

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



**DANIEL HENRIQUE DO AMARAL CORRÊA**

**MAPEAMENTO DE POTENCIAIS INTERAÇÕES ENVOLVIDAS  
NA AGREGAÇÃO E NA FORMAÇÃO DE FIBRILAS  
AMILÓIDES EM APOMIOGLOBINA.**

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
DANIEL H. DO AMARAL CORRÊA  
Carlos Ramos  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de  
Biologia para obtenção do Título de  
Doutor em Biologia Funcional e  
Molecular na área de Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique Inácio Ramos

Campinas, 2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

**C817m**

Corrêa, Daniel Henrique do Amaral

Mapeamento de potenciais interações envolvidas na agregação e na formação de fibrilas amilóides em apomioglobina / Daniel Henrique do Amaral Corrêa. – Campinas, SP: [s.n.], 2010.

Orientador: Carlos Henrique Inácio Ramos.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Apomioglobina. 2. Mutagênese sítio-dirigida. 3. Proteínas - Estabilidade. 4. Amilóide. 5. Fibrilas amilóides. I. Ramos, Carlos Henrique Inácio. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

**Título em inglês:** Mapping of potential interactions involved in apomyoglobin aggregation and amyloid fibrils formation.

**Palavras-chave em inglês:** Apomyoglobin; Site-directed mutagenesis; Proteins - Stability; Amyloid; Amyloid fibrils.

**Área de concentração:** Bioquímica.

**Titulação:** Doutor em Biologia Funcional e Molecular.

**Banca examinadora:** Carlos Henrique Inácio Ramos, Sérgio Marangoni, Jörg Kobarg, Débora Foguel, Vilma Regina Martins.

**Data da defesa:** 04/05/2010.

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 04 de Maio de 2010.

**BANCA EXAMINADORA**

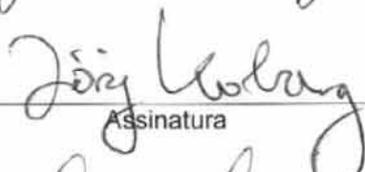
Prof. Dr. Carlos Henrique Inácio Ramos (Orientador)

  
Assinatura

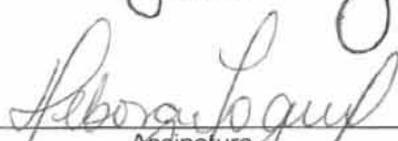
Prof. Dr. Sérgio Marangoni

  
Assinatura

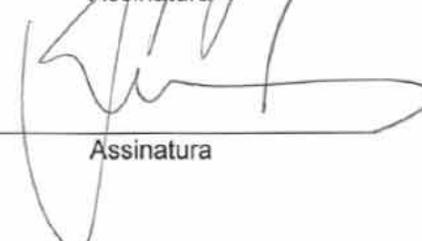
Prof. Dr. Jörg Kobarg

  
Assinatura

Profa. Dra. Débora Foguel

  
Assinatura

Profa. Dra. Vilma Regina Martins

  
Assinatura

Prof. Dr. Cláudio Chrysostomo Werneck

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Prof. Dr. Fábio Cesar Gozzo

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Matos Santoro

\_\_\_\_\_  
Assinatura

## DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins, que o conteúdo de minha tese de Doutorado, intitulada **Mapeamento de potenciais interações envolvidas na agregação e na formação de fibrilas amilóides em apomioglobina**:

não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

tem autorização da seguinte Comissão de Bioética ou Biossegurança\*: **CIBio – Comissão Interna de Biossegurança da ABTLuS**, sob Protocolo(s) nº **CHIR 01.04**.

*\* Caso a Comissão seja externa à UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*

Daniel H.A. Corrêa

Aluno: Daniel Henrique do Amaral Corrêa

Carlos Ramos

Orientador: Dr. Carlos Henrique Inácio Ramos

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

Deferido  Indeferido

Nome:

Função:

**Formulário de encaminhamento de projetos de pesquisa para análise pela CIBio - Comissão Interna de Biossegurança da ABTLuS – Associação Brasileira de Tecnologia de Luz Síncrotron**

Título do projeto: Mapeamento de potenciais interações envolvidas na agregação e na formação de fibrilas amilóides em apomioglobina

Pesquisador responsável: Carlos Ramos

Experimentador: Daniel Henrique do Amaral Corrêa

Nível do treinamento do experimentador: [ ]-Iniciação científica, [ ]-mestrado, [X]-doutorado, [ ]-doutorado direto, [ ]-pós-doutorado, [ ]-nível técnico, [ ]-outro, especifique: \_\_\_\_\_

Resumo do projeto:

Várias doenças causadas pelo envelhecimento incorreto já são conhecidas (principalmente neurodegenerativas) e, aparentemente, outras tantas estão para serem descobertas. O envelhecimento incorreto de uma proteína causa uma deposição da mesma na célula na forma de agregados ou, genericamente, fibrilas amilóides, ambos com efeito tóxico. Mesmo uma das proteínas mais estáveis e comuns conhecidas, a mioglobina, tem a capacidade de formar agregados e fibrilas amilóides, o que resultou na hipótese de que a formação destas espécies é uma propriedade de todas as proteínas. Contudo, existem diferenças entre as estruturas fibrilares que são formadas por proteínas com seqüências diferentes, e ainda pouco se conhece sobre as interações na cadeia polipeptídica que favorecem a formação de fibrilas amilóides. Nossa proposta é caracterizar, por diversos parâmetros físico-químicos, a propensão de formação de amilóides em mutantes de mioglobina. Com os resultados obtidos poderemos mapear as interações que favorecem a agregação e amiloidogênese e compreender seus mecanismos de formação, o que é de enorme interesse médico e biotecnológico.

A CIBio analisou este projeto em reunião realizada no dia: 28.08.2007.

Parecer final: [X]-projeto aprovado, [ ]-projeto recusado, [ ]-projeto com deficiências, favor comentários abaixo:

\_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

Presidente de CIBio - ABTLuS *Jörg Kobarg*  
 Prof. Dr. Jörg Kobarg  
*Celso Benedetti*

Membro da CIBio - ABTLuS  
 Prof. Dr. Celso Eduardo Benedetti  
*Nilson Ivo Tonin Zanchin*

Membro da CIBio - ABTLuS  
 Prof. Dr. Nilson Ivo Tonin Zanchin

Aos meus pais, João Batista Corrêa Filho e Carmem Sílvia Tucci do Amaral Corrêa, por serem a base de tudo. Essenciais.

Aos meus irmãos, Fábio Eduardo do Amaral Corrêa e Luiz Gustavo do Amaral Corrêa, por serem incondicionalmente meus melhores amigos e companheiros.

Ao meu filho, Otávio Gaspar do Amaral Corrêa, por ser fonte inesgotável de alegria, força e vontade que me impulsiona para ser cada vez melhor.

A Fernanda Gaspar do Amaral, pela perseverança e amor em ter construído comigo uma história perpetuada através da nossa amizade, carinho, respeito e de nosso bem maior, nosso filho Otávio.

Dedico

## AGRADECIMENTOS

**A DEUS**, causa primária de todas as coisas, inteligência e bondade supremas. Obrigado Senhor, pela vida e por ter me conduzido por um caminho de sabedoria contagiante e desafiador. Aos irmãos de luz, agradeço pelo auxílio e amor dispensados para que eu permanecesse no caminho do saber.

Aos meus pais. Pelo amor incondicional, pelos ensinamentos transmitidos que são os alicerces da minha vida, e pelos princípios que me moldaram na pessoa que sou hoje. Pai, amado amigo, companheiro, tocável homem, expressão de força, trabalho e dedicação pelo bem estar da família. Mãe, amada amiga, companheira de toda caminhada, nos acertos e nos tropeços, exemplo de amor e zelo. Amados, palavras são poucas para agradecer, para tanto, por escrito, deixo singelamente expresso o maior de todos os sentimentos por vocês ... **Amo vocês!**

Aos meus irmãos. Amigos e companheiros, junto de nossos pais, família adorável que tenho a alegria de possuir e de saber que para o que for preciso, eles, meus queridos irmãos, estarão sempre ao meu lado, fisicamente ou em pensamento. **Amo vocês!**

Aos demais familiares. Abençoado sou por tantas pessoas maravilhosas na minha vida. Minhas tias, meus tios, meus primos e primas, minhas cunhadas Vívian e Patrícia (adoráveis), meus sobrinhos e sobrinhas (deliciosamente muitos!), minhas queridas avós Antonieta e Zelina (octagenárias lindas), obrigado por toda torcida meus amados e amadas.

Ao Otávio. Filho amado, razão maior para o meu crescimento e fortaleza de amor na qual encontro o melhor abraço que posso desejar. Obrigado filho pelo seu carinho pelo “Papás”, por esse amor tão nítido e expressivo, pela nossa relação maravilhosa, relação que me permite alcançar dia-a-dia aquilo que há tempos William Shakesperare tão certamente exclamou ... “É um homem sábio aquele que conhece a seu próprio filho”. **Amo você!**

A Fernanda. Querida, especial e admirável ser humano. Pelo amor, conselhos, pela paciência, pela compreensão, por acreditar e torcer sempre por mim nesta e outras tarefas. Pequena, obrigado por nós juntos e pela nossa melhor parte... nosso filho amado. **Respeito, carinho e amor por você, sempre!**

A Bete e Jorge (*in memoriam*). Queridos, admiráveis e amáveis pais da Fernanda que muito fizeram por mim, por ela e pelo Otávio. Pacientes e resignadamente devotados ao bem estar dos que amam, dedicados e zelosos para com os filhos e a família, qualidades essas, as quais considero exemplos a serem seguidos. **Obrigado!**

Ao pessoal maravilhoso da república 1187. Muito mais que simples colegas de morada, uma família temporária com a qual foi extremamente prazeroso e edificante ter convivido, eis as “figuras”: Leandro Alves (metódico, atrapalhado e amigão, olha que combinação), Rodrigo Furlan (o galã da casa), Rodrigo Vezula Pirovani (tá para nascer quem dorme mais que ele), Carol Ligiero (da paz), Bárbara (a mais quieta que já ví), Carlos Nascimento (serenidade de pessoa), Darlene Felix (loirona figuraça) e os especiais Mendelssolm Kister de Pietre e Luiz Carlos Pimentel Almeida, seres maravilhosos, parceiros, sinceros, dedicados, nos quais confio a minha vida e respeitosa e orgulho de poder considerá-los como meus “irmãos de coração”. **Obrigado a vocês pelo carinho, apoio e conselhos no dia-a-dia.**

Aos amigos da faculdade. Pelos quatro anos de gratificante convívio, os quais agradeço imensamente, não os nomearei, eles o sabem, mas deixo um obrigado em particular para uma grande amiga em especial que já partiu para o outro plano, e que foi um exemplo unânime de gentileza, amor e simplicidade para toda a turma de Biomedicina 2002 UNIARARAS... à querida Michelle Servais Rubin, ruivinha, que DEUS a ilumine sempre e obrigado pela sua amizade e amor!

Ao Prof. Dr. Sérgio Ferreira da UFRJ pelo fornecimento da linhagem celular N2A. A Profa. Dra. Débora Foguel da UFRJ e ao Prof. Emeritus Dr. Robert L. Baldwin da Universidade Stanford pelas discussões do projeto.

Aos professores. São muitos para serem nomeados, personagens apaixonantes que não só me ensinaram, muito além, me proporcionaram modos através de problemas e situações para que eu mesmo viesse a descobrir as coisas. Gostaria, entretanto, de nomear alguns marcantes: Dr. Armindo A. Alves, por ser um dos responsáveis da minha vinda a UNICAMP (valeu “Armindinho”); Dra. Sônia V.P.M.M. Fernandes (por ter tornado a bioquímica ainda mais apaixonante); queridos Dra. Norma Geresa S. Motta, Dr. Luiz Carlos Picca, Prof. Carlos R.E. Grignoli, Prof. Acássio A. Pigoso, Dra. Míriam M.O. Levada (saudades); Dra. Nora Marcela H. Quíros e Dra. Patrícia S. Melo (Mestrado); Dr. Sérgio Marangoni, Dr. Fábio C. Gozzo e Dr. Carlos Francisco S. Bonafé (pelas valiosas críticas e sugestões na banca prévia). São muitos, enfim, muitíssimo obrigado a todos que me engrandeceram intelectualmente.

Ao Prof. Dr. Carlos Henrique Inácio Ramos. Academicamente agradeço pela confiança e pela oportunidade de realizar meu Doutorado com este projeto, pelo ensino, muita paciência, dedicação, sugestões pertinentes e pela correção criteriosa deste manuscrito. Pessoalmente, agradeço pelos conselhos, pelas conversas descontraídas, pelo senso de humor e, mesmo que poucas vezes, ter confiado em dividir comigo as ansiedades de ser pai de primeira viagem, condição na qual sou 6 anos mais experiente. Aproveitando o ensejo, parabéns pela chegada do segundo filho. Prezado Carlos, grandes professores, orientadores e mestres, têm pouca história externa para gravar. A vida, as virtudes e os exemplos desses são internalizados na vida de seus aprendizes. Esses homens são os pilares da estrutura íntima dos centros de ensino. Eles são mais essenciais do que o alicerce, as pedras, tijolos, vergalhões ou telhas que compõem o centro físico, o ambiente de ensino. Eles, não importa o tempo decorrido após suas ações diretas ou indiretas, continuarão a ser uma força carinhosa e um poder revelador na vida de seus aprendizes. Portanto, a um grande professor e respeitável ser humano, meu muito obrigado!

Às instituições de fomento FIRCA-NIH, CNPq, CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro, em especial à **FAPESP** pela concessão da minha bolsa de estudo.

A todos os técnicos, alunos de iniciação científica e pós-graduação do grupo sob supervisão do Prof. Dr. Carlos Ramos: os veteranos Dr. Júlio César Borges (simpaticíssimo e dedicado profissional), Dra. Letícia Khater (alegre e carinhosa amiga), Dra. Cristina Braga de Brito Lira (Tininha, encanto de pessoa), Dra. Ana Olívia Tiroli Cepeda (discreta e admirável profissional) e Dr. Thiago Carlos Cagliari (personagem histórica e divertida); os contemporâneos Yuri de Abreu Mendonça (“Fala rapá!”, “Não, qué não!”, raptor de porquinho inocente, mas é gente finíssima), incomparável e decidida Lisandra Marques Gava (“...nossa Daniel!”, “Falo mesmo!”), carismática e querida Viviane Cristina Heizen da Silva (Vinivinitiz!, “Oi Dãn-Dãn!”, “Vãmo, vãmo, vãmo”), divertida e admirável Dra. Melissa Regina Fessel (“...loucamente...”, “...queridoso...”), simpaticíssima e meiga Isabel Cristina Rodriguez Milan (“Danielito!”, “Danielote!”), reservado e dedicado Thiago Vargas Serafim (“Sabe o que eu estava pensando?”), adorável e incrível Danieli Cristina Gonçalves (Danisguela!, “Migucho!”), divertida Mayara Roncaglia dos Santos (“Ah gente!”, “Num tive culpa!”), delicada pink girl Ana Paula Rossi (“Oi gente!”, “Vocês estão bem?!”), animadíssima e contagiante Karina Elisa Gui (“... dar um gás na proteína!”, culpa do IPTG), moreníssima e divertida Gilce Oliveira Lopes (“Olá!”, “Também acho!”), eficiente e direta Esther Cordeiro (“Tchau gente!”, “Dá para desconectar meu MP3?”), esperta e divertida Giulianna Bosco (“Fala mister Dãn!”, “Ah, fala sério!”), gentil e atencioso Douglas Henrique de Sousa (“Fala teacher!”, “Ai ai ai viu!”), admirável e questionador Wei Kuo Chun (魏國峻) (“Daniel, posso fazer uma pergunta?”, “Mas como você sabe isso?”) e a amável e querida notável, minha pupila e pequena adorável, Ana Carla Gaiotto (“Oi Dãnzinho!”, “Ai ai ai!”, “É a treva!”). A vocês, grandes amigos, incríveis colegas, meu muito obrigado pela convivência e pelas trocas de experiências.

**Aos integrantes da banca examinadora:** Dr. Sérgio Marangoni, Dr. Jörg Kobarg, Dra. Débora Foguel e Dra. Vilma Regina Martins, grato pela atenção e pelas valiosas críticas para o aperfeiçoamento deste manuscrito. Aos membros suplentes: Dr. Cláudio Chrysostomo Werneck, Dr. Fábio Cesar Gozzo e Dr. Marcelo Matos Santoro, grato pela atenção e disponibilidade.

Ao meu grande amigo de infância, Renato Lima, vizinho “irmão” e companheiro das inúmeras peripécias e brincadeiras de crianças realmente felizes que fomos.

**Obrigado querido amigo!**

Aos membros da Pós-Graduação do departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia, em especial à coordenadora da Comissão de Pós-Graduação em Biologia Funcional e Molecular, Profa. Dra. Carmem Veríssima Ferreira, e à secretária Andréia Aparecida Vigilato.

A ABTLuS pelas ótimas estruturas laboratoriais do LNLS e especificamente do LNBio, que permitiu o uso de suas instalações e equipamentos. A todos os técnicos que auxiliaram na realização dos trabalhos, em especial à admirável e sempre dedicada Veruska Mazon Soares (queridíssima), que sempre zelou carinhosamente pelo grupo LEC, do qual tive a felicidade de fazer parte. Nomeio ainda os demais técnicos, como: Adriana C. Alves do LPP; Fábio A. Scharbele, Natasha S. D. Silva, Angelita S. Miranda e Renata R. Oliveira do LEC; Givanil L. Garrido, Maria Eugênia R. Camargo, Tereza C. L. Silva e Zildene G. Corrêa do LBM. Ao pessoal da limpeza, secretariado, aos simpaticísimos vigias (pelas conversas descontraídas em algumas madrugadas adentro) e aos demais setores. Grande grupo, obrigado pessoal!

À UNICAMP, em especial aos professores da Pós-Graduação e às instalações e laboratórios do Instituto de Química. Ao laboratório de Dicroísmo Circular sob responsabilidade de Daniel Razzo, Laboratório de Espectrofotometria sob responsabilidade de Cláudia Martelli, Laboratório de Bioquímica de Proteínas sob responsabilidade do Prof. Dr. Carlos Ramos e do Laboratório Institucional de Manipulação de OGM (LimOGeM) sob a coordenação da CIBio-IQ.

Aos inúmeros colegas de outros grupos: Gabriela Meirelles, Daniel Lanza, Daniel Trindade, Gustavo Bressan, Alexandre Quaresma, Kaliandra Gonçalves, Marcel Nakahira, Marcos Alborguetti, Carlos Paier, entre outros. Obrigado a todos, pela amizade, atenção e pelo agradável convívio.

À Profa. Cleuza Terezinha Mistro do Amaral, minha paciente e dedicada tia, a quem sou imensamente grato pelo trabalho de revisão ortográfica.

Por fim, à exuberante e contagiante ciência Bioquímica, ciência que estuda os processos químicos que ocorrem nos seres vivos, em essência, no que tange as estruturas e funções dos componentes constituintes das células. Como ciência ligada a vida, a Bioquímica nos permite vislumbrar a perfeição de uma das criações de DEUS. À Bioquímica, por ser uma grande ciência, pois como já disse Louis Pasteur ... “Um pouco de ciência nos afasta de DEUS. Muito, nos aproxima”.

“É impossível para um homem aprender aquilo que ele acha que já sabe”

**Epíteto (50 – 138)**

“O conhecimento é o processo de acumular dados; a sabedoria reside na sua simplificação”

**Martin H Fischer (1879 – 1962)**

“Qualquer um que pretenda ter, mais que uma compreensão extremamente superficial da vida, em todas as suas diversas manifestações, necessita da bioquímica.”

**Hans Adolf Krebs (1900 – 1981)**

## RESUMO

CORRÊA, D.H.A. **Mapeamento de potenciais interações envolvidas na agregação e formação de fibrilas amilóides em apomioglobina.** 2010. 198 f. Tese (Doutorado em Biologia Funcional e Molecular – Bioquímica) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2010.

Proteínas enoveladas incorretamente, com frequência levam à formação de agregados fibrilares contendo extensas estruturas em folha- $\beta$ , comumente denominadas de fibrilas amilóides. A hipótese acerca da capacidade de formar fibrilas amilóides com estruturas idênticas e ricas em estruturas beta, ser uma propriedade genérica de toda proteína, apoia-se no fato de até mesmo proteínas sem conexão com doenças, como a mioglobina, serem capazes de gerar estruturas fibrilares. Embora várias proteínas sejam intrinsecamente desordenadas, muitas são apropriadamente empacotadas, podendo se desenovelar totalmente ou parcialmente de maneira a expor regiões propensas à agregação, que podem converter o polipeptídeo em fibrilas amilóides. De fato, vários estudos sugerem que intermediários parcialmente enovelados estão envolvidos na fibrilogênese. A apomioglobina (apoMb) de baleia do espermacete é uma proteína bem caracterizada, que forma um intermediário durante o desenovelamento do estado nativo ou após a diluição do estado desenovelado em tampão de enovelamento. A mioglobina é uma proteína altamente solúvel, cujas propriedades do estado nativo não sugerem uma predisposição dessa em formar fibrilas amilóides, corroborado pela organização de sua seqüência de resíduos de aminoácidos em hélices- $\alpha$  bem definidas sem elementos de estrutura em folha- $\beta$ . Contudo, até a mioglobina forma fibrilas amilóides em certas condições, sugerindo que a capacidade de formar fibrilas seja uma característica comum de toda proteína e, portanto, não estando relacionada a uma estrutura primária específica. Neste projeto, visamos mapear as potenciais interações envolvidas na agregação e formação de fibrilas amilóides em apomioglobinas. Para tanto, apresentamos aqui os estudos dos efeitos de 19 mutantes de apoMb na cinética amiloidogênica da mesma. A indução de fibrilas amilóides foi realizada através da incubação das apoMbs em tampão borato de sódio 50 mM, pH 9 e aquecidas a 65°C. O processo de agregação foi acompanhado por

medidas da emissão de fluorescência de Tioflavina T (ThT) e espectroscopia de dicroísmo circular (CD). Outras propriedades morfo-físicoquímicas das amilóides de apoMb foram também estudadas: energia de ativação da formação de fibrilas, organização estrutural, citotoxicidade, efeito de semeadura, desmontagem por uréia. Nossos resultados mostram que alguns mutantes (7 no total) afetaram a cinética de formação das amilóides, e surpreendentemente, esses efeitos correlacionam-se bem com o efeito que a mutação tem sobre a estabilidade do estado nativo, mas não com o efeito sobre a estabilidade do estado intermediário do enovelamento. As estruturas globais (investigadas por difração de raios-X) das fibrilas formadas pelas apomioglobinas selvagem e mutantes mostram-se indistinguíveis. Experimentos de citotoxicidade, utilizando um modelo de células neuronais N2A (neuroblastoma de camundongo), e semeadura, confirmam que as diferentes formas de agregados das proteínas são capazes de diminuir a viabilidade celular e de acelerar a formação das fibrilas. Generalizando, nossos resultados suportam a hipótese de que, embora o desenovelamento parcial preceda a formação de fibrilas em apomioglobina, a formação do intermediário de enovelamento não parece ser um passo obrigatório no processo e assim, o enovelamento e a formação de agregados/fibrilas são aparentemente distintos para essa proteína.

Palavras-chave: Apomioglobina. Fibrilas amilóides. Agregação amilóide. Mutação sítio-dirigida. Enovelamento protéico. Estabilidade protéica.

## ABSTRACT

CORRÊA, D.H.A. **Mapping of potential interactions involved in apomyoglobin aggregation and amyloid fibrils formation.** 2010. 198 p. Doctorate Thesis (Functional and Molecular Biology – Biochemistry) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2010.

Protein misfolding usually leads to the formation of fibrillar aggregates with extensive  $\beta$ -sheet structure, commonly termed amyloid fibrils. The hypothesis that the ability to form ordered  $\beta$ -rich amyloid fibers with identical structures is a generic property of proteins is supported by the fact that even proteins with no connection to disease, such as myoglobin, are able to generate fibrillar structures. Although several proteins are intrinsically disordered, many are properly packed and should unfold totally or partially exposing aggregation-prone regions that can convert the polypeptide into amyloid fibrils. Actually, several studies suggest that partially folded intermediates are involved in fibrillogenesis. Sperm whale apomyoglobin (apoMb) is a well-characterized protein that forms an intermediate after either unfolding from the native state or dilution of the unfolded protein in a folding buffer. Mb is a highly soluble protein whose native state properties do not suggest a predisposition to form amyloid fibrils, corroborated by its amino acid residues sequence organization in well-defined  $\alpha$ -helices with no  $\beta$ -sheet elements. However, even Mb forms amyloid fibrils under certain conditions, suggesting that the ability to form fibrils is a common feature of all proteins and is not related to a specific primary structure. In this work, we aim to map potential interactions involved in apomyoglobin aggregation and fibrils formation. To such aim, we present here the studies of effects on amyloidogenic kinetics of 19 apoMb mutants. The induction of amyloid fibrils was performed by incubating apoMb proteins on 50 mM sodium borate buffer at pH 9 and heat to 65°C. The aggregation process was monitored both by thioflavin T (ThT) emitted fluorescence and circular dichroism (CD) spectroscopy measurements. Other morpho-physicochemical properties of apoMb amyloids were also studied: activation energy of fibril formation, structure organization, cytotoxicity, seeding effect, disassembly by urea. Our results show that some mutants (7 in total) affect the amyloid formation kinetics, and surprisingly, these effects are well correlated with the

effect that the mutation has on the stability of the native state but not with the effect on the stability of the folding intermediate. The overall structures, probed by X-ray diffraction, of fibers formed by mutants and wild-type apomyoglobin are indistinguishable. Cytotoxicity experiments, using a neuronal cell line model N2A (murine neuroblastoma), and seeding experiments, confirm that different aggregated forms of proteins are capable of decreasing the cell viability and to speed up the formation of fibrils. Generally, our results support the hypothesis that although partially unfolding precedes fibril formation in apomyoglobin, formation of the folding intermediate is not an obligatory step in the process and thus folding and aggregation/fibril formation are apparently distinct in this protein.

Key words: Apomyoglobin. Amyloid fibrils. Amyloid aggregation. Site-directed mutagenesis. Protein folding. Protein stability.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Possíveis orientações de estruturas em hélice.....	32
Figura 2. Ligações de hidrogênio (mostradas como flexas) típicas em diferentes estruturas em hélice.....	32
Figura 3. Superfície de uma folha- $\beta$ pregueada.....	33
Figura 4. Sentido N-term para C-term das cadeias e posição das ligações de hidrogênio em folhas- $\beta$ paralela ( $\beta\uparrow\uparrow$ ), antiparalela ( $\beta\downarrow\uparrow$ ) e mista ( $\beta\uparrow\uparrow\downarrow$ ).....	34
Figura 5. (a) Torção de uma folha- $\beta$ . As fitas- $\beta$ são mostradas como flechas e as ligações de hidrogênio em linhas azuis. (b) Visão axial de uma volta da fita- $\beta$ .....	34
Figura 6. Modelo estratificado de um diagrama de energia-entropia do enovelamento de uma proteína.....	40
Figura 7. Modelo estrutural proposto de uma fibrila amilóide.....	48
Figura 8. Modelo da estrutura tridimensional de mioglobina de baleia do espermacete.....	50
Figura 9. Grupamento heme presente na mioglobina, hemoglobina, citocromos e outras heme proteínas.....	51
Figura 10. Esquema da estrutura primária e secundária da mioglobina selvagem de baleia ( <i>Physeter catodon</i> ).....	56
Figura 11. Ilustração do sistema pET para expressão de proteínas recombinantes.....	60
Figura 12. Análise por SDS-PAGE (15%) do teste de indução com 0,4 mmol/L de IPTG do clone pET-T(7)H24V/H119F.....	96
Figura 13. Análise por SDS-PAGE (15%) do processo de lise de <i>E. coli</i> BL21(DE3) após expressão heteróloga de H24V/H119F induzida com IPTG 0,4 mmol/L por 4 h a 42°C.....	97
Figura 14. Perfil cromatográfico da purificação de H24V/H119F por troca aniônica.....	98
Figura 15. Perfil cromatográfico da purificação de H24V/H119F por troca catiônica.....	99
Figura 16. Análise por SDS-PAGE do processo de purificação das sHsps de cana-de-açúcar e Hsp40 (DjA1) humana.....	101
Figura 17. Perfil cinético da formação de fibrilas amilóides monitorado pela intensidade temporal da fluorescência de ThT a 482 nm.....	103
Figura 18. Variação da constante de dissociação ( $K_{dis}$ ) aparente de ThT em função do tempo de indução amiloidogênica.....	106
Figura 19. Fluorescência a 492 nm de bis-ANS em função do tempo de indução amiloidogênica.....	107

Figura 20. Espectros de CD no UV-distante. Apomioglobinas selvagem (WT) e mutantes de interações hidrofóbicas antes (linhas contínuas) e depois (linhas pontilhadas) do processo amiloidogênico.....	109
Figura 21. Espectros de CD no UV-distante. Apomioglobinas selvagem (WT) e mutantes de interações eletrostáticas e do intermediário da via de enovelamento de apomioglobina antes (linhas contínuas) e depois (linhas pontilhadas) do processo amiloidogênico.....	110
Figura 22. Espectros de CD no UV-distante. Apomioglobinas selvagem (WT) e mutantes W7F/W14F e de deleção, permutação e propensão de hélice- $\alpha$ antes (linhas contínuas) e depois (linhas pontilhadas) do processo amiloidogênico.....	111
Figura 23. Desenovelamento químico por uréia da apoMb selvagem e dos mutantes H36Q, H24V/H119F e W7F/W14F em pH 4,2 a 4°C monitorado por dicroísmo circular a 222 nm.....	113
Figura 24. Desenovelamento químico por uréia da apoMb selvagem e dos mutantes H36Q, H24V/H119F e W7F/W14F em pH 7,8 a 4°C monitorado por dicroísmo circular a 222 nm.....	115
Figura 25. Desenovelamento ácido de apoMb selvagem (WT) e dos mutantes H36Q, H24V/H119F e W7F/W14F a 4°C monitorado por dicroísmo circular a 222 nm.....	116
Figura 26. Efeito de semeadura dos agregados pré-fibrilares de apomioglobinas selvagem e mutantes H36Q, H24V/H119F e W7F/W14F.....	118
Figura 27. Efeito de semeadura dos agregados pré-fibrilares dos mutantes V10F/M131F, apoMb <sub>1-123</sub> , C_GHAB e B_GHA.....	119
Figura 28. Plot de Arrhenius da formação de fibrila amilóide monitorada por fluorescência de ThT e dicroísmo circular a 216 nm.....	121
Figura 29. Padrão de difração de raios-X de fibrila amilóide da proteína selvagem WT (esquerda) e mutante W7F/W14F (direita).....	124
Figura 30. Padrão de difração de raios-X de fibrila amilóide dos mutantes H36Q (esquerda) e H24V/H119F (direita).....	125
Figura 31. Viabilidade celular determinada pelo teste de redução do MTT.....	126
Figura 32. Viabilidade celular determinada pelo teste de redução do MTT.....	127
Figura 33. Viabilidade celular determinada pelo teste de redução do MTT.....	128
Figura 34. Viabilidade celular determinada pelo teste de redução do MTT.....	129
Figura 35. Viabilidade celular determinada pelo teste de redução do MTT.....	130
Figura 36. Viabilidade celular determinada pelo teste de redução do MTT.....	131
Figura 37. Viabilidade celular determinada pelo teste de redução do MTT.....	132
Figura 38. Viabilidade celular determinada pelo teste de redução do MTT.....	133
Figura 39. Dissociação induzida por uréia das fibrilas amilóides em pH 6 e 7.....	136

