.M; LANSBURY, P. T. Jr. (1997). Atomic force microscopic imaging of seeded fibril formation and fibril branching by the Alzheimer's disease amyloid-beta protein. *Chem. Biol.* 4, 951-959.
- HORWICH, A. (2002). Protein aggregation in disease: a role for folding intermediates forming specific multimeric interactions. *The journal of Clinical Investigation* 110,1221-1232.
- HURLE, M. R., HELMS, L. R., LI, L., CHAN, W., WETZEL, R. (1994). A role for destabilising amino acid replacements in light chain amyloidosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91,5446-5450.
- JANEWAY JR, C.A; TRAVERS, P. (1997). Immunobiology: the immune system in health and disease. 2nd ed., Current Biology Ltd. / Garland Publishing.
- JANSEN, R; GRUDZIELANEK, S; DZWOLAK, W; WINTER ,R. (2004). High pressure promotes circularly shaped insulin amyloid. *J Mol Biol.* 338, 203-206.

- IONESCU-ZANETTI, C; KHURANA, R; GILLESPIE, J.R; PETRICK, J.S; TRABACHINO, L.C; MINERT, L.J; CARTER, S.A; FINK, A.L. (1999). Monitoring the assembly of Ig light-chain amyloid fibrils by atomic force microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96,13175-13179.
- JACKSON, S.E. (1998). How do small single-domain proteins fold? *Folding & design*. 3, 81-91.
- KAD, N. M; THOMSON, N. H; SMITH, D.P; SMITH, D.A; RADFORD, S.E. (2001). Beta-2 microglobulin and its deamidated variant, N17D form amyloid fibrils with a range of morphologies in vitro. *J.Mol.Biol.* 313, 559-571.
- KELLY, J.W. (1996) Alternative conformations of amyloidogenic proteins govern their behavior. *Current opinion in Struc. Biol* 6, 11-17.
- KELLY, J.W. (1997). Amyloid fibril formation and protein misassembly: a structural quest for insights into amyloid and prion diseases. *Structure* 5, 595-600.
- KELLY, J.W. (1998) The alternative conformations of amyloidogenic proteins and their multi-step assembly pathways. *Curr.Opin.Struct.Biol.* 8, 101-106.
- KIM, P.S., BALDWIN, R.L. (1990). Intermediates in the folding reactions of small proteins. *Annu.Rev.Biochem.* 59, 631-660.
- KIM, Y; WALL, J.S; MEYER, J; MURPHY, C; RANDOLPH, T; MANNING, M.C; SOLOMON, A; CARPENTER, J.F (2000). Thermodynamic Modulation of Light Chain Amyloid Fibril Formation. *The J.OF boil.Chem.* 275, 1570-1574.
- KOO, E.H., LANSBURY, P.T JR., KELLY, J.W. (1999). Amyloid diseases: Abnormal protein aggregation in neurodegeneration. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 96, 9989-9990.
- KYLE, R.A., GERTZ,M.A. (1995).Primary Systemic Amyloidosis: Clinical and laboratory features in 474 cases. *Seminars of Hemathology* 32, 45-59.
- KYLE, R.A; LINOS, A; BEARD, C.M (1992). Incidence and natural history of primary systemic amyloidosis in Olmsted county,Minnesota,1950 through 1989. *Blood* 79, 1817-1822.
- KITAMURA, Y & ITOH, T (1978) Reaction Volumes of Protonic Ionization for Buffering Agents. Prediction of Pressure Dependence of pH and pOH. *J. Sol.Chem.*16, 715-725.
- KREBS, M.R.H; BROMLEY, E.H.C; DONALD, A.M (2005) The Binding of Thioflavin-T to Amyloid Fibrils: Localization and Implications. *J. Struct. Biol* 149, 30-37.

