

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

**DANIELA BARRETTO BARBOSA TRIVELLA**

**Bases moleculares e estruturais do  
reconhecimento de ligantes pela proteína  
transtirretina humana.**

São Carlos

2010

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.



**DANIELA BARRETTO BARBOSA TRIVELLA**

**Bases moleculares e estruturais do  
reconhecimento de ligantes pela proteína  
transtirretina humana**

Tese apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Física do Instituto de Física  
de São Carlos da Universidade de São Paulo  
para obtenção de título de Doutor em  
Ciências

Área de Concentração: Física Aplicada -  
Opção Física Biomolecular

Orientador: Prof. Dr. Igor Polikarpov

São Carlos

2010

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação IFSC/USP

Trivella, Daniela Barreto Barbosa

Bases moleculares e estruturais do reconhecimento de ligantes pela proteína transtirretina humana./Daniela Barreto Barbosa Trivella; orientador Igor Polikarpov -- São Carlos, 2010.

221 p.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Física - Área de concentração: Física Aplicada – opção: Biomolecular ) – Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo.

1. Transtirretina. 2. Amiloidose. 3. Flavanoide. .4. Cristalografia de proteína. 5. Calorimetria por titulação isotermica I. Título.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Daniela Barretto Barbosa Trivella

Tese apresentada ao Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Física Aplicada -  
Opção: Física Biomolecular.

Aprovado(a) em: 24.09.2010

Comissão Julgadora

Prof(a). Dr(a). Igor Polikarpov

Instituição: IFSC/USP


Assinatura



Prof(a). Dr(a). Eduardo Horjales Reboredo

Instituição: IFSC/USP

Assinatura



Prof(a). Dr(a). Maria Cristina Nonato Costa

Instituição: FCFRP/USP

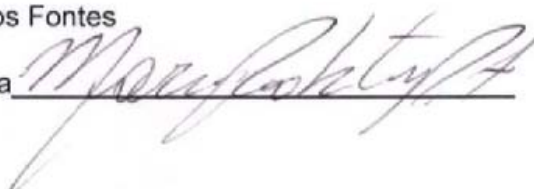
Assinatura



Prof(a). Dr(a). Marcos Roberto de Mattos Fontes

Instituição: UNESP

Assinatura



Prof(a). Dr(a). Mario Tyago Murakami

Instituição: ABTLuS

Assinatura





À minha Família.





## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Igor Polikarpov pela orientação, oportunidades e confiança.

Ao Prof. Luis Maurício T. R. Lima e à Profa. Débora Foguel pelo incentivo inicial e colaboração fundamental durante o desenvolvimento desta tese.

Ao Leonardo Castro Palmieri por sua ajuda e explicações do “mundo da TTR”.

Ao Lucas Bleicher pelos ensinamentos em cristalografia e companheirismo nas coletas de dados no LNLS.

Ao Prof. Carlos A. Montanari e ao Helton J. Wiggers pelos ensinamentos em calorimetria.

Ao Prof. Ronaldo Nagem, Prof. Ricardo Aparicio e Prof. Eduardo Horjales pela ajuda em cristalografia.

Aos professores: Antonio José da Costa Filho (Jabá), Richard Garratt e Glaucius Oliva, pelas excelentes disciplinas ministradas.

À Ana Carolina Figueira pela “consultoria científica” e amizade.

À Maria Auxiliadora Morim Santos, que faz jus a seu nome, sempre nos ajudando nas tarefas de laboratório e burocráticas.

Aos técnicos Kelven Ulisses, Su, Bianca, Bel e Andressa.

Ao João Renato, Humberto, Wanius e Caqui pela amizade e ensinamentos durante estes anos.

À Fernanda Batista pelas trocas de informação e companheirismo na sala 08.

Ao Caio e ao Flávio meus queridos ex-alunos de IC.

Ao Leo e ao Bacheга pelas discussões em química.

Aos amigos de São Carlos: Tavin, Tati Bali, FerPJ, Amanda, Ana, Vivi, Fran, Mario, Sussu, Joci, Nádia, Eliane e Cesar.

A todos os colegas do grupo de cristalografia.

À minha mãe que sempre me apoiou e me incentivou durante toda a minha vida.

Ao meu pai (em memória).

Aos meus irmãos e cunhados, e ao meu querido sobrinho Iberê.

Ao Américo - quando está de bom-humor.

À minha família, sempre unida e runida!!!

Aos amigos de Floripa: Lucas, Montanha, Di, Pri, Ro, Nora e Preta.

Um agradecimento especial para Juju que me acompanhou todos estes anos, me apoiando e me estimulando, tornando meus dias muito mais agradáveis.

À FAPESP pela concessão da bolsa de doutorado e ao LNLS pela disponibilização das linhas de luz.

Obrigada mesmo, sem vocês nada disso seria possível.

## RESUMO

Trivella, D. B. B. **Bases moleculares e estruturais do reconhecimento de ligantes pela proteína transtirretina humana.** 2010. 221 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

Mais de quarenta proteínas humanas estão envolvidas em doenças amilóides, sendo a transtirretina (TTR) uma dessas. A dissociação do tetrâmero da TTR é a etapa limitante para sua via de agregação. Esta etapa pode ser dificultada pela ligação de pequenas moléculas a dois sítios na interface tetramérica da TTR e facilitada em variantes mutantes. A mutante V30M é a variante amiloidogênica mais freqüente da TTR e, apesar da mutação não se encontrar no sítio de ligação de pequenas moléculas, pode limitar a interação de inibidores com esta proteína. Desta forma, a busca de inibidores da agregação da TTR tipo selvagem (TTRwt) e mutantes amiloidogênicas vem sendo realizada. Na presente tese, flavonóides, freqüentemente encontrados em alimentos, e agonistas sintéticos do receptor do hormônio tireoidiano, seletivos para a isoforma beta deste receptor, foram selecionados para testes de inibição da agregação da TTRwt e mutante V30M. A interação dos melhores inibidores com a TTR foi também caracterizada em detalhes. Para isto, um ensaio de agregação *in vitro* da TTR foi utilizado para triagem dos compostos; e a assinatura termodinâmica da interação dos melhores inibidores com a TTR, bem como as estruturas cristalográficas TTR:inibidores foram determinadas por calorimetria de titulação isotérmica e cristalografia de proteínas, respectivamente. Os compostos sintéticos, GC-1 e GC-24, mostraram-se inibidores eficazes, porém com potência moderada. Já as flavonas luteolina (LUT), apigenina (API) e crisina (CHR), a flavanona naringenina (NAR), o flavonol kaempferol (KAE) e a isoflavona genisteína (GEN) apresentaram boa potência e eficácia de inibição da agregação da TTR *in vitro*. Os inibidores NAR, CHR, GEN e KAE não mostraram mesma capacidade de inibição da mutante V30M e apresentaram cooperatividade negativa para ligação aos dois sítios da TTR. A posição dos inibidores no sítio, bem como a variabilidade química/ estrutural dos compostos testados parecem influenciar os mecanismos de interação com os dois sítios da TTR e a ligação à mutante V30M. Modificações no sítio da mutante V30M foram identificadas e são apontadas como a principal causa para a seletividade de alguns inibidores à forma selvagem da TTR. De modo geral, a investigação detalhada da interação de pequenas moléculas com a TTR permitiu propor as bases moleculares da cooperatividade entre os sítios desta proteína e das diferenças de interação dos inibidores com a forma selvagem e mutante V30M da TTR.

Palavras-chave: Transtirretina. Amiloidose. Flavonóide. Cristalografia de proteína. Calorimetria por titulação isotérmica

## ABSTRACT

Trivella, D. B. B. **Structural and molecular basis of ligand recognition by the human protein transthyretin**. 2010. 221 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

More than forty human proteins are involved in human amyloid diseases, being transthyretin (TTR) one of these. TTR tetramer dissociation is a limiting step for its aggregation pathway. This step can be delayed by small molecules binding to two binding sites in the TTR tetramer interface and enhanced in TTR amyloidogenic variants. The V30M mutant is the most frequent TTR amyloidogenic variant and, even though the mutation is not situated in the TTR' binding site, this mutation can limit small molecule interaction with the V30M mutant. Therefore, the search for wild type (TTRwt) and amyloidogenic TTR mutant inhibitors is under investigation. In the present thesis, flavonoids, frequently found in food, and synthetic thyroid hormone receptor beta-selective agonists were selected for evaluation of their inhibition ability on TTRwt and V30M mutant aggregation. The interaction of the best inhibitors with TTR was also characterized in details. For this, an *in vitro* TTR aggregation assay was used for inhibitor screening, and the thermodynamic signature of interaction, as well the TTR:inhibitors crystal complexes were determined by isothermal titration calorimetry and protein crystallography, respectively. The synthetic compounds, GC-1 and GC-24, displayed high efficacy, however moderated inhibition potency. The flavones luteolin (LUT), apigenin (API), chrisin (CHR), the flavanone naringenin (NAR), the flavonol kaempferol (KAE) and the isoflavone genistein (GEN) showed good potency and efficacy of TTR aggregation inhibition *in vitro*. The inhibitors, CHR, NAR, GEN and KAE, had lower inhibition capacity to the V30M mutant, and displayed negative cooperativity of binding to the two TTR binding sites. The inhibitor position in the binding site, as well as the chemical/ structural variability of the tested compounds seems to influence the interaction mechanism with the two TTR binding sites and the binding to the V30M mutant. Modifications on the V30M mutant binding sites were identified and pointed as the main reasons for the selectivity of some inhibitors to the wild type TTR. Overall, the detailed inspection of small molecule interaction with TTR suggests the molecular basis of the cooperativity between the two TTR binding sites and also of the differences between the inhibitors interaction with the wild type and with the V30M mutant TTR.

Key-words: Transthyretin. Amyloidosis. Flavonoid. Protein crystallography. Isothermal titration calorimetry.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.1** – Via representativa de enovelamento/desenovelamento e formação de fibras amilóides de proteínas, em função da energia livre de Gibbs e hidratação. Este esquema foi elaborado a partir de estudos da proteína do príon e da proteína supressora de tumor, p53, por Silva e colaboradores (23).....32
- Figura 1.2** – Possíveis mecanismos de formação de fibras amilóides de lisozima. Neste esquema a formação de fibras amilóides não envolve necessariamente espécies intermediárias (I) e desenoveladas (U); ou seja, nem sempre a barreira energética de enovelamento precisa ser ultrapassada para formação de fibras amilóides desta proteína. Ao contrário, envolve alterações na dinâmica da proteína, em uma forma quase-nativa (N\*). Figura extraída da revisão de Chiti e Dobson (2009) (14). .....33
- Figura 1.3** – Estrutura nativa da proteína transportadora transtiretina (TTR). **(A)** Homotetrâmero da TTR formado pelos monômeros A, B, C e D, ligando o complexo RBP-retinol e o hormônio tiroxina (T<sub>4</sub>). Os sítios de ligação ao complexo RBP-retinol e à tiroxina (T<sub>4</sub>) são indicados. As estruturas protéicas estão representadas em modelo de *cartoon*, de acordo com a estrutura secundária – hélice-alfa ou fita-beta. Os monômeros da TTR estão desenhados em tons de azul (mono A, mono B) e verde (mono C, mono D) e as unidades da proteína RBP em tons de vermelho. Os átomos de carbono do ligante tiroxina (T<sub>4</sub>) estão representados em bastões lilás, no canal AC e amarelos, no canal BD. **(B)** Dímero cristalográfico AB com as fitas-beta nomeadas e coloridas individualmente (folha-beta interna = fitas *DAGH* e folha-beta externa = fitas *CBEF*). O ligante tiroxina é mostrado em bastões cinza claro e os principais resíduos da TTR envolvidos em contatos com o hormônio também são mostrados em bastões e estão nomeados. Os átomos de oxigênio, iodo e nitrogênio estão representados nas cores vermelho, roxo e azul, respectivamente. As coordenadas atômicas utilizadas para a elaboração desta figura foram extraídas do *Protein Data Bank* (PDB): PDB ID: 1RLB (TTR:RBP) e 2ROX (TTR:T<sub>4</sub>). As imagens foram geradas com o programa Pymol (De Lano Scientific). .....37
- Figura 1.4** – Via de agregação da TTR relacionado a energia livre de Gibbs em cada etapa, assim como proposto por Hurshman e colaboradores em 2004 (84). A dissociação do homotetrâmero da TTR é a etapa de maior barreira energética, seguido pelo

- desenvolvimento parcial dos monômeros, rápida nucleação e formação de agregados/ amilóides.....39
- Figura 1.5** – Modelo de deslocamento da fita beta externa da TTR e agregação para formação das fibras amilóides, através de novos contatos inter-subunidades. **(A)** Modelo proposto por Serag e colaboradores (80), onde o deslocamento da fita externa promove novos contatos inter-subunidades (setas azul claras e rosa). **(B)** Modelo estrutural da fibra amilóide da TTR, construído a partir da observação de regiões protegidas e expostas ao solvente no tetrâmero e na fibra amilóide de TTR – variante Y114C (74). .....41
- Figura 1.6** – Esquema estrutural da conversão da folha-beta *AGH* da TTR em folha-alfa. Este esquema foi proposto a partir dos resultados de simulações de dinâmica molecular em baixo pH. Pode-se observar a formação de ligações de hidrogênio bifurcadas (71) – painel superior. Um esquema da agregação e provável formação de fibras amilóides a partir destes intermediários é apresentado no painel inferior (81). As fitas-beta da TTR estão nomeadas (*AGH*). .....43
- Figura 1.7** – Aumento de estabilidade do homotetrâmero da TTR conferido pela ligação de pequenas moléculas aos canais de hormônio. A via de agregação da TTR relacionando a energia livre de Gibbs em cada etapa é mostrada. *T* = tetrâmero de TTR sem ligante (apo); *T*/<sub>1</sub> = tetrâmero com 1 ligante; *T*/<sub>2</sub> = tetrâmero com 2 ligantes. Figura adaptada da Johnson e colaboradores (72). .....46
- Figura 1.8** – Alguns inibidores da formação de fibras amilóides de TTR reportados. Membros representativos de anti-inflamatórios não esteroidais (NSAIDs): 1-3; benoxazóis: 4 e compostos naturais: 5-6. ....47
- Figura 1.9** – Sítio de ligação a hormônio da TTR. **(A)** Tetrâmero da TTRwt ligando tiroxina, *T*<sub>4</sub> (PDB ID: 2ROX) com detalhe do sítio de ligação (painel superior). Os principais resíduos da TTRwt que contatam o *T*<sub>4</sub> são mostrados em bastões, coloridos de acordo com o monômero da TTR ao qual pertencem, e estão nomeados. O *T*<sub>4</sub> é mostrado em bastões laranja e sua cópia simétrica em bastões cinza claro. Os bolsões de acomodação dos iodos do *T*<sub>4</sub> são identificados (HBP1, HBP2 e HBP3). **(B)** Detalhamento dos HBPs encontrados no sítio da TTRwt. Os resíduos de aminoácido da proteína que delimitam estes bolsões são mostrados em bastões e nomeados. Os átomos de oxigênio, nitrogênio e iodo estão coloridos em vermelho, azul e roxo, respectivamente. As figuras foram geradas com o programa Pymol (De Lano Scientific LLC). .....48
- Figura 1.10** – Sítio de ligação da TTRwt ligando **(A)** ácido

flufenâmico (FLU) (PDB ID: 1BM7) e **(B)** PHENOX (PDB ID: 1DVY). Os principais resíduos da TTRwt envolvidos em contatos com estes ligantes são mostrados em bastões e estão nomeados. As moléculas do ligante são mostradas em bastões verdes e suas cópias simétricas em amarelo. A conformação de Ser117 induzida pela interação destes inibidores nos dois sítios de ligação e a interação polar formada entre elas é mostrada em linhas pontilhadas. Átomos de oxigênio, nitrogênio e fluor estão coloridos em vermelho, azul e ciano, respectivamente. As figuras foram geradas com o programa Pymol (De Lano Scientific). .....51

- Figura 1.11** – Sítio de ligação da TTRwt ligando **(A)** diflunisal (DIF) (PDB ID: 3D2T) e **(B)** seu análogo 3',5'-difluorobifenil-4-ácido carboxílico (PDB ID: 2B9A). Diflunisal é encontrado ligando a TTRwt em modo reverso (magenta) e modo *forward* (verde), enquanto seu análogo estrutural somente em modo reverso. Os principais resíduos da TTRwt envolvidos em contatos com estes ligantes são mostrados em bastões e estão nomeados. A conformação de Ser117 induzida pela interação de DIF é mostrada nos dois sítios de ligação e a interação polar formada entre elas é mostrada em linhas pontilhadas. Átomos de oxigênio, nitrogênio e fluor são mostrados em vermelho, azul e ciano, respectivamente. As figuras foram geradas com o programa Pymol (De Lano Scientific). .....53
- Figura 3.1** – Esquema das etapas seguidas no desenvolvimento da presente tese. ....61
- Figura 3.2** – Estrutura geral dos flavonóides. ....67
- Figura 3.3** – Estrutura química da genisteína (GEN). ....68
- Figura 3.4** – Estruturas químicas dos flavonóides selecionados. ....69
- Figura 3.5** – Estrutura química dos ácidos orgânicos selecionados. ....70
- Figura 3.6** – Estruturas químicas do ligante natural da TTR, o T<sub>4</sub> (tiroxina), e seu derivado, o T<sub>3</sub> (triiodo L-tironina) e análogos estruturais sintéticos do T<sub>3</sub>: GC-1 ([4-(4-hidroxi-3-isopropilbenzil)-3,5-dimetilfenoxi] ácido acético); GC-24 ([4-(3-benzil-4-hidroxi-benzil)-3,5-dimetilfenoxi] ácido acético) e NH-3. ....71
- Figura 3.7** – Ensaio de agregação da TTR induzida por pH ácido. O tetrâmero da TTR é mantido a 37°, pH 4,2 por 72 horas na presença ou ausência das pequenas moléculas teste. O pH induz dissociação e desenovelamento parcial dos monômeros da TTR, levando à agregação e/ou formação de fibras amilóides desta proteína. Se a molécula teste interagir com o(s) sítio(s) da TTR, a forma tetramérica é estabilizada, e assim há inibição da agregação/ formação de fibras amilóides da TTR. A turbidez da amostra é relativa à



formação de agregados da TTR, e assim pode ser medida e relacionada à inibição da agregação/ formação de fibras amilóides da TTR promovida pela ligação das pequenas moléculas. ....72

**Figura 3.8** – Microcalorimetria por titulação isotérmica (ITC). **(A)** Esquema do equipamento mostrando a cela de amostra, a cela de referência, a seringa e os sistemas termostático e de resposta acoplados e controlados por computador. **(B)** Exemplo dos dados retornados em um experimento de ITC onde a reação foi endotérmica. O painel superior mostra uma sequência de picos relativos às sucessivas injeções do ligante na seringa. O sinal retornado corresponde às diferenças de compensação de energia realizada pelo equipamento para manter a cela de amostra e de referência na mesma temperatura, em função do tempo. O painel inferior mostra a área de cada pico calculada e normalizada por mol de ligante injetado, em função da razão molar [ligante]/[proteína] correspondente. Utilizando modelos matemáticos apropriados, os parâmetros da ligação ( $K_a$ ,  $\Delta H$ ,  $n$ ) podem ser obtidos – adaptado de Velazquez-Compoy e Freire (2004) (170). ....79

**Figura 3.9** – Representação esquemática resumida das etapas de determinação de estruturas cristalográficas de proteínas por difração de raios-X de mono cristais. **(1)** Obtenção de cristais; **(2)** realização do experimento de difração de raios-X; **(3)** medição das intensidades das reflexões hkl nas imagens de difração = obtenção dos  $|F_{hkl}|$ ; **(4)** obtenção de fases iniciais (por substituição molecular ou faseamento experimental); **(5)** construção e refinamento do modelo atômico e refinamento das fases; **(6)** validação do modelo contra os dados experimentais; **(7)** deposição das coordenadas atômicas e fatores de estrutura no banco de dados de proteínas (PDB); **(8)** análise estrutural.....84

**Figura 4.1** – Acompanhamento das etapas de expressão e purificação da TTR por eletroferese – em gel desnaturante (a, b e c) e gel nativo (d). **(A)** Cultura de células de *E. coli* BL21 DE3 transformadas com plasmídeo de expressão da TTR: pré indução: raia 2: células e raia 3: sobrenadante; pós indução: raia 4: células e raia 5: sobrenadante. **(B)** Cromatografia de troca iônica (IEC): raia 1: amostra injetada; raias 2-7: picos (A280) de eluição Source 30Q, conforme indicado no cromatograma. **(C)** Cromatografia de exclusão molecular: raia 1: amostra injetada, raias 2-4 picos eluição SD75, conforme indicado no cromatograma. Marcador de massa molecular (MK): albumina soro bovina (66Kda), ovoalbumina (45 Kda), anidrase carbônica bovina(29Kda), inibidor de tripsina

	de soja (24Kda) e citocromo C (13Kda). <b>(D)</b> Gel nativo, amostras eluídas da gel filtração e concentradas em concentrador Centricon® (filtro com corte de 10 kDa), diferentes volumes da amostra foram aplicados ao gel (1, 4 e 2 µl). ....	94
<b>Figura 4.2</b>	– Exemplos de cristais e co-cristais TTR e TTR:ligantes obtidos. <b>(A)</b> : (A.a) cristais de apoV30M obtidos na condição de PEG400; (A.b.) co-cristais de TTRwt:genisteína obtidos na condição de PEG400 otimizada; e cristais de apoTTRwt obtidos inicialmente nas condições de cristalização contendo (A.c) PEG400; (A.d) PEG3350 e (A.e) sulfato de amônio como agente precipitante. <b>(B)</b> Padrão de difração de co-cristal TTRwt:genisteína coletado na linha MX1 – LNLS. ....	95
<b>Figura 5.1</b>	– Estabilidade da TTR mutante V30M em relação à TTRwt em <b>(A)</b> pH ácido e <b>(B)</b> sob pressão. Os dados foram normalizados em função dos valores apresentados pela apoTTRwt. ....	98
<b>Figura 5.2</b>	– Raiz média quadrada (RMS) do deslocamento em XYZ dos átomos de carbono alfa na estrutura cristalográfica da apoV30M em comparação com apoTTRwt. A sobreposição das cadeias “A” é mostrada em preto, enquanto a das cadeias “B” em cinza. O número dos resíduos, ou <i>loops</i> relativos aos picos de RMSd são apontados. ....	100
<b>Figura 5.3</b>	– Alterações estruturais introduzidas pela mutação Val30 → Met. <b>(A)</b> O tetrâmero da apoTTRwt (em ciano) e da apoV30M (em magenta) foram sobrepostos e uma figura estereo é mostrada. Os C $\alpha$ dos resíduos de aminoácido, relativos aos picos de RMSd, são indicados em esferas amarelas, numeradas de acordo com a numeração destes aminoácidos nas estruturas cristalográficas. <b>(B)</b> Um monômero foi selecionado (cadeia B) para apresentação em melhores detalhes. Os resíduos de aminoácido indicados em <b>A</b> são mostrados em bastões. Os <i>loops</i> AB e FG são mostrados em vermelho (apoV30M) e azul (apoTTRwt) para destaque. As figuras foram geradas com o programa Pymol (DeLano Scientific). ....	101
<b>Figura 5.4</b>	– Modificações estruturais no sítio de ligação introduzidas pela mutação V30M. <b>(A)</b> Volume das cavidades calculado no servidor CASTp (195). <b>(B)</b> Alteração da conformação da cadeia lateral de Ser117 (Ser117u) na estrutura tetramérica da mutante V30M. Apenas o fundo dos sítios da apoTTRwt e da apoV30M são mostrados. As figuras foram geradas com o programa Pymol (DeLano Scientific) <b>(C)</b> RMSd dos átomos da cadeia principal da apoV30M, quando sobreposta à apoTTRwt. As estruturas foram sobrepostas com o programa Superpose (192). <b>(D)</b>	

Diferença entre as distâncias medidas entre os C $\alpha$  equivalentes (ex.: distância entre Lys15A e Lys15C no sítio AC da apoTTRwt) dos resíduos que compõe os sítios da apoTTRwt e da apoV30M. As distâncias foram calculadas a partir das coordenadas atômicas destas duas estruturas, e a diferença entre as distâncias medidas nos sítios da apoTTRwt foram subtraídas das mesmas distâncias medidas nos sítios da apoV30M. Este procedimento foi realizado de acordo com o descrito por Neumann e colaboradores (196).....102

**Figura 5.4** – Tetrâmero da apoV30M com destaque para um dos sítios de ligação. O tetrâmero da apoV30M é mostrado em modelo de *cartoon*, com as subunidades monoméricas coloridas individualmente. A mutação Met30 é mostrada em bastões e circundada por pontos. A região do sítio de ligação é destacada e ampliada no painel superior. A superfície do sítio de ligação, delimitada pelos resíduos da TTR 14-19, 106-110 e 117-121 é mostrada. O sítio da apoTTRwt (PDB ID: 3CFM) é mostrado para comparação. As figuras foram geradas com o programa Pymol (DeLano Scientific). .....104

**Figura 6.1** – Inibição da agregação *in vitro* da TTR tipo selvagem (TTRwt) e mutante V30M conduzidos em concentração única (1:8) dos potenciais inibidores. Os valores de média e desvio padrão da inibição relativa (IR = agregação da TTR na presença do ligante/ agregação da apoTTR) de cada um dos ligantes testados são mostrados e foram calculados a partir de 2-3 experimentos independentes conduzidos em duplicatas. Valores iguais a 1 indicam 100% de inibição, enquanto valores iguais a zero indicam 0% de inibição da agregação da TTR mediada por pH ácido. ....108

**Figura 6.2** – Curvas de agregação em pH ácido conduzidas com a TTR tipo selvagem (**A**) e com a mutante V30M (**B**), em presença de diferentes ligantes. Os valores são expressos em inibição relativa (IR) da TTR:ligante em relação à proteína apo, mantida nas mesmas condições experimentais. A concentração da proteína utilizada foi 7,2  $\mu$ M e dos ligantes 0,3; 0,6; 0,9; 1,2; 2,4; 3,6; 4,8; 7,2; 28,8 e 57,6  $\mu$ M. Estes experimentos foram realizados em duplicatas e repetidos três vezes com diferentes preparações do ligante e da proteína. Os valores médios de IR experimental são mostrados em símbolos preenchidos em diferentes cores. As curvas experimentais foram ajustadas com a equação de dose-resposta no programa GraphPad Prism (GraphPad, v4) e são mostradas em linhas contínuas. .... 111

**Figura 6.3** – Valores de IC50 mostrados pelos diferentes ligantes nos ensaios de agregação *in vitro* da TTRwt e V30M..... 113

**Figura 7.1** – Análise do sítio de ligação dos complexos cristalográficos TTRwt:GEN e V30M:GEN. **(A)** Figura estéreo mostrando os sítios de interação da TTRwt e **(B)** da mutante V30M com a isoflavona genisteína (GEN). GEN é mostrada em bastões amarelos (sítio 1: BD) e verdes (sítio 2: AC). O mapa de omissão (2Fo-Fc) calculado para o ligante e para o resíduo de aminoácido Ser117 é mostrado, contornado a  $\sigma = 0.5$ . As interações que estabilizam GEN nos sítios da TTR são mostradas em linhas pontilhadas. Para melhor compreensão da figura as duplas conformações, observadas para alguns resíduos da TTR, envolvidas na ligação de GEN, bem como a molécula de GEN simétrica gerada ao longo do eixo Z, são mostradas em bastões cinza. As moléculas de água envolvidas na ligação de GEN são também mostradas. Estas águas foram refinadas com ocupância igual a 0,5, e por esta razão, as águas relacionadas por simetria são mostradas como esferas cinza. As conformações de Ser117 denominadas ligada (b= *bound*) e não ligada (u= *unbound*) estão indicadas. **(C)** Sobreposição das moléculas de GEN encontradas no sítio 1 (amarelo) e sítio 2 (verde) dos complexos cristalográficos TTRwt:GEN e V30M:GEN. **(D)** Estrutura tri-dimensional de GEN, como encontrado no complexo cristalográfico TTRwt:GEN. A molécula de GEN gerada por simetria de ordem 2 é mostrada em cinza. Os átomos estão numerados de acordo com a numeração das coordenadas atômicas dos complexos TTR:GEN. Os átomos de oxigênio são mostrados em vermelho, enquanto os átomos de nitrogênio em azul. As figuras foram geradas com o programa Pymol (De Lano Scientific LLC). **(E)** Volume dos sítios de ligação nas estruturas cristalográficas da TTRwt e mutante V30M na forma apo e em complexo com GEN (PDB IDs: 3CFM (apoTTRwt), 3KGS (apoV30M), 3KGU (TTRwt:GEN) e 3KGT (V30M:GEN)). ..... 118

**Figura 7.2** – Curvas representativas de ITC realizadas pela titulação de GEN (200  $\mu$ M) em uma cela de amostra contendo TTRwt **(A)** ou V30M **(B)** a 12  $\mu$ M. Os diferentes modelos matemáticos disponíveis (“sítios idênticos e independentes”, “sítios diferentes e independentes” e “sítios seqüenciais”) para descrever a interação de ligantes com proteínas foram testados e o ajuste dos dados experimentais com estes 3 modelos é mostrado em vermelho nesta figura. .... 124

**Figura 7.3** – Análise de microcalorimetria por titulação isotérmica (ITC) da ligação da GEN à TTRwt **(A)** e à mutante V30M **(B)**. Os dados brutos de saída são mostrados nos painéis superiores, enquanto os painéis inferiores

- mostram o ajuste não linear dos dados integrados, usando o modelo de “sítios seqüenciais” (para a TTRwt) ou o modelo de “sítios diferentes e independentes” (para a V30M) no programa Origin7 (OriginLab). **(C)** Diagrama esquemático mostrando as contribuições energéticas da ligação da GEN à TTRwt e à V30M, calculados a partir do ajuste não linear dos dados de ITC. ....128
- Figura 7.4** – Dados experimentais de inibição relativa da agregação da TTRwt e V30M *in vitro* (painel superior) e fração de sítios ocupados pelo ligante GEN calculado para cada ponto da curva experimental (painel inferior). As simulações da ocupação dos sítios foram realizadas usando os valores de constante de dissociação calculados nos experimentos de ITC (modelo de “sítios seqüenciais” para a TTRwt e “sítios diferentes e independentes” para a mutante V30M); além dos valores de concentração de ligante e de proteína em cada ponto experimental.....130
- Figura 7.5** – Dissociação/ desenovelamento da TTRwt (2  $\mu$ M) e V30M (2  $\mu$ M) induzido por pressão. **(A)** Curvas de pressão conduzidas na presença de 2  $\mu$ M (◐) e 8  $\mu$ M (●) de GEN comparado à curvas da apoTTR (○). **(B)** Valores de p50 calculados destas curvas de pressão (painel superior) e fração dos sítios da TTR ocupados pelo ligante GEN em cada ponto experimental, calculada considerando as constantes de afinidade obtidas nas medidas de ITC, a concentração de proteína e de ligante utilizadas nos experimentos (painel inferior). ....131
- Figura 8.1** – Curvas representativas da titulação dos flavonóides API, LUT, CHR, KAE e NAR com a TTRwt. Os painéis superiores mostram os dados brutos de saída e os painéis inferiores os dados integrados e ajustados usando o modelo de “sítios idênticos e independentes” (API, LUT e CHR) e “sítios seqüenciais” (KAE e NAR).....136
- Figura 8.2** – Interação da luteolina (LUT) com a TTRwt, assim como verificado no complexo cristalográfico TTRwt:LUT. **(A)** Figura estéreo do sítio de ligação. Como não houve diferença entre os dois sítios de ligação apenas o sítio AC é mostrado. Os resíduos de aminoácido da TTRwt que participam de interações com LUT são mostrados em bastões. A molécula de água que participa da interação é mostrada em esfera. As ligações polares formadas por LUT com a TTRwt são indicadas em linhas pontilhadas amarelas. O ligante é mostrado em bastões e contornado pelo mapa de omissão (2Fo-Fc) a  $\sigma = 0,5$ . Duas cópias simétricas do ligante foram encontradas nos sítios como consequência do eixo de simetria de ordem 2 cortar

verticalmente o sítio de ligação. Assim, a cópia simétrica gerada é mostrada em bastões cinza. **(B)** Sobreposição do ligante no sítio AC (verde) com o ligante no sítio BD (preto) do complexo TTRwt:LUT. Os átomos de oxigênio são mostrados em vermelho e de nitrogênio em azul. As figuras foram geradas com o programa Pymol (De Lano Scientific). ..... 141

**Figura 8.3** – Interação da apigenina (API) com a TTRwt, assim como verificado no complexo cristalográfico TTRwt:API. **(A)** Figura estéreo do sítio de ligação. Como não houve diferença entre os dois sítios de ligação apenas o sítio AC é mostrado. Os resíduos de aminoácido da TTRwt que participam de interações com API são mostrados em bastões. A molécula de água que participa da interação é mostrada em esfera e conectada à 4'OH de API por linhas pontilhadas amarelas. O ligante é mostrado em bastões e contornado pelo mapa de omissão (2Fo-Fc) a  $\sigma = 0,5$ . Duas cópias simétricas do ligante foram encontradas nos sítios de ligação como consequência do eixo de simetria de ordem 2 cortar verticalmente o sítio de ligação. Assim, a cópia simétrica gerada é mostrada em bastões cinza. As duplas conformações de cadeias laterais de aminoácido da TTRwt encontradas são também mostradas em bastões cinza. **(B)** Sobreposição do ligante no sítio AC (ciano) com o ligante no sítio BD (preto) do complexo TTRwt:API. Os átomos de oxigênio são mostrados em vermelho e de nitrogênio em azul. As figuras foram geradas com o programa Pymol (De Lano Scientific). ..... 143

**Figura 8.4** – Interação do kaenferol (KAEI) com a TTRwt, assim como verificado no complexo cristalográfico TTRwt:KAE. **(A)** Figura estéreo do sítio de ligação AC. **(B)** Figura estéreo do sítio de ligação BD. Os resíduos de aminoácido da TTRwt que participam de interações com KAE são mostrados em bastões. A molécula de água que participa da interação e as moléculas de água encontradas somente na entrada do canal BD são mostradas em esferas. As ligações polares formadas por KAE com a TTRwt são indicadas em linhas pontilhadas amarelas. O ligante é mostrado em bastões e contornado pelo mapa de omissão (2Fo-Fc) a  $\sigma = 0,5$ . A cópia simétrica do ligante gerada é mostrada em bastões cinza. **(C)** Sobreposição do ligante no sítio AC (amarelo) com o ligante no sítio BD (preto) do complexo TTRwt:KAE. Os átomos de oxigênio são mostrados em vermelho e de nitrogênio em azul. As Figuras foram geradas com o programa Pymol (De Lano Scientific). ..... 145

**Figura 8.5** – Interação da naringenina (NAR) com a TTRwt, assim

como verificado no complexo cristalográfico TTRwt:NAR. **(A)** Figura estéreo do sítio de ligação AC. **(B)** Figura estéreo do sítio de ligação BD. Os resíduos de aminoácido da TTRwt que participam de interações com NAR são mostrados em bastões. A molécula de água que participa da interação é mostrada em esferas. As ligações polares formadas por NAR com a TTRwt são indicadas em linhas pontilhadas amarelas. O ligante é mostrado em bastões e contornado pelo mapa de omissão (2Fo-Fc) a  $\sigma = 0,5$ . Duas cópias simétricas do ligante foram encontradas nos sítios de ligação como consequência do eixo de simetria de ordem 2 cortar verticalmente o sítio de ligação. Assim, a cópia simétrica gerada é mostrada em bastões cinza. As duplas conformações de cadeias laterais de aminoácido da TTRwt encontradas são também mostradas em bastões cinza. **(C)** Sobreposição do ligante no sítio AC (cinza) com o ligante no sítio BD (preto) do complexo TTRwt:NAR. Os átomos de oxigênio são mostrados em vermelho e de nitrogênio em azul. As Figuras foram geradas com o programa Pymol (De Lano Scientific).....147

**Figura 8.6** – Interação da crisina (CHR) com a TTRwt, assim como verificado no complexo cristalográfico TTRwt:CHR. **(A)** Figura estéreo do sítio de ligação. Como não houve diferença significativa na posição do ligante nos dois sítios de ligação apenas o sítio AC é mostrado. Os resíduos de aminoácido da TTRwt que participam de interações com CHR são mostrados em bastões. A interação polar formada por CHR com a TTRwt é indicada em linhas pontilhadas amarelas. O ligante é mostrado em bastões e contornado pelo mapa de omissão (2Fo-Fc) a  $\sigma = 0,5$ . A cópia simétrica do ligante, gerada ao longo do eixo cristalográfico Z, é mostrada em bastões cinza. As duplas conformações de cadeias laterais de aminoácido da TTRwt encontradas são também mostradas em bastões cinza. **(B)** Sobreposição do ligante no sítio AC (laranja) com o ligante no sítio BD (preto) do complexo TTRwt:CHR. Os átomos de oxigênio são mostrados em vermelho e de nitrogênio em azul. As figuras foram geradas com o programa Pymol (De Lano Scientific).....149

**Figura 8.7** – Sobreposição dos flavonóides GEN (preto), API (ciano), LUT (verde), KAE (amarelo), NAR (cinza) e CHR (laranja) como encontrados nos sítios AC **(A)** e BD **(B)** das estruturas cristalográficas da TTRwt em complexo com estes flavonóides. ....151

**Figura 8.8** – Figuras estéreo do perfil das cavidades de ligação em diferentes estruturas cristalográficas da TTRwt **(A)** apoTTRwt; **(B)** TTRwt:LUT; **(C)** TTRwt:API; **(D)**

TTRwt:KAE; **(E)** TTRwt:NAR; **(F)** TTRwt:CHR e **(G)** TTRwt:GEN. Três orientações do sítio ao longo do eixo Z foram escolhidas. Os resíduos de aminoácido da TTRwt que compõe o sítio de ligação BD (14 ao 19, 106 ao 110 e 117 ao 121) foram selecionados, a superfície correspondente gerada e esses resíduos nomeados. Um das cópias simétricas dos ligantes é mostra em bastões. As figuras foram geradas com o programa Pymol (De Lano Scientific). Os átomos de oxigênio são mostrados em vermelho e os de nitrogênio em azul. .... 155

**Figura 8.9** – Volume dos sítios de ligação da TTRwt em diferentes estruturas cristalográficas. Os cálculos foram realizados no servidor CASTp. .... 156

**Figura 8.10** – Diferenças entre os sítios de ligação da apoTTRwt em relação aos complexos TTRwt:flavonóides. **(A)** e **(B)** mostram um gráfico de RMSd da sobreposição dos átomos da cadeia principal dos complexos cristalográficos TTRwt:flavonóides com a estrutura da apoTTRwt. **(C)** e **(D)** mostram as diferenças das distâncias dos átomos de C $\alpha$  dos resíduos que compõe cada sítio de ligação da apoTTRwt subtraídos da mesma distância das estruturas TTRwt:flavonóides. Valores negativos indicam maior distância nos complexos TTRwt:flavonóides. .... 159

**Figura 8.11** – Sobreposição do sítio de ligação BD das estruturas cristalográficas TTRwt:GEN (preto), TTRwt:LUT (verde), TTRwt:API (ciano), TTRwt:KAE (amarelo), TTRwt:CHR (laranja), TTRwt:NAR (cinza escuro), apoTTRwt (cinza claro) e apoV30M (magenta). A superfície do sítio de ligação (resíduos 14-19, 106-110 e 117-121) é mostrada para apoTTRwt **(A, B)** e apoV30M **(C, D)**. A mutação Met30 é mostrada em pontilhado e pode ser observada nas extremidades da Figura D. As imagens são mostradas em estéreo e foram geradas com o programa Pymol (De Lano Scientific). .... 161

**Figura 9.2** – Visão estéreo de um dos sítios de ligação dos complexos cristalográficos **(A)** TTRwt:GC-1; **(B)** TTRwt:GC-24; **(C)** V30M:GC-1; **(D)** V30M:GC-24. Os ligantes são mostrados em bastões ciano, subrepostos com sua cópia (bastões cinza) gerada por simetria ao longo do eixo cristalográfico Z. O mapa de omissão calculado para o ligante está mostrado e contornado a  $\sigma = 1,0$ . As interações polares que estabilizam GC-1 e GC-24 nos sítios da TTR são mostradas em linhas pontilhadas. Para melhor interpretação da figura as duplas conformações das cadeias laterais dos resíduos do sítio são mostradas em cinza. As moléculas de água envolvidas na ligação de GC-1 e GC-24 são mostradas



em esferas vermelhas, enquanto as moléculas de água encontradas apenas nos complexos com GC-1 (e não nos complexos com GC-24) são mostradas em esferas amarelas. Os átomos de oxigênio e nitrogênio são mostrados em vermelho e azul, respectivamente. As figuras foram geradas com o programa Pymol (De Lano Scientific LLC).....173

**Figura 9.3** – Comparação dos sítios de ligação em estruturas cristalográficas da TTRwt e V30M na forma apo e em complexo com GC-1, GC-24 e T<sub>4</sub>. **(A)** Sobreposição do sítio de ligação de TTRwt:T<sub>4</sub> (amarelo), TTRwt:GC-1 (verde) e TTRwt:GC-24 (magenta). Os átomos participando de interações polares estão conectados por linhas pontilhadas e os resíduos de aminoácido envolvidos na interação são mostrados em bastões e estão identificados. **(B)** Sobreposição das moléculas de ligante encontradas no sítio AC (bastões coloridos) e sítio BD (bastões cinza) dos complexos cristalográficos TTRwt:GC-1, TTRwt:GC-24 e TTRwt:T<sub>4</sub>. As figuras foram geradas com o programa Pymol (De Lano Scientific LLC). **(C)** Distâncias interatômicas entre os C $\alpha$  de resíduos equivalentes que compõe os sítios da TTRwt e V30M na forma apo e ligando GC-1 ou GC-24. As distâncias medidas nas estruturas cristalográficas da TTRwt foram subtraídas das mesmas distâncias medidas nas estruturas da V30M e estas diferenças são mostradas para o sítio AC e BD neste gráfico. **(D)** Volume dos sítios de ligação em diferentes estruturas cristalográficas da TTRwt e **(E)** mutante V30M. Os cálculos foram realizados no servidor CastP (195).....179

**Figura 9.4** – Diagrama esquemático das movimentações na estrutura tetramérica da TTRwt observadas frente à ligação do T<sub>4</sub>, GC-1 e GC24. ....182

**Figura A1** – Representação (exagerada) dos “blocos mosaicos” em cristais (199).....210

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 3.1</b>	– Classificação dos flavonóides e exemplos. Adaptado de Beecher (127).....	67
<b>Tabela 5.1</b>	– Estatísticas da coleta e processamento dos dados de difração de raios-X da mutante V30M na forma apo. Os números em parênteses indicam os valores na faixa de mais alta resolução.....	99
<b>Tabela 5.2</b>	– Raiz media quadrada (RMS) do deslocamento em XYZ dos átomos na estrutura cristalográfica da apoTTRwt em comparação com apoV30M.....	100
<b>Tabela 6.1</b>	– Parâmetros experimentais e calculados a partir das curvas de agregação <i>in vitro</i> da TTRwt e mutante V30M, conduzidas em diferentes concentrações dos ligantes selecionados. ....	112
<b>Tabela 7.1</b>	– Estatísticas da coleta e processamento dos dados de difração de raios-X dos complexos cristalográficos TTRwt:GEN e V30M:GEN. Os números em parênteses indicam os valores na faixa de mais alta resolução.....	117
<b>Tabela 7.2</b>	– Contatos polares da GEN com o sítio 1 e sítio 2 da TTRwt e V30M, observados nos complexos cristalográficos TTRwt:GEN e V30M:GEN. Os átomos envolvidos nestes contatos e as distâncias medidas na estruturas cristalográficas são apresentados.....	120
<b>Tabela 7.3</b>	– Raiz média quadrada (RMS) do deslocamento em XYZ dos átomos das estruturas cristalográficas da apoTTR quando sobrepostas às estruturas dos complexos TTR:GEN.....	123
<b>Tabela 8.1</b>	– Parâmetros termodinâmicos da interação de API, LUT, CHR, KAE e NAR com a TTRwt, retornados pelo ajuste das curvas de ITC com o modelo de “sítios idênticos e independentes” ou “sítios seqüenciais” (KAE, NAR e CHR).....	138
<b>Tabela 8.2</b>	– Estatísticas do processamento e refinamento dos dados dos complexos cristalográficos TTRwt:API e TTRwt:LUT. Os valores em parênteses indicam a faixa de maior resolução. ....	139
<b>Tabela 8.3</b>	– Estatísticas do processamento e refinamento dos dados dos complexos cristalográficos TTRwt:KAE TTRwt:NAR e TTRwt:CHR. Os valores em parênteses indicam a faixa de maior resolução. ....	140
<b>Figura 9.1</b>	– Curvas de microcalorimetria por titulação isotérmica conduzidas com <b>(A)</b> TTRwt e <b>(B)</b> V30M ligando GC-1 e <b>(C)</b> TTRwt e <b>(D)</b> V30M ligando GC-24. Os dados brutos da titulação são mostrados nos painéis superiores; enquanto os painéis inferiores trazem os valores integrados e o ajuste não linear dos dados usando o modelo de “sítios idênticos e independentes” no programa Origin7 (Origin Lab).....	169

<b>Tabela 9.1</b>	– Parâmetros termodinâmicos calculados a partir das curvas de titulação isotérmica dos ligantes GC-1 e GC-24 com a TTR tipo selvagem e a mutante V30M. ....	170
<b>Tabela 9.2</b>	– Estatísticas de coleta, processamento e refinamento dos dados de difração de raios-X de cristais de TTRwt:GC-1 e V30M:GC-1. Os números em parênteses indicam os valores da faixa de maior resolução dos dados. ....	172
<b>Tabela 9.3</b>	– Estatísticas de coleta, processamento e refinamento dos dados de difração de raios-X de cristais de TTRwt:GC-24 e V30M:GC-24. Os números em parênteses indicam os valores da faixa de maior resolução dos dados. ....	172
<b>Tabela 9.4</b>	– Potenciais contatos polares entre GC-1 ou GC-24 e os sítios da TTRwt e da mutante V30M, assim como observado nas estruturas cristalográficas dos complexos TTRwt:GC-1/GC-24 e V30M:GC-1/GC-24. ....	174
<b>Tabela A1</b>	– Os sete sistemas cristalinos. Adaptado de Drenth (176). ....	211

## LISTA DE ABREVIATURAS

- API: apigenina  
CAT: catequina  
CHR: crisina  
DIF: diflunisal  
DTT: ditioneitol  
eCAT: epicatequina  
FDA: agência regulamentadora americana (*Food and Drug Administration*)  
FLU: ácido flufenâmico  
GalCat: galato de catequina  
GC-1: [4-(4-hidroxi-3-isopropilbenzil)-3,5-dimetilfenox] ácido acético;  
GC-24: [4-(3-benzil-4-hidroxi-benzil)-3,5-dimetilfenox] ácido acético;  
gCAT: galocatequina  
GEN: genisteína  
HBP: bolsão de ligação de halogênio (*halogen binding pocket*)  
IPTG: isopropiltio- $\beta$ -D-galactopironosídeo  
KAE: kaenferol  
LUT: luteolina  
MIR: mircetina  
MOR: morina  
NAR: naringenina  
PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida  
PHENOX: *meta*-trifluorometil-N-aril fenoxazina  
QUE: quercetina  
SDS: dodecil sulfato de sódio  
T<sub>4</sub>: tiroxina  
TR: receptor de hormônio tireoidiano  
TTR: transtirretina  
TTRwt: TTR selvagem  
V30M: TTR mutante contendo um resíduo de metionina, invés de valina, em posição 30  
FAP: polineuropatia amiloid familiar (*familiar amyloid polyneuropathy*)  
FAC: cardiomiopatia amiloid familiar (*familiar amyloid cardiomyopathy*)

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>Introdução</b>	<b>29</b>
1.1	Amiloidoses	30
1.2	Amiloidoses de transtirretina	34
1.3	Transtirretina: estrutura e função	36
1.4	Vias de formação de fibras amilóides de transtirretina	38
1.4.1	Mecanismo geral: dissociação do tetrâmero	38
1.4.2	Possíveis alterações estruturais dos monômeros/ dímeros de TTR dissociados	39
1.5	Estratégias para o tratamento de amiloidoses de TTR	44
<b>2</b>	<b>Objetivos e justificativa</b>	<b>57</b>
<b>3</b>	<b>Metodologia</b>	<b>61</b>
3.1	Expressão e purificação da TTR tipo selvagem e mutante V30M	62
3.1.1	Transformação das bactérias E. coli BL21 DE3	62
3.1.2	Expressão da TTR	63
3.1.3	Purificação da TTR	64
3.2	Pequenas moléculas selecionadas	66
3.2.1	Flavonóides	67
3.2.2	Análogos sintéticos do hormônio tireoidiano	70
3.3	Ensaio de agregação da TTR em pH ácido	71
3.4	Experimentos de alta pressão hidrostática (HHP)	75
3.5	Microcalorimetria por titulação isotérmica (ITC)	77
3.6	Cristalização e determinação das estruturas cristalográficas dos complexos TTR:ligantes	82
3.6.1	Ensaio de cristalização	89
3.6.2	Coleta de dados de difração de raios-X e processamento de dados	91
<b>4</b>	<b>Expressão, purificação e cristalização da TTR</b>	<b>93</b>
<b>5</b>	<b>Análise da TTR selvagem e mutante V30M na forma apo</b>	<b>97</b>
<b>6</b>	<b>Ensaio de agregação da TTR</b>	<b>107</b>
<b>7</b>	<b>Interação da genisteína (GEN) com a TTRwt e mutante V30M</b>	<b>115</b>
7.1	Estruturas cristalográficas dos complexos TTRwt:GEN e V30M:GEN	116
7.2	Microcalorimetria por titulação isotérmica (ITC)	123
7.3	Curvas de alta pressão hidrostática (HHP)	130
7.4	Conclusão	133
<b>8</b>	<b>Interação de flavonóides com a TTR</b>	<b>135</b>
8.1	Microcalorimetria por titulação isotérmica (ITC)	136
8.2	Estruturas cristalográficas dos complexos TTRwt:flavonóides	139
8.3	Análise comparativa da ligação dos diferentes flavonóides à TTRwt	150

8.4 Prováveis efeitos da mutação Met30 na ligação dos flavonóides à TTR mutante V30M _____	160
8.5 Análise estrutural da cooperatividade entre os sítios da TTRwt ligando flavonóides _____	162
8.6 Conclusão _____	164
<b>9 Interação de análogos estruturais do T<sub>4</sub> com a TTR _____</b>	<b>167</b>
9.1 Microcalorimetria por titulação isotérmica (ITC) _____	168
9.2 Estruturas cristalográficas dos complexos TTRwt:GC-1/GC-24 e V30M/GC-1/GC-24 _____	171
9.3 Discussão _____	176
9.4 Conclusão _____	182
<b>10 Conclusão e perspectivas _____</b>	<b>185</b>
REFERÊNCIAS _____	191
APÊNDICE A _____	209
APÊNDICE B _____	215
APÊNDICE C _____	217



# 1 Introdução

Em 2004, o então pós-doutorando Prof. Dr. Luis Maurício T. R. Lima, iniciou estudos de cristalização e análise estrutural da proteína transtirretina (TTR) humana no Grupo de Cristalografia do Instituto de Física de São Carlos. Estes estudos visavam implementar análises estruturais, por cristalografia, da TTR no Brasil, dando suporte a estudos já realizados com esta proteína no Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro; estudos estes concentrados no Laboratório de Agregação de Proteínas e Amiloidoses (LAPA), coordenado pela Profa. Dra. Débora Foguel.

Como a TTR está envolvida em doenças amilóides humanas, a identificação e caracterização de inibidores da agregação/ formação de fibras amilóides desta proteína torna-se importante. Neste contexto, a presente tese deu continuidade aos estudos estruturais iniciados pelo Prof. Dr. Luis Maurício, aqui focando na identificação e caracterização de inibidores da agregação da TTR humana. Para isto foram escolhidas duas variantes desta proteína, a TTR tipo selvagem (TTRwt) e a



mutante amiloideogênica mais freqüente, a V30M. Pequenas moléculas foram selecionadas com base em estruturas de inibidores da agregação da TTR já descritas, priorizando-se inibidores que potencialmente apresentariam efeitos colaterais por uso prolongado minimizados, em relação a outros inibidores já reportados. Estas moléculas foram então testadas frente à inibição da agregação/desenovelamento/ dissociação da TTR, aplicando-se protocolos disponíveis na literatura. A interação dos melhores inibidores identificados com a TTR foi caracterizada com foco termodinâmico e estrutural, baseado em análises calorimétricas, e determinação das estruturas cristalográficas dos complexos TTR:inibidores.

Estes serão os principais tópicos tratados na presente tese, após introdução e revisão bibliográfica do assunto.

## **1.1 Amiloidoses**

Amiloidoses são desordens de origem diversa onde o desenovelamento total, parcial ou mau enovelamento de proteínas têm papel central no desenvolvimento da patologia (1-4). Esses processos podem levar à formação de agregados solúveis ou insolúveis e ainda à formação de fibras amilóides de proteínas(1, 4-5). Fibras amilóides são caracterizadas pela agregação organizada de proteínas, formadas por subunidades ricas em, ou que adquirem, estruturas tipo folha-beta (6-8).

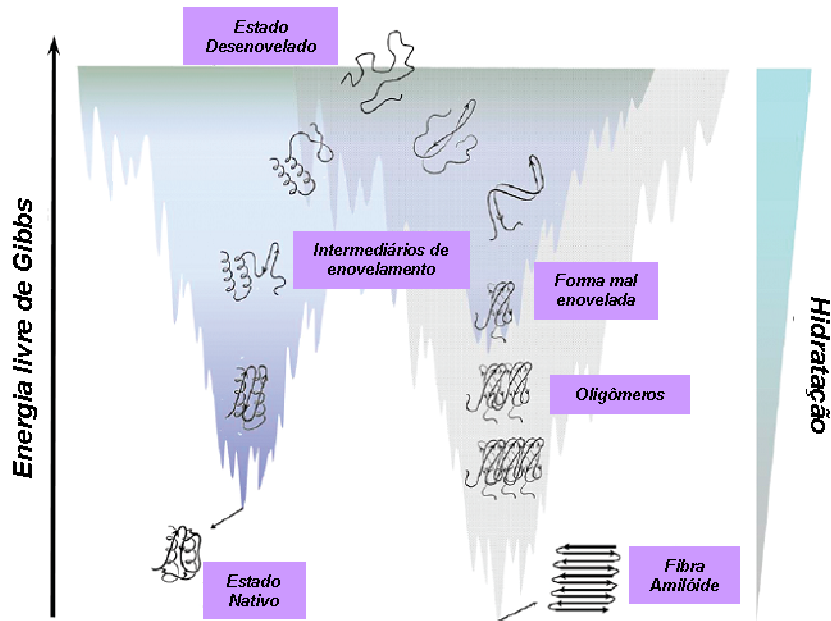
As fibras amilóides podem se depositar nos órgãos e tecidos humanos, sendo freqüentemente encontradas em forma de placas amilóides em tecidos de pacientes que apresentam tais patologias. Desta forma, por muito tempo se pensou que a deposição da placa amilóide fosse a principal causa das amiloidoses, levando à degeneração/ disfunção dos órgãos ou tecidos atingidos. No entanto, mais recentemente, foi demonstrado que espécies intermediárias como oligômeros solúveis das proteínas parcialmente desenoveladas são também tóxicos, podendo ter efeito ainda mais pronunciado que a deposição das fibras amilóides propriamente

ditas (9-13)

Mais de 40 proteínas humanas foram identificadas até o momento como protagonistas de condições neurodegenerativas e amiloidoses sistêmicas (revisado em (10, 14)). São exemplos o peptídeo  $\beta$ -amilóide e a proteína tau (doença de Alzheimer – revisado em (12)), a  $\alpha$ -sinucleína (doença de Parkinson – revisado em (13, 15)), a transtirretina (amiloidose sistêmica senil (SSA), amiloidoses familiares cardiomopáticas (FAC), polimiopáticas (FAP) e do sistema nervoso central (16-18)), a cadeia leve da imunoglobulina (19-20), a lisozima (21-22), a proteína do príon e a proteína supressora de tumor p53 (revisado em (23)). A maioria destas proteínas são cadeias polipeptídicas globulares que apresentam estrutura secundária, terciária e quaternária bem definida. No entanto, mesmo em condições fisiológicas, é observado mau enovelamento destas proteínas, seja por vias de escape de processos de enovelamento, ou conversão da estrutura nativa em estruturas desenoveladas (total ou parcialmente), gerando intermediários amiloidogênicos e fibras amilóides (5, 14, 16-17). Estes eventos podem ainda ser agravados pela presença de mutações nessas proteínas (16, 21-22, 24).

Assim, o processo de formação de fibras amilóides e intermediários envolve escape das vias de enovelamento de proteínas ou perturbação da estrutura nativa. Uma via de enovelamento/ desenovelamento e formação de fibras amilóides de proteínas é mostrada esquematicamente em função da energia livre de Gibbs e hidratação na Figura 1.1.

De acordo com o modelo proposto por Silva e colaboradores (23), baseado em estudos da proteína do príon e da proteína supressora de tumor, p53, as vias de enovelamento para conformação nativa e para formas mal enoveladas, agregados e amilóides apresentam energia livre e hidratação muito similar. Isto faz com que, em muitos casos, não haja preferência por uma ou outra forma e sim heterogeneidade da população da proteína. No entanto, o deslocamento do equilíbrio para um ou outro estado ocorre e parece ser dependente de como os intermediários de enovelamento são populados, baseado em suas energias, barreiras energéticas e exposição de superfícies hidrofóbicas ao solvente (23).



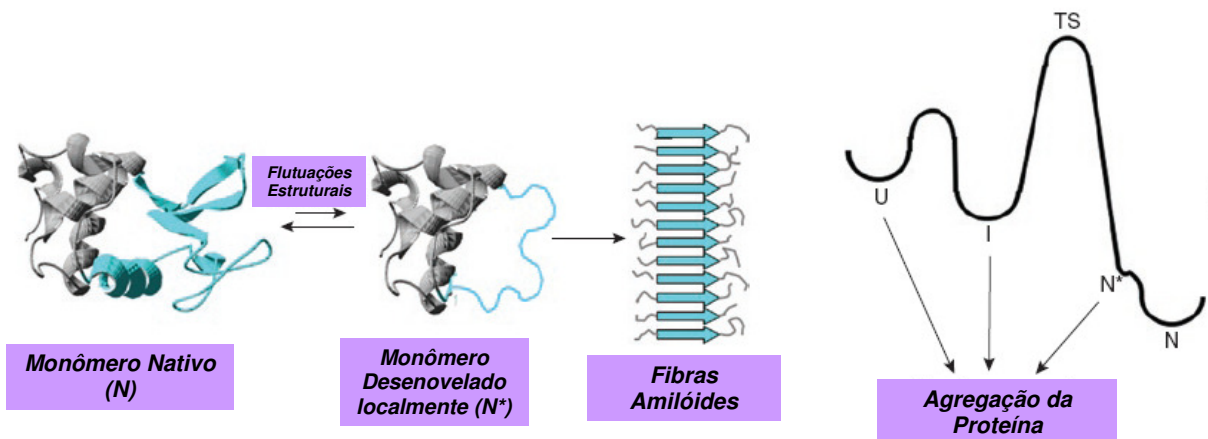
**Figura 1.1** – Via representativa de enovelamento/ desenovelamento e formação de fibras amilóides de proteínas, em função da energia livre de Gibbs e hidratação. Este esquema foi elaborado a partir de estudos da proteína do príon e da proteína supressora de tumor, p53, por Silva e colaboradores (23).

Em um processo inverso, a forma nativa é mantida por energia livre mais favorável e baixa hidratação, limitando a via de desenovelamento global da proteína. No entanto, quando a via de desenovelamento é induzida, há formação de espécies intermediárias com energia livre menos favorável (23). Estas podem retornar pela via de enovelamento normal ou seguir para vias de formação de agregados e/ou fibras amilóides, apresentando as mesmas dependências para uma ou outra via, assim como comentado acima (Figura 1.1).

Em laboratório, pode-se induzir alterações conformacionais/ estruturais e agregação dessas proteínas, através do uso de agentes perturbadores da estabilidade da estrutura nativa, tais como: alta pressão (25-26), baixo pH (4, 27-28), alta temperatura (29-30) e co-solventes (31-32). Os mecanismos e agentes perturbadores que induzem a desnaturação protéica e rápida formação de agregados ou fibras amilóides parece ser proteína específicos (revisado em (33)). No entanto, uma característica comum é a aquisição de estrutura em folha-beta (6-8), levando à rápida associação das subunidades em fibras amilóides, protofibrilas ou agregados amorfos.

Em alguns casos as alterações conformacionais/ estruturais são bastante

sutis. Foi observado que a estrutura nativa de uma dada proteína pode experimentar conformações que favorecem a agregação ou associação em fibras amilóides, mesmo mantendo sua estrutura nativa, caracterizando desenovelamento ou reestruturação local da estrutura da proteína (14, 24, 34) – Figura 1.2. Em outras palavras, estados ‘quase-nativos’ (denominados  $N^*$ ) podem ocorrer. Estes são caracterizados por pequenas variações na estrutura da proteína, mudanças locais, que apresentam pequena diferença energética em relação à estrutura nativa. São conformações que, apesar de apresentarem energia livre um pouco maior que a espécie nativa ( $N$ ), não ultrapassam a barreira energética para desenovelamento e não são caracterizadas como estados de transição ou intermediários. Ou seja, a princípio não há o desenovelamento da proteína, e sim alteração da dinâmica intrínseca da forma nativa, proporcionando a existência das formas  $N^*$ .



**Figura 1.2** – Possíveis mecanismos de formação de fibras amilóides de lisozima. Neste esquema a formação de fibras amilóides não envolve necessariamente espécies intermediárias (I) e desenoveladas (U); ou seja, nem sempre a barreira energética de enovelamento precisa ser ultrapassada para formação de fibras amilóides desta proteína. Ao contrário, envolve alterações na dinâmica da proteína, em uma forma quase-nativa ( $N^*$ ). Figura extraída da revisão de Chiti e Dobson (2009) (14).

Esta teoria foi baseada em estudos experimentais da lisozima humana, onde foi verificado que esta proteína pode acessar as conformações  $N^*$  e retornar à conformação  $N$ , com frequência 5 vezes maiores que a taxa de formação de espécies de transição (TS), intermediárias (I) e desenoveladas (U) – Figura 1.2. Foi observado também que tanto a lisozima selvagem, como mutantes amiloidogênicas e não amiloidogênicas, acessam as conformações  $N^*$ , porém com maior frequência

no caso das mutantes amiloidogênicas. Estas formas N\* foram propostas como possíveis causas de amiloidoses de lisozima, e parecem ser induzidas por flutuações térmicas, dentro das possibilidades fisiológicas e não condições físico-químicas extremas induzidas em laboratório (14, 24, 34).

Em resumo, foi verificado que, em geral, as vias de enovelamento/ amiloideogênese mostram etapas com barreiras energéticas consideráveis entre o estado nativo/ amilóide, em relação aos intermediários. No entanto, ainda existe a possibilidade de proteínas adquirirem uma conformação quase-nativa que pode formar fibras amilóides sem necessariamente passar por espécies intermediárias, ou seja, sem ultrapassar as barreiras energéticas desfavoráveis.

## ***1.2 Amiloidoses de transtirretina***

Como mencionado, a transtirretina (TTR) é uma das proteínas humanas envolvidas em doenças amilóides. Esta proteína é também o foco da presente tese. Sendo assim, este sub-capítulo tratará dos aspectos relacionados à estrutura, função, fisiologia e doenças amilóides nas quais a TTR está envolvida.

As amiloidoses de TTR podem ser causadas pela forma selvagem desta proteína e por variantes mutantes (18, 35). A amiloidose causada pela proteína selvagem é denominada amiloidose sistêmica senil (SSA), pois seus sintomas são geralmente apresentados por pacientes idosos. A deposição de fibras amilóides de TTR em pacientes com SSA foi identificada em uma grande variedade de órgãos e tecidos, porém ocorre em maior frequência no fígado, rins, coração e sistema nervoso periférico (35).

Mais de 100 mutantes pontuais da TTR já foram identificadas (18, 36-39) e muitas destas apresentam maior propensão à amiloidogênese que a forma selvagem (16, 40). A transmissão da mutação tem origem hereditária, seguindo herança autossômica dominante (41-45). Por estes motivos, as amiloidoses de TTR envolvendo variantes mutantes são denominadas amiloidoses familiares, sendo

---

ainda classificadas quanto ao órgão de deposição das fibras mais recorrente.

Assim, a cardiomiopatia amilóide familiar (FAC) é caracterizada por depósitos amiloidais de TTR principalmente no coração, causando arteriosclerose e doenças cardíacas em geral (46). Uma das mutantes de TTR mais freqüentes, envolvida em FAC, é a mutante V122I, presente em cerca de 4% da população afro-americana (38-39, 46-49).

Já a polineuropatia amilóide familiar (FAP) é caracterizada por depósitos fibrilares no sistema nervoso periférico, podendo também afetar o coração, bem como outros tecidos (43, 45). Os principais sintomas clínicos são perda de sensibilidade periférica, disfunção cardíaca e renal (43, 45). A variante mutante de TTR mais freqüente em casos de FAP é a mutante V30M. Esta variante é também a mais freqüente dentre das mutantes amiloidogênicas de TTR (43). A FAP V30M foi inicialmente identificada no norte de Portugal, na região de Povoia de Varzim, por Andrade em 1957, com prevalência de 1/1000 (revisado em (43)). Posteriormente foi também encontrada no Japão (50) e no norte da Suécia (51-52). Outra variante mutante da TTR envolvida em FAP bastante estudada é a L55P, uma das formas mais agressivas de TTR já identificadas (53).

Também foram reportadas amiloidoses de TTR seletivas para o sistema nervoso central (38-39, 54-55). Dentre estas as principais mutantes envolvidas são a A25T e D18G.

Dentre esta grande variedade de mutantes de TTR, são também encontradas variantes com menor propensão à amiloidogênese. Este é o caso da T119M e da R104H (56-60). Foi verificado, que indivíduos heterozigotos V30M/T119M não apresentavam o fenótipo de FAP, indicando uso potencial da T119M em terapias anti-amiloidogênese de TTR (57-59).