<b>Figura 40. Efeito de BSA na formação de fibrila amilóide da apomioglobina W7F/W14F.....</b>	<b>137</b>
<b>Figura 41. Atividade chaperona de Hsp40 (DjA1) humana na prevenção da formação de fibrila amilóide da apomioglobina W7F/W14F.....</b>	<b>139</b>
<b>Figura 42. Atividade chaperona de sHsp17 de cana-de-açúcar na prevenção da formação de fibrila amilóide da apomioglobina W7F/W14F.....</b>	<b>140</b>
<b>Figura 43. Atividade chaperona de sHsp18 de cana-de-açúcar na prevenção da formação de fibrila amilóide da apomioglobina W7F/W14F.....</b>	<b>141</b>
<b>Figura 44. Representação esquemática de um motivo <math>\beta</math>-cruzado.....</b>	<b>150</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Cadeias laterais dos 20 resíduos de aminoácidos (projetados a partir dos átomos de C <sup>α</sup> da cadeia principal).....	30
Tabela 2. Correlação genótipo-fenótipo de proteínas humanas relacionadas com amiloidoses.....	46
Tabela 3. Racionalidade dos mutantes e prévio conhecimento de seus efeitos na estabilidade da apomioglobina.....	57
Tabela 4. Localização das mutações sítio-dirigidas na estrutura da mioglobina (Figura 10, pág. 56).....	58
Tabela 5. Coeficientes de absorbância molar do Triptofano (T <sub>rp</sub> ), Tirosina (T <sub>yr</sub> ) e Cistina (C <sub>ys</sub> ) em GdnHCl 6 M.....	79
Tabela 6. Erro médio embutido nas predições de estruturas secundárias de acordo com a faixa de leitura.....	81
Tabela 7. Rendimento final (mg/L de indução) das apomioglobinas.....	100
Tabela 8. Parâmetros do ajuste exponencial (linhas contínuas da Figura 17, pág. 103) da cinética de formação de fibrilas amilóides, utilizando a Equação 5 descrita no item 3.2.11, pág. 81.....	104
Tabela 9. Predição – antes e após 15 dias de indução amiloidogênica – através do programa CDNN, das estruturas secundárias do tipo hélice-α e folhas-β das apomioglobinas mostradas na Figura 22, pág. 111. Faixa de predição entre 200-260 nm.....	112
Tabela 10. Valores de C <sub>m</sub> (M), ΔG <sub>H<sub>2</sub>O</sub> (kCal/mol) e m (kCal/mol.M) do desenovelamento químico por uréia em pH 4,2 (Figura 23, pág. anterior). Valores retornados através da extrapolação linear dos dados pela Equação 19 (item 3.2.16, pág. 86).....	114
Tabela 11. Taxa de formação de fibrilas amilóides (ν) aferida através do ajuste exponencial dos dados apresentados nas Figuras 26 e 27 (págs. 118 e 119, respectivamente), e variação da mesma antes e após semeadura de 1% e 5%.....	120
Tabela 12. Energia de ativação (kJ.mol <sup>-1</sup> ) do processo de formação de fibrila amilóide monitorado por fluorescência de ThT e dicroísmo circular a 216 nm mostrados na Figura 28, pág. 121.....	122
Tabela 13. Energia de ativação (kJ.mol <sup>-1</sup> ) do processo de formação de fibrila amilóide monitorado por fluorescência de ThT e dicroísmo circular a 216 nm dos mutantes V10F/M131F, apoMb <sub>1-123</sub> , C_GHAB e B_GHA.....	122
Tabela 14. Comparação da viabilidade celular de células N2A em reduzir MTT. Valores expressos em porcentagem de células viáveis após incubação com as diferentes formas agregadas das apomioglobinas selvagem (WT) e mutantes W7F/W14F, H24V/H119F, H36Q, V10F/M131F, apoMb <sub>1-123</sub> , C_GHAB e B_GHA.....	134

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\epsilon$ : coeficiente de absorvância molar ( $M^{-1}.cm^{-1}$ )

$\Delta G$ : variação da energia livre de Gibbs

$[\theta]$ : elipticidade molar residual

$^{\circ}C$ : graus Celsius - unidade de temperatura

$\text{Å}$ : ångström ( $1 \times 10^{-10}$  metros)

**ATP**: adenosina 5' tri-fosfato

**bis-ANS**: 8-dianilino naftaleno sulfonato de potássio

**BSA**: albumina de soro bovino (do inglês **Bovine Serum Albumin**)

**CD**: dicroísmo circular (do inglês **Circular Dichroism**)

**cDNA**: DNA complementar (do inglês **complementary DNA**)

**CM**: carboximetil

**DEAE**: dietilaminoetil celulose

**DMEM**: meio essencial de Eagle modificado por Dulbecco (do inglês **Dulbecco's Modified Eagle Medium**)

**DMSO**: dimetilsulfóxido

**DNA**: sigla do inglês para **DeoxyriboNucleic Acid** (ácido desoxirribonucleico)

**DTT**: ditioneitol

**EMR**: elipticidade molar residual

**FPLC**: cromatografia líquida de rápida execução (do inglês **Fast Performance Liquid Chromatography**)

**g**: gravidade ( $9,81 \text{ m/s}^2$ )

**GdnHCl**: cloreto de guanidina (do inglês **Guanidine Hydrochloride**)

**Hsp**: proteína de choque térmico (do inglês **Heat shock protein**)

**Hsp100**: proteína de choque térmico de 100 kDa

**Hsp40**: proteína de choque térmico de 40 kDa

**Hsp60**: proteína de choque térmico de 60 kDa

**Hsp70**: proteína de choque térmico de 70 kDa

**Hsp90**: proteína de choque térmico de 90 kDa

**IPTG:** isopropiltiol- $\beta$ -D-galactosídeo

**$k_{app}$ :** constante aparente

**kDa:** quiloDalton ( $1,66 \times 10^{-21}$  g)

**$k_{dis}$ :** constante de dissociação

**l:** comprimento do caminho óptico

**LB:** Luria-Bertani

**ln:** logaritmo natural ou neperiano

**LNLS:** Laboratório Nacional de Luz Síncrotron

**MM:** massa molecular

**MTT:** brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

**n:** número de resíduos de aminoácidos da proteína

**N2A:** cultura de neuroblastoma murino

**nm:** nanômetro ( $10^{-9}$  metros)

**pH:** potencial hidrogeniônico

**pI:** ponto isoelétrico

**RMN:** ressonância magnética nuclear

**RNA:** ácido ribonucléico (do inglês **Ribonucleic acid**)

**RNA<sub>m</sub>:** RNA mensageiro

**s:** segundos

**SDS:** duodecil-sulfato de sódio (do inglês **Sodium Duodecyl-Sulphate**)

**SDS-PAGE:** eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS (do inglês **Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis**)

**sHsp:** proteína de choque-térmico da família das small (do inglês **small Heat shock protein**)

**SsHsp17:** proteína de 17,2 kDa da família das small de cana-de-açúcar

**SsHsp18:** proteína de 17,9 kDa da família das small de cana-de-açúcar

**T:** temperatura

**ThT:** tioflavina T

**UV:** ultravioleta

**v:v:** volume: volume

**VC:** volume de coluna

**Vis:** visível

**WT:** selvagem (do inglês **Wild-Type**)

$\chi^2$ : qui quadrado

$\lambda$ : comprimento de onda

$\theta$ : elipticidade

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>29</b>
<b>1.1 Proteínas</b> .....	<b>29</b>
<b>1.2 Estrutura e enovelamento de proteínas</b> .....	<b>31</b>
<b>1.3 Desnaturação, desenovelamento e agregação protéica</b> .....	<b>41</b>
<b>1.3.1 Chaperonas moleculares e agregação protéica</b> .....	<b>42</b>
<b>1.3.1.1 Família das Hsp40s</b> .....	<b>43</b>
<b>1.3.1.2 Small heat shock proteins (sHsps)</b> .....	<b>44</b>
<b>1.4 Amilóide, amiloidoses e fibrilas amilóides</b> .....	<b>45</b>
<b>1.5 Mioglobina</b> .....	<b>49</b>
<b>1.6 Mioglobina e fibrilas amilóides</b> .....	<b>53</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>55</b>
<b>3 MATERIAIS E METODOLOGIAS</b> .....	<b>56</b>
<b>3.1 Materiais</b> .....	<b>56</b>
<b>3.1.1 Mutantes de apomioglobina</b> .....	<b>56</b>
<b>3.1.2 Vetor de expressão</b> .....	<b>59</b>
<b>3.1.3 Linhagens celulares, meios de cultura e soluções diversas</b> .....	<b>60</b>
<b>3.1.3.1 Linhagens de <i>Escherichia coli</i></b> .....	<b>60</b>
<b>3.1.3.2 Células de mamíferos</b> .....	<b>61</b>
<b>3.1.3.3 Meio de cultura bacteriano</b> .....	<b>62</b>
<b>3.1.3.4 Meio de cultura para as células N2A</b> .....	<b>62</b>
<b>3.1.3.5 Tioflavina T (ThT)</b> .....	<b>63</b>
<b>3.1.3.6 bis-8-anilinoftaleno-sulfonato (Bis-ANS)</b> .....	<b>64</b>
<b>3.1.3.7 Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT)</b> .....	<b>64</b>
<b>3.1.3.8 Solução de paralização para o ensaio de semeadura</b> .....	<b>64</b>
<b>3.1.3.9 Ácido benzidinodiazó-bis-1-naftilamina-4-sulfônico (Vermelho de Congo)</b> .....	<b>64</b>
<b>3.2 Metodologias</b> .....	<b>65</b>
<b>3.2.1 Técnicas espectroscópicas utilizadas no estudo de estrutura de proteínas</b> .....	<b>65</b>

3.2.1.1 Dicroísmo circular.....	65
3.2.1.2 Fluorescência.....	65
3.2.1.3 Difração de raios-X.....	66
3.2.2 Preparação de cepas de <i>E. coli</i> eletrocompetentes.....	68
3.2.3 Preparação de cepas de <i>E. coli</i> para transformação por choque térmico.....	68
3.2.4 Transformação de bactérias competentes com vetor de expressão.....	69
3.2.4.1 Transformação por eletroporação.....	69
3.2.4.2 Transformação por choque térmico.....	70
3.2.5 Expressão de proteínas.....	71
3.2.6 Lise das bactérias.....	72
3.2.6.1 Lise das bactérias contendo as apomioglobinas recombinantes.....	72
3.2.6.1.1 Lise dos corpos de inclusão e diálise preparatória.....	72
3.2.6.2 Lise das bactérias contendo sHsps (17 e 18) de cana-de-açúcar e Hsp40 (DjA1) humana.....	73
3.2.7 Purificação das proteínas recombinantes.....	74
3.2.7.1 Purificação das apomioglobinas.....	74
3.2.7.1.1 Cromatografia de troca aniônica.....	74
3.2.7.1.2 Cromatografia de troca catiônica.....	75
3.2.7.2 Purificação das sHsps (17 e 18) de cana-de-açúcar e Hsp (DjA1) humana.....	76
3.2.8 Processamento da proteínas purificadas.....	77
3.2.8.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	77
3.2.8.2 Determinação da concentração de proteínas.....	78
3.2.9 Indução de fibrilas amilóides.....	79
3.2.10 Espectros de dicroísmo circular (CD).....	80
3.2.11 Monitoração temporal da fluorescência de ThT.....	81
3.2.12 Titulação de ThT para cálculo da constante de dissociação aparente ( $K_{dis}$ ).....	82
3.2.13 Ligação de bis-ANS.....	83
3.2.14 Cálculo da energia de ativação do processo amiloidogênico monitorado por CD e fluorescência de ThT.....	83

3.2.15 Desenovelamento químico induzido por uréia.....	85
3.2.16 $C_m$ e variação da energia livre ( $\Delta G_{N-D}^0$ ) de desenovelamento.....	86
3.2.17 Desenovelamento induzido por acidificação.....	88
3.2.18 Experimentos de semeadura.....	89
3.2.18.1 Quantificação da massa de fibrilas amilóides através do método de desvio espectral do Vermelho de Congo.....	90
3.2.19 Cultura de células de mamíferos.....	91
3.2.20 Ensaio de citotoxicidade – redução do MTT.....	91
3.2.21 Caracteriação das fibrilas amilóides por difração de raios-X.....	92
3.2.22 Atividade chaperona na prevenção de agregação e fibrilização do mutante W7F/W14F de apomioglobina.....	93
3.2.23 Dissociação de fibrilas amilóides induzida por uréia em pH 6 e 7.....	94
3.2.24 Análise Estatística.....	95
4 RESULTADOS.....	96
4.1 Expressão e purificação das proteínas.....	96
4.1.1 Apomioglobinas.....	96
4.1.2 Expressão e purificação das sHsps (17 e 18) de cana-de-açúcar e Hsp40 (DjA1) humana.....	100
4.2 Perfil da cinética de formação de fibrilas amilóides de apomioglobinas.....	102
4.3 Cálculo da constante de dissociação ( $K_{dis}$ ) de Tioflavina T em relação às fibrilas amilóides.....	105
4.4 Monitoramento da ligação de bis-ANS em função do tempo de indução de fibrilas amilóides.....	105
4.5 Dicroísmo circular no ultravioleta distante das apomioglobinas antes e após amiloidogênese.....	108
4.6 Desenovelamento químico por uréia das apomioglobinas selvagem e mutantes W7F/W14F, H24V/H119F e H36Q.....	112
4.7 Desenovelamento ácido de apomioglobinas selvagem e mutantes W7F/W14F, H24V/H119F e H36Q.....	114
4.8 Propriedade de semeadura dos agregados pré-fibrilares das apomioglobinas selvagem e mutantes W7F/W14F, H36Q, H24V/H119F, V10F/M131F, apoMb <sub>1-123</sub> , C_GHAB e B_GHA.....	116

4.9 Energia de ativação do processo de conversão de estrutura em hélice- $\alpha$ para folha- $\beta$ e da formação de fibrilas amilóides das apomioglobinas selvagem e mutantes com cinética diferenciada.....	117
4.10 Caracterização por difração de raios-X das fibrilas amilóides das apomioglobinas selvagem e mutantes W7F/W14F, H36Q e H24V/H119F.....	122
4.11 Citotoxicidade em célula N2A das diferentes formas agregadas de apomioglobinas selvagem e mutantes W7F/W14F, H36Q, H24V/H119F, V10F/M131F, apoMb <sub>1-123</sub> , C_GHAB e B_GHA.....	123
4.12 Efeito da dissociação induzida por uréia das fibrilas amilóides em pH 6 e 7.....	135
4.13 Atividade chaperona das sHsps (17 e 18) de cana-de-açúcar e Hsp40 (DjA1) humana, na prevenção da agregação e fibrilização do mutante W7F/W14F.....	135
4.13.1 BSA como controle negativo da atividade chaperona.....	137
4.13.2 Atividade chaperona das sHsps 17 e 18 de cana-de-açúcar e da Hsp40 (DjA1) humana.....	138
5 DISCUSSÃO.....	142
5.1 Expressão e purificação das proteínas estudadas.....	142
5.2 Cinética amiloidogênica e estabilidade protéica.....	144
5.3 Características estruturais das fibrilas amilóides de apomioglobinas.....	147
5.4 Energia de ativação do processo amiloidogênico em apomiglobinas.....	150
5.5 Propriedade de semeadura.....	152
5.6 Citotoxicidade das formas amilóides.....	153
5.7 Chaperonas moleculares na prevenção da agregação amiloidogênica	155
5.8 Dissociação de fibrilas amilóides por ação da uréia.....	156
6 RESUMO DOS RESULTADOS.....	158
7 CONCLUSÕES.....	159
REFERÊNCIAS.....	160
ANEXO A – CORRÊA, D.H.A.; RAMOS, C.H.I. The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. <i>Afr. J. Biochem. Res.</i> , v. 3, n. 5, p. 164-173, 2009.....	182
ANEXO B - CORRÊA, D.H.A.; RAMOS, C.H.I. Insights on the structure of amyloid fibrils from site-directed mutagenesis. <i>Prot. Pep. Lett.</i> , v. 16, n. 12, p. 1519-1525, 2009.....	192

# 1 INTRODUÇÃO

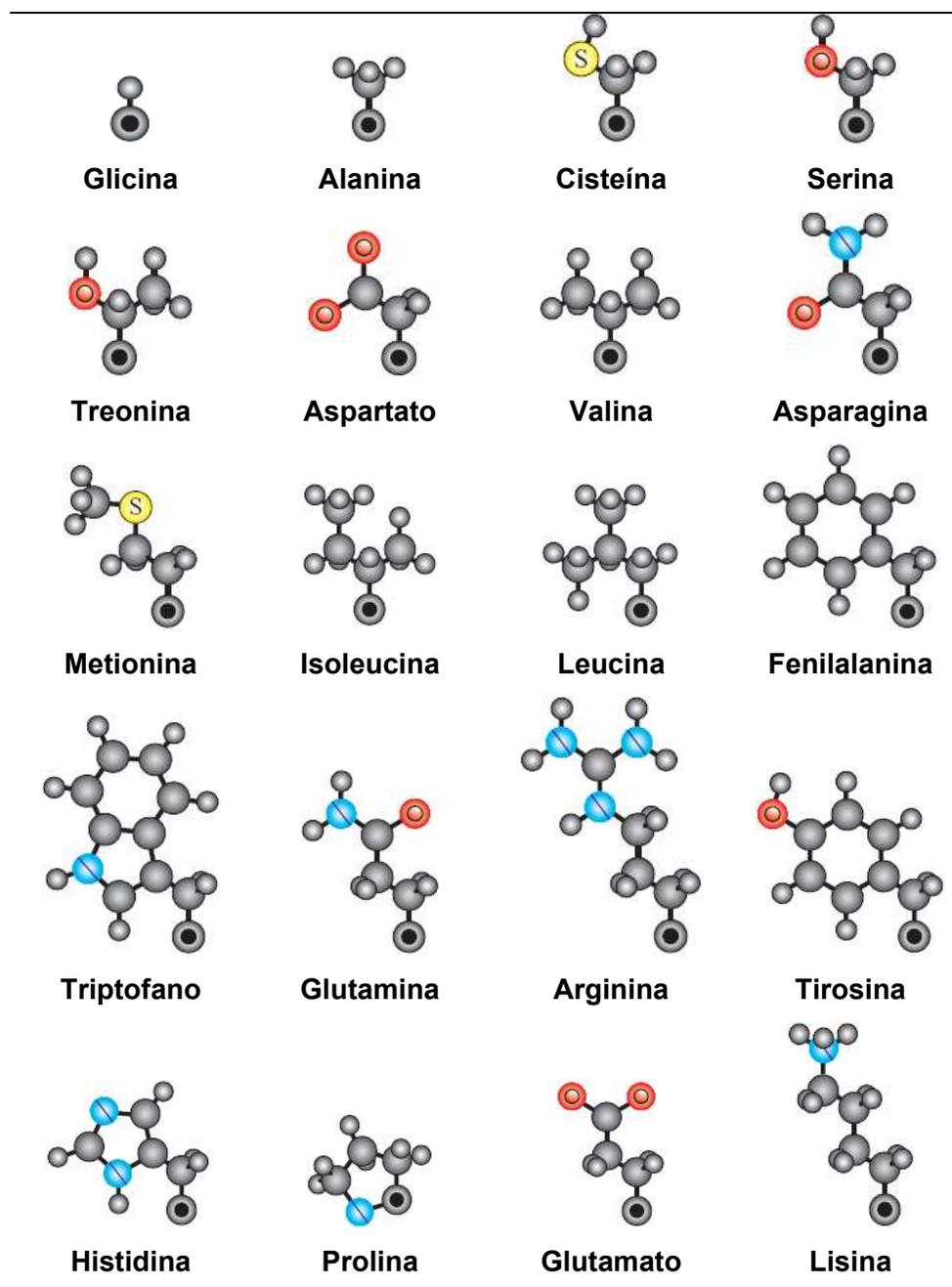
## 1.1 Proteínas

Proteínas ou polipeptídeos constituem uma classe importante de biomoléculas que desempenham importantes funções nas células, executando, por assim dizer, inúmeras atividades especificadas pela informação codificada nos genes (NELSON e COX, 2004). Dessas inúmeras funções biológicas desempenhadas pelas proteínas, podemos citar: replicação do DNA (polimerases), catálise enzimática (enzimas), contratibilidade (actina, miosina, tubulina), estrutural (queratina, colágeno), transporte (hemoglobina, mioglobina, albumina), regulação (insulina, hormônio estimulante da tiróide), defesa (imunoglobulinas, trombina), receptores celulares (CD4), repressão (Fos, Jun), chaperonas (Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40), armazenamento/estocagem (ferritina, gliadina) (WHITFORD, 2005). As proteínas constituem praticamente 50% da massa seca de uma célula de *Escherichia coli*, ao passo que outras moléculas, tais como o DNA e RNA compõem aproximadamente 3% e 20%, respectivamente (VOET e VOET, 2004). A característica mais marcante que permite às proteínas desempenharem uma gama enorme de funções é a capacidade dessas moléculas de se ligarem a outras moléculas de maneira muito específica e com grande afinidade. Essa capacidade de ligação é mediada pela estrutura terciária da proteína, estrutura essa que determina as especificações do chamado sítio de ligação, no qual ocorrem as interações responsáveis pela ligação da proteína com o seu ligante. (NELSON e COX, 2004).

Estruturalmente, as proteínas são compostas de aminoácidos arranjados numa cadeia linear e essa dobrada sobre si mesma, originando uma estrutura tridimensional específica. A seqüência dos aminoácidos de uma proteína é definida pelo processamento do RNAm transcrito pelo gene codificante da proteína e às vezes, após a deleção de peptídeo(s) da pré-proteína. Os aminoácidos são ligados entre si por

ligações peptídicas realizadas entre o grupo carboxílico de um resíduo e a amina do resíduo de aminoácido adjacente.

**Tabela 1. Cadeias laterais dos 20 resíduos de aminoácidos (projetados a partir dos átomos de C<sup>α</sup> da cadeia principal). (Adaptado de FINKELSTEIN e PTITSYN, 2002).**



Legenda: C<sup>α</sup> C H N O S

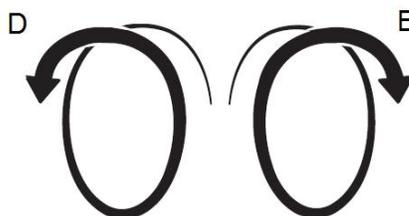
Geralmente, os genes codificam 20 tipos de aminoácidos (Tabela 1, pág. anterior). Entretanto, em alguns organismos pode ocorrer a codificação de dois outros aminoácidos: selenocisteína e pirrolisina; esses provenientes, respectivamente, da tradução dos códons de parada UGA e UAG (NELSON e COX, 2004; WHITFORD, 2005).

## **1.2 Estrutura e enovelamento de proteínas**

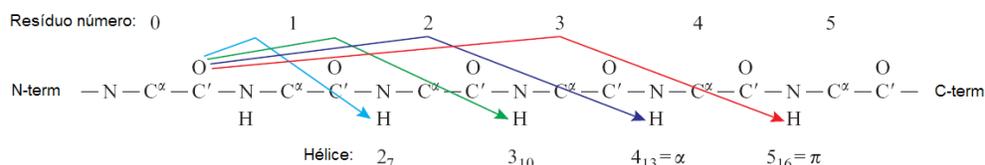
A bactéria *Escherichia coli* produz mais de 3.000 diferentes proteínas, os humanos entre 25.000 e 35.000 (excluindo-se as provenientes de splicing alternativo). Para que cada proteína seja ativa e funcional, deve apresentar uma estrutura tridimensional singular, denominada de nativa (NELSON e COX, 2004). Embora inúmeros estudos teóricos e experimentais sobre enovelamento protéico demonstrem que uma seqüência polipeptídica única e funcional apresente uma única estrutura tridimensional estável, na última década outros estudos relataram a existência do que hoje são chamadas de proteínas metaestáveis, sendo essas capazes de se enovelarem em mais de um estado tridimensional metaestável e funcional (e.g. alfa 1-antitripsina humana) (CABRITA e BOTTOMLEY, 2004).

Considerando-se a generalização inicial de uma seqüência polipeptídica única corresponder a uma única estrutura tridimensional estável e funcional, torna-se intuitivo considerar que essa estrutura protéica final seja determinada fundamentalmente pela seqüência dos resíduos que a compõem. De fato, algumas observações relacionadas a milhares de proteínas parecem suportar essa hipótese: (1) proteínas com diferentes funções apresentam diferentes seqüências de resíduos; (2) milhares de doenças genéticas são relacionadas à produção de proteínas defeituosas, sendo um terço dessas doenças relacionadas à mudança de um único resíduo em toda a seqüência; e (3) a comparação de proteínas com funções similares em diferentes espécies, mostra que essas apresentam seqüências muito similares (NELSON e COX, 2004).

Existem quatro níveis estruturais em ordem crescente de complexidade que determinam a estrutura tridimensional final de uma proteína: (1) primária; (2) secundária; (3) terciária; e (4) quaternária. A estrutura primária corresponde à seqüência de resíduos que constituem a proteína. A estrutura secundária é formada pelo agrupamento dos resíduos de aminoácidos em pequenas estruturas definidas e organizadas. Duas das estruturas secundárias mais conhecidas compreendem às hélices- $\alpha$  (hélice do tipo  $4_{13}$ ) e folhas- $\beta$  pregueadas. As estruturas em hélices podem se orientar conforme a regra da mão direita (D) ou esquerda (E) (Figura 1) e organizadas em diferentes períodos (Figura 2). As estruturas em hélice são estabilizadas por ligações de hidrogênio entre o grupo carboxila de um resíduo “i” e amina de um resíduo “ $i_{+(2+n)}$ ” ( $n \geq 0$ ) subsequente; sendo possível, em princípio, observarmos as seguintes estruturas em hélice (Figura 2):  $2_7$ ,  $3_{10}$ ,  $4_{13}$  (hélice- $\alpha$ ),  $5_{16}$  (hélice- $\pi$ ), e assim por diante. A denominação hélice- $2_7$  deriva da observação de o segundo resíduo ( $i+2$ ) participar da ligação de hidrogênio e dos 7 átomos presentes no “anel” (O:::H–N–C’–C $^\alpha$ –N–C’) (Figura 2) delimitados pela ligação de hidrogênio; quanto as outras hélices ( $3_{10}$ ,  $4_{13}$ ,  $5_{16}$ , etc) aplica-se a mesma regra (FINKELSTEIN e PTITSYN, 2002; NELSON e COX, 2004).

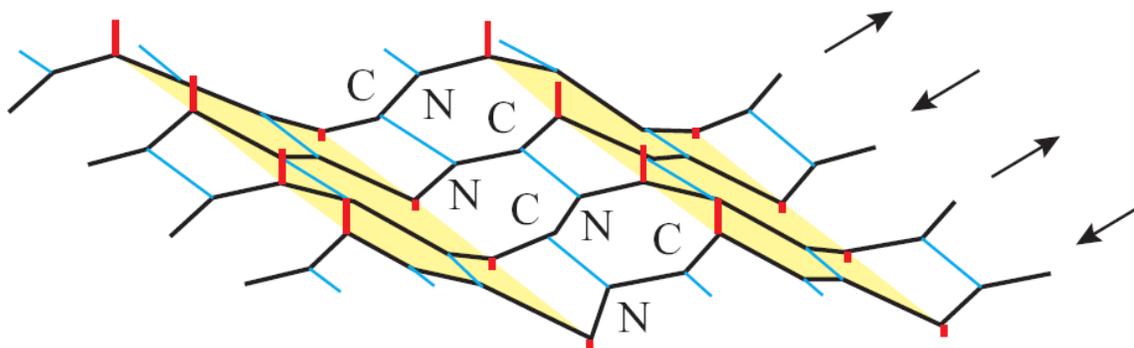


**Figura 1. Possíveis orientações de estruturas em hélice.** Hélices orientadas conforme a regra da mão direita (D) e esquerda (E). (Adaptado de FINKELSTEIN e PTITSYN, 2002).

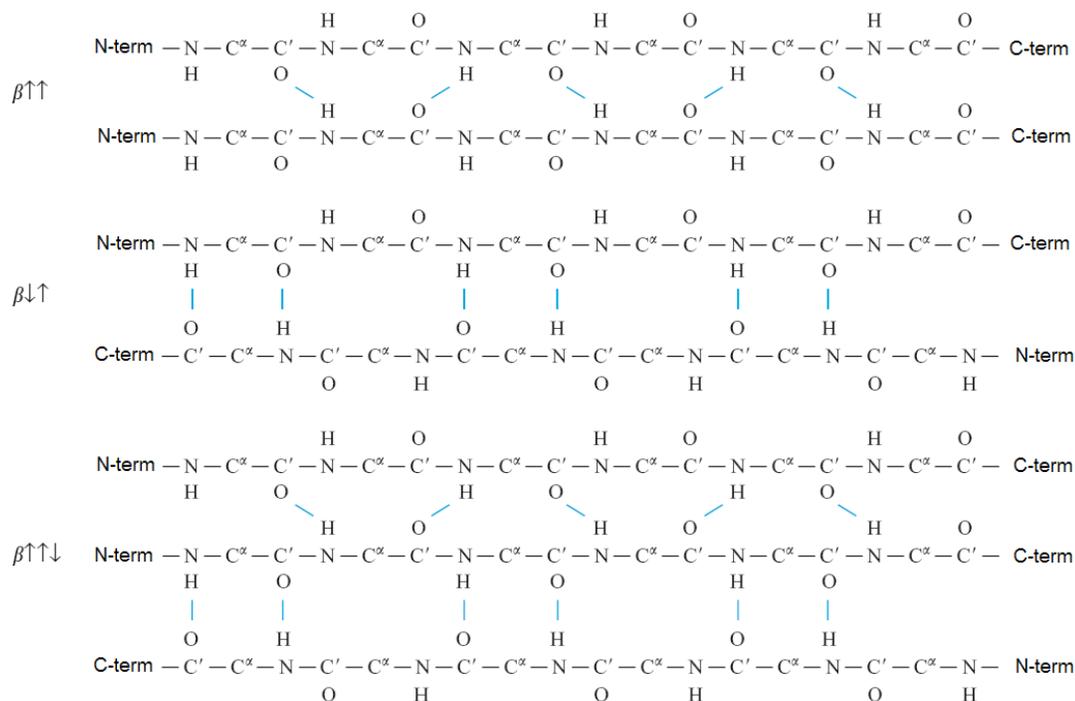


**Figura 2. Ligações de hidrogênio (mostradas como flexas) típicas em diferentes estruturas em hélice.** Os resíduos são numerados do N-terminal (N-term) até o C-terminal (C-term) da cadeia. As diferentes hélices são nomeadas conforme a extensão das ligações de hidrogênio. (Adaptado de FINKELSTEIN e PTITSYN, 2002).