- KHURANA, R.; GILLESPIE, J.R.; TALAPATRA, A.; MINERT, L.A.; IONESCU-ZANETTI, C.; MILLET, I.; FINK, A.L. (2001) Partially Folded Intermediate as Critical of Light Chain Amyloid Fibrils and Amorphous Aggregates. *Biochemistry* 40, 3525-3535.
- KHURANA, R.; IONESCU-ZANETTI, C.; POPE, M.; LI, J.; NIELSON, L.; RAMIREZ-ALVARADO, M.; REGAN, L.; FINK, A.L.; CARTER, S.A. (2003) A general model for Amyloid fibril assembly based on morphological studies using atomic force microscopy. *Biophysical Journal* 85, 1135-1144.
- KHURANA, R.; COLEMAN, C.; IONESCU-ZANETTI, C.; CARTER, S.A.; KRISHNA, V.; GROVER, R.K.; ROY, R.; SINGH, S. (2005) Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils. *J. Struct. Biol.* 151, 229-238.
- LAKOWICZ, J.R. (1999) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Plenum press, New York, N.Y. 2nd ed.
- LEHNINGER, A.L., NELSON, D.L., COX, M.M. (1993) *Principles of biochemistry*, 2nd ed., Worth Publishers, Nova York, NY.
- LEVINE, III.H. (1993). Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease b-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Science* 2, 404-410.
- LEVINE, III.H. (1997). Stopped-Flow Kinetics Reveal multiple Phases of Thioflavin T Binding to Alzheimer b (1-40) Amyloid fibrils. *Archives of biochem. and biophys* 342, 306-316.
- MCLAUGHLIN, R.W.; DE STIGTER, J.K.; SIKKINKI, L.A.; BADEN, E.M.; RAMIREZ-ALVARADO, M. (2006). The effects of sodium sulfate, glycosaminoglycans, and Congo red on the structure, stability, and amyloid formation of an immunoglobulin light-chain protein. *Protein science* 15, 1-13.
- MERLINI, G. E BELLOTTI, V. (2005). Lysozyme: A paradigmatic molecule for the investigation of protein structure, function and misfolding. *Clin Chim Acta* 357, 168-172.
- MOZHAEV, V.M., HEREMANS, K., FRANK, J., MASSON, P. AND BALNY, C. (1994) Exploiting the effects of high pressure in biotechnological applications. *Tibtech.* 124, 493-501.
- MULLER, A.M.; GEIBEL, A.; NEUMANN, H.P.; KUHNEMUND, A.; SCHMITT-GRAFF, A.; BOHM, J.; ENGELHARDT, M. (2006). Primary (AL) Amyloidosis in Plasma Cell Disorders. *The Oncologist* 11, 824-830.

- OHGUSHI, M. E WADA,A.(1983). 'Molten-globule state': a compact form of globular proteins with mobile side-chains. *Febbs letters* 164,21-24.
- ONUCHIC, J.N., WOLYNES,P.G.,LUTHEY-SCHULTEN,Z AND SOCCI,N. D.(1995).
Toward an outline of the topography of a realistic protein folding
- OZAKI, S., ABE, M., WOLFENBARGER, D., WEISS, D. T., SOLOMON, A. (1994).
Preferential expression of human-lambda light chain variable-region subgroups in multiple myeloma, AL amyloidosis, and Waldenstrom's macroglobulinemia. *Clin. Immunol. Immunopath.* 71, 183-189.
- PALADINI, A. A E WEBER. G. (1981). Absolute measurement of fluorescence polarization at high pressures. *Rev.Sci.Instrum.* 52, 419-426.
- PAN,K., BALDWIN,M., NGUYEN,J., GASSET,M., SERBAN,A., GROTH,D., MELHORNE,I., HUANG,Z., FLETTERICK,R.J., COHEN,F.E AND PRUSINER,S.B. (1993). Conversion of α -helices into β -sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 90, 10962-10966.
- PÉRES-SIMOM, J.A; GARCIA-SANZ, R; TABERNERO, M.D. (1998) Prognostic value of numerical chromosome aberrations in multiple myeloma. *Blood* 91, 3366-3371.
- PERFETTI, V., CASARINI, S., PALLADINI, G., VIGNARELLI, M. C., KLERSY, C., DIEGOLI, M., ASCARI, E., MERLINI, G. (2002). Analysis of $V\lambda$ - $J\lambda$ expression in plasma cells from primary (AL) amyloidosis and normal bone marrow identifies $3r$ (λ III) as a new amyloid-associated germline gene segment. *Blood* 100, 948-953.
- POKKULURI P. R., SOLOMON, A., WEISS, D. T., STEVENS, F. J. SCHIFFER, M. (1999). Tertiary Structure Of Human λ 6 Light Chains. *Amyloid: Int. J. Exp. Clin. Invest.* 6, 165-171.
- PRAZERES, G.M.P; BATISTA, E.J.O; SOUZA, W; BISH, P.M; WEISMULLER, G.(2003). Interaction between chondroitin-6-sulfate and *Entamoeba histolytica* as revealed by force spectroscopy. *Experimental Parasitology* 104, 40-46.
- PTITSYN, O.B (1991).How does protein synthesis give rise to the 3D-structure? *Febbs Letters* 285, 176-181.
- RAFFEN,R.M., DIECKMAN L. J., SZPUNAR, M., WUNSCHL, C., POKKULURI, P. R., DAVES, P., STEVENS, P. W., CAI, X., SCHIFFER, M., STEVENS, F. J. (1999). Physicochemical consequences of amino acid variations that contribute to fibril formation by immunoglobulin light chain. *Prot Science* 6, 509-517.
- RAMIREZ-ALVARADO, M., MERKEL, J.S., REGAN,L.(2000). A systematic exploration of the influence of the protein stability on amyloid fibril formation