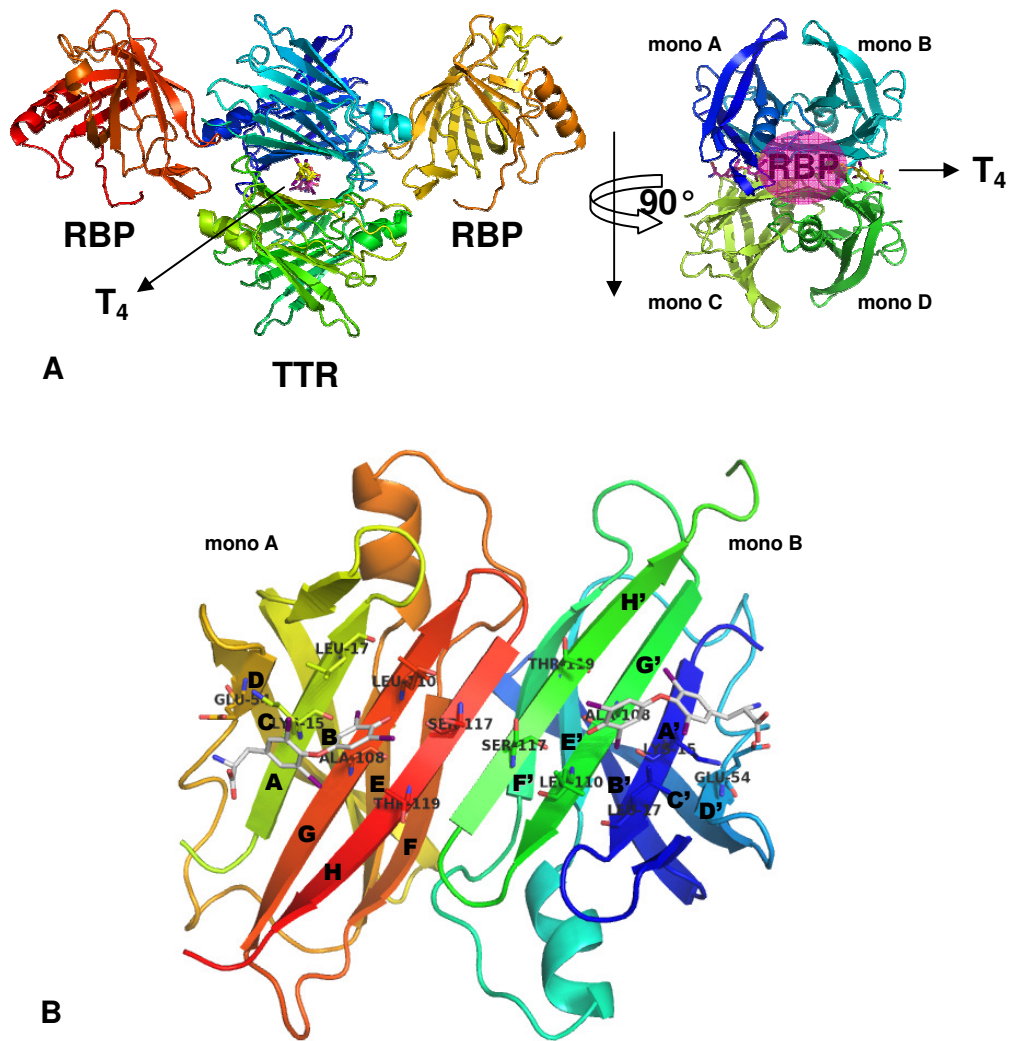
### 1.3 Transtirretina: estrutura e função

A TTR humana é uma proteína sintetizada no fígado, rins e plexo coróide, principalmente. É encontrada no plasma (0,18 mg/ mL ~3,0  $\mu$ M) e no fluido cérebro espinhal (0,015 mg/ mL ~0,3  $\mu$ M) (61). A vida média da TTR no organismo é 24 horas, sendo sua excreção realizada pelos rins (62-64)

Trata-se de uma proteína transportadora de tiroxina ( $T_4$ ) e do complexo RBP-retinol (*retinol binding protein* na forma holo) o que origina o seu nome “trans+tir+retina” (trans= transportadora; tir= tiroxina; retin= retinol). No plasma sanguíneo humano menos de 10% da TTR apresenta-se ligada ao  $T_4$ , pois o transporte deste hormônio é também realizado por duas outras proteínas plasmáticas, a albumina e a TBG (*thyroxine binding globulin*) (65). No entanto, a TTR é a única transportadora de  $T_4$  no fluido cérebro-espinhal (35, 61).

A estrutura nativa da TTR é composta por 4 monômeros idênticos – caracterizando um homotetrâmero – formados por 127 resíduos de aminoácido cada. Estes monômeros são denominados ABCD, apresentam massa molecular de ~14 kDa e  $pI$  ~5.4 (66-67). Cada monômero é organizado em 2 folhas-beta, compostas por 4 fitas-beta cada (fitas *DAGH* = folha-beta interna e fitas *CBEF* = folha-beta externa) e conectadas por uma pequena hélice-alfa e *loops* – Figura 1.3. Nas interfaces formadas pelas folhas-beta internas de cada dímero AC e BD formam-se dois sítios de ligação ao hormônio  $T_4$ . Ortogonalmente são encontrados os sítios de ligação ao complexo RBP-retinol – Figura 1.3.

A estrutura cristalográfica da TTR foi inicialmente descrita por Blake e colaboradores em 1978 (67). Outras estruturas da TTR selvagem (wt) e de variantes mutantes vêm sendo estudadas (66, 68-70). Estas foram determinadas, em sua grande maioria, no grupo espacial  $P2_12_12$ , sendo a unidade assimétrica composta por um dímero (AB), que carrega uma das faces do sítio de ligação ao  $T_4$  – Figura 1.3B. O tetrâmero é gerado por aplicação de simetria de ordem 2 ao longo do eixo cristalográfico Z, o qual atravessa os sítios de ligação ao  $T_4$  (horizontal no painel direito da Figura 1.3A).



**Figura 1.3** – Estrutura nativa da proteína transportadora transtirretina (TTR). **(A)** Homotetrâmero da TTR formado pelos monômeros A, B, C e D, ligando o complexo RBP-retinol e o hormônio tiroxina ( $T_4$ ). Os sítios de ligação ao complexo RBP-retinol e à tiroxina ( $T_4$ ) são indicados. As estruturas protéicas estão representadas em modelo de *cartoon*, de acordo com a estrutura secundária – hélice-alfa ou fita-beta. Os monômeros da TTR estão desenhados em tons de azul (mono A, mono B) e verde (mono C, mono D) e as unidades da proteína RBP em tons de vermelho. Os átomos de carbono do ligante tiroxina ( $T_4$ ) estão representados em bastões lilás, no canal AC e amarelos, no canal BD. **(B)** Dímero cristalográfico AB com as fitas-beta nomeadas e coloridas individualmente (folha-beta interna = fitas *DAGH* e folha-beta externa = fitas *CBEF*). O ligante tiroxina é mostrado em bastões cinza claro e os principais resíduos da TTR envolvidos em contatos com o hormônio também são mostrados em bastões e estão nomeados. Os átomos de oxigênio, iodo e nitrogênio estão representados nas cores vermelho, roxo e azul, respectivamente. As coordenadas atômicas utilizadas para a elaboração desta figura foram extraídas do *Protein Data Bank* (PDB): PDB ID: 1RLB (TTR:RBP) e 2ROX (TTR: $T_4$ ). As imagens foram geradas com o programa Pymol (De Lano Scientific).



## **1.4 Vias de formação de fibras amilóides de transtirretina**

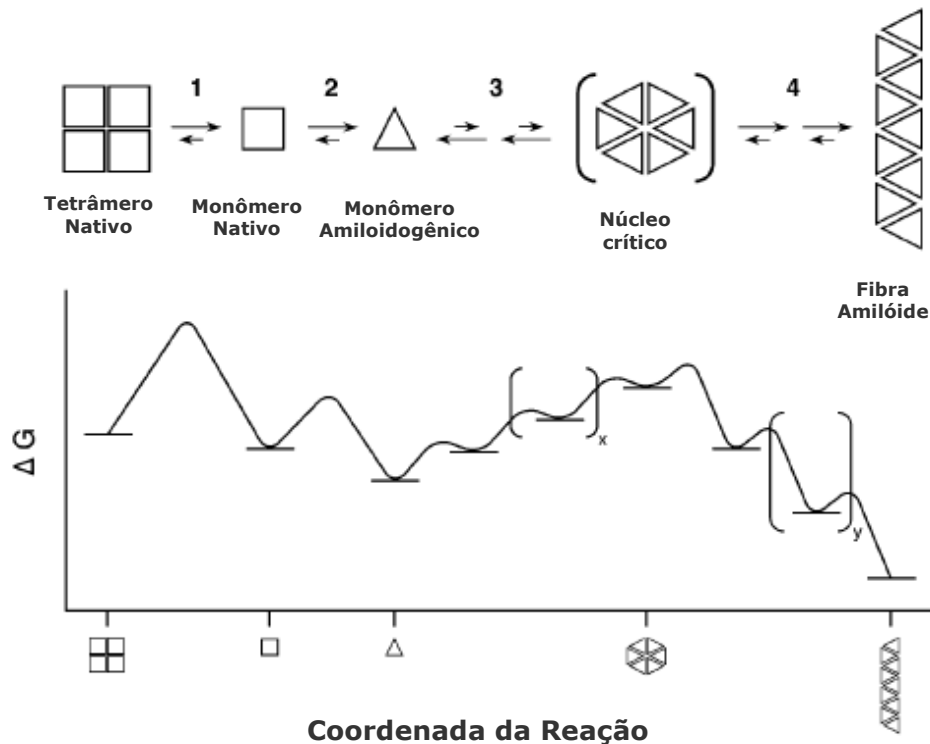
A via completa que leva à formação das fibras amilóides de TTR ainda não foi completamente elucidada. No entanto, algumas teorias foram delineadas com base em dados experimentais e computacionais reportados (2, 4, 5, 71-74). Algumas destas serão apresentadas a seguir.

### *1.4.1 Mecanismo geral: dissociação do tetrâmero*

Evidências experimentais e teóricas vêm demonstrando que em condições adversas, como baixo pH (4) e/ou alta pressão (25) o tetrâmero de TTR pode dissociar em monômeros (5, 75-78) ou dímeros (79). Estas unidades não tetraméricas de TTR podem sofrer um pequeno rearranjo estrutural (7, 73, 74, 80, 81), facilitando a formação de fibras amilóides ou agregados amorfos. Este processo também ocorre, porém mais lentamente, em condições fisiológicas (17). Além disso, é maximizado na presença de algumas mutações como a V30M e L55P e minimizado em presença de outras, como a T119M (25, 58, 59, 82, 83).

Um mecanismo geral bastante aceito, proposto pelo grupo do Dr. J. Kelly do *Scripps Research Institute* (La Jolla/ CA, USA), envolve a desestabilização do tetrâmero da TTR seguida de desenovelamento parcial dos monômeros (72, 84) – Figura 1.4. Este mecanismo propõe degraus energéticos que governam a via de formação de agregados de TTR, similar ao encontrado para outras proteínas amilóides e mostrado na Figura 1.1. Porém, no modelo descrito para a TTR, pode-se observar que a dissociação do tetrâmero em monômeros é a etapa com maior barreira energética, seguida pelo desenovelamento parcial do monômero nativo Figura 1.4. Estas são, então, as etapas limitantes para a ocorrência da via de agregação da TTR, a qual, a partir da formação de um núcleo crítico, formado pelos

monômeros desenovelados, prossegue de maneira energeticamente favorável (72, 76, 84).



**Figura 1.4** – Via de agregação da TTR relacionado a energia livre de Gibbs em cada etapa, assim como proposto por Hurshman e colaboradores em 2004 (84). A dissociação do homotetrâmero da TTR é a etapa de maior barreira energética, seguido pelo desenovelamento parcial dos monômeros, rápida nucleação e formação de agregados/ amilóides.

#### 1.4.2 Possíveis alterações estruturais dos monômeros/ dímeros de TTR dissociados

Os monômeros da TTR, assim como das fibras amilóides em geral, são formados por estruturas ricas em folhas-beta. Observações experimentais da organização das fibras amilóides de TTR indicam que estas fibras são formadas por novos contatos inter-subunidades. No entanto, os detalhes das alterações conformacionais, bem como das novas interações formadas no processo de fibrilação ainda não são muito bem compreendidos (revisado por (73)).

Sabe-se que estruturas formadas por folhas-beta apresentam pelo menos

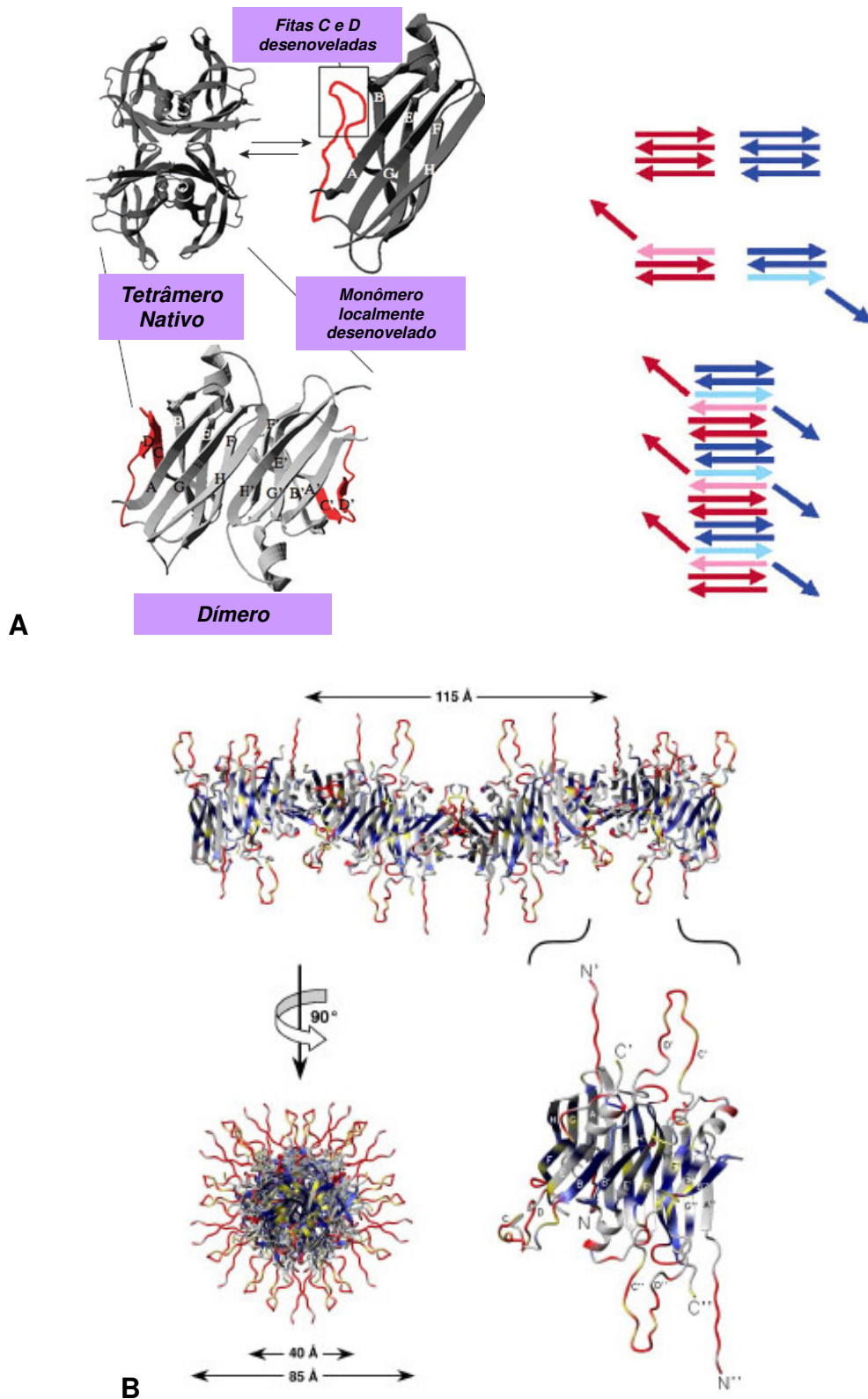
duas regiões críticas, uma em cada extremidade da folha. Estas são representadas por faces suscetíveis a interações inter-moleculares e conseqüente formação de agregados. Algumas estratégias moleculares são observadas em estruturas com presença de folhas-beta, visando proteger estas extremidades com grande potencial de agregação. As estratégias incluem: 1) presença de fitas curtas – com poucos resíduos e conseqüentemente poucos grupos amino e carbonila “disponíveis”; 2) regiões de *loop* ou longas cadeias laterais cobrindo as extremidades da folha e 3) dobras de prolina – limitando a formação de novos contatos inter-moleculares (85).

No monômero de TTR, as extremidades expostas são representadas pelas fitas *C* e *D* e, no lado oposto, pelas fitas *F* e *H*. Estas últimas encontram-se protegidas no dímero de TTR (dímero AB), sendo esta a interface de dimerização. Por outro lado, as fitas *C* e *D* são cobertas por longos *loops* (*loops* AB, CD e DE). Além disto, a fita *D* é curta e a fita *C* apresenta uma torção provocada por um resíduo de prolina posicionado na metade do comprimento da fita.

Com base nessas observações, algumas evidências teóricas e experimentais vêm propondo mecanismos pelos quais estas regiões são expostas e como as mesmas estariam envolvidas na formação das fibras amilóides de TTR. Algumas dessas teorias serão apresentadas a seguir.

#### *Região externa, exposta do tetrâmero de TTR – fitas CD*

Olofsson e colaboradores (74) analisaram as regiões expostas/ protegidas ao solvente em tetrâmeros nativos e em fibras amilóides de TTR. A partir dos resultados obtidos em seu estudo, propuseram um modelo estrutural da fibra amilóide de TTR, onde as fitas internas da proteína estariam protegidas e as fitas *C* e *D* expostas. Três mecanismos principais, que levam a desestabilização das fitas *C* e *D* e conseqüente união das subunidades alteradas, formando as fibras de TTR, foram sugeridos por alguns grupos e apresentados em conjunto na revisão de Laidman e colaboradores (73). Estes mecanismos incluem *domain swapping*, deslocamento (80, 86) e deslizamento (87) das fitas-beta externas. Os dois últimos são os mais aceitos atualmente. A Figura 1.5 ilustra o mecanismo de deslocamento de fita-beta e um modelo estrutural proposto para a fibra amilóide de TTR.



**Figura 1.5** – Modelo de deslocamento da fita beta externa da TTR e agregação para formação das fibras amilóides, através de novos contatos inter-subunidades. **(A)** Modelo proposto por Serag e colaboradores (80), onde o deslocamento da fita externa promove novos contatos inter-subunidades (setas azul clara e rosa). **(B)** Modelo estrutural da fibra amilóide da TTR, construído a partir da observação de regiões protegidas e expostas ao solvente no tetramero e na fibra amilóide de TTR – variante Y114C (74).

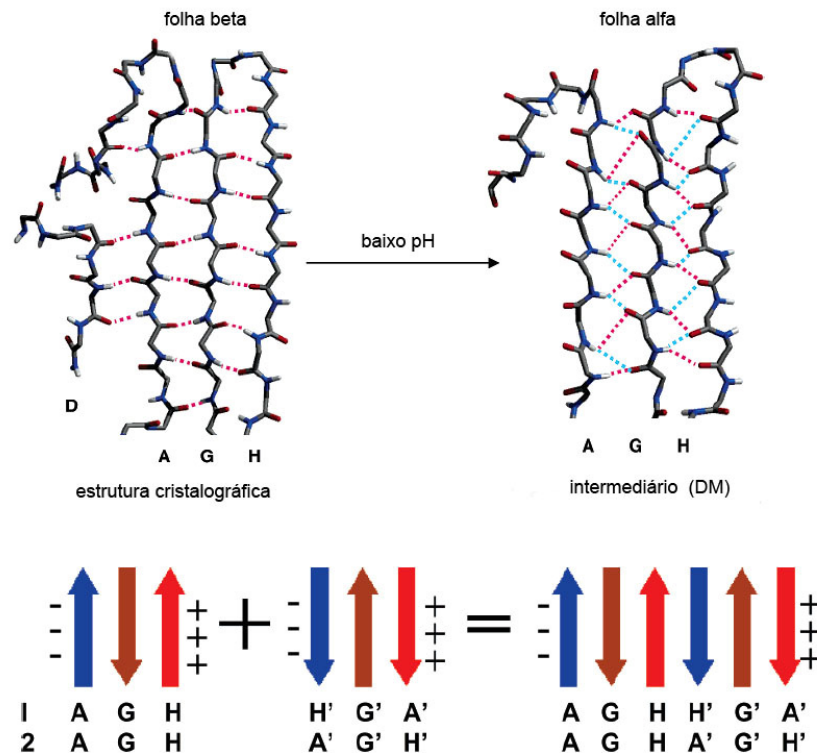
Na estrutura da fibra de TTR, proposta por Olofsson e colaboradores (74), pode-se observar o deslocamento das fitas *C* e *D* do sanduíche-beta, as quais apresentam-se desestruturadas e expostas ao solvente. Neste modelo, as fitas internas *AGH* e *BEF* estariam “protegidas”, formando o corpo da fibra amilóide de TTR (Figura 1.5B).

Vale comentar que, se este modelo for mesmo válido, dímeros e não necessariamente monômeros estariam envolvidos. Apesar de bastante convincente, este modelo ainda não é capaz de explicar diversos resultados experimentais observados na via de formação de fibras amilóides e intermediários amiloidogênicos de TTR.

É muito freqüente, a identificação de monômeros em vias de agregação da TTR, seja em condições fisiológicas, em experimentos com a TTRwt ou mutantes, ou por uso de agentes perturbadores como baixo pH (4-5, 38, 78, 88). Ainda, utilizando alta pressão como agente perturbador, o grupo da Profa. Dra. Débora Foguel mostrou que tetrâmeros alterados podem ser o material de partida para a formação de fibras amilóides (26, 89), corroborando com as dimensões das fibras amilóides de TTR, estimados por difração destas fibras (90).

#### *Conversão de folhas-beta em folhas-alfa*

Outros estudos, utilizando simulações de dinâmica molecular, sugerem que a folha-beta interna da TTR, formada pelas fitas *AGH*, podem sofrer alterações conformacionais, ocasionando a conversão de fita-beta em fita-alfa em monômeros da TTR (71, 81, 91-92), o que favoreceria a formação das fibras amilóides desta proteína – Figura 1.6.



**Figura 1.6** – Esquema estrutural da conversão da folha-beta *AGH* da TTR em folha-alfa. Este esquema foi proposto a partir dos resultados de simulações de dinâmica molecular em baixo pH. Pode-se observar a formação de ligações de hidrogênio bifurcadas (71) – painel superior. Um esquema da agregação e provável formação de fibras amilóides a partir destes intermediários é apresentado no painel inferior (81). As fitas-beta da TTR estão nomeadas (*AGH*).

Além destes resultados, obtidos a partir de ensaios computacionais de dinâmica molecular, algumas evidências experimentais suportam a teoria da conversão de folhas-beta em folhas-alfa no processo de amiloidogênese. Entre outras evidências, destaca-se a descoberta de um anticorpo capaz de detectar intermediários amiloidogênicos de diferentes proteínas formadoras de fibras amilóides, indicando um epítipo comum presente em intermediários amiloidogênicos (81, 93). No entanto, esta observação não descarta a possibilidade do anticorpo reconhecer folhas-beta, e esse ser o epítipo comum das fibras amilóides. Assim este modelo é, ainda, apenas uma teoria interessante que precisa ser comprovada com dados experimentais mais consistentes.

## ***1.5 Estratégias para o tratamento de amiloidoses de TTR***

Como mostrado, as variadas teorias das vias de formação de fibras amilóides da TTR indicam que existe a possibilidade de mais de um mecanismo ocorrer. Estes podem ser mutação ou agente perturbador (ex.: pressão, pH) dependentes. No entanto, a grande maioria dos mecanismos propostos ainda envolve a dissociação do tetrâmero, seja em dímeros ou monômeros, sendo esta a principal barreira energética da via. Desta forma, o modelo geral apresentado na Figura 1.4 ainda seria válido. Baseado nesse princípio, algumas estratégias para o tratamento de amiloidoses de TTR foram desenvolvidas, e serão comentadas a seguir.

### *1.5.1 Transplante de fígado*

Como variantes mutantes da TTR, muitas vezes, geram a desestabilização do homotetrâmero, estratégias para minimizar estes efeitos foram desenvolvidas, com foco do tratamento de amiloidoses familiares de TTR. Atualmente, a FAP V30M é efetivamente tratada por transplante de fígado (94-97). Esta estratégia proporciona a substituição do alelo V30M pelo alelo selvagem (wt) no principal órgão secretor da TTR no plasma - o fígado (94-97).

No entanto, o transplante de fígado não é efetivo contra amiloidoses seletivas para o sistema nervoso central, já que nestes tecidos a TTR é sintetizada no plexo coróide (39). Além disto, este procedimento não é uma opção para o tratamento da SSA, a qual resulta em depósitos de TTR do tipo selvagem.

Sobretudo, o transplante é um procedimento intrusivo, que requer um doador específico e a necessidade de imunossupressão, não sendo, portanto, a melhor opção para o tratamento destas enfermidades. Desta forma, é de interesse geral o desenvolvimento de outras estratégias terapêuticas contra as amiloidoses de TTR.

### *1.5.2 Estabilização dos tetrâmeros da TTR com monômeros mutantes mais estáveis*

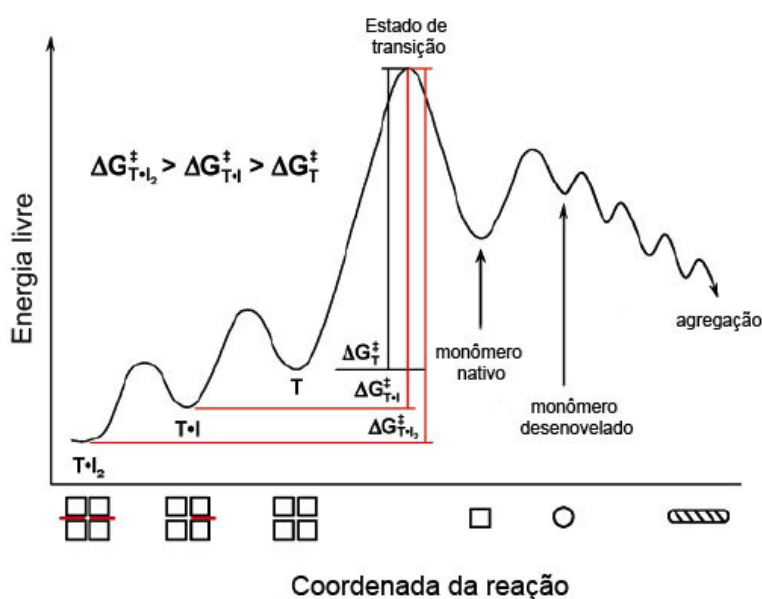
Uma outra estratégia, proposta mais recentemente e ainda em estágios laboratoriais de testes, é a utilização de monômeros de mutantes de TTR mais estáveis, como os mutantes T119M (58, 59, 76). Estes monômeros estáveis podem ser isolados e incorporados aos tetrâmeros amiloidogênicos da TTR, revertendo sua propensão à dissociação e agregação (59).

### *1.5.3 Ligação de pequenas moléculas ao canal de $T_4$ e estabilização do tetrâmero da TTR*

No entanto, nas últimas duas décadas, diversos estudos vêm reportando o uso de pequenas moléculas como agentes estabilizadores do tetrâmero da TTR (revisado em (72, 76)). Esta estratégia mostra-se bastante promissora e viabilizaria fármaco-terapias de administração oral para o tratamento dessas patologias.

Na Figura 1.3 é mostrado que o canal de ligação ao hormônio  $T_4$  (ligante natural da TTR) é localizado na interface dímero/ tetrâmero. Foi reportado que uma grande variedade de pequenas moléculas podem se ligar a este sítio do  $T_4$ , sendo que esta interação fortalece os contatos entre as subunidades do homotetrâmero da TTR, aumentando sua estabilidade (77, 98-103). O aumento da estabilidade do tetrâmero de TTR, conferido pela ligação de pequenas moléculas aos canais de ligação ao  $T_4$ , é mostrado em um diagrama esquemático na Figura 1.7.





**Figura 1.7** – Aumento de estabilidade do homotetrâmero da TTR conferido pela ligação de pequenas moléculas aos canais de hormônio. A via de agregação da TTR relacionando a energia livre de Gibbs em cada etapa é mostrada. *T* = tetrâmero de TTR sem ligante (apo); *T.l* = tetrâmero com 1 ligante; *T.l<sub>2</sub>* = tetrâmero com 2 ligantes. Figura adaptada da Johnson e colaboradores (72).

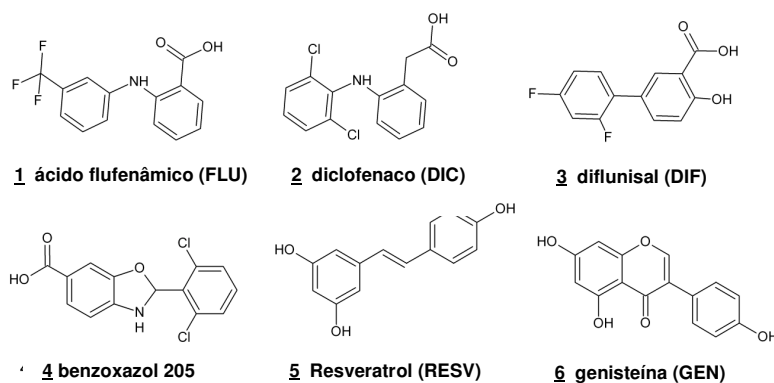
Neste sistema, a ligação de pequenas moléculas ao canal de ligação a hormônio da TTR aumenta o degrau energético para o processo de dissociação, mostrado pelas linhas vermelhas na Figura 1.7. O aumento desta barreira energética resulta, então, em maior estabilidade da forma tetramérica nativa da TTR, evitando, em última instância, a formação das fibras amilóides. Desta forma, a manifestação dos efeitos fisiológicos adversos provocados pela deposição das fibras e/ou intermediários amiloidogênicos da TTR seria minimizada.

Dado o exposto, a identificação de pequenas moléculas capazes de se ligarem aos canais de hormônio da TTR torna-se assunto importante para o desenvolvimento de fármaco-terapias para estas amiloidoses. O primeiro inibidor da agregação da TTR reportado foi o próprio ligante natural, o  $T_4$ , e o 2,4,6 triiodophenol (104). Mais tarde, antiinflamatórios não esteroidais (NSAIDs), como o ácido flufenâmico, o diclofenaco, o flurbiprofeno e o diflunisal foram também identificados como potenciais inibidores (105-107). Além destes, diversas classes de pequenas moléculas contendo um esqueleto bifenil, dibenzofurano, estilbeno e

flavona também foram descritas como potenciais classes de inibidores da agregação da TTR (77, 101, 103, 105-108).

O ligante natural da TTR, o  $T_4$ , não pode ser utilizado como um inibidor da formação das fibras de TTR, *in vivo*, devido à sua atividade hormonal. Outros inibidores reportados exibem ligação a outras proteínas plasmáticas ou provocam efeitos colaterais indesejáveis, limitando sua aplicação em fármaco-terapias de uso prolongado. Assim, a identificação de moléculas com potencial de inibição da agregação da TTR que apresentem mínimos efeitos colaterais por uso prolongado é de interesse considerável para a pesquisa farmacêutica.

Desta forma, muitas pequenas moléculas, de estrutura diversa, vêm sendo desenhadas e testadas quanto à capacidade de ligação à TTR e inibição da formação das fibras amilóides desta proteína (72, 76, 101, 103, 109). Alguns inibidores representativos são mostrados na Figura 1.8.



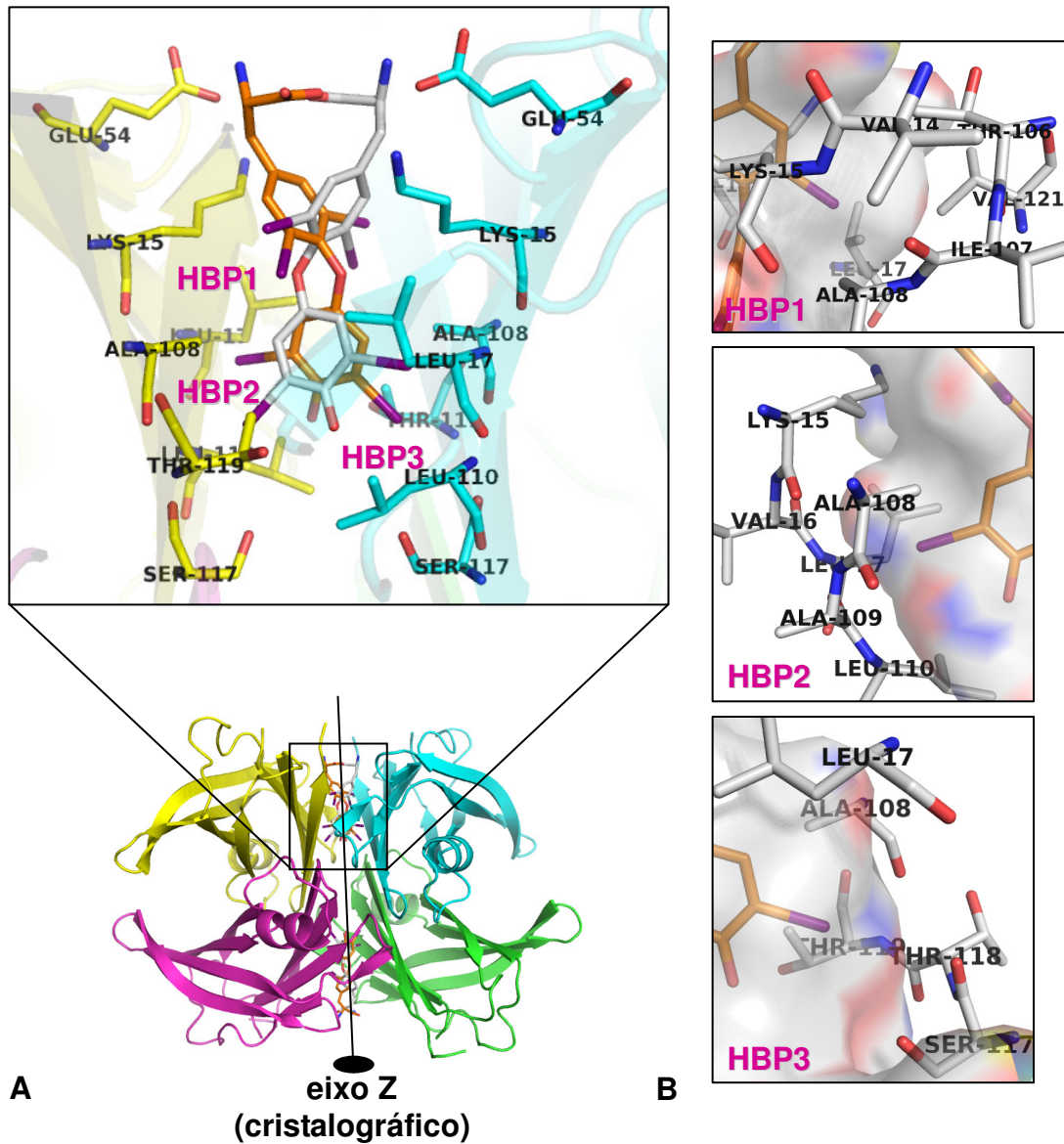
**Figura 1.8** – Alguns inibidores da formação de fibras amilóides de TTR reportados. Membros representativos de anti-inflamatórios não esteroidais (NSAIDs): 1-3; benzoxazóis: 4 e compostos naturais: 5-6.

Para maiores esclarecimentos, a caracterização do sítio de ligação ao  $T_4$  da TTR, bem como a descrição da interação do  $T_4$  e de alguns dos inibidores da agregação da TTR reportados com este sítio será realizada a seguir.

#### *Sítio de ligação a hormônio da TTR*

Como já mencionado, dois sítios de ligação ao hormônio  $T_4$  são encontrados no tetrâmero da TTR. Estes são localizados na interface entre dois dímeros (dímero

cristalográfico AB e sua cópia gerada por simetria CD). Um desses sítios é mostrado em destaque na Figura 1.9, ligando o T<sub>4</sub>.



**Figura 1.9** – Sítio de ligação a hormônio da TTR. **(A)** Tetrâmero da TTRwt ligando tiroxina, T<sub>4</sub> (PDB ID: 2ROX) com detalhe do sítio de ligação (painel superior). Os principais resíduos da TTRwt que contatam o T<sub>4</sub> são mostrados em bastões, coloridos de acordo com o monômero da TTR ao qual pertencem, e estão nomeados. O T<sub>4</sub> é mostrado em bastões laranja e sua cópia simétrica em bastões cinza claro. Os bolsões de acomodação dos iodios do T<sub>4</sub> são identificados (HBP1, HBP2 e HBP3). **(B)** Detalhamento dos HBPs encontrados no sítio da TTRwt. Os resíduos de aminoácido da proteína que delimitam estes bolsões são mostrados em bastões e nomeados. Os átomos de oxigênio, nitrogênio e iodo estão coloridos em vermelho, azul e roxo, respectivamente. As figuras foram geradas com o programa Pymol (De Lano Scientific LLC).

Três pequenas depressões podem ser identificadas no sítio, onde, encontram-

se acomodados os substituintes 3,5 e 3',5' iodo do T<sub>4</sub>. Assim, esses bolsões foram denominados HBP1, HBP2 e HBP3 (do inglês: *halogen binding pocket 1, 2 e 3*). O HBP1 é delimitado pelos resíduos da TTR Lys15, Leu17, Thr106, Ala108 e Val121, na entrada do sítio. O HBP2 por Lys15, Val16, Leu17, Ala108, Ala109 e Leu110, na região central, e o HBP3 por Leu17, Ala108, Ala109, Leu110, Ser117, Thr118 e Thr119, mais ao fundo do canal – Figura 1.9.

Duas cópias simétricas do ligante T<sub>4</sub> são encontradas em cada sítio de ligação. Estas são geradas por operação de simetria de ordem 2 no eixo cristalográfico Z, o qual atravessa o tetrâmero da TTR, passando exatamente nos sítios de ligação (vertical na Figura 1.9A, painel inferior). Essa é uma particularidade das estruturas da TTR cristalizadas no grupo espacial P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2, que às vezes limita a interpretação da interação de ligantes com estes sítios da TTR.

A cadeia lateral do T<sub>4</sub> é posicionada na entrada do sítio de ligação, interagindo com Lys15 e Glu54. O anel substituído com essa cadeia lateral (denominado anel interno devido à sua posição, bem como de análogos estruturais, no sítio do receptor de hormônio tireoidiano TR (110)) localiza-se na entrada do sítio da TTR, posicionando os 3,5 iodios nos HBP1. Já o anel externo (4'OH, 3',5'I substituído) é localizado nas regiões mais internas do sítio de ligação, com os 3',5'I posicionados no HBP2 e HBP3 da TTR, formando interações de halogênio e contatos de van der Waals com os resíduos da TTR localizados nesses bolsões.

O T<sub>4</sub> interage com os dois sítios da TTRwt seguindo um mecanismo de cooperatividade negativa entre estes sítios, com as constantes de dissociação diferindo em três ordens de magnitude ( $K_{d1} \sim 1$  nM;  $K_{d2} \sim 1$  μM) (111, 112). Vale comentar que, devido às similaridades entre os dois sítios da TTRwt, foi também verificado que os ligantes desta proteína podem ocupar os sítios de ligação seguindo mecanismos de cooperatividade positiva ou não cooperativo (revisado em (72)).

### *Interação da TTR com inibidores*

Como comentado, uma grande variedade de pequenas moléculas apresentam capacidade de ligação ao sítio do T<sub>4</sub> da TTR promovendo aumento da estabilidade da forma tetramérica desta proteína. No entanto, o sítio da TTR é bastante promíscuo, ligando uma grande variedade de químicos, e mostrando modos de

interação distintos. Os principais modos de interação de inibidores com a TTR, bem como os principais resíduos do sítio envolvidos em contatos com estes ligantes serão brevemente apresentados a seguir.

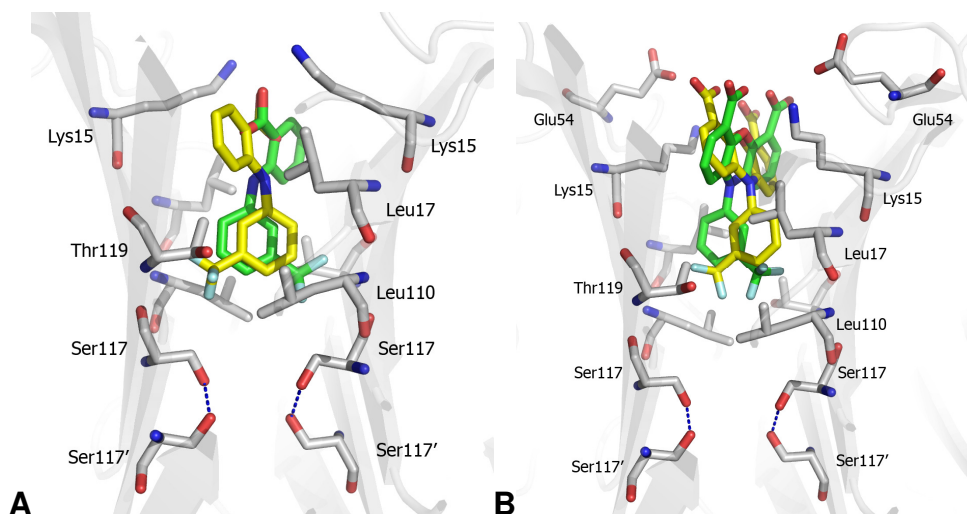
O ácido flufenâmico (FLU) e o diflunisal (DIF) são bons exemplos de inibidores da agregação da TTR. Estes são conhecidos NSAIDs, moléculas já aprovadas pela agência americana FDA (*Food and Drug Administration*) e disponíveis no mercado farmacêutico. Mostraram-se eficazes inibidores da agregação da TTR (~ 95% de inibição da agregação da TTR, em 2 vezes de excesso molar do inibidor em relação à proteína), com alta afinidade pelo sítio de T<sub>4</sub> (FLU K<sub>d1</sub>= 30 nM; K<sub>d2</sub>= 225 nM; DIF K<sub>d1</sub>= 75 nM; K<sub>d2</sub>= 1,11 μM) (101, 102, 106, 107, 109). Porém, estes NSAIDs são também inibidores da atividade das enzimas cicloxigenases (COXs), alvo biológico para o qual foram desenvolvidos. Assim, o uso prolongado destes medicamentos resulta em efeitos colaterais para o trato gastrointestinal, limitando seu uso como fármaco-terapias para amiloidoses de TTR.

No entanto, baseado na estrutura destes NSAIDs, alguns projetos de desenvolvimento racional de fármacos foram conduzidos, visando novos inibidores da agregação da TTR, com efeitos colaterais minimizados (99, 101-103, 113). Um inibidor “ideal” deve apresentar alta afinidade pela TTR e seletividade por proteínas plasmáticas, bem como mínima inibição de COX e ligação ao receptor de hormônio tireoidiano (TR) (99, 101-103, 113).

As primeiras otimizações de inibidores da agregação da TTR foram fundamentadas em observações da estrutura cristalográfica da TTRwt ligando FLU (101, 105, 109).

A estrutura do complexo cristalográfico TTRwt:FLU mostrou que este inibidor liga ao sítio do T<sub>4</sub> formando novos contatos inter-subunidades, gerando aumento da estabilidade da forma tetramérica da TTR. FLU acomoda seu anel substituído com o grupo ácido no HBP1 do sítio da TTR e este último forma contatos polares com a cadeia lateral de Lys15. O anel substituído com o trifluorometil acomoda-se na região central da cavidade e é estabilizado por interações hidrofóbicas com Leu17 e Leu110, principalmente. O CF<sub>3</sub> acomoda-se no HBP3 interagindo com a porção apolar das cadeias laterais de Thr119 e Ser117. Esta última é rotacionada em direção ao sítio adjacente do tetrâmero de TTR. Assim, a cadeia lateral da Ser117

rotacionada pode contatar a cadeia lateral de outra Ser117 no sítio adjacente, formando um novo contato inter-subunidades no tetrâmero – Figura 1.10A.



**Figura 1.10** – Sítio de ligação da TTRwt ligando **(A)** ácido flufenâmico (FLU) (PDB ID: 1BM7) e **(B)** PHENOX (PDB ID: 1DVY). Os principais resíduos da TTRwt envolvidos em contatos com estes ligantes são mostrados em bastões e estão nomeados. As moléculas do ligante são mostradas em bastões verdes e suas cópias simétricas em amarelo. A conformação de Ser117 induzida pela interação destes inibidores nos dois sítios de ligação e a interação polar formada entre elas é mostrada em linhas pontilhadas. Átomos de oxigênio, nitrogênio e fluor estão coloridos em vermelho, azul e ciano, respectivamente. As figuras foram geradas com o programa Pymol (De Lano Scientific).

Baseado nas interações formadas por FLU com a TTR, bem como na molécula de FLU por si, foram sintetizadas séries de ligantes contendo modificações no substituinte trifluorometil e carboxilato, diferentes tipos de conexões e número de anéis aromáticos (106, 107). A análise desses potenciais inibidores mostrou que o grupo carboxílico é importante e que pelo menos dois anéis aromáticos devem estar presentes, mostrando a significância de contatos polares com Lys15 na entrada do sítio e dos contatos hidrofóbicos no sítio como um todo (106).

Ainda, analisando a posição da molécula de FLU na entrada do sítio da TTR e a cópia simétrica parcialmente sobreposta, levantou-se a hipótese de que moléculas contendo anéis tricíclicos poderiam ser bons ligantes da TTR. Assim foram propostas moléculas contendo 3 anéis fundidos, como dibenzofuranos, phenoxazinas e xantanas (103).

Um inibidor eficaz ( ~ 95 % de inibição da agregação em 1:2) e de alta afinidade ( $K_{d1} = 78$  nM;  $K_{d2} = 235$  nM) foi identificado na série de moléculas com anéis tricíclicos: o *meta*-trifluorometil-N-aril fenoxazina (PHENOX). A estrutura do

complexo TTRwt:PHENOX foi determinada (PDB ID: 1DVY (101)) e o sítio de ligação da TTR ligando PHENOX é mostrado na Figura 1.10B

O sistema de anéis phenoxizina do PHENOX ocupa a porção externa do sítio de ligação da TTR conectando dois monômeros da proteína. Estes anéis são acomodados nos HBP1 e HBP1' na entrada do sítio, entre as cadeias laterais de duas Lys15 adjacentes. Além disto, interações polares entre o grupo ácido carboxílico e o grupo amina ou carboxilato de Lys15 e de Glu54, respectivamente, também podem ser formadas. Vale comentar que PHENOX foi o único composto sintético, descrito até o momento, que interage com Glu54.

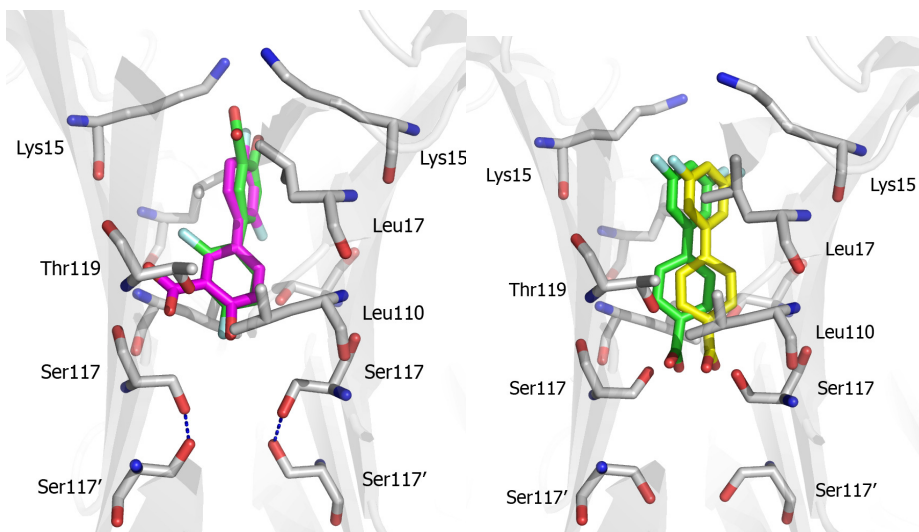
O anel substituído com um trifluorometil em posição *meta* ocupa a região central do sítio, com o CF3 posicionado mais ao fundo, entre o HBP2 e HBP3. Apesar do CF3 não ser acomodado no HBP3, assim como FLU, ainda é capaz de induzir as alterações conformacionais de Ser117, formando um novo contato inter-subunidade.

Apesar das interações do PHENOX e do FLU com a TTRwt serem similares, a entropia de ligação do PHENOX é favorável, enquanto a do FLU é desfavorável, assim como mostrado por análises de calorimetria por titulação isotérmica (ITC) (101). Esta observação foi inferida à maior flexibilidade da molécula do FLU em relação à do PHENOX, o qual contém um sistema rígido e volumoso de anéis. A ligação de pequenas moléculas a proteínas pode resultar em diminuição da liberdade conformacional do ligante, sendo este um dos principais fatores que influenciam negativamente a entropia da ligação (114). Assim, moléculas mais rígidas, como o PHENOX, apresentam menor liberdade conformacional, minimizando os efeitos entrópicos negativos da ligação. Além disto, a alocação de grupos hidrofóbicos volumosos também contribuem para a liberação de moléculas de água, favorecendo a entropia de ligação (114), também observado para o PHENOX (101).

Outro NSAID, o diflunisal (DIF), também mostra alta potência e eficácia de inibição da agregação da TTR *in vitro*, apresentando ~ 95% de inibição da agregação da TTRwt em 2 vezes de excesso de ligante e  $K_{d1} = 75$  nM;  $K_{d2} = 1,11$   $\mu$ M (109, 115). Além disto, DIF mostrou bastante seletividade para ligação à TTR frente a outras proteínas plasmáticas (116). A estrutura cristalográfica TTRwt:DIF foi

determinada (PDB ID: 3D2T (109)) e o sítio de ligação é mostrado na Figura 1.11A.

DIF pôde ser modelado no sítio da TTR em dois modos distintos: um com seu grupo ácido salicílico voltado para a entrada do sítio (modo *forward* – em verde na Figura 1.11A), e outro com esse grupo ocupando o fundo do canal (modo reverso – em magenta na Figura 1.11A) (109). O modo *forward* otimiza as interações hidrofóbicas de DIF com o fundo a região central do canal; porém, mesmo com o grupo ácido ocupando a região externa do sítio, as interações polares com Lys15, na entrada, são prejudicadas. Já no modo reverso, DIF pode formar interações polares com Thr119 e Ala108 (cadeia principal), e seus anéis são estabilizados por interações hidrofóbicas com Leu110 e Leu17, principalmente. Apenas uma conformação de Ser117, voltada em direção ao sítio adjacente, pôde ser modelada (109), sugerindo que os dois modos de ligação de DIF à TTR induzem a rotação dessa cadeia lateral, formando novos contatos inter-subunidades.



**Figura 1.11** – Sítio de ligação da TTRwt ligando **(A)** diflunisal (DIF) (PDB ID: 3D2T) e **(B)** seu análogo 3',5'-difluorobifenil-4-ácido carboxílico (PDB ID: 2B9A). Diflunisal é encontrado ligando a TTRwt em modo reverso (magenta) e modo *forward* (verde), enquanto seu análogo estrutural somente em modo reverso. Os principais resíduos da TTRwt envolvidos em contatos com estes ligantes são mostrados em bastões e estão nomeados. A conformação de Ser117 induzida pela interação de DIF é mostrada nos dois sítios de ligação e a interação polar formada entre elas é mostrada em linhas pontilhadas. Átomos de oxigênio, nitrogênio e fluor são mostrados em vermelho, azul e ciano, respectivamente. As figuras foram geradas com o programa Pymol (De Lano Scientific).

A partir da observação da estrutura do complexo TTRwt:DIF derivados de DIF



foram sintetizados, variando-se a posição dos átomos de flúor, bem como substituição da porção ácido salicílico por um anel com um ácido carboxílico em posição *para*. O análogo estrutural contendo 3',5' flúor e o anel 4,COOH mostrou inibição da agregação da TTR *in vitro* (~96% em 1:2) e alta afinidade à TTR ( $Kd_1 = 9$  nM;  $Kd_2 = 1,1$   $\mu$ M). A estrutura cristalográfica da TTRwt em complexo com esse análogo estrutural de DIF foi determinada (PDB ID: 2B9A (109)) – Figura 1.11B, mostrando que este inibidor liga somente em modo reverso.

Neste modo de ligação, os dois anéis formam interações hidrofóbicas com a região central do sítio da TTR, enquanto os átomos de flúor interagem simultaneamente com os dois HBP1 na entrada do sítio. O carboxilato é posicionado mais ao fundo do sítio, formando interações polares com Ser117 nas duas faces do canal. Assim o análogo estrutural de DIF forma fortes interações com o fundo do sítio e um maior número de contatos hidrofóbicos que DIF, aumentando sua afinidade pelo sítio da TTR, e seletividade frente a outras proteínas plasmáticas (109). Esta molécula é um forte candidato a fármaco e encontra-se em fase de testes clínicos.

Em resumo, os estudos estruturais com NSAIDs e análogos mostram que a formação de contatos polares com resíduos na entrada (Lys15 e Gu54) e fundo dos sítios (Ser117 e Thr119) da TTR mostram influências positivas para a afinidade. Além disto, contatos hidrofóbicos com estes resíduos podem também contribuir para a afinidade. Este é o caso do PHENOX, que é fortemente estabilizado na entrada do sítio da TTR por interações apolares, em adição às polares, com a cadeia lateral de Lys15; e do FLU que acomoda um grupo trifluorometil no HBP3 da TTR. Além disto, a região central do sítio de ligação também contribui para a estabilização dos inibidores, principalmente com interações hidrofóbicas mediadas pelas cadeias laterais de Leu110 e Leu17.

Além dos contatos formados diretamente entre os inibidores e a TTR, alterações estruturais nas adjacências do sítio de ligação ao  $T_4$  são também observadas, e estas parecem ser induzidas pela interação do ligante. Este é o caso da rotação da cadeia lateral de Ser117 no fundo da cavidade, que pode adquirir uma conformação que apresenta distâncias ideais para interação com outra Ser117 do sítio adjacente. Desta forma, uma nova interação inter-subunidade é formada, fortalecendo a forma tetramérica da TTR (105). No entanto, esta interação, apesar

---

de contribuir, não parece ser fundamental para o aumento da estabilidade conferida pela ligação de pequenas moléculas à TTR, por exemplo, nenhuma evidência da formação destes contatos foi observada na estrutura cristalográfica do análogo do DIF, mostrado na Figura 1.11B, em complexo com a TTRwt e este se mostrou um forte inibidor da agregação desta proteína *in vitro* (109).

Além dos NSAIDs e análogos estruturais, compostos naturais como flavonóides e estilbenos foram também reportados, em buscas paralelas por novos inibidores da agregação da TTR (77, 101). Foram identificados compostos na soja (genisteína) (77) e na uva (resveratrol) (101) que apresentaram boa inibição da agregação da TTRwt e mutantes amiloidogênicas. Em particular, a genisteína, uma isoflavona extraída da soja, mostrou alta seletividade para a TTR no plasma sanguíneo e fluido cérebro espinhal humano (117) e alta afinidade pela TTR ( $K_d=40$  nM). Além disto, a administração de genisteína a humanos (118) e ratos (119) não mostrou efeitos colaterais pronunciados em estudos de toxicidade.

Flavonóides são compostos freqüentemente encontrados em alimentos. Assim, a identificação da genisteína como um potente e seletivo inibidor da agregação da TTR tornou-se um fato interessante, abrindo a possibilidade do uso de suplementos alimentares ou direcionamento da dieta para o tratamento de amiloidoses de TTR (77). Estas alternativas são importantes, pois, até que se tenha um fármaco seguro disponível no mercado, seriam estratégias menos agressivas para o tratamento de amiloidoses familiares de TTR, as quais, no momento, são tratadas por transplante de fígado. Além disto, a orientação da dieta pode, ainda, ter efeito profilático para as amiloidoses da TTR selvagem.



## 2 Objetivos e justificativa

A estrutura da TTR com flavonóides ainda não tinha havido sido reportada. Assim, era de importância a caracterização estrutural da interação dessa nova classe de inibidores da TTR (flavonóides) com esta proteína, tanto para caracterização do modo de ligação, quanto para dar suporte a modificações direcionadas nestas moléculas, otimizando sua afinidade, inibição da agregação da TTR e seletividade frente a outras proteínas humanas. A determinação da estrutura cristalográfica da TTRwt e da mutante amiloidogênica mais freqüente desta proteína, a V30M, com genisteína, bem como a caracterização mais detalhada da interação, foram um dos objetivos principais da presente tese.

Além da genisteína, outros flavonóides, com base na estrutura desta isoflavona, foram também selecionados para testes de inibição da agregação da TTR e caracterização da interação.

Outros inibidores da agregação da TTR em potencial, como os agonistas

sintéticos seletivos pela isoforma  $\beta$  do receptor de hormônio tireoidiano (TR $\beta$ ), o GC-1 e o GC-24 (120), foram também selecionados. Estas moléculas encontravam-se em fase de testes clínicos iniciais, mostrando-se potenciais fármacos para o tratamento de anomalias metabólicas, como obesidade e hipercolesterolemia. Devido a sua seletividade pelo TR $\beta$ , os GCs apresentam efeitos colaterais minimizados, podendo ainda mostrar efeitos benéficos. Assim, o uso concomitante dessas moléculas para o tratamento de amiloidoses de TTR e distúrbios metabólicos, via ativação do TR $\beta$ , poderia ser uma possibilidade. Além da inibição da agregação da TTR em si, deu-se também importância para estas moléculas, já que a TTR é uma das proteínas plasmáticas mais envolvidas nos processos de distribuição de fármacos direcionados para os receptores tireoidianos. Assim a caracterização da interação da TTR com GC-1 e GC-24 poderia também auxiliar estudos de ADME (administração, distribuição, metabolização e excreção) destes compostos, estudos estes exigidos pelas agências regulamentadoras.

Neste contexto, a presente tese teve como objetivo o teste e caracterização de novos supostos inibidores da agregação da TTR tipo selvagem (TTR<sub>w</sub>) e da mutante amiloidogênica mais freqüente desta proteína, a variante V30M. Para isto, foi empregada uma abordagem estrutural e de Termodinâmica para a caracterização da interação dos inibidores identificados com a TTR e protocolos bem estabelecidos para a triagem dos compostos. As seguintes etapas experimentais foram inicialmente propostas:

- Testar a capacidade das pequenas moléculas selecionadas em inibir a agregação da TTR *in vitro*, em concentração única dos mesmos.
- Realizar curvas de agregação da TTR em diferentes concentrações dos melhores inibidores identificados, e assim determinar a potência e ranqueamento destes, através da análise do IC<sub>50</sub> retornados destas curvas de agregação *in vitro* da TTR.
- Analisar os aspectos termodinâmicos da interação dos melhores inibidores identificados com a TTR através de experimentos de microcalorimetria por titulação isotérmica (ITC).
- Determinar as estruturas cristalográficas da TTR em complexo com os melhores inibidores identificados, por difração de raios-X de monocristais.

- 
- Realizar curvas de alta pressão hidrostática (HHP) da TTR com genisteína, como ferramenta adicional de perturbação da estrutura terciária e quaternária da TTR, para melhor caracterização dos efeitos desta isoflavona.
- Analisar os dados obtidos pelas distintas técnicas biofísicas empregadas, relacionando os resultados dos diferentes experimentos, a fim de caracterizar a interação da TTR com seus inibidores de agregação, através de uma abordagem estrutural e termodinâmica.
- Determinar as bases moleculares do reconhecimento das classes de inibidores testadas pela TTR, incluindo:
- sítios e sub-sítios de reconhecimento de ligantes pelo tetrâmero da TTR;
  - relação da estrutura dos ligantes testados com a atividade de inibição da agregação da TTR *in vitro*;
  - bases moleculares da cooperatividade entre os sítios da TTR, quando houver.



## 3 Metodologia

O teste, caracterização e análise da interação de pequenas moléculas com a TTR tipo selvagem e a mutante V30M, foram realizados seguindo as seguintes etapas:

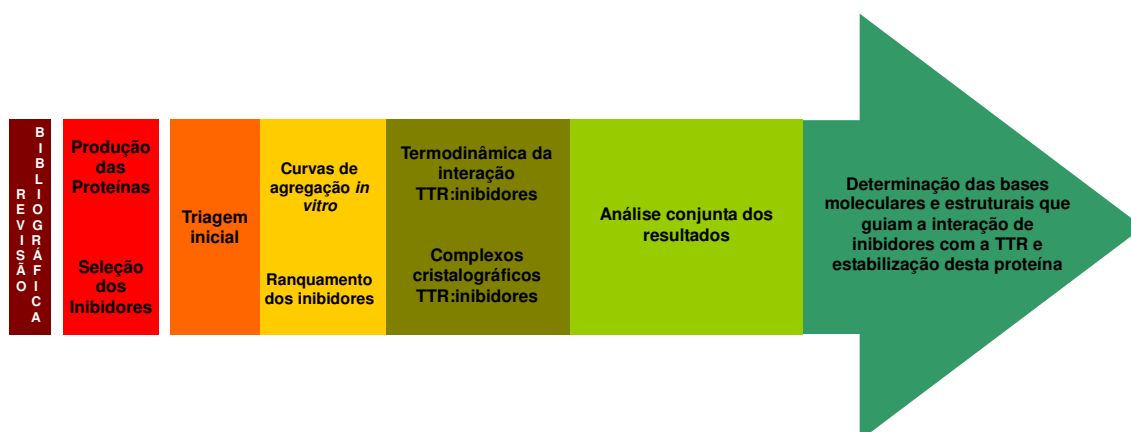


Figura 3.1 – Esquema das etapas seguidas no desenvolvimento da presente tese.



### **3.1 Expressão e purificação da TTR tipo selvagem e mutante V30M**

A TTR selvagem e a mutante V30M foram produzidas em células de bactéria *Escherichia coli* BL21 DE3, transformada com plasmídeo de expressão (pMMHa) contendo o gene para TTR e de resistência ao antibiótico ampicilina. Os plasmídeos de expressão foram fornecidos pelo grupo de pesquisa da Profa. Dra. Débora Foguel do Departamento de Bioquímica Médica, Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade Federal do Rio de Janeiro, colaboradores desse projeto. A expressão e purificação da TTR foram realizadas seguindo protocolo descrito por Lai e colaboradores (4) e adaptado pelo grupo da Profa. Dra. Débora Foguel. O processo foi inicialmente realizado na UFRJ, sendo repetido posteriormente em São Carlos, com rendimento similar. Uma breve descrição dos procedimentos será realizada a seguir.

#### *3.1.1 Transformação das bactérias E. coli BL21 DE3*

Dois microlitros do plasmídeo foram misturados a 40  $\mu$ l de células competentes. Esta mistura foi agitada lentamente e submetida a um processo de choque térmico, com a finalidade de otimizar a penetração do plasmídeo na célula. A solução foi mantida no gelo por um período de 30 minutos, e em seguida, transferida para um banho-maria em temperatura igual a 42°C por 1 minuto. Imediatamente, os frascos foram transferidos para o gelo por um período de 2 minutos e, posteriormente, mantidos a temperatura ambiente por mais 2 minutos. A esta solução, foram adicionados 960  $\mu$ L de meio LB estéril, sendo imediatamente realizada incubação sob agitação e temperatura constante (200 rpm/ 37°C) por 1 hora.

Foram preparadas placas de *Petri* contendo ~20 ml de meio LB sólido,

---

suplementado com 100 µg/ ml de ampicilina. Após o período de incubação, a suspensão de bactérias transformadas foi transferida para as placas de *Petri*. O procedimento de plaqueamento das bactérias foi realizado em 3 placas, sendo uma das placas um experimento controle (bactérias não transformadas) e as demais placas realizadas com diferentes concentrações de bactéria transformada (diluída e concentrada). As placas foram incubadas durante a noite, em estufa com temperatura constante de 37°C.

### 3.1.2 Expressão da TTR

As placas de cultura foram analisadas e uma única colônia foi transferida para 5 ml de meio LB líquido estéril, contendo 100 µg/ ml de ampicilina, o pré-inóculo. Este tubo de pré-inóculo foi incubado sob agitação constante de 200 rpm a 37°C. Após 4 horas de incubação, a solução apresentava-se bastante turva, indicando um grande número de bactérias. Esta suspensão de bactérias foi então transferida para um Erlen Meyer contendo 1 litro de meio LB estéril suplementado com 100 µg/ ml de ampicilina. A cultura foi, então, incubada a 37°C/ 200 rpm até atingir  $DO_{600} = 1,0 - 1,5$  (~6 horas). A indução da expressão da TTR foi realizada após adição de 1 mM de IPTG (concentração final) ao meio de cultura. Estas células foram mantidas sob agitação constante de 200 rpm por um período de 10-14 horas para a produção da proteína de interesse.

A suspensão de bactérias foi, então, centrifugada a 8000 rpm/ 10 min a 4°C e re-suspensa em 20 ml de tampão de lise (Tris 200 mM pH 7,5; NaCl 5 M). Esta solução foi mantida sob agitação constante por 20-30 minutos, com a finalidade de romper as células bacterianas e liberar a TTR no meio líquido. Além disto, a suspensão de bactérias foi posteriormente congelada a -80°C por 1 hora, descongelada e em seguida sonicada em sonicador *Sonifier 450* – VWR Scientific Branon, realizando-se 4 ciclos de 30 segundos, com 1 min de intervalo, como etapas adicionais de lise celular. Através destes procedimentos, a proteína produzida pelas bactérias é liberada para o meio líquido.

A solução sonicada foi então imediatamente centrifugada a 8000 rpm/ 10 min a 4°C, para a separação de alguns componentes celulares, no precipitado, das proteínas e outras moléculas solúveis, no sobrenadante. O sobrenadante foi então submetido às etapas de purificação, para o isolamento da TTR.

### 3.1.3 Purificação da TTR

As primeiras etapas da purificação da TTR consistiram em duas precipitações com sulfato de amônio, uma atingindo 40% e outra 90% de saturação. A solução do sobrenadante do sonicado foi incubada com sulfato de amônio por 30 minutos sob agitação constante, a 10°C. Após a incubação com 40% de sulfato de amônio, a solução foi centrifugada a 8000 rpm/ 10 min a 4°C, onde a proteína de interesse permaneceu no sobrenadante. Este sobrenadante foi, então, submetido à segunda precipitação com sulfato de amônio (90%), onde a TTR precipitou após a centrifugação. O *pellet* da segunda precipitação (90%) foi re-suspenso em 10 ml de tampão Tris 25 mM pH 8,0. A solução foi, então, dialisada contra 3 litros do mesmo tampão por 12 horas a 10°C para a retirada do excesso de sulfato de amônio.

Esta amostra foi então submetida à segunda etapa de purificação da TTR: cromatografia de troca iônica, em resina aniônica Source30Q (GE Life Sciences). O ponto isoelétrico teórico da TTR é  $pI = 5,4$  (calculado no servidor ExPASy: <http://ca.expasy.org>), sendo assim, a TTR apresenta uma carga parcial negativa. As resinas Source Q, por outro lado, apresentam carga positiva, proporcionada pela presença de amônia quaternária. Desta forma, a TTR e outras proteínas com carga negativa interagem com a resina.

Os procedimentos relativos à etapa de purificação utilizando resina de troca aniônica foram realizados primeiramente equilibrando-se a coluna com tampão A (Tris 25 mM pH 8,0, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, 5% de NaCl), ideal para a ligação da TTR à resina. Em seguida, a amostra – contendo a TTR produzida e previamente isolada pelas etapas de separação inicial por precipitação com sulfato de amônio – foi aplicada à coluna equilibrada, em fluxo de 3 ml/min em sistema de cromatografia de alta performance, ÄKTA Purifier900® (GE Life Sciences). As proteínas que não

interagiram com a resina Source 30Q foram removidas da coluna através de lavagem da mesma com tampão A e as frações de eluição foram coletadas em tubos Falcon de 50 ml. A presença de proteína nas frações eluídas foi monitorada por medida de absorbância a 280 nm, relativo à presença de resíduos de aminoácido com cadeia lateral aromática – Trp, Tyr e Phe, na amostra.

Após lavagem da coluna, um gradiente de 5-35% de NaCl foi realizado, com o intuito de eluir as proteínas aderidas à resina. Para tal, um gradiente de 0-40% do tampão B (Tris 25 mM pH8,0; NaCl 1 M; EDTA 1 mM; DTT 1 mM) foi aplicado. Através deste procedimento, proteínas com menor interação com a resina são removidas primeiramente, seguido da eluição de proteínas com maior interação com a resina, ou seja, com *pI* mais baixo. A TTR foi eluída em ~32% de NaCl, apresentando um pico praticamente isolado.