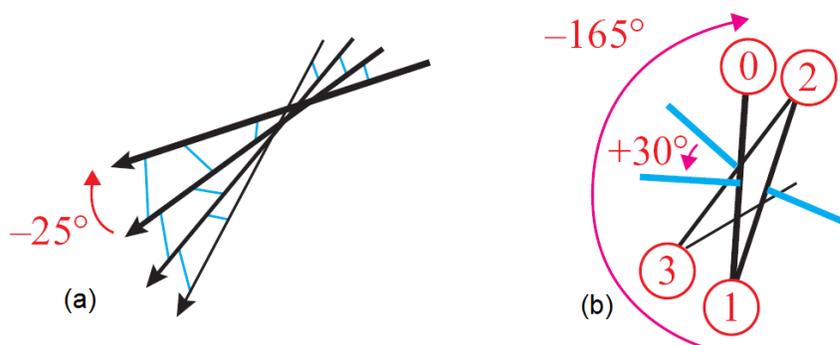
Folhas- $\beta$  pregueadas são estruturas mantidas por ligações de hidrogênio; entretanto, essas ligações são estabelecidas entre cadeias polipeptídicas diferentes ou entre segmentos distantes de uma mesma cadeia polipeptídica; exibindo, assim, uma conformação mais distendida comparada às estruturas em hélice e dispostas lado a lado. Nessas estruturas, as ligações de hidrogênio ficam perpendiculares ao eixo das cadeias e os grupos laterais, projetados para cima e para baixo do plano da folha- $\beta$ . É a conformação da superfície da folha- $\beta$ , resultante do arranjo lado a lado de cada cadeia ou segmento de cadeia que propicia o aspecto de uma folha pregueada (Figura 3). Folhas- $\beta$  pregueadas podem ser encontradas em diferentes conformações (Figura 4, pág. 34): (1) paralela ( $\beta^{\uparrow\uparrow}$ ); (2) antiparalela ( $\beta^{\downarrow\uparrow}$ ); e (3) mista (contendo estruturas  $\beta^{\uparrow\uparrow}$  e  $\beta^{\downarrow\uparrow}$ ). Em conjunto, as folhas- $\beta$  são em geral torcidas (Figura 5a, pág. 34) devido a cada fita- $\beta$  isolada ser torcida por si mesma (Figura 5b, pág. 34), o que propicia a alteração da direção das ligações de hidrogênio ao longo de cada fita, favorecendo assim, uma angulação entre as fitas- $\beta$  ligadas (FINKELSTEIN e PTITSYN, 2002; NELSON e COX, 2004).



**Figura 3. Superfície de uma folha- $\beta$  pregueada.** As cadeias laterais dos resíduos (traços vermelhos), se encontram nas pregas/dobras, e direcionadas como mostrado; e.g. as cadeias laterais ascendentes e descendentes se alternam ao longo da fita- $\beta$ . As ligações de hidrogênio são mostradas em traços azuis. (Adaptado de FINKELSTEIN e PTITSYN, 2002).



**Figura 4. Sentido N-term para C-term das cadeias e posição das ligações de hidrogênio em folhas- $\beta$  paralela ( $\beta\uparrow\uparrow$ ), antiparalela ( $\beta\downarrow\uparrow$ ) e mista ( $\beta\uparrow\downarrow$ ). Como mostrado, em cada fita- $\beta$ , a ligação de hidrogênio (traços azuis) de um resíduo é direcionado de forma oposta aquele do seu resíduo vizinho na cadeia. (Adaptado de FINKELSTEIN e PTITSYN, 2002).**



**Figura 5. (a) Torção de uma folha- $\beta$ . As fitas- $\beta$  são mostradas como flechas e as ligações de hidrogênio em linhas azuis. (b) Visão axial de uma volta da fita- $\beta$ . As cadeias laterais dos resíduos são mostradas como círculos numerados, sendo os números, crescentes conforme o aumento da distância para o observador. As linhas azuis indicam a direção dos grupos carboxílicos envolvidos nas ligações de hidrogênio da folha- $\beta$ . A grande flecha curva vermelha mostra a volta de uma fita- $\beta$ , conforme essa se aproxima do observador por um resíduo, enquanto a pequena flecha curva vermelha mostra a volta das ligações de hidrogênio, igualmente direcionadas, conforme a fita- $\beta$  se aproxima do observador por dois resíduos. (Adaptado de FINKELSTEIN e PTITSYN, 2002).**

Além das estruturas regulares descritas anteriormente (hélice- $\alpha$  e folha- $\beta$  pregueada), também são encontradas outras estruturas irregulares, compostas geralmente por metade dos resíduos não envolvidos nas estruturas regulares, sendo as mais importantes as voltas- $\beta$  do tipo I e II (FINKELSTEIN e PTITSYN, 2002).

A estrutura terciária corresponde ao dobramento final da cadeia polipeptídica, estabilizada por interações hidrofóbicas, iônica e pontes de dissulfeto (quando presentes, devido a resíduos de cisteína), entre os elementos de estrutura secundária especificados anteriormente, e também de regiões sem estrutura definida, permitindo a aproximação e interação dessas diferentes regiões distantes, particularmente através de ligações não-covalente entre as cadeias laterais dos resíduos.

Por último, a estrutura quaternária consiste na associação de duas ou mais cadeias polipeptídicas ou subunidades, formando uma proteína funcional de estado oligomérico, sendo essas subunidades mantidas associadas por ligações não-covalentes entre as mesmas (NELSON e COX, 2004).

Atualmente as proteínas podem ser classificadas em quatro categorias: globulares, fibrosas, de membrana e intrinsecamente desenoveladas (IUPs, da sigla em inglês para **Intrinsically Unfolded Proteins**) (NELSON e COX, 2004; DYSON e WRIGHT, 2005). Proteínas globulares são hidrossolúveis em grau variado e apresentam, como o próprio nome diz, forma próxima de uma esfera/glóbulo. A forma esférica ocorre devido ao arranjo espacial dos resíduos de aminoácidos de sua seqüência primária, no qual os resíduos de aminoácidos apolares/hidrofóbicos tendem a se “esconder” no interior da proteína e os demais, polares/hidrofílicos, permanecem na superfície da estrutura protéica. São os resíduos de aminoácidos polares da superfície, que através de interações dipolo-dipolo com o solvente caracterizam o grau de hidrossolubilidade da proteína. Além da hidrossolubilidade, existe outra característica que diferencia as proteínas globulares das fibrosas. As globulares possuem mais de um tipo de estrutura secundária regular, enquanto as fibrosas preferencialmente só um tipo (NELSON e COX, 2004; WHITFORD, 2005).

As proteínas fibrosas são insolúveis em solução aquosa, formando longos filamentos que lembram fios esticados. São geralmente encontradas como um agregado organizado devido ao agrupamento das cadeias laterais hidrofóbicas dos

resíduos de aminoácidos, que se projetam para fora do eixo da molécula. São em sua maioria compostas de curtas repetições de grupos específicos de resíduos de aminoácidos, e basicamente estruturadas em três tipos de conformações: (1) motivos super-hélices de hélices- $\alpha$  (e.g. queratinas); (2) extensas folhas- $\beta$  antiparalelas (e.g. fibroína); e (3) arranjo em tríplice hélice (e.g. colágeno) (NELSON e COX, 2004; WHITFORD, 2005).

As proteínas de membrana são encontradas aderidas ou associadas às membranas das células ou organelas. Essa classe de proteínas pode ser subdividida em: (1) proteínas integrais de membranas; e (2) proteínas periféricas de membrana. (NELSON e COX, 2004).

Proteínas intrinsecamente desenoveladas, também conhecidas como proteínas naturalmente desordenadas ou naturalmente desestruturadas, constituem uma classe de proteínas caracterizada pela ausência de uma estrutura terciária estável, quando isolada sobre condições fisiológicas *in vitro*. Essa “nova” classe de proteínas vem sendo estudada na última década, principalmente após relatos da existência de algumas proteínas envolvidas em interações proteína-proteína (quando não desempenhando suas funções e isoladas na sua forma monomérica), apresentarem-se naturalmente desordenadas/desestruturadas; portanto, sem uma estrutura definida como a observada durante tais interações. Sugere-se, até o momento, que o estado desenovelado natural das IUPs seja crucial para a função da mesma, sendo sua composição de aminoácidos menos hidrofóbica do que a encontrada em proteínas hidrossolúveis. Não apresentam núcleos hidrofóbicos e, não são susceptíveis a se tornarem insolúveis quando aquecidas. Aproximadamente 40% das proteínas de eucariotos possuem, ao menos, uma longa região desorganizada (> 50 resíduos). Aproximadamente 10% das proteínas de vários genomas são preditas como sendo totalmente desenoveladas, sendo atualmente centenas de IUPs identificadas, entretanto nenhuma desempenhando uma função enzimática (TOMPA, 2002; GUNASEKARAN et al., 2003; DYSON e WRIGHT, 2005; SCHLESSINGER et al., 2009).

A compreensão do enovelamento de proteínas é considerada um dos mais complexos problemas biológicos. O enovelamento é considerado a segunda etapa da

codificação genética (DILL et al., 1995), pois a estrutura de uma proteína “está determinada” no gene que a codifica, sendo que cada gene dita a seqüência de aminoácidos de uma proteína (LATTMAN e ROSE, 1993). A questão central de se entender o enovelamento é prever qual será a estrutura tridimensional da proteína, conhecida como estado nativo, simplesmente a partir de sua seqüência de aminoácidos (TAKETOMI et al., 1975). A função de uma proteína está relacionada de uma maneira bastante complexa com sua seqüência de aminoácidos (BORK et al., 1998), sendo esta funcionalidade definida pela topologia geral da proteína (LEE e RICHARDS, 1971) que só é alcançada após o correto enovelamento da cadeia polipeptídica. Portanto, a estrutura tridimensional (enovelada) da proteína e suas funções, não podem ser compreendidas separadamente (PRIGOGINE, 1997). Mesmo sendo do senso comum que a estrutura tridimensional de uma proteína seja definida por sua seqüência de aminoácidos, ainda não se sabe os detalhes de como essa informação é processada. Por esses aspectos, destacamos a importância em se estudar a via de enovelamento de proteínas, sua estabilidade e estrutura.

Anfinsen (1973), ao estudar o problema da desnaturação de proteínas como um processo reversível sob condições apropriadas, propôs que a estrutura tridimensional nativa de uma proteína, corresponde ao mínimo global de energia. Em outras palavras, ele propôs que a estrutura nativa é determinada termodinamicamente, sendo constatado que a cadeia polipeptídica abandona ou retorna facilmente à conformação nativa se as condições do solvente (ambiente) se afastam ou se aproximam das fisiológicas; concluindo que a estrutura nativa é determinada unicamente pela seqüência de aminoácidos da sua cadeia e pelas condições físico-químicas do meio solvente (ANFISEN, 1973; MICHELETTI et al., 1999).

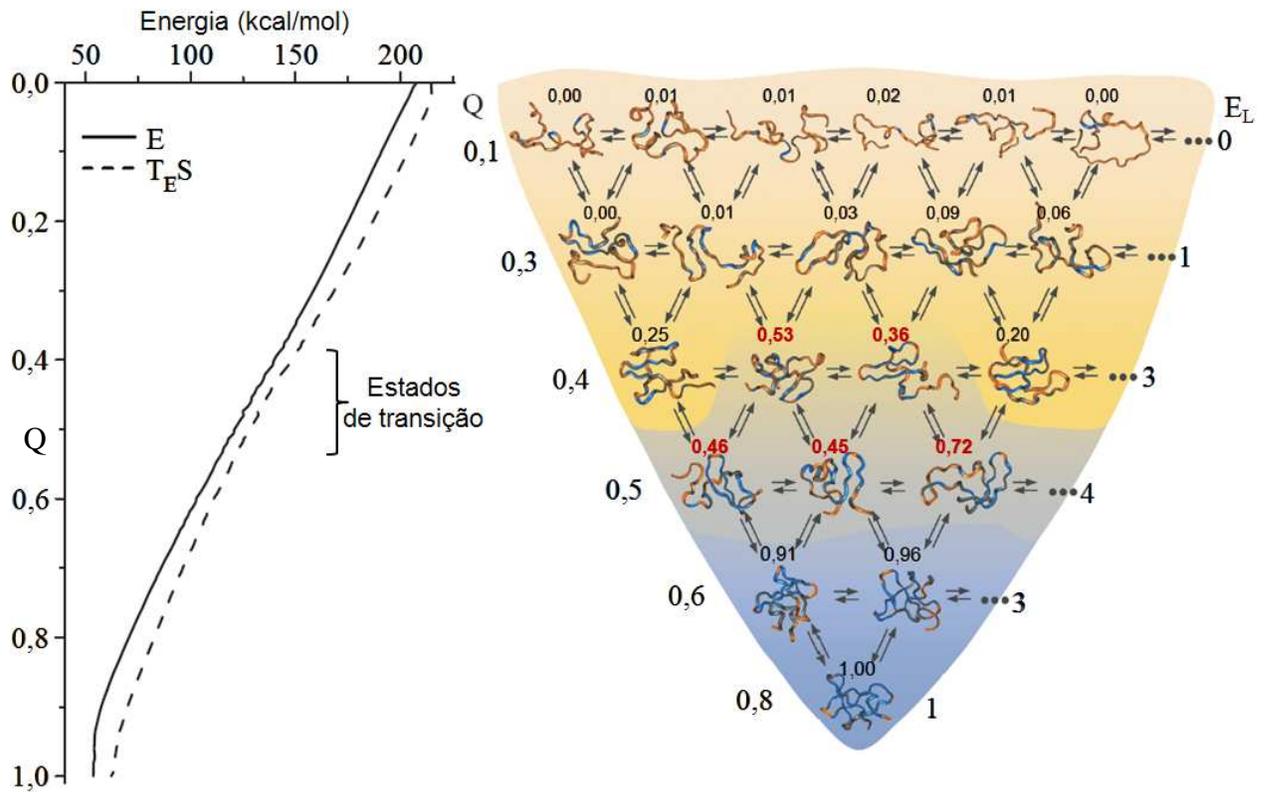
Vários estudos sobre a dinâmica do enovelamento de proteínas direcionam-se para a compreensão de como o processo de enovelamento contorna o chamado paradoxo de Cyrus Levinthal (ZWANZIG et al., 1992), que consiste num raciocínio lógico matemático feito sobre um trabalho de Levinthal. Levinthal (1969), ao estudar os graus de liberdade de uma cadeia polipeptídica, sugeriu um número astronômico de conformações possíveis, tendo estimado, para tanto, valor da ordem de  $10^{300}$ . Tendo-se em mente o trabalho de Levinthal (1969), o paradoxo é hipotetizado da seguinte

maneira: por exemplo, ao se considerar uma única ligação entre os resíduos presentes numa seqüência polipeptídica de 101 resíduos, e considerando-se que existam apenas três possíveis configurações relacionadas a cada uma das ligações, isso significa que essa proteína hipotética poderia adotar  $3^{100}$ , ou  $5 \times 10^{47}$  conformações diferentes. Se essa proteína fosse capaz de experimentar  $10^{13}$  configurações diferentes de ligação por segundo, então a proteína levaria  $3^{100} \times 10^{-13} \text{ s} \cong 5 \times 10^{34} \text{ s}$  para experimentar todas as configurações possíveis (ZWANZIG et al., 1992). Isso é um tempo muito longo, 119 milhões de bilhões de vezes maior do que a idade do Universo, considerada como 13,73 bilhões de anos (HINSHAW et al., 2009). Sabe-se que proteínas pequenas e de um único domínio enovelam-se rapidamente, em milissegundos, o que sugere a existência de caminhos preferenciais para o enovelamento, conduzindo a molécula para um mínimo global de energia.

Outros modelos foram criados para explicar o enovelamento de proteínas (WETLAUFER, 1973; KIM e BALDWIN, 1982; HARRISON e DURBIN, 1985; BALDWIN, 1989; FERSHT, 1997. Para uma revisão veja RAMOS e FERREIRA, 2005). Hoje se considera que a forma nativa pode não corresponder ao mínimo global de energia, podendo entretanto se acomodar também em um mínimo local (BERG et al., 2000). Experimentos termodinâmicos demonstram que o enovelamento de proteínas pequenas pode ser descrito por um processo reversível do tipo “dois-estados” (PRIVALOV e KHENCHINASHVILI, 1974), ou seja, ou as moléculas estão no estado nativo, ou estão desenoveladas, não existindo estados intermediários detectáveis. No entanto, existem algumas exceções: a apomioglobina (apoMb), por exemplo, apresenta estados intermediários (GRIKO et al., 1988; JENNINGS e WRIGHT, 1993), enovelando-se conforme um processo no qual certas estruturas secundárias nativas se formam rapidamente e estabilizam a cadeia protéica num estado metaestável intermediário, chamado de “molten globule” (OHGUSHI e WADA, 1983; PTITSYN, 1991; BALDWIN e ROSE, 1999). Padronizou-se chamar de “molten globule” à forma compacta semelhante à estrutura nativa (sem elementos terciários), e de intermediários as formas com alguns elementos terciários semelhantes ao do estado nativo.

Com o avanço dos estudos, uma outra perspectiva para o enovelamento de proteínas foi proposta. Essa proposta sugere um cenário onde o perfil energético do

processo de enovelamento de uma proteína se assemelha a um funil rugoso (SALI et al., 1994; BALDWIN, 1995). Nesse modelo (Figura 6, pág. 40), o topo do funil representa um grande número de conformações com alta energia, portanto instáveis e desenoveladas. Seguindo o modelo, para se enovelar, a proteína seguiria por rotas específicas em direção à base do funil onde a energia seria a mínima, correspondendo ao estado nativo. Durante esse processo, diferentes rotas poderiam ser percorridas pela proteína; ou seja, o processo poderia ser do tipo liso (representando um enovelamento extremamente rápido do tipo “dois-estados”), mais rugoso e lento (apresentando mínimos de energia locais relacionados a intermediários) (RADFORD et al., 1992), e vales de baixa energia com barreiras intransponíveis, relacionados a agregados irreversíveis e possivelmente fibrilas amilóides. Recentemente, estudos computacionais e experimentais indicam que os caminhos e as taxas de enovelamento são fortemente determinadas pela topologia do estado nativo (FERRARA e CAFLISCH, 2001). As mais sofisticadas técnicas para a predição da estrutura de proteína a partir da seqüência da mesma, conseguem, na maioria das vezes, prever corretamente a topologia da estrutura nativa, mas não conseguem prever detalhes estruturais importantes, como as voltas ou certos tipos de empacotamento (SCHONBRUN et al., 2002); desta forma, o enovelamento de proteínas ainda é um problema em aberto.



**Figura 6. Modelo estratificado de um diagrama de energia-entropia do enovelamento de uma proteína.** À esquerda é representada a energia média de uma estrutura em um determinado estrato ( $Q$ , fração de contatos nativos), e a entropia do estrato. À direita está representado o funil energético correspondente. A profundidade no funil corresponde à energia (sendo nesse modelo identificado por  $Q$ , após escalar). A largura no funil representa a entropia configuracional dos estratos. Os números indicados junto das diferentes estruturas mostradas, representam a probabilidade de tais estruturas em concluir o enovelamento antes de se desenovelarem. Profundidades intermediárias no funil correspondem aos valores intermediários na probabilidade das estruturas completarem seu enovelamento. A entropia ( $T_E S$ ) favorece o conjunto de estados próximos do topo do funil, enquanto a energia livre ( $E_L$ ) de estabilização de cada estrutura/estado, favorece ao fundo do funil (Adaptado de WOLYNES, 2008).

### 1.3 Desnaturação, desenovelamento e agregação protéica

Proteínas que apresentam perda significativa da estrutura terciária levando à perda de sua função, são consideradas desnaturadas (NELSON e COX, 2004). A maioria das proteínas podem ser desnaturadas por calor, esse afetando interações fracas, como ligações de hidrogênio, com perda abrupta da estrutura quando a temperatura chega a um patamar específico. A mudança abrupta da estrutura protéica em consequência do aumento da temperatura, indica que o desenovelamento protéico é um processo do tipo cooperativo, no qual a perda de estrutura numa região da proteína desestabiliza outras regiões. Além da temperatura, outros fatores podem causar a desnaturação de uma proteína, tais como: (1) pH; (2) ácidos (e.g. ácido acético, ácido tricloroacético 12%); (3) solventes orgânicos (e.g. etanol, acetona); (4) reagentes de ligação cruzada (e.g. formaldeído, glutaraldeído); (5) agentes caotrópicos (e.g. uréia 6-8 mol/L, cloreto de guanidina (GdnHCl) 6 mol/L, perclorato de lítio 4,5 mol/L); e (6) redutores de pontes de dissulfeto (e.g. 2-mercaptoetanol, ditioneitol (DTT)) (NELSON e COX, 2004; WHITFORD, 2005).

Proteínas desenoveladas em altas concentrações de desnaturantes ou em altas temperaturas, sugeriram, até pouco tempo, que estados desenovelados seriam a randomização da conformação protéica, a qual estaria isenta de interações inter-resíduos não randômicas persistentes (McCARNEY et al., 2005). Essa idéia passou por mudanças nos últimos anos, isso devido a um crescente número de estudos sobre estados desnaturados frente a uma variedade de condições, principalmente usando espectroscopia de RMN (VENDRUSCOLO e DOBSON, 2005). Atualmente considera-se que, mesmo em altas concentrações de desnaturantes, agrupamentos significantes de cadeias laterais alifáticas e aromáticas podem persistir, mesmo quando nenhuma estrutura secundária significante for conservada (LE DUFF et al., 2006). Em um estudo com a proteína lisozima, interações não-nativas implicando grupos aromáticos, mostraram-se persistentes em altas concentrações de desnaturante (KLEIN-SEETHARAMAN et al., 2002). Estruturas residuais encontradas em certos conjuntos de

estados desenovelados, parecem desempenhar um importante papel no início da agregação de proteínas desenoveladas (MISHIMA et al., 2006).

Inúmeras técnicas experimentais e estudos teóricos indicam que uma fração significativa dos contatos que definem a estrutura nativa de uma proteína pode estar presente no estado desenovelado, sendo esse achado uma forte indicação de que a presença de tais contatos no estado desenovelado devem, portanto, ser necessários para estabelecer a topologia do estado nativo necessário para uma reação de enovelamento eficaz (DING et al., 2005; LINDORFF-LARSEN et al., 2005; MITTAG e FORMAN-KAY, 2007). Por outro lado, nota-se ainda que essas preferências estruturais, determinadas pelas propriedades intrínsecas da seqüência de aminoácidos (e.g. propensão de estruturas secundárias, carga e hidrofobicidade), não só determinam a capacidade da cadeia polipeptídica de enovelar-se eficientemente até o estado nativo, mas parecem ser igualmente importantes na determinação da cinética da agregação protéica (KAD, et al., 2003; UVERSKY e FINK, 2004; JAHN e RADFORD, 2005).

### **1.3.1 Chaperonas moleculares e agregação protéica**

Chaperonas ou proteínas de choque térmico (Hsp, da sigla em inglês para **H**eat **s**hock **p**roteins), são uma classe de proteínas muito conhecida. Por muitos anos, os genes Hsp eram vistos como mistérios acadêmicos, curiosidades confinadas aos estudos de glândulas salivares da mosca das frutas *Drosophila melanogaster*. O estudo das Hsps se iniciou após a observação de um novo padrão de expressão gênica advindo da preparação de uma glândula de *Drosophila*, quando essa foi acidentalmente aquecida no estágio de preparação do microscópio para visualização da mesma (RITOSSA, 1962). Entretanto, somente após 10-15 anos, um RNAm de Hsp foi isolado de *Drosophila* (ASHBURNER, 1982). A resposta ao choque térmico é caracterizado pelo aparecimento de proteínas que transientemente permitem o aumento da tolerância frente ao aumento da temperatura. Além do choque térmico, são descritos outros fatores de estresse que propiciam à expressão de chaperonas, tais como: estresse

oxidativo, privação de glicose e infecções, e fatores que podem levar ao incorreto enovelamento e agregação de proteínas intracelulares. Também é reportado que a expressão das chaperonas pode estar envolvida na citoproteção, prevenção de apoptose, bem como na sinalização de caminhos alternativos na circulação de proteínas durante períodos de estresse celular (WESTERHEIDE e MORIMOTO, 2005). A superfamília das Hsps são classificadas de acordo com a massa das proteínas, bem como da função das mesmas, incluindo as Hsp100s, Hsp90s, Hsp70s, Hsp60s, Hsp40s, small Hsps e heme oxigenase (Hsp32) (KAMPINGA et al., 2009).

### **1.3.1.1 Família das Hsp40s**

Hsp40s são proteínas com massa molecular de aproximadamente 40 kDa e definidas pela presença de um domínio altamente conservado (domínio J), com cerca de 70 resíduos, formando quatro hélices- $\alpha$  nomeadas de hélices- $\alpha$  I até IV (HILL et al., 1995). As proteínas da família Hsp40 são diversificadas. Basicamente são classificadas em três grupos: A, B e C, baseadas no grau de conservação dos domínios (CHEETHAM e CAPLAN, 1998). As do tipo A ou I, são aquelas similares à DNAJ de *E. coli*, apresentando quatro domínios: domínio J, uma seqüência rica em glicinas e fenilalaninas, um domínio rico em cisteínas e o domínio DNAJ\_C, sendo que os domínios rico em cisteínas e DNAJ\_C estão envolvidos na interação com o substrato (LI et al., 2003). As do tipo B ou II não apresentam o domínio rico em cisteínas, e as do tipo C ou III possuem apenas o domínio J. As famílias A e B são diméricas (CHEETHAM e CAPLAN, 1998).

As Hsp40s são consideradas co-chaperonas das Hsp70s em razão da capacidade de ligar substratos e transportá-los à Hsp70 e concomitantemente estimular a atividade ATPásica dessa última. Entretanto, existem evidências de que as Hsp40s do tipo I também funcionem como chaperonas por si só (PRIP-BUUS et al., 1996), isso devido à presença do domínio rico em cisteínas no qual ocorre a ligação de íons zinco. As proteínas da família Hsp40 são capazes de manter o substrato em uma

conformação capaz de ser renovado, sendo assim considerada uma “holdase”; ou seja, ligam peptídeos parcialmente enovelados, prevenindo a agregação dos mesmos, mas sem auxiliar no renovelamento. Essas chaperonas denominadas como “holdases” são geralmente independentes de ATP e entregam o substrato para chaperonas do tipo “enovelases” ou para o sistema proteolítico (BEISSINGER e BUCHNER, 1998).

### **1.3.1.2 Small heat shock proteins (sHsps)**

Small heat shock proteins (sHsp) são encontradas em praticamente todos os organismos (CASPER et al., 1995; DE JONG et al., 1998). São definidas pela presença de um domínio altamente conservado, localizado no C-terminal chamado de domínio  $\alpha$ -cristalino (MORNON et al., 1998), assim por ter sido identificado inicialmente nas proteínas que compõem o cristalino dos olhos de vertebrados (De JONG et al., 1993). Esse domínio é bastante conservado entre diferentes espécies muito distantes evolutivamente (De JONG et al., 1998).

As sHsps apresentam uma massa molecular que varia de 9 a 42 kDa, razão da denominação “small”, sendo sua forma nativa encontrada geralmente organizada em grandes oligômeros de 8 a 32 subunidades (VAN MONTFORT et al., 2001).

Estudos com várias sHsps mostram, *in vitro*, que essas proteínas possuem função de chaperona, sendo capazes de ligar proteínas parcialmente desenoveladas, prevenindo a agregação irreversível dessas (HASLBECK et al., 2005). As sHsps normalmente ligam os substratos (atividade essa independente de ATP), quando esses expõem regiões hidrofóbicas, mantendo-os em um estado que pode ser renovado (EHRNSPERGER et al., 1997). O substrato pode ser liberado das sHsps para o renovelamento por outras chaperonas dependentes de ATP como os sistemas Hsp70 ou Hsp100 (CASHIKAR et al., 2005). Por esse motivo, assim como as Hsp40s, as sHsps também podem ser consideradas “holdases” (BEISSINGER e BUCHNER, 1998). Os substratos das sHps variam desde peptídeos até proteínas oligoméricas sem nenhuma especificidade de seqüência, estrutura ou de pI (HASLBECK et al., 2004).

Além disso, essas chaperonas têm o potencial de ligar pelo menos uma molécula de substrato por subunidade, o que faz delas bastante eficientes na prevenção da agregação protéica (BUCHNER et al., 1998).

#### **1.4 Amilóide, amiloidose e fibrilas amilóides**

O termo amilóide foi utilizado pela primeira vez por Rudolph Virchow em 1854. Virchow, ao usar uma solução aquosa de iodo combinada com ácido sulfúrico hidratado (conhecida por corar celulose em azul), para corar algumas estruturas encontradas em humanos, observou que tais estruturas apresentaram a mesma propriedade de se corarem em azul. Anteriormente, em animais inferiores, já havia sido descrita a presença de tais estruturas parecidas com a celulose, então denominadas de corpos amiláceos, geralmente presentes em epêndimas e no plexo coróide, e que também apresentavam a mesma propriedade da celulose quando coradas (VIRCHOW, 1854a). Posteriormente a esse trabalho, Virchow (1854b) e Meckel, ao testarem tecidos humanos contendo estruturas que hoje denominamos de placas amilóides, observaram a mesma reação com o iodo observada nos corpos amiláceos. Friedreich e Kekulé (1859) mostraram que aquele material amilóide, ao contrário do que se pensava, era composto por proteínas e não por carboidratos, achado esse confirmado por Hanssen (1908). As amiloidoses são descritas como uma classe de patologia causada por alguma espécie de desordem no envelhecimento de proteínas e que pode originar a formação de agregados da proteína em questão, e assim, podendo levar a formação de fibrilas amilóides e a deposição anormal dessas estruturas em órgãos e tecidos (GLENNER, 1980; FERREIRA e De FELICE, 2001; RAMOS e FERREIRA, 2005). Pouco mais de 60 proteínas amilóides já foram identificadas (MOK et al., 2007), sendo 36 delas associadas de alguma maneira a alguma doença amiloidogênica em humanos (PETTERSSON-KASTBERG et al., 2009) (Tabela 2, pág. 46).