- RICHARDSON, J.S E RICHARDSON, D.C. (2002). Natural β -sheet proteins use negative design to avoid edge-to edge aggregation. PNAS 99, 2754-2759.
- ROCHET, J; LANSBURY, P.T. (2000). Amyloid fibrillogenesis: themes and variations. Current Opinion in Structural Biology 10, 60-68.
- ROCHET, J.C; CONWAY, K.A; LANSBURY, P.T. (2000). Inhibition of fibrillization and accumulation of prefibrillar oligomers in mixtures of human and mouse alpha-synuclein. Biochemistry 39, 10619-10626.
- ROSEN, C.G., AND WEBER, G. (1969) Dimer formation from 1-amino-8-naphthalenesulfonate catalysed by bovine serum albumin. A new fluorescent molecule with exceptional binding properties. Biochemistry 8, 3915-3920.
- ROSHINI, S.A; GEYER, S.M; PRICETROSKA, T.L; ALLMER, C; KYLE, R.A; GERTZ, M.A; FONSECA, R (2003). Immunoglobulin light chain variable(V) region genes influence clinical presentation and outcome in light chain-associated amyloidosis(AL). Blood 101, 3801-3808.
- RUDOLPH, R AND LILIE, H. (1996). In vitro folding of inclusion body proteins. The FASEB Journal 10, 49-56.
- SHIRAHAMA, T AND COHEN, A.S. (1967). High resolution electron microscopy analysis of the amyloid fibril. J.Cell.Biol 33, 679-708.
- SERPELL, L. C; SUNDE, M; BENSON, M. D; TENNENT, G. A; PEPYS, M. B; FRASER, P. A. (2000) The protofilament structure of amyloid fibrils. J. Mol Biol. 300, 1033-1039.
- SILVA, J. L.; FOGUEL, D; ROYER, C. A. (2001). Pressure provides new insights into protein folding, dynamics and structure. Trends Biochem.Sci. 26, 612-618.
- SILVA, J. L. AND WEBER, G. (1993) Pressure stability of proteins. Annu. Rev. Phys. Chem. 44, 89-113.
- SILVA, J. L; SILVEIRA, C. F; CORREIA, A; PONTES, L. (1992). Dissociation of a native dimer to a molten globule monomer. Effects of pressure and dilution on the association equilibrium of Arc repressor. J.Mol.Biol. 233, 545-555.
- SIPE, J. (1994). Amyloidosis. Crit.Rev.Clin.Lab.Sci. 31, 325-354.
- SKINNER, M. (2000). AL amyloidosis: the last 30 years. Amyloid: Int. J. Exp. Clin. Invest. 7, 13-14.
- SMELLER, L; RUBENS, P; HEREMANS, K. (1999). Pressure effect on the temperature-induced unfolding and tendency to aggregate of myoglobin. Biochemistry. 38, 3816-3820.

SOLOMON, A; WEISS, D.T; MURPHY, C.L; HRNCIC, R; WALL, J.S; SCHELL M. (1998). Light chain-associated amyloid deposits comprised of a novel kappa constant domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95, 9547-9551.

SOLOMON, A., WALDMANN, T.A., FAHEY, J.L., McFARLANE, A.S. (1964). Metabolism of bence jones proteins. *J.Clin.Invest.* 43, 103-117.

SOUILLAC, P.O; UVERSKY, V.N; MILLET, I.S; KHURANA, R; DONIACH, S; FINK, A.L. (2002). Effect of association state and conformational on the kinetics of immunoglobulin Light Chain Amyloid Fibril Formation at Physiological pH. *J. Biol. Chem.* 277, 12657-12665.