As frações de TTR isoladas por cromatografia de troca iônica foram então concentradas em concentrador Centricon® - Millipore, com filtro de corte de 10 kDa, com a finalidade de concentrar a amostra e reduzir o volume da mesma. Uma terceira etapa de purificação por cromatografia de exclusão molecular em resina Superdex75 (GE Healthcare) foi realizada. Neste último passo de purificação a proteína de interesse, TTR, é separada de alguns poucos contaminantes de alta e baixa massa molecular, há seleção das espécies tetraméricas da TTR e, ainda, a amostra é mantida em solução tampão de interesse (Tris 25 mM pH 7,5 ou pH 8,5 – de acordo com a necessidade; KCl 100 mM; EDTA 1 mM; DTT 1 mM).

O pico de TTR resultante da cromatografia de exclusão molecular foi novamente concentrado em concentrador Centricon® - Millipore, com filtro de corte de 10 kDa. O processo foi realizado por centrifugação a 4000 rpm a 4°C, até atingir uma concentração de TTR ~170 µM, o equivalente a ~10 mg/ml da proteína.

A concentração de proteínas totais foi estimada em todas as etapas de purificação, a partir da lise celular, pelo método de Bradford (121). A concentração da TTR purificada foi determinada pela lei de Lambert-Beer (Equação 1).

$$\text{Concentração (M)} = A_{280} / (\epsilon(\text{M cm})^{-1} \times l(\text{cm}) \times D) \quad (1)$$

Onde:  $\epsilon$  é o coeficiente de extinção molar do tetrâmero de TTR,  $\epsilon = 77.600 (\text{M cm})^{-1}$  (122),  $l$  = comprimento da cubeta = 1 cm, e  $D$  é o fator de diluição.

Os passos de expressão e purificação da TTR foram acompanhados através de eletroforese em gel desnaturante (PAGE/SDS) (123, 124). Ainda, com a finalidade de verificar a qualidade da amostra purificada, utilizou-se, também, eletroforese em gel nativo Phast Gel® (GE Healthcare), homogêneo (20%).

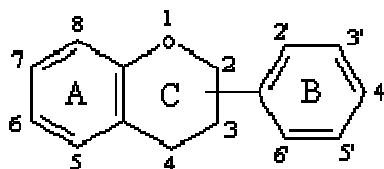
### **3.2 Pequenas moléculas selecionadas**

O levantamento inicial da literatura revelou que uma grande variedade de pequenas moléculas são capazes de se ligar aos canais de hormônio da TTR, aumentando a estabilidade do tetrâmero desta proteína e inibindo a agregação da mesma (70, 77, 101, 103, 108, 125-126). No entanto, um grande problema encontrado para a utilização destes compostos como fármacos são os efeitos colaterais apresentados pelos mesmos, por uso prolongado. Desta forma, alguns flavonóides, encontrados com frequência nos alimentos, e análogos sintéticos do hormônio tireoidiano, com promissora aplicação terapêutica, foram selecionados como compostos para testes iniciais de agregação da TTR e posterior análise biofísica aprofundada da interação. Uma breve descrição de cada grupo de químicos selecionados para os testes de agregação *in vitro* da TTR será realizada a seguir.

Todas as moléculas foram obtidas comercialmente, optando-se sempre por lotes com elevado grau de pureza; com exceção do GC-1, GC-24 e NH3. Estes últimos foram sintetizados pela pós-doc Mirela Sairre (GC-1 e GC-24) – IFSC-USP, ou pelo grupo do Dr. Thomas Scalan (NH3) – *Oregon Health & Science University*, Protland, OR, E.U.A..

### 3.2.1 Flavonóides

Polifenóis são compostos constituídos por um ou mais anéis aromáticos com pelo menos uma hidroxila e conectados por uma ligação de carbono. Os flavonóides são uma subclasse dos polifenóis, onde a ligação entre seus anéis A e B (Figura 3.2) é realizada por uma conexão de 3 carbonos combinados com um oxigênio e 2 carbonos do anel aromático A, formando um terceiro anel de 6 membros, o anel C (127).



**Figura 3.2** – Estrutura geral dos flavonóides.

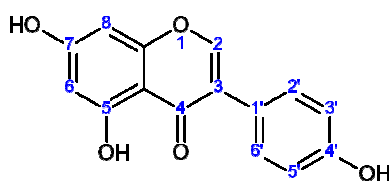
Os flavonóides podem ser classificados de acordo com a insaturação do anel C e os substituintes presentes nos anéis A, B e C. A Tabela 3.1 apresenta as subclasses de flavonóides, caracterizadas de acordo com o descrito por Beecher (127), e alguns exemplos de cada subclasse.

**Tabela 3.1** – Classificação dos flavonóides e exemplos. Adaptado de Beecher (127).

Subclasse	Conexão anéis B-C	Insaturação do anel C	Grupo funcional do anel C	Exemplos	Fontes
Flavanol	2	Não	3-hidroxi ou 3-O-galato	Catequina, Galocatequina, Epicatequina	Chás e uvas vermelhas
Flavanona	2	Não	4-oxo	Esperetina, Naringenina	Frutas cítricas
Flavona	2	Dupla ligação 2-3	4-oxo	Apigenina, Luteolina	Folhas verdes
Isoflavona	3	Dupla ligação 2-3	4-oxo	Daidzeína, Genisteína	Soja
Flavonol	2	Dupla ligação 2-3	3-hidroxi, 4-oxo	Kaenferol, Miricetina, Quercetina	Frequentemente encontrados nos alimentos
Antocianidina	2	Duplas ligações 1-2 e 3-4	3-hidroxi	Cianidina, Malvidina	Frutas silvestres

### Genisteína (GEN)

A genisteína (GEN) é um composto natural, presente em grandes quantidades na soja (*Glycine max*). Foi demonstrado que a genisteína é um potente inibidor da agregação da TTR *in vitro* e que esta isoflavona liga aos dois sítios da TTRwt com cooperatividade negativa, apresentando constantes de afinidade de  $K_{d1} = 40 \pm 25$  nM e  $K_{d2} = 1,4 \pm 0.17$   $\mu$ M (77). Além disto, a genisteína mostrou pouca interação com outras proteínas no plasma e fluido cérebro-espinhal humano (77, 117) e pouco efeito colateral em testes de toxicidade (118, 128). Estas características tornam a genisteína uma molécula promissora para o tratamento de amiloidoses de TTR, e desta forma, foi selecionada para estudos mais aprofundados, como determinação da estrutura cristalográfica do complexo TTR:GEN e análise termodinâmica da interação desta isoflavona com a mutante V30M, no presente trabalho. A estrutura química da genisteína é mostrada na Figura 3.3.



Genisteína (GEN)

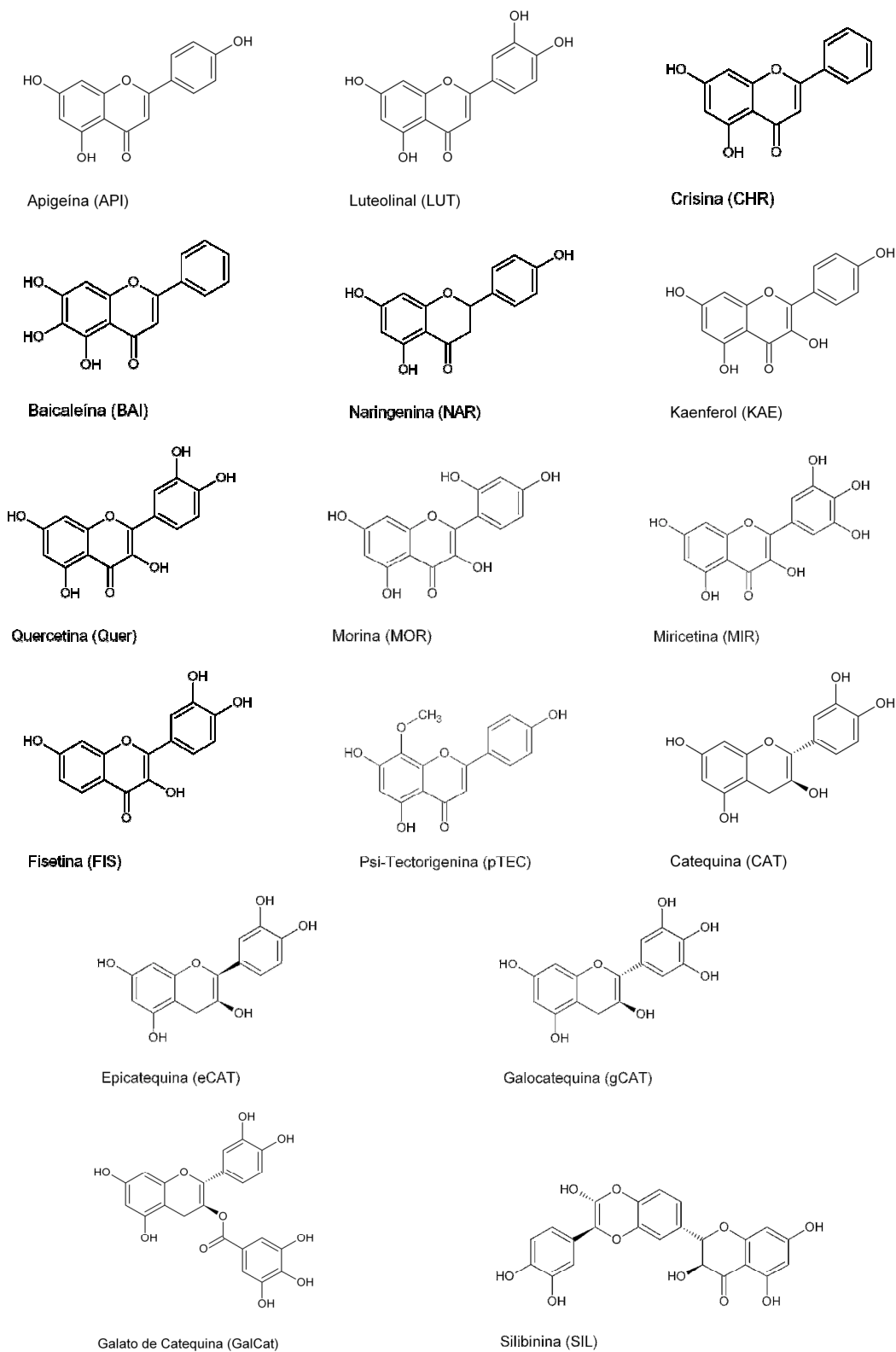
**Figura 3.3** – Estrutura química da genisteína (GEN).

Lotes de genisteína sintética foram obtidos da empresa Sigma, optando-se pela aquisição de amostras com elevado grau de pureza (>99%). A estrutura química da genisteína obtida comercialmente, antes e após congelamento e diluição em DMSO ou EtOH, foi checada por ressonância magnética nuclear (análises realizadas pela pós-doc Mirela Sairre).

### Flavonóides selecionados baseado na estrutura da genisteína

Como a genisteína se mostrou um bom inibidor da agregação da TTR e apresenta boas propriedades farmacológicas, uma série de flavonóides, selecionados baseado na estrutura da genisteína, foi também testada. Nesta série encontravam-se flavonas, flavanonas, flavonóis e flavanóis (catequinas). As estruturas foram escolhidas, com a finalidade de testar o número e posição das

hidroxilas, bem como a presença de ramificações volumosas, como na silibinina e galato de catequina, em inibidores da agregação da TTR. Estas estruturas são apresentadas na Figura 3.4.

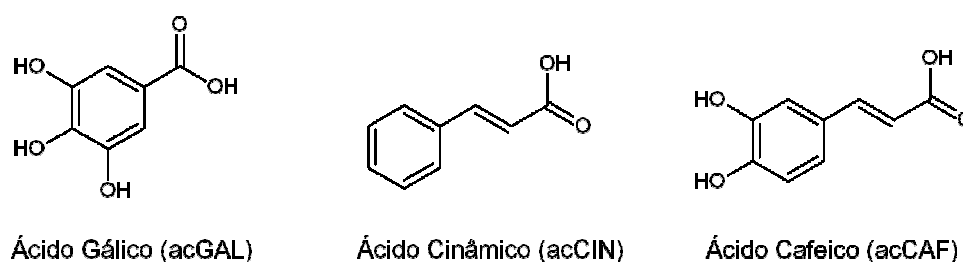


**Figura 3.4** – Estruturas químicas dos flavonóides selecionados.



### Ácidos orgânicos

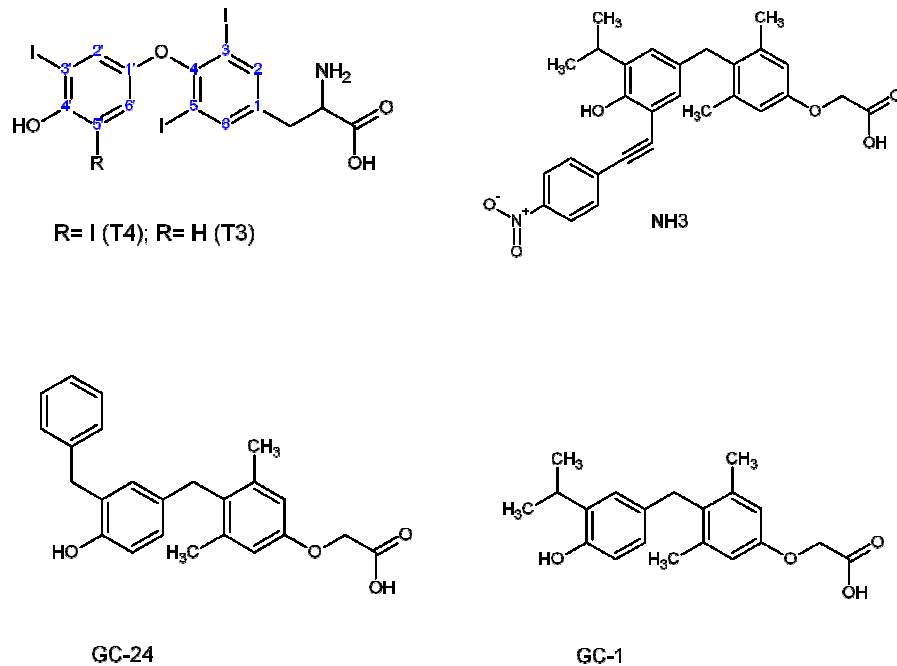
Três ácidos orgânicos de baixa massa molecular foram também escolhidos. Estas estruturas foram selecionadas para uma abordagem de busca por fragmentos, que poderiam auxiliar na identificação de novos bolsões ou diferentes conformações de interação de pequenas moléculas com o sítio da TTR, e talvez, assim, apontar novas estratégia para o desenvolvimento de inibidores da agregação desta proteína. Para isto, o ácido cinâmico, ácido gálico e ácido cafeico foram testados. Estas estruturas são mostradas na Figura 3.5.



**Figura 3.5** – Estrutura química dos ácidos orgânicos selecionados.

### 3.2.2 – Análogos sintéticos do hormônio tireoidiano

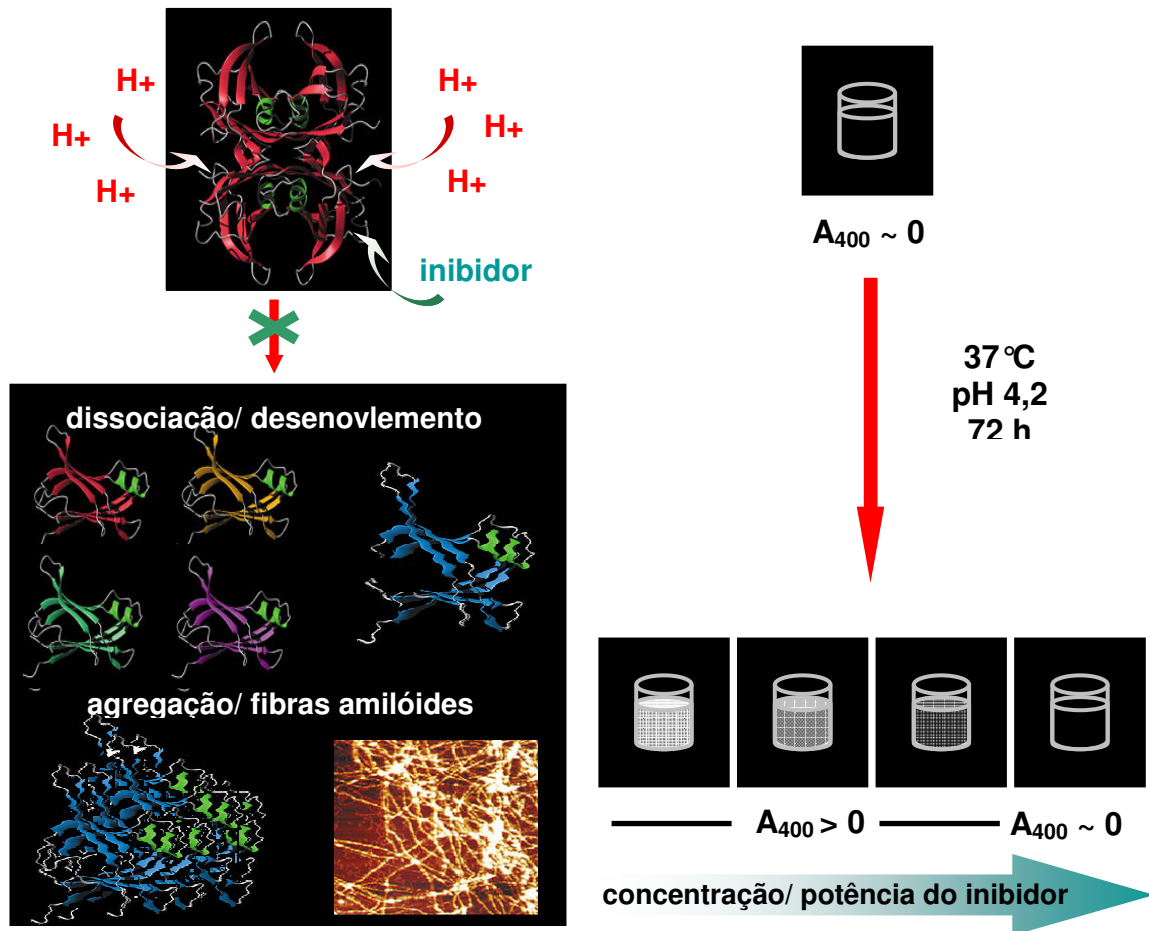
O ligante natural da TTR, o  $T_4$  e seu derivado  $T_3$ , ligam com alta afinidade aos canais da TTRwt (111, 112). Os análogos sintéticos do  $T_3$ : GC-1 e GC-24 mostraram seletividade pela isoforma  $\beta$  do receptor de hormônio tireoidiano (TR $\beta$ ) (120, 129). O TR $\beta$  é um alvo biológico importante para o tratamento de distúrbios metabólicos, como obesidade e hipercolesterolemia (130), e sua ativação específica apresenta baixos efeitos colaterais. A ligação de pequenas moléculas à TTR plasmática pode afetar a distribuição de fármacos, auxiliando ou prejudicando a entrega destas moléculas ao receptor alvo (131, 132). Além disto, ainda há a possibilidade de compostos desenhados para o tratamento de anomalias metabólicas serem usados concomitantemente para o tratamento de amiloidoses de TTR, amplificando seu uso terapêutico. A fim de verificar estas hipóteses, os agonistas seletivos do TR $\beta$ , o GC-1 (129, 133) e o GC-24 (120) foram selecionados para os testes de inibição da agregação da TTR e posterior caracterização da interação. Além destes, o antagonista NH3 (134) também foi testado. Estas estruturas são mostradas na Figura 3.6.



**Figura 3.6** – Estruturas químicas do ligante natural da TTR, o T<sub>4</sub> (tiroxina), e seu derivado, o T<sub>3</sub> (triiodo L-tironina) e análogos estruturais sintéticos do T<sub>3</sub>: GC-1 ([4-(4-hidroxi-3-isopropilbenzil)-3,5-dimetilfenoxi] ácido acético); GC-24 ([4-(3-benzil-4-hidroxi-benzil)-3,5-dimetilfenoxi] ácido acético) e NH-3.

### 3.3 Ensaios de agregação da TTR em pH ácido

Conforme descrito na literatura, a TTR sofre dissociação/ desenovelamento em pH menor que 5 (4, 25, 101). Desta forma, o ensaio de agregação da TTR induzida por acidificação do pH foi proposto (4, 104, 122) e é amplamente utilizado (53, 77, 98, 101-104, 109) como uma metodologia simples e rápida para analisar a capacidade de pequenas moléculas em inibirem a agregação desta proteína. A metodologia é então baseada nesse princípio e é explicada esquematicamente na Figura 3.7.



**Figura 3.7** – Ensaio de agregação da TTR induzida por pH ácido. O tetrâmero da TTR é mantido a 37°, pH 4,2 por 72 horas na presença ou ausência das pequenas moléculas teste. O pH induz dissociação e desenvolvimento parcial dos monômeros da TTR, levando à agregação e/ou formação de fibras amilóides desta proteína. Se a molécula teste interagir com o(s) sítio(s) da TTR, a forma tetramérica é estabilizada, e assim há inibição da agregação/ formação de fibras amilóides da TTR. A turbidez da amostra é relativa à formação de agregados da TTR, e assim pode ser medida e relacionada à inibição da agregação/ formação de fibras amilóides da TTR promovida pela ligação das pequenas moléculas.

Quando o pH da amostra é acidificado, a TTR tende a dissociar/ desenvolver, e a formação de agregados e/ou fibras amilóides desta proteína ocorre rapidamente. A agregação da TTR é, então, quantificada através de medidas de turbidez da amostra a 400-600 nm. Os experimentos podem ser conduzidos em diferentes concentrações do ligante e um grupo controle negativo é sempre realizado na ausência do ligante (apoTTR). O controle negativo é usado para comparação dos resultados e determinação da agregação relativa da TTR na presença ou ausência de inibidores.

Os ensaios de agregação da TTR em pH ácido foram conduzidos seguindo

protocolos descritos anteriormente (101-103), com mínimas modificações. Tubos de 1,5 ml foram preparados contendo 237,5 µL da proteína (TTRwt ou V30M) a 7,2 µM em tampão Tris (25mM Tris pH 7,5, 100 mM KCl, 1 mM EDTA). Estoques iniciais dos ligantes foram preparados em co-solvente adequado (EtOH ou DMSO) 20 vezes mais concentrados que a concentração do ensaio. Os estoques de ligante 20x concentrados foram adicionados (volume estoque ligante = 12,5 µL) aos tubos, contendo a solução da proteína, garantindo que a concentração final do co-solvente não ultrapassasse 5%. Um grupo controle negativo foi realizado com proteína incubada somente com co-solvente, ou seja, proteína sem ligante (apo). As soluções foram mantidas em pH 7,5 por 2 horas em temperatura ambiente para garantir a interação do ligante com a TTR.

Após o período de incubação em pH 7,5, o pH foi acidificado, por adição de 250 µL tampão acetato (200 mM acetato de sódio pH 4,0, 100 mM KCl, 1 mM EDTA) resultando em pH final igual a 4,2. Após a adição do tampão acetato, a concentração final da TTR nos ensaios ficou 3,6 µM, que é a concentração média da TTR no plasma sanguíneo humano. Os tubos de 1,5 ml contendo TTR a 3,6 µM, na presença ou ausência dos ligantes teste, foram, então, mantidos em estufa a 37 °C por 72 horas.

Após o período de incubação em pH 4,2 a 37 °C, 200 µL da solução em cada tubo foram transferidos para microplacas de 96 poços, após breve agitação. Medidas de turbidez foram realizadas a 400 nm em leitor de microplaca. Caso os ligantes apresentassem absorção neste comprimento de onda, as medidas de turbidez foram conduzidas a 500 ou 600 nm. Um grupo denominado 'branco' foi mantido nas mesmas condições experimentais, porém na ausência da proteína – ou seja, apresentavam somente a solução tampão e o ligante ou co-solvente, para que fossem descontados os valores de absorbância não relativos à turbidez da agregação da TTR. Os experimentos foram realizados em duplicatas e repetidos 2-3 vezes.

Os valores de absorbância foram convertidos em valores de agregação relativa (AR) da TTR (relativa à proteína incubada por 72h na ausência de ligante: apoTTR – controle negativo), conforme Equação 2.

$$AR = [(turbidez\ TTR:ligante) / (turbidez\ apoTTR)] \quad (2)$$

Os valores de AR foram então convertidos em valores de inibição relativa (IR= 1-AR) para melhor visualização dos dados. Assim, valores de inibição relativa igual a zero indicam valores de turbidez idênticos ao apresentado pela apoTTR, ou seja, sem ação protetiva do ligante; enquanto valores de IR>0, indicam alguma proteção conferida pelos ligantes teste frente à indução da agregação da TTR em pH ácido.

Estes ensaios de agregação da TTR *in vitro* foram conduzidos inicialmente em concentração única dos ligantes (1:8), com o intuito de se realizar uma triagem inicial das pequenas moléculas selecionadas. Os ligantes que apresentaram valores de inibição relativa igual ou maiores que 0,5, nestes ensaios iniciais, foram encaminhados para novos experimentos de agregação *in vitro*, conduzidos assim como descrito acima, porém em diferentes concentrações das pequenas moléculas (concentração final na primeira incubação: 0,3-57,4  $\mu$ M).

Gráficos de inibição relativa (IR) *versus* log da concentração do inibidor foram construídos e estes dados foram ajustados aplicando-se a equação de dose resposta, no programa GraphPad Prism (versão 4.0, GraphPad, San Diego) – Equação 3. Neste procedimento, foi utilizada restrição de mínimo=0 ([inibidor] = 0  $\rightarrow$  IR = 0). A partir do ajuste não linear dos dados experimentais das curvas de agregação, os valores de EC50 (concentração do inibidor necessária para conferir 50% do efeito máximo de um inibidor em particular) e IC50 (concentração do inibidor necessária para conferir 50% de IR) foram determinados para cada ligante testado. Os valores de EC50 foram retornados diretamente do ajuste dos dados, enquanto os valores de IC50 foram extraídos dos valores de IR ajustados (n=1000).

$$Y = \min + (\max - \min) / (1 + 10^{(\log EC50 - x)Hill}) \quad (3)$$

Onde: Y = IR; Hill = constante de Hill (cooperatividade); max = IR máxima ajustada e min = IR mínima (= 0).

### **3.4 Experimentos de alta pressão hidrostática (HHP)**

Experimentos de alta pressão hidrostática são bastante utilizados para verificar processos de dissociação/ desenovelamento de proteínas e intermediários (2, 25-26, 89, 135-143). A aplicação da pressão gera infiltração de água nas cavidades da proteína, resultando em exposição de resíduos internalizados, e conseqüente hidratação destes resíduos expostos, diminuição de cavidades não hidratadas e menores volumes (revisado em (23)). Assim, em um caso típico de desnaturação por pressão o equilíbrio da reação  $P_N + nH_2O \rightarrow P_D(H_2O)_n$  (onde:  $P_N$  = proteína nativa e  $P_D$  = proteína desenovelada) é deslocado para os estados desenovelados (23).

O sistema de pressão pode ser acoplado a um fluorímetro (144), espectrômetro de infra-vermelho (7), sistemas de eletroforese (143) ou de difração de raios-X (145-146). Desta forma, os processos de dissociação e/ou desenovelamento de proteínas podem ser acompanhados à medida que pressão é aplicada ao sistema.

No caso de sistemas de pressão acoplados à fluorímetros, na grande maioria dos casos, a fluorescência intrínseca da proteína, através do acompanhamento do espectro de emissão do triptofano (Trp), é monitorada. O Trp absorve a 280 nm e apresenta pico de emissão entre 300-350 nm, sendo o pico de emissão dependente da polaridade do microambiente onde os Trp da proteína se encontram. Em ambientes mais hidrofóbicos o centro de massa (CM) do espectro de emissão de fluorescência do Trp é deslocado para comprimentos de onde de maior energia (azul), enquanto em ambientes mais polares o CM é deslocado para comprimentos de onda de menor energia (vermelho). O CM é calculado de acordo com a Equação 4 em cada passo de pressão adicionada, e então é associado ao estado de enovelamento/ dissociação da proteína.

Além dos experimentos de agregação da TTR *in vitro*, curvas de alta pressão hidrostática (HHP) foram também conduzidas, com as proteínas TTRwt e a mutante V30M, na presença ou ausência do ligante genisteína. Estes experimentos foram realizados como análise adicional da interação da genisteína com a TTR e proteção

ao tetrâmero conferida por ligação desta isoflavona à TTRwt e à mutante V30M.

Os experimentos foram conduzidos de acordo com protocolos bem estabelecidos (25-26, 135, 137-139). Estudos preliminares de alta pressão hidrostática (HHP), dos complexos TTRwt:genisteína e V30M:genisteína, foram realizados no Instituto de Bioquímica Médica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a coordenação da Profa. Dra. Débora Foguel e do Prof. Dr. Luis Mauricio T.R. Lima. Posteriormente, estes ensaios foram continuados no CBME – IFSC/USP.

Curvas de pressão foram realizadas com as proteínas apo (sem ligante), em concentrações equimolares e em excesso (4 vezes) do ligante genisteína. Uma solução a 2  $\mu$ M de TTR foi preparada em tampão Tris 25 mM pH 7,0, KCl 100 mM, EDTA 1 mM com 0, 2 ou 8  $\mu$ M de genisteína e mantida a 10 °C por 2 horas.

Amostras individuais foram colocadas em garrafas de quartzo e estas na cela de alta pressão (ISS Champaign, IL) com janelas ópticas (147). O espectro de fluorescência foi gravado em espectrofluorímetro PC1 (ISS Champaign, IL), ajustando o comprimento de onda de excitação para 280 nm e coletando a emissão na faixa de 300-400 nm. Através destas medidas pôde-se acompanhar o deslocamento do centro de massa dos triptofanos na estrutura da TTR (2 Trp por monômero), e assim monitorar processos de dissociação/ desenovelamento da TTR em análise, na presença ou ausência do ligante.

As curvas de HHP foram conduzidas, adicionando-se pressão em passos de 5 Kpsi, indo de 0 a 50 Kpsi. Anteriormente a cada leitura, a amostra foi mantida em repouso por um período de 10 minutos para garantir o equilíbrio. Os dados foram expressos em função do centro de massa (CM) e então normalizados pelo grau de dissociação ( $\alpha$ ), conforme descrito na Equação 4 e na Equação 5.

$$CM = \langle vp \rangle = \frac{\sum v_i F_i}{\sum F_i} \quad (4)$$

$$\alpha = (\langle vp \rangle - \langle v_i \rangle) / (\langle v_i \rangle - \langle v_f \rangle) \quad (5)$$

Onde :  $F_i$  é a fluorescência emitida ao comprimento de onda  $v_i$ , e  $\langle v_i \rangle$  e  $\langle v_f \rangle$  são os valores iniciais e finais de CM na curva de pressão, respectivamente; enquanto  $\langle vp \rangle$  é o CM à pressão  $p$  (25).

Valores de p50 (valores de pressão relativos a 50% da transição) foram extraídos das curvas de pressão, construídas com os dados de pressão *versus* extensão da reação ( $\alpha$ ) em equação sigmóide de 4 parâmetros, utilizando o programa SigmaPlot (versão 10 Jandel Scientific). Os valores de p50 foram utilizados para comparar as curvas de pressão de TTR conduzidas com a proteína selvagem (TTRwt) e com a mutante V30M, bem como, em diferentes concentrações de genisteína. Maiores valores de p50 estão relacionados à maior estabilidade da proteína sob pressão na condição teste. Os experimentos foram realizados pelo menos três vezes a 1°C pH 7,5.

### **3.5 Microcalorimetria por titulação isotérmica (ITC)**

Reações químicas liberam ou absorvem calor. Baseado neste princípio Lavoisier e Laplace desenvolveram um calorímetro de gelo em meados de 1780 para medir a variação da taxa metabólica de pequenos mamíferos. A partir daí, muitos calorímetros e desenhos experimentais foram desenvolvidos para os mais variados fins. Atualmente, existem calorímetros que permitem testes de fármacos em culturas de células (148, 149), identificação de microorganismos (150-152), decomposição de materiais ou fármacos (153-156); desenovelamento e agregação de proteínas (157, 158); interação de pequenas moléculas com proteínas (159-163), proteína/ DNA (164), proteína/ proteína (165), entre outras aplicações.

A microcalorimetria por titulação isotérmica (ITC) vem sendo amplamente utilizada como ferramenta importante para a avaliação da termodinâmica da interação de pequenas moléculas com proteínas e em estudos que visam o desenvolvimento/ melhoramento de fármacos (114, 160-163, 166-169). A técnica permite a medida direta do calor trocado durante a ligação de uma pequena molécula à proteína alvo, por exemplo, assim levando à determinação, dentre outras coisas, da variação de entalpia do processo, da constante de afinidade e da estequiometria da reação. Destes parâmetros, são calculados a variação da entropia



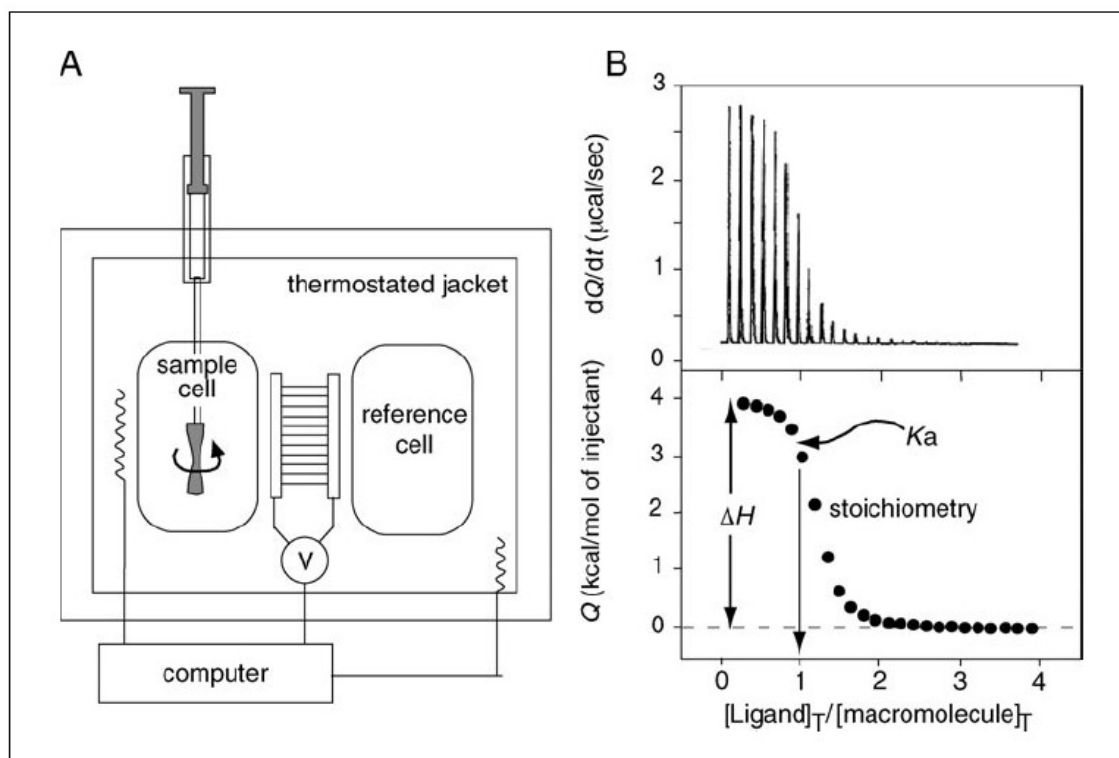
e da energia livre de Gibbs, obtendo-se assim, a descrição termodinâmica completa da reação (166, 170). Além disto, o mecanismo de interação da pequena molécula com os sítios da proteína, no caso de  $n > 1$ , pode também ser explorado.

Os equipamentos de ITC foram finamente elaborados para que estas medidas fossem possíveis. A amostra – geralmente uma solução contendo a proteína de interesse – é colocada em uma cela denominada “cela da amostra”. Uma outra cela contendo uma solução de referência – tampão da amostra ou água – é mantida nas mesmas condições da cela da amostra. Uma seringa – geralmente contendo a pequena molécula teste em solução idêntica à da proteína – é acoplada ao sistema, estando em contato com a cela da amostra. Injeções de alíquotas do ligante são realizadas, sendo estas controladas por um computador acoplado ao sistema. O sistema contendo estas duas celas e a seringa é termicamente isolado por uma jaqueta adiabática.

Anteriormente ao início da titulação, o sistema é equilibrado sendo que uma energia fixa é aplicada pelo equipamento para manter as duas celas na mesma temperatura (linha de base). A titulação do ligante na proteína é realizada por injeções de volume fixo e conhecido. A adição do ligante (L) à cela contendo a amostra (M) faz com que o complexo (ML) seja formado, sendo a formação de ML dependente da constante de associação ( $K_a$ ) e das concentrações de M e L. A formação de ML é acompanhada por liberação (reações exotérmicas) ou absorção (reações endotérmicas) de calor. O calor liberado ou absorvido após cada injeção é medido com grande precisão, através de um mecanismo de compensação de energia que o equipamento deve realizar para manter a cela da amostra e a cela de referência exatamente na mesma temperatura. Assim, se a interação da pequena molécula com a proteína é exotérmica, o sistema deverá adicionar menos energia à cela de amostra que à cela de referência, dando um sinal negativo; o contrário ocorre em casos de interação endotérmica.

Após cada injeção, o equilíbrio do sistema é re-estabelecido e as diferenças de temperatura entre a cela de amostra e de referência são nulas (retornam aos valores da linha de base). A integração dos picos de cada injeção retorna os valores da quantidade de calor trocado durante cada injeção. Ao longo da titulação os sítios da proteína na cela começam a ficar saturados e a quantidade de calor resultante de cada injeção vai diminuindo até que somente o calor de diluição do ligante na

amostra (não específico à ligação) é observado (Figura 3.8).



**Figura 3.8** – Microcalorimetria por titulação istérmica (ITC). **(A)** Esquema do equipamento mostrando a cela de amostra, a cela de referência, a seringa e os sistemas termostático e de resposta acoplados e controlados por computador. **(B)** Exemplo dos dados retornados em um experimento de ITC onde a reação foi endotérmica. O painel superior mostra uma sequência de picos relativos às sucessivas injeções do ligante na seringa. O sinal retornado corresponde às diferenças de compensação de energia realizada pelo equipamento para manter a cela de amostra e de referência na mesma temperatura, em função do tempo. O painel inferior mostra a área de cada pico calculada e normalizada por mol de ligante injetado, em função da razão molar [ligante]/[proteína] correspondente. Utilizando modelos matemáticos apropriados, os parâmetros da ligação ( $K_a$ ,  $\Delta H$ ,  $n$ ) podem ser obtidos – adaptado de Velazquez-Compoy e Freire (2004) (170).

Um experimento controle (na ausência da proteína) é sempre realizado para excluir o calor de diluição do ligante. O volume injetado é finamente controlado pelo equipamento e as concentrações do ligante na seringa e da proteína na cela devem ser conhecidas com precisão, para que se possa realizar os cálculos com segurança.

Os equipamentos de ITC apresentam um sistema especial na cela da amostra que permite que a pressão e o volume da solução de proteína sensível ao equipamento seja constante. Após a injeção da amostra, o excesso de volume –

relativo ao volume injetado – é extravasado para um compartimento não sentido termicamente pelo equipamento. Desta forma, os experimentos de ITC são realizados em temperatura, volume e pressão constantes, sendo que apenas a variação de temperatura relativa à interação do ligante com a proteína é detectada (vale comentar que o calor de diluição do ligante também é percebido, porém isto é levado em consideração e descontado nos cálculos). Por este motivo, as Equações 7 (Primeira Lei da Termodinâmica) e 8 podem ser combinadas (Equação 9) e simplificadas, resultando na Equação 10, válida para processos realizados a pressão constante.

$$\Delta U = q + w \quad (7)$$

$$\Delta H = \Delta U + V\Delta p + p\Delta V \quad (8)$$

$$\Delta H = q - p\Delta V + p\Delta V + \Delta pV \quad (9)$$

$$\Delta H = q_{p,v} \quad (10)$$

Onde:  $\Delta U$ : variação da energia interna do sistema;  $\Delta H$ : variação da entalpia;  $q$  = calor,  $w = -pdV$ ;  $p$  = pressão  $V$  = volume

Assim a variação da entalpia da reação pode ser determinada diretamente por ITC em um único experimento (considerando  $10^4 < K_a < 10^8 \text{ M}^{-1}$ ) (170).

Medindo-se a variação de calor relativa a cada injeção ( $q_i$ ) do ligante pode-se obter os parâmetros  $n$  (estequiometria) e  $K_a$  (constante de associação). Este procedimento é realizado através de ajuste não linear dos dados de ITC, utilizando modelos matemáticos de interação (“sítios idênticos e independentes”, “sítios diferentes e independentes” ou “sítios seqüenciais”), que são baseados nas Equações 11 e 12 (sítios idênticos e independentes) (170).

$$q_i = V \Delta H ([ML]_i - [ML]_{i-1} (1 - v / V)) \quad (11)$$

$$[ML]_i = (1 + n[M]_i K_a + K_a [L]_i - ((1 + n[M]_i K_a + K_a [L]_i)^2 - 4n[M]_i K_a^2 [L]_i)^{1/2}) / 2K_a \quad (12)$$

Onde:  $q_i$ : o calor absorvido ou liberado a cada injeção  $i$ ;  $V$ : volume da cela da amostra sentido pelo equipamento;  $v$ : volume injetado;  $[ML]$ : concentração do complexo formado após a injeção  $i$ ;  $[M]$  concentração total de proteína após a injeção  $i$ ;  $[L]$  concentração total do ligante após a injeção  $i$ .

Ensaio de microcalorimetria por titulação isotérmica (ITC) dos melhores ligantes da TTR testados foram realizados, com o intuito de se determinar os parâmetros termodinâmicos da ligação destas pequenas moléculas com a TTR tipo selvagem e mutante V30M.

Os ensaios de ITC foram realizados seguindo protocolo descrito por Green e colaboradores (2005) (77). Os ensaios foram conduzidos em equipamento VP-ITC (Microcal/ GE Life Sciences), onde a cela continha 1,5 ml de TTR (8-12  $\mu\text{M}$ ) preparada em tampão Tris 25 mM pH 7,5 – 8,5, KCl 100 mM, EDTA 1 mM, DMSO 5% ou 10% EtOH e a seringa continha o ligante a 100-300  $\mu\text{M}$  no mesmo tampão. Houve necessidade de variar o pH nos experimentos, devido à baixa solubilidade de alguns ligantes nas condições experimentais. Soluções estoque dos ligantes foram cuidadosamente preparadas, garantindo-se o correto valor de concentração dos ligantes nos experimentos. A concentração da solução da proteína nos experimentos foi também conferida previamente à realização dos mesmos, através da medida de absorbância a 280 nm.

O equipamento foi lavado previamente à realização dos ensaios e uma titulação teste de água contra água foi realizada, a fim de se verificar a presença de possíveis contaminantes na seringa de titulação e/ou celas experimental e de referência.

As amostras de proteína, de referência e do ligante foram desgaseificadas, para retirada de eventuais bolhas de ar que poderiam interferir nas medidas. Cuidadosamente a solução da proteína foi introduzida na cela experimental e o excesso do volume foi retirado com uma seringa, assim como descrito no manual do equipamento. O mesmo procedimento foi realizado com a solução de referência (solução idêntica à da cela experimental, porém sem a proteína, ou seja, solução tampão mais co-solvente) na cela de referência. A solução do ligante foi introduzida na seringa de titulação conforme descrito no manual do equipamento.

Os parâmetros experimentais foram ajustados no programa de controle do VP-ITC, seguindo o seguinte protocolo: temperatura = 25 °C; agitação = 250 rpm; tempo de pré-titulação = 120 segundos; referência = 10  $\mu\text{cal/s}$ . Além disto, foram introduzidos os valores da concentração do ligante e da proteína, o número, volume e intervalo das injeções. Uma injeção inicial de 2  $\mu\text{L}$  foi realizada e posteriormente

descartada. O ligante foi titulado em injeções de 5-10  $\mu\text{L}$  até obter-se saturação das curvas. O intervalo entre as injeções foi de 2 a 4 minutos, dependendo do tempo de estabilização da troca de calor nas diferentes titulações..

A titulação foi então conduzida com total controle do experimento pelo programa de aquisição do calorímetro VP-ITC. Os valores brutos das titulações foram integrados e, então, usados para ajuste não linear dos dados em modelo de “sítios seqüenciais”, “sítios idênticos e independentes” ou “sítios diferentes e independentes” no programa Origin (versão 7, Oringin Lab). Os valores retornados foram cuidadosamente analisados. Modelos que apresentaram parâmetros estatísticos de ajuste (valores de  $\chi^2/\text{DoF}$  e erro dos parâmetros termodinâmicos) dentro de erro aceitável foram guardados, para posterior comparação com outros resultados experimentais, e, assim, escolha do modelo que melhor explica a interação dos ligantes com a TTR. Este procedimento será discutido em maiores detalhes durante a apresentação dos resultados.

### ***3.6 Cristalização e determinação das estruturas cristalográficas dos complexos TTR:ligantes***

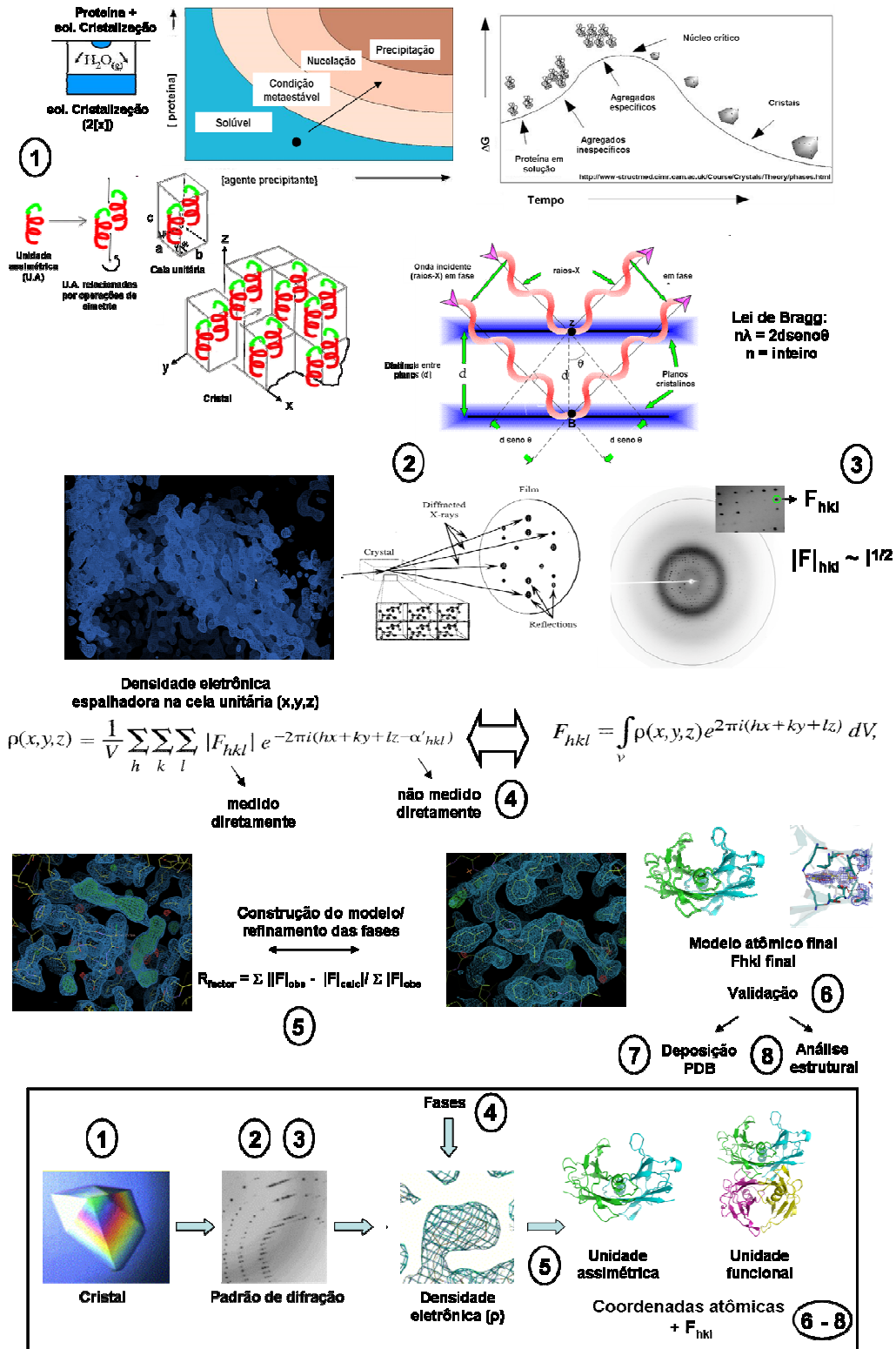
A cristalografia de proteínas vem evoluindo muito nas últimas décadas. Cada vez mais estruturas cristalográficas de alvos biológicos em complexo com pequenas moléculas de interesse farmacêutico vêm sendo determinadas. Estruturas cristalográficas de complexos proteína:ligante mostram grande contribuição para a análise e direcionamento da síntese/ modificação de moléculas em programas de desenvolvimento de fármacos (101, 110, 160). A grande vantagem da cristalografia de proteínas é que a técnica retorna as coordenadas tridimensionais (x, y, z) do complexo, permitindo assim que imagens de alta resolução do mesmo, em 3D, sejam obtidas e analisadas. Desta forma, as interações entre a macromolécula de interesse e o ligante testado podem ser analisadas em detalhes e ao nível atômico. Da mesma maneira, alterações conformacionais induzidas pela ligação de uma pequena molécula à proteína podem também ser exploradas. Além disto, a alocação

de moléculas do solvente e até mesmo orientação e participação de moléculas de água em processos catalíticos de enzimas podem ser investigadas (171-175).

Coordenadas atômicas de estruturas de proteínas, determinadas por difração de raios-X de monocristais, podem ser determinadas em resolução sub-atômica ( $<1.0 \text{ \AA}$ ), mas as resoluções mais freqüentes estão entre 1.7 e 2.5  $\text{\AA}$ . A resolução é um parâmetro sempre buscado pelos cristalógrafos, sendo que quanto maior a resolução (menor as distâncias entre os planos cristalinos, medida em Ångstroms) maior a precisão na posição dos átomos da proteína no modelo atômico gerado, melhor a reconstrução da densidade eletrônica espalhadora do cristal, e assim, os detalhes da interação podem ser analisados com mais precisão. Além disto, o aumento da resolução de uma estrutura cristalográfica permite também a inserção de parâmetros adicionais no refinamento da estrutura, como adição de átomos de hidrogênio e refinamento anisotrópico dos fatores de temperatura, parâmetros estes que podem contribuir para a análise da estrutura e interação entre os átomos da proteína, ligante e solvente.

A resolução da difração por um determinado cristal é dependente da organização interna do mesmo e da estratégia utilizada durante a coleta dos dados (comprimento de onda, distância entre o cristal e o detector, dose de exposição). O segundo ponto (estratégia de coleta) pode ser controlado pelo cristalógrafo dependendo do equipamento que está sendo utilizado; no entanto, o primeiro (organização interna do cristal) nem sempre o é. Para a avaliação de complexos cristalográficos proteína:ligante, é desejado que a estrutura seja determinada a pelo menos 2,5  $\text{\AA}$ , de preferência a resoluções melhores que 2  $\text{\AA}$ , quando possível.

Uma breve apresentação das etapas de determinação de estruturas de proteínas por difração de raios-X de monocristais será realizada utilizando-se o esquema simplificado, mostrado na Figura 3.9. Maiores detalhes da técnica podem ser encontrados em livros técnicos, como o de Drenth (176) e o de Rhodes (177). A definição de alguns termos técnicos usados em cristalografia são apresentados no Apêndice A.



**Figura 3.9** – Representação esquemática resumida das etapas de determinação de estruturas cristalográficas de proteínas por difração de raios-X de mono cristais. (1) Obtenção de cristais; (2) realização do experimento de difração de raios-X; (3) medição das intensidades das reflexões hkl nas imagens de difração = obtenção dos  $|F_{hkl}|$ ; (4) obtenção de fases iniciais (por substituição molecular ou faseamento experimental); (5) construção e refinamento do modelo atômico e refinamento das fases; (6) validação do modelo contra os dados experimentais; (7) deposição das coordenadas atômicas e fatores de estrutura no banco de dados de proteínas (PDB); (8) análise estrutural.

Para a realização de experimentos de difração de raios-X de monocristais e determinação da estrutura cristalográfica da proteína (ou complexos) é necessário, primeiramente, que bons cristais sejam obtidos – etapa 1 na Figura 3.9. Esta etapa é, muitas vezes, uma etapa demorada e até limitante e é proteína-dependente. Para a formação de cristais de proteína, é necessário que uma condição de supersaturação seja atingida. Um diagrama de fases é mostrado esquematicamente na Figura 3.9 e diagramas como este são utilizados para guiar a estratégia de obtenção de cristais de proteínas. A amostra da proteína deve apresentar alto grau de pureza e elevada concentração (geralmente 8-12 mg/ml). As condições do meio são alteradas - adicionando-se agentes precipitantes, variando-se o pH, concentração de sal, de proteína, temperatura, entre outros - para que condições de supersaturação sejam atingidas, sempre desejando-se evitar a agregação desordenada e conseqüentemente a precipitação da proteína em forma não cristalina. Por isto, as condições do meio são alteradas gradativamente, através da utilização de métodos como o de gota suspensa (mostrado na Figura 3.9), gota sentada, capilares, entre outros. Em condições de supersaturação a interação entre as moléculas da proteína é favorecida. Atingindo-se a condição de supersaturação de maneira lenta, os contatos entre as moléculas ocorrem de maneira ordenada, núcleos críticos são formados e o crescimento do cristal ocorre, se bem formado, de modo ordenado e periódico.

O cristal é interpretado matematicamente como uma rede periódica (retículo cristalino), periodicidade, esta que permite reduzir o problema ao conteúdo da “cela unitária”. A cela unitária, por sua vez, é a unidade do cristal, a partir da qual pode-se reconstruir o cristal por operações de translação ao longo de eixos não colineares. Na maioria dos casos, os cristais e, portanto a cela unitária, exibem simetrias, o que permite, ainda, reduzir os dados à chamada “unidade assimétrica” (U. A. – Figura 3.9).

Com bons cristais em mãos, experimentos de difração de raios-X podem, então, ser conduzidos – etapa 2 na Figura 3.9. Nesta etapa, o cristal é exposto a um feixe de raios-X monocromático, com comprimento de onda geralmente na ordem de 0.8-1,6 Å, dependendo da fonte e estratégia de coleta empregada. Os elétrons dos átomos do cristal expostos à radiação vibram e espalham radiação de mesmo comprimento de onda e em todas as direções. Vale salientar que quem interage com



os raios-X são os elétrons, sendo o espalhamento dos núcleos desprezível.

O fenômeno de espalhamento de raios-X por cristais pode ser interpretado a partir da construção de Bragg, onde o cristal atua, em analogia ao espalhamento de luz visível, como uma rede de difração com reflexão especular dos raios-X (Figura 3.9, item 2). O fenômeno de interferência ocorre, e assim pontos de difração são observados como resultado da exposição do cristal à radiação de comprimento de onda próximo ao valor da distância entre os átomos. A observação de um ponto de difração em uma dada direção, chamado também de reflexão, ocorre quando a interferência entre as ondas espalhadas nessa direção é construtiva. Segundo a construção de Bragg, a presença de interferência construtiva, ou observação da reflexão, é dependente de a diferença do caminho percorrido ( $2d\text{sen}\theta$ ) por ondas refletidas por planos de difração ser igual a um número inteiro ( $n$ ), multiplicado pelo comprimento de onda ( $\lambda$ ) (Equação 13). Esta situação é dependente da orientação do cristal em relação ao feixe. Rotacionando o cristal com relação a um eixo fixo ( $\varphi$ ) pode-se colocar novas reflexões hkl em condição de difração e tirar outras reflexões hkl da condição de difração. Este método é chamado de método de rotação (revisado em (178)).

$$n\lambda = 2d\text{sen}\theta \quad (13)$$

Cada reflexão recebe um índice hkl, em uma etapa do processamento dos dados denominada indexação (Apêndice A), relacionado ao espalhamento na direção de um determinado plano cristalino.

Cada reflexão hkl pode ser descrita por um fator de estrutura  $F_{hkl}$  – Equação 14 (177). Nesta equação, a contribuição de cada átomo  $j$  depende de sua natureza (tipo de átomo: C, N, O, etc. – o que define  $f$ : a amplitude da contribuição, sendo  $f_j$ : o fator de espalhamento atômico = amplitude da onda espalhada pelo átomo) e sua posição ( $x, y, z$ ) na cela unitária. Todos os átomos na cela unitária contribuem para  $F_{hkl}$ .

$$F_{hkl} = \sum_{j=1}^n f_j e^{2\pi i(hx + ky + lz)} \quad (14)$$

Alternativamente,  $F_{hkl}$  pode ser expresso em função da contribuição de cada elemento de volume de densidade eletrônica  $\rho$  na cela unitária  $(x, y, z)$  (Equação 15).

$$F_{hkl} = \int_V \rho(x, y, z) e^{2\pi i(hx + ky + lz)} dV \quad (15)$$

O padrão de difração pode ser descrito matematicamente como a transformada de Fourier da densidade eletrônica do cristal. Da mesma forma,  $F_{hkl}$  seria a transformada de Fourier de  $\rho(x, y, z)$  num conjunto de planos reais  $hkl$  (177), sendo a densidade eletrônica na cela unitária descrita pela transformada de Fourier inversa – Equação 16:

$$\rho(x, y, z) = 1/V \sum_h \sum_k \sum_l F_{hkl} e^{-2\pi i(hx + ky + lz)} \quad (16)$$

Após o processamento dos dados (indexação, integração e escalonamento) – etapa 3 da Figura 3.9 – descrito em mais detalhes no Apêndice A, as informações contidas nas imagens de difração são reduzidas a uma lista de reflexões  $hkl$ , suas intensidades médias e erros associados. As intensidades  $hkl$  são então convertidas em módulo do fator de estrutura ( $|F_{hkl}|$ ), através da relação  $I \sim (|F_{hkl}|)^2$ . Como fica evidente na Equação 17,  $F_{hkl}$  é um número complexo, com módulo e fase.  $|F_{hkl}|$  é relacionado à amplitude de  $F_{hkl}$  e  $\alpha$  sua fase (Equação 17) (177).

$$F_{hkl} = |F_{hkl}| e^{i\alpha} \quad (17)$$

A fase  $\alpha$  de  $F_{hkl}$  não pode ser medida diretamente em um experimento de difração. A recuperação das fases é um problema na cristalografia, bem como em qualquer outro experimento de espalhamento, porém existe uma série de métodos que podem ser aplicados para recuperação das fases, tais como substituição molecular, espalhamento anômalo e substituição isomórfica. Para a reconstituição da densidade eletrônica da cela unitária ( $\rho(x,y,z)$ ), é necessário que se tenha as

amplitudes e as fases dos fatores de estrutura  $F_{hkl}$  – Equação 18.

$$\rho(x, y, z) = 1/V \sum_h \sum_k \sum_l |F_{hkl}| e^{-2\pi i(hx + ky + lz - \alpha'_l)} \quad (18)$$

Onde:  $\alpha'_l = \alpha / 2\pi$ ;  $\alpha$  = fase de cada reflexão hkl (177).

Se a estrutura da proteína em análise, ou de uma proteína com similaridade estrutural – geralmente refletida por identidade de sequência primária > 30% - é conhecida, pode-se utilizar os  $|F_{hkl}|$  medidos da proteína em análise e as fases do modelo similar como uma estimativa inicial das fases da estrutura de interesse. Esta é a base do método de substituição molecular. No caso de análise de complexos cristalográficos proteína:ligante esta estratégia pode ser facilmente aplicada, já que complexos determinados com diferentes ligantes apresentarão poucas diferenças estruturais, salvo raras exceções. Conhecendo-se as amplitudes (medido diretamente no experimento de difração) e tendo-se boas estimativas iniciais das fases dos  $F_{hkl}$  (proveniente de uma estrutura 3D conhecida, no caso de substituição molecular) pode-se calcular a densidade eletrônica em cada unidade de volume da cela unitária. No entanto esta estimativa inicial de densidade eletrônica é ruidosa, devido à má qualidade das fases iniciais. Por isto há necessidade de refinamento destas fases.

A partir de um mapa de densidade eletrônica inicial pode-se iniciar o processo de construção de um modelo atômico. Pontos de alta densidade eletrônica estão relacionados à posição dos átomos da proteína na cela unitária, assim um modelo atômico inicial pode ser construído. Aplicando-se as Equações 14 e 18 recalcula-se os  $|F_{hkl}|$  calculados ( $|F_{hkl}|_{calc}$ ) a partir do modelo atômico e fases iniciais e compara-se os  $|F_{hkl}|_{calc}$  aos  $|F_{hkl}|_{obs}$ .

O modelo atômico é refinado, aplicando-se restrições geométricas e pesos adequados, para melhoramento das fases, visando diminuir as diferenças entre  $|F_{hkl}|_{obs}$  e  $|F_{hkl}|_{calc}$ . Normalmente, são usados, como guia, dois mapas de densidade eletrônica:  $2F_{obs} - F_{calc}$  e  $F_{obs} - F_{calc}$ . Este último é chamado de “mapa de diferença”, pois reflete a diferença do que foi observado (reflexões medidas) e o que é calculado a partir do modelo sob refinamento, ainda imperfeito. Os parâmetros estatísticos

$R_{\text{factor}}$  e  $R_{\text{free}}$  (Equação 19) são também utilizados para guiar o refinamento do modelo.  $R_{\text{factor}}$  leva em consideração ~95% dos  $|F_{\text{hkl}}|$  e  $R_{\text{free}}$  5% dos  $|F_{\text{hkl}}|$  medidos. Os 5% das reflexões separadas para  $R_{\text{free}}$  são selecionadas randomicamente e não são utilizadas no processo de refinamento, formando assim um conjunto teste.

$$R_{\text{factor}} = \frac{\sum ||F|_{\text{obs}} - |F|_{\text{calc}}|}{\sum |F|_{\text{obs}}} \quad (19)$$

As estruturas cristalográficas dos complexos TTRwt e mutante V30M com os melhores inibidores identificados foram determinadas. Estes dados são importantes, pois permitem: a análise dos principais contatos realizados pelos diferentes ligantes com a proteína; posterior comparação dos contatos TTR:ligante com dados de inibição da agregação e parâmetros termodinâmicos da interação; verificação das alterações conformacionais na proteína provocadas pela interação dos ligantes; determinação das bases moleculares da cooperatividade entre os dois sítios de ligação a hormônio da TTR; e análise estrutural da estabilidade do tetrâmero da TTR proporcionada pela ligação de pequenas moléculas à esta proteína.

### 3.6.1 Ensaios de cristalização

Ensaios de cristalização da TTR foram realizados inicialmente com a TTR selvagem e posteriormente com a mutante V30M na forma apo. Uma busca por condições de cristalização foi realizada, inicialmente, a partir de condições de cristalização da TTRwt identificadas pelo Prof. Dr. Maurício Trombaili R. Lima da Faculdade de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, UFRJ, colaborador desse projeto, bem como de dados disponíveis na literatura (101-103). Concomitantemente, foram testadas condições de cristalização apresentadas nos kits comerciais 'The PEG's suite' (Nextal, Qiagen) e no kit 'Crystal Screen I e II' – Hampton Research. Os ensaios foram realizados em câmara de cristalização a 18°C.

As gotas de cristalização foram montadas em placas de cristalização, utilizando sistema de gota suspensa. Cada gota era composta por 1  $\mu\text{L}$  de TTR a 85-170  $\mu\text{M}$  (5-10 mg/ml) e 1  $\mu\text{l}$  da solução de cristalização. As gotas foram montadas em lamínulas siliconizadas e equilibradas contra 500  $\mu\text{l}$  da solução de cristalização no poço.

Cristais de apoTTR foram observados após 1-4 dias em condições que continham sulfato de amônio, PEG400 ou PEG 3350 como agente precipitante. Os cristais foram submetidos a experimentos de difração iniciais no anôdo rotatório Rigaku Ultra X18, com detector mar345dtb, montado no CBME-IFSC/USP. Estes dados mostraram que a TTR cristalizada em diferentes condições experimentais apresentavam qualidade de difração razoável, porém os dados ainda podiam ser melhorados. Alguns cristais apresentaram redes de difração múltipla, e ou resolução maior que 2  $\text{Å}$ . Foi também observado a presença de anéis de gelo nas imagens de difração iniciais.

Desta forma, soluções crio-protetoras foram testadas de acordo com o descrito por Garman e McSweeney (2007) (179). As condições de cristalização foram refinadas, e após algumas tentativas foram obtidos bons padrões de difração por cristais de TTR, obtidos na condição de cristalização HEPES 100 mM pH 7.0-8.5; PEG400 24-30%; cloreto de cálcio 200 mM. Previamente aos experimentos de difração, o cristal foi rapidamente lavado com uma solução contendo os componentes da solução de cristalização, mais 10 % de etileno glicol ou glicerol como agentes crio-protetores.

A formação de complexos cristalinos de TTR:ligantes foi testada utilizando-se, inicialmente, a técnica de *soaking*. O procedimento de *soaking* com os ligantes selecionados foi realizado por incubação do cristal, previamente formado, com uma solução do ligante a 1-2 mM (dissolvido inicialmente em DMSO) em solução de cristalização, sendo a concentração de DMSO final igual a 5-10%. O cristal foi mantido na solução de *soaking* por pelo menos 1 semana, previamente à coleta dos dados.

Uma técnica alternativa para a obtenção de complexos TTR:ligantes, a co-cristalização, também foi utilizada. Os co-cristais de TTR:ligantes foram obtidos por pré-incubação de 85-170  $\mu\text{M}$  de TTR com 1-2 mM dos ligantes, em 5-10% de

DMSO. Esta solução foi mantida por pelo menos 3 horas a 18° C, sendo em seguida montadas as gotas de cristalização. Co-cristais de TTR em complexo com os ligantes selecionados foram obtidos após 1-3 dias, nas condições de cristalização contendo PEG400 como agente precipitante, assim como descrito acima.

### *3.6.2 Coleta de dados de difração de raios-X e processamento de dados*

Os cristais e co-cristais de TTRwt e V30M foram submetidos a experimentos de difração de raios-X, os quais foram realizados no anôdo rotatório do IFSC (Rigaku Ultra X18, com detector mar345dtb) ou nas linhas de luz MX1 (180), e MX2 (181), com detectores mar345dtb e marMosaic225, respectivamente; no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Campinas, SP. Imagens de difração foram coletadas utilizando-se o método de rotação. Em todos os experimentos de difração o seguinte protocolo foi seguido:

- 1) Obtenção de imagens de difração iniciais:
  - a. teste de dose/ tempo de exposição do cristal à radiação e determinação aproximada da resolução da difração;
  - b. análise da difração nas diferentes faces do cristal;
  - c. indexação do padrão de difração (programa iMosflm (182))
  - d. estratégia de coleta (programa iMosflm (182) e/ou HKL200 (183)).
- 2) Análise da qualidade da difração:
  - a. resolução melhor que 2,5 Å;
  - b. boa forma das reflexões;
  - c. rede de difração única
  - d. bom posicionamento dos eixos cristalinos no feixe;
  - e. mosaicidade;
  - f. dose de exposição e tempo de equipamento disponível para atingir a completeza dos dados.
- 3) Ajuste dos parâmetros de coleta:

- a. análise dos parâmetros de estratégia de coleta;
  - b. re-alinhamento do cristal no feixe (quando necessário);
  - c. coleta dos dados.
- 4) Integração inicial das reflexões nas primeiras 10-20 graus coletados e análise da resolução, sobreposição das reflexões, relação  $I/\sigma$  (corte de resolução  $I/\sigma < 2$ ), etc..