**Tabela 2. Correlação genótipo-fenótipo de proteínas humanas relacionadas com amiloidoses.**

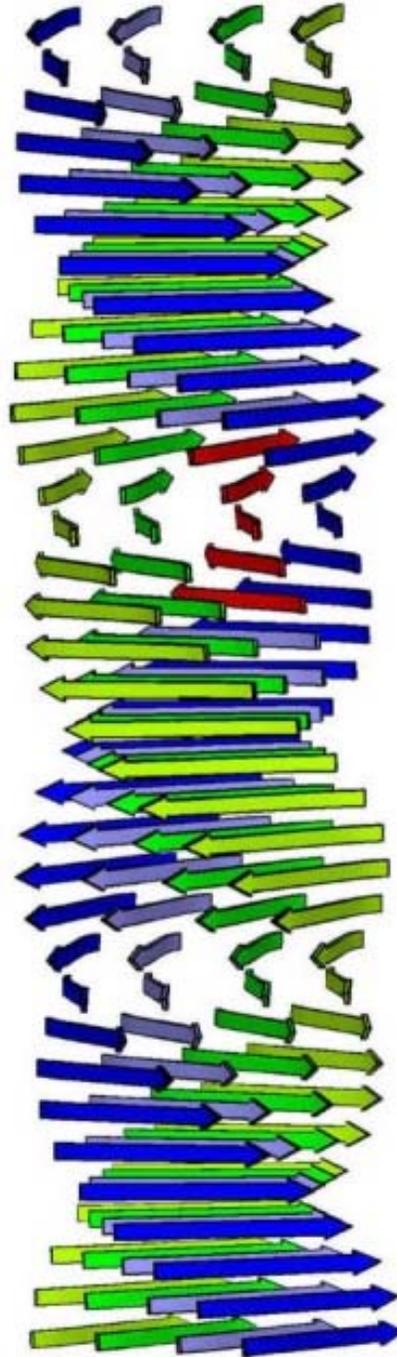
<b>Proteína</b> (n° de resíduos)	<b>Genótipo</b> (Mutações pontuais)	<b>Fenótipo</b> (Doença associada)
Beta-amilóide (39-43)	-	Mal de Alzheimer (FÖRSTL e KURZ, 1999)
Transtirretina (127)	-	Amiloidose sistêmica senil (WESTERMARK et al., 2002)
Transtirretina (127)	+ de 85 variantes	Amiloidoses sistêmicas familiar (CONNORS et al., 2003)
Gesolina (782)	D187N	Amiloidose familiar tipo-5 (MAURY et al., 1990)
$\alpha$ -sinucleína (140)	A30P, E46K ou A53T	Mal de Parkinson (LI et al., 2001; ZARRANZ et al., 2004)
Lisozima (148)	I56T, F57I, W64R ou D67H	Amiloidose familiar visceral (PEPYS et al., 1993; HARRISON, et al., 1996; GRANEL et al., 2002; YAZAKI et al., 2003)
Receptor da oncostatina M (979)	C634G	Amiloidose líquen-cutânea (SERI et al., 1997)
Proteína priônica (253)	D178N-129V, V180I, V180I/M232R, T183A, E196K, E200K, V203I, R208H, V210I, E211Q ou M232R	Doença de Creutzfeldt-Jakob (KOVÁCS et al., 2002)
Proteína priônica (253)	P102L, P105L, A117V, G131V, F198S, D202N, Q212P, Q217R ou M232T	Doença de Gerstmann-Sträussler- Scheinker (KOVÁCS et al., 2002)
Proteína priônica (253)	D178N-129M	Insônia familiar fatal (KOVÁCS et al., 2002)

Como exemplos de amiloidoses conhecidas temos: Alzheimer, Parkinson, Huntington, amiloidose sistêmica senil, polineuropatia familiar amiloidótica (WESTERMARK et al., 1990; GHISO et al., 1994; KELLY, 1996). Em algumas dessas doenças, como amiloidose sistêmica, quilogramas de proteínas insolúveis podem se depositar em vários tecidos e órgãos (DOBSON, 2003; RAMOS e FERREIRA, 2005). Esses depósitos são compostos por fibrilas rígidas (Figura 7, pág. 48), possuindo algumas características em comum, tais como: serem não-ramificadas, terem de 7-10 nanômetros de diâmetro, com comprimentos variáveis, estrutura típica de folha- $\beta$ -cruzada antiparalela ou paralela orientada perpendicularmente ao eixo da fibrila (CASTANO e FRANGIONE, 1988; LANSBURY et al., 1995; TYCKO, 2006), insolúveis, resistentes à proteases, ligam a corantes como vermelho de Congo (KLUNK et al., 1989) e à sonda fluorescente Tioflavina T (NAIKI et al., 1989; LEVINE, 1993), e podem ser constituídas de duas ou mais estruturas denominadas de protofibrilas entrelaçadas em hélice orientada à esquerda (FÄNDRICH et al., 2006).

Vários estudos *in vitro* demonstram que as proteínas amiloidogênicas se auto-montam de maneira irreversível até fibrilas, através de um processo inicial de nucleação (FÄNDRICH et al., 2006). A formação *in vitro* dessas fibrilas amilóides parece ser causada por condições que favoreçam estados parcialmente enovelados mais propensos à agregação (SIRANGELO et al., 2002), especificamente por intermediários que são estruturalmente instáveis comparativamente ao estado nativo da proteína (SPEED et al., 1996; FINK, 1998).

A formação das fibrilas amilóides é geralmente caracterizada por uma fase lag seguida de um período de rápido crescimento (ŽEROVNIK, 2002). A propensão em formar fibrilas amilóides não parece estar restrita apenas às proteínas potencialmente conhecidas como amiloidogênicas, mas parece ser uma propriedade de todas as proteínas, sendo identificada em proteínas que não possuem patologia relacionada, como por exemplo a apomioglobina (FÄNDRICH et al., 2001). Das diversas proteínas humanas amiloidogênicas conhecidas, constata-se que entre elas existe pouca ou ainda nenhuma homologia estrutural ou mesmo entre as seqüências de seus resíduos de aminoácidos (KELLY, 1996), sendo, entretanto, suas semelhanças amiloidogênicas explicadas pela propensão dessas proteínas em adotarem uma conformação

intermediária em comum, através da desnaturação parcial, tornando-as capazes de se auto-montarem em estruturas fibrilares (KELLY, 1996).



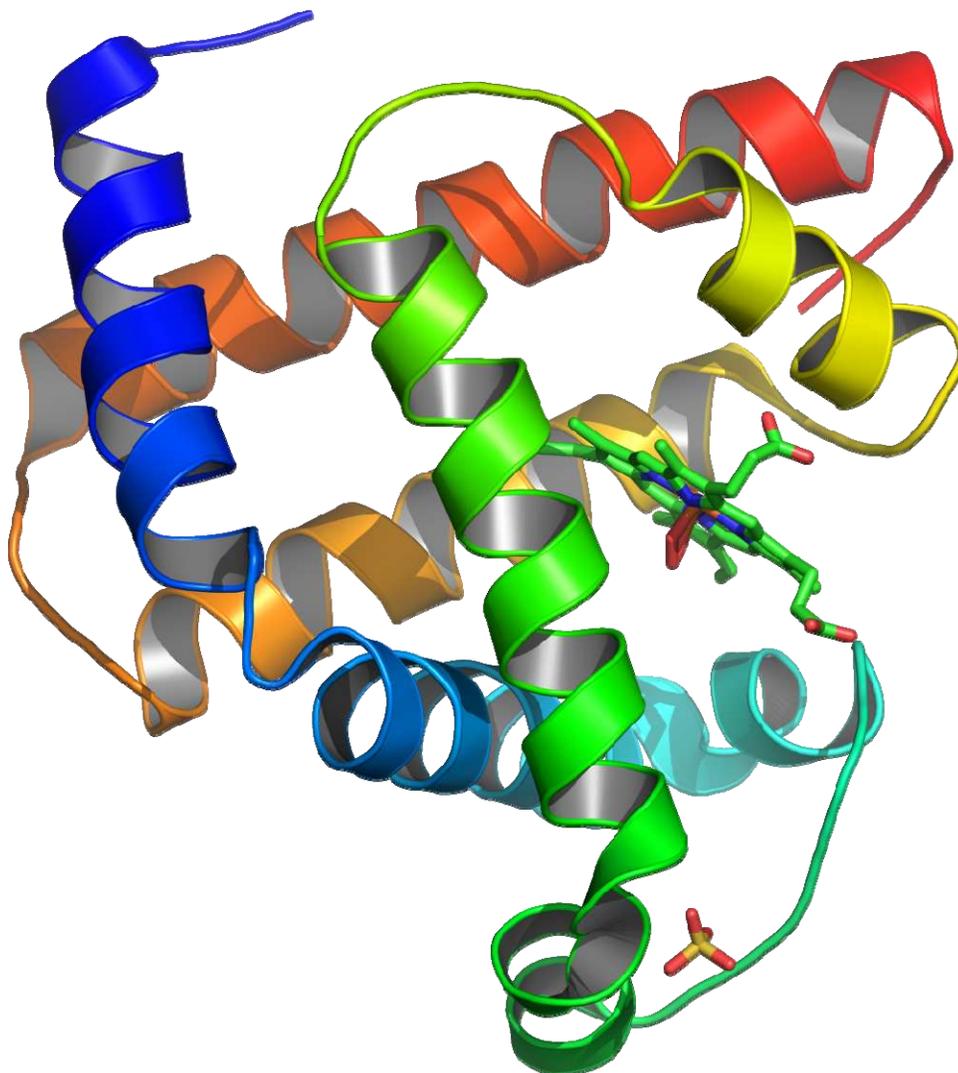
**Figura 7. Modelo estrutural proposto de uma fibrila amilóide.** Nota-se as folhas- $\beta$  orientadas perpendicularmente ao eixo da fibra (Adaptado de STANIFORTH et al., 2001).

Experimentos com poliaminoácidos específicos demonstram que para a ocorrência da estrutura típica encontrada nas fibrilas amilóides, essa não requer a presença de interações específicas entre as cadeias laterais ou mesmo de arranjos de seqüências dos resíduos da cadeia polipeptídica (FÄNDRICH e DOBSON, 2002). Outro trabalho, usando a apomioglobina como modelo, sugere a hipótese de que a formação das espécies fibrilares é uma propriedade de todas as proteínas. O fato de uma proteína, como a apomioglobina, essencialmente formada por hélices- $\alpha$  ser capaz de produzir fibrilas amilóides formadas principalmente por folha- $\beta$ , indica que essa mudança conformacional é dirigida pelas interações da cadeia principal (DOBSON, 2003). Como a cadeia principal é comum em todos os polipeptídios, isso explicaria porque todas as proteínas teriam propensão de formar fibrilas amilóides. Contudo, outras evidências experimentais são necessárias para a confirmação dessa hipótese. Apesar de proteínas diferentes serem capazes de formar fibrilas amilóides, essas fibrilas possuem algumas características que as diferenciam. Alguns trabalhos mostram que apesar da capacidade de formar fibrilas amilóides seja a mesma entre as várias seqüências, a propensão à formação pode variar enormemente (CHITI et al., 2003).

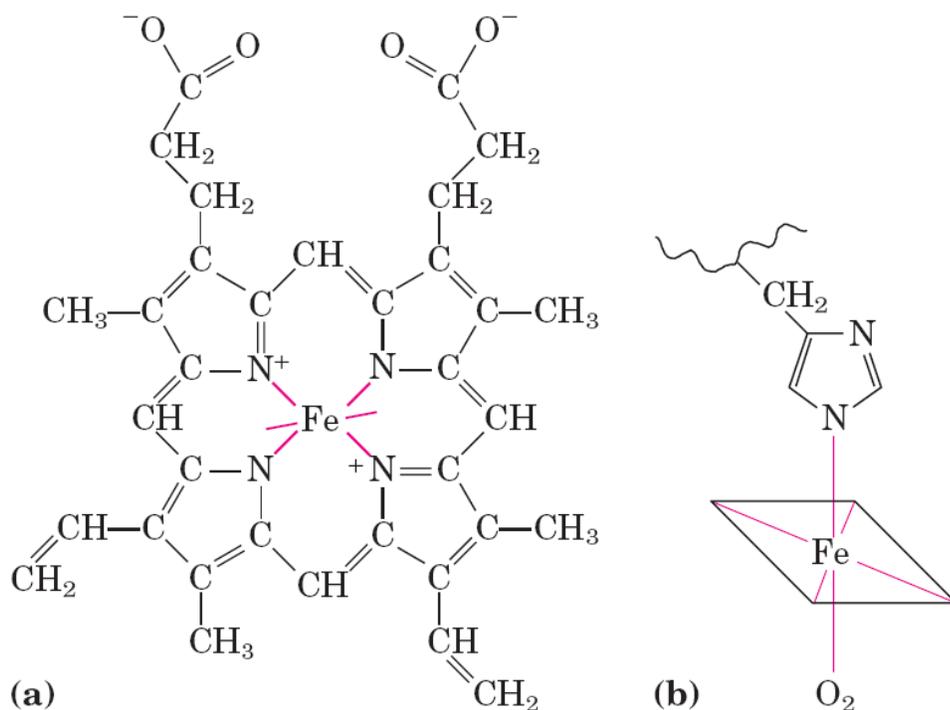
## 1.5 Mioglobina

A mioglobina (Mb) da baleia do espermacete (*Physeter catodon*) é uma hemeproteína globular monomérica de massa molecular de 17 kDa, composta por 153 resíduos de aminoácidos, estruturada em 8 hélices- $\alpha$  nomeadas de A-H (TAKANO, 1977) (Figura 8, pág. 50), e que desempenha a função de transporte de oxigênio (ANTONINI e BRUNORI, 1971). Para ligar o oxigênio, a mioglobina necessita de um grupo prostético conhecido como heme (Figura 9, pág. 51), constituído de uma protoporfirina e um átomo de Fe centralizado (STRYER et al., 2002). Na ausência do grupo heme, a mioglobina, agora denominada apomioglobina (apoMb), deixa de exercer seu papel fisiológico, mantendo a maioria de suas características físico-químicas, sendo algumas das diferenças a ausência da cor vermelha (BRESLOW et al.,

1965), menor estabilidade e menor compactação (GRIKO et al., 1988; NISHII et al., 1994), desestruturação da hélice F e ausência das características de “molten globule” (ELIEZER e WRIGHT, 1996; RIBEIRO-JR e RAMOS, 2004).



**Figura 8. Modelo da estrutura tridimensional de mioglobina de baleia do espermacete.** Mioglobina é uma proteína exclusivamente em hélice- $\alpha$ , envolvida no transporte de oxigênio. É constituída por 8 hélices- $\alpha$ , denominadas A até H. As hélices são mostradas como cartoons. O grupo prostético heme é mostrado na forma de bastões conectados. Figura criada usando o software Pymol (Delano Scientific LLC) e a estrutura em PDB da mioglobina (2JHO).



**Figura 9. Grupamento heme presente na mioglobina, hemoglobina, citocromos e outras heme proteínas.** (a) O grupo heme é constituído de uma complexa estrutura orgânica na forma de anel, denominada de protoporfirina, na qual está ligado um átomo de ferro no seu estado ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ). O átomo de ferro é hexacoordenado, sendo tetracoordenado com o plano do anel de porfirina, ao qual está ligado, e bicoordenado paralelamente a esse mesmo plano porfirínico. (b) Na mioglobina e hemoglobina, uma das coordenações perpendiculares do ferro está ligada a um átomo de nitrogênio de uma Histidina, enquanto a outra coordenação permanece livre, servindo de sítio de ligação obrigatório para uma molécula de oxigênio ( $\text{O}_2$ ) (Adaptado de NELSON e COX, 2004).

A mioglobina já teve sua função, estrutura e via de enovelamento amplamente estudada (JAMIN, 2005), sendo considerada uma proteína modelo para o estudo de intermediários da via de enovelamento de proteínas (PRIVALOV, 1996). Durante o seu desenovelamento ácido, a apoMb forma um intermediário em pH próximo de 4 com propriedades físicas tanto do estado nativo (pH neutro) quanto do estado desenovelado (pH 2) (GRIKO et al., 1988). Nessas condições, somente as hélices- $\alpha$  A, G, H e parte da B estão estruturadas (HUGHSON et al., 1990; LOH et al., 1995; ELIEZER et al.,

1998), os triptofanos se encontram parcialmente expostos (KIRBY e STEINER, 1970), e a estrutura terciária é menos compacta que a observada na forma nativa (ELIEZER et al., 1995). A existência desse intermediário composto pelas hélices- $\alpha$  A, B, G e H, é considerada uma importante etapa para que a apoMb alcance seu estado nativo, sendo essa consideração comprovada por estudos utilizando mutações sítio-dirigidas (KAY et al., 1999; LUO e BALDWIN, 2001).

Considera-se a presença de dois intermediários na via de enovelamento da apomioglobina, propondo-se que a proteína se enovela de maneira seqüencial, primeiramente com a formação das hélices- $\alpha$  A, G e H e posterior incorporação da hélice B formando um estrutura significativamente compacta e estável (LOH et al., 1995; LUO e BALDWIN, 2001). Esses dois intermediários, denominados  $I_a$  e  $I_b$ , coexistem em um equilíbrio dependente de pH, concentração de uréia e de alguns ânions (JAMIN e BALDWIN, 1998). Fortes evidências da existência dos dois intermediários consiste na observação da diferença dos espectros de fluorescência da proteína entre os pHs 3,4 - 4,2 e do aumento dessa fluorescência na presença de 1 M de uréia, das quais se conclui que a hélice- $\alpha$  B ainda não estaria formada no  $I_a$ , forma essa sendo a única presente em pH 3,4. Enquanto em pH 4,2, a forma dominante seria  $I_b$ , com a hélice- $\alpha$  B parcialmente ou totalmente formada, sendo essa forma a primeira a se desenovelar na presença de até 1 M de uréia, quando apenas  $I_a$  estaria então presente. De fato, Eliezer et al. (1998) demonstram que a hélice- $\alpha$  B estaria mais estruturada no intermediário em pH 4 - 4,2, sugerindo de fato que o domínio ABGH seria o núcleo da forma  $I_b$ . Outros estudos constatam que ocorrem proteções diferentes dos resíduos da hélice- $\alpha$  B, concluindo-se que há maior estruturação da porção C-terminal dessa hélice- $\alpha$  (NISHIMURA et al., 2002, 2003).

Postula-se que no decorrer do processo de enovelamento da mioglobina, a primeira hélice- $\alpha$  a se formar seja a H e a última a hélice- $\alpha$  F; essa última se estruturando com a incorporação do grupo heme, finalmente originando a forma Holo funcional (ONUFRIEV et al., 2003). Geierstanger et al. (1998) mostrou que a formação do intermediário seja uma consequência do rompimento de uma ponte de hidrogênio entre as Histidinas 24 e 119, localizadas respectivamente nas hélices- $\alpha$  B e G. O

intermediário da apomioglobina é formado cooperativamente e estabilizado por interações hidrofóbicas, sendo que mutações que perturbem essas interações de empacotamento afetam a estabilidade desse intermediário e essa desestabilização é semelhante à encontrada no estado nativo (KAY e BALDWIN, 1996; JAMIN e BALDWIN, 1996; KAY et al., 1999). Estes resultados mostram, portanto, que a estrutura do intermediário apresenta características do estado nativo (KAY et al., 1999), sendo mais bem definida para um estado do tipo 'molten-globule' (OGUSHI e WADA, 1983; KUWAJIMA, 1989). A presença dos intermediários seria uma solução ao paradoxo de Levinthal, pois a formação dessas estruturas parcialmente enoveladas podem restringir o número de conformações, considerando-se ainda que a estrutura nativa da proteína pode ser determinada muito mais pela sua via de enovelamento do que pela sua conformação mais estável (BALDWIN, 1989).

## **1.6 Mioglobina e fibrilas amilóides**

A mioglobina é uma proteína globular compacta, estável e aparentemente sem nenhuma propensão à formação de fibrilas amilóides, sendo predominantemente composta de hélices- $\alpha$  e sem a presença de estruturas em folha- $\beta$ . Entretanto, verifica-se que quando essa proteína é incubada em 50 mM de tampão borato de sódio, pH 9, a 65°C, observa-se uma grande quantidade de estruturas fibrilares vistas por microscopia eletrônica de transmissão (MET), contendo grande quantidade de estruturas em folha- $\beta$  observadas por espectro de dicroísmo circular e anisotropia de raios-X, e por marcação colorimétrica em ensaios com tioflavina T (ThT) e vermelho de Congo (FÄNDRICH et al., 2001). Cogita-se que a formação de fibrilas amilóides da mioglobina esteja relacionada às condições em que a cadeia polipeptídica esteja desenovelada (FÄNDRICH et al., 2003) ou às porções da cadeia polipeptídica sem elementos estáveis de estrutura secundária que não seriam capazes de se enovelarem ou mesmo de formarem espécies parcialmente enoveladas (FÄNDRICH e DOBSON, 2002). Outros trabalhos demonstram que um duplo mutante de mioglobina, W7F/W14F, na sua forma

apo, também apresenta capacidade de formação de fibrilas amilóides similares à proteína selvagem, mesmo em pH fisiológico e à temperatura ambiente, sugerindo que os processos de agregação e fibrilização de apomioglobina podem ser dirigidos por uma forma não-nativa que é citotóxica, mesmo nesse estado pré-fibrilar (SIRANGELO et al., 2002; SIRANGELO et al., 2004). Esse resultado, combinado com a identificação da participação da hélice- $\alpha$  G na formação de fibrilas, levantou a hipótese de que seqüências específicas na apomioglobina estariam envolvidas com a formação inicial de fibrilas amilóides nessa proteína (FÄNDRICH et al., 2003). Contudo, um mapeamento extensivo de tais seqüências não havia sido realizado até o presente momento.

## 2 OBJETIVOS

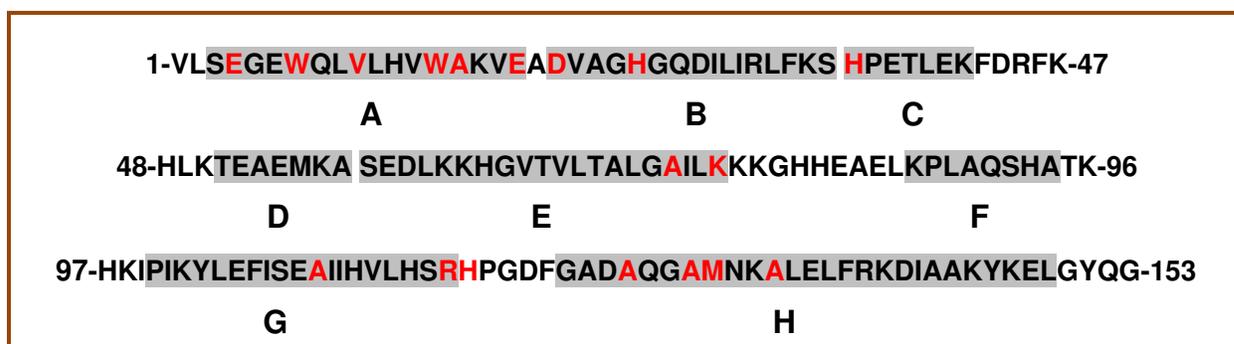
O objetivo geral deste projeto foi estudar as características físico-químicas de fibrilas amilóides de 19 mutantes de apomioglobina de baleia (*Physeter catodon*) e compará-las com a forma selvagem. Como objetivos específicos, primeiramente nos propusemos a estudar o perfil cinético de formação de fibrilas amilóides de mutantes envolvidos em alterações da hidrofobicidade, interações eletrostáticas, propensão, deleção e permutação de hélices- $\alpha$  e relativos ao intermediário da via de enovelamento. Secundariamente analisamos a morfologia, citotoxicidade e outras propriedades das fibrilas – bem como das espécies precursoras das mesmas – dos mutantes que apresentaram cinética amiloidogênica, estatisticamente diferente da proteína selvagem. Por fim, estudamos alguns agentes potencialmente ativos contra a agregação protéica, tais como chaperonas moleculares e agentes desnaturantes, a fim de avaliar a eficiência dos mesmos em impedir ou reverter a fibrilização amilóidica das proteínas estudadas.

### 3 MATERIAIS E METODOLOGIAS

#### 3.1 Materiais

##### 3.1.1 Mutantes de apomioglobina

Os mutantes (Tabela 3, pág. 57) de apomioglobina estudados neste projeto foram divididos em seis categorias: 6 estavam envolvidos com interações hidrofóbicas (V10F, A110F, A127F, A130F, A134F e V10F/M131F), 3 com interações eletrostáticas (E04A, E18A/K77A e R118A), 4 com o intermediário da via de enovelamento (D20A, H24V/H119F, H36Q e M131A), 2 com deleção de hélices- $\alpha$  (apoMb<sub>1-123</sub> e apoMb<sub>1-99</sub>), 2 com permutação das hélices- $\alpha$  (apoMb-B\_GHA e apoMb-C\_GHAB) e 1 envolvido com a propensão de hélice- $\alpha$  (A15G/A74G). Outro mutante estudado foi o W7F/W14F, esse utilizado como segundo controle.



**Figura 10. Esquema da estrutura primária e secundária da mioglobina selvagem de baleia (*Physeter catodon*).** A estrutura primária da mioglobina está representada pelas letras dos códigos de cada aminoácido e as hélices- $\alpha$  estão sombreadas em cinza. As hélices- $\alpha$  são nomeadas de A – H (em negrito abaixo da seqüência). Os aminoácidos em vermelho se referem àqueles que foram mutados (Tabela 4, pág. 58).

**Tabela 3. Racionalidade dos mutantes e prévio conhecimento de seus efeitos na estabilidade da apomioglobina.**

<b>Mutante</b>	<b>Efeito medido ou <u>esperado</u></b>	<b>Referência</b>
<b>V10F</b>	<u>desestabilização</u>	RAMOS_ Comunicação pessoal
<b>A110F</b>	<u>desestabilização</u>	RAMOS_ Comunicação pessoal
<b>A127F</b>	<u>desestabilização</u>	RAMOS_ Comunicação pessoal
<b>A130F</b>	<u>desestabilização</u>	RAMOS_ Comunicação pessoal
<b>A134F</b>	<u>desestabilização</u>	RAMOS_ Comunicação pessoal
<b>V10F/M131F</b>	<u>desestabilização</u>	RAMOS_ Comunicação pessoal
<b>W7F/W14F</b>	desestabilização	SIRANGELO et al., 2000
<b>H24V/H119F</b>	estabilização	BARRICK et al., 1994
<b>D20A</b>	sem efeito	KAY e BALDWIN, 1998
<b>M131A</b>	desestabilização	KAY e BALDWIN, 1996
<b>H36Q</b>	desestabilização	BARRICK et al., 1994
<b>A15G/A74G</b>	desestabilização	REGIS et al., 2005
<b>E04A</b>	desestabilização	RAMOS et al., 1999
<b>E18A/K77A</b>	<u>sem efeito</u>	RAMOS_ Comunicação pessoal
<b>R118A</b>	estabilização	RAMOS et al., 1999
<b>apoMb<sub>1-123</sub></b>	desestabilização	RIBEIRO-JR e RAMOS, 2005
<b>apoMb<sub>1-99</sub></b>	desestabilização	RIBEIRO-JR e RAMOS, 2005
<b>apoMb-B_GHA</b>	desestabilização	RIBEIRO-JR e RAMOS, 2005
<b>apoMb-C_GHAB</b>	desestabilização	RIBEIRO-JR e RAMOS, 2005

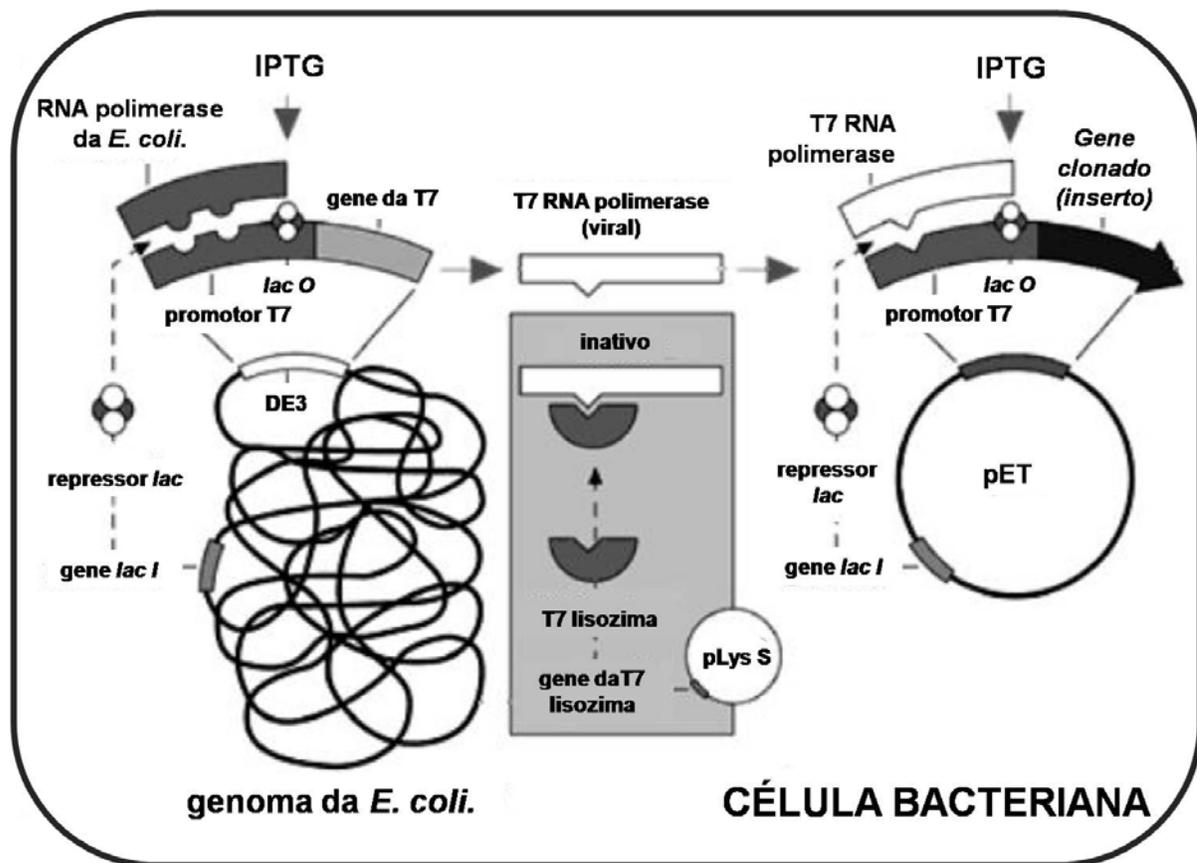
**Tabela 4. Localização das mutações sítio-dirigidas na estrutura da mioglobina (Figura 10, pág. 56).**

<b>Mutante</b>	<b>Localização</b>	<b>Referência</b>
<b>E04A</b>	Interface entre as hélices- $\alpha$ A e EF	RAMOS et al., 1999
<b>W7F</b>	Interface entre as hélices- $\alpha$ A e H	KAY e BALDWIN, 1996
<b>V10F</b>	Hélice A	(*)
<b>W14F</b>	Interface entre as hélices- $\alpha$ A e E	KAY e BALDWIN, 1996
<b>A15G</b>	Hélice A	REGIS et al., 2005
<b>E18A</b>	Interface entre as hélices- $\alpha$ A e E	RAMOS et al., 1999
<b>D20A</b>	Interface entre as hélices- $\alpha$ B e G	RAMOS et al., 1999
<b>M131F</b>	Interface entre as hélices- $\alpha$ A, G e H	BERTAGNA e BARRICK, 2004
<b>H24V</b>	Interface entre hélices- $\alpha$ B, E e G	BARRICK et al., 1994
<b>H36Q</b>	Interface entre hélices- $\alpha$ BC e G	BARRICK et al., 1994
<b>A74G</b>	Hélice E	REGIS et al., 2005
<b>K77A</b>	Interface entre as hélices- $\alpha$ A e E	RAMOS et al., 1999
<b>A110F</b>	Hélice G	(*)
<b>R118A</b>	Interface entre as hélices- $\alpha$ B e G	RAMOS et al., 1999
<b>H119F</b>	Interface entre hélices- $\alpha$ B e G	BARRICK et al., 1994
<b>A127F</b>	Hélice H	(*)
<b>A130F</b>	Interface entre as hélices- $\alpha$ A e H	(*)
<b>M131A</b>	Interface entre as hélices- $\alpha$ A, G e H	KAY e BALDWIN, 1996
<b>A134F</b>	Hélice H	(*)
<b>apoMb<sub>1-123</sub></b>	Deleção da hélice H	RIBEIRO-JR e RAMOS, 2005
<b>apoMb<sub>1-99</sub></b>	Deleção da hélices- $\alpha$ G e H	RIBEIRO-JR e RAMOS, 2005
<b>apoMb-B_GHA</b>	Permutação da hélice A	RIBEIRO-JR e RAMOS, 2005
<b>apoMb-C_GHAB</b>	Permutação das hélices- $\alpha$ A e B	RIBEIRO-JR e RAMOS, 2005

(\*) Esses mutantes foram estudados pela primeira vez.