STEVENS, F. J. AND ARGON Y. (1999). Pathogenic light chains and the B-cell repertoire. *Immunol. Today*, 20, 451-457.

STINE, W.B; SNYDER, S.W; LADROR, U.S; WADE, W.S; MILLER, M.F; PERUM, T.J; HOLZMAN, T.F; KRAFFT, G.A. (1996). The nanometer-scale structure of amyloid-beta visualized by atomic force microscopy. *J. Prot. Chem.* 15, 193-203.

TANFORD, C. (1970). Protein denaturation. A theoretical models for the mechanism of denaturation. *Ad. Protein chem*, 24, 1-95.

The action of hot water upon egg-albumen and the influence of acid and salts upon reaction velocity. *The journal of physiology* 43, 1-27.

TORRENT, J; ALVAREZ-MARTINEZ, M.T; HEITZ, T. (2003). Alternative Prion Structural Changes Revealed by High Pressure. *Biochemistry* 43, 7262-7170.

TSONG, T.Y., BALDWIN, R.L. AND ELSON, E.L. (1971). The Sequential Unfolding of Ribonuclease A: Detection of a Fast Initial Phase in the Kinetics of Unfolding.

VIRCHOW, R (1853). Zur Cellulose-Frage. *Virchows Arch.* 6, 415-426.

WALL, J., SCHELL, M., MURPHY, C., HRNCIC, R., STEVENS, F. J., SOLOMON, A. (1999) Thermodynamic instability of human $\lambda 6$ light chain: correlation with fibrillogenicity. *Biochemistry* 38, 14101-14108.

WALL, J.S; GUPTA, V; WILKERSON, M; SCHELL, M; LORIS, R; ADAMS, P; SOLOMON, A; STEVENS, F.J; DEALWIS, C. (2004). Structural Basis of Light Chain Amyloidogenicity: Comparison of the Thermodynamic Properties, Fibrillogenic Potential and Tertiary Structural Features of Four $\lambda 6$ proteins. *J. Mol. Reognit.* 17, 323-331.

WEBER, G. (1987) Free energy couplings between ligand binding and subunit association in hemoglobin are of first order. *Biochemistry* 26, 331-332.

WEBER, G. AND DRICKAMER, H.G. (1983) The effect of high pressure upon proteins and other biomolecules. *Q.Rev. Biophys.* 16, 89-112.

- WEISSMULLER, G; GARCIA-ABREU,J; MASCARELLO BISCH,P; MOURA NETO,V; CAVALCANTE,L.A. (2000). Glial cells with differential neurite growth-modulating properties probed by atomic force microscopy. *Neurosci. Res.* 38, 217-20.
- WETZEL R. (1997). Domain stability in immunoglobulin light chain deposition disorders. *Adv. Prot Chem.* 50, 182-242.
- WETZEL, R. (1994). Mutations and off pathway aggregation of proteins. *Trends in biotechnology* 12, 0193-198.
- WETZEL, R. (1994).Mutations and off-pathway aggregation of proteins. *Trends in Biotechnology* 12, 193-198.
- WILLIAMS, S.C., FRIPPIAT,J., TOMLINSON,I.M., IGNATOVICH,O., LEFRANC,M., WINTER,G.(1996). Sequence and evolution of the human germline V_{λ} repertorie. *J.Mol.Biol.* 264, 220-232.
- WOLYNES, P.G., ONUCHI, J.N., THIRUMALAI, D. (1995) Navigating the folding routes. *Science* 267, 1619-1620.
- WORN, A., PLUCKTHUN, A. (1998). Mutual stabilization of V_L and V_H domain in single-chain antibody fragments, investigated with mutants engineered for stability. *Biochemistry* 37, 13120-13127.

Curriculum Vitae

Nome: Karinne Marieta Pimenta de Carvalho.

Data de Nascimento: 24 de Janeiro de 1979.

Naturalidade: Belo Horizonte- Minas Gerais.

Formação acadêmica:

Graduação: Ciências Biológicas- Universidade Federal de Ouro Preto- Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Ouro Preto- MG.

Mestrado em Química Biológica no Instituto de Bioquímica Médica- Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Orientação de Estudante: Fábio Lima da Conceição- Iniciação científica/ 2005.

Luana Morgado Barbosa- iniciação científica/2006.

Comunicação em congressos

05 comunicações em congressos nacionais.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)