Após a coleta das imagens de difração, as reflexões em todas as imagens foram integradas e escalonadas, usando o programa iMosflm (182) ou HKL2000 (183). A distribuição das intensidades e o grupo espacial foi checado usando os programas phenix.xtriage (184) e Pointless (185), respectivamente.

Como a estrutura cristalográfica da TTR humana já tinha sido determinada, as fases foram recuperadas por substituição molecular, usando-se a estrutura da TTRwt na forma apo, determinada por Hornberg e colaboradores (2000), código PDB 1F41.

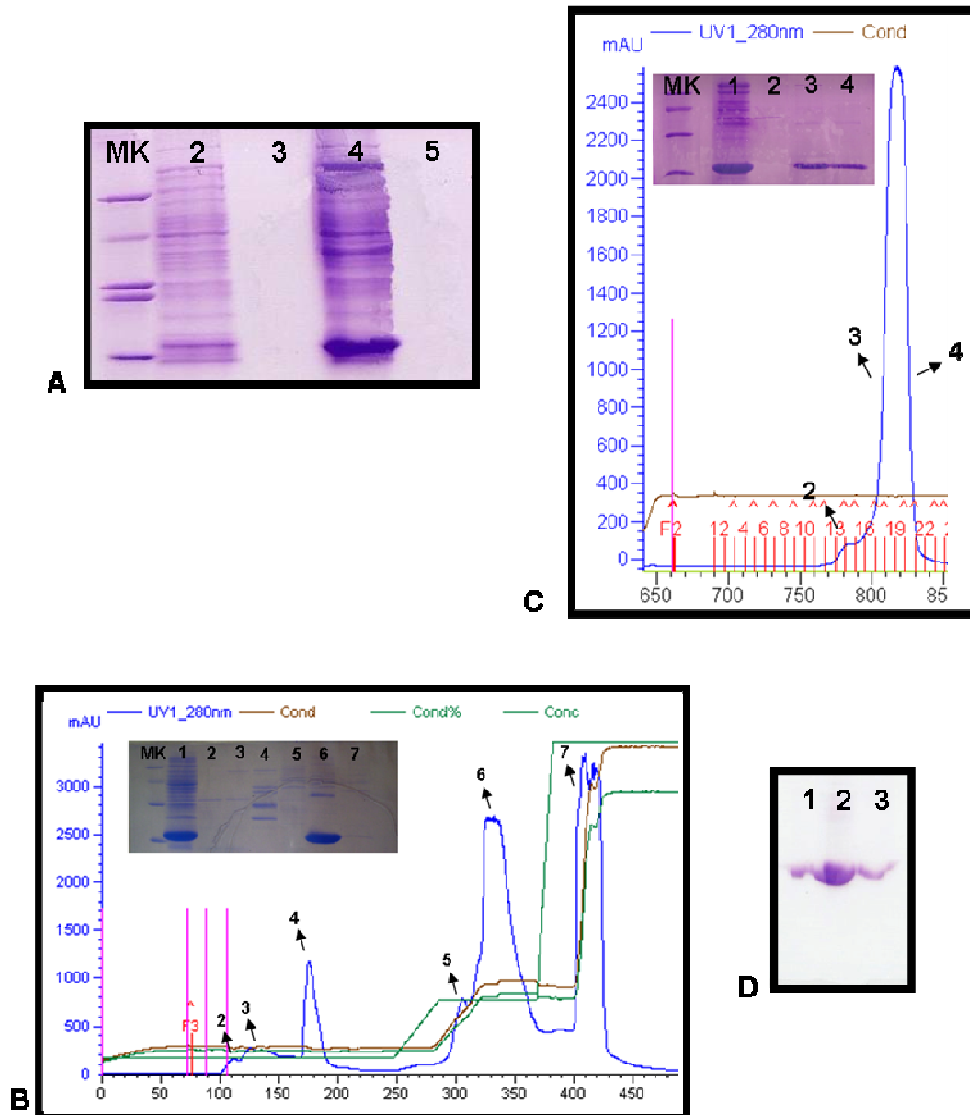
O modelo inicial foi refinado no espaço real utilizando-se o programa Coot (186), seguido de ciclos de refinamento por máxima verossimilhança, com restrição de geometria, usando-se o programa Refmac5 (187).

Inicialmente, foram coletados dados de difração, utilizando cristais TTRwt:ligantes obtidos por *soaking*, porém raramente pôde-se observar boa densidade eletrônica relativa ao ligante. Posteriormente, foram coletados cristais TTRwt:ligantes obtidos por co-cristalização, onde pôde-se observar excelente densidade eletrônica para a maioria dos ligantes testados. Na maioria dos casos, foi necessária a coleta de mais de um conjunto de dados, para a obtenção de bons complexos cristalográficos TTR:ligantes.

## **4 Expressão, purificação e cristalização da TTR**

A expressão e a purificação da proteína TTR tipo selvagem e da variante mutante V30M foram conduzidas de acordo com a demanda por estas amostras. Cromatogramas representativos das etapas de purificação são mostrados na Figura 4.1, em conjunto com os géis PAGE/SDS de alíquotas das amostras coletadas nas diferentes etapas de expressão e purificação.



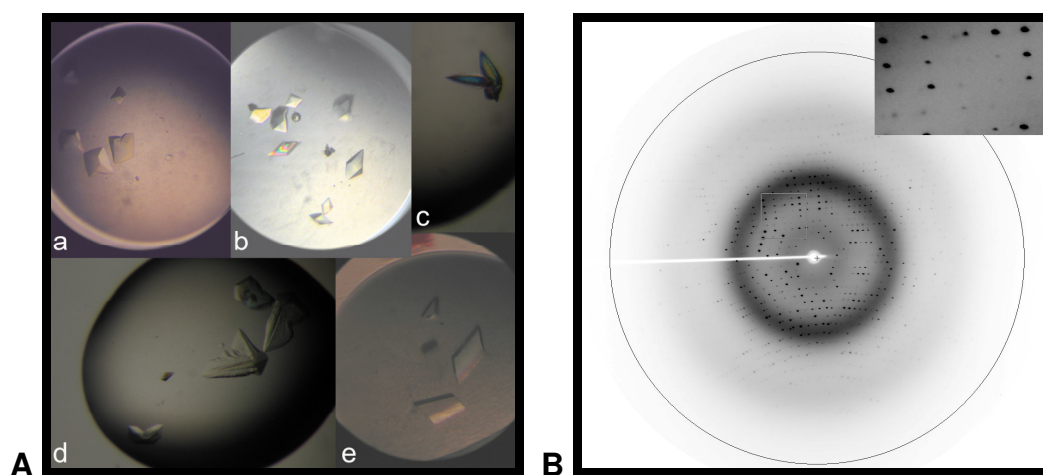


**Figura 4.1** – Acompanhamento das etapas de expressão e purificação da TTR por eletroforese – em gel desnaturante (a, b e c) e gel nativo (d). **(A)** Cultura de células de *E. coli* BL21 DE3 transformadas com plasmídeo de expressão da TTR: pré indução: raia 2: células e raia 3: sobrenadante; pós indução: raia 4: células e raia 5: sobrenadante. **(B)** Cromatografia de troca iônica (IEC): raia 1: amostra injetada; raias 2-7: picos (A280) de eluição Source 30Q, conforme indicado no cromatograma. **(C)** Cromatografia de exclusão molecular: raia 1: amostra injetada, raias 2-4 picos eluição SD75, conforme indicado no cromatograma. Marcador de massa molecular (MK): albumina soro bovina (66Kda), ovoalbumina (45 Kda), anidrase carbônica bovina(29Kda), inibidor de tripsina de soja (24Kda) e citocromo C (13Kda). **(D)** Gel nativo, amostras eluídas da gel filtração e concentradas em concentrador Centricon® (filtro com corte de 10 kDa), diferentes volumes da amostra foram aplicados ao gel (1, 4 e 2  $\mu$ l).

Pode-se verificar a expressão basal das proteínas bacterianas anteriormente à indução da expressão da TTR com IPTG; seguido de aumento significativo da expressão de uma proteína com banda em PAGE/SDS em torno de 14 kDa, relativa ao monômero da TTR, após a adição de IPTG ao meio de cultura (Figura 4.1A). Esta proteína foi mantida no interior das células bacterianas até que a lise celular foi

realizada. Esta amostra foi submetida às etapas de cromatografia de troca iônica (IEC), após a lise celular e precipitação com 40 e 90 % de sulfato de amônio. A Figura 4.1B mostra um cromatograma de IEC típico, onde os picos 2-5 e 7 mostram a retirada de contaminantes da amostra e o pico 6 a TTR com certo grau de pureza. No entanto, um contaminante de ~ 35 kDa ainda estava presente. Assim, uma nova etapa de purificação, por cromatografia de exclusão molecular foi realizada (Figura 4.1C). Nesta última etapa de purificação o contaminante é separado quase que completamente da amostra da TTR, garantindo a obtenção de amostras de TTR com alto grau de pureza. Após estas etapas de purificação era sempre calculado o rendimento da expressão/ purificação. Em média a TTRwt dava 40 miligramas de TTR purificada por litro de cultura de bactéria, enquanto a mutante V30M dava 20-30 mg/l. Estas amostras foram concentradas até ~10 mg/ ml e armazenadas.

Ensaio de cristalização foram conduzidos com a proteína purificada, na presença e ausência de inibidores da agregação da TTR. Cristais típicos são mostrados na Figura 4.2.



**Figura 4.2** – Exemplos de cristais e co-cristais TTR e TTR:ligantes obtidos. **(A)**: (A.a) cristais de apoV30M obtidos na condição de PEG400; (A.b.) co-cristais de TTRwt:genisteína obtidos na condição de PEG400 otimizada; e cristais de apoTTRwt obtidos inicialmente nas condições de cristalização contendo (A.c) PEG400; (A.d) PEG3350 e (A.e) sulfato de amônio como agente precipitante. **(B)** Padrão de difração de co-cristal TTRwt:genisteína coletado na linha MX1 – LNLS.

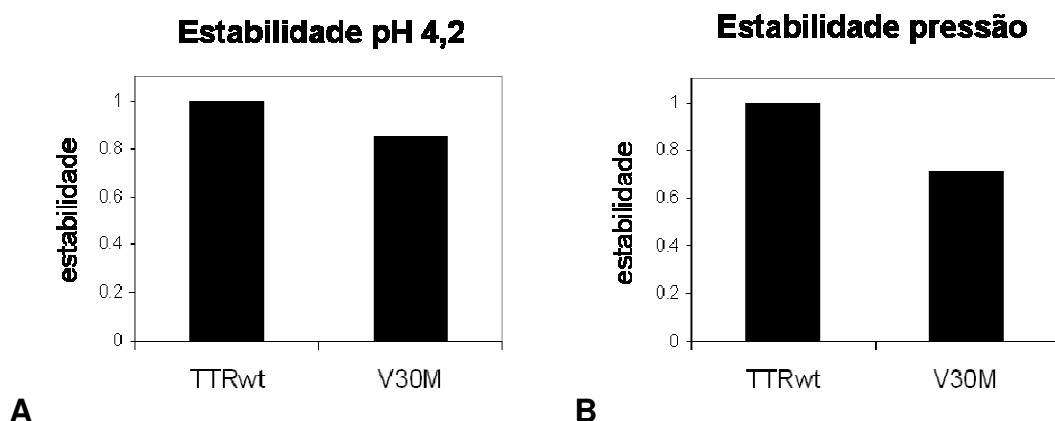
Estes cristais mostravam dimensões de 0,1-0,4 mm no eixo de maior comprimento. Em geral, os cristais da apoTTR apresentavam faces “enrugadas” e

ramificações. Assim, era necessário selecionar cristais de faces mais uniformes e realizar um procedimento de separação de múltiplos cristais. Os cristais apresentavam boa resistência a choque mecânico, não sendo enfrentadas grandes dificuldades durante este procedimento. A Figura 4.2B mostra uma imagem de difração típica destes cristais, após a adição de agente crio-protetor.

## **5 Análise da TTR selvagem e mutante V30M na forma apo**

Na presente tese serão analisadas a TTR tipo selvagem e mutante V30M. Assim, é importante que se faça uma caracterização destas proteínas, apontando as principais diferenças estruturais e de estabilidade entre estas duas formas de TTR.

Ensaio de agregação em pH ácido e curvas de alta pressão hidrostática (HHP) foram conduzidos com a TTRwt e com a mutante V30M na forma apo. Assim como já reportado em outros estudos (5, 25, 135), a TTR mutante V30M apresenta menor estabilidade sob pressão e em pH ácido que a TTRwt – Figura 5.1.



**Figura 5.1** – Estabilidade da TTR mutante V30M em relação à TTRwt em (A) pH ácido e (B) sob pressão. Os dados foram normalizados em função dos valores apresentados pela apoTTRwt.

Alguns trabalhos já haviam comparado a estrutura da TTRwt e da mutante V30M na forma apo (66, 68, 188). No entanto, nestes estudos foi dada mais atenção a alterações globais nestas proteínas e foram utilizadas estruturas cristalizadas em diferentes condições de cristalização (inclusive diferentes pHs). Além disto, a estrutura “apo” de Hornberg et al. (66) (PDB ID: 1F41) apresenta densidade eletrônica significativa nos dois canais de ligação ao T<sub>4</sub>, indicando a presença de algum ligante, que, por algum motivo não especificado, foi ignorada. Em outros trabalhos, reportando estruturas da TTR com e sem ligante, esta estrutura da TTRwt “apo” foi também utilizada para comparação, provavelmente por desconhecimento deste fato pelos pesquisadores. Isto atrasou e complicou um pouco as análises de comparação das estruturas apo/ holo das TTR estudadas na presente tese, bem como as comparações da TTR selvagem com a TTR mutante V30M. Além disto, a única estrutura da mutante V30M na forma apo disponível no PDB até 2008 foi cristalizada em pH 5,0, condição que pode influenciar alterações conformacionais no tetrâmero da TTR (189, 190), prejudicando, assim, as comparações desta estrutura com estruturas de TTR na forma holo, ou em comparação com a TTR selvagem.

Assim, cristais da V30M na forma apo foram crescidos em pH 7,5 e sua estrutura foi determinada no presente trabalho (PDB ID: 3KGS). As estatísticas da coleta e processamento destes dados de difração são mostradas na Tabela 5.1. Todas as análises estruturais envolvendo apoTTR reportadas aqui foram realizadas com esta estrutura da apoV30M e com uma estrutura da apoTTRwt (PDB ID: 3CFM), disponibilizada pelo Prof. Dr. Maurício T.R.Lima (191). Esta estrutura da apoTTRwt foi cristalizada nas mesmas condições experimentais que as estruturas que serão

discutidas na presente tese e, mais importante, determinada inequivocamente na ausência de ligante.

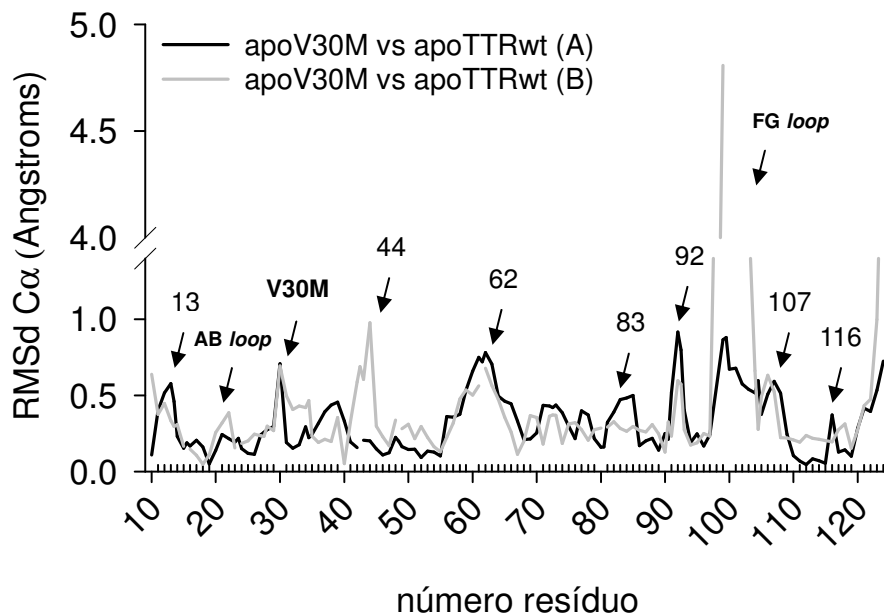
**Tabela 5.1** – Estatísticas da coleta e processamento dos dados de difração de raios-X da mutante V30M na forma apo. Os números em parênteses indicam os valores na faixa de mais alta resolução.

Parâmetro/ estrutura cristalográfica	apoV30M
Comprimento de onda (Å)	1,46
Grupo espacial	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2
Cela unitária (Å)	43,39 85,46 64,23
Faixa de resolução (Å)	22,10-1,80
Faixa de alta resolução (Å)	1,85-1,80
Reflexões no conjunto de trabalho	21153
Reflexões no conjunto teste	1432
R-fator*	0,199 (0,243)
R-livre**	0,248 (0,344)
Completeza (%)	97,5 (91,9)
Redundância	3,7 (3,7)
I/σ médio	14,5 (2,90)
RMS de comprimento de ligação (Å)	0,009
RMS de ângulos de ligação (°)	1,38
B-fator médio (Å <sup>2</sup> )	20,45
Ramachandran outliers	0/226

\* R-fator =  $\sum hkl \frac{(|F_o| - |F_c|)}{\sum (F_o)}$ , para o conjunto de trabalho, correspondendo a 95% dos dados.

\*\* R-livre =  $\sum hkl \frac{(|F_o| - |F_c|)}{\sum (F_o)}$ , para o conjunto teste, correspondendo a 5% dos dados, selecionados aleatoriamente.

A unidade assimétrica das estruturas da TTR determinadas em grupo espacial P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2 apresentam um dímero (formado pelas cadeias A e B) na unidade assimétrica. Assim, os tetrâmeros da apoV30M e da apoTTRwt (PDB ID 3CFM) foram gerados e comparados. Inicialmente foi realizada a sobreposição dos átomos (C $\alpha$ , cadeia principal e todos os átomos) destas estruturas, utilizando-se o programa Superpose (192). O resultado destas sobreposições é mostrado na Figura 5.2 em forma de gráfico (RMSd VS número resíduo) e em forma de tabela, na Tabela 5.2.



**Figura 5.2** – Raiz média quadrada (RMS) do deslocamento em XYZ dos átomos de carbono alfa na estrutura cristalográfica da apoV30M em comparação com apoTTRwt. A sobreposição das cadeias “A” é mostrada em preto, enquanto a das cadeias “B” em cinza. O número dos resíduos, ou *loops* relativos aos picos de RMSd são apontados.

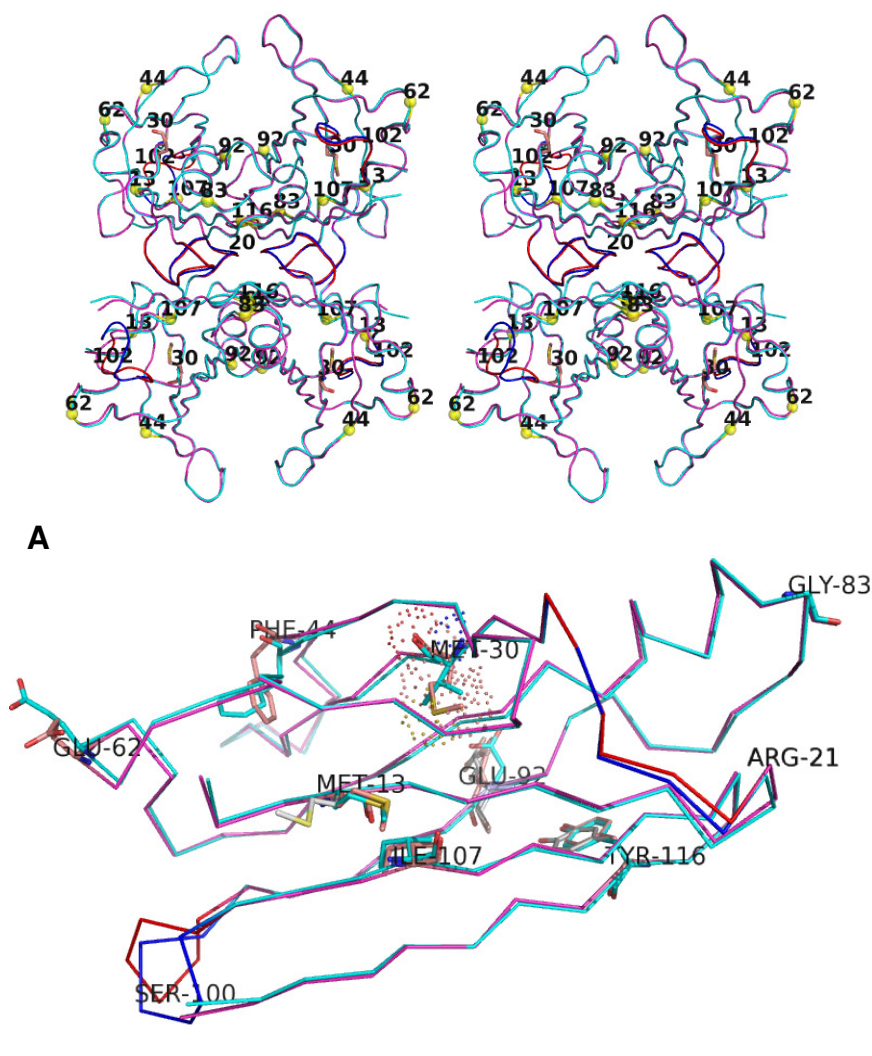
A comparação da apoTTRwt com a apoV30M mostrou que estas proteínas são diferentes, porém as alterações estruturais introduzidas pela mutação Met30 são sutis – animação 1 (Apêndice B).

**Tabela 5.2** – Raiz média quadrada (RMS) do deslocamento em XYZ dos átomos na estrutura cristalográfica da apoTTRwt em comparação com apoV30M.

Estruturas cristalográficas sobrepostas	apoTTRwt vs apoV30M (RMSd)
Átomos C $\alpha$ (Å)	0,55
Átomos da cadeia principal (Å)	0,60
Todos os átomos (Å)	1,31

Analisando em detalhes os picos de RMSd em conjunto com a inspeção visual destas estruturas, pode-se perceber que a introdução de um resíduo mais volumoso, no caso Met30, entre as folhas beta dos monômeros da V30M gera movimentos locais na estrutura. Estes movimentos são propagados em direção às extremidades do monômero (Figura 5.3). Estas alterações influenciam a interface de dimerização (região das fitas-beta *F* e *H*, representada por Glu92 e Tyr116, respectivamente) e de tetramerização (*AB loop* e região pós hélice, representados

por Val20 e Gly83, respectivamente), e os sítios de interação com ligantes (fitas-beta internas A, G e H, representados por Met13, Ile107 e Tyr116). Além disto, o *loop DE* (resíduo 63) e a fita C (resíduo 44) também são afetados.

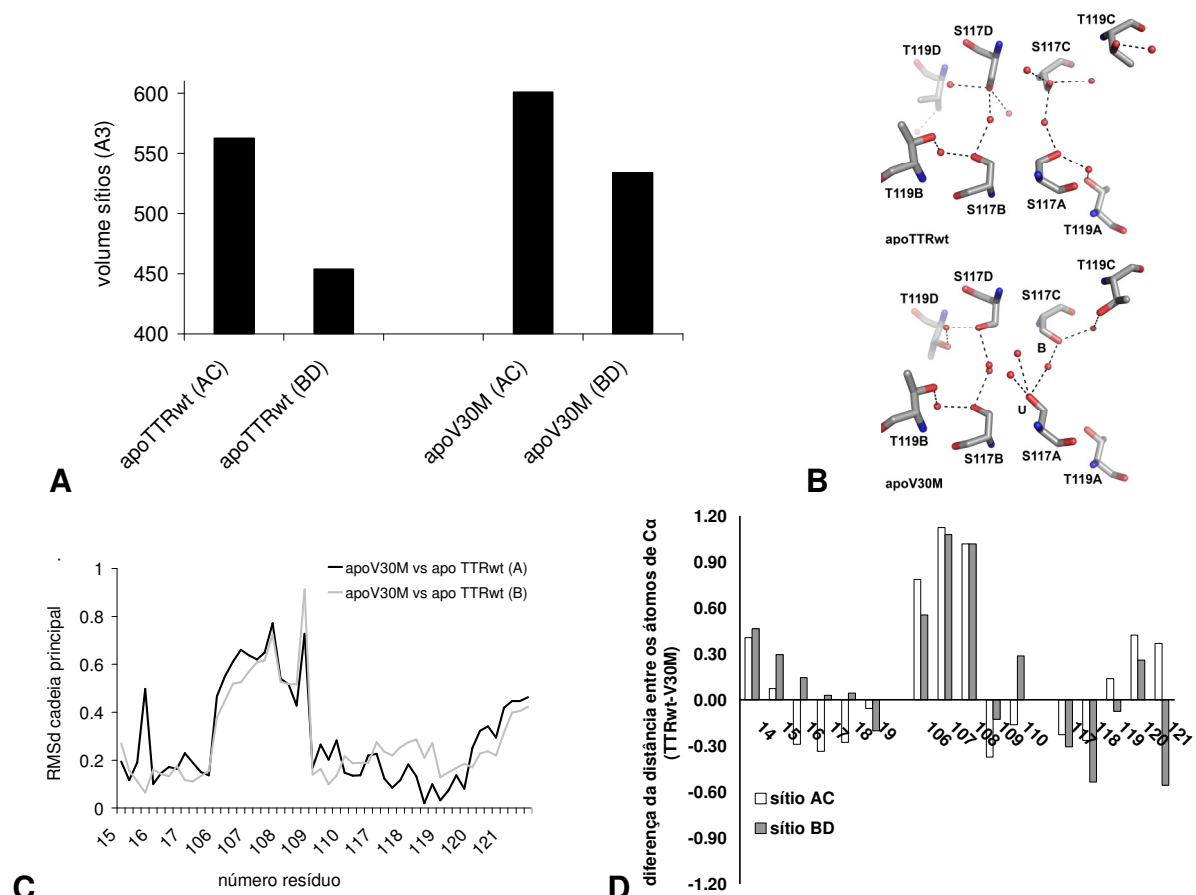


**Figura 5.3** – Alterações estruturais introduzidas pela mutação Val30 → Met. **(A)** O tetramero da apoTTRwt (em ciano) e da apoV30M (em magenta) foram sobrepostos e uma figura estéreo é mostrada. Os Cα dos resíduos de aminoácido, relativos aos picos de RMSd, são indicados em esferas amarelas, numeradas de acordo com a numeração destes aminoácidos nas estruturas cristalográficas. **(B)** Um monômero foi selecionado (cadeia B) para apresentação em melhores detalhes. Os resíduos de aminoácido indicados em **A** são mostrados em bastões. Os *loops AB* e *FG* são mostrados em vermelho (apoV30M) e azul (apoTTRwt) para destaque. As figuras foram geradas com o programa Pymol (DeLano Scientific).

Vale lembrar que o deslocamento da fita C e da fita D da TTR foi implicada nas vias de agregação e formação de fibras amilóides desta proteína (73). Além disto, mutações agressivas da TTR (como a L55P) ocorrem nesta região, sendo esta considerada um *hotspot* para amiloidoses de TTR (18, 45, 122). Assim, as alterações estruturais observadas no *loop DE* e na fita C da mutante V30M podem estar



relacionadas a instabilidades das fitas *CD*, as quais protegem a região externa do tetrâmero da TTR. Não menos importantes, as alterações observadas nas interfaces de dimerização e tetramerização devem influenciar a estabilidade tetramérica da mutante V30M. Foi observado que esta mutante de TTR dissocia mais facilmente que a variante selvagem (5, 193, 194). Assim sendo, a presença da mutação Met30 parece influenciar a estrutura do tetrâmero, afetando os contatos entre as subunidades monoméricas e a estabilidade das fitas-beta externas, diminuindo, assim, a estabilidade do tetrâmero e facilitando a dissociação e agregação desta proteína.



**Figura 5.4** – Modificações estruturais no sítio de ligação introduzidas pela mutação V30M. **(A)** Volume das cavidades calculado no servidor CASTp (195). **(B)** Alteração da conformação da cadeia lateral de Ser117 (Ser117u) na estrutura tetramérica da mutante V30M. Apenas o fundo dos sítios da apoTTRwt e da apoV30M são mostrados. As figuras foram geradas com o programa Pymol (DeLano Scientific) **(C)** RMSd dos átomos da cadeia principal da apoV30M, quando sobreposta à apoTTRwt. As estruturas foram sobrepostas com o programa Superpose (192). **(D)** Diferença entre as distâncias medidas entre os  $C\alpha$  equivalentes (ex.: distância entre Lys15A e Lys15C no sítio AC da apoTTRwt) dos resíduos que compõe os sítios da apoTTRwt e da apoV30M. As distâncias foram calculadas a partir das coordenadas atômicas destas duas estruturas, e a diferença entre as distâncias medidas nos sítios da apoTTRwt foram subtraídas das mesmas distâncias medidas nos sítios da apoV30M. Este procedimento foi realizado de acordo com o descrito por Neumann e colaboradores (196).

Mutações, mesmo que não localizadas no sítio de ligação, podem resultar em modulação do reconhecimento de ligantes pela proteína mutada (revisado em (197)). Assim, os sítios de interação com hormônio da TTRwt e mutante V30M foram analisados em maiores detalhes, a fim de investigar e caracterizar possíveis alterações de forma e posicionamento de cadeias laterais nos sítios da mutante V30M, que poderiam afetar a interação de ligantes com esta proteína (Figura 5.4 e Figura 5.5).

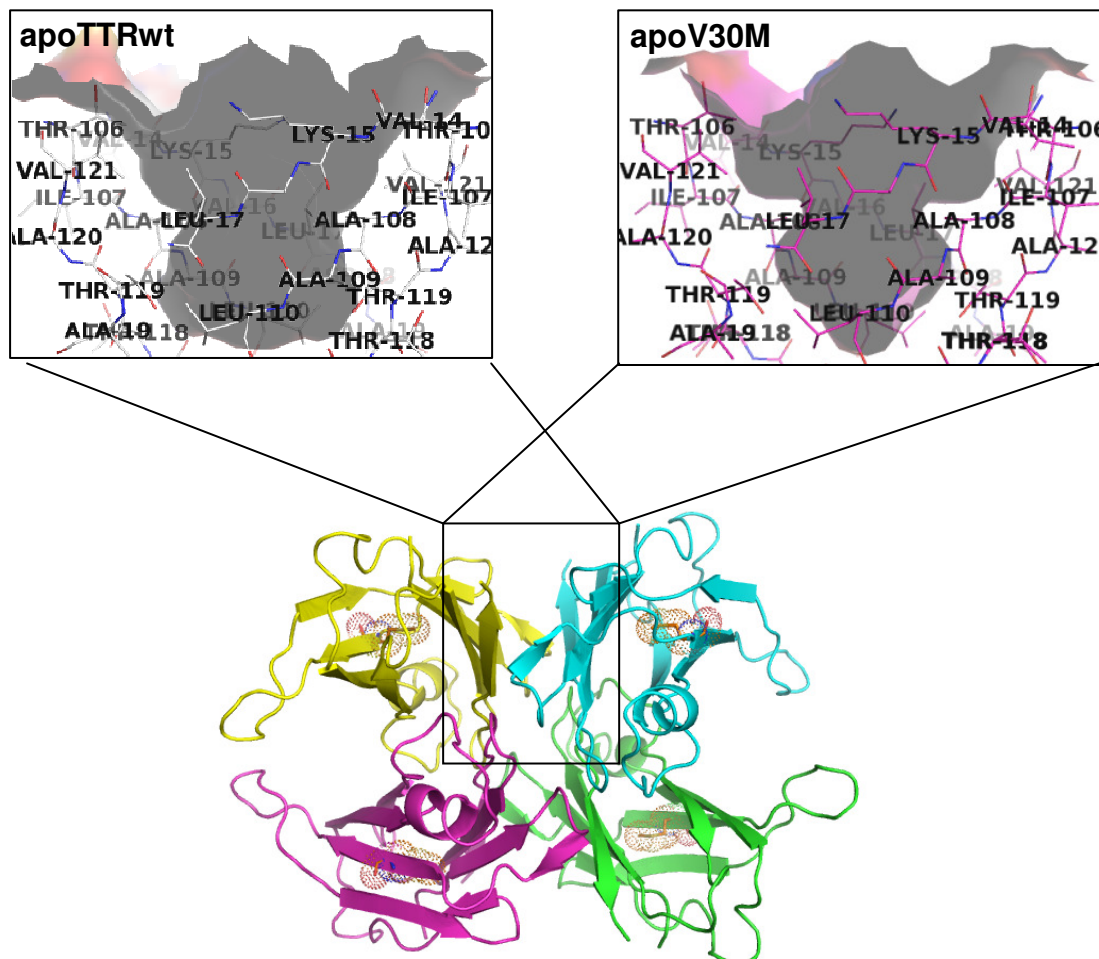
Primeiramente, foi verificado que as cavidades da V30M apresentam maior volume que as cavidades da TTRwt ( $\Delta \sim 100 \text{ \AA}^3$ ) - Figura 5.4A. Foram também encontradas diferenças na forma destes canais de ligação (Figura 5.4C e Figura 5.5), principalmente próximo ao resíduo 107.

Analisando as distâncias entre os resíduos equivalentes que compõe cada sítio de ligação da TTR, foi verificado que a mutação gera o deslocamento da cadeia principal dos resíduos 106-109 (região central da cavidade), em direção ao centro do canal de ligação a hormônio. No entanto, os demais resíduos do sítio (14-19 - entrada; 117-121 - fundo) são deslocados para a direção oposta (Figura 5.3D). Assim, o sítio da mutante V30M apresenta maior volume na entrada da cavidade, enquanto a região central é mais estreita que o sítio da TTRwt (Figura 5.4). A mutação fica logo atrás da fita *G* (resíduos 106-109), e a presença de Met30 parece forçar a região central desta fita em direção ao sítio de ligação, enquanto suas extremidades, bem como a da fita *A* e *H* são deslocadas em direção oposta. Estas são as causas aparentes da modificação da forma do sítio da TTR induzida pela mutação Met30. Estas alterações estruturais podem afetar a interação desta TTR mutante com ligantes, assim como sugerido para a ligação do  $T_4$  (68, 126).

Uma análise mais detalhada das cadeias laterais dos resíduos que compõe os sítios de ligação da TTR tipo selvagem e da mutante V30M, na forma apo, foi realizada. Esta análise mostrou que o resíduo Ser117 em um dos sítios da apoV30M apresenta uma conformação voltada para o centro do tetrâmero, para o lado oposto do canal Figura 5.4B, e assim foi denominada Ser117u. Esta conformação foi observada em todas as estruturas da apoV30M disponíveis e não foi observada nas estruturas da apoTTRwt, indicando que é decorrência da mutação Met30.

Por outro lado, foi reportado que a conformação Ser117u é observada e

induzida por ligantes que posicionam grupos apolares no fundo do sítio da TTRwt (98, 101). Quando esta conformação é induzida nos dois sítios do tetrâmero simultaneamente, as Ser117u voltadas para o centro do tetrâmero podem interagir através de suas cadeias laterais, ou por intermédio de moléculas de água, formando assim, uma nova interação que pode aumentar a estabilidade da estrutura quaternária da TTR. No entanto, apenas um dos sítios da apoV30M apresentou a conformação Ser117u (canal AC) e não foi observado nenhum indício de que, no outro canal (canal BD), esta conformação de Ser117 poderia estar presente, assim a conformação Ser117u encontrada na apoV30M não parece ter influências positivas na estabilidade do tetrâmero.



**Figura 5.4** – Tetrâmero da apoV30M com destaque para um dos sítios de ligação. O tetrâmero da apoV30M é mostrado em modelo de *cartoon*, com as subunidades monoméricas coloridas individualmente. A mutação Met30 é mostrada em bastões e circundada por pontos. A região do sítio de ligação é destacada e ampliada no painel superior. A superfície do sítio de ligação, delimitada pelos resíduos da TTR 14-19, 106-110 e 117-121 é mostrada. O sítio da apoTTRwt (PDB ID: 3CFM) é mostrado para comparação. As figuras foram geradas com o programa Pymol (DeLano Scientific).

Em resumo, esta análise detalhada das estruturas da apoTTR tipo selvagem e mutante V30M indicam que, apesar de sutis, existem diferenças entre estas duas formas de TTR analisadas. Estas podem influenciar a estabilidade das formas diméricas e tetrâméricas, além da interação desta proteína com ligantes. Estes resultados serão utilizados para posterior comparação com as estruturas da TTR com ligantes, as quais serão apresentadas nos capítulos seguintes.



---

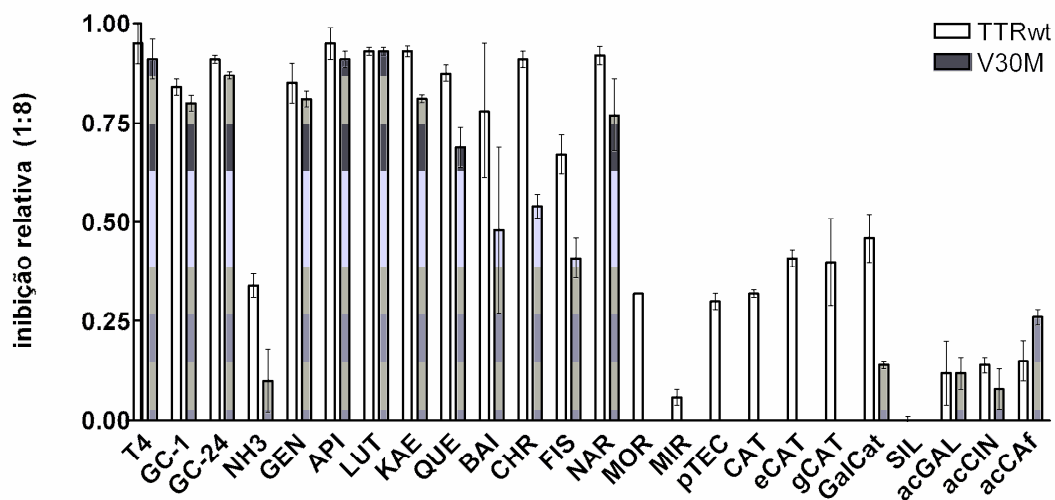
## 6 Ensaio de agregação da TTR

Ensaio inicial de agregação *in vitro* da TTRwt e mutante V30M foram conduzidos em concentração única das pequenas moléculas (razão molar proteína:ligante = 1:8), para triagem dos melhores inibidores. Estes ensaios também visavam a investigação de diferenças de inibição, proporcionada pela interação destas moléculas, entre a TTRwt e a V30M.

Os resultados mostraram bastante diferença de inibição relativa (IR) entre os ligantes testados, bem como entre a TTRwt e a mutante V30M.

As flavonas apigenina (API) e luteolina (LUT), a isoflavona genisteína (GEN) e os análogos do hormônio tireoideano GC-1 e GC-24, mostraram-se inibidores eficazes da agregação da TTRwt e da mutante V30M nestes ensaios iniciais (Figura 6.1). A flavona crisina (CHR), a flavanona naringenina (NAR) e os flavonóis

quercetina (QUE) e kaenferol (KAE) apresentaram alta inibição da TTR tipo selvagem, porém moderada inibição da mutante V30M (Figura 6.1 e Tabela 6.1). Os outros flavonóis, fiseteina (FIS) e baicaleína (BAI), mostraram-se inibidores moderados, enquanto as catequinas, a MOR, a pTER, a SIL e os ácidos orgânicos mostraram-se inibidores fracos das duas formas de TTR analisadas. Estes experimentos foram também conduzidos na presença do ligante natural da TTR, o T<sub>4</sub>, para comparação. – Figura 6.1.



**Figura 6.1** – Inibição da agregação *in vitro* da TTR tipo selvagem (TTRwt) e mutante V30M conduzidos em concentração única (1:8) dos potenciais inibidores. Os valores de média e desvio padrão da inibição relativa (IR = agregação da TTR na presença do ligante/ agregação da apoTTR) de cada um dos ligantes testados são mostrados e foram calculados a partir de 2-3 experimentos independentes conduzidos em duplicatas. Valores iguais a 1 indicam 100% de inibição, enquanto valores iguais a zero indicam 0% de inibição da agregação da TTR mediada por pH ácido.

Os análogos sintéticos do T<sub>3</sub>, GC-1 e GC-24, apresentaram inibição da TTR comparável à genisteína e ao ligante natural T<sub>4</sub>, respectivamente. Além disto, a inibição da mutante V30M por estes ligantes foi bastante similar ao observado para a proteína selvagem (TTRwt) – Figura 6.1. No entanto, GC-24 mostrou maior inibição da agregação da TTR que seu análogo estrutural GC-1. GC-1 e GC-24 diferem por seus substituintes em posição 3' (GC-1 = 3' isopropil; GC-24 = 3' benzil). Assim, a maior inibição promovida por GC-24 em comparação ao GC-1 indica a importância de substituintes volumosos e hidrofóbicos na posição 3' destas moléculas para ligação ao sítio da TTR e/ou inibição da agregação desta proteína. O outro análogo estrutural do T<sub>3</sub>, o NH<sub>3</sub>, apresentou baixa inibição da TTRwt (IR < 0,40) e baixíssima

inibição da mutante V30M ( $IR < 0,20$ ). Estes dados indicam que a presença de substituintes volumosos, simultaneamente, em posição 3' e 5' de análogos do ligante natural  $T_4$  são desfavoráveis para a ligação ao sítio da TTR. Estes efeitos são ainda mais evidentes para a mutante V30M. Em conjunto, esta primeira análise, dos efeitos de inibição da agregação da TTR por análogos estruturais do  $T_4$ , sugere que as moléculas contendo substituintes volumosos apenas em posição 3' são capazes de serem acomodadas de maneira similar no sítio da TTRwt e da mutante V30M. No entanto, a introdução de substituintes volumosos na posição 5' destes ligantes, gera, além de menor eficácia de inibição, diferenças mais acentuadas entre a TTR selvagem e a variante mutante V30M.

Dentre o grupo dos flavonóides, as flavonas API e LUT apresentaram os maiores valores de inibição relativa em 8 vezes de excesso do ligante, sendo que a inibição da agregação conferida por estas flavonas foi bastante similar ao observado para o ligante natural  $T_4$ . Estes resultados mostram que API e LUT são inibidores eficazes tanto da TTRwt quanto da mutante V30M. Além disto, estas flavonas apresentaram inibição relativa da agregação da TTR superior ao observado para a isoflavona GEN. Este fato é interessante, pois a diferença estrutural entre GEN e API é a posição do anel B e o sítio da TTR é simétrico. Sendo assim, estes resultados podem refletir diferente acomodação da porção equivalente (anéis A e C) destes ligantes no sítio simétrico da TTR, como consequência da alteração da posição do anel B. Se isso for mesmo verdade, poderiam ocorrer diferentes interações entre o ligante e a proteína, ou ainda diferentes rearranjos conformacionais proporcionados pela interação de flavonas e isoflavonas com a TTR.

Os flavonóis KAE e QUE mostraram alta inibição da TTRwt porém seu efeito para a mutante V30M foi inferior. Os demais flavonóis testados (FIS, MOR e MIR) apresentaram-se inibidores mais fracos da TTRwt e muito fracos da mutante. Os flavonóis apresentam uma hidroxila adicional na posição 3 do anel C. Como estes ligantes não se mostraram bons inibidores da agregação da V30M, mesmo em altas concentrações, é muito provável que a presença da hidroxila na posição 3 nestas moléculas prejudique a interação das mesmas com o sítio da mutante TTR, diminuindo sua afinidade por esta proteína. Adicionalmente, a presença da hidroxila na posição 2' da MOR e da hidroxila na posição 5' da MIR parece contribuir negativamente para a interação, pois estes dois flavonóis apresentaram baixa



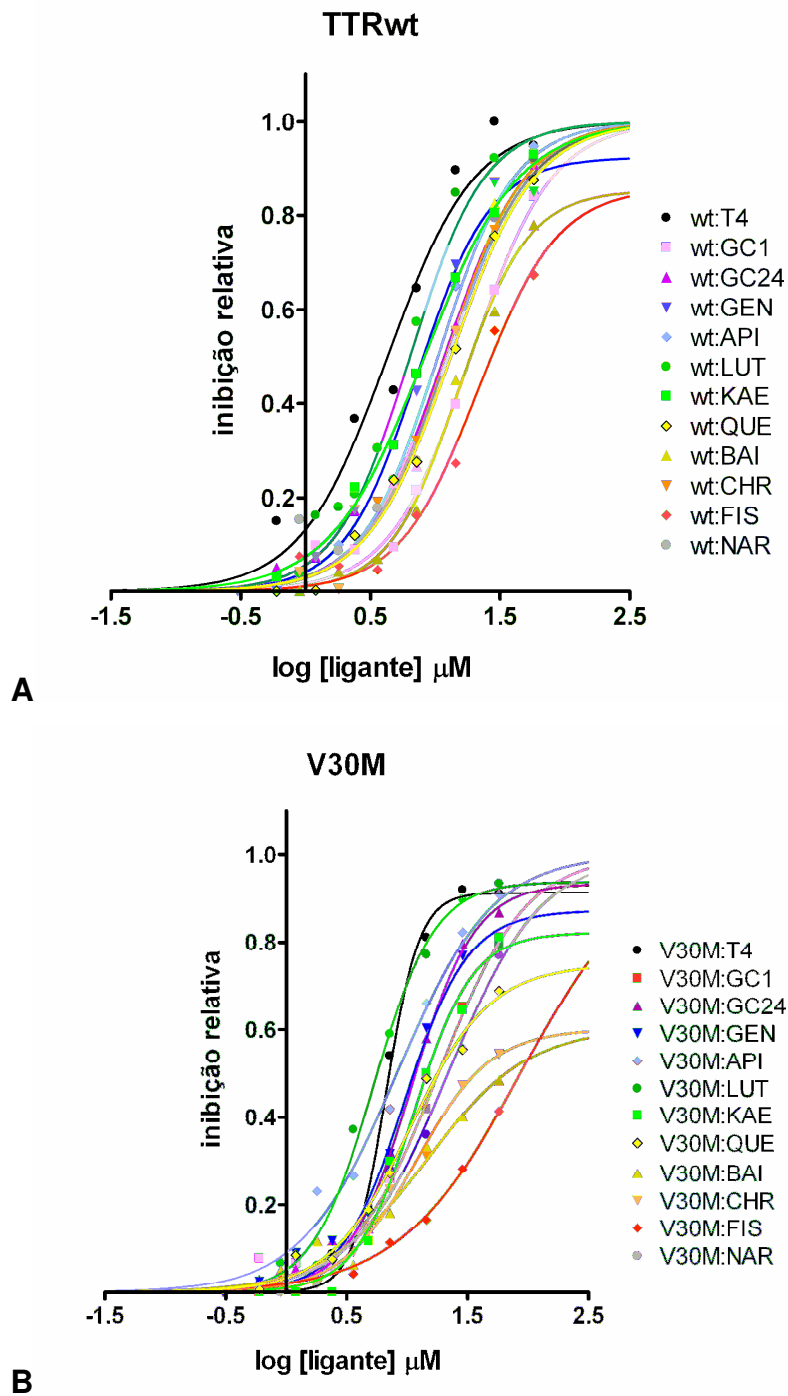
capacidade de inibição da TTR *in vitro* e são estruturalmente similares ao KAE e à QUE, com exceção destas hidroxilas. A hidroxila na posição 5 (ausente em FIS) parece também ser importante para a interação, já que FIS apresentou menor inibição que seu análogo estrutural QUE - Figura 6.1.

A flavanona NAR e a flavona CHR mostraram inibição da TTRwt, porém seu efeito para a mutante foi também inferior. A flavanona não apresenta insaturação do anel C e a flavona não apresenta a hidroxila em posição 4'. Estas diferenças químico/estruturais parecem também afetar a ligação à mutante V30M, porém as razões para tais diferenças ainda são obscuras.

As catequinas (CAT, GalCAT, gCAT e eCAT) e a silibinina (SIL) apresentaram baixa inibição da TTR, indicando que a presença da carbonila no anel C e/ou a planaridade da ligação do anel C com o anel B são importantes para a ligação de flavonóides à TTR. No entanto, a presença de substituintes volumosos, presentes no GalCat e SIL, apresenta, em primeira análise, contribuição neutra ou favorável, no caso de GalCat, e desfavorável, no caso de SIL, para a interação com o sítio da TTR – Figura 6.1.

Com exceção de GEN, API e LUT, os outros flavonóides apresentaram-se claramente melhores inibidores da TTR tipo selvagem do que da mutante V30M, por razão ainda não muito evidente. No entanto, estas diferenças de inibição, entre as duas variantes de TTR analisadas, devem estar embasadas nas diferenças observadas entre as apoTTRs, como: estreitamento do centro do canal da V30M, aumento de volume do sítio da V30M, rotação da cadeia lateral de Ser117u (capítulo 5). Este fato foi investigado e será discutido em detalhes nas próximas seções.

Curvas de agregação, conduzidas em diferentes concentrações dos ligantes (0,3 a 57,6  $\mu\text{M}$ ), foram realizadas com os melhores inibidores da agregação da TTR, identificados nos ensaios de agregação *in vitro* iniciais. O gráfico do ajuste não linear destes dados experimentais por uma equação de dose-resposta é mostrado na Figura 6.2 para melhor comparação do perfil de inibição dos ligantes selecionados. Os valores de IC50, inibição máxima experimental ( $IR_{\text{max}}$ : [ligante] = 57,6  $\mu\text{M}$  (1:8)) e os parâmetros estatísticos do ajuste são mostrados na Tabela 6.1. Os valores de IC50 foram graficados e são mostrados na Figura 6.3 para melhor comparação da potência dos diferentes inibidores.



**Figura 6.2** – Curvas de agregação em pH ácido conduzidas com a TTR tipo selvagem (**A**) e com a mutante V30M (**B**), em presença de diferentes ligantes. Os valores são expressos em inibição relativa (IR) da TTR:ligante em relação à proteína apo, mantida nas mesmas condições experimentais. A concentração da proteína utilizada foi 7,2  $\mu\text{M}$  e dos ligantes 0,3; 0,6; 0,9; 1,2; 2,4; 3,6; 4,8; 7,2; 28,8 e 57,6  $\mu\text{M}$ . Estes experimentos foram realizados em duplicatas e repetidos três vezes com diferentes preparações do ligante e da proteína. Os valores médios de IR experimental são mostrados em símbolos preenchidos em diferentes cores. As curvas experimentais foram ajustadas com a equação de dose-resposta no programa GraphPad Prism (GraphPad, v4) e são mostradas em linhas contínuas.

Com base nos valores de IC<sub>50</sub> e IR<sub>max</sub>, pode-se colocar API, LUT e GC-24 como os melhores inibidores testados (alta potência e alta eficácia), tanto para TTRwt quanto para V30M. CHR, NAR, GEN, KAE e QUE também se mostraram bons inibidores da TTRwt, porém seu efeito não foi o mesmo para a mutante V30M. Vale comentar que LUT mostrou maior potência e eficácia que o ligante natural T<sub>4</sub> para a V30M, apontando este flavonóide como um potencial inibidor da variante amiloidogênica de TTR mais freqüente, a V30M.

**Tabela 6.1** – Parâmetros experimentais e calculados a partir das curvas de agregação *in vitro* da TTRwt e mutante V30M, conduzidas em diferentes concentrações dos ligantes selecionados.

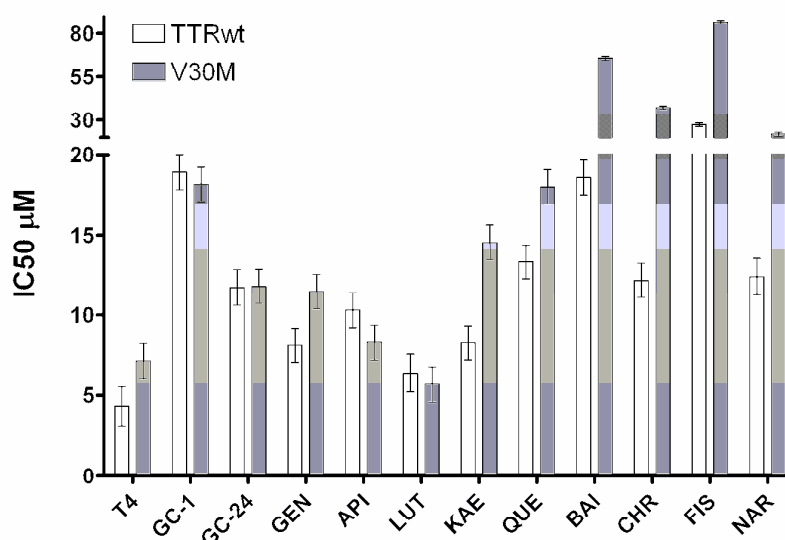
Ligante	IC <sub>50</sub> (µM) <sup>b</sup>	±	r <sup>2</sup> <sup>a</sup>	Irmax <sup>c</sup>	±
<b>TTRwt</b>					
T <sub>4</sub>	4,34	1,20	0,969	0,95	0,05
GC-1	18,92	1,09	0,988	0,84	0,02
GC-24	11,72	1,12	0,984	0,91	0,01
GEN	8,11	1,07	0,994	0,85	0,05
API	10,30	1,08	0,995	0,95	0,04
LUT	6,38	1,17	0,969	0,93	0,01
KAE	8,26	1,06	0,996	0,93	0,01
QUE	13,34	1,07	0,995	0,87	0,02
BAI	18,58	1,07	0,994	0,78	0,17
CHR	12,16	1,08	0,994	0,91	0,02
FIS	27,35	1,10	0,981	0,67	0,05
NAR	12,39	1,16	0,973	0,95	0,02
<b>V30M</b>					
T <sub>4</sub>	7,14	1,08	0,995	0,91	0,05
GC-1	18,16	1,07	0,991	0,80	0,02
GC-24	11,78	1,08	0,993	0,87	0,01
GEN	11,46	1,08	0,991	0,81	0,02
API	8,28	1,10	0,989	0,91	0,02
LUT	5,68	1,10	0,992	0,93	0,01
KAE	14,55	1,09	0,989	0,81	0,01
QUE	17,99	1,07	0,990	0,68	0,05
BAI	65,92	1,09	0,967	0,48	0,21
CHR	37,24	1,06	0,991	0,54	0,03
FIS	86,90	1,03	0,994	0,41	0,05
NAR	21,83	1,09	0,988	0,77	0,09

<sup>a</sup> Parâmetro de qualidade do ajuste não linear dos dados, usando equação de dose-resposta no programa GraphPad (v. 4,0; GraphPAD, San Diego).

<sup>b</sup> Valor da concentração do ligante relativa a IR = 0,5, nas curvas ajustadas.

<sup>c</sup> Valores experimentais de inibição relativa observados nos grupos incubados com 8 vezes de excesso molar dos ligantes. Os valores de média e desvio padrão de três experimentos independentes são mostrados.

Analisando as curvas de agregação e comparando os resultados mostrados para TTRwt e para a mutante V30M, observa-se que a maioria das curvas dos ligantes testados com a mutante V30M apresenta deslocamento para os valores de maior concentração do ligante (eixo x) – deslocamento para a direita - Figura 6.2. Isto reflete menor potência dos ligantes testados para a mutante V30M em relação à TTRwt. Desta forma, os valores de IC50 dos ligantes testados com a V30M foram maiores que os apresentados para os mesmos ligantes testados com a TTRwt, com exceção de LUT, API, GC-1 e GC-24 (Tabela 6.1 e Figura 6.3). Isto pode refletir menor afinidade da maioria dos ligantes para a mutante V30M, assim como já observado para o ligante natural T<sub>4</sub> (68, 188), e deve estar embasado nas diferenças entre os sítios da mutante e da TTR selvagem, assim como apresentado no capítulo 5. No entanto, LUT, API, GC-1 e GC-24 apresentaram valores de IC50 bastante similares para a TTRwt e para a mutante V30M, o que pode indicar modo de interação distinto destes ligantes com o sítio da TTR, em relação aos demais ligantes. Assim, as alterações conformacionais introduzidas pela mutação Met30 não parecem interferir, interferem muito pouco ou até favorecem a ligação de LUT, API, GC-1 e GC-24 à V30M.



**Figura 6.3** – Valores de IC50 mostrados pelos diferentes ligantes nos ensaios de agregação *in vitro* da TTRwt e V30M.

Estes resultados estão de acordo com o observado nos ensaios de agregação iniciais, conduzidos em excesso (8 vezes) dos ligantes, onde foi observado que a inibição relativa da TTRwt foi sempre maior que a inibição da V30M, com exceção de

API, LUT, GC-1 e GC-24. No entanto, apesar de uma boa correlação entre potência ( $IC_{50}$ ) e eficácia ( $IR_{max}$ ) dos ligantes testados para TTRwt e V30M, alguns ligantes que foram considerados como bons inibidores da agregação da TTR ( $IR > 0,85$  em 8 vezes de excesso), como GC-1, GC-24 e NAR, mostraram moderada ou baixa potência de inibição ( $IC_{50} > 10 \mu M$ ) – Tabela 6.1. Estes ligantes de alta eficácia e baixa potência podem apresentar baixa afinidade pelo(s) sítio(s) da TTR, porém a ligação parece bastante eficiente e suficiente para conferir a estabilidade do tetrâmero de TTR.

Foi também observado que alguns ligantes (como GEN, BAI, QUE e CHR (V30M)) não apresentaram tendência de inibição completa da agregação da TTR, porém mostraram inibição similar aos demais ligantes no início das curvas dose-reposta. Duas hipóteses são levantadas para explicar este perfil de curva: 1) a estabilidade do tetrâmero da TTR conferida pela ligação destas moléculas pode depender da ocupação dos dois sítios de ligação da proteína, sendo a ocupação do segundo sítio mais desfavorável; e 2) mesmo após a saturação dos dois sítios da TTR por estes ligantes a agregação ainda é observada, porém em menor grau. Em outras palavras, a ocupação dos sítios da TTR não é, por si, suficiente para promover máxima estabilidade do tetrâmero nestes casos.

No entanto, as bases moleculares que suportam estas observações não podem ser exploradas com base somente nos experimentos de agregação. Desta forma, foram também realizados ensaios de microcalorimetria por titulação isotérmica, para determinar as constantes de afinidade e outros parâmetros termodinâmicos da interação. Além disto, as estruturas cristalográficas da TTR com estes inibidores foram também determinadas. Estas análises, em conjunto visam: investigar em maiores detalhes a interação destas moléculas com a TTR, a identificação de diferenças que possam explicar o desfavorecimento da interação com a mutante V30M, possíveis diferenças de afinidade entre os sítios de ligação e identificação de alterações estruturais promovidas pela interação destas moléculas que poderiam estar envolvidas na estabilidade do tetrâmero. Estes dados serão apresentados e discutidos em detalhes nos próximos capítulos, onde cada grupo de moléculas foi separado para facilitar a comparação, interpretação e discussão dos resultados. Nestes capítulos os resultados aqui apresentados serão novamente comentados e relacionados às informações provenientes das outras técnicas experimentais empregadas.

## **7 Interação da genisteína (GEN) com a TTRwt e mutante V30M**

Outros pesquisadores já haviam proposto a GEN como um potente inibidor da agregação da TTR (77). Como já se sabia, a GEN liga com cooperatividade negativa aos sítios da TTRwt ( $K_{d1} = 40 \pm 25$  nM and  $K_{d2} = 1,4 \pm 0,17$   $\mu$ M (77)). No entanto, o modo de ligação e constantes de afinidade de GEN pela mutante V30M não era conhecida até o momento. Tampouco, as bases moleculares que guiam o processo de cooperatividade da TTRwt era conhecida, apenas algumas especulações estruturais haviam sido delineadas com base em observações de estruturas cristalográficas da TTR em complexo com  $T_4$  e análogos (196).

Desta forma, havia a necessidade de estudar em maiores detalhes a interação da TTR tipo selvagem e da variante amiloidogênica mais freqüente da TTR

– a mutante V30M – com esta isoflavona. Assim, para determinar os parâmetros termodinâmicos da interação da V30M com a isoflavona GEN; foram conduzidos experimentos de microcalorimetria por titulação isotérmica (ITC). Além disto, a fim de buscar informações ao nível molecular que pudessem dar suporte ao processo de cooperatividade negativa apresentado pela TTRwt ao se ligar à GEN, e ao processo de interação de GEN com a mutante V30M, foram determinadas as estruturas cristalográficas da TTRwt e mutante V30M em complexo com GEN. Experimentos de alta pressão hidrostática (HHP) foram também realizados, com a finalidade de verificar a proteção conferida pela GEN aos tetrâmeros de TTRwt e V30M, usando alta pressão como agente perturbador. Estes dados serão apresentados individualmente nas próximas seções, seguido de uma discussão conjunta, relacionando as diferentes técnicas biofísicas utilizadas para a análise da interação da GEN com a TTR, e as conclusões delineadas a partir destas observações experimentais.

### **7.1 Estruturas cristalográficas dos complexos TTRwt:GEN e V30M:GEN**

Os cristais da TTRwt e V30M em complexo com GEN apresentaram bom padrão de difração e alta resolução (1,85-1,95 Å). Os parâmetros de rede foram muito similares aos observados na maioria das estruturas da TTR, na forma apo ou em complexo com ligantes (Tabela 7.1). Os cristais pertencem ao grupo espacial  $P2_12_12$  e apresentam um dímero (monômeros A e B) na unidade assimétrica.

A molécula de GEN foi encontrada nos dois sítios da TTRwt e mutante V30M, posicionada sobre o eixo de simetria de ordem 2. Como o sítio da TTR apresenta duas faces equivalentes (interfaces idênticas e simetricamente relacionadas entre monômero A e C ou B e D), e a GEN é uma molécula assimétrica, quando o tetrâmero de TTR é gerado, duas moléculas de GEN, parcialmente sobrepostas, podem ser observadas em cada um dos sítios da TTR (Figura 7.1), assim como já comentado no capítulo 1. A presença das duas conformações da GEN no sítio da

TTR resulta em diferente orientação de moléculas de água e cadeias laterais de resíduos de aminoácido do sítio da TTR, as quais podem interagir com uma ou outra face do ligante, dependendo da orientação do mesmo no sítio. Desta forma, as duplas conformações de cadeias laterais encontradas no sítio da TTR foram analisadas com muito cuidado, e quando apropriado, inferidas à dupla conformação do ligante.

**Tabela 7.1** – Estatísticas da coleta e processamento dos dados de difração de raios-X dos complexos cristalográficos TTRwt:GEN e V30M:GEN. Os números em parênteses indicam os valores na faixa de mais alta resolução.

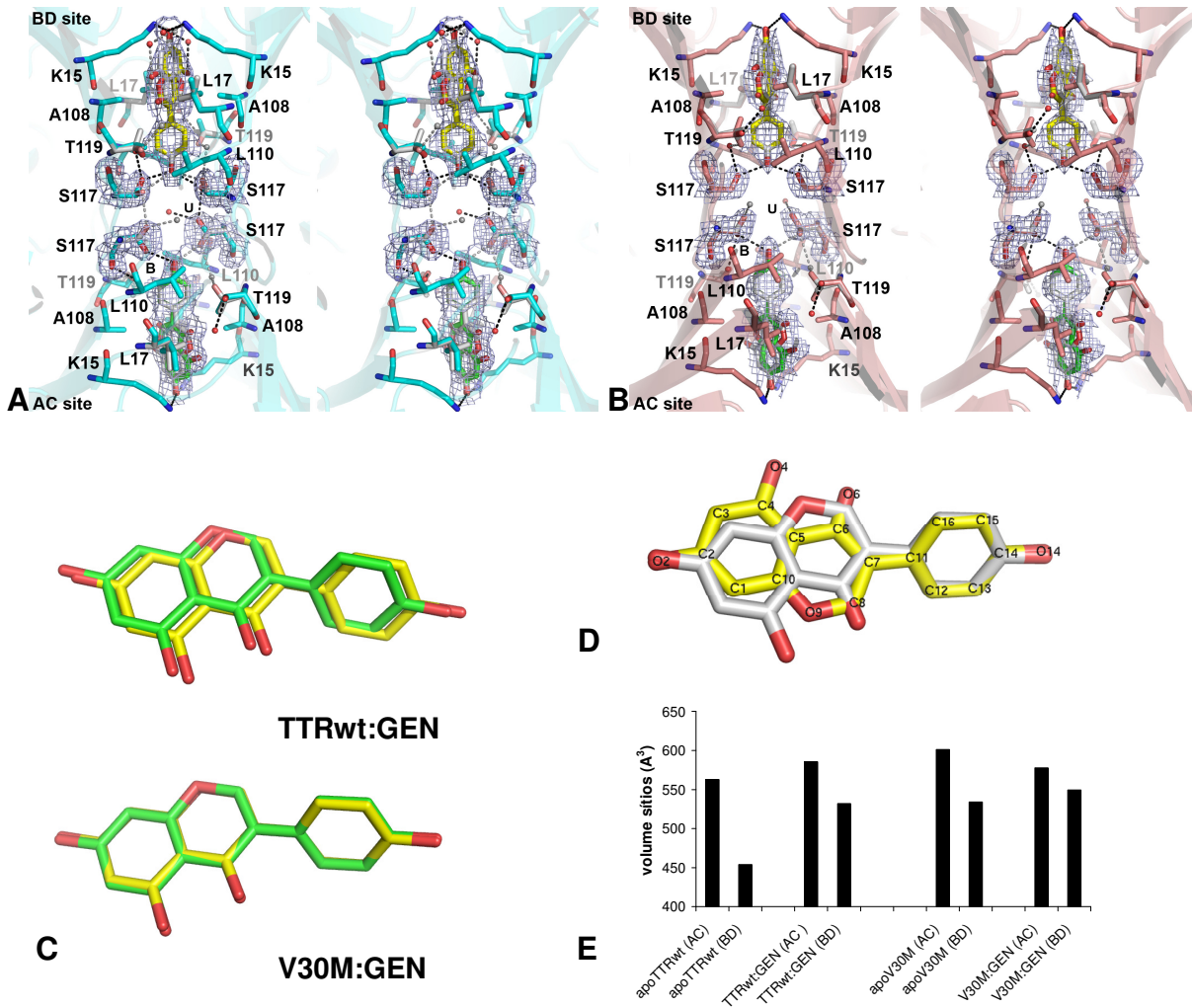
Parâmetro/ estrutura cristalográfica	TTRwt:GEN	V30M:GEN
Comprimento de onda (Å)	1,46	1,46
Grupo espacial	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2
Cela unitária (Å)	43,53 85,35 64,97	43,27 85,07 64,18
Faixa de resolução (Å)	21,40-1,85	28,36-1,95
Faixa de alta resolução (Å)	1,90-1,85	2,00-1,95
Reflexões no conjunto de trabalho	18138	15624
Reflexões no conjunto teste	1035	884
R-fator*	0,198 (0,338)	0,190 (0,226)
R-livre**	0,234 (0,362)	0,236 (0,322)
Completeza (%)	94,6 (89,3)	97,1 (96,6)
Redundância	4,4 (1,3)	4,9 (4,8)
I/σ médio	13,60 (2,40)	11,6 (3,5)
RMS de comprimento de ligação (Å)	0,010	0,014
RMS de ângulos de ligação (°)	1,14	1,50
B-fator médio (Å <sup>2</sup> )	21,1	24,23
Ramachandran outliers	0/226	0/226

\* R-fator =  $\sum hkl (|F_o| - |F_c|) / \sum (F_o)$ , para o conjunto de trabalho, correspondendo a 95% dos dados.

\*\* R-livre =  $\sum hkl (|F_o| - |F_c|) / \sum (F_o)$ , para o conjunto teste, correspondendo a 5% dos dados, selecionados aleatoriamente.