### 3.1.2 Vetor de expressão

A clonagem dos cDNAs das apomioglobinas selvagem e de todos os demais 19 mutantes, bem como das sHsps (17 e 18) de cana-de-açúcar e Hsp40 (DjA1) humana, já se encontrava pronta e foi preparada anteriormente (RIBEIRO-JR et al., 2003; Ribeiro-Jr e RAMOS 2004; BORGES et al., 2005; TIROLI e RAMOS, 2007). Os cDNAs de todas as proteínas já se encontravam clonados em vetor de expressão pET (Amersham Life Science). O vetor de expressão pET é controlado pelo sistema T7, no qual o cDNA alvo é clonado sob o controle do promotor do gene 10 do bacteriófago T7 (Figura 11, pág. 60) (STUDIER et al., 1990). A expressão do cDNA alvo ocorre somente na presença da RNA polimerase do vírus T7, devido à especificidade do promotor. As cepas de bactérias utilizadas para a expressão possuem, integrado ao seu genoma, o prófago do bacteriófago T7, que é lisogênico. Nesse prófago, a expressão da T7 RNA polimerase está sob o controle do promotor lacUV5 do operon *lac*, que é mantido reprimido na presença de glicose e na ausência de seu indutor natural, a 1,6 aldolactose, um derivado da galactose (STUDIER et al., 1990). O produto do gene *lac I* representa o repressor que, quando ligado ao operador O (presente no prófago do T7), impede a expressão da T7 RNA polimerase, não ocorrendo a transcrição do cDNA alvo. Porém, na presença de IPTG (isopropil-tiogalactopiranosídeo), um análogo do indutor natural 1,6-aldolactose, o repressor se desliga do operador, liberando a expressão da T7 RNA polimerase do bacteriófago T7. Essa, por sua vez, atua na transcrição do cDNA alvo clonado no vetor do sistema pET. Como a T7 RNA polimerase é muito mais eficiente que a RNA polimerase da *E. coli*, sendo produzida em grandes quantidades e em pouco tempo, praticamente o único produto protéico sintetizado pela bactéria constitui-se naquele representado pelo cDNA alvo. Assim, na presença da RNA polimerase do bacteriófago T7, o cDNA alvo é altamente transcrito, resultando em grande quantidade do produto protéico.



**Figura 11. Ilustração do sistema pET para expressão de proteínas recombinantes.** Nesse sistema, o gene de interesse só será transcrito pela T7 RNA polimerase do bacteriófago lisogênico, cujo prófago está inserido no genoma da cepa BL21 (DE3). A T7 RNA polimerase tem sua síntese inibida pelo repressor *lac*, o qual só será desligado do operador do gene da T7 RNA polimerase na presença de IPTG, um análogo do indutor natural 1,6-aldolactose. (Adaptado do catálogo da Novagen/2000).

### 3.1.3 Linhagens celulares, meios de cultura e soluções diversas

#### 3.1.3.1 Linhagens de *Escherichia coli*

- *E. coli* DH5 $\alpha$  (HANAHAN, 1983; *Invitrogen*): utilizada para a multiplicação e manutenção de vetores plasmidiais.

- *E. coli* BL21(DE3)<sup>®</sup> (STUDIER e MOFFAT, 1986; *Stratagene*): utilizada na expressão das apomioglobinas e da Hsp40 (DjA1) humana. Essa cepa possui baixos níveis de produção de proteases, que poderiam degradar a proteína de interesse, e o gene (DE3), responsável pela síntese da enzima T7 RNA polimerase controlado pelo promotor *lacUV5* que é ativado pela adição de IPTG (como descrito no item 3.1.2, pág. 59).
- *E. coli* BL21(DE3)pLysS<sup>®</sup> (STUDIER e MOFFAT, 1986; *Stratagene*): utilizada na expressão das proteínas sHsp17 e sHsp18 de cana-de-açúcar. Essa cepa possui as mesmas características da BL21 (DE3); entretanto, com o adendo de também expressar uma lisozima específica que inibe a T7 RNA polimerase, regulando, portanto, a expressão das proteínas de interesse. Essa cepa é geralmente utilizada quando a proteína de interesse pode ser tóxica para a bactéria.

### 3.1.3.2 Células de mamíferos

Para os testes de citotoxicidade das formas amilóides das apomioglobinas (WT, H36Q, apoMb<sub>1-123</sub>, apoMb-B\_GHA, apoMb-C\_GHAB, W7F/W14F, V10F/M131F e H24V/H119F), utilizamos uma linhagem simplificada de células neuronais, mais especificamente neuroblastoma de murino (N2A). A cultura N2A foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Sérgio Ferreira (Universidade Federal do Rio de Janeiro). Essa linhagem celular foi estabelecida por Klebe e Ruddle (1969) a partir de um tumor espontâneo da linhagem A de camundongos híbridos albinos *Mus musculus musculus* x *Mus musculus domesticus* (C1300) (DUNHAM e STEWART, 1953). A grande vantagem em se trabalhar com esse tipo celular para testes de citotoxicidade se deve ao fato dessas células serem morfofisiologicamente semelhantes às células nervosas, mas principalmente por possuírem alta capacidade mitótica (proliferação), em razão da origem tumoral das mesmas.

### **3.1.3.3 Meio de cultura bacteriano**

Para o crescimento de bactérias, preparação de células competentes, expressão de proteínas e manutenção de bactérias transformadas com vetores de interesse, foi utilizado o meio de cultura LB (Luria-Bertani). O meio LB é composto por: triptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L e NaCl 10 g/L. Para o preparo, dissolvem-se os componentes em água desmineralizada, ajusta-se o pH para 7,0 (utilizando HCl ou NaOH 1M), completa-se para o volume de trabalho desejado com água desmineralizada e autoclava-se logo em seguida para posterior utilização. Para o meio sólido, utilizado na confecção de placas de cultura, acrescenta-se 1,5% de ágar anteriormente à etapa de autoclavagem.

Para o crescimento de células transformadas por eletroporação ou choque térmico – etapa essa anterior ao plaqueamento das mesmas para posterior identificação das bactérias transformadas – foi utilizado o meio SOC. Esse meio é composto de: triptona 20 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 10 mmol/L, KCL 2,5 mmol/L, MgCl<sub>2</sub> 10 mmol/L, MgSO<sub>4</sub> 10 mmol/L e Glicose 20 mmol/L. Para o preparo, dissolvem-se os componentes (com exceção da glicose) em água desmineralizada, ajusta-se o pH para 7,0 (utilizando HCl ou NaOH 1M), completa-se para o volume de trabalho desejado com água desmineralizada e autoclava-se logo em seguida. Antes da utilização, acrescenta-se a glicose a partir de uma solução estoque 1 mol/L filtrada em filtro 0,22 µM.

### **3.1.3.4 Meio de cultura para as células N2A**

Para o cultivo das células N2A foi utilizado o meio DMEM (meio mínimo essencial de Eagle modificado por Dulbecco-Vogt). Esse meio é amplamente utilizado na cultura de uma grande variedade de células de crescimento em monocamada. O diferencial desse meio, com relação ao original de Eagle, é que o meio DMEM contém

aproximadamente quatro vezes mais vitaminas e aminoácidos, de duas a quatro vezes mais glicose e ainda ferro e vermelho de fenol. Esse meio possui concentrações de aminoácidos semelhantes às células de mamíferos.

O meio DMEM adquirido da Gibco já vem em porções individuais em pó para o preparo de 1 litro de solução. Para o preparo, dissolve-se o conteúdo do pacote em um volume de 900 mL de água ultra pura com o auxílio de um agitador magnético, em seguida adicionam-se 3,7 g de bicarbonato de sódio e após dissolver completamente esses compostos, ajusta-se o pH para 7,4 com o auxílio de soluções de NaOH ou HCl 1M. A seguir, o volume é completado para 1 litro com água ultra pura e o meio é imediatamente esterilizado por filtração em filtro Millipore de 0,22  $\mu\text{M}$  aplicando uma pressão positiva sobre o sistema. O processo de filtração deve ser realizado em um fluxo laminar horizontal. Por fim, o meio deve ser armazenado em um recipiente devidamente esterilizado. A cultura de N2A é cultivada em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (v/v), 100  $\mu\text{g/mL}$  de estreptomicina, 100 U/mL de penicilina e 1  $\mu\text{g/mL}$  de fungizona (Gibco), sendo que esse meio suplementado é denominado de meio DMEM completo. A suplementação do meio DMEM pode ser feita após a filtração, tomando-se os devidos cuidados para fazê-lo em ambiente estéril (fluxo laminar horizontal). O meio DMEM completo pode ser armazenado a 4°C por até 6 meses.

### **3.1.3.5 Tioflavina T (ThT)**

A solução estoque de ThT (Sigma) foi preparada dissolvendo-se cerca de 30 mg do pó para cada 1 mL de água ultra pura. Após ser completamente dissolvida, a concentração exata de ThT foi medida espectrofotometricamente em 416 nm, utilizando o coeficiente de extinção molar de 26.620  $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  (WALL et al., 1999). A solução estoque foi mantida a 4°C ao abrigo da luz.

### **3.1.3.6 bis-8-anilinaftaleno-sulfonato (Bis-ANS)**

A solução estoque de bis-ANS (Sigma) foi preparada dissolvendo-se cerca de 30 mg do pó para cada 1 mL de metanol. Após ter sido completamente dissolvido, a concentração exata de bis-ANS foi medida espectrofotometricamente em 360 nm, utilizando o coeficiente de extinção molar  $23.000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  (HAUGLAND, 1992). A solução estoque foi mantida a  $4^{\circ}\text{C}$  ao abrigo da luz.

### **3.1.3.7 Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT)**

A solução estoque de MTT (Sigma) foi preparada a uma concentração de 5 mg/mL. Para isso, 5 mg do MTT em pó foram dissolvidos em 1 mL de PBS (composição: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1,4 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,4).

### **3.1.3.8 Solução de paralização para o ensaio de semeadura**

A solução de paralisação é composta de 20% SDS e 0,01 M HCl.

### **3.1.3.9 Ácido benzidinodiazó-bis-1-naftilamina-4-sulfônico (Vermelho de Congo)**

A solução estoque de vermelho de congo ( $200 \mu\text{M}$ ) foi preparada em 90% de solução salina tamponada com fosfato de sódio filtrada (tampão fosfato de sódio 10 mM, KCl 2,7 mM, NaCl 137 mM e pH 7,4) e 10% (v/v) de etanol. Para evitar a formação de micelas (microagregados), após o preparo, a solução foi filtrada 3 vezes em filtro

0,22  $\mu\text{M}$ . Para determinação da concentração final da solução estoque, mediu-se a absorbância em 505 nm de uma alíquota do estoque em solução de fosfato de sódio 10 mM, pH 7,0 e 40% de etanol (v/v), utilizando-se para tanto o coeficiente de extinção molar de  $59.300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (KLUNK, et al., 1999).

## **3.2 Metodologias**

### **3.2.1 Técnicas espectroscópicas utilizadas no estudo de estrutura de proteínas**

#### **3.2.1.1 Dicroísmo circular**

Para informações detalhadas sobre o fundamento da técnica de CD e das várias aplicabilidades da mesma no estudo de proteínas, veja o ANEXO A (pág. 182), referente à revisão publicada no **“African Journal of Biochemistry Research Vol.3 (5), pp. 164-173, Maio de 2009”** intitulada: **“The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function”**.

#### **3.2.1.2 Fluorescência**

A emissão de fluorescência é caracterizada como um fenômeno físico que ocorre quando um elétron previamente excitado retorna ao seu estado fundamental/basal, sendo que nesse processo, nem toda a energia que anteriormente tenha excitado o elétron é convertida em fluorescência, podendo uma fração da mesma ser “perdida” por processos não radioativos. Devido a essa perda parcial de energia, a energia da luz emitida é sempre menor que a energia da luz utilizada para a excitação, e dessa forma,

a luz fluorescente emitida é sempre em comprimento de onda maior do que a da luz de excitação. As proteínas possuem certos aminoácidos que podem contribuir para a chamada fluorescência intrínseca, no caso: triptofano (Trp), tirosina (Tyr) e fenilalanina (Phe). Dos três aminoácidos, o triptofano é o mais utilizado nos estudos de fluorescência de proteínas. Esse aminoácido é extremamente sensível ao ambiente no qual se encontra, e portanto, apresenta características de fluorescência diferenciadas em cada grau de exposição aos diferentes meios, os quais podem ser hidrofílicos ou hidrofóbicos. Não somente devido aos possíveis resíduos de aminoácidos fluorescentes presentes nas proteínas, também é possível utilizar a fluorescência como ferramenta de estudo de proteínas através de outras fontes fluorescentes não intrínsecas. Como exemplo podemos citar sondas fluorescentes que se liguem a determinados aminoácidos, aminoácidos modificados ou outros compostos que emitem fluorescência ao interagirem com a proteína (LAKOWICZ, 2006).

### **3.2.1.3 Difração de raios-X**

A técnica de difração de raios-X faz parte do conjunto de técnicas de espalhamento de raios-X, e como tal, permite obter informações sobre a estrutura cristalina, composição química e propriedades físicas de materiais e filmes finos. Através dessa técnica, é possível determinar a geometria ou forma de uma molécula. Feixes de raios-X de comprimento de onda bem determinados são usados em análises de cristais de proteínas e outros materiais. A técnica se baseia na observação da intensidade de espalhamento de um feixe de raios-X que incide sobre uma amostra em função do ângulo de incidência e espalhamento do feixe, da polarização e energia do mesmo. Quando esse feixe definido difrata em um cristal desconhecido, as medidas dos ângulos de difração dos raios emergentes podem elucidar a distância dos átomos no cristal e, conseqüentemente, a estrutura cristalina. Esse método de análise é muito utilizado no estudo de proteínas, sendo que a intensidade e os ângulos dos feixes resultantes da difração são lidos e processados por um computador que calcula e

mostra as prováveis configurações dos átomos que compõem o cristal (AZÁROFF et al., 1974).

Com relação às fibrilas amilóides, a técnica de difração de raios-X é uma poderosa ferramenta para a caracterização estrutural desses agregados. Imagens de difração de fibrilas amilóides podem ser coletadas através de qualquer fonte de raios-X que esteja equipada com um detector. Entretanto, as informações contidas numa imagem de difração de raios-X de estruturas amilóides fibrilares são muito dependentes da orientação da fibrila, sendo que a quantidade desse material a ser difratado, o posicionamento do mesmo no feixe de raios-X e a procedência da amostra fibrilar são fatores que determinam, em geral, um alinhamento muito pobre dessas estruturas. Portanto, observa-se nas imagens, uma forte reflexão em 4,7 Å e outras reflexões difusas em 8-12 Å, principalmente quando se utiliza fontes de raios-X de pouco brilho. Para a obtenção de dados de alta resolução, se faz necessário o uso de fontes de raios-X com alto brilho, como os encontrados em laboratórios do tipo Síncrotron, tais como o Laboratório Nacional de Luz Síncrotron – LNLS (Campinas, Brasil), European Synchrotron Radiation Facility – ESRF (Grenoble, França), Advanced Photon Source – APS (Argonne, Estados Unidos), entre outros mais de 50 espalhados pelo globo. Além do ganho de brilho no feixe de raios-X, o uso desses Síncrotrons permite outras vantagens. O espalhamento de raios-X pelo ar, geralmente observado em experimentos com fontes geradoras de raios-X por anodo rotatório de  $\text{CuK}\alpha$ , e o uso de comprimento de onda da ordem de 1,5 Å, são parâmetros que dificultam a obtenção de boas imagens de difração de raios-X de fibrilas amilóides. Nesse aspecto, a utilização de feixes de raios-X, como os encontrados nos Síncrotrons (de menor comprimento de onda), permite a minimização dos problemas citados anteriormente, sendo ainda particularmente vantajoso para a aquisição de reflexões a ângulos mais baixos. Alternativamente, o uso de câmaras com hélio envolvendo a amostra e o detector, permite excluir particularmente o problema de espalhamento pelo ar (SERPELL, et al., 1999).

### 3.2.2 Preparação de cepas de *E. coli* eletrocompetentes

Para a obtenção de cepas de *E. coli* eletrocompetentes, as cepas de interesse foram pré-inoculadas em 10 mL de LB e crescidas durante a noite (16 horas) a 37°C sob agitação de 200 rpm. No dia posterior, o pré-inóculo (5 mL) foi diluído em 500 mL de meio LB e as células foram crescidas a 37°C sob agitação de 200 rpm (INNOVA 44 Incubator Shaker Series – New Brunswick), até a  $DO_{600nm}$  (Densidade Óptica) verificada em espectrofotômetro (Ultrospec 3000 UV/Vis Spectrophotometer-Pharmacia Biotec®) atingir aproximadamente 0,6-0,8. As células foram armazenadas em banho de gelo por 20 min e posteriormente centrifugadas a 15.000 x g por 15 min a 4°C (Sigma Laboratory Centrifuges 4K15-Sigma®; rotor 12172H). Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 500 mL de glicerol 10% gelado. Essa operação foi repetida três vezes, primeiramente com ressuspensão em 250 mL, seguida por ressuspensão em 20 mL, e finalmente em 2 mL de glicerol 10%. As células foram armazenadas em alíquotas de 100 µL a -80°C para uso posterior.

### 3.2.3 Preparação de cepas de *E. coli* para transformação por choque térmico

Para a obtenção de cepas de *E. coli* competentes para choque térmico, as cepas de interesse foram pré-inoculadas em 10 mL de LB e crescidas durante a noite (16 horas) a 37°C, sob agitação de 200 rpm. No dia posterior, o pré-inóculo (5 mL) foi diluído em 500 mL de meio LB e as células foram crescidas a 37°C, sob agitação de 200 rpm até atingirem  $DO_{600nm}$  de 0,5. Após atingida a DO, as células foram deixadas em banho de gelo por 5-10 minutos. As células foram centrifugadas a 1.600 x g por 7 minutos a 4°C, o sobrenadante descartado e o precipitado obtido ressuspenso em 10 mL de uma solução gelada de cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub> 60 mM, glicerol 15%, PIPES 10 mM, pH 7,0). As células ressuspensas foram centrifugadas a 1.100 x g por 5 minutos a 4°C, o sobrenadante descartado e o precipitado obtido ressuspenso em 2 mL de

solução de cloreto de cálcio como descrito acima. As células foram aliqüotadas em 100 µL em tubos do tipo eppendorf e armazenadas em ultra freezer a -80°C.

### **3.2.4 Transformação de bactérias competentes com vetor de expressão**

Durante o projeto aqui descrito, a transformação das bactérias com os vetores de interesse foi realizada, inicialmente, através do método de eletroporação; sendo, entretanto, após algum tempo, realizada somente pelo método de choque térmico. Para tanto descreve-se a seguir as duas metodologias utilizadas.

#### **3.2.4.1 Transformação por eletroporação**

No método de eletroporação, utilizou-se um eletroporador MicroPulser™ Electroporation Apparatus (Bio-Rad®), sendo o protocolo descrito a seguir:

- 100 µL de bactérias eletrocompetentes foram descongeladas em gelo e posteriormente 1µL de solução plasmidial contendo o plasmídio de interesse foi adicionado;
- O homogeneizado foi incubado em banho de gelo por 1 minuto e após o tempo de incubação, foi transferido para uma cubeta de eletroporação (0,2 cm) e posteriormente submetido a um pulso de 2kV por 5 milisegundos (características do programa EC2 do MicroPulser);
- 1mL de meio SOC foi adicionado e o homogeneizado foi incubado a 37°C por 1 hora, sob agitação constante de 200 rpm (Orbital Shaker 420 – Thermo Forma®);
- Após a incubação, as bactérias foram centrifugadas a 2.600 x g (Centrifuge 5417C – Eppendorf®) em temperatura ambiente, durante 1 minuto para a

remoção de 1 mL de meio de cultura e o volume residual foi utilizado para ressuspender as bactérias sedimentadas;

- 100  $\mu$ L da suspensão foram espalhadas, com o auxílio de alça de “Drigalsky”, em placas de Petri contendo meio de cultura sólido (LB) com o(s) antibiótico(s) apropriado(s) para a seleção e crescimento dos clones transformados, sendo então incubados a 37°C por 16 horas sob agitação constante de 200 rpm.

### **3.2.4.2 Transformação por choque térmico**

No método de transformação por choque térmico, o protocolo utilizado foi o descrito a seguir:

- As células competentes (100  $\mu$ L) foram colocadas em um tubo do tipo eppendorf de 1,5 mL;
- Aos tubos mantidos em banho de gelo, 1  $\mu$ L de solução plasmidial contendo o plasmídeo de interesse foi adicionado e deixou-se incubar por 10 minutos;
- Os tubos foram colocados em um banho previamente estabilizado a 42°C e deixados incubar por 45 segundos;
- Os tubos foram novamente incubados em banho de gelo por 2 minutos a fim de reduzir possíveis danos às bactérias;
- A cada tubo foi adicionado 1 mL de meio LB sem antibiótico e deixado incubar por 1 hora a 37°C sob agitação de 200 rpm;
- Os tubos foram brevemente centrifugados a 2.600 x g em temperatura ambiente para posterior remoção de 1 mL de meio de cultura para que o volume residual fosse utilizado para ressuspender as células;
- O volume residual com as células ressuspensas foi espalhado com o auxílio de alça de “Drigalsky”, em placas de Petri contendo meio de cultura sólido (LB) com o(s) antibiótico(s) apropriado(s) para a seleção e crescimento dos clones transformados, sendo então incubados a 37°C por 16 horas e sob agitação constante de 200 rpm.

### 3.2.5 Expressão de proteínas

O sistema de expressão utilizado para a produção das proteínas utilizadas neste projeto foi o sistema pET descrito por Studier et al. (1990). As características desse sistema já foram descritas no item 3.1.2, pág. 59. As colônias de bactérias *E. coli* das linhagens utilizadas – transformadas com os plasmídios do tipo pET contendo o cDNA codificante da proteína a ser expressa – inicialmente crescidas em placa de Petri contendo meio LB ágar, foram raspadas e pré-inoculadas em meio LB contendo antibiótico apropriado e incubadas a 37°C, durante a noite, sob agitação constante de 200 rpm (Orbital Shaker 420™). No dia seguinte, transferiu-se um determinado volume do pré-inóculo (na proporção de 1:50) para um volume maior de meio LB para proceder a indução em grande escala (4 L). O volume de 4 L foi submetido à agitação constante de 200 rpm a 37°C (INNOVA 44™) para o crescimento da cultura bacteriana, sendo esse crescimento monitorado até que a  $DO_{600nm}$  atingisse 0,6-0,8. Atingida a fase de crescimento apropriada, as bactérias foram induzidas à expressão heteróloga em resposta à adição de IPTG na concentração final de 0,4 mmol/L. A cultura foi submetida à agitação constante de 200 rpm por 4 horas ou 16 horas a 37°C (no caso das sHsp17 e sHsp18 de cana-de-açúcar e Hsp40 (DjA1) humana) e 42°C (no caso das apomioglobinas). Na condição de 42°C, as apomioglobinas produzidas são estocadas em corpos de inclusão (RIBEIRO-JR et al., 2003). Decorridos os tempos de indução, as culturas foram centrifugadas a 6.000 x g por 15 min, a 4°C (Himac CR22G High-Speed Refrigerated Centrifuge™ - Hitachi®; rotor R9AF), e o precipitado foi armazenado a -80°C. Para determinar o melhor tempo de indução para cada proteína recombinante, 50 mL de cultura de células foram induzidas nas condições descritas acima e alíquotas de 0,5 mL foram retiradas a cada hora. Essas alíquotas foram preparadas e avaliadas por SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970), como descrito no item 3.2.8.1, pág. 77.

### **3.2.6 Lise das bactérias**

#### **3.2.6.1 Lise das bactérias contendo as apomioglobinas recombinantes**

As bactérias presentes no precipitado obtido após o processo de expressão heteróloga, foram lisadas em banho de gelo com auxílio do sonicador Sonifier 450™ (Branson®). O processo de sonicação foi realizado da seguinte forma:

1. Ao precipitado bacteriano descongelado foi adicionado, na proporção de 10mL/L de indução, um tampão de lise contendo Tris-HCl 50 mM pH 8,0, KCl 100 mM e EDTA 1 mM;
2. A suspensão foi sonicada obedecendo-se a uma seqüência alternada de 12 segundos de sonicação (potência de saída de 40 Watts) seguida de um intervalo de 1 minuto, seqüência essa repetida 8 vezes;
3. A suspensão foi centrifugada a 13.000 x g por 15 minutos a 4°C (Sigma 4K15™; rotor 12256), sendo em seguida o sobrenadante separado e o precipitado ressuspenso no tampão de lise como indicado no passo 1;
4. Repetição dos passos 2 e 3 por mais 3x, sendo que no passo 2 a seqüência foi repetida somente 4x. O precipitado final obtido se refere aos corpos de inclusão.

##### **3.2.6.1.1 Lise dos corpos de inclusão e diálise preparatória**

A lise dos corpos de inclusão, obtidos após o processo de lise das bactérias, descrito anteriormente (item 3.2.6.1, acima), foi realizado da seguinte forma:

1. Após o término do passo 4 da lise bacteriana (item 3.2.6.1, acima) ao precipitado obtido, adicionou-se na proporção de 15 ml/L de indução, um tampão de

- solubilização (Tris-HCl 100 mM, pH 8,0 e cloreto de guanidina 8 M), sendo essa solução agitada delicadamente por 30-60 minutos em um agitador magnético;
2. Após a agitação descrita acima, a solução ambientada em banho de gelo foi sonicada em um sonicador Sonifier 450™ (Branson®), obedecendo-se a uma seqüência alternada de 12 segundos de sonicação (potência de saída de 20 Watts), seguida de um intervalo de 1,5 minuto, seqüência essa repetida 10 vezes;
  3. Após a sonicação, a solução foi centrifugada a 13.000 x g por 15 minutos, a 4°C (Sigma 4K15™; rotor 12256);
  4. O sobrenadante resultante do passo 3 descrito acima, foi transferido para outro frasco e a esse foi adicionado lentamente água ultra pura em q.s.p dobrar o volume;
  5. A solução descrita no passo 4 acima, foi cuidadosamente colocada em um saco de diálise e dialisada a 4°C contra 1 L de tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,2 ou 5,8 (no caso do mutante W7F/W14F) por 1 h (2x), seguidamente contra 2 L (16 horas) e no dia seguinte contra 1 L por 1 h;
  6. O dialisado foi centrifugado a 13.000 x g por 30 minutos a 4°C (Sigma 4K15™; rotor 12256) e em seguida filtrado em filtro Millipore 0,22 µm, para posteriormente ser utilizado na purificação (item 3.2.7, pág. 74). Foram coletadas alíquotas do sobrenadante e do precipitado para análise por SDS-PAGE (item 3.2.8.1, pág. 77).

### **3.2.6.2 Lise das bactérias contendo sHsps (17 e 18) de cana-de-açúcar e Hsp40 (DjA1) humana**

As bactérias presentes no precipitado, obtido após o processo de expressão heteróloga, foram lisadas em banho de gelo com auxílio do sonicador Sonifier 450™ (Branson®). O processo de sonicação foi realizado da seguinte forma:

1. Ao precipitado bacteriano descongelado foi adicionado, na proporção de 10mL/L de indução, um tampão de lise contendo Tris-HCl 50 mM pH 8,0, KCl 100 mM e EDTA 1 mM;
2. A suspensão foi sonicada obedecendo-se a uma seqüência alternada de 10 segundos de sonicação (potência de saída de 40 Watts), seguida de um intervalo de 1 minuto, seqüência essa repetida 12-16 vezes até que fosse observado um extremo estado de liquefação da solução;
3. A suspensão foi centrifugada a 13.000 x g por 15 minutos a 4°C (Sigma 4K15™; rotor 12256), sendo em seguida o sobrenadante separado para ser submetido aos passos de purificação específicos de cada proteína em questão.

### **3.2.7 Purificação das proteínas recombinantes**

As proteínas foram purificadas por metodologias pré-estabelecidas – com algumas modificações – por outros membros do grupo no qual este projeto foi realizado. Para a purificação das apomioglobinas, seguimos as metodologias descritas em Ribeiro-Jr et al. (2003) e Ribeiro-Jr e Ramos (2004). Quanto às chaperonas sHsps e Hsp40 (DjA1), seguimos as metodologias descritas em Tiroli e Ramos (2007) e Borges et al. (2005), respectivamente.

#### **3.2.7.1 Purificação das apomioglobinas**

##### **3.2.7.1.1 Cromatografia de troca aniônica**

Após a diálise e filtragem das soluções protéicas (descritas no passo 6 do item 3.2.6.1.1, pág. 73), o referido filtrado foi submetido a uma cromatografia em coluna de

troca aniônica DEAE-Sepharose (Fast Flow™, Pharmacia Biotech®). O processo de purificação foi feito com a coluna DEAE acoplada a um sistema FPLC™ÄKTA™ (Amershan Pharmacia Biotech®), com fluxo constante de 2,5 mL/min e limite de pressão em 0,3 MPa. O protocolo de purificação foi feito como descrito a seguir: equilíbrio da coluna com 2,5 volumes de coluna (VC), com tampão fosfato de sódio 50 mM pH7,2 (com exceção no caso da purificação do mutante W7F/W14F, no qual o pH foi de 5,8), seguida pela injeção da amostra, lavagem da coluna com 2,5 VC com coleta fracionada de 10 em 10 mL, eluição com gradiente linear de 1 M de NaCl por 2,5 VC, com coleta fracionada de 10 em 10 mL. Todo o processo foi realizado com monitoramento constante da absorbância a 280 nm, da temperatura e da condutância.

As frações coletadas foram submetidas à análise por SDS-PAGE, sendo que as frações contendo a proteína de interesse foram reunidas e dialisadas contra o tampão da corrida cromatográfica subsequente (item 3.2.7.1.2 abaixo).

### **3.2.7.1.2 Cromatografia de troca catiônica**

Após a junção das frações contendo a proteína de interesse, a solução final foi dialisada a 4°C contra 1 L de tampão acetato de sódio 10 mM pH 2,0 por 1 h (2x), seguidamente contra 2 L (16 horas) e no dia seguinte contra 1 L por 1 h. A solução final contida no saco de diálise foi então centrifugada a 13.000 x g (Sigma 4K15™; rotor 12256) por 30 min a 4°C e o sobrenadante foi filtrado em filtro 0,22 µm e submetido a uma cromatografia em coluna de troca catiônica CM-Sepharose (Fast Flow™, Pharmacia Biotech®). O processo de purificação foi feito com a coluna CM-Sepharose acoplada ao sistema FPLC™ÄKTA™ (Amershan Pharmacia Biotech®), com fluxo constante de 2,5 mL/min e limite de pressão em 0,3 MPa. O protocolo de purificação foi feito como descrito a seguir: equilíbrio da coluna com 2,5 volumes de coluna (VC) com o mesmo tampão utilizado na diálise (acetato de sódio 10 mM, pH 2,0), seguida pela injeção da amostra, lavagem da coluna com 2,5 VC, com coleta fracionada de 10 em 10 mL, eluição com gradientes fracionados de 1 M de NaCl por 3,35 VC, com coleta

fracionada de 10 em 10 mL, sendo 1 VC em gradiente de 0-15%, 1 VC em gradiente de 15%, 1 VC para gradiente de 15-25%, 0,2 VC em gradiente 25% e finalmente 0,15 VC em gradiente de 25-100%. Todo o processo foi realizado com monitoramento constante da absorbância a 280 nm, da temperatura e da condutância.