Nos dois sítios dos dois complexos TTR:GEN analisados, o anel fenil de GEN encontra-se voltado para o fundo do canal, em direção à interface de tetramerização. Os grupos hidroxila de GEN desempenham papel importante no reconhecimento deste ligante pela TTR, interagindo com as cadeias laterais de Lys15 e Ser117, localizadas na entrada e fundo do sítio, respectivamente - Figura 7.1. Interações hidrofóbicas são também observadas, entre a porção apolar das cadeias laterais de Leu17, Leu110, Thr119, Lys15 e Ala108 da TTR e a GEN, conforme sugerido pela análise da ligação da GEN à TTRwt e à V30M, realizada usando-se o programa LigPlot (198).





**Figura 7.1** – Análise do sítio de ligação dos complexos cristalográficos TTRwt:GEN e V30M:GEN. **(A)** Figura estéreo mostrando os sítios de interação da TTRwt e **(B)** da mutante V30M com a isoflavona genisteína (GEN). GEN é mostrada em bastões amarelos (sítio 1: BD) e verdes (sítio 2: AC). O mapa de omissão (2Fo-Fc) calculado para o ligante e para o resíduo de aminoácido Ser117 é mostrado, contornado a  $\sigma = 0.5$ . As interações que estabilizam GEN nos sítios da TTR são mostradas em linhas pontilhadas. Para melhor compreensão da figura as duplas conformações, observadas para alguns resíduos da TTR, envolvidas na ligação de GEN, bem como a molécula de GEN simétrica gerada ao longo do eixo Z, são mostradas em bastões cinza. As moléculas de água envolvidas na ligação de GEN são também mostradas. Estas águas foram refinadas com ocupância igual a 0,5, e por esta razão, as águas relacionadas por simetria são mostradas como esferas cinza. As conformações de Ser117 denominadas ligada (*b= bound*) e não ligada (*u= unbound*) estão indicadas. **(C)** Sobreposição das moléculas de GEN encontradas no sítio 1 (amarelo) e sítio 2 (verde) dos complexos cristalográficos TTRwt:GEN e V30M:GEN. **(D)** Estrutura tri-dimensional de GEN, como encontrado no complexo cristalográfico TTRwt:GEN. A molécula de GEN gerada por simetria de ordem 2 é mostrada em cinza. Os átomos estão numerados de acordo com a numeração das coordenadas atômicas dos complexos TTR:GEN. Os átomos de oxigênio são mostrados em vermelho, enquanto os átomos de nitrogênio em azul. As figuras foram geradas com o programa Pymol (De Lano Scientific LLC). **(E)** Volume dos sítios de ligação nas estruturas cristalográficas da TTRwt e mutante V30M na forma apo e em complexo com GEN (PDB IDs: 3CFM (apoTTRwt), 3KGS (apoV30M), 3KGU (TTRwt:GEN) e 3KGT (V30M:GEN)).

Como comentado anteriormente, a interação da GEN com a TTRwt ocorre por um processo de cooperatividade negativa entre os dois sítios do tetrâmero. Como o segundo sítio tem 40 vezes menos afinidade por GEN que o primeiro, verificou-se se esta diferença se refletia nos dados cristalográficos, o que então resultaria em diferenças de fator de temperatura (B-fator) e/ou refinamento da ocupação dos ligantes nos dois sítios da TTRwt. Desta forma, a ocupação da molécula de GEN nas estruturas cristalográficas foi refinada, comparando-se os valores de fator de temperatura, até que estes últimos atingissem valores similares e comparáveis ao B-fator médio dos átomos na estrutura como um todo e/ou bom ajuste nos mapas de densidade eletrônica  $2Fo-Fc$ . O mesmo procedimento foi realizado no refinamento do complexo V30M:GEN. Assim, as moléculas de GEN no sítio BD da TTRwt e V30M apresentaram valores de ocupação maiores (TTRwt = 0,50; V30M = 0,45) que os ligantes nos sítios AC (TTRwt = 0,35; V30M = 0,40) destes complexos. Vale comentar que o mesmo resultado foi obtido realizando-se o procedimento inverso, ou seja, quando a ocupação de GEN foi fixada ( $occ = 0,5$ ) os valores do fator de temperatura médio dos átomos de GEN no canal AC eram sempre maiores que o observado no canal BD. Desta forma, o canal BD foi denominado sítio 1, enquanto o canal AC sítio 2.

Sobrepondo as moléculas de GEN encontradas no sítio 1 e sítio 2 dos complexo cristalográficos TTRwt:GEN e V30M:GEN pode-se observar pouca diferença em relação à posição destas moléculas do ligante nos dois sítios da TTR – Figura 7.1C. Apenas um pequeno deslocamento de GEN, em direção à entrada do sítio, é observado na molécula de GEN ocupando o sítio 2 da TTRwt.

No sítio 1 da TTRwt (canal BD) GEN forma interações fortes com as cadeias laterais de Lys15 e Ser117 dos monômeros B e D da TTRwt, conectando estes dois monômeros. O substituinte em posição 7 da GEN (átomo O2 na estrutura cristalográfica) e da GEN gerada por simetria ocupam praticamente a mesma posição na entrada do sítio 1 da TTRwt e estão em distancias ideais para formar contatos polares com o grupo amino da cadeia lateral de Lys15 da cadeia B e da cadeia D da TTRwt. Esta interação pode ser adicionalmente estabilizada através de uma ligação de hidrogênio com moléculas de água simetricamente dispostas na entrada do sítio 1 ( $H_2O$  #124 e  $H_2O$  #124') - Tabela 7.2.

**Tabela 7.2** – Contatos polares da GEN com o sítio 1 e sítio 2 da TTRwt e V30M, observados nos complexos cristalográficos TTRwt:GEN e V30M:GEN. Os átomos envolvidos nestes contatos e as distâncias medidas na estruturas cristalográficas são apresentados.

resíduo	monômero	átomo	resíduo	monômero	átomo	distância (Å)
<b>TTRwt:GEN</b>						
<i>Sítio 1</i>						
GEN		O2	Lys15	B	NZ	2,77
GEN		O2	Lys15	D	NZ	2,83
GEN		O14	Ser117	B	OG	3,10
GEN		O14	Ser117w	D	OG	2,72
H <sub>2</sub> O #124		O	Lys15	D	NZ	3,49
H <sub>2</sub> O #147		O	Lys15	B	NZ	2,95
GEN		O4	H <sub>2</sub> O #124		O	2,89
H <sub>2</sub> O #41		O	Ser117w	D	OG	3,14
H <sub>2</sub> O #41		O	Thr119w	D	OG1	2,84
H <sub>2</sub> O #42		O	Thr119	D	OG1	2,97
Ser117	B	OG	Ser117u	A	OG	3,07
<i>Sítio 2</i>						
Genistein		O2	Lys15	A	NZ	2,96
Genistein		O2	Lys15	C	NZ	3,11
Genistein		O14	Ser117w	C	OG	2,95
H <sub>2</sub> O #44		O	Ser117w	C	OG	3,00
H <sub>2</sub> O #44		O	Thr119w	C	OG1	3,21
H <sub>2</sub> O #90		O	Thr119	A	OG1	3,08
H <sub>2</sub> O #45		O	Ser117u	A	OG	2,74
<b>V30M:GEN</b>						
<i>Sítio 1</i>						
GEN		O2	Lys15	B	NZ	3,11
GEN		O2	Lys15	D	NZ	3,29
GEN		O14	Ser117	B	OG	2,79
GEN		O14	Ser117	D	OG	2,83
H <sub>2</sub> O #61		O	Ser117	B/D	OG	3,10
H <sub>2</sub> O #61		O	Thr119	B	OG1	2,85
H <sub>2</sub> O #38		O	Thr119	D	OG1	2,86
<i>Sítio 2</i>						
GEN		O2	Lys15	A	NZ	2,96
GEN		O2	Lys15	C	NZ	3,18
GEN		O14	Ser117	C	OG	3,07
H <sub>2</sub> O #62		O	Ser117	A	OG	3,14
H <sub>2</sub> O #62		O	Thr119	A	OG1	2,96
H <sub>2</sub> O #45		O	Ser117u	C	OG	2,82
H <sub>2</sub> O #43		O	Thr119	C	OG1	3,12

No fundo do sítio 1 da TTRwt, as hidroxilas das cadeias laterais de Ser117B e Ser117D também encontram-se em distâncias ótimas para formar interações polares

com GEN (átomo O14). Uma molécula de água foi localizada entre as cadeias laterais de Ser117 e Thr119 nas duas faces do sítio 1 (H<sub>2</sub>O #41 e H<sub>2</sub>O #41'), e foi refinada com ocupação igual a 0,5. Esta molécula de água e sua simétrica são coordenadas pelas hidroxilas de uma das conformações das cadeias laterais de Ser117 e Thr119. Por este motivo, estes rotâmeros foram denominados Ser117w e Thr119w. Vale comentar que as duas conformações de Ser117 no sítio 1 da TTRwt estão em distâncias ótimas para formar interações polares com o ligante GEN. Como a molécula de H<sub>2</sub>O #41 foi refinada com meia ocupação, suspeita-se que a entrada de GEN no sítio provocou o deslocamento desta molécula de água em uma ou outra face do sítio, dependendo da orientação de GEN, e provavelmente este fato é responsável pela dupla conformação de Ser117 e Thr119 (Figura 7.1 e Tabela 7.2).

No sítio 2 da TTRwt (canal AC), o número de contatos polares possíveis entre a proteína e o ligante é menor que no sítio 1. Uma das cadeias laterais de Ser117, no fundo do canal AC, está rotacionada em direção oposta a do ligante, em direção ao sítio 1. Como a GEN interage com as duas Ser117 no sítio 1, e as interações com Ser117 e Lys15 são as principais interações polares da GEN com a TTRwt, há indicativos que esta interação seja importante para a ligação da GEN à TTRwt. No entanto, se uma das hidroxilas da cadeia lateral de Ser117 está distante do ligante, uma interação polar importante é perdida no sítio 2 da TTRwt, enfraquecendo a estabilização da GEN com o segundo sítio da TTRwt. Esta conformação de Ser117 foi também encontrada em um dos sítios da apoV30M, como relatado no capítulo 5, e como este rotâmero limita a formação de contatos polares entre a cadeia lateral de Ser117 e o ligante, foi denominada conformação não ligada (Ser117u; u= *unbound*).

O número e distâncias dos contatos polares, observados no complexo V30M:GEN são bastante similares ao observado no complexo TTRwt:GEN (Tabela 7.2). Contatos fortes são observados entre a GEN e a cadeia lateral de Lys15 na entrada dos sítios da V30M e apenas uma conformação de Ser117 é observada no sítio 1 (a conformação Ser117b) – Figura 7.1B. Assim como observado na estrutura cristalográfica TTRwt:GEN, a conformação Ser117u também está presente no segundo sítio da V30M:GEN (canal AC). A densidade eletrônica relativa às moléculas de água na entrada do sítio 1 da TTRwt:GEN estava muito fraca ou ausente no complexo V30M:GEN, e por este motivo, estas moléculas de água não foram modeladas na entrada do sítio 1 do complexo V30M:GEN.

Vale comentar que a posição da molécula do ligante, bem como a posição de cadeias laterais dos dois sítios das duas proteínas aqui analisadas (TTRwt e V30M) é muito similar. Além disto, pouca diferença é observada quando se sobrepõe os átomos de C $\alpha$  do complexo TTRwt:GEN com os mesmos átomos do complexo V30M:GEN (RMS = 0,32) – Tabela 7.3. Estas análises levariam a pensar que a interação de GEN com a TTRwt e com a V30M é muito parecida.

No entanto, quando se compara os complexos TTRwt:GEN e V30M:GEN individualmente com as estruturas da apoTTR (apoTTRwt e apoV30M), verifica-se poucas movimentações estruturais provocadas por GEN à V30M e movimentações mais significativas para a TTRwt (Tabela 7.3). A variação do volume das cavidades entre as estruturas cristalográficas apoTTR e TTR:GEN também é maior no caso da TTRwt (~100 Å) em relação à V30M (< 50 Å). Além disto, a conformação Ser117u parece ser intrínseca à mutante V30M, já que também foi encontrada na estrutura da apoV30M – apresentdo no capítulo 5; já a conformação Ser117u parece ser induzida pela interação de GEN com a TTRwt. Estas diferenças podem refletir que a TTRwt e a V30M apresentam distintos mecanismos de interação com GEN, e até mesmo diferenças em afinidade da GEN pela TTRwt e pela mutante V30M.

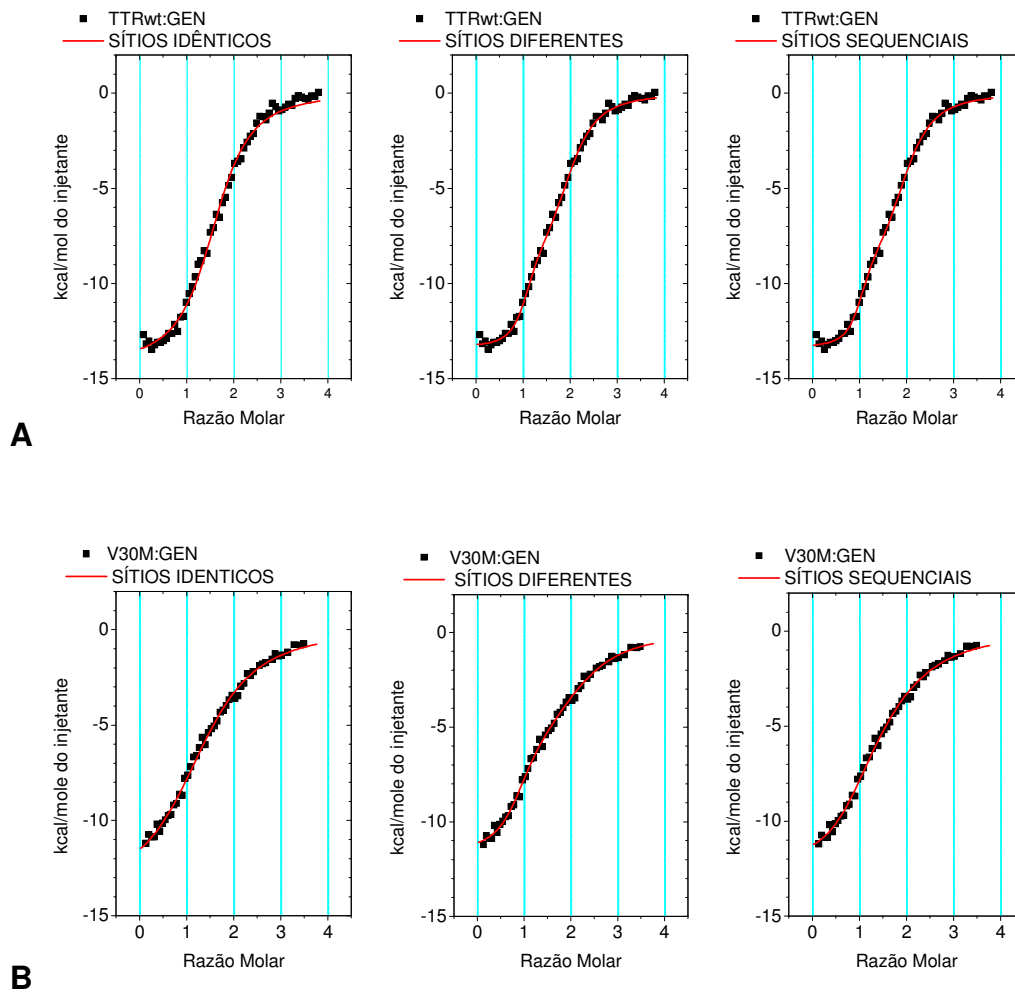
De fato, os dados de agregação da TTR *in vitro* indicam que GEN tem menor potência de inibição da mutante V30M que da TTRwt. Os dados de cristalografia sugerem que as duas variantes de TTR formam as mesmas interações com o ligante GEN e as alterações estruturais introduzidas pela mutação Met30 são minimizadas após a interação de GEN com a mutante V30M. No entanto, as movimentações promovidas pela interação de GEN com os dois sítios da TTR são bastante diferentes para TTRwt e para a mutante V30M. Em conjunto, estes dados sugerem que as diferenças observadas nas curvas de agregação da TTRwt e da mutante V30M incubadas com GEN são reflexo de distintos mecanismos de interação deste ligante com estas duas variantes de TTR. Assim, experimentos de ITC foram realizados com a TTRwt e a mutante V30M ligando GEN, a fim de analisar o mecanismo e os parâmetros termodinâmicos que guiam a interação deste ligante com as duas variantes de TTR.

**Tabela 7.3** – Raiz média quadrada (RMS) do deslocamento em XYZ dos átomos das estruturas cristalográficas da apoTTR quando sobrepostas às estruturas dos complexos TTR:GEN.

Estruturas cristalográficas sobrepostas	apoTTRwt	apoV30M	TTRwt:GEN
	vs TTRwt:GEN	vs V30M:GEN	vs V30M:GEN
Átomos C $\alpha$ (Å)	0,41	0,24	0,32
Átomos da cadeia principal (Å)	0,50	0,27	0,34
Todos os átomos (Å)	1,10	0,85	0,68

## 7.2 Microcalorimetria por titulação isotérmica (ITC)

A Figura 7.2 mostra os resultados de uma curva representativa de titulação da GEN com a TTR tipo selvagem e outra com a mutante V30M. Os três modelos matemáticos disponíveis para descrever a interação do ligante com a proteína, a partir de medidas de ITC, “sítios idênticos e independentes”, “sítios diferentes e independentes” e “sítios seqüenciais” foram aplicados às curvas de ITC da TTRwt e da mutante V30M com GEN. Os dados de ITC puderam ser bem descritos pelos três modelos de interação testados, tanto nas curvas da TTRwt quanto da V30M. No entanto, os menores valores de  $\chi^2/\text{DoF}$  e erros do ajuste foram obtidos usando o modelo de “sítios seqüenciais” para a TTRwt, e o modelo de “sítios diferentes e independentes” para a mutante V30M. Além dos parâmetros estatísticos do ajuste, outros fatores foram também considerados para a determinação do modelo de interação de GEN com a TTRwt e com a mutante V30M. Os parâmetros termodinâmicos calculados, usando cada um dos modelos, foram comparados aos outros dados experimentais, gerados neste estudo, para que assim pudesse ser inferido um modelo de interação da GEN com a TTR de forma mais embasada.



**Figura 7.2** – Curvas representativas de ITC realizadas pela titulação de GEN (200  $\mu$ M) em uma cela de amostra contendo TTRwt (**A**) ou V30M (**B**) a 12  $\mu$ M. Os diferentes modelos matemáticos disponíveis (“sítios idênticos e independentes”, “sítios diferentes e independentes” e “sítios seqüenciais”) para descrever a interação de ligantes com proteínas foram testados e o ajuste dos dados experimentais com estes 3 modelos é mostrado em vermelho nesta figura.

As análises dos complexos cristalográficos TTR:GEN mostraram que a GEN interage com Ser117 e que esta interação parece ser importante para a ligação de GEN à TTR. A análise da estrutura cristalográfica da apoV30M (capítulo 5) mostrou que os dois sítios desta proteína são diferentes, mesmo na ausência do ligante, sendo que um dos sítios da apoV30M apresenta a conformação Ser117u. Desta forma, a análise da estrutura apoV30M já descartaria a hipótese da V30M ligar GEN em modelo de “sítios idênticos e independentes”, pois os sítios da apoV30M não são idênticos.

No entanto, a análise da apoTTRwt mostra que os dois sítios desta TTR apresentam Ser117 na conformação ligada (Ser117b), o que possibilitaria, a princípio, GEN ligar à TTRwt em modelo de “sítios idênticos e independentes”.

Porém, no complexo TTRwt:GEN a conformação Ser117u é observada em um dos sítios da TTRwt. Assim, uma interação de GEN com Ser117 em um dos sítios da TTRwt não é observada no complexo cristalográfico TTRwt:GEN (Figura 7.1 e Tabela 7.2). Isto faz com que os sítios da TTR fiquem diferentes quando ligados à GEN. Desta forma, com base nos dados cristalográficos gerados aqui, o modelo de “sítios idênticos e independentes” não seria adequado para descrever a interação de GEN com a TTRwt nem com a mutante V30M, considerando que Ser117 desempenha papel importante no reconhecimento e ligação de GEN à TTR.

Além disso, quando o modelo de “sítios idênticos e independentes” é usado, os valores das constantes de dissociação retornadas das curvas de GEN com TTRwt ou V30M são na ordem de micromolar (TTRwt  $K_d = 1.2 \pm 0.4 \mu\text{M}$ ; V30M  $K_d = 3.1 \pm 0.5 \mu\text{M}$ ), o que não corrobora muito com as curvas de agregação *in vitro* da TTR conduzidas em diferentes concentrações de GEN. Esta observação também foi realizada anteriormente por Green e colaboradores (77), quando estudaram a interação da GEN com a TTRwt. Desta forma, os dados de agregação *in vitro* da TTR também não corroboram com o modelo de ‘sítios idênticos e independentes’ para descrever a interação de GEN com a TTRwt nem com a mutante V30M.

Dado o exposto, a interação de GEN com a TTRwt e com a mutante V30M poderia ainda ser descrita pelos modelos de “sítios seqüenciais” ou “sítios diferentes e independentes”. No caso da TTRwt, o ajuste dos dados realizado com estes dois modelos retornou constantes de dissociação muito similares (*sítios diferentes e independentes*:  $K_{d1} = 36 \pm 10 \text{ nM}$ ;  $K_{d2} = 1,2 \pm 0.1 \mu\text{M}$ ; *sítios seqüenciais*:  $K_{d1} = 32 \pm 6 \text{ nM}$  e  $K_{d2} = 1,3 \pm 0.1 \mu\text{M}$ ). Desta forma, a comparação das constantes retornadas com os dados de agregação é ineficaz. A diferença entre os modelos está na presença ou não de cooperatividade entre os sítios, que deve ser resultado de alterações alostéricas provocadas pela interação do primeiro ligante com o tetrâmero de TTRwt. Como os sítios da apoTTRwt são idênticos e os sítios no complexo TTRwt:GEN são diferentes - frente à análise das conformações das cadeias laterais de Ser117 – o modelo de “sítios diferentes e independentes” não parece adequado para explicar a ligação de GEN à TTRwt. Além disto, a ligação de GEN à TTRwt provoca movimentações estruturais que são propagadas ao longo do tetrâmero (Tabela 7.3 e animação 2 – Apêndice B), podendo levar à alterações no segundo sítio de ligação. Estes dados mostram que, muito provavelmente, GEN liga aos dois



sítios da TTRwt em modelo de “sítios seqüenciais”, com cooperatividade negativa neste caso. Assim, a interação da primeira molécula de GEN provoca alterações conformacionais na TTRwt, resultando em modificações do segundo sítio (rotação da cadeia lateral de Ser117 - que adquire a conformação Ser117u - e aumento do volume do segundo sítio); o que caracteriza cooperatividade negativa entre os sítios da TTRwt.

O ajuste dos dados de ITC obtidos pela titulação de GEN com a V30M usando o modelo de “sítios seqüenciais” ou de “sítios diferentes e independentes” resultou em constantes de dissociação distintas (*sítios diferentes e independentes*:  $K_{d1} = 149 \pm 57$  nM e  $K_{d2} = 2.9 \pm 0.5$   $\mu$ M; *sítios seqüenciais*:  $K_{d1} = 682 \pm 2$  nM;  $K_{d2} = 5,9 \pm 2,55$   $\mu$ M). No entanto, a comparação dos dados de agregação com as constantes retornadas pelo ajuste dos dados de ITC usando estes dois modelos não é suficiente para definir inequivocamente o mecanismo de interação de GEN com os sítios da mutante V30M, pelo fato de que as constantes, apesar de diferentes, ainda estão na mesma ordem de magnitude. Como a diferença entre os dois modelos está na presença ou não de cooperatividade entre os sítios, recorreu-se à análise comparativa das estruturas cristalográficas da V30M na forma apo (apoV30M) e holo (V30M:GEN).

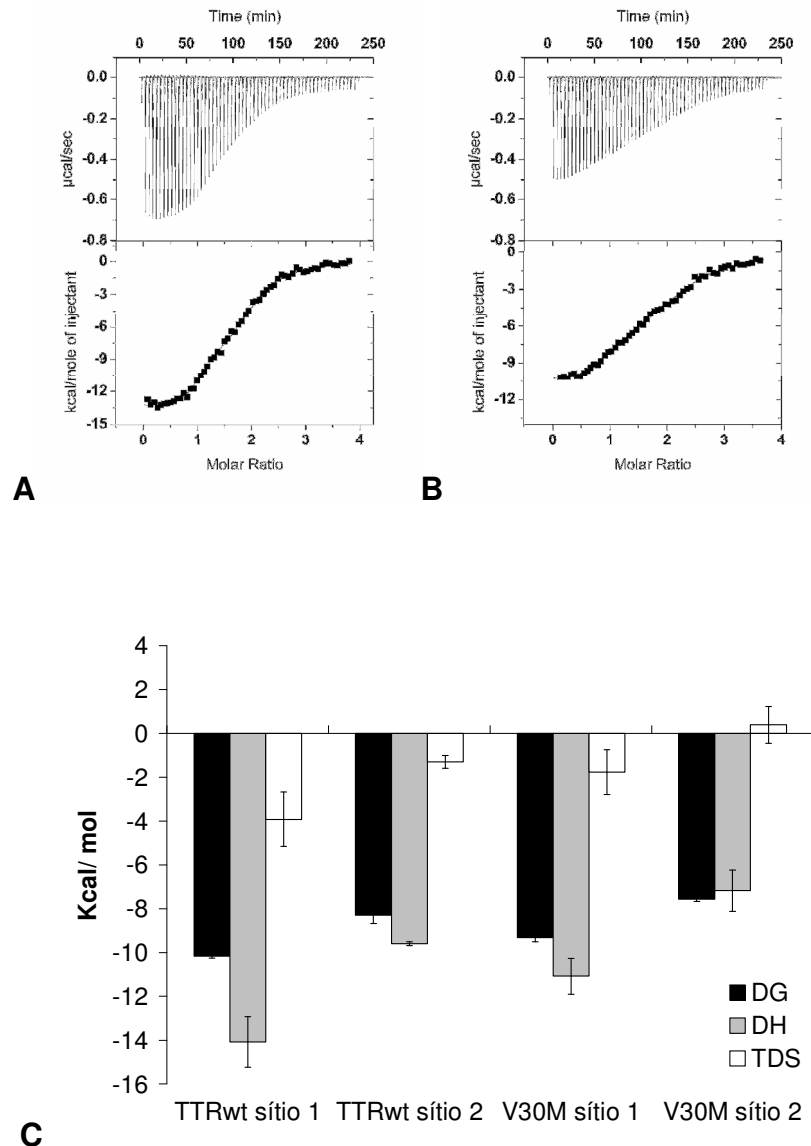
Considerando que a alteração conformacional de Ser117 é o principal evento alostérico causado pela interação do primeiro ligante com a TTR, e que a conformação Ser117u está presente na apoV30M, o modelo de “sítios diferentes e independentes” pareceu mais adequado para descrever a interação de GEN com os dois sítios da mutante V30M, já que as diferenças entre os sítios da V30M são intrínsecas a esta mutante de TTR, estando presentes na apoV30M. Outro fator experimental que corrobora com este modelo de interação de GEN com a V30M é que os movimentos observados na estrutura da V30M são mais sutis que o observado na TTRwt e, estes, estão concentrados nos sítios de ligação (Tabela 7.3 e animação 3 – Apêndice B). Sendo assim, as alterações alostéricas provocadas pela ligação de uma molécula de GEN à V30M aparentam ser pequenas ou ausentes, sendo então mais provável que esta isoflavona interaja com a mutante V30M seguindo o modelo de “sítios diferentes e independentes”.

Além disto, o número e distâncias de ligações da V30M com a GEN, medidos na estrutura cristalográfica V30M:GEN, são muito parecidos com o observado no complexo TTRwt:GEN. Desta forma, não é muito provável que a afinidade de GEN

aos sítios da TTRwt sejam muito diferentes da afinidade deste ligante pela mutante V30M. Assim, as constantes retornadas no modelo de “sítios diferentes e independentes” parecem mais corretas. Ainda, se considerarmos a degenerescência estatística da interação da primeira molécula de GEN com os sítios idênticos da apoTTRwt, a constante de dissociação do primeiro sítio da TTRwt fica ainda mais similar ( $K_{d1}^0 = 64 \pm 6$  nM) à constante de dissociação do primeiro sítio da V30M, calculada usando o modelo de “sítios diferentes e independentes” ( $K_{d1} = 149 \pm 57$  nM), o que corrobora perfeitamente com os dados cristalográficos.

Dado o exposto, o modelo de “sítios seqüenciais” foi utilizado para descrever as curvas de ITC de GEN com a TTRwt e o modelo de “sítios diferentes e independentes” para as curvas de GEN com a mutante V30M. A Figura 7.3 mostra os dados brutos de saída dos experimentos de ITC – painéis superiores – e o ajuste não linear dos dados, usando o modelo de “sítios seqüenciais” para a TTRwt e o modelo de “sítios diferentes e independentes” para a mutante V30M – painéis inferiores. Os parâmetros termodinâmicos que governam a interação da GEN com cada sítio da TTRwt e da V30M, calculados destas curvas de ITC, são mostrados num diagrama esquemático na Figura 7.3C. Destas medidas, a estequiometria da interação ( $n=2$ ) foi também obtida.

As constantes de ligação da GEN à TTRwt foram  $K_{d1} = 31 \pm 6$  nM e  $K_{d2} = 1,3 \pm 0,1$   $\mu$ M, valores que estão de acordo com o previamente publicado (77). A mutante V30M mostrou menor afinidade pela GEN, com constantes de dissociação  $K_{d1} = 149 \pm 57$  nM e  $K_{d2} = 2.9 \pm 0.5$   $\mu$ M, como previsto nos ensaios de agregação da TTR *in vitro*.



**Figura 7.3** – Análise de microcalorimetria por titulação isotérmica (ITC) da ligação da GEN à TTRwt (**A**) e à mutante V30M (**B**). Os dados brutos de saída são mostrados nos painéis superiores, enquanto os painéis inferiores mostram o ajuste não linear dos dados integrados, usando o modelo de “sítios seqüenciais” (para a TTRwt) ou o modelo de “sítios diferentes e independentes” (para a V30M) no programa Origin7 (OriginLab). (**C**) Diagrama esquemático mostrando as contribuições energéticas da ligação da GEN à TTRwt e à V30M, calculados a partir do ajuste não linear dos dados de ITC.

Os dois sítios da TTRwt e da V30M mostraram variação da energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) favorável, com valores que variaram de  $-10.2 \text{ kcal mol}^{-1}$  a  $-7.6 \text{ kcal mol}^{-1}$ . As interações são guiadas por entalpia, com uma pequena contribuição entrópica desfavorável, exceto pelo segundo sítio da V30M Figura 7.3C.

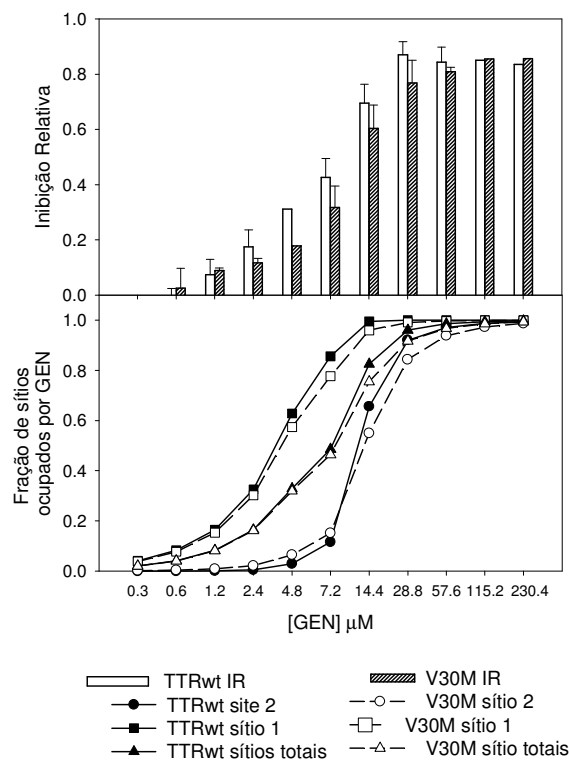
A contribuição entálpica da ligação da GEN ao sítio 1 da TTRwt e da V30M é maior ( $\Delta H_1$  TTRwt =  $-14,08 \pm 1,15 \text{ kcal mol}^{-1}$ ;  $\Delta H_1$  V30M =  $-11,08 \pm 0,82 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) que ao sítio 2 ( $\Delta H_2$  TTRwt =  $-9,54 \pm 0,08 \text{ kcal mol}^{-1}$ ;  $\Delta H_2$  V30M =  $-7,17 \pm 0,94 \text{ kcal mol}^{-1}$ ).

$\text{mol}^{-1}$ ). Esta diferença deve refletir a perda da interação de GEN com a cadeia lateral de Ser117b, devido à presença da conformação Ser117u, no sítio 2 da TTRwt e da V30M; além de contatos polares mais distantes observados no segundo sítio dos dois complexos cristalográficos analisados (TTRwt:GEN e V30M:GEN) – Tabela 7.2 .

Moléculas de água retidas no interior dos sítios também foram observadas nos dois complexos TTR:GEN estudados, o que pode influenciar negativamente a entropia de ligação, assim como sugerido pelos valores de  $\Delta S$  mostrados na Figura 7.3C.

A comparação dos dados experimentais de agregação da TTR *in vitro* com a fração dos sítios da TTR ocupados pelo ligante GEN – calculados a partir dos valores experimentais de constante de afinidade calculados por ITC – permitiu analisar em maiores detalhes a contribuição da ocupação de um ou dos dois sítios do tetrâmero da TTR para a estabilidade da proteína, e assim, a inibição da agregação da TTR *in vitro*. A Figura 7.4 mostra os dados experimentais de inibição da agregação da TTR *in vitro* no painel superior e uma simulação da fração de sítios dos tetrâmeros de TTRwt e mutante V30M que estariam ocupados pelo ligante GEN – considerando as constantes de dissociação retornadas no ajuste das curvas de ITC (sítios seqüenciais para TTRwt e sítios diferentes e independentes para V30M), a concentração de proteína e do ligante usada nos experimentos.

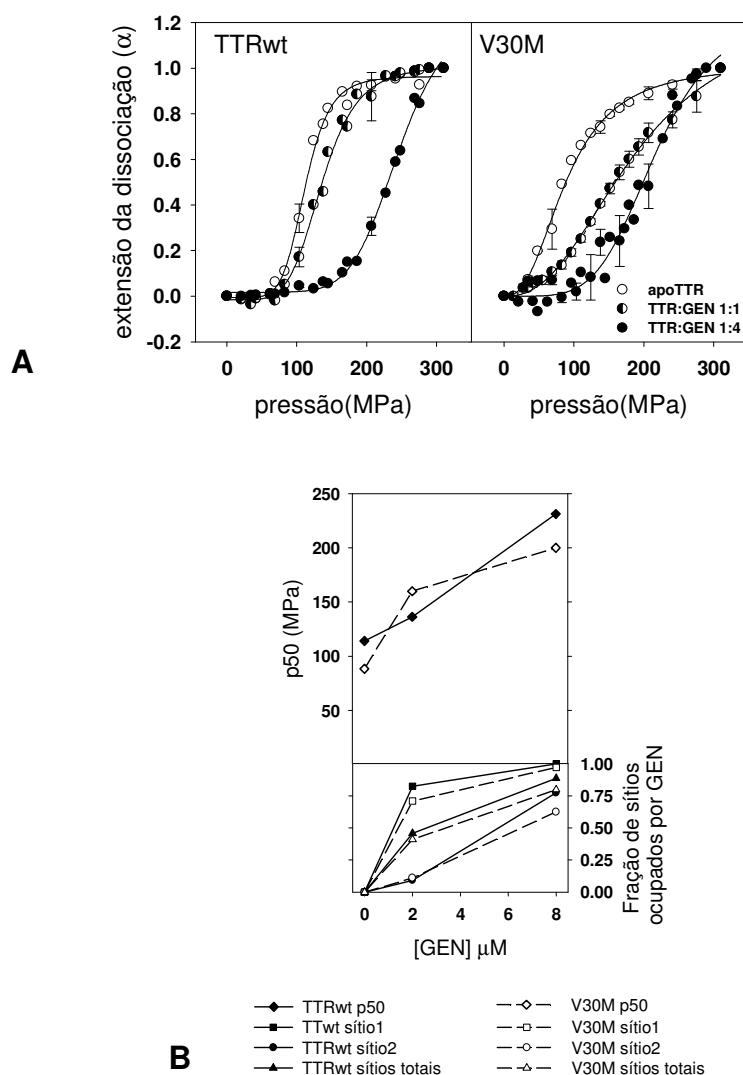
Fazendo a correlação dos dados experimentais de agregação com a fração de sítios do tetrâmero da TTRwt e da V30M ocupados por GEN calculados, verificou-se que a ocupação dos dois sítios da TTR por GEN é importante para conferir estabilidade do tetrâmero em pH ácido, tanto para a TTRwt quanto para a V30M. O coeficiente de correlação calculado por comparação das curvas de agregação da TTRwt e da V30M com a curva de sítios totais ocupados foi 0,99; enquanto que com a curva de pelo menos um sítio ocupado no tetrâmero foi 0,96. Estes dados indicam que a ocupação dos dois sítios da TTR é necessária para conferir a máxima estabilidade do tetrâmero, proporcionada pela ligação de GEN, usando a acidificação do pH como agente indutor da agregação da TTR.



**Figura 7.4** – Dados experimentais de inibição relativa da agregação da TTRwt e V30M *in vitro* (painel superior) e fração de sítios ocupados pelo ligante GEN calculado para cada ponto da curva experimental (painel inferior). As simulações da ocupação dos sítios foram realizadas usando os valores de constante de dissociação calculados nos experimentos de ITC (modelo de “sítios seqüenciais” para a TTRwt e “sítios diferentes e independentes” para a mutante V30M); além dos valores de concentração de ligante e de proteína em cada ponto experimental.

### 7.3 Curvas de alta pressão hidrostática (HHP)

Outra técnica experimental utilizada, para verificar a estabilidade da TTR conferida pela ligação da GEN, foi o uso de alta pressão como agente perturbador. Para tal foram conduzidas curvas de alta pressão hidrostática (HHP) em diferentes concentrações da GEN. A emissão do triptofano foi utilizada como um sensor de desenovelamento/ dissociação dos tetrâmeros da TTR. As curvas de HHP e os valores de p50 (valor de pressão onde a extensão da reação é 50%) extraídos destas curvas são mostrados na Figura 7.5.



**Figura 7.5** – Dissociação/ desenovelamento da TTRwt (2  $\mu$ M) e V30M (2  $\mu$ M) induzido por pressão. **(A)** Curvas de pressão conduzidas na presença de 2  $\mu$ M (●) e 8  $\mu$ M (●) de GEN comparado à curvas da apoTTR (○). **(B)** Valores de p50 calculados destas curvas de pressão (painel superior) e fração dos sítios da TTR ocupados pelo ligante GEN em cada ponto experimental, calculada considerando as constantes de afinidade obtidas nas medidas de ITC, a concentração de proteína e de ligante utilizadas nos experimentos (painel inferior).

Aumentando a razão molar entre TTR e GEN de 1:1 (GEN = 2  $\mu$ M) para 1:4 (GEN = 8  $\mu$ M) resultou no deslocamento progressivo das curvas de pressão para a direita – maior pressão, sugerindo estabilização do tetrâmero gerada pela ligação da GEN.

Nas curvas de pressão conduzidas com a TTRwt há uma relação linear entre os valores de p50 e o aumento da concentração de GEN (painel superior da Figura 5.3.3-1B. Está claro que os valores de p50 são diferentes quando diferentes concentrações de GEN são utilizadas p50= 114,15 MPa (apoTTRwt); p50= 136,4 MPa (TTR:GEN 1:1) e p50= 231,3 MPa (TTR:GEN 1:4). Em contraste, os valores de

p50 nas curvas conduzidas com a mutante V30M foram p50= 88,5 MPa (apoV30M); p50=160,0 MPa (TTR:GEN 1:1) e somente um pouco maior (200,0 MPa) para TTR:GEN 1:4.

Este resultado pareceu curioso em uma primeira análise, já que não era esperado que os valores de p50 fossem maiores para a mutante que para a TTRwt nas curvas de pressão conduzidas em concentrações equimolares de GEN, já que a TTR tipo selvagem apresenta maior afinidade pela isoflavona GEN. Estas curvas de pressão foram repetidas inúmeras vezes e o resultado foi sempre consistente. Entretanto, após a análise da fração dos sítios da TTRwt e da V30M ocupados por GEN em cada ponto das curvas experimentais, foi possível compreender estes dados (Figura 7.5B).

Os valores de p50 observados nas curvas de pressão da V30M correlacionam igualmente com a ocupação de um dos sítios e com a ocupação total dos sítios do tetrâmero de V30M (cc = 0,99). No entanto, a correlação com a ocupação do segundo sítio foi baixa (cc = 0,85). Estes dados indicam que a ocupação do segundo sítio da V30M não interfere tanto na estabilidade do tetrâmero sob pressão.

Por outro lado, as curvas de HHP da TTRwt correlacionam muito bem com a ocupação do sítio 2 da TTRwt (cc = 0,99), como pode ser claramente observado na Figura 7.5B. Através destas análises, há indicativos de que o sítio de menor afinidade da TTRwt deve ser ocupado por GEN para conferir estabilidade do tetrâmero de TTRwt em alta pressão e que os tetrâmeros de TTRwt são mais instáveis que os tetrâmeros de V30M quando apenas uma molécula de GEN está ligada.

Estas diferenças de correlação entre os valores de p50 e a ocupação dos sítios de ligação da TTRwt e da V30M pode ser consequência dos rearranjos estruturais distintos provocados pela ligação da GEN aos sítios das TTR analisadas. Como observado nas estruturas cristalográficas, a ligação de GEN à TTRwt provoca alterações estruturais mais evidentes que à mutante V30M. Dentre estas alterações, está o alargamento dos sítios da TTRwt e uma pequena diminuição dos sítios da mutante V30M.

A infiltração de água na estrutura de proteínas sob pressão é geralmente o fator responsável pelo desenovelamento/ dissociação destas estruturas (23). Isto ocorre devido à quebra do efeito hidrofóbico, no caso de infiltração de água, e consequente exposição de aminoácidos apolares ao solvente, gerando

desenovelamento da estrutura proteica.

Assim, a princípio, os tetrâmeros da TTRwt, com um único sítio ocupado por GEN, são mais suscetíveis à infiltração de água que os tetrâmeros da mutante V30M nestas mesmas condições. Se isto for realmente verdade, os canais de solvente devem estar alargados na TTRwt o que resultaria em maior movimentação de moléculas de água no tetrâmero da TTRwt, facilitando, desta forma, seu desenovelamento/ dissociação induzidos por pressão. Não está evidente, com base nos dados experimentais gerados aqui, qual ou quais canais de solvente estariam envolvidos nesse processo. Porém há indícios de que o alargamento dos sítios da TTRwt, induzido pela ligação de GEN, deve influenciar a estabilidade da TTRwt sob pressão.

## **7.4 Conclusão**

O uso combinado de diferentes técnicas biofísicas permitiu analisar em maiores detalhes a interação de GEN com a TTR tipo selvagem e a mutante V30M. Os dados de ITC apontaram mecanismos de interação distintos de GEN com estas duas variantes de TTR, o que foi inferido à presença da conformação Ser117u na apoV30M e maiores movimentações estruturais provocadas pela ligação de GEN à TTRwt. Estas movimentações na estrutura da TTRwt pode implicar menor estabilidade desta proteína, em relação à mutante V30M, sob pressão, quando apenas uma molécula do ligante está presente no tetrâmero.

Os dados gerados foram importantes para o melhor entendimento das bases estruturais da cooperatividade entre os sítios da TTRwt frente à interação com pequenas moléculas, questão sempre levantada em relatos científicos sobre esta proteína e pouco explorada a fundo até o momento. Além disto, os resultados aqui mostrados foram também importantes para a detecção de diferenças de interação da TTR tipo selvagem e da mutante amiloidogênica mais freqüente desta proteína, a V30M, com ligantes. Estas observações são importantes, do ponto de vista estrutural, pois mostram que mutações mesmo distantes do sítio da TTR podem



afetar significativamente a interação destas variantes com seus ligantes.

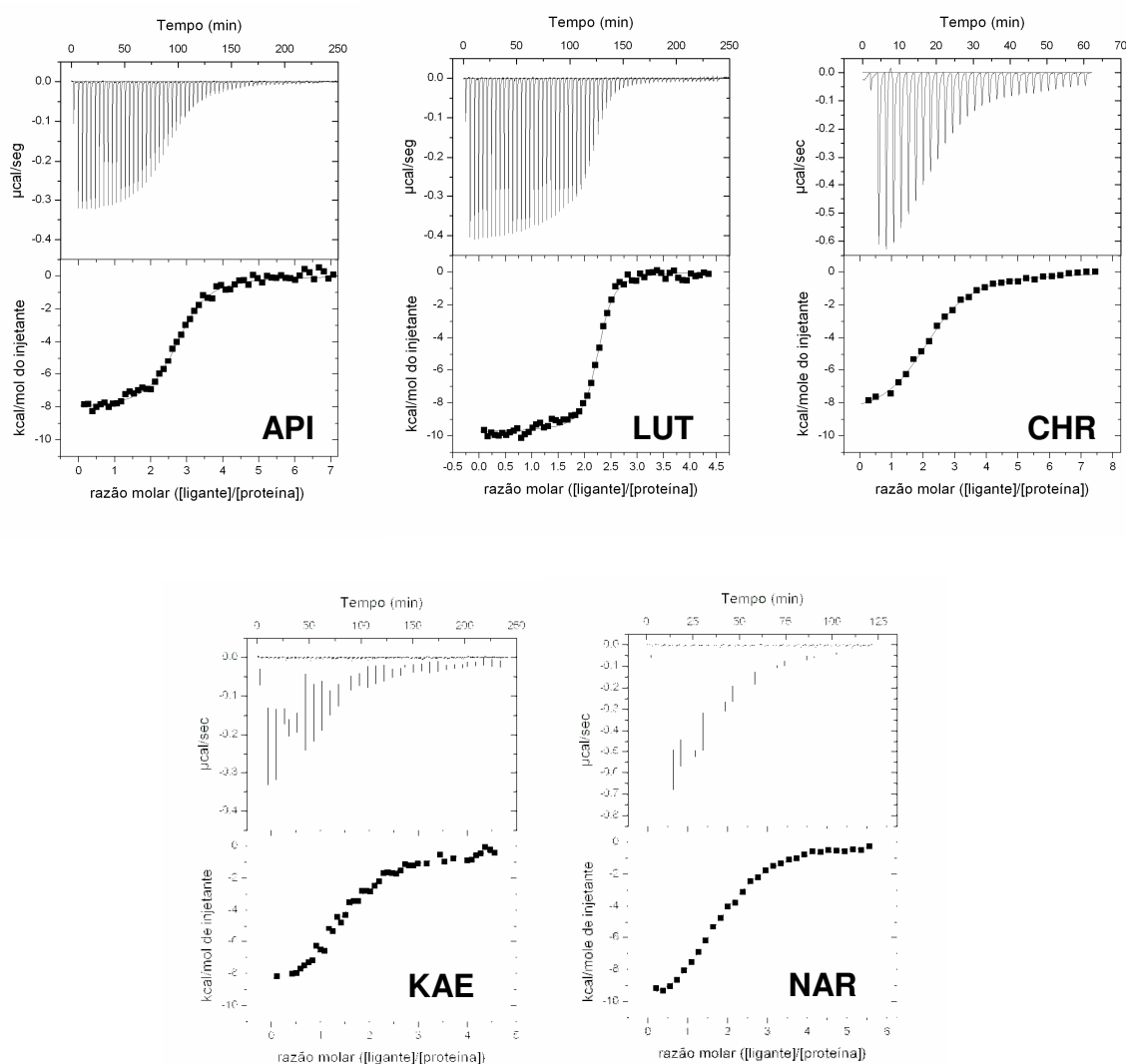
Estas observações têm implicação para o desenvolvimento de fármaco-terapias para o tratamento de amiloidoses de TTR por diversos motivos. Primeiramente, os distintos mecanismos de interação e afinidade de GEN pela TTR tipo selvagem e mutante V30M identificados pode também ocorrer com outras classes de pequenas moléculas inibidoras da agregação da TTR. No entanto, até recentemente, somente a TTR tipo selvagem era analisada na maioria dos estudos visando o desenvolvimento de inibidores da agregação da TTR, o que pode resultar em efeitos não previstos quando estes fármacos forem administrados a pacientes que expressam variantes mutantes da TTR. A importância da ocupação do segundo sítio da TTRwt também é bastante relevante, pois assim como observado nos ensaios de HHP, o mesmo pode ocorrer em condições fisiológicas, porém em menor escala, ressaltando a importância de que os inibidores de agregação da TTR, principalmente os que levam à alterações conformacionais mais significantes desta proteína, talvez devam apresentar alta afinidade pelos dois sítios da TTR, o que raramente é levado em consideração nos programas de desenvolvimento de inibidores da agregação desta proteína.

## 8 Interação de flavonóides com a TTR

Como mostrado no capítulo 6 as flavonas API e LUT foram os melhores inibidores da agregação da TTRwt e da mutante V30M *in vitro*. A flavona CHR, a flavanona NAR e o flavonol KAE também apresentaram boa inibição da TTRwt, porém seu efeito para a inibição da agregação da mutante V30M foi bem inferior. Desta forma, dados de cristalografia e calorimetria foram coletados e analisados, a fim de investigar em maiores detalhes o bom desempenho destas moléculas como inibidores da agregação da TTRwt, bem como as diferenças de inibição em relação à mutante V30M.

## 8.1 Microcalorimetria por titulação isotérmica (ITC)

Uma curva representativa dos ensaios de ITC da TTRwt com cada um destes flavonóides é mostrada na Figura 8.1 e os parâmetros termodinâmicos da interação extraídos destes resultados são mostrados na Tabela 8.1.



**Figura 8.1** – Curvas representativas da titulação dos flavonóides API, LUT, CHR, KAE e NAR com a TTRwt. Os painéis superiores mostram os dados brutos de saída e os painéis inferiores os dados integrados e ajustados usando o modelo de “sítios idênticos e independentes” (API, LUT e CHR) e “sítios seqüenciais” (KAE e NAR).

Como já comentado, a interação de pequenas moléculas com os dois sítios da TTR pode seguir mecanismo de “sítios seqüencias”, “sítios idênticos e

independentes” ou “sítios diferentes e independentes”. Desta forma, os dados integrados das curvas de ITC (painéis inferiores da Figura 8.1) foram ajustados utilizando estes três modelos de interação no programa Origin 7.

O uso do modelo de “sítios diferentes e independentes” resultou em baixa qualidade do ajuste em todos os casos, apresentando alto valor de erro dos parâmetros termodinâmicos retornados, maiores valores de  $\chi^2/\text{DoF}$  e “n” muito diferente de 1 (para cada um dos sítios). Além disto, as análises da estrutura cristalográfica da apoTTRwt (capítulo 5), mostraram que os dois sítios de ligação desta proteína são muito similares. Desta forma, os dados de ITC e cristalografia, em conjunto, descartam a possibilidade da TTRwt interagir com os flavonóides testados em modelo de “sítios diferentes e independentes”.

As curvas de API e LUT não puderam ser muito bem descritas pelo modelo de “sítios seqüenciais”, porém apresentaram bom ajuste com o modelo de “sítios idênticos e independentes”. LUT e API apresentaram  $K_d$  na ordem de nanomolar, com LUT tendo mais afinidade pela TTRwt que API (LUT  $K_d = 100 \pm 10$  nM; API  $K_d = 490 \pm 130$  nM) – Tabela 8.1. Estes valores de  $K_d$  estão de acordo com a inibição da agregação da TTRwt proporcionada pela interação destes ligantes, como observado nos ensaios de agregação *in vitro* – capítulo 6.

Já as curvas de CHR, KAE e NAR apresentaram bom ajuste dos dados tanto com o modelo de “sítios seqüenciais” quanto com o modelo de “sítios idênticos e independentes”. Assim, os parâmetros termodinâmicos obtidos pelo ajuste das curvas de ITC de CHR, NAR e KAE com estes dois modelos de interação foram armazenados para comparação com os dados de agregação e estruturais e são mostrados na Tabela 8.1.

Nos ensaios de agregação *in vitro* da TTRwt (capítulo 6), KAE apresentou valor de IC50 bastante similar ao IC50 da isoflavona GEN (IC50 KAE = 8,26  $\mu\text{M}$ ; IC50 GEN = 8,11  $\mu\text{M}$ ). Já CHR (IC50 CHR = 12,16  $\mu\text{M}$ ) mostrou perfil de inibição da agregação similar ao GC-24, com IC50 maior que KAE e GEN, e similar a NAR (IC50 NAR = 12,39  $\mu\text{M}$ ). Estes dados indicariam que KAE tem maior afinidade por pelo menos um dos sítios da TTRwt que CHR e NAR. Sendo assim, é pouco provável que KAE interaja com os sítios da TTRwt pelo modelo de “sítios idênticos e independentes”, pois assim sua afinidade pela TTRwt ( $K_d > 2$ ) seria menor que a de CHR ( $K_d < 2$   $\mu\text{M}$ ). Já pelo modelo de “sítios seqüenciais”, KAE apresenta  $K_{d1}$  na

ordem de nanomolar; valores que melhor corroboram com os dados de agregação *in vitro*.

**Tabela 8.1** – Parâmetros termodinâmicos da interação de API, LUT, CHR, KAE e NAR com a TTRwt, retornados pelo ajuste das curvas de ITC com o modelo de “sítios idênticos e independentes” ou “sítios seqüenciais” (KAE, NAR e CHR).

ligante	Modelo	K <sub>d</sub> (μM) <sup>a</sup>	ΔG(kcal mol <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	ΔH(kcal mol <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	-TΔS (kcal mol <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>
LUT	Independentes	0,10 ± 0,01	-9,53	-10,30 ± 0,52	0,77
API	Independentes	0,49 ± 0,13	-8,59	- 8,30 ± 0,24	-0,29
CHR	Independentes	1,40 ± 0,06	-7,98	- 8,89 ± 0,13	0,92
CHR	Seqüenciais	1,78 ± 0,63	-7,83	-10,00 ± 0,82	2,18
		2,72 ± 0,39	-7,58	- 9,86 ± 1,04	2,28
NAR	Independentes	2,29 ± 0,18	-7,69	-11,30 ± 0,94	3,62
NAR	Seqüenciais	0,61 ± 0,25	-8,47	-10,40 ± 0,59	1,96
		4,82 ± 0,07	-7,25	-10,60 ± 1,15	3,36
KAE	Independentes	2,10 ± 0,63	-7,74	- 9,63 ± 1,12	1,89
KAE	Seqüenciais	0,18 ± 0,05	-9,19	- 8,15 ± 0,38	-1,04
		4,01 ± 0,97	-7,35	-7,58 ± 0,74	0,23

<sup>a</sup> Parâmetros termodinâmicos extraídos do ajuste não linear dos dados de ITC, usando o modelo de “sítios idênticos e independentes” ou “sítios seqüenciais” no programa Origin 7. <sup>b</sup> e <sup>c</sup> foram calculados usando a média dos valores de ΔH e K<sub>d</sub>: <sup>b</sup> ΔG= RTln(K<sub>d</sub>); <sup>c</sup> ΔG= ΔH - TΔS.

Com relação à CHR verifica-se que os parâmetros termodinâmicos retornados pelo modelo de “sítios sequenciais” e “sítios independentes” são muito próximos – Tabela 8.1. As constantes de afinidade estão na mesma ordem de magnitude, e, assim, as principais diferenças entre os dois modelos estão concentradas em maiores valores de entalpia no modelo de “sítios seqüenciais”, porém compensação entrópica mais desfavorável. Ainda, no modelo de “sítios seqüenciais” as diferenças entre o sítio de maior e de menor afinidade são pequenas, o que indica que as alterações alostéricas induzidas pela ligação da primeira molécula de CHR à TTRwt, se existirem, gerariam poucas diferenças para a interação da segunda molécula deste ligante. Os valores de K<sub>d</sub> retornados pelo ajuste dos dados de ITC com estes dois modelos de interação utilizados estão na mesma ordem de magnitude ( 1-3 μM), estando ambos de acordo com os dados de agregação *in vitro* (capítulo 6).

NAR apresenta perfil de inibição da agregação bastante semelhante ao de CHR, porém mostra maior inibição nos primeiros pontos destas curvas (Figura 6.2), o que pode indicar que NAR têm maior afinidade pela TTRwt que CHR. No entanto, é bastante complicado identificar o mecanismo de interação de NAR com a TTRwt baseado somente nestes dados experimentais.

Para investigar em maiores detalhes a interação destas moléculas com a TTRwt, as estruturas cristalográficas da TTRwt em complexo com estes 5

flavonóides foram determinadas e serão apresentadas a seguir.

## 8.2 Estruturas cristalográficas dos complexos TTRwt:flavonóides

As estatísticas da coleta, processamento e refinamento das estruturas cristalográficas da TTRwt em complexo com API, LUT, CHR, KAE, e NAR são mostradas nas Tabelas 8.2 e 8.3.

**Tabela 8.2** – Estatísticas do processamento e refinamento dos dados dos complexos cristalográficos TTRwt:API e TTRwt:LUT. Os valores em parênteses indicam a faixa de maior resolução.

Parâmetro/estrutura cristalográfica	TTRwt:LUT	TTRwt:API
Comprimento de onda (Å)	1,46	1,46
Grupo espacial	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2
Cela unitária (Å)	43,264 84,782 65,087	43,152 85,132 64,458
Faixa de resolução (Å)	26,01 – 1,90	21,49 – 1,95
Faixa de maior resolução (Å)	2,00 – 1,90	1,95 – 1,90
Reflexões no conjunto de trabalho	18246 (2386)	17704 (1031)
Reflexões no conjunto teste	987 (115)	964 (65)
R-fator*	18,79 (21,59)	18,93 (25,80)
R-livre**	19,96 (24,33)	23,52 (31,15)
Completeza (%)	98,45 (92,00)	96,30 (77,57)
Redundância	3,9 (3,5)	5,1 (3,7)
I/σ médio	17,25 (2,5)	17,64 (3,48)
RMS ligações (Å)	0,036	0,014
RMS ângulos (°)	1,79	1,42
B-fator médio (Å <sup>2</sup> )	23,66	27,00
Ramachandran outliers	0/229	0/229

\* R-fator =  $\sum hkl \frac{||F_o| - |F_c||}{\sum(F_o)}$ , para o conjunto de trabalho, correspondendo a 95% dos dados.

\*\* R-livre =  $\sum hkl \frac{||F_o| - |F_c||}{\sum(F_o)}$ , para o conjunto teste, correspondendo a 5% dos dados, selecionados aleatoriamente.

Os cristais da TTRwt em complexo com os cinco flavonóides apresentaram parâmetros de rede bastante similares e grupo espacial P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2. A unidade assimétrica era formada pelos monômeros A e B da TTRwt, compreendidos pelos resíduos de aminoácido 10 ao 124 e 10 ao 125, nos monômeros A e B, respectivamente. Os nove primeiros aminoácidos não apresentaram densidade

eletrônica evidente, assim como os três/dois últimos resíduos, indicando flexibilidade das porções amino e carboxi terminal das subunidades monoméricas, assim como observado nos complexos TTR:GEN e na estrutura da apoV30M. O tetrâmero (ABCD) da TTRwt foi gerado a partir da unidade assimétrica (AB) por aplicação da operação de simetria de ordem 2 no eixo cristalográfico Z. Duas cópias simétricas dos ligantes foram encontradas em cada sítio de ligação dos complexos TTRwt:flavonóides, como já reportado em outras estruturas de complexos TTR:ligantes.

**Tabela 8.3** – Estatísticas do processamento e refinamento dos dados dos complexos cristalográficos TTRwt:KAE TTRwt:NAR e TTRwt:CHR. Os valores em parênteses indicam a faixa de maior resolução.

Parâmetro/estrutura cristalográfica	TTRwt:KAE	TTRwt:NAR	TTRwt:CHR
Comprimento de onda (Å)	1,46	1,46	1,43
Grupo espacial	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2
Cela unitária (Å)	43,326 85,666 64,350	43,734 85,173 65,058	42,476 83,286 65,540
Faixa de resolução (Å)	30,00 – 2,05	22,25 – 1,60	19,27 – 1,75
Faixa de maior resolução (Å)	2,14 – 2,05	1,65 – 1,60	1,79 – 1,75
Reflexões no conjunto de trabalho	14172 (1749)	27878 (2544)	20396 (1522)
Reflexões no conjunto teste	1184 (154)	1507 (138)	1136 (74)
R-fator*	21,20 (22,57)	18,93 (17,14)	19,53 (27,80)
R-livre**	22,30 (26,71)	21,33 (25,63)	22,61 (32,50)
Completeza (%)	98,28 (99,00)	87,00 (99,80)	98,13 (94,94)
Redundância	4,5 (3,4)	5,1 (5,2)	4,8 (4,6)
I/σ médio	13,66 (1,93)	31,63 (7,70)	16,11 (3,25)
RMS ligações (Å)	0,036	0,045	0,014
RMS ângulos (°)	1,80	2,09	1,66
B-fator médio (Å <sup>2</sup> )	25,48	17,55	19,89
Ramachandran outliers	0/229	0/229	0/229

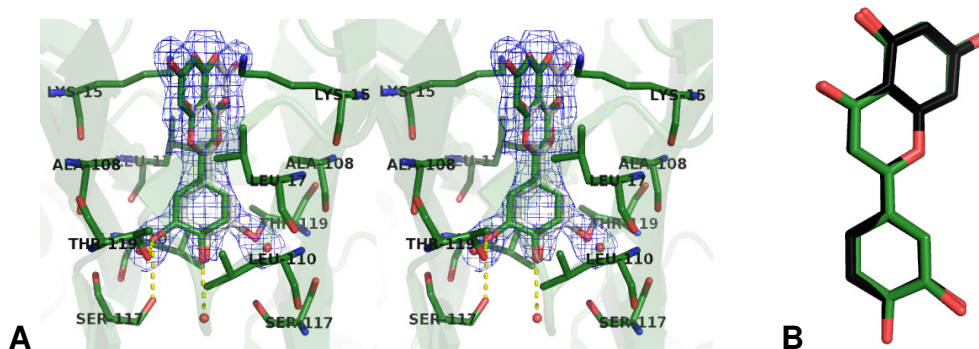
\* R-fator =  $\sum hkl (|F_o| - |F_c|) / \sum (F_o)$ , para o conjunto de trabalho, correspondendo a 95% dos dados.

\*\* R-livre =  $\sum hkl (|F_o| - |F_c|) / \sum (F_o)$ , para o conjunto teste, correspondendo a 5% dos dados, selecionados aleatoriamente.

Todos os ligantes foram encontrados com o anel B voltado para o fundo do canal, enquanto os anéis A e C dos flavonóides ocupavam a porção central e entrada dos sítios de ligação. Algumas duplas conformações das cadeias laterais dos resíduos da TTRwt que compõe os sítios de ligação foram inferidas à posição de uma ou outra cópia simétrica do ligante. A conformação relativa à interação do ligante simétrico é mostrada em cinza nas Figuras 8.2 – 8.6. A interação de uma das cópias simétricas dos flavonóides API, LUT, KAE, NAR e CHR com a TTRwt foi analisada usando-se o programa Ligplot (198) e será discutida a seguir.

*TTRwt:LUT*

A hidroxila em posição 3' de LUT pode contatar a cadeia lateral de Ser117 e Thr119 no HBP3 da TTRwt através de interações de hidrogênio. Vale comentar que somente uma conformação de Ser117 e Thr119 foi observada na estrutura TTRwt:LUT. A hidroxila em posição 3' de LUT acomoda-se no HBP3 da TTRwt, na posição de uma molécula de água, que foi refinada em meia ocupação. Assim, dependendo da orientação de LUT no sítio, esta molécula de água ou é deslocada por LUT, ou é mantida, sendo coordenada pelas cadeias laterais de Ser117 e Thr119. Ao contrário do observado no complexo TTRwt:GEN, LUT liga mais acima nos sítios da TTRwt que GEN. Desta forma, a hidroxila em posição 4' de LUT não encontra-se em distâncias ideais para formar interações polares com a cadeia lateral de Ser117 no fundo dos sítios de ligação. No entanto, a 4'OH de LUT pode formar interações de hidrogênio com uma molécula de água localizada no fundo do sítio. Vale comentar que esta molécula de água é deslocada quando GEN está ligada à TTR – Figura 8.2.



**Figura 8.2** – Interação da luteolina (LUT) com a TTRwt, assim como verificado no complexo cristalográfico TTRwt:LUT. **(A)** Figura estéreo do sítio de ligação. Como não houve diferença entre os dois sítios de ligação apenas o sítio AC é mostrado. Os resíduos de aminoácido da TTRwt que participam de interações com LUT são mostrados em bastões. A molécula de água que participa da interação é mostrada em esfera. As ligações polares formadas por LUT com a TTRwt são indicadas em linhas pontilhadas amarelas. O ligante é mostrado em bastões e contornado pelo mapa de omissão ( $2F_o - F_c$ ) a  $\sigma = 0,5$ . Duas cópias simétricas do ligante foram encontradas nos sítios como consequência do eixo de simetria de ordem 2 cortar verticalmente o sítio de ligação. Assim, a cópia simétrica gerada é mostrada em bastões cinza. **(B)** Sobreposição do ligante no sítio AC (verde) com o ligante no sítio BD (preto) do complexo TTRwt:LUT. Os átomos de oxigênio são mostrados em vermelho e de nitrogênio em azul. As figuras foram geradas com o programa Pymol (De Lano Scientific).

Os anéis AC de LUT estão acomodados entre a porção apolar das cadeias laterais das duas Lys15 na entrada dos sítios. A posição de LUT e Lys15 sugere que



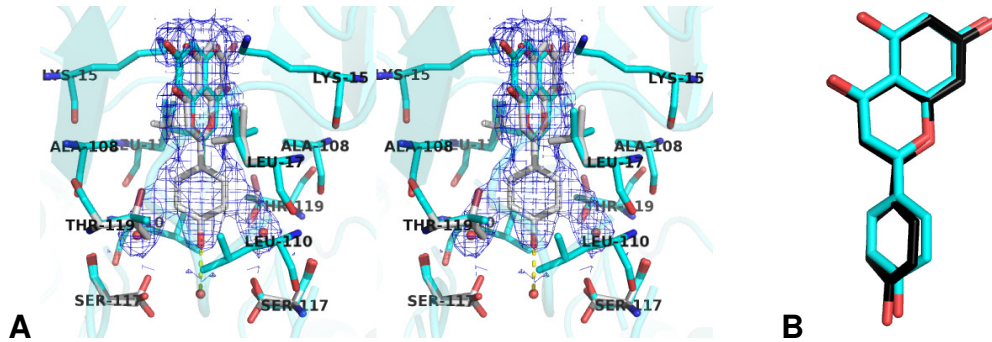
fortes interações apolares ocorrem entre os anéis AC do ligante e a cadeia lateral de Lys15 na entrada do sítio. LUT ainda pode formar interações hidrofóbicas, tanto com o sítio AC quanto com o sítio BD da TTRwt, através de contatos com Thr119 e Ala108 em uma das faces dos sítios e com Leu17 nas duas faces dos canais.