### **3.2.7.2 Purificação das sHsps (17 e 18) de cana-de-açúcar e Hsp40 (DjA1) humana**

As metodologias utilizadas na purificação das sHsps (17 e 18) de cana-de-açúcar e da Hsp40 humana (DjA1), se encontram descritas em Tiroli e Ramos (2007) e Borges et al. (2005), respectivamente, sendo que os processos de seqüenciamento e clonagem já estavam estabelecidos, não sendo realizado no presente projeto.

Com relação às sHsps, após os processos de expressão e lise bacteriana, a solução final contendo a proteína de interesse (como descrito no fim do passo 3 do item 3.2.6.2, pág. 74) foi submetida a uma cromatografia de troca aniônica em coluna DEAE-Sephrose (Fast Flow™, Pharmacia Biotech®) – previamente equilibrada com 2 volumes de coluna de Tris-HCl 25 mM, pH 8,0 – usando um cromatógrafo do tipo FPLC™ ÄKTA™ (Pharmacia Biotech®). As sHsps foram eluídas com 150 mM de NaCl e posteriormente submetidas a um passo cromatográfico de exclusão molecular numa coluna HiLoad Superdex 200pg 26/60™ (Pharmacia Biotech®) – previamente equilibrada com Tris-HCl 25 mM, pH 8,0 e NaCl 100 mM – usando um cromatógrafo do tipo FPLC™ ÄKTA™ (Pharmacia Biotech®).

Quanto a Hsp40 humana (DjA1), a solução final contendo a proteína (como descrito no fim do passo 3 do item 3.2.6.2, pág. 74) foi aplicada numa coluna cromatográfica de afinidade com metal imobilizado HiTrap Chelating™ (Pharmacia Biotech®), usando um cromatógrafo FPLC™ ÄKTA™ (Pharmacia Biotech). A proteína foi eluída com 500 mM de imidazol e posteriormente submetida a um passo cromatográfico de exclusão molecular numa coluna HiLoad Superdex 200pg 26/60™ (Pharmacia Biotech®).

### **3.2.8 Processamento das proteínas purificadas**

As amostras de cada proteína, após purificadas, foram submetidas à análise por SDS-PAGE para avaliação do grau de pureza das mesmas, sendo posteriormente dialisadas a 4°C contra água ultra pura (no caso das apomioglobinas) ou em tampão apropriado para estocagem (no caso das chaperonas), concentradas com concentrador Aminco® (massa de exclusão de 10 KDa), avaliadas quanto a concentração pelo método de Edelhock (1967) (item 3.2.8.2, pág. 78) e por fim aliquotadas e estocadas a -20°C para uso posterior.

#### **3.2.8.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

As amostras coletadas em cada passo dos processos de indução e de purificação foram diluídas em tampão de amostra para eletroforese (Tris-HCl 50 mmol/L, pH 6,8, DTT 100 mmol/L, SDS 2%, azul de bromofenol 0,1% e glicerol 10%), fervidas durante 5 minutos e posteriormente centrifugadas por 2 min a 3.000 x g em microcentrífuga Eppendorf® (Centrifuge 5417C™) à temperatura ambiente. Essas amostras foram submetidas – juntamente com um padrão de massa molecular – à eletroforese em SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970). A eletroforese foi conduzida utilizando-se Mini-Protean II Dual Slab Cell™ (Bio-Rad®) com gel de empacotamento de 5%, gel de separação de 15% ou 12% e voltagem constante de 200 V por ~45 min. O gel foi corado por 30 min em solução contendo etanol:ácido acético:água 5:1:15 (v:v:v) e Coomassie Brilliant Blue R™ (Bio-Rad®) 0,25% e descorado em ácido acético:etanol:água 3:2:35 (v:v:v).

### 3.2.8.2 Determinação da concentração de proteínas

A concentração das proteínas foi determinada espectrofotometricamente utilizando um espectrofotômetro JASCO® (UV/Vis Spectrophotometer V-530™) através do método de Edelhock (1967) com algumas modificações. Para tanto, as amostras foram diluídas em tampão fosfato de sódio (25 mmol/L, pH 6,5, contendo cloreto de guanidina 7,5 mol/L) na proporção de 1:4 de amostra para a solução. As soluções de cloreto de guanidina, quando preparadas, tiveram suas concentrações aferidas em um refratômetro (Model 334610™, Spectronic Instrument®). Os valores obtidos na leitura do refratômetro foram inseridos na equação abaixo (PACE, 1986):

$$M_{GndHCl} = 57,147 \times (\Delta N) + 38,68 \times (\Delta N)^2 - 91,60 \times (\Delta N)^3 \quad \text{[Equação 1]}$$

onde  $M_{GndHCl}$  é a molaridade da guanidina (mol/L) e  $\Delta N$  é a diferença entre o índice de refração da solução de cloreto de guanidina e do tampão utilizado na preparação da solução.

Para a medida da concentração das proteínas, foi calculado o coeficiente de absorvância molar da proteína de interesse utilizando a fórmula:

$$\varepsilon_{(\lambda)} = n_{Trp} \times \varepsilon_{(Trp)} + n_{Tyr} \varepsilon_{(Tyr)} + n_{Cys} \varepsilon_{(Cys)} \quad \text{[Equação 2]}$$

onde,  $\varepsilon_{(\lambda)}$  é o coeficiente de absorvância molar ( $M^{-1}cm^{-1}$ ) da proteína de interesse em um determinado comprimento de onda  $\lambda$ ;  $n_{(Trp)}$ ,  $n_{(Tyr)}$  e  $n_{(Cys)}$  são o número de triptofanos, tirosinas e cistinas da proteína;  $\varepsilon_{(Trp)}$ ,  $\varepsilon_{(Tyr)}$  e  $\varepsilon_{(Cys)}$  são os coeficientes de absorvância molar em um determinado comprimento de onda do triptofano, da tirosina e da cistina, respectivamente. Os valores dos coeficientes de absorvância molar desses aminoácidos variam de acordo com o comprimento de onda (Tabela 5, pág. 79). O coeficiente de absorvância molar da proteína de interesse foi estimado pelo programa ProtParam tool (GASTEIGER et al., 2005) disponível em <<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>>.

**Tabela 5. Coeficientes de absorvância molar do Triptofano ( $T_{rp}$ ), Tirosina ( $T_{yr}$ ) e Cistina ( $C_{ys}$ ) em GdnHCl 6 M. (Adaptado de PACE et al., 1995).**

$\lambda$	$\varepsilon T_{rp} (M^{-1}.cm^{-1})$	$\varepsilon T_{yr} (M^{-1}.cm^{-1})$	$\varepsilon C_{ys} (M^{-1}.cm^{-1})$
276	5405	1455	160
278	5565	1395	140
280	5685	1285	125
282	5635	1220	115

A média da concentração protéica foi determinada através das absorvâncias aferidas nos 4 comprimentos de onda e utilizando-se da fórmula:

$$A = \varepsilon \times l \times C \quad \text{[Equação 3]}$$

onde  $A$  é a absorvância;  $l$  o comprimento do caminho óptico (cm),  $\varepsilon$  o coeficiente de absorvância molar ( $M^{-1}.cm^{-1}$ ) e  $C$  a concentração molar (mol/L). As leituras de absorvância, para cada comprimento de onda relacionado, foram realizadas em triplicada.

### 3.2.9 Indução de fibrilas amilóides

Para a indução amiloidogênica das apomioglobinas, as proteínas foram preparadas em tampão borato de sódio 50 mM, pH 9,0 em concentração mínima de 30  $\mu$ M (conforme exigência de amostra para os experimentos) e incubadas a 65°C (Dry Bath Incubator™, Boekel Scientific®) por até 15 dias (FÄNDRICH et al., 2001). Em intervalos de tempo específicos, foram retiradas alíquotas para a realização dos experimentos de dicroísmo circular (CD), ligação de ThT, ligação de bis-ANS e ligação de vermelho de Congo.

### 3.2.10 Espectros de dicroísmo circular (CD)

Os espectros de CD foram medidos utilizando-se um espectropolarímetro J-810™ (JASCO®), cubetas de quartzo de 1 cm, 5 mm e 2 mm de caminho óptico e proteínas diluídas até a condição na qual fornecessem sinal a 222 nm necessariamente entre -20 e -40 miligraus (intervalo no qual a relação sinal/ruído é baixa). Todas as medidas foram feitas sob fluxo de nitrogênio de 10L/min. Os resultados são a média de 16 espectros de 200-260 nm lidos a uma velocidade de 50 nm/min, 1 s de resposta, tendo como branco e tampão os informados nas legendas dos gráficos referentes aos resultados. O programa utilizado para o registro dos dados foi o Spectra Manager® (JASCO), sendo que para o tratamento e confecção do gráfico dos dados obtidos, utilizou-se os programas Origin 6.1® ou Pro8.0 SR0® (OriginLAB Corporation®). A temperatura da cela foi mantida constante a 25°C através de um sistema interno de controle (Peltier Type Control System PFD 425S™, JASCO®) e controlador externo de temperatura NESLAB RTE Series (NESLAB®). Os valores obtidos na leitura de CD (miligraus) foram convertidos para elipticidade molar residual ( $[\theta]_{EMR}$ ) que é definida pela seguinte equação:

$$[\theta]_{EMR} = (\theta \times 100 \times MM) / (C \times l \times n) \quad \text{[Equação 4]}$$

onde  $\theta$  é a elipticidade em graus,  $MM$  é a massa molecular da proteína (Da),  $C$  é a concentração da proteína (mg/mL),  $l$  é o comprimento do caminho óptico (cm) e  $n$  é o número de resíduos de aminoácidos da respectiva proteína. Para o cálculo das porcentagens de estruturas secundárias, utilizou-se o programa CDNN Deconvolution® Versão 2.1, com a base NNET\_23 que conta com 23 espectros para a análise do espectro da proteína de interesse, por combinação linear dos espectros da base. Esses últimos previamente calculados a partir de espectros de CD de um grupo de proteínas de referência, com estrutura em 3D conhecida. A seguir (Tabela 6, pág 81) apresentamos os erros inerentes ao programa, frente à referida base NNET\_23.

**Tabela 6. Erro médio embutido nas predições de estruturas secundárias de acordo com a faixa de leitura.**

$\lambda$ (nm)	180-260	185-260	190-260	195-260	200-260	205-260	210-260
<b>NNET_23</b>	5,0%	5,1%	5,0%	5,2%	5,4%	5,5%	5,4%

### 3.2.11 Monitoração temporal da fluorescência de ThT

Em intervalos de tempo determinados, alíquotas de 100  $\mu$ L foram retiradas das soluções descritas no item 3.2.9, pág. 79, e misturadas com 500  $\mu$ L de uma solução de ThT em água ultra pura, sendo a proporção final de ThT:proteína de 5:1. Após 10 minutos de equilíbrio da mistura anterior, a ligação de ThT foi então monitorada por fluorescência (ISS Multifrequency Phase Fluorometer K2™) com excitação em 450 nm e espectro de emissão entre 460 e 600 nm. Os espectros foram lidos a 25°C, na velocidade de 1 nm/s com aberturas de janelas para excitação e emissão de 1 mm, sendo os resultados de cada ponto do espectro a média de 10 leituras. Para a montagem da cinética, a intensidade de fluorescência em 482 nm ( $\lambda_{\text{max}}$  de emissão) foi graficada em função do tempo, e os dados foram ajustados para uma função exponencial simples do tipo:

$$F = F_{\text{max}} + k \times \exp(-t/\tau) \quad \text{[Equação 5]}$$

onde  $F$  é a intensidade de fluorescência medida a 482 nm;  $F_{\text{max}}$  é a máxima intensidade de fluorescência medida a 482 nm, essa correspondendo ao máximo de agregação das fibrilas amilóides (VILASI et al., 2006);  $k$  é a diferença entre a intensidade de fluorescência máxima e a inicial; e  $\tau$  (h) o inverso da taxa de formação de fibrilas amilóides ( $\nu$ ). A intensidade de fluorescência a 482 nm foi corrigida, subtraindo-se da mesma a intensidade de emissão a 482 nm da solução de ThT, antes da adição da alíquota contendo a proteína em estudo. Como branco foi utilizado uma solução de proteína selvagem “fresca” proveniente de uma amostra do estoque (com não mais de 3 semanas) congelada a -20°C em água ultra pura. Para tanto, a amostra

do estoque foi descongelada à temperatura ambiente e então diluída apropriadamente em tampão, para obtenção da proteína nas mesmas condições para indução amiloidogênica (borato de sódio 50 mM, pH 9), não sendo aquecida, sendo diluída com ThT como descrito anteriormente, aguardado os 10 minutos de equilíbrio e lida no fluorímetro a temperatura ambiente.

### 3.2.12 Titulação de ThT para cálculo da constante de dissociação aparente ( $K_{dis}$ )

A titulação de ThT foi analisada considerando-se uma reação de ligação em equilíbrio simples, definida por uma constante de dissociação ( $K_{dis}$ ) de primeira ordem. Os dados experimentais foram fitados por uma curva isotérmica de ligação dada pela equação que segue (VAZ et al., 2006):

$$Y = \frac{(1 + [L]_t / [P]_t + K_{dis} / [P]_t) - \sqrt{(1 + [L]_t / [P]_t + K_{dis} / [P]_t)^2 - 4 \times [L]_t / [P]_t}}{2} \quad \text{[Equação 6a]}$$

com  $Y$ , grau de saturação, dado pela equação:

$$Y = \frac{\Delta F_i}{\Delta F_{max}} \quad \text{[Equação 6b]}$$

onde  $\Delta F_i = (F_{obs} - F_{min})$  representa a diferença entre a intensidade de fluorescência após cada adição de ThT ( $F_{obs}$ ) e a intensidade de fluorescência na ausência de ThT ( $F_{min}$ ).  $\Delta F_{max} = (F_{max} - F_{min})$  representa a variação máxima da intensidade de fluorescência, com ( $F_{max}$ ) sendo a intensidade de fluorescência quando a proteína está totalmente saturada com ThT.  $[P]_t$  é a concentração total de proteína e  $[L]_t$  a concentração total de ligante após cada adição de ThT. Para a titulação, alíquotas de 100  $\mu$ L de 30  $\mu$ M de proteínas induzidas à amiloidogênese, foram colhidas em tempos determinados, diluídas em água ultra pura até 600  $\mu$ L (solução final com 5  $\mu$ M de proteínas), e submetidas à crescentes quantidades de ThT, sendo que ao

completar a titulação, o volume final não excedeu em mais de 3% o inicial de 600  $\mu$ L. Os parâmetros de excitação e emissão, bem como correções e branco utilizados, são os mesmos descritos no item 3.2.11, pág. 81. O dados graficados são a média de duas leituras em quintuplicata.

### **3.2.13 Ligação de bis-ANS**

Em intervalos de tempo determinados, alíquotas de 100  $\mu$ L foram retiradas das soluções descritas no item 3.2.9, pág. 79. A essa alíquota foi adicionado um volume apropriado da solução estoque de bis-ANS, sendo a proporção final de bis-ANS:proteína de 1:2. Após 10 minutos de equilíbrio, a ligação de bis-ANS foi então monitorada por fluorescência (ISS Multifrequency Phase Fluorometer K2™), com excitação em 350 nm e espectro de emissão entre 400 e 600 nm. Os espectros foram medidos a 20°C na velocidade de 1 nm/s com aberturas de janelas para excitação e emissão de 1 mm, sendo os resultados de cada ponto do espectro a média de 10 leituras. Os pontos graficados, representam a intensidade máxima de fluorescência obtida em 492 nm. Para branco foi realizado o mesmo procedimento como descrito no fim do item 3.2.11, pág. 81, com as devidas correspondências.

### **3.2.14 Cálculo da energia de ativação do processo amiloidogênico monitorado por CD e fluorescência de ThT**

Foram realizados ensaios para a determinação da energia de ativação do processo de formação de folhas- $\beta$ , através do aumento de sinal de dicroísmo circular a 216 nm, e da formação de fibrilas amilóides, observando a fluorescência de ThT a 482 nm. A cinética de formação de folha- $\beta$  foi monitorada através do acompanhamento do ganho de sinal de CD a 216 nm, mantendo a proteína de estudo em uma temperatura

fixa, sendo utilizada uma cubeta de quartzo de 1 mm de caminho óptico. As temperaturas testadas foram: 35, 45, 55 e 65 °C. A concentração de proteína utilizada foi de 4 µM em borato de sódio 50 mmol/L, pH 9,0. Os dados coletados para a formação de folha-β foram corrigidos para elipticidade molar residual, utilizando a equação 4 citada no item 3.2.10, pág. 80, normalizados e utilizados para tratamento posterior dos dados para construção do gráfico de Arrhenius.

A cinética de formação de fibrilas amilóides foi monitorada através da fluorescência de ThT. Para tanto, amostras de apomioglobinas (30 µM em borato de sódio 50 mM, pH 9,0) foram incubadas em diferentes temperaturas. Nos tempos determinados, as amostras foram diluídas cinco vezes com solução de ThT, previamente preparada da solução estoque descrita no item 3.1.3.5, pág. 63, sendo a proporção final de ThT:proteína de 5:1, e a mistura incubada por 10 min à mesma temperatura anterior da amostra. Em seguida, nessa mesma temperatura, foi realizada a leitura da fluorescência em um fluorímetro Aminco Bowman® Series 2 (SLM-AMINCO®). A temperatura da cela de leitura foi controlada por um banho digital Polyscience®. A emissão de fluorescência do ThT foi lida de 460-600 nm com excitação a 450 nm e abertura de janelas para excitação e emissão de 4 nm. Foram utilizadas cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico e as medidas corrigidas da mesma forma como descrita no fim do item 3.2.11, pág. 81. As médias dos dados coletados foram normalizados e utilizados no tratamento posterior para a construção do gráfico de Arrhenius.

Os dados de CD e fluorescência de ThT foram analisados através de um ajuste exponencial simples, conforme descrito pela seguinte equação (MARCON et al., 2006):

$$Y = Y_0 + B \times \exp(-t/k_{app}) \quad \text{[Equação 7]}$$

onde  $Y_0$  é o valor máximo do sinal da sonda utilizada (considerando-se que os dados das sondas foram normalizados, o valor máximo apresenta-se sempre igual a 1),  $B$  é a amplitude da mudança do sinal da sonda,  $k_{app}$  é a constante aparente para o evento analisado e  $t$  é o tempo (horas).

A partir dos valores de  $k_{app}$ , foi construído um gráfico de  $\ln k_{app} \times 1/T$ . Dos pontos desse gráfico foi feito um ajuste linear com a equação de Arrhenius:

$$\ln k_{app} = \ln A - E_a/R \times T \quad \text{[Equação 8]}$$

onde  $E_a$  e  $A$  são constantes características da reação ( $E_a$  é a energia de ativação e  $A$  o fator de frequência ou fator pré-exponencial),  $R$  é a constante dos gases perfeitos ( $8,3145 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ ) e  $T$  é a temperatura absoluta. Esse ajuste foi utilizado para obtenção dos parâmetros de Arrhenius referentes à formação de folhas- $\beta$  e da formação de fibrila.

### 3.2.15 Desenovelamento químico induzido por uréia

Algumas apomioglobinas selecionadas – por razões que veremos no decorrer deste manuscrito – foram submetidas à concentrações crescentes de uréia, que variaram de 0 a 8 M, em duas condições tamponantes: tampão Hepes 10 mM pH 7,8 e tampão citrato de sódio 4 mM pH 4,2. O volume final utilizado no ensaio foi de 2 mL. As soluções de uréia foram preparadas na data ou no dia anterior da realização dos experimentos e suas concentrações foram aferidas em um refratômetro. Os valores obtidos na leitura do refratômetro foram inseridos na equação abaixo (PACE, 1986):

$$M_{Uréia} = 117,66 \times (\Delta N) + 29,753 \times (\Delta N)^2 - 185,56 \times (\Delta N)^3 \quad \text{[Equação 9]}$$

onde  $M_{Uréia}$  é a molaridade da uréia (mol/L) e  $\Delta N$  é a diferença entre o índice de refração da solução contendo uréia e do tampão utilizado.

O grau de desenovelamento foi monitorado a 4°C através da leitura do sinal de dicroísmo circular a 222 nm para monitorar a perda de estrutura secundária, especificamente de hélice- $\alpha$  (estrutura secundária predominante na apomioglobina). Para tanto, foram usadas cubetas de quartzo de 5 mm de caminho ótico, sendo os resultados a média de 61 leituras realizadas ao longo de 1 min em intervalos de 1 s. Os

brancos utilizados foram os próprios tampões de cada condição ao longo da variação de 0-8 M de uréia. Cada alíquota de proteína, em uma determinada concentração de desnaturante foi equilibrada por 10 min a 4°C antes das leituras. As proteínas foram comparadas contra a forma selvagem no que se refere à estabilidade dessas, frente ao aumento contínuo de desnaturante. Essa comparação foi feita através de dois parâmetros: da avaliação do  $C_m$  (concentração de desnaturante no ponto médio de transição), nas condições de pH 7,8 e 4,2 e da energia livre de desenovelamento ( $\Delta G^{\circ}_{N-D}$ ) calculada na condição de pH 4,2, parâmetros esses obtidos como descrito no item 3.2.16 a seguir. Para o cálculo desses parâmetros, os dados obtidos foram tratados adequadamente nos programas Origin 6.1® ou Pro8.0 SR0® (OriginLAB Corporation®).

### 3.2.16 $C_m$ e variação da energia livre ( $\Delta G^{\circ}_{N-D}$ ) de desenovelamento

A energia livre de desenovelamento ( $\Delta G^{\circ}_{N-D}$ ) das proteínas selecionadas foi calculada através dos dados medidos do experimento de desnaturação em equilíbrio (item 3.2.15, pág. 85), na condição tamponante com citrato de sódio 4 mM, pH 4,2, na qual o desenovelamento é considerado como sendo de dois estados (intermediário para o desenovelado) (KAY e BALDWIN, 1996).  $C_m$  é a concentração de desnaturante no ponto médio de transição entre os dois estados.

O cálculo da variação da energia livre ( $\Delta G^{\circ}_{N-D}$ ) foi realizado através do método de extrapolação linear, utilizando-se dos dados de pré e pós-transição (SANTORO e BOLEN, 1988), como os obtidos de experimentos de proteínas com o desenovelamento em dois estados e reversível, aplicável no experimento anteriormente descrito. Considerando-se que a transição do estado nativo (N) para o estado desenovelado (D) pode ser descrita por um processo de dois estados, aceita-se que:

$$f_N + f_D = 1$$

[Equação 10]

onde  $f_N$  é a fração de proteínas enoveladas e  $f_D$  a fração de proteínas desenoveladas. Utilizando-se uma variação da equação de Gibbs, que relaciona energia livre com a constante de equilíbrio:

$$\Delta G = -R \times T \times \ln k_{eq} \quad \text{[Equação 11]}$$

sendo  $\Delta G$  a variação de energia livre do processo (kcal/mol),  $R$  a constante universal dos gases (1,987 Cal/K.moL),  $T$  a temperatura absoluta e  $k_{eq}$  a constante de equilíbrio, temos que:

$$k_{eq} = f_D / f_N \quad \text{[Equação 12]}$$

considerando o valor da sonda utilizada para seguir o desenovelamento como  $Y$  temos:

$$Y = (Y_N \times f_N) + (Y_D \times f_D) \quad \text{[Equação 13]}$$

$$\text{logo: } k_{eq} = Y_N - Y / Y - Y_D \quad \text{[Equação 14]}$$

podemos então calcular a variação da energia livre em função de  $Y$  para cada ponto dentro da zona de transição, sendo o  $\Delta G$  observado ( $\Delta G_{obs}$ ) tido como:

$$\Delta G_{obs} = -R \times T \times \ln k_{eq} \quad \text{[Equação 15]}$$

com  $k_{eq}$  a constante de equilíbrio para cada ponto  $Y$  dentro da zona de transição (Equação 14). Assim sendo, tanto a pré-transição (estado nativo enovelado ou N) quanto a pós-transição (estado desenovelado ou D), podem ser descritas por equações de retas do tipo:

$$Y_N = m_N \times [\text{uréia}] + Y_{N_0} \quad \text{[Equação 16]}$$

$$Y_D = m_D \times [\text{uréia}] + Y_{D_0} \quad \text{[Equação 17]}$$

nas quais  $Y_N$  e  $Y_D$  são os valores da sonda, em função da concentração de desnaturante, dentro da pré e pós transições, respectivamente;  $Y_{N_0}$  e  $Y_{D_0}$  representam

os valores da sonda nos respectivos interceptos (sem desnaturante) da pré e pós transições,  $m_N$  e  $m_D$  representam as inclinações das retas (dependência do valor da sonda em relação ao desnaturante).

Desenvolvendo melhor a equação 14 obtemos:

$$Y = Y_N + (Y_D \times k_{eq}) / (1 + k_{eq}) \quad \text{[Equação 18]}$$

e reescrevendo a equação 18, utilizando a combinação das equações 15, 16 e 17 e utilizando-se a inclinação da reta, obtida de um gráfico de  $\Delta G_{obs}$  (kCal/mol) versus concentração de uréia, obtemos:

$$Y = \left\{ \frac{(Y_{N_0} + m_N \times [uréia]) + (Y_{D_0} + m_D \times [uréia]) \times \exp(-((\Delta G_{H_2O} + m \times [uréia]) / R \times T))}{(1 + \exp(-((\Delta G_{H_2O} + m \times [uréia]) / R \times T)))} \right\} \quad \text{[Equação 19]}$$

onde  $\Delta G_{H_2O}$  é a variação de energia na ausência de uréia,  $R$  é a constante dos gases (1,987 Cal/K.mol) e  $T$  é a temperatura absoluta na qual o experimento foi realizado. Essa equação foi utilizada para ajustar as curvas de enovelamento para obter os parâmetros  $\Delta G_{H_2O}$  (kCal/mol) – energia de desenovelamento na ausência de desnaturante – e  $m$  (kCal/mol.M) – constante relacionada ao grau de exposição da proteína ao desnaturante (TANFORD, 1968). Para o cálculo de  $C_m$ , na condição de pH 7,8, o mesmo foi encontrado manualmente através de extrapolação gráfica na condição, enquanto que na condição de pH 4,2, utilizamos a equação abaixo.:

$$C_m = \Delta G_{H_2O} / m \quad \text{(VAZ et al., 2006)} \quad \text{[Equação 20]}$$

### 3.2.17 Desenovelamento induzido por acidificação

Amostras em água ultra pura das apomioglobinas selecionadas foram diluídas até a concentração final de 2  $\mu$ M e volume final de 2 mL em diferentes tampões citrato de sódio/ácido cítrico 2 mM, contendo 30 mM de NaCl. Esse procedimento permitiu a

obtenção de soluções da proteína de interesse em diversas condições de pHs que variaram de 7,7 a 2,0. A variação de pH, necessária para o ensaio de desenovelamento ácido, foi obtida pela mistura de diferentes proporções de citrato de sódio e ácido cítrico, mantendo-se a concentração final de 2 mM relativo ao citrato. Para obtenção de pHs inferiores a 3,0, adicionou-se concentrações crescentes de HCl a partir do tampão de ácido cítrico em pH 3,0. O grau de desenovelamento foi monitorado através do acompanhamento do sinal de dicroísmo circular (CD) no comprimento de onda de 222 nm utilizando o espectropolarímetro J-810™ (JASCO®), medida que permitiu a monitoração da perda de estrutura em hélice- $\alpha$  da proteína. Foram usadas cubetas de quartzo de 1 cm de caminho ótico termostalizadas a 4°C, através de um sistema interno de controle (Peltier Type Control System PFD 425S™, JASCO®) e controlador externo de temperatura NESLAB RTE Series (NESLAB). Cada solução de proteína foi equilibrada por 10 min a 4°C. Posteriormente, realizou-se o ensaio composto de 61 leituras (1/s) durante o intervalo de 1 min, sendo que ao fim de cada ensaio o pH foi checado (RAMOS et.al.,1999). Arranjando os dados obtidos na forma de sinal de CD x pH, foi possível, através de extrapolação gráfica, obter o valor de pH<sub>m</sub> que indica o valor de pH no ponto médio de transição entre dois estados.

### **3.2.18 Experimentos de semeadura**

Para a preparação das sementes (fibrilas pré-formadas), as proteínas foram incubadas a 65°C, por 48 horas, no meio de indução de fibrilas (borato de sódio 50 mM, pH 9,0). Após esse tempo, as amostras foram resfriadas em temperatura ambiente (~22°C), sonicadas por 15 segundos em um sonicador Sonifier 450™ (Branson®) e posteriormente filtradas em filtro 0,22  $\mu$ m (Millipore®). As sementes foram misturadas com as amostras frescas ambientadas em tampão borato de sódio 50 mM e pH 9,0, nas proporções finais de 0, 1% e 5% e incubadas a 65°C (instante considerado como o tempo zero do experimento). Em tempos determinados (6, 18, 72 e 160 horas), as amostras foram homogeneizadas e uma alíquota foi retirada para proceder a

quantificação da massa de fibrilas amilóides, através do método do desvio espectral do corante Vermelho de Congo como descrito no item 3.2.18.1 a seguir.

### 3.2.18.1 Quantificação da massa de fibrilas amilóides através do método de desvio espectral do Vermelho de Congo

Para quantificar a massa de fibrila amilóide formada ao longo do tempo de incubação no ensaio de semeadura (item 3.2.18, pág. 90), utilizamos o método descrito por Klunk et al. (1999). Nesse método é predito que a ligação do Vermelho de Congo à fibrila amilóide é independente da seqüência primária de resíduos de aminoácidos, sendo dependente somente da presença de estrutura em folha- $\beta$  pregueada e da presença de pelo menos um aminoácido carregado positivamente. O método foi inicialmente elaborado utilizando-se a proteína  $\beta$ -amilóide ( $A\beta$ ), sendo portanto necessária uma adaptação do mesmo (descrito pelo próprio autor), para adequar o método ao modelo de amilóide utilizado; no caso deste projeto, as apomioglobinas.

Para adaptar o método, utilizamos a proteína selvagem como modelo de amilóide, e para tanto realizamos todos os passos descritos nas páginas 303 e 304 do referido trabalho (KLUNK et al., 1999). Após todos os passos, foi possível chegar à fórmula final para o cálculo da massa de fibrilas amilóides (em  $\mu\text{g/mL}$ ) de apomioglobinas ( $apoMb_{fib}$ ):

$$apoMb_{fib} = \left( {}^{543}A_t / 4530 \right) - \left( {}^{400}A_t / 6610 \right) - ([VC] / 0,512) \quad \text{[Equação 21]}$$

onde  ${}^{543}A_t$  e  ${}^{400}A_t$  são a soma das absorbâncias da amostra de apoMb incubada com o Vermelho de Congo em 543 nm e 400 nm, respectivamente, e  $[VC]$  a concentração de Vermelho de Congo utilizada.