Segundo os dados de calorimetria (ITC), LUT interage com os dois sítios da TTRwt de modo não cooperativo, apresentando  $K_d = 100$  nM e  $\Delta G = -9,53$  kcal mol<sup>-1</sup> para os dois sítios. A interação é guiada pela entalpia (-10,30 kcal mol<sup>-1</sup>), com pequeno desfavorecimento entrópico ( $-T\Delta S = 0,78$  kcal mol<sup>-1</sup>).

Estes resultados estão de acordo com o observado na estrutura cristalográfica TTRwt:LUT. LUT apresenta posição equivalente nos dois sítios da TTRwt, formando 3 interações polares e várias interações hidrofóbicas com os sítios da TTRwt.

#### *TTRwt:API*

API interage com os dois sítios da TTRwt de maneira bastante similar à LUT. No entanto, a ausência da hidroxila em posição 3' em API limita o número de interações polares deste ligante com o fundo dos sítios. Desta forma e igualmente à LUT, API faz interações hidrofóbicas com as duas Lys15 na entrada dos dois sítios e com Thr119, Ala108, e Leu17 no fundo e centro do canal e, ainda, uma interação de hidrogênio entre sua 4'OH e uma molécula de água localizada no fundo do sítio. Vale comentar que a cadeia lateral de Ser117 no complexo TTRwt:API é bastante flexível, sendo que 3 rotâmeros puderam ser modelados. No entanto, as distâncias entre os OGs destas conformações de Ser117 e a 4'OH de API são longas, sendo assim pouco provável que esta interação ocorra de maneira eficiente. Desta forma, sugere-se que a interação de API com a TTRwt seja dominada por interações apolares, assim como já descrito para muitos ligantes da TTRwt (101, 109) e os contatos polares de API com a TTRwt estejam limitados à interação da 4'OH do ligante com uma molécula de água cristalográfica no fundo do sítio - Figura 8.3.



**Figura 8.3** – Interação da apigenina (API) com a TTRwt, assim como verificado no complexo cristalográfico TTRwt:API. **(A)** Figura estéreo do sítio de ligação. Como não houve diferença entre os dois sítios de ligação apenas o sítio AC é mostrado. Os resíduos de aminoácido da TTRwt que participam de interações com API são mostrados em bastões. A molécula de água que participa da interação é mostrada em esfera e conectada à 4'OH de API por linhas pontilhadas amarelas. O ligante é mostrado em bastões e contornado pelo mapa de omissão (2Fo-Fc) a  $\sigma = 0,5$ . Duas cópias simétricas do ligante foram encontradas nos sítios de ligação como consequência do eixo de simetria de ordem 2 cortar verticalmente o sítio de ligação. Assim, a cópia simétrica gerada é mostrada em bastões cinza. As duplas conformações de cadeias laterais de aminoácido da TTRwt encontradas são também mostradas em bastões cinza. **(B)** Sobreposição do ligante no sítio AC (ciano) com o ligante no sítio BD (preto) do complexo TTRwt:API. Os átomos de oxigênio são mostrados em vermelho e de nitrogênio em azul. As figuras foram geradas com o programa Pymol (De Lano Scientific).

API apresenta assinatura termodinâmica similar à de LUT, no entanto, a contribuição entálpica da ligação de API ( $\Delta H = -8,30 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) à TTRwt é menor, porém a entropia de ligação é um pouco mais favorável ( $-T\Delta S = -0,29 \text{ kcal mol}^{-1}$ ). Como consequência dessas diferenças, a variação da energia livre de Gibbs e o  $K_d$  de API são menos favoráveis à ligação que os de LUT – Tabela 8.1. Como API e LUT ligam de maneira bastante similar aos sítios da TTRwt, é muito provável que as diferenças energéticas da ligação de API e LUT à TTRwt sejam decorrência da ausência da hidroxila em posição 3' em API. Desta forma, os contatos polares de API com o fundo dos sítios da TTRwt são limitados, e, assim, há diminuição da contribuição entálpica da ligação. Contatos entre a proteína e o ligante podem limitar a movimentação de cadeias laterais dos resíduos de aminoácido da proteína, e esse é um dos fatores que levam à entropia desfavorável da ligação de pequenas moléculas a proteínas (114). Baseado neste princípio, é muito provável que a entropia mais favorável observada para a ligação de API à TTRwt, em relação à LUT, seja devido à ausência de contatos polares entre este flavonóide e a proteína. No entanto, o ganho entálpico da ligação de LUT à TTRwt foi maior que a perda entrópica. Assim, LUT ainda apresentou  $\Delta G$ , e, consequentemente  $K_d$ , mais favoráveis que API ( $K_d = 490 \text{ nM}$ ).

*TTRwt:KAE*

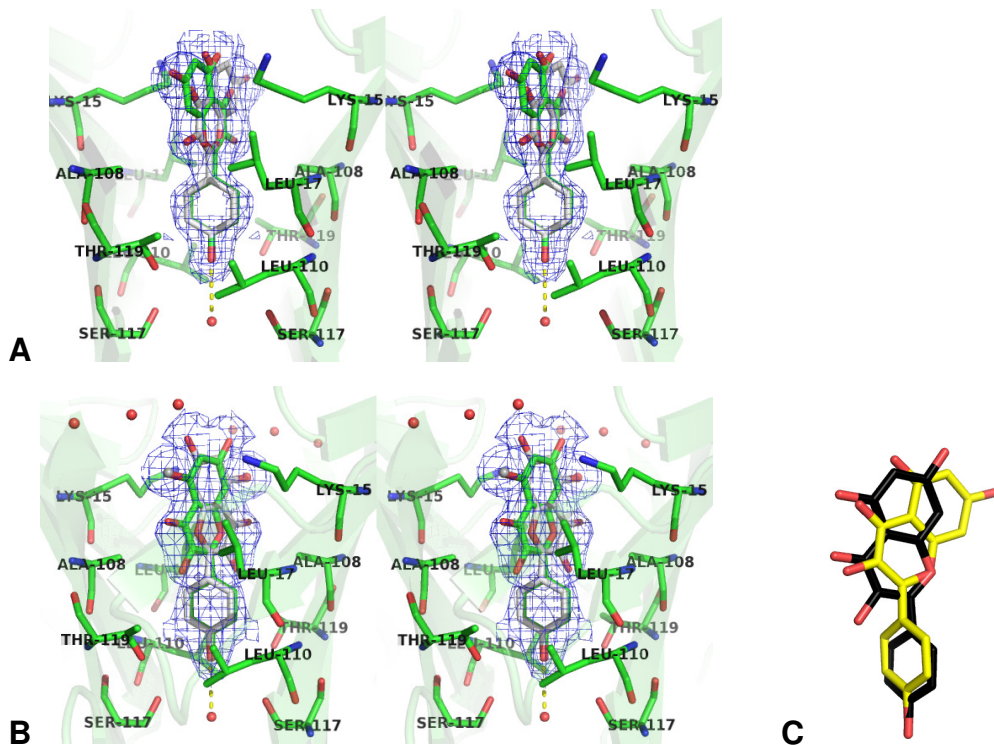
A posição de KAE no sítio AC, similar à de LUT e à de API, favorece interações apolares com Lys15 na entrada deste sítio. KAE ainda pode contatar uma molécula de água posicionada no fundo do sítio, assim como LUT e API. No entanto, os demais contatos hidrofóbicos de KAE com o sítio AC da TTRwt são limitados e apenas Leu17 participa destas interações - Figura 8.4.

No sítio BD, KAE encontra-se deslocado em direção ao centro e fundo do canal. Assim, os anéis AC de KAE encontram-se muito distantes ( $> 5 \text{ \AA}$ ) dos átomos da cadeia lateral de Lys15 e as fortes interações apolares com Lys15 não são observadas. Além disto, muitas moléculas de água são encontradas na entrada do sítio BD do complexo TTRwt:KAE. Porém, a interação de 4'OH de KAE com a água do fundo do canal ocorre de maneira bastante similar ao observado no canal AC e nos complexos TTRwt:API/LUT. Leu17, Leu110 e Ala108 participam de interações hidrofóbicas com KAE, contribuindo para sua estabilização no sítio BD.

Apenas uma conformação de Ser117 foi encontrada nos dois sítios do complexo TTRwt:KAE. No entanto, as distâncias entre 4'OH de KAE e OG de Ser117 são longas ( $> 3,6 \text{ \AA}$ ), sendo pouco provável que esta interação seja formada.

De modo geral, existem diferenças de interação de KAE com os dois sítios da TTRwt. Estas diferenças são decorrentes do distinto posicionamento do ligante nos dois sítios de ligação da TTRwt, resultando em perda das interações com Lys15 e retenção de moléculas de água na entrada do sítio BD.

Os resultados de ITC mostraram dúvidas em relação ao mecanismo de interação de KAE com a TTRwt. O ajuste das curvas de ITC de KAE com a TTRwt pôde ser realizado tanto com o modelo de “sítios seqüenciais” quanto com o modelo de “sítios idênticos e independentes”, como comentado no início deste capítulo. No entanto, os valores de  $K_d$  retornados pelo modelo de sítios seqüenciais melhor corroboram com os dados de agregação *in vitro*. Além disto, foram verificadas diferenças de interação de KAE com os dois sítios da TTRwt nas análises de cristalografia. No complexo TTRwt:KAE foi verificada diferença na posição e interação do ligante com o sítio AC em relação ao sítio BD da TTRwt. Desta forma, é mais provável que KAE interaja com os dois sítios da TTRwt seguindo um modelo de “sítios seqüenciais”, com cooperatividade negativa neste caso.



**Figura 8.4** – Interação do kaempferol (KAE) com a TTRwt, assim como verificado no complexo cristalográfico TTRwt:KAE. **(A)** Figura estéreo do sítio de ligação AC. **(B)** Figura estéreo do sítio de ligação BD. Os resíduos de aminoácido da TTRwt que participam de interações com KAE são mostrados em bastões. A molécula de água que participa da interação e as moléculas de água encontradas somente na entrada do canal BD são mostradas em esferas. As ligações polares formadas por KAE com a TTRwt são indicadas em linhas pontilhadas amarelas. O ligante é mostrado em bastões e contornado pelo mapa de omissão (2Fo-Fc) a  $\sigma = 0,5$ . A cópia simétrica do ligante gerada é mostrada em bastões cinza. **(C)** Sobreposição do ligante no sítio AC (amarelo) com o ligante no sítio BD (preto) do complexo TTRwt:KAE. Os átomos de oxigênio são mostrados em vermelho e de nitrogênio em azul. As Figuras foram geradas com o programa Pymol (De Lano Scientific).

Os parâmetros termodinâmicos retornados pelo ajuste das curvas de ITC de KAE em modelo seqüencial mostram que o sítio de maior afinidade teria  $K_{d1}$  na ordem de nanomolar, maior contribuição entálpica e, principalmente, entropia favorável para a interação – Tabela 8.1. Os dados de cristalografia mostram que a molécula de KAE ocupando o sítio AC da TTRwt liga em posição semelhante à de API e LUT, formando interações similares ao observado no complexo TTRwt:API: interações apolares com Lys15 na entrada do sítio e de hidrogênio com uma água no fundo do canal. Este modo de ligação corrobora com os valores de  $K_{d1}$  encontrados para KAE, API e LUT, todos na ordem de nanomolar. A variação da entalpia da ligação de KAE à TTRwt foi bastante similar ao observado para API, o que está em harmonia com o número e tipo de contatos observados para estes dois ligantes. No entanto, KAE apresentou entropia ( $-T\Delta S = -1,04 \text{ kcal mol}^{-1}$ ), de ligação

um pouco mais favorável que API ( $-T\Delta S = -0,29 \text{ kcal mol}^{-1}$ ), resultando em maior afinidade da TTRwt por KAE que para API. É provável que o ganho entrópico observado para KAE seja decorrente da hidroxila em posição 3 nessa molécula, substituinte característico dos flavonóis. Como será discutido mais adiante nesta seção, este substituinte é posicionado na região central do sítio de ligação, próximo à região mais estreita da cavidade. Com isso, a acomodação da 3OH de KAE no sítio da TTRwt gera movimentos dos resíduos de aminoácido que formam esse sítio, sendo que esta deve ser a principal razão da variação de entropia mais favorável para a ligação de KAE, em relação a API, à TTRwt.

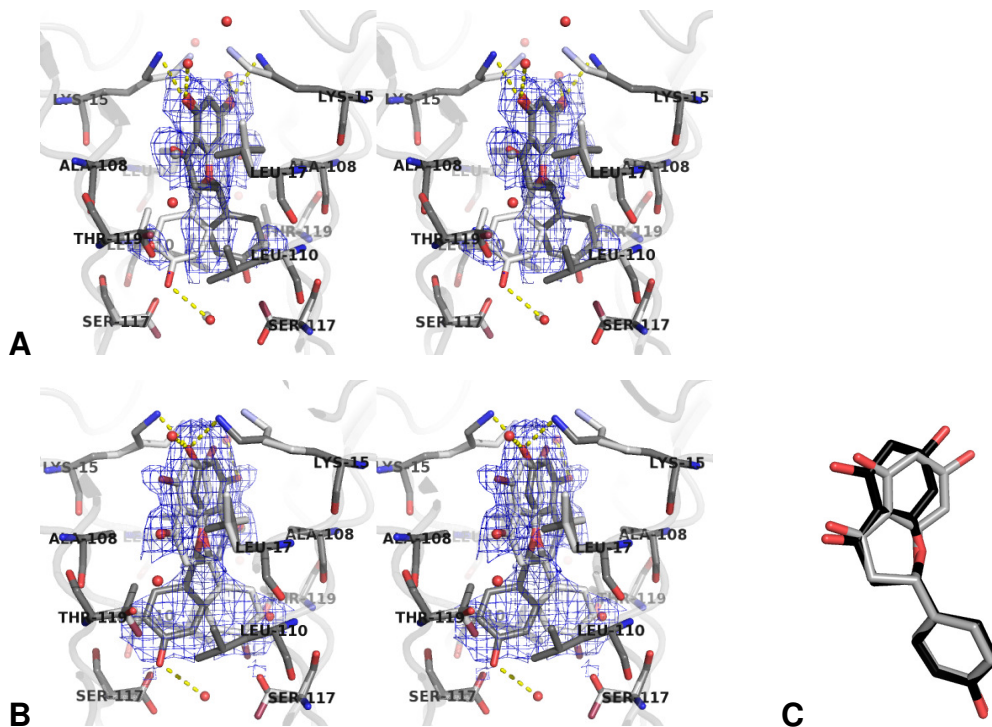
Já no sítio de menor afinidade, a contribuição entálpica da ligação de KAE é menos favorável, assim como o ganho entrópico – Tabela 8.1. A molécula de KAE no canal BD localiza-se deslocada, ocupando mais a região central do canal. Isso faz com que as interações apolares com Lys15 na entrada do sítio sejam bastante limitadas (distância  $> 5 \text{ \AA}$ ) e esta deve ser a principal razão da diminuição de entalpia observada para o segundo sítio de ligação de KAE. Além destas diferenças da posição e contatos formados por KAE no canal BD da TTRwt, foram também encontradas moléculas de água retidas na entrada e no centro desse sítio, moléculas estas que não foram encontradas no canal AC. Esta pode ser uma das razões da contribuição entrópica menos favorável para a ligação da segunda molécula de KAE à TTRwt.

#### *TTRwt:NAR*

NAR liga aos dois sítios da TTRwt de maneira bem deslocada em comparação aos demais flavonóides. Isto faz com que moléculas de água fiquem retidas no centro e entrada dos canais de ligação. A ausência de dupla ligação no anel C de NAR dá maior liberdade conformacional a este anel, bem como maior flexibilidade de posicionamento do anel B. A densidade eletrônica relativa ao anel B de NAR é bastante fragmentada, no canal AC do complexo cristalográfico TTRwt:NAR. Sendo assim, existe incerteza quanto à posição deste anel de NAR no sítio AC. No entanto, no canal BD pôde-se modelar o anel B de NAR com mais segurança. Este anel encontra-se inserido no HBP3 do sítio BD da TTRwt, gerando o deslocamento das cadeias laterais de Thr119 e Ser117 para acomodação do ligante e otimização de interações hidrofóbicas com a porção apolar das cadeias laterais de Ser117 e Thr119. A 4'OH do anel B de NAR pode ainda contatar uma molécula de água

cristalográfica no fundo do sítio – Figura 8.5.

NAR apresenta um certo deslocamento na entrada do sítio AC em relação ao BD - Figura 8.5B. Isto faz com que as interações entre NAR e o sítio BD da TTRwt sejam mais favoráveis. No sítio AC, as hidroxilas em posição 7 e 5 de NAR podem contatar diretamente as cadeias laterais de Lys15 dos monômeros A (3,2 Å) e C (3,0 Å) da TTRwt, respectivamente. Porém o anel B parece não ser muito bem acomodado no HBP3 no fundo desse sítio. Já no sítio BD o anel B de NAR está melhor acomodado no HBP3, sendo as interações hidrofóbicas e polares com o fundo do sítio otimizadas.



**Figura 8.5** – Interação da naringenina (NAR) com a TTRwt, assim como verificado no complexo cristalográfico TTRwt:NAR. **(A)** Figura estéreo do sítio de ligação AC. **(B)** Figura estéreo do sítio de ligação BD. Os resíduos de aminoácido da TTRwt que participam de interações com NAR são mostrados em bastões. A molécula de água que participa da interação é mostrada em esferas. As ligações polares formadas por NAR com a TTRwt são indicadas em linhas pontilhadas amarelas. O ligante é mostrado em bastões e contornado pelo mapa de omissão (2Fo-Fc) a  $\sigma = 0,5$ . Duas cópias simétricas do ligante foram encontradas nos sítios de ligação como consequência do eixo de simetria de ordem 2 cortar verticalmente o sítio de ligação. Assim, a cópia simétrica gerada é mostrada em bastões cinza. As duplas conformações de cadeias laterais de aminoácido da TTRwt encontradas são também mostradas em bastões cinza. **(C)** Sobreposição do ligante no sítio AC (cinza) com o ligante no sítio BD (preto) do complexo TTRwt:NAR. Os átomos de oxigênio são mostrados em vermelho e de nitrogênio em azul. As Figuras foram geradas com o programa Pymol (De Lano Scientific).

A hidroxila em posição 7 de NAR está disposta exatamente entre as duas

cadeias laterais de Lys15, podendo contatar o grupo amina das duas Lys15 na entrada do sítio BD em mesma distância (2,7 Å). Vale comentar que a hidroxila dos flavonóides com maior propensão à deprotonação é a hidroxila em posição 7 ( $pK_a < 7$ ) – calculado no servidor Sparc (<http://sparc.chem.uga.edu/sparc/>). Desta forma, a posição do substituinte em posição 7 de NAR e das cadeias laterais de Lys15 no sítio BD de TTRwt:NAR podem sugerir a formação de interações eletrostáticas. Os substituintes em posição 5 e 7 de NAR, em adição às interações polares com Lys15, podem ainda formar interações de hidrogênio com moléculas de água posicionadas na entrada dos dois sítios. Essas moléculas de água estão posicionadas entre Lys15 e 5,7-OH de NAR, podendo assim ser coordenadas por estes, dependendo da orientação da cadeia lateral de Lys15, a qual foi modelada em dupla conformação nos dois sítios de ligação. Contatos hidrofóbicos com Lys15, Leu17, Ala108 e Leu110, são também observados, sendo esses últimos mais favoráveis (em número e distâncias interatômicas) no sítio BD.

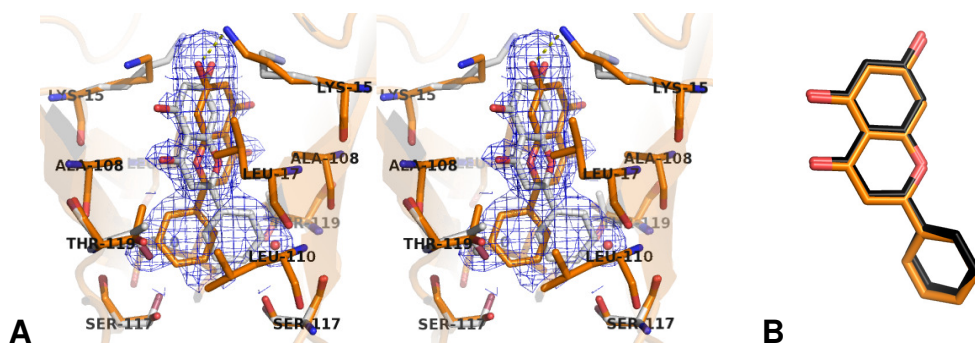
Os dados de cristalografia indicam a existência de diferenças de interação entre NAR e os dois sítios da TTRwt. Estas mostram o envolvimento de diferentes átomos do ligante em contatos polares com Lys15, maiores distância destes contatos no sítio AC, bem como menor número e maiores distâncias de contatos apolares nesse sítio de ligação. Estas observações dariam suporte à diferenças de afinidade de NAR aos dois sítios da TTRwt.

O ajuste dos dados de ITC de NAR em modelo de “sítios seqüenciais” mostra que NAR apresenta contribuição entálpica similar para a interação com os dois sítios da TTRwt ( $\Delta H_1 = -10,40 \text{ Kcal mol}^{-1}$ ;  $\Delta H_2 = -10,60 \text{ Kcal mol}^{-1}$ ), porém a variação de entropia é mais favorável para a interação da primeira molécula do ligante com a TTRwt ( $-T\Delta S_1 = 1,96 \text{ Kcal mol}^{-1}$ ;  $-T\Delta S_2 = 3,36 \text{ Kcal mol}^{-1}$ ). Não foram encontradas diferenças no número de moléculas de água retidas nos dois sítios do complexo TTRwt:NAR e, com exceção dos átomos do anel B, os valores de B-fator dos átomos dos ligantes nos dois sítios da TTRwt são bastante similares. Assim, o favorecimento entrópico para a ligação da primeira molécula de NAR à TTRwt pode ser consequência dos diferentes tipos de contato realizados com Lys15 na entrada do sítio (interação eletrostática no sítio BD e de hidrogênio no sítio AC) e da melhor acomodação do anel B no sítio BD. Esta última observação pode prejudicar a entropia de ligação no canal BD da TTRwt, por diminuir a liberdade conformacional do ligante, como já mencionado.

*TTRwt:CHR*

CHR não apresenta a hidroxila em posição 4', ao contrário dos outros flavonóides analisados. Desta forma, não foram detectadas interações polares entre CHR e o fundo do sítio da TTRwt. Como consequência, a molécula de CHR encontra-se um pouco deslocada em direção ao fundo do canal, com o anel B deste flavonóide inserido no HBP3 da TTRwt, adquirindo posição similar à de NAR (sítio BD). Assim como observado no complexo TTRwt:NAR, esta alocação de CHR possibilita a formação de interações polares entre o substituinte em posição 7 de uma das cópias simétricas de CHR com uma das cadeias laterais de Lys15 (NZ) na entrada dos sítios. No entanto, na outra face do sítio a cadeia lateral de Lys15 é encontrada rotacionada, provavelmente devido a impedimentos estéricos com os anéis de CHR (distância ~ 1,9 Å).

A posição de CHR, bem como as interações realizadas entre CHR e a TTRwt são bastante preservadas nos dois sítios de ligação. A interação polar com Lys15 na entrada do sítio ocorre em mesma distância interatômica na entrada dos dois sítios (NZ Lys15: 7O(H) CHR = 3,0 Å). CHR ainda pode realizar contatos apolares com Lys15, Leu17, Ala108, Leu110, Ser117 e Thr119 – Figura 8.6. No entanto, estes últimos são um pouco privilegiados no sítio BD (principalmente com Lys15, Leu17 e Leu110) em relação ao AC.



**Figura 8.6** – Interação da crisina (CHR) com a TTRwt, assim como verificado no complexo cristalográfico TTRwt:CHR. **(A)** Figura estéreo do sítio de ligação. Como não houve diferença significativa na posição do ligante nos dois sítios de ligação apenas o sítio AC é mostrado. Os resíduos de aminoácido da TTRwt que participam de interações com CHR são mostrados em bastões. A interação polar formada por CHR com a TTRwt é indicada em linhas pontilhadas amarelas. O ligante é mostrado em bastões e contornado pelo mapa de omissão (2Fo-Fc) a  $\sigma = 0,5$ . A cópia simétrica do ligante, gerada ao longo do eixo cristalográfico Z, é mostrada em bastões cinza. As duplas conformações de cadeias laterais de aminoácido da TTRwt encontradas são também mostradas em bastões cinza. **(B)** Sobreposição do ligante no sítio AC (laranja) com o ligante no sítio BD (preto) do complexo TTRwt:CHR. Os átomos de oxigênio são mostrados em vermelho e de nitrogênio em azul. As figuras foram geradas com o programa Pymol (De Lano Scientific).



Como CHR foi modelada exatamente na mesma posição nos dois sítios de ligação, essas pequenas diferenças encontradas devem ser consequência de movimentos alostéricos, que modificam a segunda cavidade de ligação, sendo estas insuficientes para alterar a conformação do ligante no sítio, porém prejudicando um pouco as interações de CHR com o sítio AC da TTRwt.

O ajuste dos dados de ITC de CHR em modelo seqüencial retornou parâmetros termodinâmicos semelhantes para os dois sítios de ligação de CHR – Tabela 8.1. As análises estruturais mostram poucas diferenças de interação de CHR com os dois sítios da TTR, as quais são concentradas em diferenças de interações apolares com Lys15, Leu17 e Leu110. Assim, as diferenças de interação de CHR com os dois sítios da TTRwt existem, porém são muito pequenas, e devem ser consequência do menor número de contatos hidrofóbicos formados por CHR com o sítio AC da TTRwt.

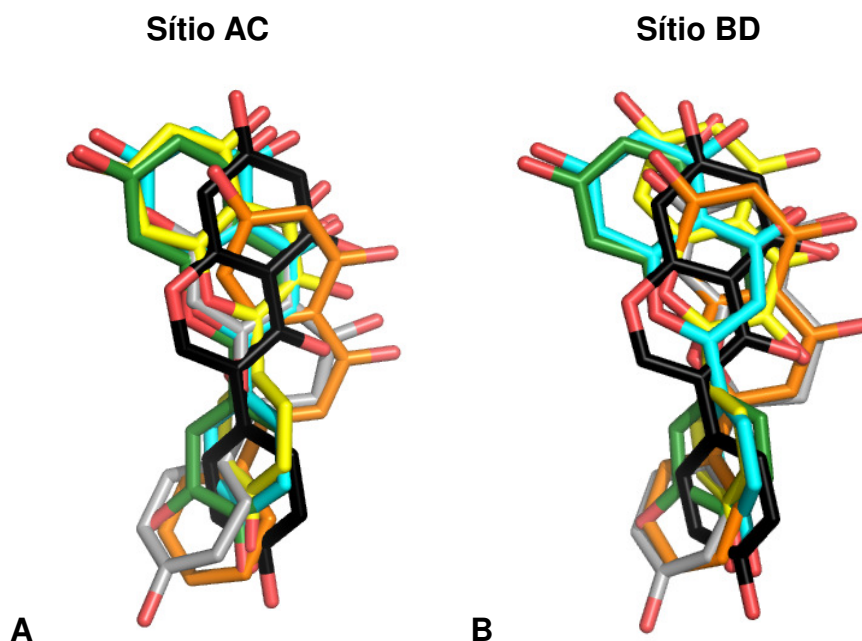
### ***8.3 Análise comparativa da ligação dos diferentes flavonóides à TTRwt***

Foi realizada, também, uma análise comparativa da posição dos diferentes flavonóides nos sítios da TTRwt (Figura 8.7).

O anel fenil (anel B) de todos os flavonóides ocupam o fundo do sítio da TTRwt, enquanto os anéis fundidos (anéis AC) a porção central e entrada do canal. Esta posição do ligante nos sítios da TTRwt é similar ao observado no complexo TTRwt:GEN – capítulo 7. Assim, GEN foi também incluída nesta comparação. GEN é acomodada mais ao fundo do sítio que KAE, API e LUT. Por outro lado, CHR e NAR estão bem deslocadas em direção ao fundo do sítio, com o anel B inserido no HBP3 da TTRwt – Figura 8.7.

LUT, API e KAE (sítio AC) posicionam os anéis fundidos mais na entrada do canal, alocados no HBP1 da TTRwt (entre Thr106 e Val121), em posição similar aos 3,5I do ligante natural T<sub>4</sub>. Já CHR e NAR mostram deslocamento horizontal, posicionando seus anéis fundidos em direção a um ou outro monômero da TTRwt na

região central e entrada dos sítios. A 3OH de KAE, a carbonila em posição 4 e a hidroxila em posição 5 de GEN também estão deslocadas no eixo horizontal do sítio, porém não tão proeminentes como os substituintes em posição 4,5 de CHR e NAR. Vale comentar que estas porções destes ligantes (anel C de NAR e CHR, 3OH de KAE e a 4C=O, 5OH de GEN) posicionam-se abaixo do HBP1 da TTRwt, uma região estreita do sítio de ligação, entre Ala108, Leu17, Thr119 e Val121 (Figura 8.8).



**Figura 8.7** – Sobreposição dos flavonóides GEN (preto), API (ciano), LUT (verde), KAE (amarelo), NAR (cinza) e CHR (laranja) como encontrados nos sítios AC (**A**) e BD (**B**) das estruturas cristalográficas da TTRwt em complexo com estes flavonóides.

NAR e KAE ocupam posição diferenciada no sítio BD em relação ao AC. NAR está um pouco mais deslocada em direção a uma das faces do sítio BD, ocupando posição equivalente à de CHR nesse sítio de ligação. Já KAE ocupa posição distinta à de LUT e API no sítio BD, encontrando-se mais centralizado, com suas 3OH, 4C=O sobrepostas aos substituintes em posição 4,5 de GEN – Figura 8.7B.

De modo geral, apesar dos flavonóides ocuparem posição global similar, diferenças são encontradas na disposição destes ligantes no sítio da TTRwt (Figura 8.7), como consequência de sua distinta composição química/estrutural. Assim, diferentes interações dos flavonóides com os resíduos da TTRwt foram observadas e algumas relações entre a posição dos ligantes no sítio, regiões do sítio exploradas e tipos de contatos proteína:ligante formados foram inspecionadas e relacionadas à afinidade.

Como já reportado para outros ligantes da TTRwt (101, 109), contatos polares na entrada e fundo dos sítios mostraram-se importantes para a afinidade. Em particular, as interações polares entre os flavonóides e a cadeia lateral de Ser117 parecem de importância fundamental para a afinidade, contribuindo com a entalpia da ligação, porém com compensação entrópica ainda inferior ao ganho entálpico. GEN e LUT, foram os flavonóides testados de maior afinidade pela TTRwt ( $K_{d1}$  GEN= 30 nM;  $K_d$  LUT= 100 nM) e realizam estas interações. Já CHR não realiza esse tipo de interação e foi o flavonóide testado que mostrou menor afinidade à TTRwt ( $K_{d1}$  = 1,7  $\mu$ M). Além disto, KAE ( $K_{d1}$  = 180 nM) e API ( $K_{d1}$  = 490 nM) também mostraram menor afinidade e menor contribuição entálpica para a ligação, que LUT por exemplo, e não realizam contatos diretos com Ser117 (Tabela 8.1 e Figuras 8.2 a 8.6). Observações similares foram também realizadas com os análogos do diflunisal (DIF) (109). O análogo de maior afinidade ( $K_{d1}$ = 9 nM) – Figura 1.11B) realiza interações polares com Ser117, ao contrário de DIF e outros análogos que ligam em modo *forward* ( $K_{d1}$  ~80 nM) (109).

Os contatos polares com Lys15 na entrada dos sítios parecem também contribuir para a entalpia da ligação, porém a perda entrópica é mais significativa, nem sempre favorecendo a afinidade. NAR e CHR, por exemplo, realizam estes contatos polares com Lys15 na entrada dos sítios, apresentando entalpia de ligação bastante favorável, porém este ganho é compensado pela perda entrópica, desfavorecendo a ligação à TTR.

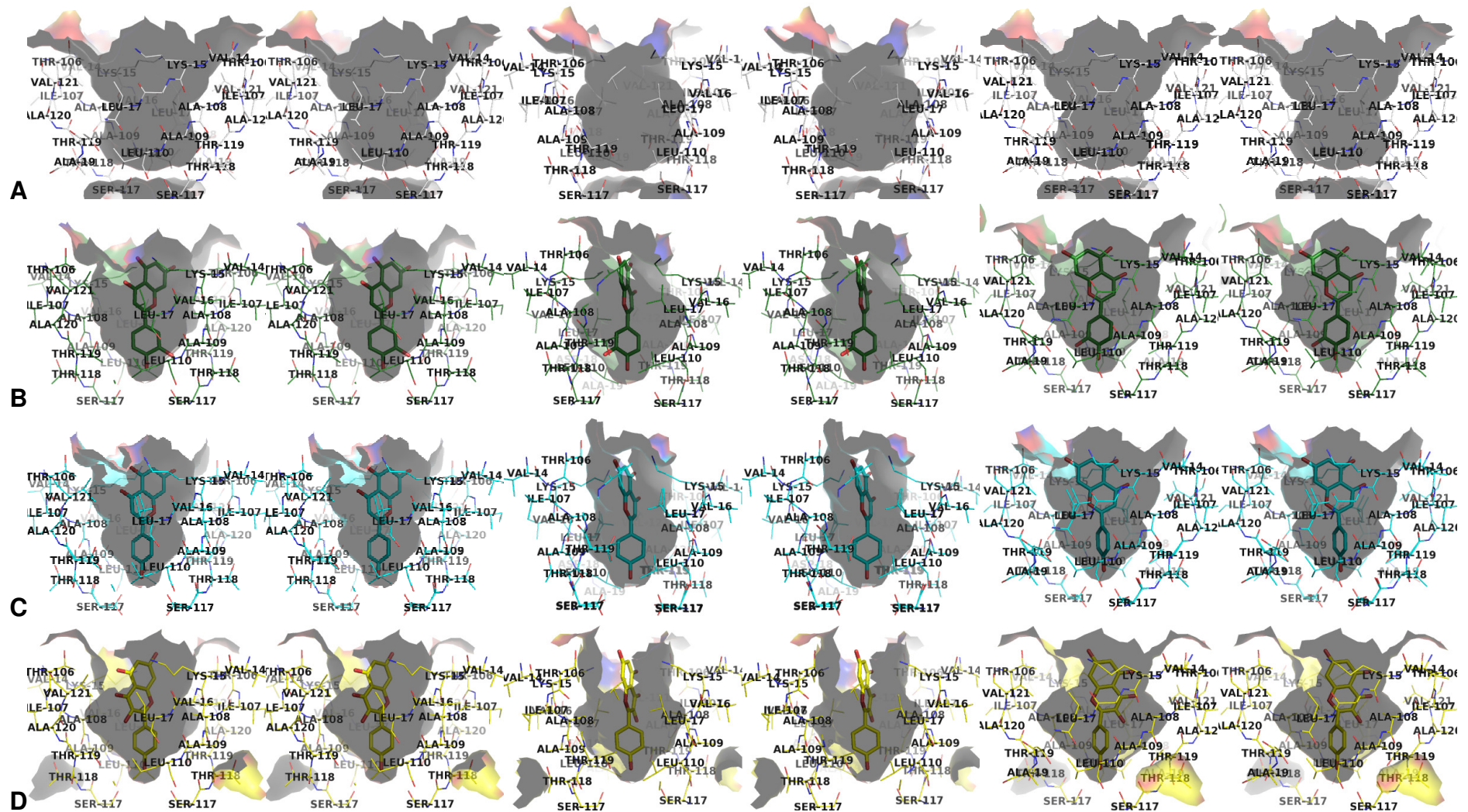
No entanto, interações, mesmo que não polares, com a cadeia lateral de Lys15 mostraram-se bastante importantes para guiar o posicionamento e fortalecer as interações dos flavonóides com a TTRwt, assim como verificado para LUT, API e KAE (sítio AC). A perda dessa interação em TTRwt:KAE (sítio BD) resultou em mau posicionamento ligante no sítio e perda de afinidade.

Além destes, contatos hidrofóbicos em todas as regiões do sítio, principalmente os mediados por Leu17 e Leu110, também contribuem para a estabilização dos flavonóides nos sítios da TTRwt. Porém sua contribuição para a afinidade parece ser menos pronunciada que as interações polares/ apolares com a entrada do sítio e polares com o fundo da cavidade.

A forma, volume e movimentações dos sítios de ligação em cada complexo TTRwt:flavonóide foi também analisada. Ilustrativamente, a superfície dos sítios de ligação BD - delimitada pelos resíduos 14-19, 106-110 e 117-121 - em cada

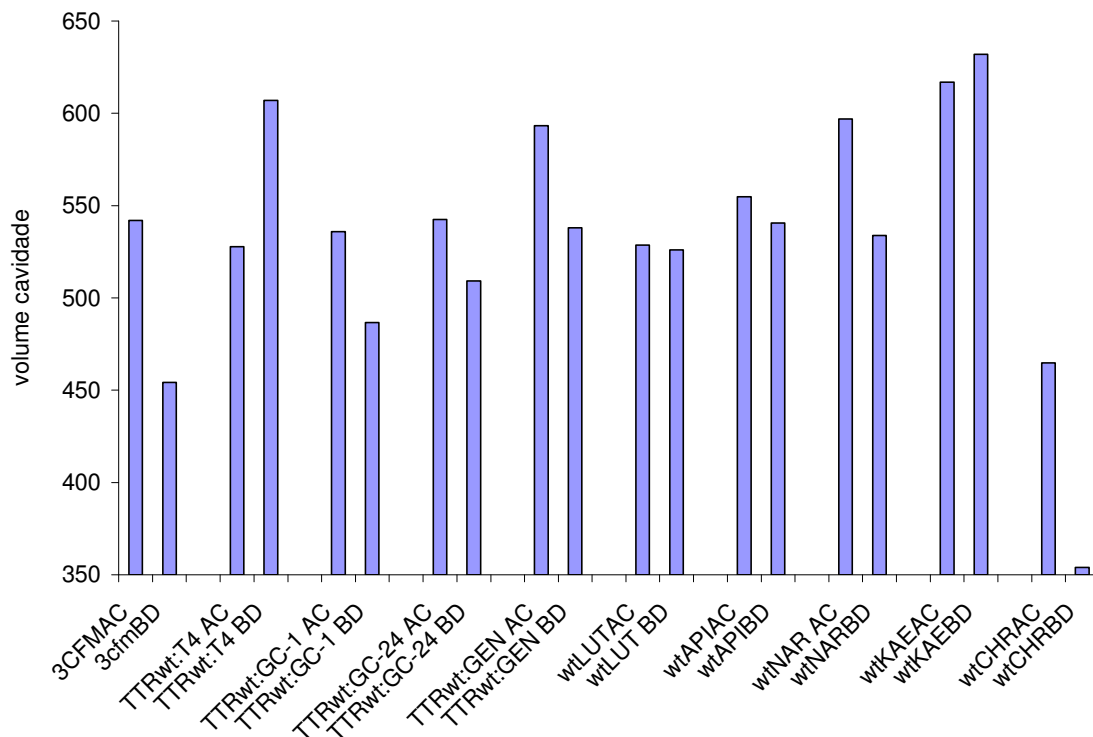
---

complexo TTRwt:flavonóide é mostrada na Figura 8.8 em imagens estéreo. O volume de cada uma das cavidades foi também calculado e é mostrado na Figura 8.9 para facilitar a interpretação destes dados. Além disso, os átomos da cadeia principal dos resíduos que formam os sítios de ligação dos complexos TTRwt:flavonóides foram sobrepostos aos mesmos átomos da estrutura da apoTTRwt. A variação da posição destes átomos é mostrada na Figura 8.10A e Figura 8.10B. Para melhor compreensão da direção do movimento induzido pela interação do ligante, foi realizada análise da variação das distâncias de átomos de C $\alpha$  de resíduos equivalentes que formam os sítios de ligação. A diferença entre as distâncias encontradas na estrutura da apoTTRwt com as mesmas distâncias nas estruturas TTRwt:flavonóides é mostrada na Figura 8.10C e Figura 8.10D. Nesta última análise, valores negativos indicam movimentação dos C $\alpha$  em direção oposta ao ligante nos complexos TTRwt:flavonóides.



(continua)





**Figura 8.9** – Volume dos sítios de ligação da TTRwt em diferentes estruturas cristalográficas. Os cálculos foram realizados no servidor CASTp.

Em todos os complexos TTRwt:flavonóides é observado estreitamento do fundo do sítio, que adquire formato complementar ao do ligante, com exceção de TTRwt:GEN (Figura 8.8). Essa observação deve ser decorrente de movimentações do fundo do sítio (principalmente Ala109 e Leu110) para otimização de contatos hidrofóbicos proteína/ligante. No caso de TTRwt:GEN, o ligante aloca-se mais ao fundo e o posicionamento do anel B deve impedir ou minimizar esses movimentos.

TTRwt:LUT e, principalmente, TTRwt:KAE mostram alargamento do centro do canal, provocado por deslocamento das cadeias laterais de Ala109, Leu17, Thr119 e Val121. Estes movimentos podem ser resultado da acomodação dos anéis AC de LUT no HBP1 da TTRwt, aliado à acomodação da 3'OH do anel B de LUT no HBP3 (painéis da esquerda e da direita da Figura 8.8). No complexo TTRwt:KAE estes movimentos são mais evidentes e podem ser consequência da alocação da 3OH deste flavonol nesse bolsão, resultando em maior aumento do volume dos sítios de TTRwt:KAE – Figura 8.9.

TTRwt:API mostra estreitamento entre Lys15, Leu17, Ala108, não observado em TTRwt:LUT (painel central da Figura 8.8). Isto pode ser consequência da ausência da 3'OH em API, já que API e LUT apresentam posição equivalente nos

dois sítios de ligação e a única diferença estrutural entre eles é a hidroxila em posição 3' de LUT.

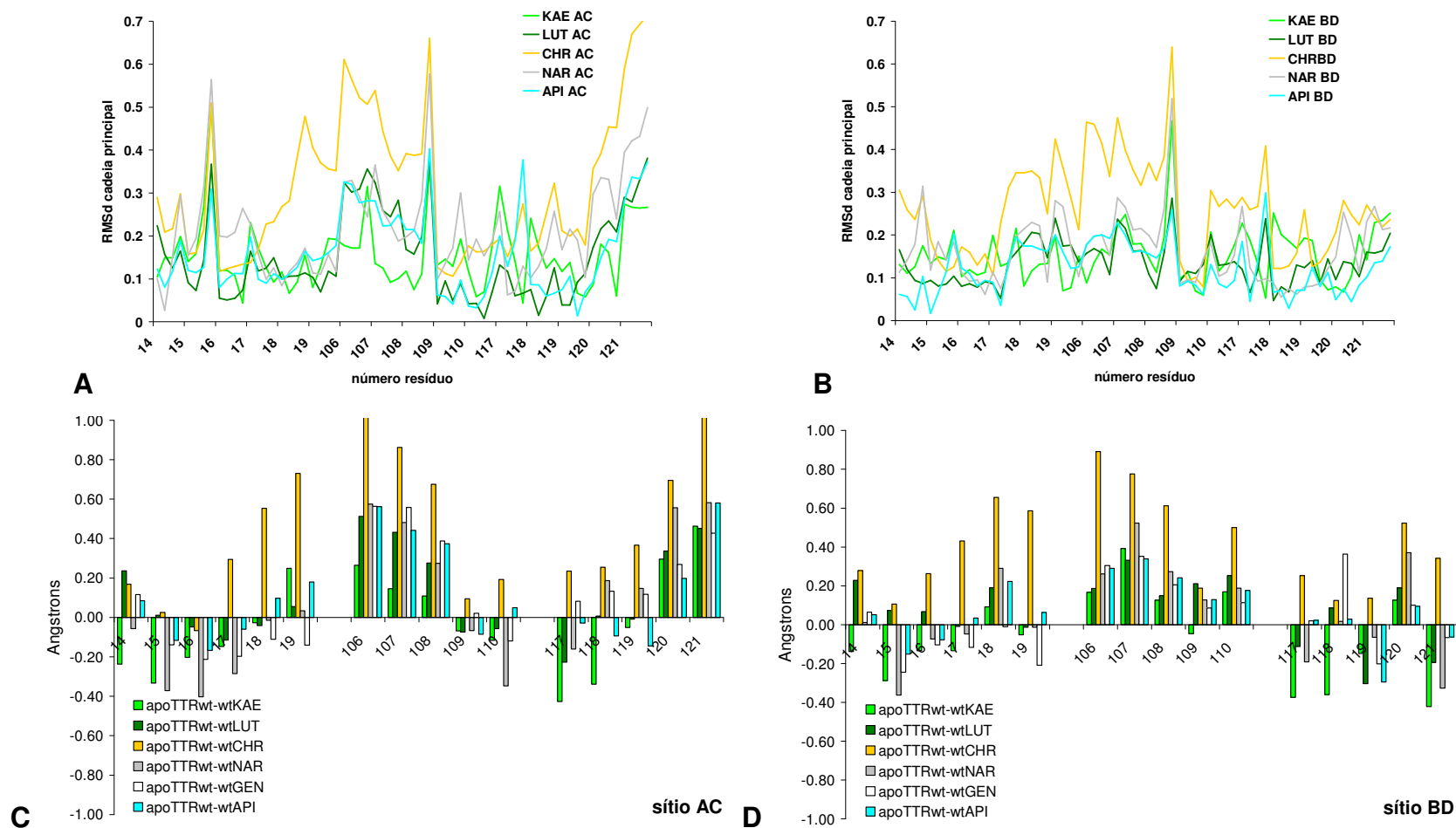
Como CHR e NAR ligam mais ao fundo do sítio, interações polares com as cadeias laterais de Lys15 são favorecidas e o anel B desses flavonóides insere-se no HBP3 da TTRwt. Desta forma, as cadeias laterais de Lys15 fecham e modificam a forma da entrada do sítio, o que é mais evidente em TTRwt:CHR (Figura 8.8F). Na região central do canal de ligação, NAR e CHR posicionam seus anéis fundidos (anéis A e C). No entanto, ao contrário do esperado e observado em TTRwt:KAE, não foi verificado aumento de volume dessa região do sítio em TTRwt:CHR, e movimentações mais sutis são observadas em TTRwt:NAR.

Apesar da posição da NAR ser semelhante a da CHR nos sítios de ligação, as movimentações dos resíduos da TTRwt induzidas por NAR são diferentes das de CHR. Em TTRwt:CHR há redução evidente do volume das cavidades (Figura 8.8 e Figura 8.9). Já TTRwt:NAR mostra perfil e volume das cavidades intermediário ao de TTRwt:CHR e TTRwt:KAE. Em TTRwt:NAR não há redução do volume do bolsão formado por Lys15, Ala108 e Leu17, assim como observado em TTRwt:KAE e TTRwt:LUT e, da mesma forma que observado em TTRwt:KAE, há alargamento do HBP1. No entanto, e ao contrário de TTRwt:KAE, não há aumento aparente de volume do bolsão central (Ala109, Leu17, Val121 – painel central da Figura 8.8).

Analisando a movimentação das cadeias principais dos sítios da TTRwt em complexo com os diferentes ligantes (Figura 8.10) verifica-se que a região compreendida entre os resíduos 106-108 se fecha em direção a estes flavonóides, sendo estes movimentos bastante significantes para TTRwt:CHR. Nos complexos TTRwt:NAR e TTRwt:KAE as movimentações são em direção oposta na entrada e fundo dos sítios. Estas movimentações devem ser decorrentes da acomodação da 3OH de KAE e do anel C de NAR na região central do sítio. No caso de TTRwt:CHR, que também posiciona seu anel C no centro da cavidade, essa movimentação não é observada. Este é um fato intrigante, porém se considerarmos que CHR não possui a 4'OH no anel B, podemos imaginar que este ligante consegue ser melhor acomodado no sítio, sem forçar as faces opostas do canal. Já ligantes que posicionam porções mais volumosas na região central do sítio e apresentam a 4'OH do anel B (KAE, NAR e GEN), há necessidade de alargamento de alguma região da cavidade para que os mesmos sejam acomodados. Em KAE e NAR as cadeias principais da entrada e fundo do sítio devem fazer este papel – Figura 8.10. Já em



TTRwt:GEN as movimentações no fundo do sítio são menos pronunciadas. Esta observação deve ser decorrência de GEN ligar mais ao fundo do sítio e as movimentações induzidas por este ligante serem propagadas na interface entre os dois sítios da TTRwt.



**Figura 8.10** – Diferenças entre os sítios de ligação da apoTTRwt em relação aos complexos TTRwt:flavonóides. **(A)** e **(B)** mostram um gráfico de RMSd da sobreposição dos átomos da cadeia principal dos complexos cristalográficos TTRwt:flavonóides com a estrutura da apoTTRwt. **(C)** e **(D)** mostram as diferenças das distâncias dos átomos de C $\alpha$  dos resíduos que compõe cada sítio de ligação da apoTTRwt subtraídos da mesma distância das estruturas TTRwt:flavonóides. Valores negativos indicam maior distância nos complexos TTRwt:flavonóides.

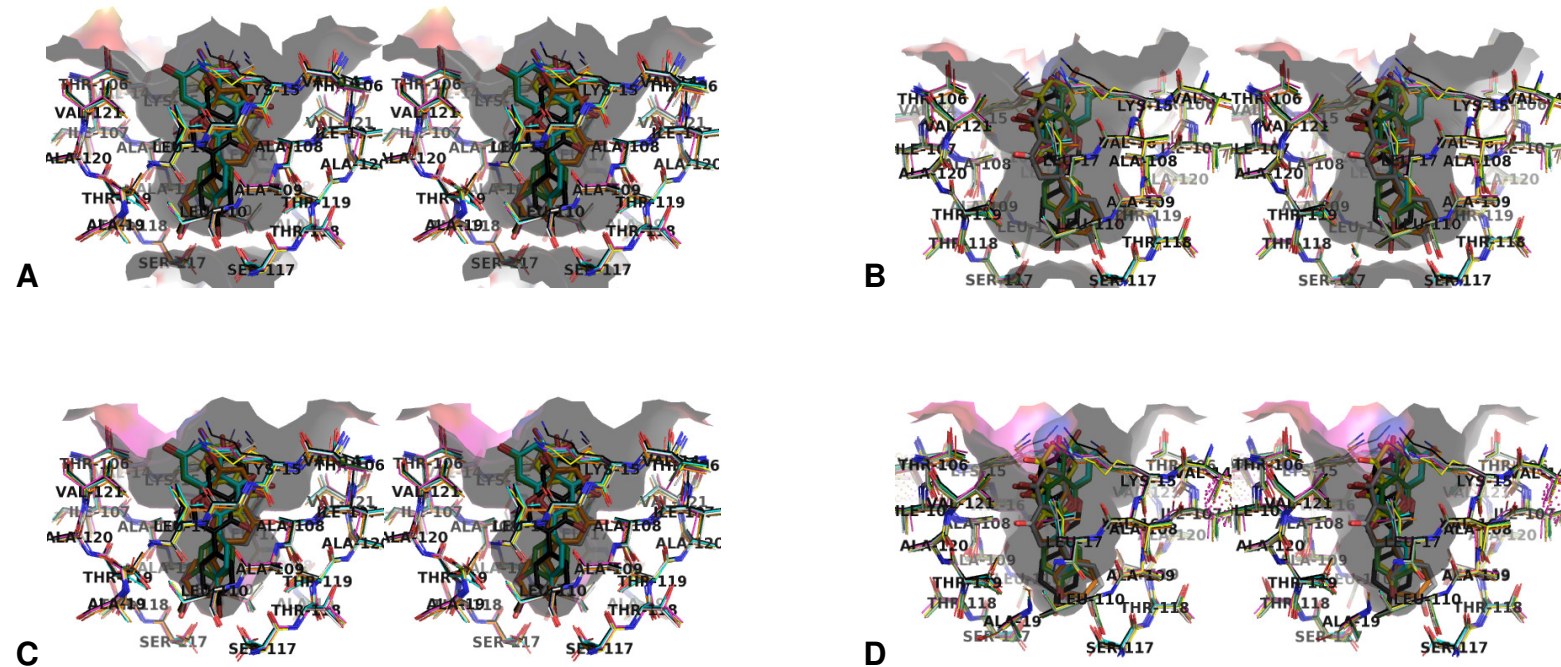
#### **8.4 Prováveis efeitos da mutação Met30 na ligação dos flavonóides à TTR mutante V30M**

Assim como mostrado no capítulo 6 NAR e CHR mostram inibição da agregação da V30M bem inferior à da TTRwt, mesmo em elevadas concentrações destes ligantes. O mesmo foi observado para KAE e GEN, porém em menor grau.

Observando novamente as Figura 8.7 e Figura 8.8 verifica-se que, com exceção de LUT e API, os outros flavonóides posicionam hidroxilas ou anéis um pouco abaixo do HBP1 (entre Leu17, Ala108, Thr119 e Val121), uma das regiões mais estreitas do canal. A carbonila em posição 4 e a hidroxila em posição 5 de GEN estão alocadas nessa região, assim como a hidroxila em posição 3 e as hidroxilas em posição 3 e 5 de KAE no sítio AC e BD, respectivamente. Da mesma maneira, os anéis C de NAR e CHR estão ali alocados nos sítios AC e BD da TTRwt.

Interessantemente, os flavonóides que acomodam porções volumosas na região central dos sítios de ligação mostram, também, menor inibição da mutante V30M em relação à TTRwt. Em conjunto, estes dados podem indicar que esta região do canal limita a interação destes flavonóides com a V30M. No mesmo sentido, foi observado que as diferenças entre a apoTTRwt e a apoV30M estão concentradas justamente nessa região – capítulo 5. A Figura 8.11 mostra o perfil do sítio da apoTTRwt e da apoV30M, com as moléculas dos flavonóides (assim como encontrado nos complexos TTRwt:flavonóides) sobrepostas aos sítios da apoTTRwt e apoV30M para comparação.

O estreitamento do centro do canal da mutante parece ser induzido pela mutação Met30, assim como discutido no capítulo 5. Essa mutação fica localizada nas adjacências dessa região, e deve também limitar os movimentos de expansão/ contração do sítio de ligação para acomodação dos ligantes.



**Figura 8.11** – Sobreposição do sítio de ligação BD das estruturas cristalográficas TTRwt:GEN (preto), TTRwt:LUT (verde), TTRwt:API (ciano), TTRwt:KAE (amarelo), TTRwt:CHR (laranja), TTRwt:NAR (cinza escuro), apoTTRwt (cinza claro) e apoV30M (magenta). A superfície do sítio de ligação (resíduos 14-19, 106-110 e 117-121) é mostrada para apoTTRwt (**A, B**) e apoV30M (**C, D**). A mutação Met30 é mostrada em pontilhado e pode ser observada nas extremidades da Figura D. As imagens são mostradas em estéreo e foram geradas com o programa Pymol (De Lano Scientific).

Como mostrado, a ligação de flavonóides à TTRwt gera movimentos bastante diversificados, modificando a forma e volume destas cavidades de ligação. Estas movimentações afetam, principalmente, a região central das cavidades e parecem ser fundamentais para a acomodação dos ligantes e otimização de sua interação com a TTR. Assim, a interação dos flavonóides com a V30M pode ser prejudicada, principalmente se estas moléculas posicionarem porções rígidas e volumosas na região central da cavidade, já que esta mutante apresenta estreitamento dessa região e limitações de flexibilidade do sítio para acomodação do ligante.

### ***8.5 Análise estrutural da cooperatividade entre os sítios da TTRwt ligando flavonóides***

Com exceção de API e LUT, os outros flavonóides mostraram cooperatividade entre os sítios de ligação, em maior (GEN (40x), KAE (20x), NAR (10x)) ou menor (CHR (<2x)) grau. As estruturas TTR:flavonóides foram sobrepostas à estrutura apoTTRwt e a variação da posição dos átomos nessas estruturas foi analisada. Foi verificado que todos os complexos TTRwt:flavonóides apresentam uma certa variação em relação à apoTTRwt (RMSd C $\alpha$  ~0,4 Å), assim como observado no complexo TTRwt:GEN. Porém, não foi identificada nenhuma diferença significativa, baseado nessas sobreposições, entre os diferentes complexos cristalográficos analisados, que poderia explicar a presença ou ausência de cooperatividade entre os sítios da TTRwt.

No entanto, pode-se verificar que os ligantes cooperativos apresentaram diferenças em sua posição nos dois sítios ou perda de interações importantes com resíduos da TTRwt. Assim, dependendo do tipo, modo e posição dos ligantes no sítio, as possíveis alterações alostéricas geradas pela interação da primeira molécula de ligante com o tetrâmero da TTRwt podem ter efeito neutro ou mais pronunciado na interação da segunda molécula destes flavonóides com a TTRwt.

Em TTRwt:GEN (capítulo 7) a rotação de Ser117 parece ser a protagonista do mecanismo seqüencial, já que Ser117 mostra participação fundamental na interação

de GEN com a TTRwt. A posição de GEN mais deslocada em direção ao fundo do canal pode ser o fator principal para que esta conformação seja induzida no segundo sítio de ligação.

No caso de KAE e NAR, o deslocamento do ligante na região central do segundo sítio mostra papel importante para os contatos formados entre estas moléculas e a TTRwt. A diferente acomodação do ligante no segundo sítio pode ser decorrência de movimentos induzidos pela ligação do primeiro ligante ao tetrâmero da TTRwt, aumentando a forma e o volume do segundo sítio (Figura 8.9) e, desta forma, prejudicando a interação da segunda molécula com a TTRwt.

Já no caso de CHR a movimentação do tetrâmero não provocou alterações na posição do ligante nos dois sítios, porém minimizou as interações hidrofóbicas com os resíduos da TTR no sítio de menor afinidade. CHR colapsa os sítios de ligação, e esse fechamento é observado em menor proporção no provável sítio de menor afinidade - AC (Figura 8.9). Não está muito claro o que provoca essas diferenças, porém a presença de uma molécula de CHR no tetrâmero da TTRwt pode limitar os movimentos de fechamento do segundo sítio, dificultando a acomodação da segunda molécula de CHR, e resultando em uma pequena perda de afinidade.

No caso de API e LUT, que não mostram cooperatividade de ligação, as moléculas do ligante ocupando os dois sítios da TTRwt apresentaram a mesma posição, as mesmas interações com a TTRwt e o volume e a forma das cavidade foi bastante similar (entre eles e em relação à apoTTRwt). Assim, provavelmente devido à diferença de acomodação de API e LUT no sítio da TTR (anéis fundidos no HBP1) e de suas distinções estruturais em relação ao KAE (presença de 3OH no anel C de KAE), as possíveis movimentações alostéricas induzidas pela ligação da primeira molécula de API ou LUT à TTRwt não afetam a ligação do segundo ligante, caracterizando um modo de interação não cooperativo.

Em geral, os flavonóides que se acomodam na região central dos sítios parecem ser mais suscetíveis às alterações conformacionais induzidas pela interação da primeira molécula do ligante com o tetrâmero da TTRwt, o que gera modificações de sua posição no segundo sítio (KAE e NAR) e/ou prejuízo para as interações com os resíduos da TTRwt (GEN, KAE, CHR, e NAR). Já ocupação do fundo do canal pelo ligante (observado em GEN) deve promover movimentações que são propagadas na interface do tetrâmero, podendo resultar em rotação da cadeia lateral de Ser117, comprometendo a afinidade no segundo sítio (no caso de

GEN) e maximizando as diferenças entre os sítios.

## **8.6 Conclusão**

Apesar das estruturas químicas dos flavonóides testados serem semelhantes, as pequenas diferenças químicas/estruturais testadas resultaram em distinta acomodação destes ligantes nos sítios da TTRwt. Como consequência, houve variação do reconhecimento destes flavonóides pela mutante V30M e presença de cooperatividade de ligação, de alguns destes, aos dois sítios da TTRwt. Essas diferenças parecem ser consequência da posição do anel B (em 3 na isoflavona genisteína), da flexibilidade do anel C (ausência de dupla ligação em NAR), da presença da 4'OH no anel B (ausente em CHR) e da 3OH no anel C (presente nos flavonóis, como KAE).

O anel B foi encontrado alocado mais acima, mais ao fundo ou inserido no HBP3 da TTRwt. Como consequência, os anéis fundidos (anéis AC) puderam ocupar o HBP1, a região central do sítio, ou ainda mostraram-se deslocados no eixo horizontal da cavidade. Com isso, as interações entre os flavonóides e a TTRwt foram moduladas, afetando, principalmente os contatos na entrada e fundo dos sítios de ligação e acomodação na região central da cavidade.

A acomodação do ligante na região central da cavidade parece ter influência significativa para ligação à mutante V30M. Todos os flavonóides testados, com exceção de API e LUT, acomodam substituintes rígidos e volumosos numa região estreita da cavidade, entre o HBP1 e o HBP2. Este estreitamento é ainda mais pronunciado na mutante V30M, como resultado das alterações estruturais induzidas pela mutação Met30. Assim, parece haver uma correlação entre a acomodação de substituintes rígidos e volumosos na região central do sítio e perda de afinidade pela V30M. Estes podem ter origem tanto no estreitamento da região central do sítio da mutante, quanto na perda de flexibilidade da mesma devido à mutação Met30.

Com exceção de API e LUT, os outros flavonóides mostraram cooperatividade entre os sítios de ligação, em maior ou menor grau. A análise das estruturas

---

cristalográficas da TTRwt ligando flavonóides sugere que todos os flavonóides geraram movimentações ao tetrâmero da TTR. Porém os efeitos dessas movimentações para a interação do ligante com o segundo sítio só foram observados para os ligantes que acomodam porções volumosas na região central (KAE, NAR, CHR, GEN) e, ainda, são maximizados no caso de GEN – que interage com o fundo do sítio. Assim, a ligação de flavonóides à TTRwt parece propiciar a presença de cooperatividade entre os sítios de ligação. No entanto, dependendo do modo de interação do ligante (posição ideal no sítio, tipos e localização de contatos com a TTRwt) as diferenças de interação entre os dois sítios pode ser maximizada (GEN, KAE, NAR), minimizada (CHR) ou ausente (API, LUT).





---

## 9 Interação de análogos estruturais do T<sub>4</sub> com a TTR

Os análogos sintéticos do T<sub>3</sub> GC-1 e GC-24 mostraram-se bons inibidores da TTRwt e da mutante V30M nos ensaios de agregação da TTR induzida por pH, conduzidos em concentração excessiva destes compostos. Desta forma, esses inibidores foram submetidos a novos ensaios de agregação *in vitro* da TTRwt e da V30M, conduzidos em diferentes concentrações de GC-1 e GC-24, mostrando-se inibidores de potência moderada (IC<sub>50</sub> > 10 μM). Curiosamente, GC-1 e GC-24 apresentaram perfis de curva e valores de IC<sub>50</sub> bastante similares para TTRwt e para a mutante V30M, ao contrário dos demais inibidores analisados, com exceção de LUT (capítulo 6).

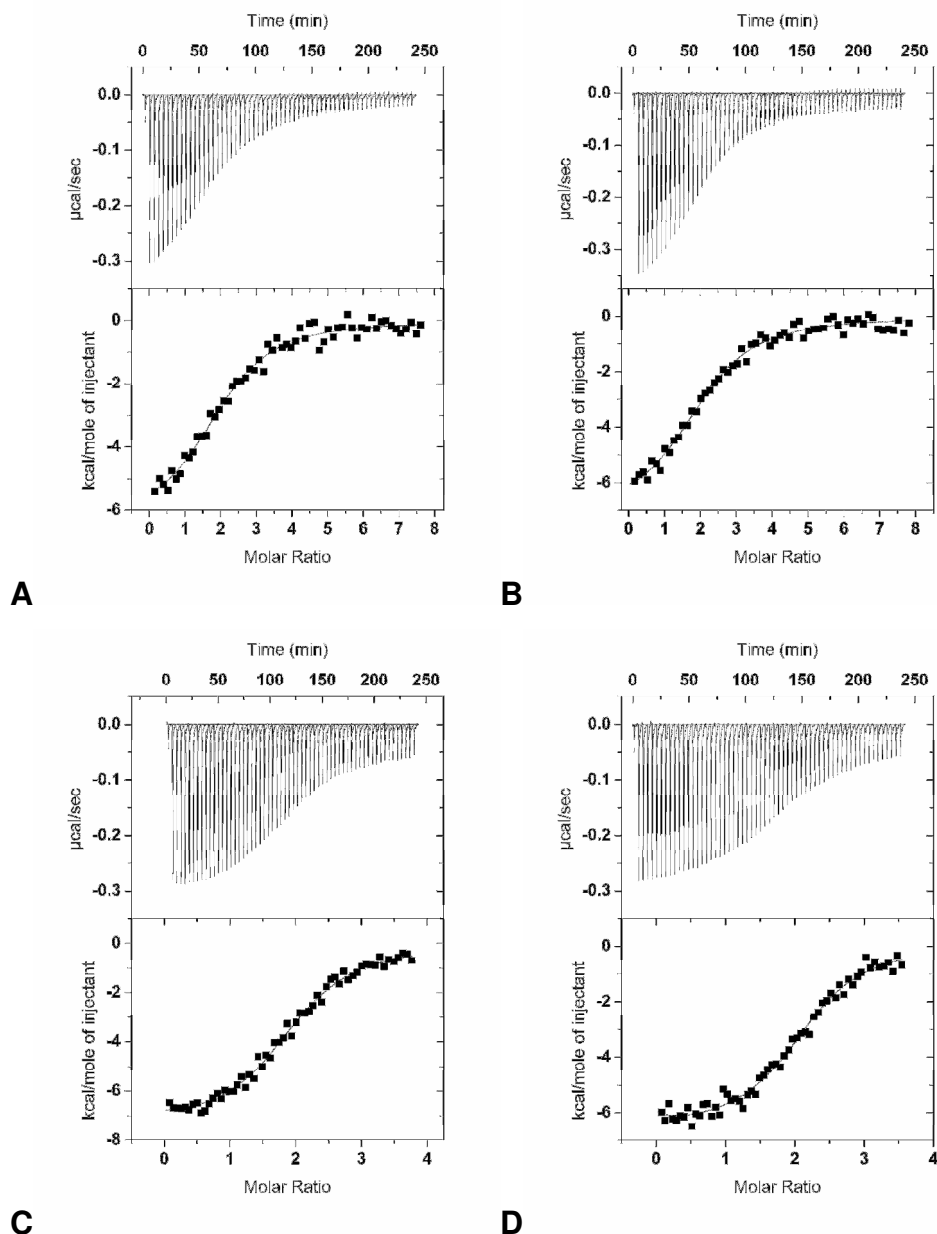
Assim, GC-1 e GC-24 foram submetidos a novos experimentos biofísicos,

com o intuito de aprimorar a caracterização da interação destes inibidores com a TTRwt e com a mutante V30M. As estruturas tri-dimensionais dos complexos TTR:GC-1/GC-24 foram determinadas por cristalografia de raios-X e ensaios de microcalorimetria por titulação isotérmica (ITC) foram conduzidos com estes ligantes. Estes resultados serão apresentados e discutidos em detalhes a seguir.

### ***9.1 Microcalorimetria por titulação isotérmica (ITC)***

Ensaio de microcalorimetria por titulação isotérmica foram conduzidos, titulando-se independentemente os ligantes GC-1 ou GC-24 em cela contendo uma solução de TTR tipo selvagem ou mutante V30M, conforme descrito no capítulo de metodologia (capítulo 3). Para cada titulação, de cada ligante em cada proteína, foram realizados três experimentos independentes. Uma curva representativa de cada titulação é mostrada na Figura 9.1 e os parâmetros termodinâmicos calculados destas titulações são mostrados na Tabela 9.1.

Os três modelos de interação disponíveis (“sítios idênticos e independentes”, “sítios seqüenciais” e “sítios diferentes e independentes”) foram testados. No entanto, as constantes de dissociação retornadas pelo ajuste dos dados de ITC com os modelos de “sítios seqüenciais” e “sítios diferentes e independentes” foram muito semelhantes ou os erros do ajuste por estes modelos foram muito altos. Desta forma, o modelo de “sítios idênticos e independentes” foi escolhido



**Figura 9.1** – Curvas de microcalorimetria por titulação isotérmica conduzidas com (A) TTRwt e (B) V30M ligando GC-1 e (C) TTRwt e (D) V30M ligando GC-24. Os dados brutos da titulação são mostrados nos painéis superiores; enquanto os painéis inferiores trazem os valores integrados e o ajuste não linear dos dados usando o modelo de “sítios idênticos e independentes” no programa Origin7 (Origin Lab).