### **3.2.19 Cultura de células de mamíferos**

As células N2A foram cultivadas em meio DMEM completo. A cultura celular foi mantida em estufa com 95% de umidade atmosférica e 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

Quando não cultivadas, as células N2A permaneciam em soro fetal bovino inativado, contendo 10% de DMSO (crioprotetor) e criopreservadas em nitrogênio líquido (-196°C). Para cultivar as células N2A, elas foram retiradas do nitrogênio líquido, rapidamente colocadas a 37°C para descongelar. Em seguida, acrescentou-se 8 mL de meio DMEM completo (pré-aquecido a 37°C) e após leve agitação, a suspensão foi centrifugada por 1 minuto a 3.000 x g em temperatura ambiente para sedimentação das células no fundo do frasco. Retirou-se todo o meio, deixando o sedimento de células no fundo do frasco, e em seguida foram adicionados 5 mL de meio DMEM completo; então as células foram gentilmente ressuspensas e posteriormente, essa suspensão de células foi cultivada em um frasco plástico de cultura de 25 cm<sup>2</sup> (Corning®), em estufa com 95% de umidade atmosférica e 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. A cada 1 ou 2 semanas foram realizados repiques, de acordo com a densidade celular, ou da constatação da mudança de coloração do meio de cultura. Para a realização do repique, as células eram diluídas em meio de cultura novo. Primeiro retirava-se o meio antigo com pipeta pasteur, com o cuidado de não tocar o fundo do frasco para não aspirar as células, depois eram adicionados 5 mL de meio DMEM completo novo e as células então ressuspensas gentilmente. Posteriormente, 1 mL da solução anterior era distribuída em 5 frascos, e em seguida cada frasco era completado com 4 mL de meio DMEM completo novo (diluição final de 1:5).

### **3.2.20 Ensaio de citotoxicidade - redução do MTT**

O método utilizado foi adaptado do descrito por Mosmann (1983). Para o ensaio, uma suspensão de N2A foi distribuída em placa tipo Elisa (Greiner Bio-One®) de 96

poços (200 µL por poço), com densidade final de aproximadamente 1.000 células/poço. Após 24 horas, as células foram inoculadas com as amostras de proteínas, todas em Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, 100 µg/mL de estreptomicina, 100 U/mL de penicilina e 1 µg/mL de fungizona. Antes da inoculação, as amostras de proteínas foram submetidas à luz ultravioleta em fluxo laminar por 5 minutos. Em cada poço foram adicionados 20 µL do estoque de cada amostra (5 mg/mL), sendo a concentração final de proteína na cultura de 1 mg/mL. As amostras de proteínas foram: formas nativas, pré-fibrilas (obtidas como descrito no item 3.2.18, pág. 89) e fibrilas maduras (após 15 dias de indução). Os controles foram: células no meio DMEM completo e células que receberam apenas a alíquota do tampão idêntico ao das proteínas (borato de sódio 50 mM, pH 9,0). O período de incubação foi de 24 horas, em estufa com 95% de umidade atmosférica e 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Após o tempo de incubação, adicionou-se 20 µL de uma solução estoque (5 mg/mL) de MTT (Sigma-Aldrich®), para alcançar uma concentração final de MTT na cultura de 0,5 mg/mL, sendo posteriormente a cultura incubada na estufa por mais 4 horas. Ao final da incubação, as células foram rompidas com a adição de 200 µL por poço da solução de paralisação (20% SDS e 0,01 M HCl). A placa foi incubada num agitador orbital em temperatura ambiente (~22°C), coberta com papel alumínio. No dia seguinte, a absorbância de cada poço foi medida a 540 nm. A porcentagem de viabilidade celular foi então determinada, considerando como controle positivo (100%), as células não tratadas. Cada experimento de citotoxicidade foi feito em oito replicatas e o resultado apresentado é a média de três experimentos independentes.

### **3.2.21 Caracterização das fibrilas amilóides por difração de raios-X**

Para a difração de raios-X, as proteínas selecionadas foram preparadas na concentração de 2 mg/mL (~118 µM), volume final de 1,8 mL, e incubadas a 65°C em tampão borato de sódio 50 mM, pH 9,0 por 10 dias. Após o tempo de incubação, a solução foi dialisada contra água ultra pura a 4°C, para remoção total dos sais do

tampão. Para tanto, foram realizadas três trocas de 1 L de água ultra pura, com tempo de diálise de 1 h em cada etapa, e por último a amostra foi dialisada contra 5 L de água ultra pura por 24 horas. As amostras foram então centrifugadas a 10.000 x g por 10 minutos, e depois deixadas em banho seco para a secagem das fibrilas.

As coletas foram realizadas na linha D03B-MX1 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS). Os parâmetros de coleta foram: feixe de luz monocromática de  $\lambda=1,488 \text{ \AA}$ , distância entre a amostra e o detector (MAR345™) de 100 mm e aquisição da imagem de difração no modo de ângulo fixo por 15 minutos. Os dados foram escalonados e integrados com o programa HKL2000® (OTWINOWSKI e MINOR, 1997).

### **3.2.22 Atividade chaperona na prevenção de agregação e fibrilização do mutante W7F/W14F de apomioglobina**

Para testar a atividade chaperona das sHsps (17 e 18) de cana-de-açúcar e Hsp40 humana (DjA1), na prevenção da agregação e processo amiloidogênico de apomioglobina, utilizamos o mutante W7F/W14F como modelo amiloidogênico. A escolha desse mutante se fez devido à propriedade do mesmo (em uma clonagem contendo cauda de histidina), formar fibrila amilóide em pH fisiológico (pH 7) e à temperatura ambiente (25°C) (SIRANGELO et al., 2004), diferentemente da condição extrema (pH 9, 65°C, FÄNDRICH et al., 2001), utilizada no projeto aqui descrito. A condição amiloidogênica a 65°C utilizada neste projeto, é imprópria para os ensaios com as chaperonas utilizadas, isso em virtude da alta temperatura que é superior ao limiar de estabilidade dessas chaperonas (TIROLI-CEPEDA, 2007).

O mutante W7F/W14F foi expresso e purificado como descrito anteriormente. Após purificado, o mutante W7F/W14F foi reambientado em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 5, NaCl 200 mM. Para o teste da atividade chaperona, 30  $\mu\text{M}$  de W7F/W14F foram diluídos (15 vezes) em soluções de sHsps e Hsp40, todas em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7, NaCl 200mM, em diferentes proporções de W7F/W14F e

chaperonas. Após o preparo das diferentes soluções, as mesmas foram deixadas a 25°C por até 23 dias, sendo que em tempos determinados, uma alíquota foi retirada e então misturada com uma solução de ThT em fosfato de sódio 10 mM, pH 7, NaCl 200 mM, sendo a proporção final de ThT:proteínas de 5:1. A ligação de ThT foi então monitorada por fluorescência, com excitação a 450 nm e máximo de emissão a 482 nm. Como controle negativo, utilizamos a albumina bovina (BSA) e como branco, o mutante W7F/W14F “fresco”, proveniente de uma amostra do estoque (com não mais de 3 semanas) congelada a -20°C em água com pH 5,5. A amostra do estoque foi descongelada à temperatura ambiente e então diluída apropriadamente com as soluções das chaperonas, até as condições descritas anteriormente. Em seguida foram diluídas com ThT como descrito e imediatamente lida no fluorímetro à temperatura ambiente.

### **3.2.23 Dissociação de fibrilas amilóides induzida por uréia em pH 6 e 7**

Para avaliar a dissociação/desmontagem das fibrilas amilóides induzidas por uréia, fibrilas amilóides de apomiglobinas, após 10 dias de indução amiloidogênica (como descrito no item 3.2.9, pág. 79), foram incubadas em diferentes concentrações de uréia (0-8 M) em tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7 ou 6 por 24 horas a 25°C. Em seguida, uma alíquota foi misturada com solução estoque de ThT acrescida de uréia até a proporção final fibrila:ThT de 1:5 (4:20 µM). A dissociação/desmontagem das fibrilas foi aferida pela monitoração da fluorescência de ThT a 482 nm com excitação a 450 nm, tendo como branco, amostras preparadas da mesma forma descrita no fim do item 3.2.11, pág 81, com as devidas correspondências.

### 3.2.24 Análise Estatística

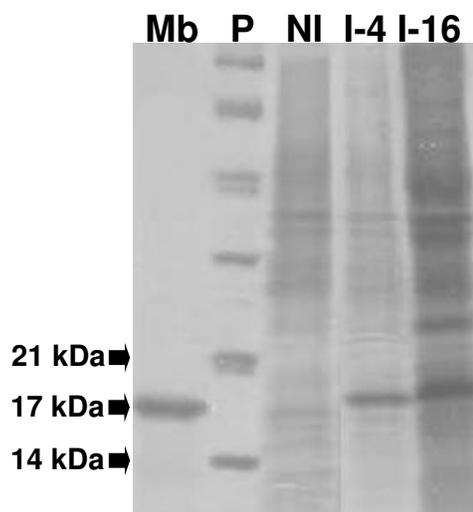
Em decorrência do objetivo deste trabalho – no qual visamos a comparação dos resultados obtidos de cada mutante da apomioglobina com a forma selvagem – para avaliarmos a presença ou não de diferenças estatisticamente significativas entre as taxas de amiloidogênese par a par (selvagem x mutante), aplicamos o teste “t” em par de Student, com distribuição bicaudal. Consideramos estatisticamente diferentes os pares analisados nos quais o nível de significância foi de  $p < 0,001$ . Quanto ao nível de significância para a análise de outros parâmetros, foi utilizado valor de  $p < 0,05$  ou  $p < 0,01$  (descritos nas tabelas apresentadas em resultados). As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa computacional Origin 6.1® ou Pro8.0 SR0® (OriginLAB Corporation®).

## 4 RESULTADOS

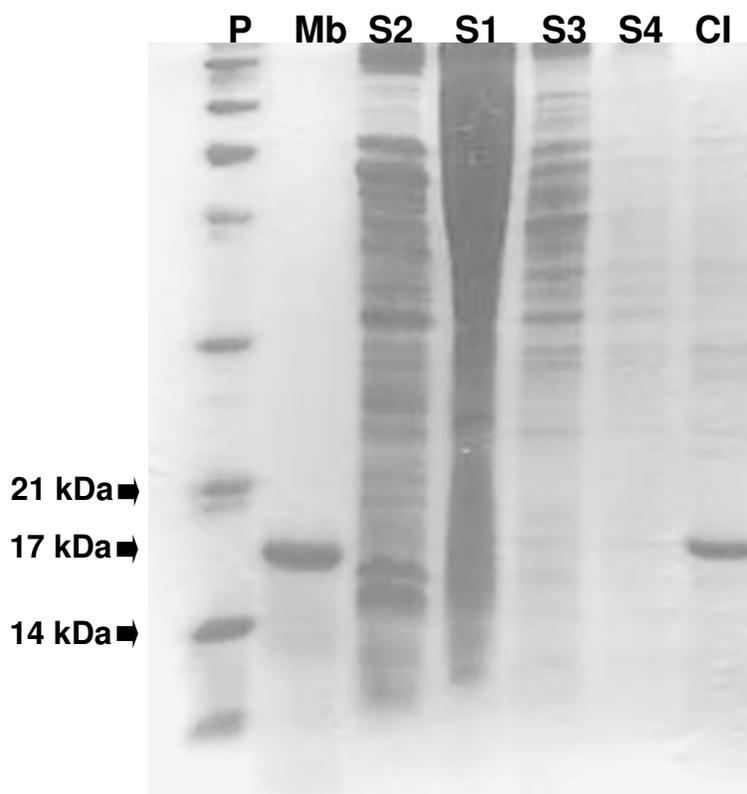
### 4.1 Expressão e purificação das proteínas

#### 4.1.1 Apomioglobinas

Os cDNAs das mioglobinas já se encontravam clonados em vetor pT7-7a ou pET3a (mutantes de permutação). Testes de indução (Figura 12) mostraram que as mioglobinas foram devidamente expressas após 4 ou 16 h de indução por IPTG 0,4 mmol/L a 42°C, ficando estocadas em corpos de inclusão. Todas as mioglobinas, selvagem e os 19 mutantes, foram expressas na sua forma apo (sem o grupamento heme), em linhagem *E. coli* BL21(DE3) (Figura 13, pág. 97).

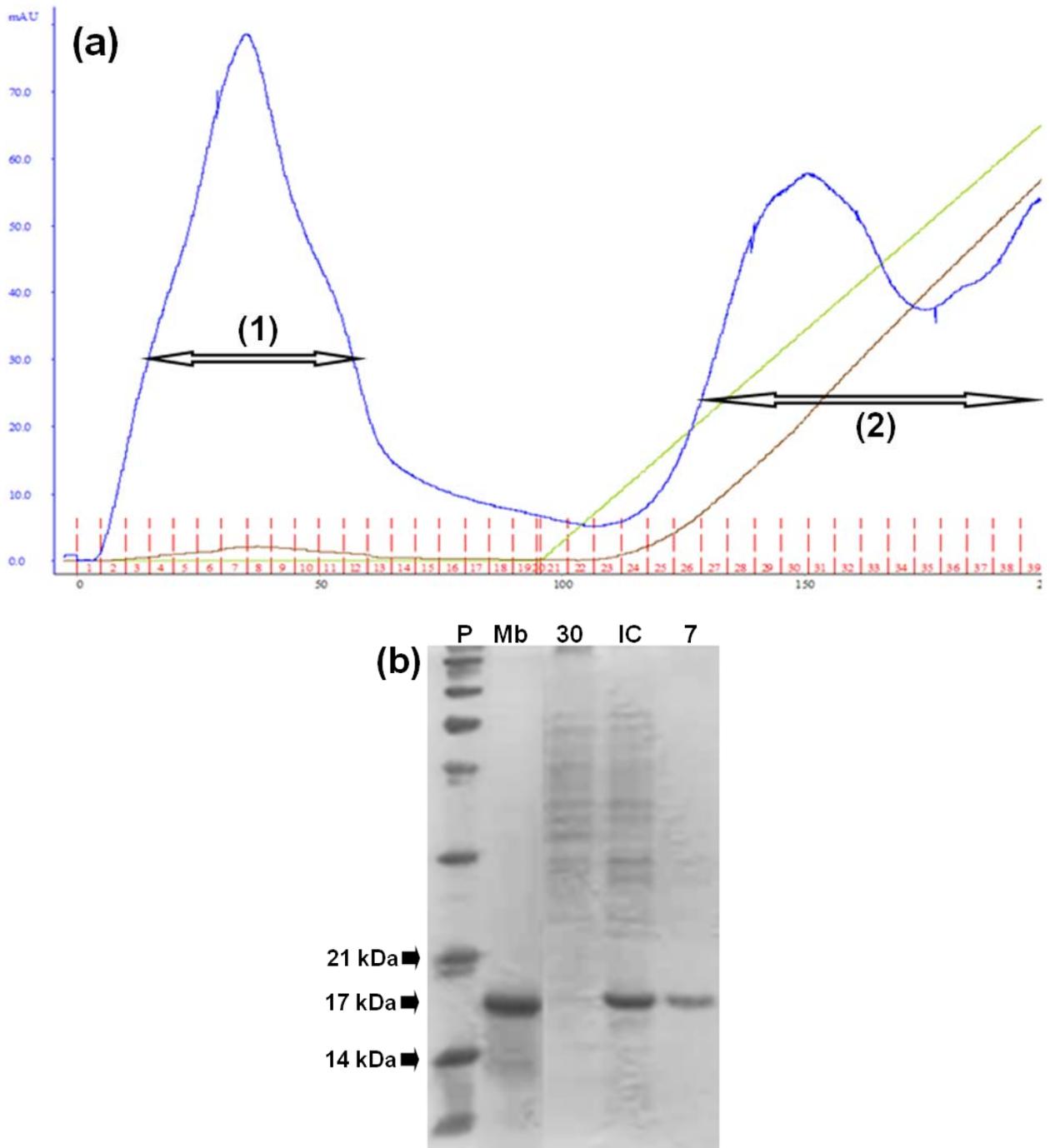


**Figura 12. Análise por SDS-PAGE (15%) do teste de indução com 0,4 mmol/L de IPTG do clone pET-T(7)H24V/H119F.** Uma cultura em pequena escala de *E. coli* BL21(DE3), foi transformada com o vetor pET-T(7)H24V/H119F e incubada a 37°C (**NI** - não induzida); para indução a 42°C adicionou-se IPTG (0,4mmol/L) e a cultura foi novamente incubada. Para análise, precipitados de alíquotas colhidas nas condições **NI** e após 4 e 16 horas de indução (**I-4** e **I-16**) foram ressuspensos em 100 µL de tampão de amostra para eletroforese, fervidos por 5 minutos e 10 µL foram submetidos à eletroforese em SDS-PAGE (15%). **Mb**: mioglobina de cavalo (17 kDa); **P**: padrão de massa molecular.

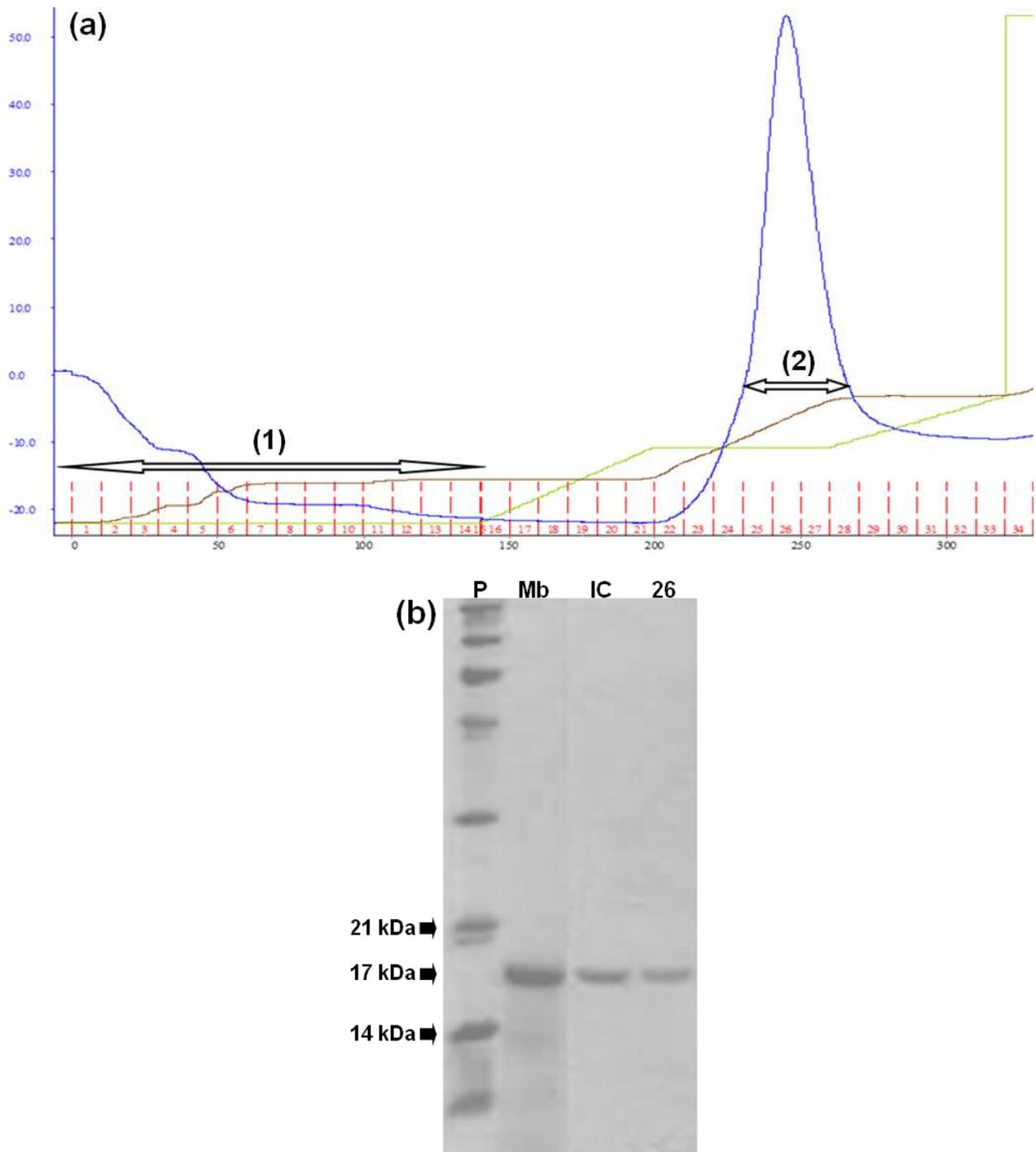


**Figura 13. Análise por SDS-PAGE (15%) do processo de lise de *E. coli* BL21(DE3) após expressão heteróloga de H24V/H119F induzida com IPTG 0,4 mmol/L por 4 h a 42°C.** Após 4 h de indução com IPTG 0,4 mmol/L a 42°C, a cultura foi centrifugada e os procedimentos de lise das bactérias e dos corpos de inclusão foram realizados como descritos nos itens 3.2.6.1 e 3.2.6.1.1, pág. 72, respectivamente. **P:** padrão de massa molecular; **Mb:** mioglobina de cavalo (17 kDa); **S1-S4:** 1° ao 4° sobrenadantes do processo de lise bacteriana; **CI:** sobrenadante obtido após processo de lise do corpo de inclusão, mostrando a banda referente ao mutante H24V/H119F.

As apomioglobinas foram purificadas em dois passos cromatográficos, sendo primeiramente realizada uma cromatografia de troca aniônica em coluna DEAE-Sepharose (Figura 14, pág. 98). Observou-se que nesse processo que as proteínas foram eluídas antes do gradiente de NaCl, com início de eluição entre 5 e 11 mL após a aplicação da amostra. Num segundo passo, foi realizada uma cromatografia de troca catiônica em coluna CM-Sepharose (Figura 15, pág. 99), no qual as apomioglobinas foram eluídas entre 13,5-18% de NaCl (135-180 mM).



**Figura 14. Perfil cromatográfico da purificação de H24V/H119F por troca aniônica.** (a) (1) proteínas não ligadas à coluna DEAE-Sepharose - eluídas durante a lavagem da coluna com tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,2 e (2) proteínas ligadas à coluna - eluídas durante o gradiente linear de NaCl; (b) SDS-PAGE 15% referente à cromatografia observada em (a). (**P**) padrão de massa molecular, (**Mb**) mioglobina, (**30**) fração eluída n° 30, (**IC**) amostra injetada na coluna, (**7**) fração eluída n° 7. (—): absorvância em 280 nm; (—): gradiente de NaCl com 100% correspondendo a 1M; (—): condutância; (||): frações eluídas.



**Figura 15. Perfil cromatográfico da purificação de H24V/H119F por troca catiônica.** (a) (1) proteínas não ligadas à coluna CM-Sepharose - eluídas durante a lavagem da coluna com tampão acetato de sódio 10 mM, pH 2,0 e (2) proteínas ligadas à coluna - eluídas durante o gradiente fracionado de NaCl; (b) SDS-PAGE 15% referente à cromatografia observada em (a). (**P**) padrão de massa molecular, (**Mb**) mioglobina, (**IC**) amostra injetada na coluna, (**26**) fração eluída n° 26. (—): absorvância em 280 nm; (—): gradiente de NaCl com 100% correspondendo a 1 M; (—): condutância; (||): frações eluídas.

Constatamos que após os processos de purificação, e processamento das proteínas (como descrito no item 3.2.8, pág. 77), as apomioglobinas expressas apresentaram grande solubilidade aquosa e considerável rendimento de expressão (Tabela 7), perfazendo um total de massa de proteína da ordem de 72-160 mg, sendo algumas proteínas mais expressas do que outras.

**Tabela 7. Rendimento final (mg/L de indução) das apomioglobinas.**

Mutante	Rendimento (mg/L)*	Mutante	Rendimento (mg/L)*
WT	38 ± 2	apoMbB_GHA	27 ± 2
E04A	33 ± 2	apoMbC_GHAB	28 ± 2
W7F/W14F	27 ± 2	A134F	30 ± 2
V10F	28 ± 1	M131A	28 ± 1
E18A/K77A	26 ± 2	A15G/A74G	32 ± 2
D20A	29 ± 2	V10F/M131F	32 ± 1
H24V/H119F	20 ± 2	ApoMb <sub>1-123</sub>	33 ± 1
H36Q	26 ± 1	ApoMb <sub>1-99</sub>	33 ± 2
A110F	29 ± 3	A130F	29 ± 1
R118A	28 ± 2	A127F	20 ± 2

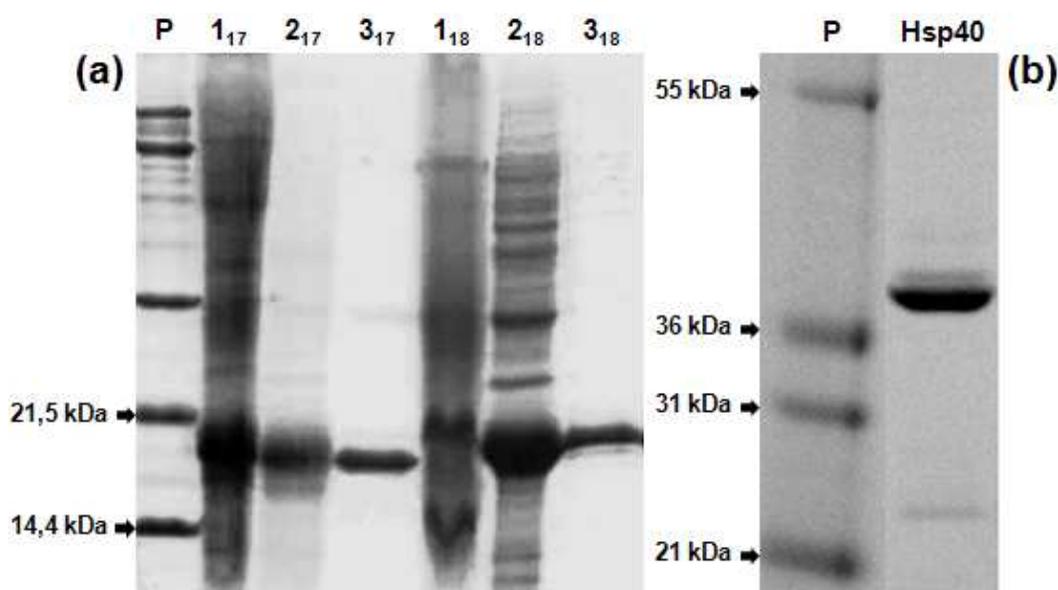
\* A variação no rendimento de expressão protéica pode ser justificada por diferenças da viabilidade, tempo de retenção e cópias dos vetores plasmidiais nas células de *E. coli*, ou ainda, por possíveis perdas de amostra durante os procedimentos de purificação.

#### 4.1.2 Expressão e purificação das sHsps (17 e 18) de cana-de-açúcar e Hsp40 (DjA1) humana

As sHsps (17 e 18) de cana-de-açúcar foram expressas em linhagem *E. coli* BL21(DE3)pLysS, transformadas com vetores de expressão pET3a contendo os cDNAs das chaperonas de interesse. Para a purificação dessas proteínas, dois passos cromatográficos foram utilizados (Figura 16a). Primeiramente, uma cromatografia de troca aniônica em coluna DEAE-Sepharose, na qual a fração solúvel proveniente da lise

bacteriana foi utilizada como amostra. Secundariamente, foi realizada uma cromatografia de gel filtração em coluna HiLoad Superdex 200pg 26/60. Como mostrado, as sHsps foram encontradas na fração solúvel do lisado bacteriano (Figura 16a).

A chaperona Hsp40 (DjA1) humana foi expressa em linhagem *E. coli* BL21(DE3), transformada com vetor de expressão pET28a contendo o cDNA da referida proteína. O processo de purificação da Hsp40 foi realizado em dois passos cromatográficos. Primeiramente, uma cromatografia de afinidade em coluna HiTrap Chelating com íon  $Ni^{2+}$  imobilizado. Como segundo passo cromatográfico, foi utilizado uma cromatografia de gel filtração em coluna HiLoad Superdex 200pg 26/60 (Figura 16b).



**Figura 16. Análise por SDS-PAGE do processo de purificação das sHSPs de cana-de-açúcar e HSP40 (DjA1) humana. (a)** SDS-PAGE 15% da purificação de sHsps (17 e 18) de cana-de-açúcar. **P:** padrão de massa molecular; **1<sub>17</sub>** e **1<sub>18</sub>**, fração solúvel da lise bacteriana de *E. coli* BL21(DE3)pLysS contendo sHsps 17 e 18, respectivamente; **2<sub>17</sub>** e **2<sub>18</sub>**, sHsps 17 e 18 após troca iônica, respectivamente; **3<sub>17</sub>** e **3<sub>18</sub>**, sHsps 17 e 18 após gel filtração, respectivamente. **(b)** SDS-PAGE 12% da purificação de Hsp40 (DjA1) humana. **P:** padrão de massa molecular, **Hsp40:** Hsp40 (DjA1) humana após gel filtração.

## 4.2 Perfil da cinética de formação de fibrilas amilóides de apomioglobinas

Após a purificação das apomioglobinas (item 4.1.1, pág. 96), as proteínas foram submetidas à amiloidogênese conforme descrito anteriormente (item 3.2.9, pág. 79). Uma vez incubadas a 65°C em tampão borato de sódio 50 mM e pH 9, em tempos pré-determinados (como descrito no item 3.2.11, pág. 81), cada solução de proteína induzida à amiloidogênese teve uma alíquota retirada, essa alíquota foi então diluída com uma solução estoque de ThT até a proporção final de ThT:proteína de 5:1, sendo posteriormente essa solução lida em fluorímetro para medir a intensidade de fluorescência de ThT em 482 nm. Para a montagem da cinética amiloidogênica, graficou-se os dados de fluorescência de ThT em 482 nm em função do tempo, e os dados foram ajustados para uma função exponencial simples, como descrito no item 3.2.11 (pág. 81). Observa-se na Figura 17 (pág. 103), o gráfico do perfil cinético da formação de fibrilas amilóides das apomioglobinas selvagem e mutantes.

Na Tabela 8 (pág. 104), observamos os melhores valores dos parâmetros retornados após o ajuste exponencial (equação 5, pág. 81) dos dados de cinética de formação de fibrilas amilóides, como demonstrados na figura 17 (pág. 103). A taxa de formação de fibrilas amilóides é dada pelo inverso do valor do parâmetro  $\tau$ . Com base nos valores encontrados para cada proteína, observamos que dos 19 mutantes, 7 apresentam cinética amiloidogênica significativamente ( $p < 0,001$ ) diferente da apomioglobina selvagem, sendo dois com cinética mais lenta (H24V/H119F e V10F/M131F, 21% menor) e cinco com cinética mais rápida (W7F/W14F, apoMb<sub>1-123</sub>, B\_GHA, H36Q, C\_GHAB; 187%, 130%, 109%, 69% e 38% maiores, respectivamente).