Conforme sugerido inicialmente pelas análises dos dados de inibição de agregação da TTR (capítulo 6), GC-1 apresentou menor afinidade pelas duas formas de TTR analisadas quando comparado à ligação do GC-24 (Tabela 9.1). Esta diferença de afinidade deve ser consequência da presença de um substituinte mais volumoso, um anel benzil, na posição 3' do GC-24 em comparação com o substituinte isopropil na mesma posição do GC-1. Como GC-24 mostrou maior

afinidade pela TTR que GC-1, supõe-se que esta substituição favoreça os contatos hidrofóbicos do GC-24 com a TTR. Além disto, pode ainda propiciar maior movimentação de cadeias laterais de aminoácidos no sítio da TTR e liberação de moléculas de água do interior da cavidade, o que deve refletir maior contribuição entrópica da ligação de GC-24 à TTR. De fato, os resultados de ITC indicam que a ligação de GC-24 à TTR apresenta contribuição entrópica mais favorável que a ligação de GC-1, e esta é a principal diferença energética da ligação destas duas moléculas à TTR – Tabela 9.1.

A ligação de GC-1 e GC-24 à TTR tipo selvagem e mutante V30M foram bastante similares, com pequeno favorecimento da interação com a mutante V30M Tabela 9.1. Estes resultados corroboram perfeitamente com os dados de agregação *in vitro* (capítulo 6)..

**Tabela 9.1** – Parâmetros termodinâmicos calculados a partir das curvas de titulação isotérmica dos ligantes GC-1 e GC-24 com a TTR tipo selvagem e a mutante V30M.

TTR	ligante	<i>n</i>	$K_d$ ( $\mu\text{M}$ ) <sup>a</sup>	$\Delta G$ (Kcal/mol) <sup>b</sup>	$\Delta H$ (Kcal/mol) <sup>a</sup>	$-T\Delta S$ (Kcal/mol) <sup>c</sup>
TTRwt	GC-1	2	$4,62 \pm 2,10$	-7,34	$-7,26 \pm 1,26$	-0,08
V30M	GC-1	2	$2,35 \pm 1,21$	-7,76	$-7,53 \pm 0,59$	-0,23
TTRwt	GC-24	2	$1,23 \pm 0,09$	-8,06	$-7,31 \pm 0,09$	-0,75
V30M	GC-24	2	$1,01 \pm 0,19$	-8,18	$-6,58 \pm 0,20$	-1,60

<sup>a</sup> Parâmetros termodinâmicos extraídos do ajuste matemático das curvas de ITC, usando o modelo de sítios idênticos e independentes no programa Origin 7. **b** e **c** foram calculados usando a média dos valores de  $\Delta H$  e  $K_d$ : <sup>b</sup>  $\Delta G = RT \ln(K_d)$ ; <sup>c</sup>  $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ .

Os experimentos de ITC sugerem que GC-1 e GC-24 interagem com os canais de ligação a hormônio da TTR seguindo modelo de “sítios idênticos e independentes”, ao contrario do ligante natural  $T_4$  e de alguns outros ligantes, como a genisteína, reportados no presente trabalho. Infelizmente não foi possível realizar experimentos de ITC similares com  $T_4$  devido à sua baixa solubilidade nas condições experimentais. Por este motivo, foram utilizados dados disponíveis na literatura para a comparação da ligação de GC-1 e GC-24 com o ligante natural da TTR, o  $T_4$ .  $T_4$  liga à TTRwt por um processo de cooperatividade negativa aos dois sítios desta proteína, apresentando constantes de dissociação  $K_{d1} \sim 1\text{nM}$ ,  $K_{d2} \sim 1\ \mu\text{M}$  (112, 126, 196).

A comparação e análise detalhada da ligação de GC-1/GC-24 à TTRwt com a ligação de  $T_4$  a esta proteína torna-se muito interessante, pois estes ligantes apresentam estruturas químicas similares, mecanismos de interação com os dois

sítios da TTR distintos e constantes de afinidade diferindo em mais de uma ordem de magnitude. Além disto, dados sobre os mecanismos de cooperatividade entre os sítios da TTR são bastante escassos e importantes para a melhor compreensão das bases moleculares da interação de pequenas moléculas com a TTR e subsequente embasamento para o desenho racional de inibidores da dissociação/desenovelamento desta proteína. É evidente que os dados experimentais de agregação *in vitro* e ITC não podem, sozinhos, dar suporte a este tipo de análise. Neste sentido, experimentos de co-cristalização do GC-1 e GC-24 com a TTRwt e mutante V30M foram realizados. As estruturas cristalográficas destes complexos foram determinadas e analisadas em detalhes e em comparação com a estrutura cristalográfica da TTRwt ligando T<sub>4</sub>. Estes dados serão apresentados e discutidos em detalhes a seguir.

## **9.2 Estruturas cristalográficas dos complexos TTRwt:GC-1/GC-24 e V30M/GC-1/GC-24**

Co-cristais de TTRwt e V30M ligando GC-1 ou GC-24 foram obtidos, os dados foram processados e a estrutura destes complexos foi determinada, conforme descrito no capítulo 3. As estatísticas do processamento e refinamento destes dados são mostradas na Tabela 9.2 e Tabela 9.3.

GC-1 e GC-24 puderam ser modelados nos dois sítios da TTRwt e V30M. Estes ligantes estavam posicionados no eixo de simetria de ordem 2, e por esse motivo foram refinados com ocupação igual a 0,5, assim como descrito para os outros ligantes da TTR reportados na presente tese. Não foi identificada diferença entre a ocupação e/ou fatores de temperatura médio dos ligantes nos dois sítios da TTR. A Figura 9.2 mostra um dos sítios de ligação dos complexos cristalográficos TTRwt:GC-1, TTRwt:GC-24, V30M:GC-1 e V30M:GC-24.

**Tabela 9.2** – Estatísticas de coleta, processamento e refinamento dos dados de difração de raios-X de cristais de TTRwt:GC-1 e V30M:GC-1. Os números em parênteses indicam os valores da faixa de maior resolução dos dados.

Parâmetro/ estrutura cristalográfica	TTRwt:GC-1	V30M:GC-1
Comprimento de onda (Å)	1,46	1,46
Grupo espacial	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2
Parâmetros de cela unitária (Å)	43,52 85,16 64,04	43,73 85,45 64,22
Faixa de resolução (Å)	21,24 – 1,55	27,59 - 1,75
Faixa de alta resolução (Å)	1,59 - 1,55)	1,80 - 1,75
Reflexões no conjunto de trabalho	31526 (2282)	21311 (1565)
Reflexões no conjunto teste	1774 (121)	1212 (75)
R-fator*	17,97 (28,80)	18,18 (24,70)
R-livre**	21,00 (33,40)	22,33 (26,30)
Completeza (%)	99,26 (94,16)	95,00 (92,24)
Redundância	3,6 (2,5)	4,6 (4,7)
I/σ médio	28,9 (2,94)	14,5 (3,1)
RMS de comprimento de ligação (Å)	0,013	0,016
RMS de angulo de ligação (°)	1,583	1,676
B-fator médio (Å <sup>2</sup> )	21,72	18,96
Ramachandran outliers	0/228	0/228

\* R-fator =  $\sum hkl \frac{||F_o| - |F_c||}{\sum(F_o)}$ , para o conjunto de trabalho, correspondendo a 95% dos dados.

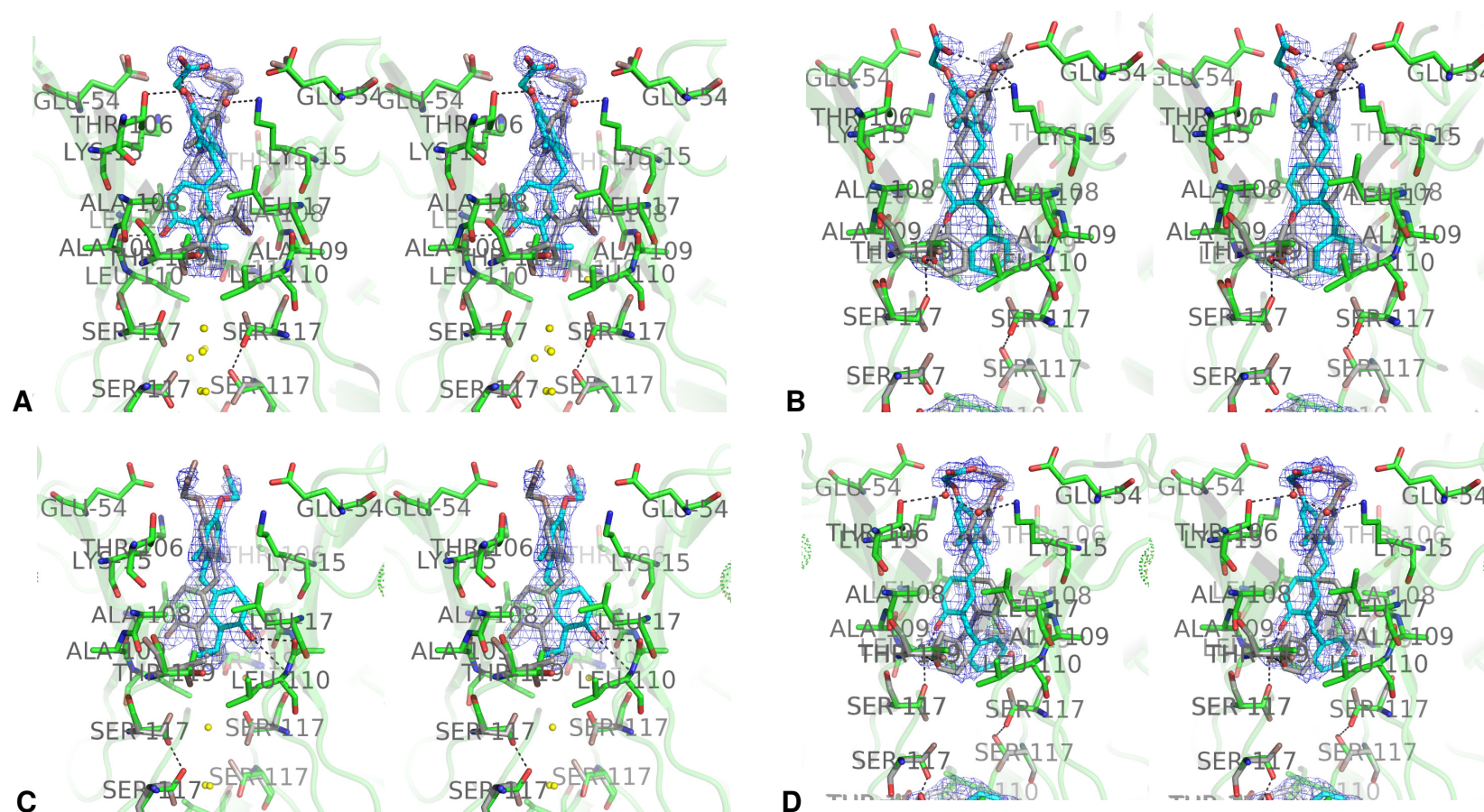
\*\* R-livre =  $\sum hkl \frac{||F_o| - |F_c||}{\sum(F_o)}$ , para o conjunto teste, correspondendo a 5% dos dados, selecionados aleatoriamente.

**Tabela 9.3** – Estatísticas de coleta, processamento e refinamento dos dados de difração de raios-X de cristais de TTRwt:GC-24 e V30M:GC-24. Os números em parênteses indicam os valores da faixa de maior resolução dos dados.

Parâmetro/ estrutura cristalográfica	TTRwt:GC-24	V30M:GC-24
Comprimento de onda (Å)	1,46	1,43
Grupo espacial	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2
Parâmetros de cela unitária (Å)	42,77 84,910 64,44	43,76 85,40 64,32
Faixa de resolução (Å)	25,91-2,00	22,15-1,70
Faixa de alta resolução (Å)	2,05-2,00	1,75-1,70
Reflexões no conjunto de trabalho	14299 (1085)	24256 (1867)
Reflexões no conjunto teste	852 (67)	1449 (109)
R-fator*	18,33 (22,70)	16,39 (25,20)
R-livre**	21,90 (28,20)	20,69 (35,90)
Completeza (%)	97,70 (95,60)	99,74 (99,80)
Redundância	6,4 (6,5)	7,0 (6,9)
I/σ médio	13,1 (3,7)	14,6 (4,2)
RMS de comprimento de ligação (Å)	0,014	0,013
RMS de angulo de ligação (°)	1,544	1,425
B-fator médio (Å <sup>2</sup> )	23,50	20,59
Ramachandran outliers	0/228	0/228

\* R-fator =  $\sum hkl \frac{||F_o| - |F_c||}{\sum(F_o)}$ , para o conjunto de trabalho, correspondendo a 95% dos dados.

\*\* R-livre =  $\sum hkl \frac{||F_o| - |F_c||}{\sum(F_o)}$ , para o conjunto teste, correspondendo a 5% dos dados, selecionados aleatoriamente.



**Figura 9.2** – Visão estéreo de um dos sítios de ligação dos complexos cristalográficos **(A)** TTRwt:GC-1; **(B)** TTRwt:GC-24; **(C)** V30M:GC-1; **(D)** V30M:GC-24. Os ligantes são mostrados em bastões ciano, sobrepostos com sua cópia (bastões cinza) gerada por simetria ao longo do eixo cristalográfico Z. O mapa de omissão calculado para o ligante está mostrado e contornado a  $\sigma = 1,0$ . As interações polares que estabilizam GC-1 e GC-24 nos sítios da TTR são mostradas em linhas pontilhadas. Para melhor interpretação da figura as duplas conformações das cadeias laterais dos resíduos do sítio são mostradas em cinza. As moléculas de água envolvidas na ligação de GC-1 e GC-24 são mostradas em esferas vermelhas, enquanto as moléculas de água encontradas apenas nos complexos com GC-1 (e não nos complexos com GC-24) são mostradas em esferas amarelas. Os átomos de oxigênio e nitrogênio são mostrados em vermelho e azul, respectivamente. As figuras foram geradas com o programa Pymol (De Lano Scientific LLC).



GC-1 e GC-24 interagem com a TTR tipo selvagem e mutante V30M de maneira bastante similar, no entanto algumas diferenças podem, ainda, ser observadas. GC-1 e GC-24 contatam as duas faces dos sítios de ligação da TTR, realizando interações hidrofóbicas com resíduos de aminoácido localizados nos bolsões HBP1 e HBP2 dos sítios da TTR. A presença do anel benzil na posição 3' do GC-24 causa um deslocamento desta molécula no fundo do sítio, em relação à molécula de GC-1. Desta forma, GC-24 ainda pode realizar interações com resíduos da TTR localizados no HBP3, através de contatos hidrofóbicos do anel benzil com a porção apolar das cadeias laterais de Leu110, Ser117 e Thr119 em uma das faces do sítio. Além disto, GC-24 pode realizar interações de hidrogênio, mediadas por água, entre a hidroxila em posição 4' do GC-24 e as hidroxilas das cadeias laterais de Ser117 e Thr119 na outra face do sítio. Por outro lado, a hidroxila em posição 4' do GC-1 contata diretamente a cadeia principal de aminoácidos do HBP2 da TTR - Figura 9.2 e Tabela 9.4.

**Tabela 9.4** – Potenciais contatos polares entre GC-1 ou GC-24 e os sítios da TTRwt e da mutante V30M, assim como observado nas estruturas cristalográficas dos complexos TTRwt:GC-1/GC-24 e V30M:GC-1/GC-24.

átomo	resíduo	átomo	resíduo	Comprimento da ligação (Å)
<b>TTRwt:GC-1</b>				
O	H <sub>2</sub> O 191	OAF	<b>GC-1</b>	3,18
O	H <sub>2</sub> O 191	OG1	Thr 106	2,96
O	Ala 109	OAG	<b>GC-1</b>	2,83
<b>TTRwt:GC-24</b>				
O	H <sub>2</sub> O 140	OAD	<b>GC-24</b>	2,88
O	H <sub>2</sub> O 140	OE2	Glu 54	2,47
O	H <sub>2</sub> O 140	NZ	Lys 15	2,49
O	H <sub>2</sub> O 141	OAE	<b>GC-24</b>	3,31
O	H <sub>2</sub> O 141	OG	Ser 117	2,96
O	H <sub>2</sub> O 141	OG	Thr 119	2,70
<b>V30M:GC-1</b>				
O	Ala 109	OAG	<b>GC-1</b>	2,87
N	Leu 110	OAG	<b>GC-1</b>	3,31
<b>V30MGC-24</b>				
O	H <sub>2</sub> O 165	OAD	<b>GC-24</b>	2,58
O	H <sub>2</sub> O 165	OG1	Thr 106	3,15
O	H <sub>2</sub> O 152	OAE	<b>GC-24</b>	2,55
O	H <sub>2</sub> O 152	OG	Ser 117	2,83
O	H <sub>2</sub> O 152	OG1	Thr 119	2,99

A cadeia lateral de GC-1 e GC-24 encontra-se posicionada na entrada dos sítios, tanto nas estruturas cristalográficas em complexo com TTRwt quanto na estruturas com a mutante V30M, realizando interações mediadas por água com a cadeia lateral de Lys15, Glu54 e/ou Thr106. Esta região do ligante parece ser bastante flexível, mostrando fatores de temperatura mais elevados e densidade eletrônica mais fragmentada, o que indica que as interações de GC-1 e GC-24 na entrada dos sítios da TTR são fracas.

Os anéis aromáticos que carregam a cadeia lateral de GC-1 e GC-24 (anéis internos) estão posicionados na porção mais externa dos sítios da TTR, e os grupos metila em posição 3 e 5 destes anéis são alocados nos HBP1 e HBP1' da TTR. Estes grupos metila contatam simultaneamente a porção hidrofóbica das cadeias laterais de Lys15 e Thr106 nas duas faces dos sítios da TTR. O anel interno pode, ainda, interagir com a cadeia lateral de Lys15 em uma das faces do sítio.

O anel externo de GC-1 e GC-24, carregando uma hidroxila em posição 4' e um grupo isopropil (GC-1) ou benzil (GC-24) em posição 3', encontra-se na porção vertical central do sítio de ligação da TTR, no entanto está deslocado na direção de uma ou outra face do sítio. Este anel é estabilizado por interações hidrofóbicas com as cadeias laterais de resíduos de aminoácido da TTR localizados no HBP2: Leu17 e Ala108.

O substituinte 3'isopropil do GC-1 é posicionado no centro horizontal do sítio, interagindo com as cadeias laterais de Thr119 e Leu110. A posição do substituinte 3' isopropil do GC-1 - e o 3' isopropil da cópia simétrica deste ligante – forçam a rotação das cadeias laterais de Ser117 e Thr119, sendo que a porção hidrofóbica destes resíduos ficam expostas ao ligante em uma das faces do canal de ligação. Na outra face do canal, a hidroxila na posição 4' do GC-1 faz interações polares com a cadeia principal de Ala109 e Leu110 (apenas no complexo V30M:GC-1). As cadeias laterais de Ser117 e Thr119 adquirem a outra conformação observada, participando da coordenação de uma molécula de água. Estas são as razões prováveis da dupla conformação observada para as cadeias laterais de Ser117 e Thr119 nos complexos TTR:GC-1.

Vale comentar que a conformação de Ser117 que expõe sua face hidrofóbica para o GC-1 é a conformação Ser117u observada nos complexos com genisteína. Como a presença da conformação Ser117u nos complexos TTR:GC-1 são muito provavelmente decorrentes da orientação do ligante nos sítios, e os ligantes estão

igualmente acomodados nos dois sítios da TTR, a conformação Ser117u é observada nos dois sítios da TTR. Isto torna possível a interação entre as cadeias laterais das Ser117u nos dois sítios da TTR em complexo com GC-1, uma nova interação na interface de dimerização que pode contribuir para a estabilidade da TTR (101, 103) - Figura 9.2 e Tabela 9.4.

Movimentações similares das cadeias laterais de Ser117 e Thr119 são observadas nos complexos TTR:GC-24. No entanto, o substituinte 3' benzil do GC-24 encontra-se disposto em direção a uma ou outra face do canal de ligação da TTR, e não no centro deste canal como observado para o 3'isopropil do GC-1. Desta forma, o anel benzil do GC-24 faz interações mais extensivas com um ou com outro monômero da TTR, contatando os resíduos de aminoácido do HBP3 ou HBP3': Leu110, Thr119 e Ser117. A hidroxila em posição 4' do GC-24 está também deslocada no sítio da TTR em relação à hidroxila do GC-1, estando localizada mais ao centro do canal. Desta forma, as interações entre 4'OH do GC-24 e a TTR ocorre por intermédio de uma molécula de água, que por sua vez é coordenada por uma das conformações de Ser117 e Thr119, e não diretamente com a cadeia lateral de Ala109 e Leu110 como nos complexos com GC-1. A conformação Ser117u é também observada nos dois sítios dos complexos TTR:GC-24 e há interação entre as cadeias de Ser117u dos dois sítios, como comentado acima para os complexos TTR:GC-1. Pode-se também observar que um número maior de moléculas de água é retido na interface entre os sítios dos complexos com GC-1, em comparação aos complexos com GC-24 – Figura 9.2.

### **9.3 Discussão**

Os ensaios de agregação mostraram que GC-1 e GC-24 inibem a agregação da TTR *in vitro*, no entanto com potência moderada. A partir dos experimentos de ITC conduzidos com GC-1 e GC-24 pôde-se determinar as constantes de afinidade destes compostos pela TTR tipo selvagem e pela mutante V30M, além dos parâmetros termodinâmicos ( $\Delta H$ ,  $\Delta S$  e  $\Delta G$ ) e mecanismo da interação. GC-1 e GC-

24 apresentaram constantes de dissociação na ordem de micromolar, o que está de acordo com a baixa potência observada por estes ligantes nos ensaios de inibição da agregação da TTR. Estes ligantes parecem interagir igualmente com os dois sítios da TTR e nenhuma evidência de cooperatividade entre estes sítios foi verificada nos experimentos de ITC e na análise das estruturas cristalográficas dos complexos de GC-1 e GC-24 com a TTR<sub>wt</sub> e com a mutante V30M.

GC-24 foi identificado nos experimentos de ITC e inibição da agregação da TTR como um inibidor de maior afinidade e maior potência que GC-1. Os dados de ITC indicam entropia de ligação mais favorável para GC-24 que para GC-1, o que deve ser decorrência da substituição mais volumosa na posição 3' do GC-24. A presença do 3' benzil no GC-24 proporciona maior interação deste ligante com os resíduos do HBP3 da TTR, realocação da molécula do ligante no sítio e maior liberação de moléculas de água – Figura 9.2. Estes fatores devem ser os maiores contribuintes para as diferenças de  $K_d$  e  $\Delta S$  observadas entre GC-1 e GC-24 quando ligados à TTR e, assim, refletem a maior potência de inibição de GC-24 em relação ao GC-1 nos ensaios de agregação *in vitro*.

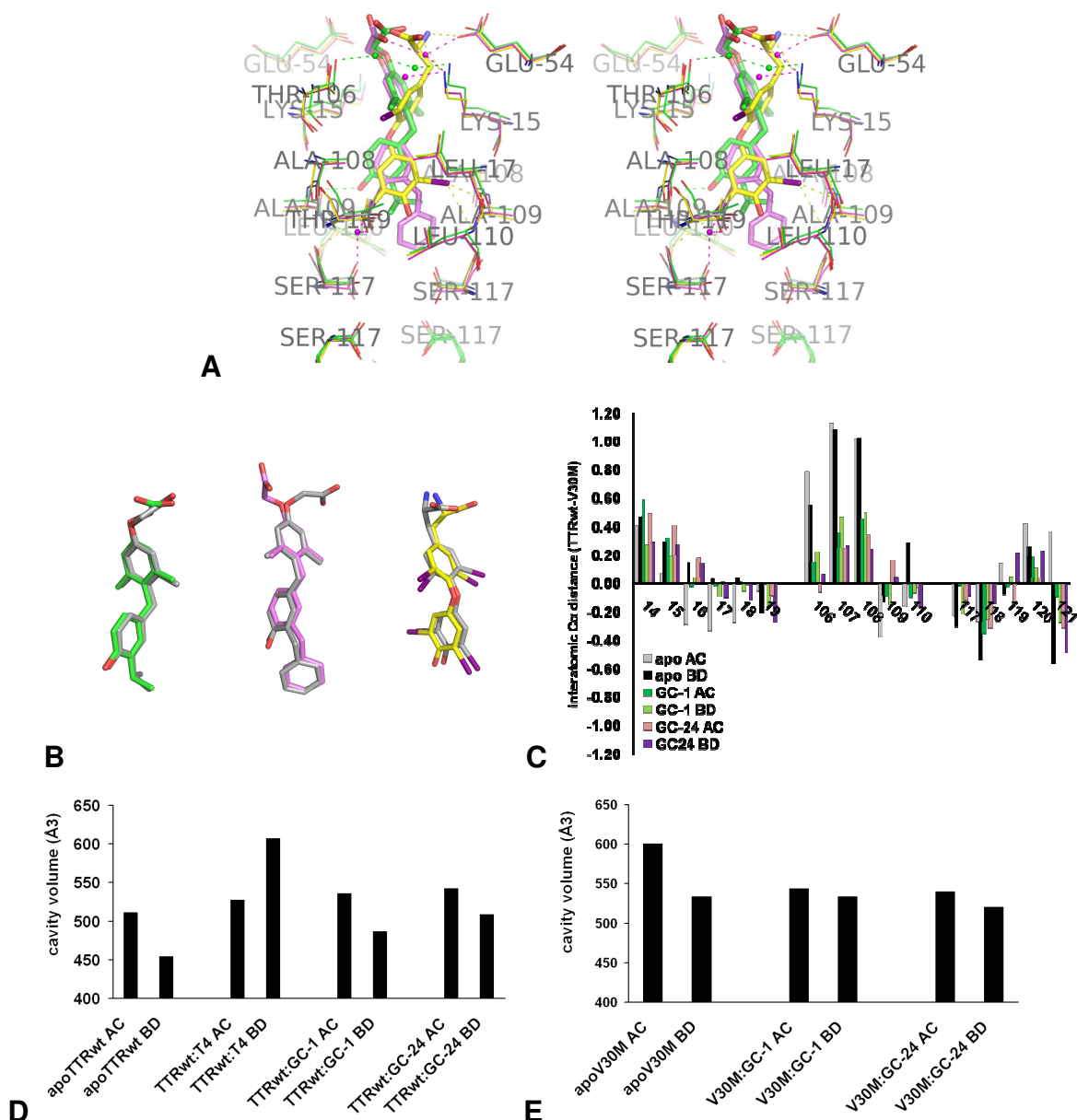
Algumas diferenças foram também observadas entre os complexos cristalográficos TTR<sub>wt</sub> e V30M. A mutação Met30 gera deformações no sítio de ligação da mutante V30M, causando a movimentação da cadeia principal dos resíduos 106-108 em direção ao centro do canal (Figura 9.3) e reposicionamento de cadeias laterais. Em conjunto, essas modificações no sítio da mutante V30M geram alterações da forma e aumento do volume destas cavidades da V30M (capítulo 5).

A conformação Ser117<sub>u</sub>, observada em um dos sítios da apoV30M, parece ser induzida pelo ligante nos complexos TTR:GCs, e assim as diferenças entre os sítios da apoV30M parecem não afetar a ligação. Entretanto, a movimentação da região dos resíduos 106-108, induzidas pela mutação Met30, pode afetar a interação de ligantes com a mutante V30M, assim como previamente observado para o ligante natural T<sub>4</sub> (68) e para os flavonóides aqui reportados. No caso do T<sub>4</sub>, a alteração da forma da cavidade influencia negativamente a interação deste ligante com a V30M, por dificultar a acomodação dos iodos nas posições 3,5 do anel interno do T<sub>4</sub> no HBP1 e HBP1' da V30M (68, 188). Esta observação pode ser decorrência da presença da mutação Met30, que 1) modifica a forma da cavidade e 2) limita a flexibilidade do canal, dificultando o alargamento da região central do mesmo após a

interação do ligante. Porém, GC-1 e GC-24 apresentam grupos metila nas posições 3,5 do anel interno. A presença destes substituintes em posição 3,5 parecem não alterar ou até mesmo favorecer a ligação dos GCs à mutante V30M, por proporcionar melhor acomodação dos substituintes metila nos HBP1 da V30M. Além disto, também como consequência das alterações estruturais introduzidas pela mutação Met30, os comprimentos da ligação dos contatos polares entre GC-1 e GC-24 e a V30M são, também, ligeiramente menores que o observado nos complexos com a TTRwt (Tabela 9.4). Além disto, GC-1 faz um contato adicional com a cadeia principal de Leu110 da V30M (Figura 9.3C). Assim, ao contrário do T<sub>4</sub> e de outros ligantes da TTR reportados aqui, as constantes de afinidade de GC-1 e GC-24 pela mutante V30M são um pouco melhores que para a TTR tipo selvagem.

Os inibidores da agregação da TTR analisados neste capítulo ligam à TTRwt e mutante V30M por um processo não cooperativo. É, então, interessante comparar a ligação de GC-1 e GC-24 com a ligação do T<sub>4</sub> à TTRwt. O T<sub>4</sub> liga à TTRwt com alta afinidade e mostra cooperatividade negativa entre os sítios desta proteína (Kd1 ~ 1 nM; Kd2 ~ 1 μM) (112, 126). O T<sub>4</sub> difere do GC-1 e GC-24 por apresentar átomos de iodo nas posições 3,5 e 3',5', uma ligação éter conectando os anéis interno e externo, e uma carga positiva e outra negativa em sua cadeia lateral. Sobrepondo as estruturas cristalográficas dos complexos TTRwt:T<sub>4</sub> com TTRwt:GC-1 e TTRwt:GC-24 (Figura 9.3) pode-se encontrar algumas evidências estruturais que explicam a não cooperatividade de GC-1 e GC-24 ao ligarem aos dois sítios da TTRwt e a moderada afinidade destes ligantes por esta proteína.

Na Figura 9.3 observa-se diferenças entre a posição do ligante T<sub>4</sub> e dos ligantes GC-1 e GC-24 no sítio da TTRwt. Interações similares são observadas entre os GCs e o T<sub>4</sub> com os HBP1 da TTRwt, no entanto, os substituintes 3,5 iodo do T<sub>4</sub> estão acomodados nestes bolsões da TTRwt, enquanto os substituintes 3, 5 metila dos GCs ocupam esta posição nos complexos TTRwt:GC-1 e TTRwt:GC-24.



**Figura 9.3** – Comparação dos sítios de ligação em estruturas cristalográficas da TTRwt e V30M na forma apo e em complexo com GC-1, GC-24 e T<sub>4</sub>. **(A)** Sobreposição do sítio de ligação de TTRwt:T<sub>4</sub> (amarelo), TTRwt:GC-1 (verde) e TTRwt:GC-24 (magenta). Os átomos participando de interações polares estão conectados por linhas pontilhadas e os resíduos de aminoácido envolvidos na interação são mostrados em bastões e estão identificados. **(B)** Sobreposição das moléculas de ligante encontradas no sítio AC (bastões coloridos) e sítio BD (bastões cinza) dos complexos cristalográficos TTRwt:GC-1, TTRwt:GC-24 e TTRwt:T<sub>4</sub>. As figuras foram geradas com o programa Pymol (De Lano Scientific LLC). **(C)** Distâncias interatômicas entre os Ca de resíduos equivalentes que compõe os sítios da TTRwt e V30M na forma apo e ligando GC-1 ou GC-24. As distâncias medidas nas estruturas cristalográficas da TTRwt foram subtraídas das mesmas distâncias medidas nas estruturas da V30M e estas diferenças são mostradas para o sítio AC e BD neste gráfico. **(D)** Volume dos sítios de ligação em diferentes estruturas cristalográficas da TTRwt e **(E)** mutante V30M. Os cálculos foram realizados no servidor CastP (195).

Além disto, a presença da conexão éter no T<sub>4</sub> parece facilitar a acomodação do seu anel externo nos HBP2 e HBP3 da TTRwt. T<sub>4</sub> acomoda perfeitamente seus átomos de iodo nas posições 3' e 5' nesses bolsões da TTRwt, formando importantes interações hidrofóbicas e ligações de halogênio com resíduos do HBP2 e HBP3' (126). No entanto, os GCs encontram-se deslocados no fundo do sítio, em relação ao T<sub>4</sub>. As interações dos GCs com o HBP2 e HBP3' ocorrem via os substituintes 3' (isopropil no GC-1 e benzil no GC-24) e 4' (hidroxila) da TTRwt, respectivamente. Como os iodios diferem dos carbonos por seu maior tamanho e por serem halogênios, estes substituintes do T<sub>4</sub> podem formar interações apolares mais fortes com as cadeias laterais dos resíduos da TTR, e ainda interações de halogênio com a cadeia principal dos resíduos de aminoácido do HBP2 e HBP3 da TTRwt (126).

Além disto, os grupos funcionais amino e ácido carboxílico da cadeia lateral do T<sub>4</sub> estão melhor acomodados na entrada do sítio e podem formar interações iônicas com as cadeias laterais carregadas de Glu54 e Lys15. No entanto, as cadeias laterais dos GCs apresentam maior flexibilidade e aparentemente fazem apenas interações mediadas por água na entrada do sítio da TTRwt.

Em resumo, a melhor acomodação dos átomos de iodo do T<sub>4</sub> nos HBPs da TTRwt e a presença de cargas positivas e negativas na cadeia lateral deste ligante, proporcionam interações mais fortes e em maior número entre o ligante e a proteína, o que resulta em maior afinidade do T<sub>4</sub> pelos sítios da TTRwt.

Analisando as estruturas cristalográficas dos complexos TTRwt:T<sub>4</sub> e TTRwt:GCs pode-se também observar alguns aspectos estruturais que explicam a ausência de cooperatividade entre os sítios da TTRwt observada para a ligação dos GCs à proteína e a presença de cooperatividade entre os sítios para a ligação do T<sub>4</sub>.

Comparando a posição das moléculas dos ligantes nos sítios AC e BD, nos complexos TTRwt:GCs, observa-se que estas moléculas apresentam conformação e posição muito similar. No entanto, a mesma comparação realizada com o complexo TTRwt:T<sub>4</sub> mostra que a molécula de T<sub>4</sub> está deslocada no sítio AC em comparação com o sítio BD – Figura 9.3B. Além disto, a análise do volume dos sítios de ligação nos complexos TTRwt:GCs mostram que os dois sítios da TTRwt ligando GC-1 ou GC-24 apresentam volume muito similar ( $\Delta < 50 \text{ \AA}^3$ ); no entanto, os sítios da TTRwt ligando T<sub>4</sub> apresentam grande variação de volume destas cavidades ( $\sim 150 \text{ \AA}^3$ ) - Figura 9.3D.

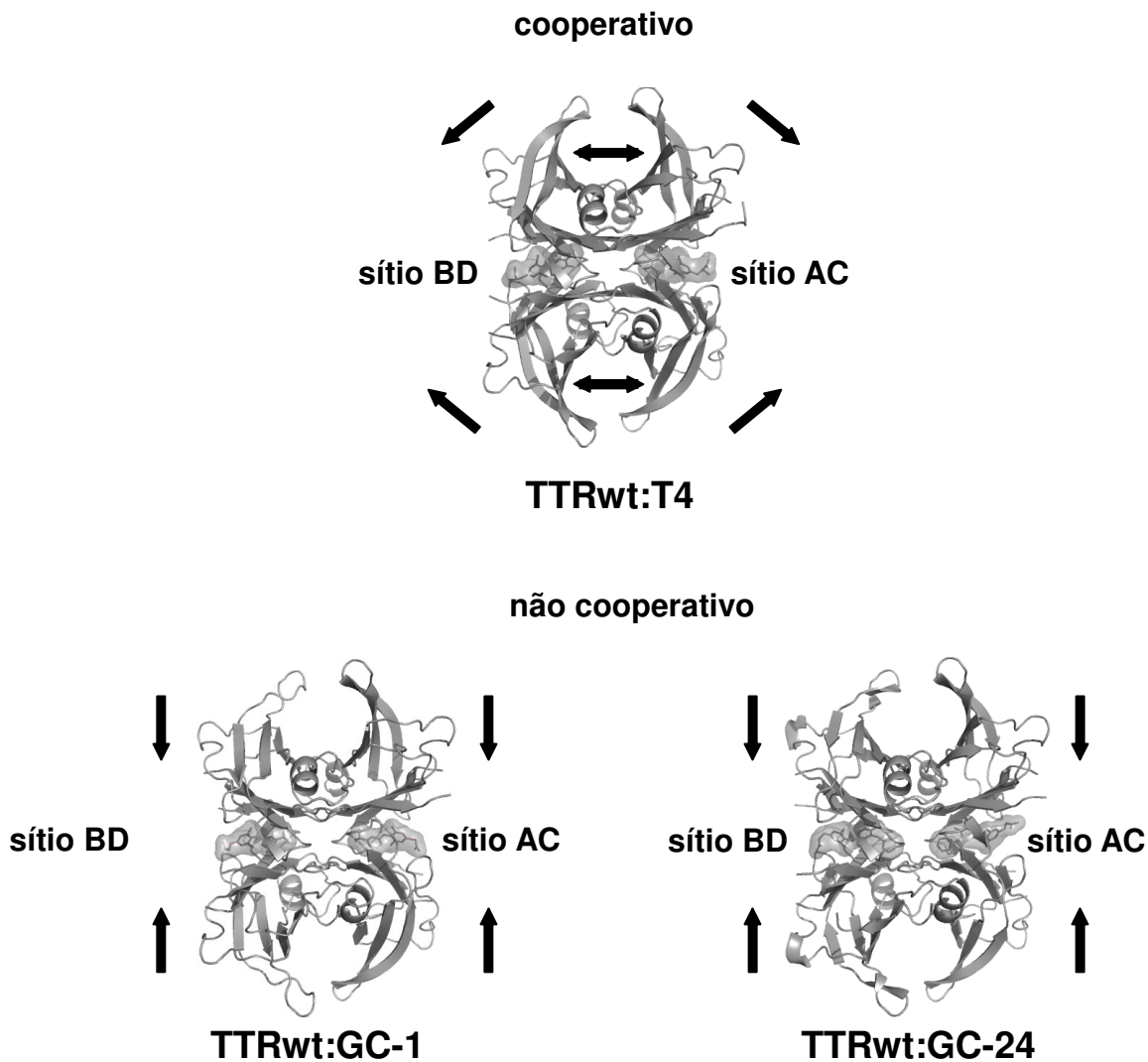
Como resultado destas variações, entre a posição das moléculas do ligante e o volume das cavidades nos dois sítios da TTRwt ligando T<sub>4</sub>, as interações entre o ligante T<sub>4</sub> e a TTRwt são em menor número e maiores distâncias no sítio BD em comparação ao sítio AC do complexo TTRwt:T<sub>4</sub>. Por exemplo, a ligação de halogênio entre o átomo de iodo em posição 3' do T<sub>4</sub> e o átomo de oxigênio da cadeia principal de Leu110 apresenta comprimento de ligação igual a 2.80 Å e 3.26 Å no sítio AC e BD do complexo TTRwt:T<sub>4</sub>, respectivamente. Em adição o contato polar entre o ácido carboxílico da cadeia lateral do T<sub>4</sub> e a cadeia lateral de Lys15 da TTRwt não é observada no sítio BD do complexo TTRwt:T<sub>4</sub>. A mesma análise foi realizada nos sítios dos complexos cristalográficos TTRwt:GC-1 e TTRwt:GC-24 e nenhuma diferença significativa foi observada, apenas a reorientação da cadeia lateral flexível do GC-24. No entanto esta porção da molécula do ligante pareceu bastante flexível, indicando que a cadeia lateral dos GCs exploram variadas conformações quando ligados à TTR, ao contrário da cadeia lateral do T<sub>4</sub>, principalmente no canal AC, que forma fortes contatos com a entrada do sítio da TTRwt.

Em conjunto estas observações indicam que a ligação do T<sub>4</sub> à TTRwt promove movimentos significantes à estrutura da TTRwt. Como resultado, são observadas divergências entre os dois sítios desta proteína no complexo TTRwt:T<sub>4</sub>, o que gera diferenças de afinidade e cooperatividade entre os sítios da TTRwt para a ligação do T<sub>4</sub>. Ao contrário, a ligação dos GCs à TTRwt promove movimentos mais sutis à estrutura do tetrâmero, minimizando os efeitos da interação do primeiro ligante com a TTRwt que poderiam afetar a ligação da segunda molécula do inibidor. Desta forma, não são observadas diferenças entre os sítios da TTRwt ligando GC-1 ou GC-24, o que indica que a interação destas moléculas com os dois sítios da TTRwt é bastante similar, caracterizando um processo de interação não cooperativo.

As estruturas da TTRwt na forma apo foram sobrepostas às estruturas TTRwt ligando T<sub>4</sub>, GC-1 e GC-24 e uma animação foi gerada (animação 4). A partir da análise desta animação, pode-se perceber duas formas de movimentação do tetrâmero de TTR induzidas pela ligação 1) do ligante cooperativo (T<sub>4</sub>) e 2) dos ligantes não-cooperativos (GC-1 e GC-24). No caso do ligante cooperativo, verifica-se movimentos abrangendo todo o tetrâmero e suas interfaces, já no caso de ligantes não cooperativos as movimentações parecem estar concentradas nos sítios de ligação não sendo, ou sendo pobremente, propagadas para a estrutura tetramérica como um todo. O sentido destes movimentos é mostrado de forma



esquemática na Figura 9.4.



**Figura 9.4** – Diagrama esquemático das movimentações na estrutura tetramérica da TTRwt observadas frente à ligação do T<sub>4</sub>, GC-1 e GC-24.

## 9.4 Conclusão

Neste capítulo foram apresentados os dados da interação de GC-1 e GC-24 com a TTR tipo selvagem e mutante V30M. Os dados experimentais de agregação da TTR mediada por acidificação do pH mostram que GC-1 e GC-24 ligam e inibem

a agregação da TTRwt e mutante V30M, com alta eficácia, porém moderada potência. Os dados de ITC indicaram que estes ligantes interagem com os dois sítios da TTR em modo não cooperativo e apresentam constantes de dissociação moderada, na ordem de micromolar. Além disto, os dados de ITC ainda mostraram que a ligação de GC-1 e GC-24 à TTR apresenta contribuição entrópica favorável, a qual é dependente do tamanho do substituinte hidrofóbico na posição 3' destes inibidores.

A análise das estruturas cristalográficas permitiu realizar importantes observações a respeito das bases moleculares que guiam a cooperatividade entre os sítios da TTRwt quando ligando T<sub>4</sub> e análogos. Os resultados mostraram que amplas movimentações da estrutura tetramérica da TTR, induzidas pela interação do ligante, podem resultar em diferenças entre os dois sítios desta proteína, e, assim, levar a um mecanismo de cooperatividade de ligação. De acordo com estas análises, ligantes carregando substituintes menos volumosos em posições equivalentes às posições 3,5;3',5' do T<sub>4</sub> e análogos podem não induzir cooperatividade entre os sítios da TTR, promovendo movimentações mais sutis ao tetrâmero de TTR. Da mesma maneira, movimentações mais sutis, como as observadas pela ligação dos GCs à TTRwt, são também observadas na mutante V30M e parecem também minimizar as discrepâncias de afinidade e ligação de inibidores à esta proteína.

Os resultados aqui gerados podem auxiliar o desenho de novos inibidores da agregação da TTR visando o aumento da contribuição entrópica para a ligação dos mesmos à TTR e pode dar suporte ao desenvolvimento de inibidores não cooperativos e com maior afinidade à mutante V30M.



## **10 Conclusão e perspectivas**

A presente tese analisou a interação de flavonóides e de análogos estruturais do T<sub>4</sub> com a proteína transtirretina humana, forma selvagem e mutante V30M. Dentre as moléculas testadas, a flavona LUT se mostrou um potente inibidor das duas formas de TTR analisadas. API e GC-24 também apresentaram boa inibição da agregação da mutante V30M. Assim, estas moléculas mostram grande potencial para o tratamento de amiloidoses de TTR, principalmente da FAP V30M. No entanto, análises com enfoque clínico devem ser conduzidas para averiguar a possibilidade do uso destas moléculas como fármaco-terapias para o tratamento das amiloidoses de TTR.

Com base nas análises estruturais e de Termodinâmica aqui apresentadas pôde-se apontar: 1) as principais regiões e resíduos do sítio de ligação ao hormônio da TTR envolvidos na afinidade aos ligantes testados, 2) as bases estruturais da seletividade TTRwt/ V30M, 3) as bases moleculares/ estruturais da cooperatividade

entre os sítios da TTRwt.

Particularidades foram encontradas entre as duas classes de ligantes testadas. No caso dos flavonóides, interações polares e apolares com Lys15 parecem ser mais importantes para a estabilização e posicionamento destes inibidores no sítio da TTR que para a afinidade em si. Os dados indicaram que a formação de contatos polares com a cadeia lateral de Lys15 na entrada dos sítios desloca os flavonóides para as regiões mais internas do canal, contribui para entalpia da ligação, porém desfavorece o fator entrópico. Desta forma, a formação de interações polares entre flavonóides e Lys15 pode resultar em perda, ao invés de ganho, de afinidade.

Interações formadas entre os flavonóides e o fundo do sítio da TTRwt também apresentam-se importantes para a afinidade. No fundo do sítio foram observados contatos polares (com Ser117, Thr119 e moléculas de água) e contatos hidrofóbicos mediados pela acomodação de anéis aromáticos. Os flavonóides exibiram grande variação de posicionamento e interação com o fundo do sítio da TTR, a qual pareceu ser dependente das diferenças químicas/ estruturais na série analisada. GEN formou fortes interações polares com as cadeias laterais de Ser117 nas duas faces do fundo do sítio de ligação. Estas interações mostraram-se muito importantes para sua afinidade pela TTR, sendo que a indisponibilidade desta interação – em um dos sítios de ligação – pareceu ser a principal razão pela diferença de afinidade entre os dois sítios da TTR por GEN. Entretanto, esta isoflavona foi o único flavonóide testado que acomodou o anel B nesta posição.

Nos complexos da TTRwt com API, LUT e KAE estes ligantes encontraram-se posicionados mais acima do sítio de ligação, sendo as interações com Ser117 comprometidas (com exceção de LUT que contactou Ser117 via sua 3'OH). No entanto, este modo de interação, fez com que uma molécula de água ficasse retida no fundo do sítio, em distâncias ideais para a formação de ligações de hidrogênio com o anel B destes flavonóides. Assim, embora mais limitadas, as interações polares destes flavonóides com o fundo do sítio da TTR foram também encontradas e, a princípio, independem da disponibilidade de Ser117 para a interação. No caso de NAR, que apresenta maior flexibilidade do anel C, e CHR, que não carrega uma hidroxila em posição 4', o anel B foi encontrado inserido no HBP3 da TTR, formando contatos apolares com a cadeia lateral de Ser117 e Thr119 (porção apolar). Desta

forma, NAR ainda pôde contatar uma molécula de água na interface tetramérica, preservando os contatos polares com o fundo do sítio e aumentando sua afinidade pela TTRwt em relação à CHR.

O modo de ocupação da região central do sítio pelos flavonóides mostrou ter influências tanto para a cooperatividade entre os sítios, quanto para ligação à mutante V30M. Com exceção de LUT e API, os outros flavonóides posicionaram porções volumosas e rígidas na região mais estreita do canal, região esta que é ainda mais restrita na mutante V30M. Isto, muito provavelmente, desfavoreceu a ligação destas moléculas à mutante V30M. Por outro lado, LUT e API mostraram posição diferenciada no sítio da TTRwt, sendo suas porções mais volumosas deslocadas em direção à entrada do sítio de ligação. Assim, LUT e API apresentaram interação similar ou até melhor com a V30M que com a TTR tipo selvagem.

Além da influência de ligação à mutante V30M, a ocupação da região central da cavidade por substituintes volumosos pareceu afetar o modo de interação destes flavonóides com o segundo sítio da TTRwt. Aparentemente esta é a região mais afetada pela interação dos flavonóides com a TTRwt. Alterações alostéricas proporcionadas pela interação do primeiro ligante com o tetrâmero de TTR podem modular o volume/ forma ou a dinâmica do segundo sítio, prejudicando a acomodação dos flavonóides, resultando em cooperatividade negativa entre os sítios. No entanto, a origem destas alterações não pôde ser avaliada com base nos resultados experimentais aqui gerados. Dessa maneira, seria interessante que análises, por outras técnicas biofísicas/ estruturais (como ressonância magnética nuclear ou simulações computacionais de dinâmica molecular) fossem conduzidas para averiguar em maiores detalhes estas hipóteses.

A análise da estrutura da TTRwt em complexo com T<sub>4</sub> e seus análogos estruturais, GC-1 e GC-24, mostrou que a formação de interações polares com Glu54 e Lys15 na entrada do sítio, bem como a acomodação de substituintes mais volumosos nos HBPs da TTRwt são importantes para afinidade. Estas interações foram favorecidas no complexo TTRwt:T<sub>4</sub> e menos evidentes nos complexos TTR:GC-1 e TTR:GC-24, correlacionando a menor afinidade destes análogos pela TTRwt. Porém, tais interações podem prejudicar o reconhecimento do T<sub>4</sub> pela mutante amiloidogênica V30M, e, ainda, gerar movimentos mais pronunciados da

estrutura tetramérica da TTRwt, resultando em cooperatividade entre os sítios de ligação da TTRwt quando ligando T<sub>4</sub>.

A presença de substituintes hidrofóbicos e volumosos nos análogos do T<sub>4</sub> mostrou favorecimento da contribuição entrópica da ligação, sendo esta correlacionada ao maior volume desses substituintes. O substituinte 3'benzil do GC-24 foi encontrado acomodado no HBP3 da TTR, formando interações apolares com os resíduos da TTR e gerando liberação de moléculas de água no centro do tetrâmero. Esta foi a principal diferença de interação observada nas estruturas cristalográficas da TTR ligando GC-1 e GC-24 e é correlacionada à entropia mais favorável da ligação do GC-24 em relação ao seu análogo GC-1 (3' isopropil), aumentando sua afinidade pelos sítios da TTR. Esta observação abre a possibilidade de modificação de inibidores já existentes, acrescentando substituintes hidrofóbicos volumosos em regiões que se acomodariam no HBP3, visando melhoramento do fator entrópico e afinidade destes inibidores pela TTR. Entretanto, estas sugestões devem ser analisadas em maiores detalhes, a fim de averiguar qual classe de inibidor mais se enquadraria para tais modificações, a viabilidade de síntese ou modificação das moléculas e tentativas já conduzidas

Contudo, os dados aqui relatados apresentam, pela primeira vez, estruturas da TTR com flavonóides e apontam as bases moleculares e estruturais do reconhecimento de flavonóides e análogos estruturais do T<sub>4</sub> pela TTR, bem como, implicações para ligação à mutante V30M. Assim, estes resultados apontam novas moléculas como potenciais inibidores da agregação da TTR e dão suporte ao desenho racional de inibidores desta proteína, informações estas de significativo impacto na pesquisa farmacêutica.

Este trabalho também gerou publicações e informações importantes para a continuidade dos estudos com a TTR. Os resultados apresentados nos capítulos 5 e 7 (apoTTR e TTR:GEN) já foram publicados em revista de impacto internacional (Apêndice C). Os dados relativos ao GC-1 e GC-24 (capítulo 9) foram submetidos para publicação e encontram-se em fase de revisão. Já o material relativo ao teste e caracterização dos outros flavonóides (capítulo 8) está sendo preparado para publicação. Além disso, as coordenadas atômicas e os fatores de estrutura dos dados cristalográficos da apoV30M e dos complexos TTRwt:GEN, V30M:GEN, TTRwt:GC-1, TTRwt:GC-24, V30M:GC-1 e V30M:GC-24 foram disponibilizados no

---

banco de dados de proteínas PDB, e em breve os dados das estruturas cristalográficas da TTRwt ligando API, LUT, KAE, NAR e CHR também serão disponibilizados.

Durante o desenvolvimento da presente tese, a autora também realizou trabalhos paralelos, onde destaca-se uma revisão dos estudos de desenvolvimento de fármacos baseado na estrutura da proteína/ pequena molécula, realizados com inibidores da agregação da TTR e com agonistas seletivos do receptor de hormônio tireoidiano, isoforma beta (TR $\beta$ ), publicada como parte de um capítulo no livro Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery (capítulo no Apêndice C). Além disso, a autora também escreveu a parte estrutural de uma revisão focando na família IL-10 das interleucinas humanas, a qual foi publicada em revista específica de alto impacto internacional (Apêndice C).





---

**REFERÊNCIAS**

- 1 MARCON, G.; PLAKOUTSI, G.;CHITI, F. Protein aggregation starting from the native globular state. **Methods in Enzymology**, v. 413, p. 75-91, 2006.
  
- 2 SILVA, J. L.; CORDEIRO, Y.;FOGUEL, D. Protein folding and aggregation: two sides of the same coin in the condensation of proteins revealed by pressure studies. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1764, n. 3, p. 443-451, 2006.
  
- 3 SILVA, J. L.; FOGUEL, D. Hydration, cavities and volume in protein folding, aggregation and amyloid assembly. **Physical Biology**, v. 6, n. 1, p. 015002, 2009.
  
- 4 LAI, Z.; COLON, W.;KELLY, J. W. The acid-mediated denaturation pathway of transthyretin yields a conformational intermediate that can self-assemble into amyloid. **Biochemistry**, v. 35, n. 20, p. 6470-6482, 1996.
  
- 5 KELLY, J. W.; COLON, W.; LAI, Z.; LASHUEL, H. A.; MCCULLOCH, J.; MCCUTCHEN, S. L.; MIROY, G. J.;PETERSON, S. A. Transthyretin quaternary and tertiary structural changes facilitate misassembly into amyloid. **Advances in Protein Chemistry**, v. 50, n. 161-181, 1997.
  
- 6 CORDEIRO, Y.; KRAINEVA, J.; RAVINDRA, R.; LIMA, L. M.; GOMES, M. P.; FOGUEL, D.; WINTER, R.;SILVA, J. L. Hydration and packing effects on prion folding and beta-sheet conversion. High pressure spectroscopy and pressure perturbation calorimetry studies. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 31, p. 32354-32359, 2004.
  
- 7 CORDEIRO, Y.; KRAINEVA, J.; SUAREZ, M. C.; TEMPESTA, A. G.; KELLY, J. W.; SILVA, J. L.; WINTER, R.;FOGUEL, D. Fourier transform infrared spectroscopy provides a fingerprint for the tetramer and for the aggregates of transthyretin. **Biophysical Journal**, v. 91, n. 3, p. 957-967, 2006.
  
- 8 CHITNUMSUB, P.; FIORI, W. R.; LASHUEL, H. A.; DIAZ, H.;KELLY, J. W. The nucleation of monomeric parallel beta-sheet-like structures and their self-assembly in aqueous solution. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 1, p. 39-59, 1999.
  
- 9 FERREIRA, S. T.; VIEIRA, M. N.;DE FELICE, F. G. Soluble protein oligomers as emerging toxins in Alzheimer's and other amyloid diseases. **IUBMB Life**, v. 59, n. 4-5, p. 332-345, 2007.
  
- 10 CHITI, F.; DOBSON, C. M. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. **Annual Review of Biochemistry**, v. 75, n. 333-366, 2006.
  
- 11 SOUSA, M. M.; CARDOSO, I.; FERNANDES, R.; GUIMARAES, A.;SARAIVA, M. J. Deposition of transthyretin in early stages of familial amyloidotic polyneuropathy: evidence for toxicity of nonfibrillar

aggregates. **American Journal of Pathology**, v. 159, n. 6, p. 1993-2000, 2001.

12 DE STROOPER, B. Proteases and proteolysis in Alzheimer disease: a multifactorial view on the disease process. **Physiological Reviews**, v. 90, n. 2, p. 465-494, 2010.

13 VAN ROOIJEN, B. D.; CLAESSENS, M. M.; SUBRAMANIAM, V. Membrane interactions of oligomeric alpha-synuclein: potential role in Parkinson's disease. **Current Protein & Peptide Science**, v. 11, n. 5, p. 334-342, 2010.

14 CHITI, F.; DOBSON, C. M. Amyloid formation by globular proteins under native conditions. **Nature Chemical Biology**, v. 5, n. 1, p. 15-22, 2009.

15 AULUCK, P. K.; CARAVEO, G.; LINDQUIST, S. alpha-Synuclein: Membrane Interactions and Toxicity in Parkinson's Disease. **Annual Review of Cell Developmental Biology**, v. n. *in press*.

16 QUINTAS, A.; SARAIVA, M. J.; BRITO, R. M. The amyloidogenic potential of transthyretin variants correlates with their tendency to aggregate in solution. **FEBS Letters**, v. 418, n. 3, p. 297-300, 1997.

17 QUINTAS, A.; SARAIVA, M. J.; BRITO, R. M. The tetrameric protein transthyretin dissociates to a non-native monomer in solution. A novel model for amyloidogenesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 46, p. 32943-32949, 1999.

18 CONNORS, L. H.; LIM, A.; PROKAEVA, T.; ROSKENS, V. A.; COSTELLO, C. E. Tabulation of human transthyretin (TTR) variants, 2003. **Amyloid**, v. 10, n. 3, p. 160-184, 2003.

19 YAMAMOTO, K.; YAGI, H.; LEE, Y. H.; KARDOS, J.; HAGIHARA, Y.; NAIKI, H.; GOTO, Y. The amyloid fibrils of the constant domain of immunoglobulin light chain. **FEBS Letters**, v. 584, n. 15, p. 3348-3353,

20 GLENNER, G. G.; TERRY, W.; HARADA, M.; ISERSKY, C.; PAGE, D. Amyloid fibril proteins: proof of homology with immunoglobulin light chains by sequence analyses. **Science**, v. 172, n. 988, p. 1150-1151, 1971.

21 BOOTH, D. R.; SUNDE, M.; BELLOTTI, V.; ROBINSON, C. V.; HUTCHINSON, W. L.; FRASER, P. E.; HAWKINS, P. N.; DOBSON, C. M.; RADFORD, S. E.; BLAKE, C. C.; PEPYS, M. B. Instability, unfolding and aggregation of human lysozyme variants underlying amyloid fibrillogenesis. **Nature**, v. 385, n. 6619, p. 787-793, 1997.

22 PEPYS, M. B.; HAWKINS, P. N.; BOOTH, D. R.; VIGUSHIN, D. M.; TENNENT, G. A.; SOUTAR, A. K.; TOTTY, N.; NGUYEN, O.; BLAKE, C. C.; TERRY, C. J.; ET AL. Human lysozyme gene mutations cause hereditary systemic amyloidosis. **Nature**, v. 362, n. 6420, p. 553-557, 1993.

- 
- 23 SILVA, J. L.; VIEIRA, T. C.; GOMES, M. P.; BOM, A. P.; LIMA, L. M.; FREITAS, M. S.; ISHIMARU, D.; CORDEIRO, Y.; FOGUEL, D. Ligand binding and hydration in protein misfolding: insights from studies of prion and p53 tumor suppressor proteins. **Accounts of Chemical Research**, v. 43, n. 2, p. 271-279, 2010.
- 24 DUMOULIN, M.; KUMITA, J. R.; DOBSON, C. M. Normal and aberrant biological self-assembly: Insights from studies of human lysozyme and its amyloidogenic variants. **Accounts of Chemical Research**, v. 39, n. 9, p. 603-610, 2006.
- 25 FERRAO-GONZALES, A. D.; PALMIERI, L.; VALORY, M.; SILVA, J. L.; LASHUEL, H.; KELLY, J. W.; FOGUEL, D. Hydration and packing are crucial to amyloidogenesis as revealed by pressure studies on transthyretin variants that either protect or worsen amyloid disease. **Journal of Molecular Biology**, v. 328, n. 4, p. 963-974, 2003.
- 26 FERRAO-GONZALES, A. D.; SOUTO, S. O.; SILVA, J. L.; FOGUEL, D. The preaggregated state of an amyloidogenic protein: hydrostatic pressure converts native transthyretin into the amyloidogenic state. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, v. 97, n. 12, p. 6445-6450, 2000.
- 27 GUIJARRO, J. I.; SUNDE, M.; JONES, J. A.; CAMPBELL, I. D.; DOBSON, C. M. Amyloid fibril formation by an SH3 domain. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, v. 95, n. 8, p. 4224-4228, 1998.
- 28 MCPARLAND, V. J.; KAD, N. M.; KALVERDA, A. P.; BROWN, A.; KIRWIN-JONES, P.; HUNTER, M. G.; SUNDE, M.; RADFORD, S. E. Partially unfolded states of beta(2)-microglobulin and amyloid formation in vitro. **Biochemistry**, v. 39, n. 30, p. 8735-8746, 2000.
- 29 LITVINOVICH, S. V.; BREW, S. A.; AOTA, S.; AKIYAMA, S. K.; HAUDENSCHILD, C.; INGHAM, K. C. Formation of amyloid-like fibrils by self-association of a partially unfolded fibronectin type III module. **Journal of Molecular Biology**, v. 280, n. 2, p. 245-258, 1998.
- 30 FANDRICH, M.; FLETCHER, M. A.; DOBSON, C. M. Amyloid fibrils from muscle myoglobin. **Nature**, v. 410, n. 6825, p. 165-166, 2001.
- 31 CHITI, F.; WEBSTER, P.; TADDEI, N.; CLARK, A.; STEFANI, M.; RAMPONI, G.; DOBSON, C. M. Designing conditions for in vitro formation of amyloid protofilaments and fibrils. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, v. 96, n. 7, p. 3590-3594, 1999.
- 32 PLAKOUTSI, G.; BEMPORAD, F.; MONTI, M.; PAGNOZZI, D.; PUCCI, P.; CHITI, F. Exploring the mechanism of formation of native-like and precursor amyloid oligomers for the native acylphosphatase from *Sulfolobus solfataricus*. **Structure**, v. 14, n. 6, p. 993-1001, 2006.
- 33 PICKEN, M. M. Amyloidosis-where are we now and where are we heading? **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 134, n. 4, p. 545-551,

- 34 JOHNSON, R. J.; CHRISTODOULOU, J.; DUMOULIN, M.; CADDY, G. L.; ALCOCER, M. J.; MURTAGH, G. J.; KUMITA, J. R.; LARSSON, G.; ROBINSON, C. V.; ARCHER, D. B.; LUISI, B.; DOBSON, C. M. Rationalising lysozyme amyloidosis: insights from the structure and solution dynamics of T70N lysozyme. **Journal of Molecular Biology**, v. 352, n. 4, p. 823-836, 2005.
- 35 WESTERMARK, P.; SLETTEN, K.; JOHANSSON, B.; CORNWELL, G. G. 3RD Fibril in senile systemic amyloidosis is derived from normal transthyretin. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, v. 87, n. 7, p. 2843-2845, 1990.
- 36 CONNORS, L. H.; RICHARDSON, A. M.; THEBERGE, R.; COSTELLO, C. E. Tabulation of transthyretin (TTR) variants as of 1/1/2000. **Amyloid**, v. 7, n. 1, p. 54-69, 2000.
- 37 SEKIJIMA, Y.; WISEMAN, R. L.; MATTESON, J.; HAMMARSTROM, P.; MILLER, S. R.; SAWKAR, A. R.; BALCH, W. E.; KELLY, J. W. The biological and chemical basis for tissue-selective amyloid disease. **Cell**, v. 121, n. 1, p. 73-85, 2005.
- 38 HAMMARSTROM, P.; SEKIJIMA, Y.; WHITE, J. T.; WISEMAN, R. L.; LIM, A.; COSTELLO, C. E.; ALTLAND, K.; GARZULY, F.; BUDKA, H.; KELLY, J. W. D18G transthyretin is monomeric, aggregation prone, and not detectable in plasma and cerebrospinal fluid: a prescription for central nervous system amyloidosis? **Biochemistry**, v. 42, n. 22, p. 6656-6663, 2003.
- 39 SEKIJIMA, Y.; HAMMARSTROM, P.; MATSUMURA, M.; SHIMIZU, Y.; IWATA, M.; TOKUDA, T.; IKEDA, S.; KELLY, J. W. Energetic characteristics of the new transthyretin variant A25T may explain its atypical central nervous system pathology. **Laboratory Investigation**, v. 83, n. 3, p. 409-417, 2003.
- 40 QUINTAS, A.; VAZ, D. C.; CARDOSO, I.; SARAIVA, M. J.; BRITO, R. M. Tetramer dissociation and monomer partial unfolding precedes protofibril formation in amyloidogenic transthyretin variants. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 29, p. 27207-27213, 2001.
- 41 PLANTE-BORDENEUVE, V.; SAID, G. Transthyretin related familial amyloid polyneuropathy. **Current Opinion in Neurology**, v. 13, n. 5, p. 569-573, 2000.
- 42 ZAROS, C.; GENIN, E.; HELLMAN, U.; SAPORTA, M. A.; LANGUILLE, L.; WADINGTON-CRUZ, M.; SUHR, O.; MISRAHI, M.; PLANTE-BORDENEUVE, V. On the origin of the transthyretin Val30Met familial amyloid polyneuropathy. **Annals of Human Genetics**, v. 72, n. Pt 4, p. 478-484, 2008.
- 43 HELLMAN, U.; ALARCON, F.; LUNDGREN, H. E.; SUHR, O. B.; BONAITI-PELLIE, C.; PLANTE-BORDENEUVE, V. Heterogeneity of penetrance in familial amyloid polyneuropathy, ATTR Val30Met, in the Swedish population. **Amyloid**, v. 15, n. 3, p. 181-186, 2008.
- 44 LIM, A.; PROKAEVA, T.; MCCOMB, M. E.; O'CONNOR, P. B.; THEBERGE, R.; CONNORS, L. H.; SKINNER, M.; COSTELLO, C. E. Characterization of transthyretin variants in familial transthyretin amyloidosis by mass spectrometric peptide mapping and DNA sequence analysis. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 4, p. 741-751, 2002.

- 45 SARAIVA, M. J. Transthyretin mutations in hyperthyroxinemia and amyloid diseases. **Human Mutation**, v. 17, n. 6, p. 493-503, 2001.
- 46 BUXBAUM, J.; ALEXANDER, A.; KOZIOL, J.; TAGOE, C.; FOX, E.;KITZMAN, D. Significance of the amyloidogenic transthyretin Val 122 Ile allele in African Americans in the Arteriosclerosis Risk in Communities (ARIC) and Cardiovascular Health (CHS) Studies. **American Heart Journal**, v. 159, n. 5, p. 864-870,
- 47 CONNORS, L. H.; PROKAEVA, T.; LIM, A.; THEBERGE, R.; FALK, R. H.; DOROS, G.; BERG, A.; COSTELLO, C. E.; O'HARA, C.; SELDIN, D. C.;SKINNER, M. Cardiac amyloidosis in African Americans: comparison of clinical and laboratory features of transthyretin V122I amyloidosis and immunoglobulin light chain amyloidosis. **American Heart Journal**, v. 158, n. 4, p. 607-614, 2009.
- 48 BUXBAUM, J.; JACOBSON, D. R.; TAGOE, C.; ALEXANDER, A.; KITZMAN, D. W.; GREENBERG, B.; THANEEMIT-CHEN, S.;LAVORI, P. Transthyretin V122I in African Americans with congestive heart failure. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 47, n. 8, p. 1724-1725, 2006.
- 49 JIANG, X.; BUXBAUM, J. N.;KELLY, J. W. The V122I cardiomyopathy variant of transthyretin increases the velocity of rate-limiting tetramer dissociation, resulting in accelerated amyloidosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, v. 98, n. 26, p. 14943-14948, 2001.
- 50 IKEDA, S.; NAKAZATO, M.; ANDO, Y.;SOBUE, G. Familial transthyretin-type amyloid polyneuropathy in Japan: clinical and genetic heterogeneity. **Neurology**, v. 58, n. 7, p. 1001-1007, 2002.
- 51 REILLY, M. M.; ADAMS, D.; BOOTH, D. R.; DAVIS, M. B.; SAID, G.; LAUBRIAT-BIANCHIN, M.; PEPYS, M. B.; THOMAS, P. K.;HARDING, A. E. Transthyretin gene analysis in European patients with suspected familial amyloid polyneuropathy. **Brain**, v. 118 ( Pt 4), n. 849-856, 1995.
- 52 SOUSA, A.; ANDERSSON, R.; DRUGGE, U.; HOLMGREN, G.;SANDGREN, O. Familial amyloidotic polyneuropathy in Sweden: geographical distribution, age of onset, and prevalence. **Human Heredity**, v. 43, n. 5, p. 288-294, 1993.
- 53 LASHUEL, H. A.; WURTH, C.; WOO, L.;KELLY, J. W. The most pathogenic transthyretin variant, L55P, forms amyloid fibrils under acidic conditions and protofilaments under physiological conditions. **Biochemistry**, v. 38, n. 41, p. 13560-13573, 1999.
- 54 MASCALCHI, M.; SALVI, F.; PIRINI, M. G.; D'ERRICO, A.; FERLINI, A.; LOLLI, F.; PLASMATI, R.; TESSA, C.; VILLARI, N.;TASSINARI, C. A. Transthyretin amyloidosis and superficial siderosis of the CNS. **Neurology**, v. 53, n. 7, p. 1498-1503, 1999.
- 55 GARZULY, F.; VIDAL, R.; WISNIEWSKI, T.; BRITTIG, F.;BUDKA, H. Familial meningocerebrovascular amyloidosis, Hungarian type, with mutant transthyretin (TTR Asp18Gly). **Neurology**, v. 47, n. 6, p. 1562-1567, 1996.

- 56 ALMEIDA, M. R.; ALVES, I. L.; TERAZAKI, H.; ANDO, Y.;SARAIVA, M. J. Comparative studies of two transthyretin variants with protective effects on familial amyloidotic polyneuropathy: TTR R104H and TTR T119M. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 270, n. 3, p. 1024-1028, 2000.
- 57 FOSS, T. R.; KELKER, M. S.; WISEMAN, R. L.; WILSON, I. A.;KELLY, J. W. Kinetic stabilization of the native state by protein engineering: implications for inhibition of transthyretin amyloidogenesis. **Journal of Molecular Biology**, v. 347, n. 4, p. 841-854, 2005.
- 58 KAMATA, M.; SUSANTO, M. T.;CHEN, I. S. Enhanced transthyretin tetramer stability following expression of an amyloid disease transsuppressor variant in mammalian cells. **The Journal of Gene Medicine**, v. 11, n. 2, p. 103-111, 2009.
- 59 PALHANO, F. L.; LEME, L. P.; BUSNARDO, R. G.;FOGUEL, D. Trapping the monomer of a non-amyloidogenic variant of transthyretin: exploring its possible use as a therapeutic strategy against transthyretin amyloidogenic diseases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 3, p. 1443-1453, 2009.
- 60 SEKIJIMA, Y.; DENDLE, M. T.; WISEMAN, R. L.; WHITE, J. T.; D'HAENZE, W.;KELLY, J. W. R104H may suppress transthyretin amyloidogenesis by thermodynamic stabilization, but not by the kinetic mechanism characterizing T119 interallelic trans-suppression. **Amyloid**, v. 13, n. 2, p. 57-66, 2006.
- 61 ALDRED, A. R.; BRACK, C. M.;SCHREIBER, G. The cerebral expression of plasma protein genes in different species. **Comparative Biochemistry Physiology B Biochemistry Molecular Biology**, v. 111, n. 1, p. 1-15, 1995.
- 62 MAKOVER, A.; MORIWAKI, H.; RAMAKRISHNAN, R.; SARAIVA, M. J.; BLANER, W. S.;GOODMAN, D. S. Plasma transthyretin. Tissue sites of degradation and turnover in the rat. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 18, p. 8598-8603, 1988.
- 63 SHETTY, P. S.; WATRASIEWICZ, K. E.; JUNG, R. T.;JAMES, W. P. Rapid-turnover transport proteins: an index of subclinical protein-energy malnutrition. **Lancet**, v. 2, n. 8136, p. 230-232, 1979.
- 64 SOUSA, M. M.; NORDEN, A. G.; JACOBSEN, C.; WILLNOW, T. E.; CHRISTENSEN, E. I.; THAKKER, R. V.; VERROUST, P. J.; MOESTRUP, S. K.;SARAIVA, M. J. Evidence for the role of megalin in renal uptake of transthyretin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 49, p. 38176-38181, 2000.
- 65 SCHREIBER, G. The evolutionary and integrative roles of transthyretin in thyroid hormone homeostasis. **Journal of Endocrinology**, v. 175, n. 1, p. 61-73, 2002.
- 66 HORNBERG, A.; ENEQVIST, T.; OLOFSSON, A.; LUNDGREN, E.;SAUER-ERIKSSON, A. E. A comparative analysis of 23 structures of the amyloidogenic protein transthyretin. **Journal of Molecular Biology**, v. 302, n. 3, p. 649-669, 2000.

- 67 BLAKE, C. C.; GEISOW, M. J.; OATLEY, S. J.; RERAT, B.; RERAT, C. Structure of prealbumin: secondary, tertiary and quaternary interactions determined by Fourier refinement at 1.8 Å. **Journal of Molecular Biology**, v. 121, n. 3, p. 339-356, 1978.
- 68 HAMILTON, J. A.; STEINRAUF, L. K.; BRADEN, B. C.; LIEPNIEKS, J.; BENSON, M. D.; HOLMGREN, G.; SANDGREN, O.; STEEN, L. The x-ray crystal structure refinements of normal human transthyretin and the amyloidogenic Val-30-->Met variant to 1.7-Å resolution. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 4, p. 2416-2424, 1993.
- 69 SEBASTIAO, M. P.; SARAIVA, M. J.; DAMAS, A. M. The crystal structure of amyloidogenic Leu55 --> Pro transthyretin variant reveals a possible pathway for transthyretin polymerization into amyloid fibrils. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 38, p. 24715-24722, 1998.
- 70 ZANOTTI, G.; D'ACUNTO, M. R.; MALPELI, G.; FOLLI, C.; BERNI, R. Crystal structure of the transthyretin--retinoic-acid complex. **European Journal of Biochemistry**, v. 234, n. 2, p. 563-569, 1995.
- 71 DAGGETT, V. Alpha-sheet: The toxic conformer in amyloid diseases? **Accounts of Chemical Research**, v. 39, n. 9, p. 594-602, 2006.
- 72 JOHNSON, S. M.; WISEMAN, R. L.; SEKIJIMA, Y.; GREEN, N. S.; ADAMSKI-WERNER, S. L.; KELLY, J. W. Native state kinetic stabilization as a strategy to ameliorate protein misfolding diseases: a focus on the transthyretin amyloidoses. **Accounts of Chemical Research**, v. 38, n. 12, p. 911-921, 2005.
- 73 LAIDMAN, J.; FORSE, G. J.; YEATES, T. O. Conformational change and assembly through edge beta strands in transthyretin and other amyloid proteins. **Accounts of Chemical Research**, v. 39, n. 9, p. 576-583, 2006.
- 74 OLOFSSON, A.; IPPEL, J. H.; WIJMENGA, S. S.; LUNDGREN, E.; OHMAN, A. Probing solvent accessibility of transthyretin amyloid by solution NMR spectroscopy. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 7, p. 5699-5707, 2004.
- 75 LIU, K.; CHO, H. S.; LASHUEL, H. A.; KELLY, J. W.; WEMMER, D. E. A glimpse of a possible amyloidogenic intermediate of transthyretin. **Nature Structural Biology**, v. 7, n. 9, p. 754-757, 2000.
- 76 HAMMARSTROM, P.; WISEMAN, R. L.; POWERS, E. T.; KELLY, J. W. Prevention of transthyretin amyloid disease by changing protein misfolding energetics. **Science**, v. 299, n. 5607, p. 713-716, 2003.
- 77 GREEN, N. S.; FOSS, T. R.; KELLY, J. W. Genistein, a natural product from soy, is a potent inhibitor of transthyretin amyloidosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, v. 102, n. 41, p. 14545-14550, 2005.
- 78 FOSS, T. R.; WISEMAN, R. L.; KELLY, J. W. The pathway by which the tetrameric protein transthyretin dissociates. **Biochemistry**, v. 44, n. 47, p. 15525-15533, 2005.



- 79 SORENSEN, J.; HAMELBERG, D.; SCHIOTT, B.; MCCAMMON, J. A. Comparative MD analysis of the stability of transthyretin providing insight into the fibrillation mechanism. **Biopolymers**, v. 86, n. 1, p. 73-82, 2007.
- 80 SERAG, A. A.; ALTENBACH, C.; GINGERY, M.; HUBBELL, W. L.; YEATES, T. O. Arrangement of subunits and ordering of beta-strands in an amyloid sheet. **Nature Structural Biology**, v. 9, n. 10, p. 734-739, 2002.
- 81 YANG, M.; LEI, M.; YORDANOV, B.; HUO, S. Peptide plane can flip in two opposite directions: implication in amyloid formation of transthyretin. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 12, p. 5829-5833, 2006.
- 82 HURSHMAN BABBES, A. R.; POWERS, E. T.; KELLY, J. W. Quantification of the thermodynamically linked quaternary and tertiary structural stabilities of transthyretin and its disease-associated variants: the relationship between stability and amyloidosis. **Biochemistry**, v. 47, n. 26, p. 6969-6984, 2008.
- 83 SHNYROV, V. L.; VILLAR, E.; ZHADAN, G. G.; SANCHEZ-RUIZ, J. M.; QUINTAS, A.; SARAIVA, M. J.; BRITO, R. M. Comparative calorimetric study of non-amyloidogenic and amyloidogenic variants of the homotetrameric protein transthyretin. **Biophysical Chemistry**, v. 88, n. 1-3, p. 61-67, 2000.
- 84 HURSHMAN, A. R.; WHITE, J. T.; POWERS, E. T.; KELLY, J. W. Transthyretin aggregation under partially denaturing conditions is a downhill polymerization. **Biochemistry**, v. 43, n. 23, p. 7365-7381, 2004.
- 85 RICHARDSON, J. S.; RICHARDSON, D. C. Natural beta-sheet proteins use negative design to avoid edge-to-edge aggregation. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, v. 99, n. 5, p. 2754-2759, 2002.
- 86 SERAG, A. A.; ALTENBACH, C.; GINGERY, M.; HUBBELL, W. L.; YEATES, T. O. Identification of a subunit interface in transthyretin amyloid fibrils: evidence for self-assembly from oligomeric building blocks. **Biochemistry**, v. 40, n. 31, p. 9089-9096, 2001.
- 87 ENEQVIST, T.; ANDERSSON, K.; OLOFSSON, A.; LUNDGREN, E.; SAUER-ERIKSSON, A. E. The beta-slip: a novel concept in transthyretin amyloidosis. **Molecular Cell**, v. 6, n. 5, p. 1207-1218, 2000.
- 88 LASHUEL, H. A.; LAI, Z.; KELLY, J. W. Characterization of the transthyretin acid denaturation pathways by analytical ultracentrifugation: implications for wild-type, V30M, and L55P amyloid fibril formation. **Biochemistry**, v. 37, n. 51, p. 17851-17864, 1998.
- 89 FOGUEL, D.; SILVA, J. L. New insights into the mechanisms of protein misfolding and aggregation in amyloidogenic diseases derived from pressure studies. **Biochemistry**, v. 43, n. 36, p. 11361-11370, 2004.
- 90 BLAKE, C.; SERPELL, L. Synchrotron X-ray studies suggest that the core of the transthyretin amyloid fibril is a continuous beta-sheet helix. **Structure**, v. 4, n. 8, p. 989-998, 1996.

- 
- 91 ARMEN, R. S.; ALONSO, D. O.; DAGGETT, V. Anatomy of an amyloidogenic intermediate: conversion of beta-sheet to alpha-sheet structure in transthyretin at acidic pH. **Structure**, v. 12, n. 10, p. 1847-1863, 2004.
- 92 LI, D. W.; HAN, L.; HUO, S. Structural and pathway complexity of beta-strand reorganization within aggregates of human transthyretin(105-115) peptide. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 111, n. 19, p. 5425-5433, 2007.
- 93 GLABE, C. G. Conformation-dependent antibodies target diseases of protein misfolding. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 29, n. 10, p. 542-547, 2004.
- 94 HOLMGREN, G.; ERICZON, B. G.; GROTH, C. G.; STEEN, L.; SUHR, O.; ANDERSEN, O.; WALLIN, B. G.; SEYMOUR, A.; RICHARDSON, S.; HAWKINS, P. N.; ET AL. Clinical improvement and amyloid regression after liver transplantation in hereditary transthyretin amyloidosis. **Lancet**, v. 341, n. 8853, p. 1113-1116, 1993.
- 95 SUHR, O. B.; ERICZON, B. G.; FRIMAN, S. Long-term follow-up of survival of liver transplant recipients with familial amyloid polyneuropathy (Portuguese type). **Liver Transplantation**, v. 8, n. 9, p. 787-794, 2002.
- 96 HERLENIUS, G.; WILCZEK, H. E.; LARSSON, M.; ERICZON, B. G. Ten years of international experience with liver transplantation for familial amyloidotic polyneuropathy: results from the Familial Amyloidotic Polyneuropathy World Transplant Registry. **Transplantation**, v. 77, n. 1, p. 64-71, 2004.
- 97 JONSEN, E.; SUHR, O. B.; TASHIMA, K.; ATHLIN, E. Early liver transplantation is essential for familial amyloidotic polyneuropathy patients' quality of life. **Amyloid**, v. 8, n. 1, p. 52-57, 2001.
- 98 GALES, L.; MACEDO-RIBEIRO, S.; ARSEQUELL, G.; VALENCIA, G.; SARAIVA, M. J.; DAMAS, A. M. Human transthyretin in complex with iododiflunisal: structural features associated with a potent amyloid inhibitor. **Biochemical Journal**, v. 388, n. Pt 2, p. 615-621, 2005.
- 99 JOHNSON, S. M.; PETRASSI, H. M.; PALANINATHAN, S. K.; MOHAMEDMOHAIDEEN, N. N.; PURKEY, H. E.; NICHOLS, C.; CHIANG, K. P.; WALKUP, T.; SACCHETTINI, J. C.; SHARPLESS, K. B.; KELLY, J. W. Bisaryloxime ethers as potent inhibitors of transthyretin amyloid fibril formation. **The Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 5, p. 1576-1587, 2005.
- 100 MILLER, S. R.; SEKIJIMA, Y.; KELLY, J. W. Native state stabilization by NSAIDs inhibits transthyretin amyloidogenesis from the most common familial disease variants. **Laboratory Investigation**, v. 84, n. 5, p. 545-552, 2004.
- 101 KLABUNDE, T.; PETRASSI, H. M.; OZA, V. B.; RAMAN, P.; KELLY, J. W.; SACCHETTINI, J. C. Rational design of potent human transthyretin amyloid disease inhibitors. **Nature Structural Biology**, v. 7, n. 4, p. 312-321, 2000.

- 102 OZA, V. B.; SMITH, C.; RAMAN, P.; KOEPF, E. K.; LASHUEL, H. A.; PETRASSI, H. M.; CHIANG, K. P.; POWERS, E. T.; SACHETTINI, J.; KELLY, J. W. Synthesis, structure, and activity of diclofenac analogues as transthyretin amyloid fibril formation inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 2, p. 321-332, 2002.
- 103 PETRASSI, H. M.; JOHNSON, S. M.; PURKEY, H. E.; CHIANG, K. P.; WALKUP, T.; JIANG, X.; POWERS, E. T.; KELLY, J. W. Potent and selective structure-based dibenzofuran inhibitors of transthyretin amyloidogenesis: kinetic stabilization of the native state. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 18, p. 6662-6671, 2005.
- 104 MIROY, G. J.; LAI, Z.; LASHUEL, H. A.; PETERSON, S. A.; STRANG, C.; KELLY, J. W. Inhibiting transthyretin amyloid fibril formation via protein stabilization. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, v. 93, n. 26, p. 15051-15056, 1996.
- 105 PETERSON, S. A.; KLABUNDE, T.; LASHUEL, H. A.; PURKEY, H.; SACCHETTINI, J. C.; KELLY, J. W. Inhibiting transthyretin conformational changes that lead to amyloid fibril formation. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, v. 95, n. 22, p. 12956-12960, 1998.
- 106 BAURES, P. W.; OZA, V. B.; PETERSON, S. A.; KELLY, J. W. Synthesis and evaluation of inhibitors of transthyretin amyloid formation based on the non-steroidal anti-inflammatory drug, flufenamic acid. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 7, p. 1339-1347, 1999.
- 107 BAURES, P. W.; PETERSON, S. A.; KELLY, J. W. Discovering transthyretin amyloid fibril inhibitors by limited screening. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 8, p. 1389-1401, 1998.
- 108 MORAIS-DE-SA, E.; PEREIRA, P. J.; SARAIVA, M. J.; DAMAS, A. M. The crystal structure of transthyretin in complex with diethylstilbestrol: a promising template for the design of amyloid inhibitors. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 51, p. 53483-53490, 2004.
- 109 ADAMSKI-WERNER, S. L.; PALANINATHAN, S. K.; SACCHETTINI, J. C.; KELLY, J. W. Diflunisal analogues stabilize the native state of transthyretin. Potent inhibition of amyloidogenesis. **The Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 2, p. 355-374, 2004.
- 110 BLEICHER, L.; APARICIO, R.; NUNES, F. M.; MARTINEZ, L.; GOMES DIAS, S. M.; FIGUEIRA, A. C.; SANTOS, M. A.; VENTURELLI, W. H.; DA SILVA, R.; DONATE, P. M.; NEVES, F. A.; SIMEONI, L. A.; BAXTER, J. D.; WEBB, P.; SKAF, M. S.; POLIKARPOV, I. Structural basis of GC-1 selectivity for thyroid hormone receptor isoforms. **BMC Structural Biology**, v. 8, n. 8, 2008. doi: [10.1186/1472-6807-8-8](https://doi.org/10.1186/1472-6807-8-8).
- 111 ANDREA, T. A.; CAVALIERI, R. R.; GOLDFINE, I. D.; JORGENSEN, E. C. Binding of thyroid hormones and analogues to the human plasma protein prealbumin. **Biochemistry**, v. 19, n. 1, p. 55-63, 1980.
- 112 CHENG, S. Y.; PAGES, R. A.; SAROFF, H. A.; EDELHOCH, H.; ROBBINS, J. Analysis of thyroid hormone binding to human serum prealbumin by 8-anilinonaphthalene-1-sulfonate fluorescence. **Biochemistry**, v. 16, n. 16, p. 3707-3713, 1977.

- 113 JULIUS, R. L.; HAWTHORNE, M. F. Amyloid disease prevention by transthyretin native state complexation with carborane derivatives lacking cyclooxygenase inhibition. **Drug News & Perspectives**, v. 21, n. 5, p. 258-266, 2008.
- 114 LAFONT, V.; ARMSTRONG, A. A.; OHTAKA, H.; KISO, Y.; MARIO AMZEL, L.;FREIRE, E. Compensating enthalpic and entropic changes hinder binding affinity optimization. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 69, n. 6, p. 413-422, 2007.
- 115 TOJO, K.; SEKIJIMA, Y.; KELLY, J. W.;IKEDA, S. Diflunisal stabilizes familial amyloid polyneuropathy-associated transthyretin variant tetramers in serum against dissociation required for amyloidogenesis. **Neuroscience Research**, v. 56, n. 4, p. 441-449, 2006.
- 116 SEKIJIMA, Y.; DENDLE, M. A.;KELLY, J. W. Orally administered diflunisal stabilizes transthyretin against dissociation required for amyloidogenesis. **Amyloid**, v. 13, n. 4, p. 236-249, 2006.
- 117 RADOVIC, B.; MENTRUP, B.;KOHRLE, J. Genistein and other soya isoflavones are potent ligands for transthyretin in serum and cerebrospinal fluid. **British Journal of Nutrition**, v. 95, n. 6, p. 1171-1176, 2006.
- 118 BLOEDON, L. T.; JEFFCOAT, A. R.; LOPACZYNSKI, W.; SCHELL, M. J.; BLACK, T. M.; DIX, K. J.; THOMAS, B. F.; ALBRIGHT, C.; BUSBY, M. G.; CROWELL, J. A.;ZEISEL, S. H. Safety and pharmacokinetics of purified soy isoflavones: single-dose administration to postmenopausal women. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 76, n. 5, p. 1126-1137, 2002.
- 119 OKAZAKI, K.; OKAZAKI, S.; NAKAMURA, H.; KITAMURA, Y.; HATAYAMA, K.; WAKABAYASHI, S.; TSUDA, T.; KATSUMATA, T.; NISHIKAWA, A.;HIROSE, M. A repeated 28-day oral dose toxicity study of genistein in rats, based on the 'Enhanced OECD Test Guideline 407' for screening endocrine-disrupting chemicals. **Archives of Toxicology**, v. 76, n. 10, p. 553-559, 2002.
- 120 BORNGRAEBER, S.; BUDNY, M. J.; CHIELLINI, G.; CUNHA-LIMA, S. T.; TOGASHI, M.; WEBB, P.; BAXTER, J. D.; SCANLAN, T. S.;FLETTERICK, R. J. Ligand selectivity by seeking hydrophobicity in thyroid hormone receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, v. 100, n. 26, p. 15358-15363, 2003.
- 121 BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 248-254, 1976.
- 122 MCCUTCHEN, S. L.; COLON, W.;KELLY, J. W. Transthyretin mutation Leu-55-Pro significantly alters tetramer stability and increases amyloidogenicity. **Biochemistry**, v. 32, n. 45, p. 12119-12127, 1993.
- 123 LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

- 124 SHAPIRO, A. L.; VINUELA, E.; MAIZEL, J. V., JR. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 28, n. 5, p. 815-820, 1967.
- 125 WOJTCZAK, A.; LUFT, J.; CODY, V. Mechanism of molecular recognition. Structural aspects of 3,3'-diiodo-L-thyronine binding to human serum transthyretin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 1, p. 353-357, 1992.
- 126 WOJTCZAK, A.; CODY, V.; LUFT, J. R.; PANGBORN, W. Structures of human transthyretin complexed with thyroxine at 2.0 Å resolution and 3',5'-dinitro-N-acetyl-L-thyronine at 2.2 Å resolution. **Acta Crystallographica D Biological Crystallography**, v. 52, n. Pt 4, p. 758-765, 1996.
- 127 BEECHER, G. R. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. **Journal of Nutrition**, v. 133, n. 10, p. 3248S-3254S, 2003.
- 128 BUSBY, M. G.; JEFFCOAT, A. R.; BLOEDON, L. T.; KOCH, M. A.; BLACK, T.; DIX, K. J.; HEIZER, W. D.; THOMAS, B. F.; HILL, J. M.; CROWELL, J. A.; ZEISEL, S. H. Clinical characteristics and pharmacokinetics of purified soy isoflavones: single-dose administration to healthy men. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 75, n. 1, p. 126-136, 2002.
- 129 WAGNER, R. L.; HUBER, B. R.; SHIAU, A. K.; KELLY, A.; CUNHA LIMA, S. T.; SCANLAN, T. S.; APRILETTI, J. W.; BAXTER, J. D.; WEST, B. L.; FLETTERICK, R. J. Hormone selectivity in thyroid hormone receptors. **Molecular Endocrinology**, v. 15, n. 3, p. 398-410, 2001.
- 130 WAGNER, R. L.; APRILETTI, J. W.; MCGRATH, M. E.; WEST, B. L.; BAXTER, J. D.; FLETTERICK, R. J. A structural role for hormone in the thyroid hormone receptor. **Nature**, v. 378, n. 6558, p. 690-697, 1995.
- 131 CONNELLY, S.; CHOI, S.; JOHNSON, S. M.; KELLY, J. W.; WILSON, I. A. Structure-based design of kinetic stabilizers that ameliorate the transthyretin amyloidoses. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 20, n. 1, p. 54-62, 2010.
- 132 CHOI, S.; CONNELLY, S.; REIXACH, N.; WILSON, I. A.; KELLY, J. W. Chemoselective small molecules that covalently modify one lysine in a non-enzyme protein in plasma. **Nature Chemical Biology**, v. 6, n. 2, p. 133-139, 2010.
- 133 CHIELLINI, G.; NGUYEN, N. H.; YOSHIHARA, H. A.; SCANLAN, T. S. Improved synthesis of the iodine-free thyromimetic GC-1. **Bioorganic Medicinal Chemistry Letters**, v. 10, n. 23, p. 2607-2611, 2000.
- 134 NGUYEN, N. H.; APRILETTI, J. W.; CUNHA LIMA, S. T.; WEBB, P.; BAXTER, J. D.; SCANLAN, T. S. Rational design and synthesis of a novel thyroid hormone antagonist that blocks coactivator recruitment. **The Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 15, p. 3310-3320, 2002.

- 135 FOGUEL, D. High pressure studies on transthyretin. **Protein & Peptide Letters**, v. 12, n. 3, p. 245-249, 2005.
- 136 FOGUEL, D.; ROBINSON, C. R.; DE SOUSA, P. C., JR.; SILVA, J. L.; ROBINSON, A. S. Hydrostatic pressure rescues native protein from aggregates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 63, n. 5, p. 552-558, 1999.
- 137 FOGUEL, D.; SUAREZ, M. C.; FERRAO-GONZALES, A. D.; PORTO, T. C.; PALMIERI, L.; EINSIEDLER, C. M.; ANDRADE, L. R.; LASHUEL, H. A.; LANSBURY, P. T.; KELLY, J. W.; SILVA, J. L. Dissociation of amyloid fibrils of alpha-synuclein and transthyretin by pressure reveals their reversible nature and the formation of water-excluded cavities. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, v. 100, n. 17, p. 9831-9836, 2003.
- 138 SILVA, J. L.; FOGUEL, D.; DA POIAN, A. T.; PREVELIGE, P. E. The use of hydrostatic pressure as a tool to study viruses and other macromolecular assemblages. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 6, n. 2, p. 166-175, 1996.
- 139 SILVA, J. L.; FOGUEL, D.; ROYER, C. A. Pressure provides new insights into protein folding, dynamics and structure. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 26, n. 10, p. 612-618, 2001.
- 140 SILVA, J. L.; OLIVEIRA, A. C.; GOMES, A. M.; LIMA, L. M.; MOHANA-BORGES, R.; PACHECO, A. B.; FOGUEL, D. Pressure induces folding intermediates that are crucial for protein-DNA recognition and virus assembly. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1595, n. 1-2, p. 250-265, 2002.
- 141 DA POIAN, A. T.; OLIVEIRA, A. C.; GASPAR, L. P.; SILVA, J. L.; WEBER, G. Reversible pressure dissociation of R17 bacteriophage. The physical individuality of virus particles. **Journal of Molecular Biology**, v. 231, n. 4, p. 999-1008, 1993.
- 142 SILVA, J. L.; WEBER, G. Pressure stability of proteins. **Annual Review of Physical Chemistry**, v. 44, n. 89-113, 1993.
- 143 PALADINI, A. A.; SILVA, J. L.; WEBER, G. Slab gel electrophoresis of oligomeric proteins under high hydrostatic pressure. I. Description of the system and demonstration of the pressure dissociation of a dimer. **Analytical Biochemistry**, v. 161, n. 2, p. 358-364, 1987.
- 144 FOGUEL, D.; CHALOUB, R. M.; SILVA, J. L.; CROFTS, A. R.; WEBER, G. Pressure and low temperature effects on the fluorescence emission spectra and lifetimes of the photosynthetic components of cyanobacteria. **Biophysical Journal**, v. 63, n. 6, p. 1613-1622, 1992.
- 145 ROUGET, J. B.; SCHROER, M. A.; JEWORREK, C.; PUHSE, M.; SALDANA, J. L.; BESSIN, Y.; TOLAN, M.; BARRICK, D.; WINTER, R.; ROYER, C. A. Unique features of the folding landscape of a repeat protein revealed by pressure perturbation. **Biophysical Journal**, v. 98, n. 11, p. 2712-2721,

- 146 GIRARD, E.; KAHN, R.; MEZOUAR, M.; DHAUSSY, A. C.; LIN, T.; JOHNSON, J. E.; FOURME, R. The first crystal structure of a macromolecular assembly under high pressure: CpMV at 330 MPa. **Biophysical Journal**, v. 88, n. 5, p. 3562-3571, 2005.
- 147 PALADINI, A. A., JR.; WEBER, G. Pressure-induced reversible dissociation of enolase. **Biochemistry**, v. 20, n. 9, p. 2587-2593, 1981.
- 148 BEEZER, A. E.; NAVRATIL, J.; FISEROVA, A.; POSPISIL, M. Different immunomodulator regulated patterns of effector-target cell interactions: a novel application of microcalorimetry. **Microbios**, v. 73, n. 296, p. 205-213, 1993.
- 149 BEEZER, A. E.; MILES, R. J.; SHAW, E. J.; VICKERSTAFF, L. Antibiotic bioassay by flow microcalorimetry. **Experientia**, v. 36, n. 9, p. 1051-1052, 1980.
- 150 VINE, G. J.; BISHOP, A. H. The analysis of microorganisms by microcalorimetry in the pharmaceutical industry. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 6, n. 3, p. 223-238, 2005.
- 151 SCHAARSCHMIDT, B.; LAMPRECHT, I. Calorimetric characterization of microorganisms. **Experientia**, v. 32, n. 10, p. 1230-1234, 1976.
- 152 BOLING, E. A.; BLANCHARD, G. C.; RUSSELL, W. J. Bacterial identification by microcalorimetry. **Nature**, v. 241, n. 5390, p. 472-473, 1973.
- 153 KODALI, D. R. Oxidative stability measurement of high-stability oils by pressure differential scanning calorimeter (PDSC). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 20, p. 7649-7653, 2005.
- 154 ROSKAR, R.; KMETEC, V. Evaluation of the moisture sorption behaviour of several excipients by BET, GAB and microcalorimetric approaches. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 53, n. 6, p. 662-665, 2005.
- 155 CESCHEL, G. C.; BADIELLO, R.; RONCHI, C.; MAFFEI, P. Degradation of components in drug formulations: a comparison between HPLC and DSC methods. **Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis**, v. 32, n. 4-5, p. 1067-1072, 2003.
- 156 RUNGE, F. E.; HEGER, R. Use of microcalorimetry in monitoring stability studies. Example: vitamin A esters. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 1, p. 47-55, 2000.
- 157 SOLIS-MENDIOLA, S.; ROJO-DOMINGUEZ, A.; HERNANDEZ-ARANA, A. Cooperativity in the unfolding transitions of cysteine proteinases. Calorimetric study of the heat denaturation of chymopapain and papain. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1203, n. 1, p. 121-125, 1993.
- 158 SHRAKE, A.; FINLAYSON, J. S.; ROSS, P. D. Thermal stability of human albumin measured by

differential scanning calorimetry. I. Effects of caprylate and N-acetyltryptophanate. **Vox Sanguinis**, v. 47, n. 1, p. 7-18, 1984.

159 VELAZQUEZ-CAMPOY, A.; FREIRE, E. Isothermal titration calorimetry to determine association constants for high-affinity ligands. **Nature Protocols**, v. 1, n. 1, p. 186-191, 2006.

160 KAWASAKI, Y.; CHUFAN, E. E.; LAFONT, V.; HIDAKA, K.; KISO, Y.; MARIO AMZEL, L.; FREIRE, E. How much binding affinity can be gained by filling a cavity? **Chemical Biology & Drug Design**, v. 75, n. 2, p. 143-151, 2010.

161 FREIRE, E. A thermodynamic approach to the affinity optimization of drug candidates. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 74, n. 5, p. 468-472, 2009.

162 FREIRE, E. Do enthalpy and entropy distinguish first in class from best in class? **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 19-20, p. 869-874, 2008.

163 BARDI, J. S.; LUQUE, I.; FREIRE, E. Structure-based thermodynamic analysis of HIV-1 protease inhibitors. **Biochemistry**, v. 36, n. 22, p. 6588-6596, 1997.

164 CRANE-ROBINSON, C.; DRAGAN, A. I.; READ, C. M. Defining the thermodynamics of protein/DNA complexes and their components using micro-calorimetry. **Methods in Molecular Biology**, v. 543, n. 625-651, 2009.

165 VELAZQUEZ-CAMPOY, A.; LEAVITT, S. A.; FREIRE, E. Characterization of protein-protein interactions by isothermal titration calorimetry. **Methods Mol Biol**, v. 261, n. 35-54, 2004.

166 LADBURY, J. E.; DOYLE, M. L. **Biocalorimetry 2: Applications of Calorimetry in the Biological Sciences**. New York: Wiley-Blackwell, 2004. 276 p.

167 ABABOU, A.; LADBURY, J. E. Survey of the year 2004: literature on applications of isothermal titration calorimetry. **Journal of Molecular Recognition**, v. 19, n. 1, p. 79-89, 2006.

168 GOMEZ, J.; FREIRE, E. Thermodynamic mapping of the inhibitor site of the aspartic protease endothiapsin. **Journal of Molecular Biology**, v. 252, n. 3, p. 337-350, 1995.

169 VELAZQUEZ CAMPOY, A.; FREIRE, E. ITC in the post-genomic era...? Priceless. **Biophysical Chemistry**, v. 115, n. 2-3, p. 115-124, 2005.

170 VELAZQUEZ-CAMPOY, A.; OHTAKA, H.; NEZAMI, A.; MUZAMMIL, S.; FREIRE, E. Isothermal titration calorimetry. **Current Protocols in Cell Biology**, v. Chapter 17, n. Unit 17 18, 2004.



- 171 APARICIO, R.; FERREIRA, S. T.; POLIKARPOV, I. Closed conformation of the active site loop of rabbit muscle triosephosphate isomerase in the absence of substrate: evidence of conformational heterogeneity. **Journal of Molecular Biology**, v. 334, n. 5, p. 1023-1041, 2003.
- 172 HA, Y.; MCCANN, M. T.; TUCHMAN, M.; ALLEWELL, N. M. Substrate-induced conformational change in a trimeric ornithine transcarbamoylase. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, v. 94, n. 18, p. 9550-9555, 1997.
- 173 KATAOKA, M.; HEAD, J. F.; SEATON, B. A.; ENGELMAN, D. M. Melittin binding causes a large calcium-dependent conformational change in calmodulin. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, v. 86, n. 18, p. 6944-6948, 1989.
- 174 PRASHAR, V.; BIHANI, S.; DAS, A.; FERRER, J. L.; HOSUR, M. Catalytic water co-existing with a product peptide in the active site of HIV-1 protease revealed by X-ray structure analysis. **PLoS One**, v. 4, n. 11, p. e7860, 2009.
- 175 PEDERSEN, A. K.; PETERS, G. G.; MOLLER, K. B.; IVERSEN, L. F.; KASTRUP, J. S. Water-molecule network and active-site flexibility of apo protein tyrosine phosphatase 1B. **Acta Crystallographica D Biological Crystallography**, v. 60, n. Pt 9, p. 1527-1534, 2004.
- 176 DRENTH, J. **Principles of protein X-Ray crystallography**. 3rd ed. New York: Springer, 2007. 333 p.
- 177 RHODES, G. **Crystallography made crystal clear: a guide for users of macromolecular models**. 2<sup>nd</sup> ed. San Diego: Academic Press, 2000. 269 p.
- 178 DAUTER, Z.; WILSON, K. S., Monochromatic data collection, In: International Union of Crystallographys (Ed.) **International Tables for Crystallography**. 1st ed. London: Kluwer Academic Publishers, 2006, p. 177-195.
- 179 GARMAN, E. F.; MCSWEENEY, S. M. Progress in research into radiation damage in cryo-cooled macromolecular crystals. **Journal of Synchrotron Radiation**, v. 14, n. 1, p. 1-3, 2007.
- 180 POLIKARPOV, I.; PERLES, L. A.; DE OLIVEIRA, R. T.; OLIVA, G.; CASTELLANO, E. E.; GARRATT, R. C.; CRAIEVICH, A. Set-up and experimental parameters of the protein crystallography beamline at the Brazilian National Synchrotron Laboratory. **Journal of Synchrotron Radiation**, v. 5, n. Pt 2, p. 72-76, 1998.
- 181 GUIMARAES, B. G.; SANFELICI, L.; NEUENSCHWANDER, R. T.; RODRIGUES, F.; GRIZOLLI, W. C.; RAULIK, M. A.; PITON, J. R.; MEYER, B. C.; NASCIMENTO, A. S.; POLIKARPOV, I. The MX2 macromolecular crystallography beamline: a wiggler X-ray source at the LNLS. **Journal of Synchrotron Radiation**, v. 16, n. Pt 1, p. 69-75, 2009.

- 
- 182 LESLIE, A. G. The integration of macromolecular diffraction data. **Acta Crystallographica D Biological Crystallography**, v. 62, n. Pt 1, p. 48-57, 2006.
- 183 OTWINOWSKI, Z.; MINOR, W., Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode, In: R. M. Sweet W. Carter Jr.s (Ed.) **Methods in Enzymology**. New York: Academic Press, 1997, p. 307-326.
- 184 ADAMS, P. D.; AFONINE, P. V.; BUNKOCZI, G.; CHEN, V. B.; DAVIS, I. W.; ECHOLS, N.; HEADD, J. J.; HUNG, L. W.; KAPRAL, G. J.; GROSSE-KUNSTLEVE, R. W.; MCCOY, A. J.; MORIARTY, N. W.; OEFFNER, R.; READ, R. J.; RICHARDSON, D. C.; RICHARDSON, J. S.; TERWILLIGER, T. C.;ZWART, P. H. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. **Acta Crystallographica D Biological Crystallography**, v. 66, n. 213-221, 2010.
- 185 EVANS, P. Scaling and assessment of data quality. **Acta Crystallographica D Biological Crystallography**, v. 62, n. Pt 1, p. 72-82, 2006.
- 186 EMSLEY, P.; COWTAN, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. **Acta Crystallographica D Biological Crystallography**, v. 60, n. Pt 12 Pt 1, p. 2126-2132, 2004.
- 187 MURSHUDOV, G. N.; VAGIN, A. A.;DODSON, E. J. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. **Acta Crystallographica D Biological Crystallography**, v. 53, n. Pt 3, p. 240-255, 1997.
- 188 SEBASTIAO, M. P.; LAMZIN, V.; SARAIVA, M. J.;DAMAS, A. M. Transthyretin stability as a key factor in amyloidogenesis: X-ray analysis at atomic resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 306, n. 4, p. 733-744, 2001.
- 189 PALANINATHAN, S. K.; MOHAMEDMOHAIDEEN, N. N.; SNEE, W. C.; KELLY, J. W.;SACCHETTINI, J. C. Structural insight into pH-induced conformational changes within the native human transthyretin tetramer. **Journal of Molecular Biology**, v. 382, n. 5, p. 1157-1167, 2008.
- 190 PASQUATO, N.; BERNI, R.; FOLLI, C.; ALFIERI, B.; CENDRON, L.;ZANOTTI, G. Acidic pH-induced conformational changes in amyloidogenic mutant transthyretin. **Journal of Molecular Biology**, v. 366, n. 3, p. 711-719, 2007.
- 191 LIMA, L. M.; SILVA VDE, A.; PALMIERI LDE, C.; OLIVEIRA, M. C.; FOGUEL, D.;POLIKARPOV, I. Identification of a novel ligand binding motif in the transthyretin channel. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 1, p. 100-110, 2010.
- 192 The CCP4 suite: programs for protein crystallography. **Acta Crystallographica D Biological Crystallography**, v. 50, n. Pt 5, p. 760-763, 1994.
- 193 FERRAO-GONZALES, A. D.; PALMIERI, L.; VALORY, M.; SILVA, J. L.; LASHUEL, H.; KELLY, J. W.;FOGUEL, D. Hydration and packing are crucial to amyloidogenesis as revealed by pressure studies on

transthyretin variants that either protect or worsen amyloid disease. **Journal of Molecular Biology**, v. 328, n. 4, p. 963-974, 2003.

194 SARAIVA, M. J. Transthyretin amyloidosis: a tale of weak interactions. **FEBS Letters**, v. 498, n. 2-3, p. 201-203, 2001.

195 DUNDAS, J.; OUYANG, Z.; TSENG, J.; BINKOWSKI, A.; TURPAZ, Y.; LIANG, J. CASTp: computed atlas of surface topography of proteins with structural and topographical mapping of functionally annotated residues. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. Web Server issue, p. W116-118, 2006.

196 NEUMANN, P.; CODY, V.; WOJTCZAK, A. Structural basis of negative cooperativity in transthyretin. **Acta Biochimica Polonica**, v. 48, n. 4, p. 867-875, 2001.

197 LORIA, J. P.; BERLOW, R. B.; WATT, E. D. Characterization of enzyme motions by solution NMR relaxation dispersion. **Accounts of Chemical Research**, v. 41, n. 2, p. 214-221, 2008.

198 WALLACE, A. C.; LASKOWSKI, R. A.; THORNTON, J. M. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. **Protein Engineering**, v. 8, n. 2, p. 127-134, 1995.

199 JEFFREY, P. (2006) X-ray Data Collection Course. disponível em: <http://xray0.princeton.edu/~phil/Facility/Guides/XrayDataCollection.html>, acesso em: 26 de agosto de 2010.

200 LESLIE, A. G. Data processing., In: International Union of Crystallographys (Ed.) **International Tables for Crystallography**. London: Kluwer Academic Publishers, 2006, p. 212-217.

201 WEISS, M. S. Global indicators of X-ray data quality. **Journal of Applied Crystallography**, v. 34, n. 2, p. 130-135, 2001.

202 RHODES, G. Judging the Quality of Macromolecular Models: A Glossary of Terms from Crystallography, NMR, and Homology Modeling. 2000 disponível em: [http://spdbv.vital-it.ch/TheMolecularLevel/ModQual/#R-factor%20\(crystallography\)](http://spdbv.vital-it.ch/TheMolecularLevel/ModQual/#R-factor%20(crystallography)), acesso em: 02 de julho de 2010.

203 BLUNDELL, T.L.; JOHNSON, L.N. **Protein Crystallography**. London: Academic Press, 1994. 565 p.

## APÊNDICE A

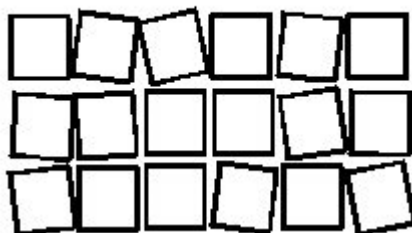
Este apêndice foi criado com a finalidade de realizar uma breve descrição de alguns termos freqüentemente utilizados em Cristalografia e das etapas de processamento dos dados de difração.

**Completeza:** A completeza de um conjunto de dados é definida pelo número de reflexões únicas medidas em relação à quantidade de reflexões únicas possíveis em uma dada faixa de resolução. A completeza é expressa em porcentagem, e bons conjuntos de dados apresentam, idealmente 100% de completeza, mas 90- 95% ainda é aceitável - se a fração não medida estiver espalhada aleatoriamente no espaço recíproco.

**Multiplicidade ou Redundância:** A multiplicidade do conjunto de dados refere-se ao número de vezes que uma mesma reflexão foi observada, tanto em decorrência de medidas múltiplas quanto por relações de simetria. Assim, a multiplicidade é a razão do número total de reflexões medidas pelo número de reflexões únicas. Quanto maior a multiplicidade, melhor as estimativas dos erros nas reflexões. Para Substituição Molecular, onde existe um modelo de partida, multiplicidade ~ 3 já pode levar a um bom resultado. No entanto, para sinal isomorfo ou anômalo, multiplicidades entre 20 e 40 ou ainda maiores podem ser necessárias; porque as diferenças isomorfias e ainda mais, as anômalas, são geralmente muito pequenas frente à intensidade das próprias reflexões.

**Mosaicidade:** Ao invés de um arranjo perfeito, os cristais reais podem ser vistos como pequenos domínios reunidos contiguamente, chamados de “blocos mosaico” – Figura A1. É interessante comentar que se o cristal fosse perfeito, o espaço recíproco seria formado por pontos de dimensão zero (matematicamente, um ponto não tem dimensão), não sendo possível medir as reflexões. Uma conseqüência da mosaicidade é introduzir, na Lei de Bragg, uma faixa angular onde

uma determinada família de planos cristalinos permanece em condição de difração. A mosaicidade é medida em graus e valores típicos para cristais de proteínas estão em torno de 0,2-1,0 grau. Assim, a mosaicidade é uma medida angular do grau de desordem do empacotamento cristalino. Menor mosaicidade indica cristais mais ordenados e, assim, melhor difração.



**Figura A1** – Representação (exagerada) dos “blocos mosaicos” em cristais (199).

**B-fator:** O B-fator, também denominado “fator de temperatura” ou “fator de Debye-Waller” é um parâmetro que estima a mobilidade estática ou dinâmica de um átomo, e pode também indicar quando há erros na construção do modelo. A expressão do fator de espalhamento por um átomo (Equação 14) representa o espalhamento por um átomo em repouso. Mudanças na temperatura, por exemplo, afetam a vibração térmica dos átomos, afetando a intensidade do espalhamento (203). Em 1914, Debye demonstrou que a vibração térmica dos átomos gera uma diminuição da intensidade por um fator de:

$$\exp[-B(\sin^2\theta/\lambda^2)] \quad (\text{A1})$$

Onde:

$$B = 8\pi^2 u^2/3 = 8\pi^2 u_x^2 \quad (\text{A2})$$

e “u” é o deslocamento médio dos átomos ao longo da normal dos planos de reflexão e “u<sub>x</sub>” sua componente x (203).

Fatores de temperatura altos implicam em rápido decaimento da intensidade com o ângulo de Bragg  $\theta$  e limita a resolução da estrutura. Em cristais de proteína, os valores de B-fator estão na ordem de 12-20  $\text{Å}^2$ , correspondendo a um deslocamento médio dos átomos em relação à sua posição média de 0,15 a 0,5  $\text{Å}$ .

**Indexação:** A partir da posição das reflexões hkl na imagem de difração e, conhecendo-se com precisão os parâmetros do experimento - como comprimento de onda, distância cristal detector, posição do centro do detector e posição das reflexões medidas no detector - pode-se determinar os parâmetros da rede cristalina (eixos a, b e c e ângulos  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ), sistema cristalino, centragem da rede e possíveis grupos de espaço. Os sete sistemas cristalinos são descritos na Tabela A1.

**Tabela A1** – Os sete sistemas cristalinos. Adaptado de Drenth (176)

Sistema cristalino	Condições impostas na geometria da cela unitária	Simetria de grupo pontual mínima
Triclínico	Nenhuma	1
Monoclínico	$\alpha = \gamma = 90^\circ$	2
Ortorrômbico	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	222
Tetragonal	$a = b; \alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	4
Trigonal	$a = b; \alpha = \beta = 90^\circ; \gamma = 120^\circ$ (eixo hexagonal)	3
	$a = b = c; \alpha = \beta = \gamma$ (eixo romboédrico)	
Hexagonal	$a = b; \alpha = \beta = 90^\circ; \gamma = 120^\circ$	6
Cúbico	$a = b = c; \alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	23

Uma vez conhecendo-se os parâmetros da rede é possível prever a posição de cada reflexão no detector, em cada orientação do cristal. Cada reflexão recebe, então, um índice hkl. Os índices hkl são relacionados ao espalhamento na direção de um determinado plano cristalino. Quanto maiores os índices hkl, maior o ângulo entre a direção do feixe incidente e a direção de observação e, portanto, maior a distância da posição da reflexão em relação ao centro do detector. Cada índice hkl refere-se ao número de vezes em que os eixos a, b, c da cela unitária são divididos em partes iguais. Assim, se um plano recebe um índice hkl=342, significa

que este plano corta o eixo a em 3 partes iguais, o eixo b em 4 e o eixo c em 2.

**Integração:** A integração consiste em medir os valores das intensidades de cada reflexão, bem como estimar o erro destas intensidades. Dois métodos são usualmente empregados: 1) soma ou 2) ajuste de padrões (*profile fitting*). Na integração por soma a intensidade em cada pixel do detector, relacionada a uma reflexão hkl, é somada. O ruído (*background*) nas adjacências de cada reflexão é também medido e descontado do valor de intensidade em cada pixel da reflexão. Assim, obtêm-se um valor de intensidade final relativo a cada reflexão hkl em particular, descontado do ruído associado. O método de ajuste de padrões, assume que o padrão do perfil da reflexão é conhecido e a intensidade é derivada encontrando-se um fator de escala que, quando aplicado ao perfil padrão, resulta no melhor ajuste ao padrão da reflexão observada. Assim, este método é baseado em duas etapas: 1) a determinação dos perfis padrão e 2) a estimativa das intensidades dos padrões ajustados (200). Este procedimento é realizado para cada reflexão hkl em todas as imagens de difração do conjunto de dados coletado. Ao final desta etapa uma lista contendo todas as reflexões hkl medidas e suas intensidades é obtida.

**Escalonamento:** Reflexões idênticas e simetricamente relacionadas devem apresentar mesma intensidade. No entanto, alguns fatores podem influenciar a intensidade de reflexões equivalentes (ex.: diminuição da intensidade do feixe de raios-X ao longo da coleta, diminuição da capacidade de difração do cristal ao longo da coleta por danos por radiação, absorção) coletadas em diferentes imagens de difração e em diferentes orientações do cristal. Para corrigir esta variação um fator de escala é aplicado, assim como correções da absorção. Esta etapa é denominada escalonamento. Uma média da intensidade das reflexões equivalentes é então realizada e esta média e o erro associado são computados. Parâmetros estatísticos, como o  $R_{\text{merge}}$  (Equação A3), são utilizados para avaliar a dispersão das reflexões medidas em torno de um valor médio, em diferentes imagens (201, 202).

---

$$R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{hkl} \sum_n |I_n - \langle I_n \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_n I_n} \quad (\text{A3})$$

Onde:  $I_n$ ,  $\langle I_n \rangle$  = intensidade e média das intensidades das de reflexões redundantes (idênticas ou relacionadas por simetria) medidas  $n$  vezes em diferentes imagens do conjunto de dados.





## APÊNDICE B

Este apêndice foi criado com a finalidade de descrever o conteúdo das Animações 1-4. Estas animações foram disponibilizadas na mídia (CD) que acompanha a presente tese e estão em formato “avi” e “Windows”. As animações podem ser visualizadas no WindowsMediaPlayer, ou, alternativamente, no VLC media player (programa livre, o download pode ser realizado em <http://www.videolan.org/vlc/>).

**Animação 1:** *apoTTRwt versus apoV30M*. Nesta animação pode-se visualizar as principais alterações conformacionais induzidas pela mutação Met30. A cadeia principal dos tetrômeros da TTR é mostrada em linhas e a superfície dos resíduos da folha-beta interna (fitas A, D, G e H) e dos sítios de ligação (resíduos 14-19, 106-110, 117-121) foram geradas e são mostradas em transparência, em diferentes orientações. Os resíduos do sítio estão nomeados. As figuras foram geradas com o programa Pymol (De Lano Scientific) e o filme foi criado com o Microsoft®Windows®MovieMaker (v 5.1). As coordenadas atômicas PDB ID: 3KGS (apoV30M) e 3CFM (apoTTRwt) foram utilizadas.

**Animação 2:** *apoTTRwt versus TTRwt:GEN*. Nesta animação pode-se visualizar as movimentações induzidas pela ligação da genisteína (GEN) à TTRwt. A cadeia principal dos tetrômeros da TTR é mostrada em linhas e a superfície dos resíduos da folha-beta interna (fitas A, D, G e H) e dos sítios de ligação (resíduos 14-19, 106-110, 117-121) foram geradas e são mostradas em transparência, em diferentes orientações. Os resíduos do sítio estão nomeados e Ser117 é mostrada em bastões. As figuras foram geradas com o programa Pymol (De Lano Scientific) e o filme foi criado com o Microsoft®Windows®MovieMaker (v 5.1). As coordenadas atômicas PDB ID: 3CFM (apoTTRwt) e 3KGU (TTRwt:GEN) foram utilizadas.

**Animacão 3:** *apoV30M versus V30M:GEN*. Nesta animacão pode-se visualizar as movimentacões induzidas pela ligacão da genisteína (GEN) à mutante V30M. A cadeia principal dos tetrêmeros da TTR é mostrada em linhas e a superfície dos resíduos da folha-beta interna (fitas A, D, G e H) e dos sítios de ligacão (resíduos 14-19, 106-110, 117-121) foram geradas e são mostradas em transparência, em diferentes orientacões. Os resíduos do sítio estão nomeados e Ser117 é mostrada em bastões. As figuras foram geradas com o programa Pymol (De Lano Scientific) e o filme foi criado com o Microsoft®Windows®MovieMaker (v 5.1). As coordenadas atômicas PDB ID: 3KGS (apoV30M) e 3KGT (V30M:GEN) foram utilizadas.

**Animacão 4:** *apoTTRwt versus TTRwt:T<sub>4</sub>, GC-1, GC-24*. Nesta animacão pode-se visualizar as diferenças de movimentos no tetrâmero da TTRwt, induzidas pela ligacão do T<sub>4</sub> (ligante cooperativo), GC-1 e GC-24 (ligantes não cooperativos). Os movimentos são mais pronunciados na estrutura da TTRwt ligando T<sub>4</sub>. A direçao dos movimentos é indicada por setas. Os ligantes são mostrados em bastões e a superfície dos resíduos que compõe os sítios de ligacão (resíduos 14-19, 53-55, 106-110) é mostrada em transparência. As figuras foram geradas com o programa Pymol (De Lano Scientific) e o filme foi criado com o Microsoft®Windows®MovieMaker (v 5.1). As coordenadas atômicas PDB ID: 3CFM (apoTTRwt), 2ROX (TTRwt:T<sub>4</sub>), 3NEE (TTRwt:GC-1) e 3NEO (TTRwt:GC-24) foram utilizadas.

---

## **APÊNDICE C**

Este apêndice mostra as publicações da autora, geradas ou em processo de publicação, no período do desenvolvimento da presente tese.

Trivella, D. B. B. ; Bleicher, L. ; Palmieri, L. C.; Wiggers, H. J. ; Montanari, C. A. ; Kelly, J. W. ; Lima, L. M. T.R. ; Foguel, D. ; Polikarpov, I. . Conformational differences between the wild type and V30M mutant transthyretin modulate its binding to genistein: Implications to tetramer stability and ligand-binding. *Journal of Structural Biology*, v. 170, p. 522-531, 2010. PubMed PMID: 20211733.

Trivella, D. B. B.; Sairre, M. I.; Foguel, D.; Lima, L M. T. R.; Polikarpov, I. The binding of synthetic triiodo L-thyronine analogues to human transthyretin (hTTR): molecular basis of cooperative and non-cooperative ligand recognition. *Journal of Structural Biology* – submetido para publicação.

Trivella, D. B. B. ; Ferreira Junior, J.R. ; Renauld, J.C. ; Dumoutier, J.B. ; Polikarpov, I. . Structure and Function of Interleukin-22 and Other Members of the Interleukin-10 Family - REVIEW. *Cellular and Molecular Life Sciences*, Sep;67(17):2909-2935, 2010. PubMed PMID:20454917.

Andricopulo, A. D. ; Guido, R. V. C. ; Trivella, D. B. B. ; Polikarpov, I. ; Leitão, A. ; Montanari, C. A. . Recent Trends in Structure-Based Drug Design and Energetics.. In: Donald J. Abraham; David P. Rotella. (Org.). *Burger's Medicinal Chemistry, Drug Discovery and Development*. 7 ed.. 7 ed. New york: John Wiley & Sons, Inc., 2010, v. 2, p. 685-724.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Structural Biology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/yjsbi](http://www.elsevier.com/locate/yjsbi)

## Conformational differences between the wild type and V30M mutant transthyretin modulate its binding to genistein: Implications to tetramer stability and ligand-binding

Daniela B.B. Trivella<sup>a</sup>, Lucas Bleicher<sup>a</sup>, Leonardo de Castro Palmieri<sup>b</sup>, Helton José Wiggers<sup>c</sup>, Carlos Alberto Montanari<sup>c</sup>, Jeffery W. Kelly<sup>d</sup>, Luís Maurício T.R. Lima<sup>e</sup>, Débora Foguel<sup>b</sup>, Igor Polikarpov<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, P.O. Box 369, 13560-970 São Carlos, SP, Brazil

<sup>b</sup>Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21941-590 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>c</sup>Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 13560-970 São Carlos, SP, Brazil

<sup>d</sup>Department of Chemistry and The Skaggs Institute for Chemical Biology, The Scripps Research Institute, 92037 La Jolla, CA, USA

<sup>e</sup>Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21941-590 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 18 November 2009

Received in revised form 27 February 2010

Accepted 2 March 2010

Available online 6 March 2010

#### Keywords:

Crystal structure

Isothermal titration calorimetry

Pressure stability

Genistein

Wild type TTR

V30M mutant TTR

### ABSTRACT

Transthyretin (TTR) is a tetrameric  $\beta$ -sheet-rich transporter protein directly involved in human amyloid diseases. It was recently found that the isoflavone genistein (GEN) potently inhibits TTR amyloid fibril formation (Green et al., 2005) and is therefore a promising candidate for TTR amyloidosis treatment. Here we used structural and biophysical approaches to characterize genistein binding to the wild type (TTRwt) and to its most frequent amyloidogenic variant, the V30M mutant. In a dose-dependent manner, genistein elicited considerable increases in both mutant and TTRwt stability as demonstrated by high hydrostatic pressure (HHP) and acid-mediated dissociation/denaturation assays. TTR:GEN crystal complexes and isothermal titration calorimetry (ITC) experiments showed that the binding mechanisms of genistein to the TTRwt and to V30M are different and are dependent on apoTTR structure conformations. Furthermore, we could also identify potential allosteric movements caused by genistein binding to the wild type TTR that explains, at least in part, the frequently observed negatively cooperative process between the two sites of TTRwt when binding ligands. These findings show that TTR mutants may present different ligand recognition and therefore are of value in ligand design for inhibiting TTR amyloidosis.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Transthyretin (TTR) is a homo-tetrameric  $\beta$ -sheet-rich protein composed of four subunits termed A, B, C and D. Each TTR monomer is composed of 127 amino acids and has a molecular mass of 14 kDa. TTR is found in human plasma at a concentration of approximately 0.20 mg/mL (3.6  $\mu$ M), where it binds to the retinol-binding protein (RBP) and to the thyroid hormone thyroxine (T4) (Bartalena et al., 1993). In addition, TTR is the major carrier of T4 in cerebrospinal fluid, where it is present at a concentration of 0.02 mg/mL (0.29  $\mu$ M) (Aldred et al., 1995). The wild type TTR (TTRwt) binds two T4 molecules per tetramer and the binding occurs in a negative cooperative fashion, with their two binding constants differing by two orders of magnitude from one another (Andrea et al., 1980).

At acidic pH, TTR undergoes dissociation into a partially folded monomeric intermediate, which self assembles to give rise to

amorphous aggregates and/or amyloid fibrils (Colon et al., 1992; Lai et al., 1996; Kelly, 1996; Lashuel et al., 1998; Liu et al., 2000). However, the precise molecular mechanisms underlying TTR aggregation remain elusive. Several groups, however, have suggested the participation of dimers or even altered tetramers as the raw material for TTR aggregation (Foguel et al., 2003; Serag et al., 2001; Eneqvist et al., 2000).

The deposition of aggregates composed of TTRwt and variants of TTR is involved in several severe amyloid diseases, such as senile systemic amyloidosis (SSA), familial amyloid polyneuropathy (FAP), familial amyloid cardiomyopathy (FAC) and central nervous system amyloidosis (CNSA). SSA is characterized by large TTRwt amyloid deposits in the heart and affects about 10% of the world population over seventy years of age (Westermarck et al., 1990; Connors et al., 2000). More than a hundred point mutations in TTR are associated with FAP, FAC and CNSA, which are characterized by amyloid deposits mainly in the peripheral nerves, heart, and central nervous system, respectively (Connors et al., 2000; Saraiva et al., 1984; Benson, 1996; Saraiva, 2001). The V30M variant is the most prevalent form of FAP. This mutation causes a decrease in tetramer stability,

\* Corresponding author. Fax: +55 16 3373 9881.

E-mail address: [ipolikarpov@ifsc.usp.br](mailto:ipolikarpov@ifsc.usp.br) (I. Polikarpov).

---

Elsevier Editorial System(tm) for Journal of Structural Biology  
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: The binding of synthetic triiodo L-thyronine analogues to human transthyretin (hTTR):  
molecular basis of cooperative and non-cooperative ligand recognition

Article Type: Regular Article

Keywords: crystal structure; isothermal titration calorimetry; GC-1; GC-24; T3 analogues; thyroid  
hormone receptor beta selective agonist; wild type TTR; V30M mutant TTR.

Corresponding Author: Prof. Igor Polikarpov,

Corresponding Author's Institution: Universidade de Sao Paulo (USP)

First Author: Daniela Barretto B Trivella, MSc

Order of Authors: Daniela Barretto B Trivella, MSc; Mirela I Sairre, Dr; Debora Foguel, Dr; Luis Mauricio  
T R Lima, Dr; Igor Polikarpov

Abstract: In the present study we characterize the interactions of the synthetic triiodo L-thyronine analogues and thyroid hormone nuclear receptor TR $\beta$  selective agonists GC-1 and GC-24 with the wild type and V30M variants of human transthyretin. To achieve this aim we conducted in vitro TTR acid mediated aggregation and isothermal titration calorimetry experiments and determined TTR:GC-1 and TTR:GC-24 crystal structures. Our data show that both GC-1 and GC-24 bind to TTR in a non-cooperative manner and are good inhibitors of TTR aggregation, with dissociation constants for both hormone binding sites at the low micromolar concentration range. Analysis of the crystal structures of TTRwt:GC-1(24) complexes and their comparison with the TTRwt X-ray structure bound to its natural ligand thyroxine (T4) allowed, at the molecular level, to reveal the basis for the cooperative process displayed by T4 and the non-cooperative process provoked by both GC-1 and GC-24 when bound to TTR.

## Structure and function of interleukin-22 and other members of the interleukin-10 family

Daniela Barretto Barbosa Trivella ·  
José Ribamar Ferreira-Júnior · Laure Dumoutier ·  
Jean-Christophe Renault · Igor Polikarpov

Received: 12 November 2009 / Revised: 19 April 2010 / Accepted: 20 April 2010 / Published online: 8 May 2010  
© Springer Basel AG 2010

**Abstract** The IL-10 family of cytokines is comprised of IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, and IFN-ks (IL-28A, IL-28B, and IL-29). The IL-10 family members bind to shared class II cytokine receptor chains that associate in various combinations in heterodimeric complexes. Upon interleukin/receptor complex formation, these proteins switch on the Jak/STAT pathway and elicit pleiotropic biological responses whose variety sharply contrasts with their structural similarities. IL-10 family members are involved in several human diseases and health conditions and hence their structural analyses may provide valuable information to design specific therapeutic strategies. In this review, we describe the human interleukin-10 family of cytokines, focusing on their structures and functions, with particular attention given to IL-22 and IL-10. We report on the recently published structures of IL-10 cytokine family members and their complexes with cognate transmembrane and soluble receptors as well as on interleukin physiology and physiopathology.

**Keywords** Interleukin-22 · Interleukin-10 family · Cytokines · Membrane receptors

### Introduction

Immunomodulation is a primary physiological function of interleukins such as interleukin-10 (IL-10), which was originally described as a factor that inhibits IFN- $\gamma$  production by T lymphocytes [1]. Ten years after the original identification of IL-10, various genetic approaches led to the cloning of a series of genes coding for IL-10-related factors that are now collectively described as the IL-10 family, which comprises IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, and interferon-ks: IL-28A (IFN- $\kappa$ ), IL-28B (IFN- $\lambda$ ), and IL-29 (IFN- $\omega$ ). These cytokines were grouped together based on sequence alignment, structural homology, and binding to shared class II cytokine receptor chains that activate the JAK/STAT pathway [2–5]. IL-10 family members are helical proteins formed by six or seven helices and connecting loops [6–8]. Each IL-10 member can associate with the extracellular portion of two transmembrane proteins from the class II cytokine receptor, forming a heterodimeric complex. There are six different receptor chains for nine ligands, four with a long cytoplasmic tail (IL-10R1, IL-20R1, IL-22R1, and IL-28R) and two with a short cytoplasmic domain (IL-10R2 and IL-20R2), and each of the members of the IL-10 family bind to either IL-10R2 or IL-20R2 associated with a long receptor chain [9–13]. Besides these transmembrane proteins, a soluble receptor has also been described and designated IL-22 binding protein (IL-22BP) because it binds and neutralizes IL-22 *in vitro*. The type I IFN- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  also share some structural characteristics with this family [14], but they

D. B. B. Trivella · I. Polikarpov (✉)  
Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo,  
Avenida Trabalhador São Carlense 400, São Carlos,  
SP CEP 13566-590, Brazil  
e-mail: ipolikarpov@ifsc.usp.br

J. R. Ferreira-Júnior  
Escola de Artes, Ciências e Humanidades, Universidade de São  
Paulo, Avenida Arlindo Bettio, 1000, Ermelino Matarazzo,  
São Paulo, SP CEP 03828-000, Brazil

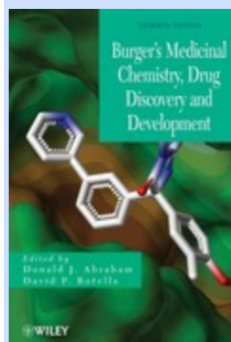
L. Dumoutier · J.-C. Renault  
Ludwig Institute for Cancer Research, Brussels Branch,  
Brussels, Belgium

L. Dumoutier · J.-C. Renault  
Experimental Medicine Unit, Christian de Duve Institute,  
Université Catholique de Louvain, Brussels, Belgium

Abraham, Donald J. / Rotella, David P.

## **Burger's Medicinal Chemistry, Drug Discovery and Development**

8 Volume Set



7. Edition - October 2010  
**ca. 1800.- Euro**  
**subscription price valid**  
**until 31. January 2011**  
 ca. 2020.- Euro

2010. 6356 Pages, 8 Volumes,  
 Hardcover  
 - Handbook/Reference Book -  
 ISBN-10: 0-470-27815-3  
 ISBN-13: 978-0-470-27815-4 -  
 John Wiley & Sons

Page 1 of 88

Burgers Medicinal Chemistry, Drug Discovery and Development

1

### **Recent Trends in Structure-Based Drug Design and Energetics**

Adriano D. Andricopulo<sup>1</sup>, Rafael V. C. Guido<sup>1</sup>, Daniela B. B. Trivella<sup>2</sup>, Igor

Polikarpov<sup>2</sup>, Andrei Leitão<sup>3</sup>, and Carlos A. Montanari<sup>4,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Química Medicinal e Computacional, Centro de Biotecnologia Molecular

Estrutural, Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, Av. Trabalhador São-Carlense 400, 13560-970, São Carlos-SP, Brazil

<sup>2</sup> Laboratório de Cristalografia, Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, Av.

Trabalhador São-Carlense 400, 13560-970, São Carlos-SP, Brazil

<sup>3</sup> Division of Biocomputing, MSC11 6145, University of New Mexico School of Medicine,

Albuquerque, NM 87131, USA

<sup>4</sup> Grupo de Estudos em Química Medicinal e Produtos Naturais - NEQUIMED-PN. Departamento

de Química e Física Molecular, Instituto de Química de São Carlos - Universidade de São Paulo, Av. Trabalhador São-Carlense 400, 13560-970, São Carlos-SP, Brazil

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



# 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](#)