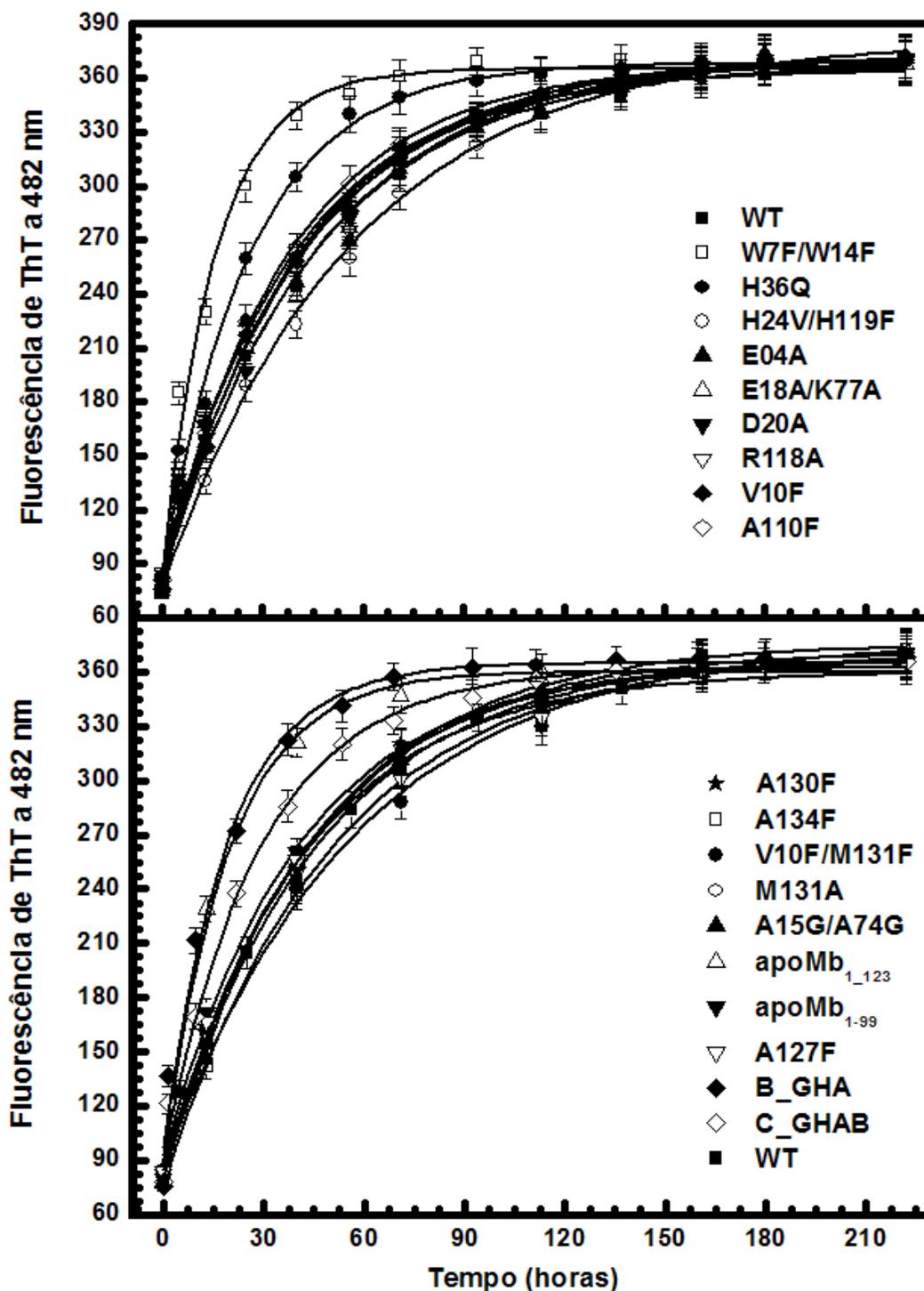


Figura 17. Perfil cinético da formação de fibrilas amilóides monitorado pela intensidade temporal da fluorescência de ThT a 482 nm. Símbolos: intensidade de fluorescência de ThT a 482 nm. Linhas contínuas: melhor ajuste dos dados para uma função exponencial simples (Equação 5, pág. 81) Os experimentos foram realizados como descrito no item 3.2.11, pág. 81. Cada ponto se refere à média de quatro experimentos realizados em separado e em quintuplicata.

**Tabela 8. Parâmetros do ajuste exponencial (linhas contínuas na figura 17, pág. 103) da cinética de formação de fibrilas amilóides, utilizando a Equação 5 descrita no item 3.2.11, pág. 81.**

Proteína	K	F <sub>max</sub>	τ (h)	v (x10 <sup>-2</sup> /h)	χ <sup>2</sup>	* Valor de p
WT	-287,2 ± 6,2	368,1 ± 6,0	45,0 ± 2,9	2,22 ± 0,13	0,95	-
E04A	-285,3 ± 5,8	365,4 ± 5,5	40,6 ± 2,5	2,46 ± 0,14	1,32	0,0458
W7F/W14F	-281,5 ± 4,4	365,1 ± 3,4	15,7 ± 0,9	6,37 ± 0,35	1,12	<0,0001
V10F	-290,3 ± 5,7	368,6 ± 5,5	40,5 ± 2,4	2,47 ± 0,14	0,79	0,0397
E18A/K77A	-291,8 ± 6,3	372,4 ± 6,1	46,0 ± 2,9	2,17 ± 0,13	1,52	0,6061
D20A	-288,2 ± 6,0	372,1 ± 5,8	43,2 ± 2,7	2,31 ± 0,14	1,78	0,3825
H24V/H119F	-304,3 ± 7,6	380,7 ± 7,6	56,9 ± 3,8	1,76 ± 0,11	0,96	<0,0010
H36Q	-283,4 ± 4,7	368,3 ± 4,1	26,6 ± 1,5	3,76 ± 0,20	1,51	<0,0001
A110F	-284,6 ± 5,3	367,8 ± 5,2	37,9 ± 2,3	2,64 ± 0,15	0,72	0,0055
R118A	-280,3 ± 6,1	368,4 ± 5,9	44,0 ± 2,8	2,27 ± 0,14	1,00	0,6194
A127F	-277,8 ± 5,6	364,5 ± 5,3	39,2 ± 2,5	2,55 ± 0,15	0,88	0,0159
A130F	-285,8 ± 4,6	371,2 ± 3,3	44,0 ± 1,9	2,27 ± 0,09	2,32	0,5504
A134F	-294,8 ± 3,4	370,7 ± 2,7	50,0 ± 1,6	2,00 ± 0,06	1,34	0,0219
M131A	-293,6 ± 3,1	375,8 ± 2,3	44,7 ± 1,3	2,24 ± 0,07	2,45	0,7955
A15G/A74G	-284,9 ± 3,5	366,8 ± 2,5	41,9 ± 1,4	2,39 ± 0,08	3,23	0,0675
V10F/M131F	-291,3 ± 5,7	377,3 ± 4,9	57,1 ± 3,2	1,75 ± 0,09	3,45	<0,0010
apoMb <sub>1-123</sub>	-270,2 ± 9,4	360,2 ± 4,6	19,6 ± 1,8	5,10 ± 0,43	2,78	<0,0001
apoMb <sub>1-99</sub>	-273,5 ± 9,4	364,0 ± 5,4	40,0 ± 3,7	2,50 ± 0,21	3,22	0,0639
B_GHA	-284,1 ± 1,3	366,5 ± 1,1	21,5 ± 0,3	4,65 ± 0,07	2,45	<0,0001
C_GHAB	-280,9 ± 2,9	365,2 ± 2,6	32,7 ± 1,1	3,06 ± 0,10	2,31	<0,0001

F<sub>max</sub>, máxima intensidade de fluorescência; K, diferença entre a intensidade de fluorescência máxima e a inicial; τ, inverso da taxa de formação de fibrilas amilóides v; χ<sup>2</sup>, qui-quadrado.

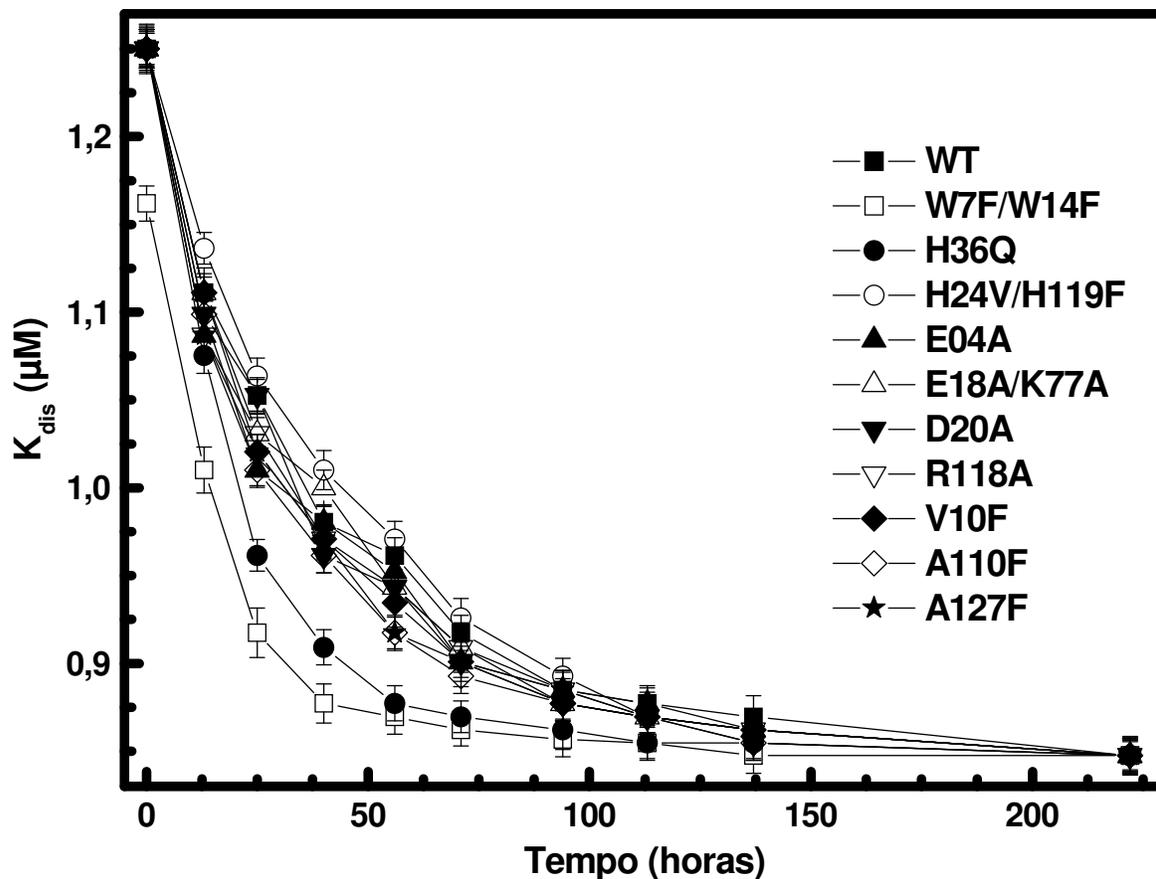
\* significância estatística da diferença entre os valores da taxa de formação de fibrilas amilóides (v) entre apomioglobina mutante e selvagem. Diferenças significativas implicam valores de p<0,001 após aplicar teste “t” em par de Student, com distribuição bicaudal.

### **4.3 Cálculo da constante de dissociação ( $K_{dis}$ ) de Tioflavina T em relação às fibrilas amilóides**

Além da medida comparativa da cinética amiloidogênica dos mutantes frente à apomioglobina selvagem, através do acompanhamento temporal da fluorescência de ThT (como observado na Figura 17, pág. 103, e Tabela 8, pág. 104), também acompanhamos, ao longo do tempo, a variação da afinidade de ligação de ThT às fibrilas amilóides. Para tanto, realizamos a titulação de ThT em função do tempo de formação de fibrilas amilóides, com a finalidade de obter a constante de dissociação ( $K_{dis}$ ) de ThT em relação às fibrilas amilóides (como descrito no item 3.2.12, pág. 82). Observamos que a constante de dissociação de ThT diminuiu gradativamente, e que o decaimento da  $K_{dis}$  dos mutantes W7F/W14F e H36Q, comparado com o observado na proteína selvagem, foi mais acentuado entre as primeiras 130 horas de indução de fibrilas amilóides (Figura 18, pág. 106).

### **4.4 Monitoramento da ligação de bis-ANS em função do tempo de indução de fibrilas amilóides**

Para acompanhar o grau de disponibilidade de sítios hidrofóbicos ao longo do processo amiloidogênico, observamos o perfil de ligação de bis-ANS em função do tempo de formação das fibrilas amilóides. Observamos que houve um acentuado decaimento da fluorescência de bis-ANS ao longo do tempo, sendo esse decaimento muito semelhante para as apomioglobinas estudadas (Figura 19, pág. 107). Ao final de 70 horas (~três dias) de indução amiloidogênica, a fluorescência do bis-ANS se igualou àquela observada na ausência de proteína.



**Figura 18. Variação da constante de dissociação ( $K_{dis}$ ) aparente de ThT em função do tempo de indução amiloidogênica.** Alíquotas de 100  $\mu$ L contendo 30  $\mu$ M de proteínas induzidas à amiloidogênese foram coletadas em tempos pré determinados para a titulação de ThT e cálculo de  $K_{dis}$ , como descrito no item 3.2.12, pág. 82. Os valores foram normalizados contra a fluorescência de ThT na presença de apoMb selvagem descongelada e preparada no dia da medida e sob a mesma condição das demais soluções, como descrito anteriormente. Cada ponto se refere à média de três experimentos feitos em separado e em quintuplicata. As linhas ligando os pontos servem para auxiliar a observação.

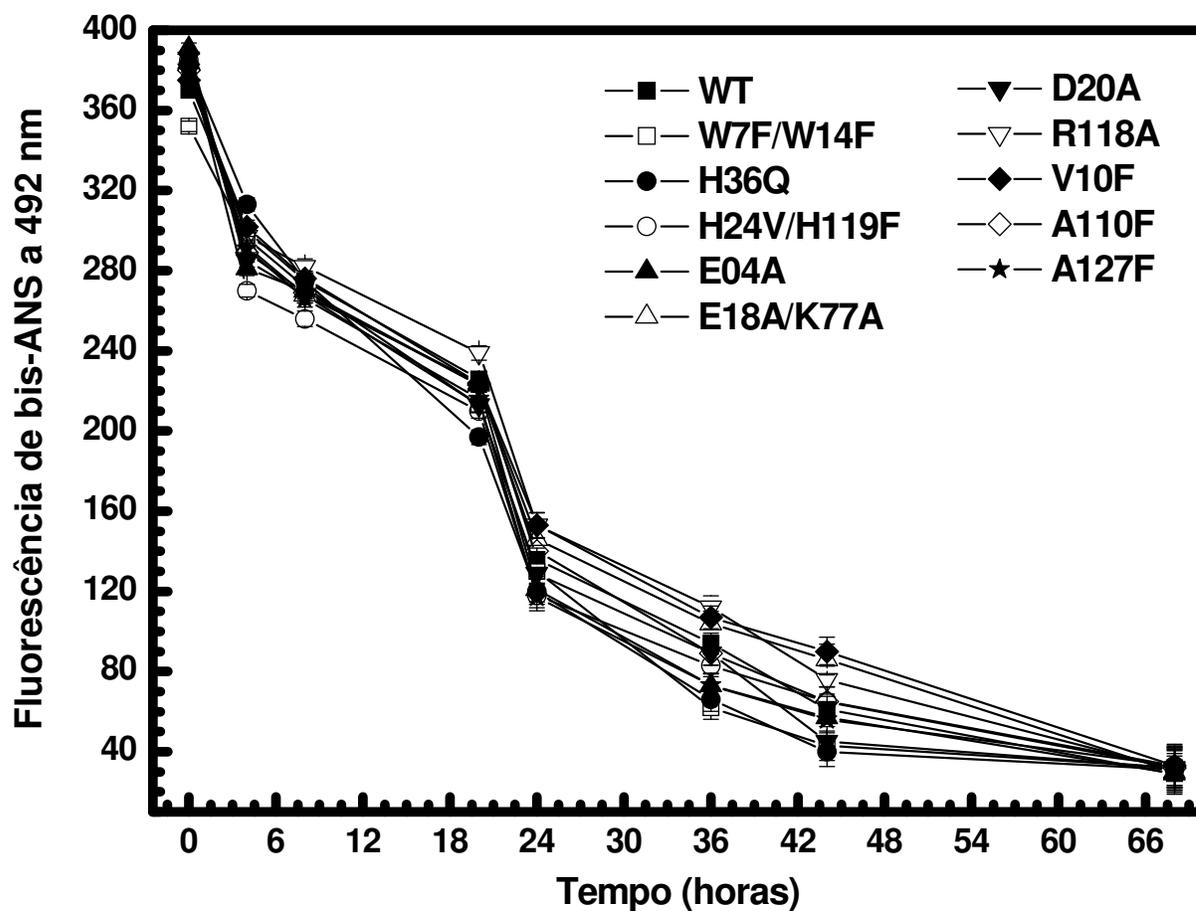


Figura 19. Fluorescência a 492 nm de bis-ANS em função do tempo de indução amiloidogênica. Alíquotas de 100  $\mu$ L de 30  $\mu$ M de proteínas induzidas à amiloidogênese foram colhidas em tempos determinados, diluídas com um estoque de bis-ANS preparado em metanol como descrito no item 3.2.13, pág. 83, até a proporção final de bis-ANS:proteína de 1:2. Cada ponto se refere à média de dois experimentos feitos em separado e em quintuplicata. As linhas ligando os pontos servem para auxiliar a observação.

#### 4.5 Dicroísmo circular no ultravioleta distante das apomioglobinas antes e após amiloidogênese

Após a purificação das apomioglobinas, as proteínas foram analisadas por CD para verificação do estado enovelado das mesmas através da quantificação das estruturas secundárias. Aparentemente, os mutantes pontuais (V10F, A110F, A127F, A130F, A134F, V10F/M131F, E04A, E18A/K77A, R118A, D20A, H24V/H119F, H36Q, M131A e A15G/A74G) não causaram mudanças significativas na quantidade de estruturas em hélice- $\alpha$  comparativamente à apomioglobina selvagem, como observado pelo sinal de CD a 222 nm (característico de hélice- $\alpha$ ) em  $18.300 \pm 500 \text{ grau.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$  (linhas contínuas, Figuras 20, 21 e 22, págs. 109, 110 e 111, respectivamente), intervalo de sinal indicativo de porcentagem de hélice- $\alpha$  da ordem de  $64 \pm 5 \%$ . O valor indicativo de porcentagem de hélice- $\alpha$  foi obtido após deconvolução dos espectros de CD das proteínas pelo programa CDNN (como descrito no item 3.2.10, pág. 80). Com relação aos mutantes de permutação e deleção de hélice- $\alpha$ , esses mutantes apresentaram perfis de espectros de CD semelhantes aos observados em trabalhos anteriores, referentes ao estudo inicial de tais mutantes (RIBEIRO-JR e RAMOS, 2005).

Devido a característica das amilóides serem estruturalmente constituídas de folhas- $\beta$ , para averiguar referida propriedade, avaliamos o perfil do espectro de CD das apomioglobinas após o processo amiloidogênico. Como esperado, após a formação das amilóides, as apomioglobinas apresentaram perfil de espectro de CD típico de proteínas ricas em estruturas do tipo folha- $\beta$ , com sinal de CD a 216 nm bem definido (linhas pontilhadas, Figuras 20, 21 e 22, págs. 109, 110 e 111, respectivamente). Quanto a quantificação das estruturas em folha- $\beta$ , a estimativa de tais estruturas pelo programa CDNN retornou valores da ordem de  $48 \pm 9\%$  entre os mutantes estudados.

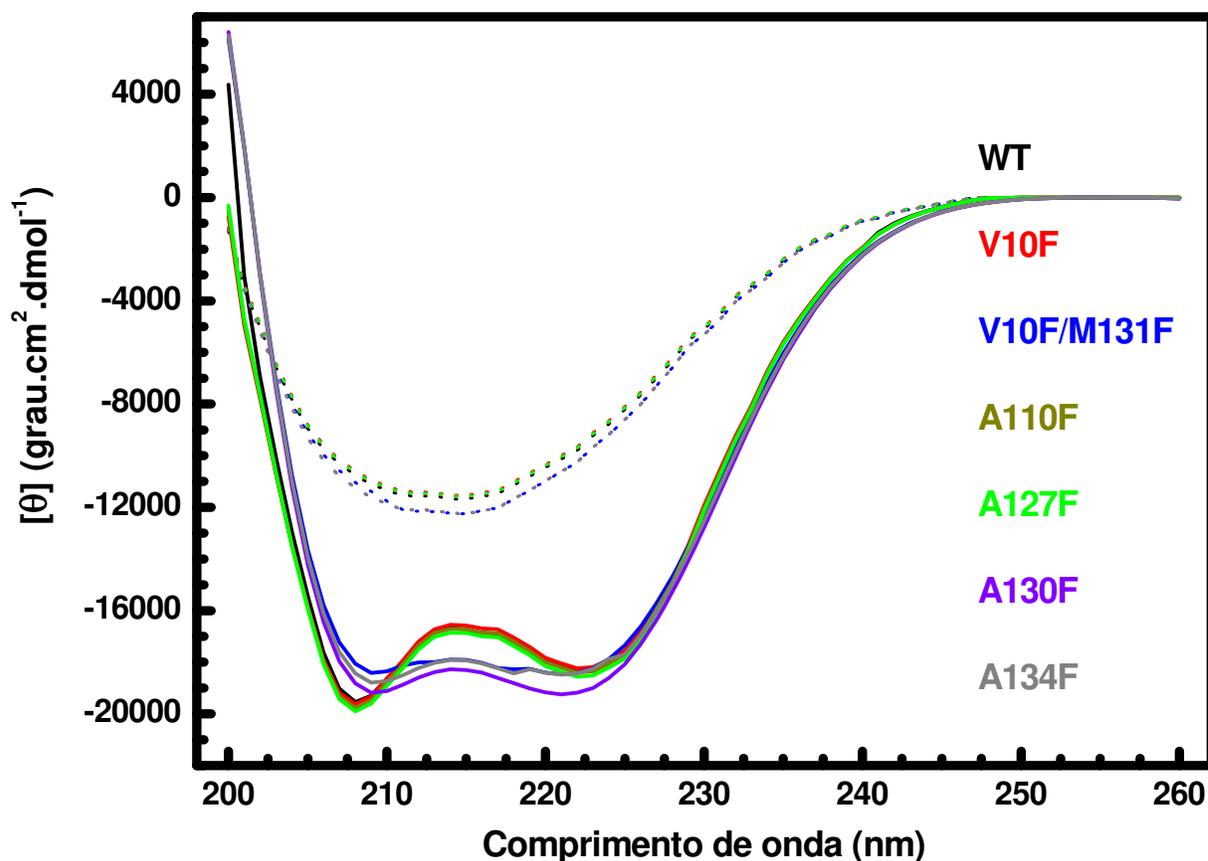


Figura 20. Espectros de CD no UV-distante. Apomioglobinas selvagem (WT) e mutantes de interações hidrofóbicas antes (linhas contínuas) e depois (linhas pontilhadas) do processo amiloidogênico. Medidas de CD realizadas a 25°C, em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 6,5. Os espectros dos mutantes, tanto no estado nativo, quanto no estado de fibrila amilóide, são semelhantes ao da proteína selvagem. Para as proteínas mostradas, a deconvolução dos espectros pelo programa CDNN estimou uma quantificação semelhante das seguintes estruturas secundárias:  $64 \pm 4\%$  de hélice- $\alpha$  na condição nativa e  $43 \pm 3\%$  de folhas- $\beta$  na condição de fibrilas amilóides.

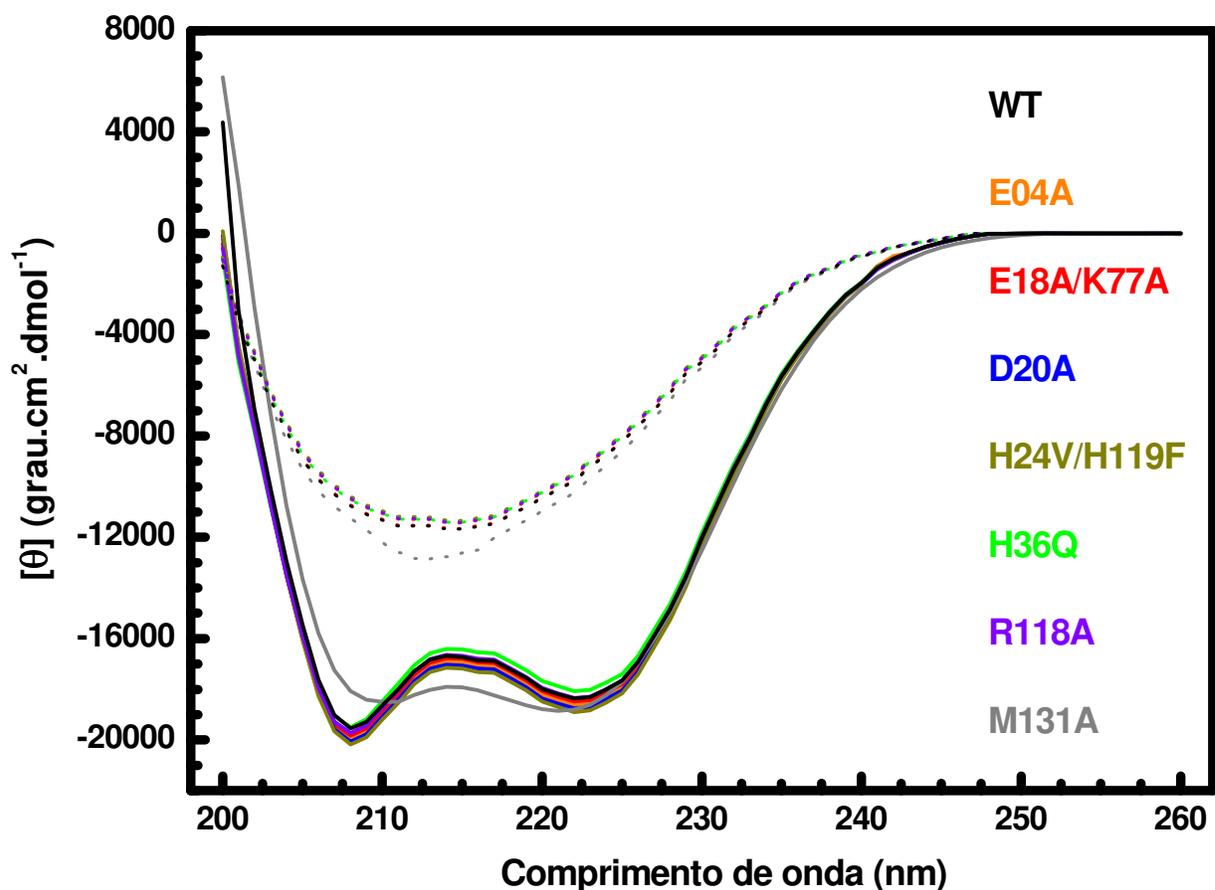


Figura 21. Espectros de CD no UV-distante. Apomioglobinas selvagem (WT) e mutantes de interações eletrostáticas e do intermediário da via de enovelamento de apomioglobina antes (linhas contínuas) e depois (linhas pontilhadas) do processo amiloidogênico. Medidas de CD realizadas a 25°C, em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 6,5. Os espectros dos mutantes, tanto no estado nativo, quanto no estado de fibrila amilóide, são semelhantes ao da proteína selvagem. Para as proteínas mostradas, a deconvolução dos espectros pelo programa CDNN estimou uma quantificação semelhante das seguintes estruturas secundárias:  $63 \pm 4\%$  de hélice- $\alpha$  na condição nativa e  $44 \pm 4\%$  de folhas- $\beta$  na condição de fibrilas amilóides.

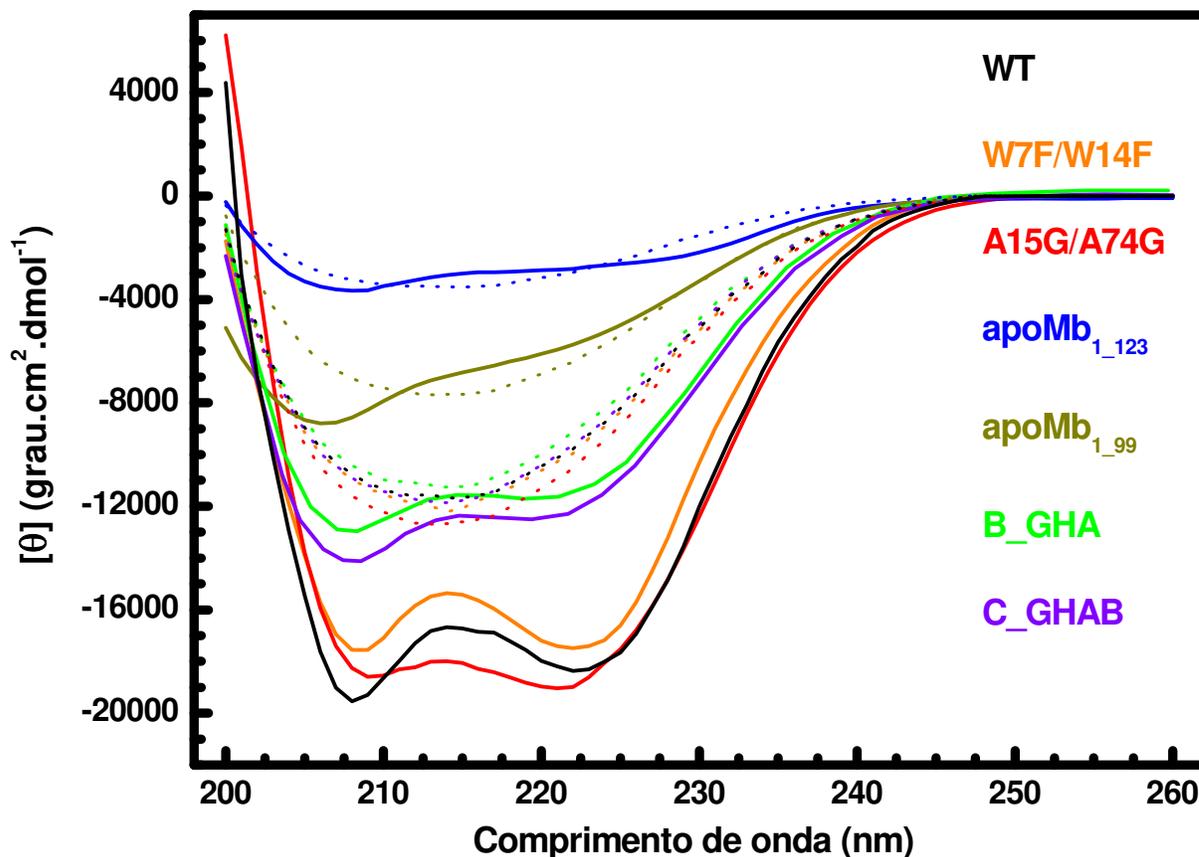


Figura 22. Espectros de CD no UV-distante. Apomioglobinas selvagem (WT) e mutantes W7F/W14F e de deleção, permutação e propensão de hélice- $\alpha$  antes (linhas contínuas) e depois (linhas pontilhadas) do processo amiloidogênico. Medidas de CD realizadas a 25°C, em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 6,5. Os espectros dos mutantes, tanto no estado nativo, quanto no estado de fibrila amilóide, diferem significativamente da proteína selvagem, sendo a deconvolução dos espectros pelo programa CDNN apresentados na Tabela 9 (pág. 112).

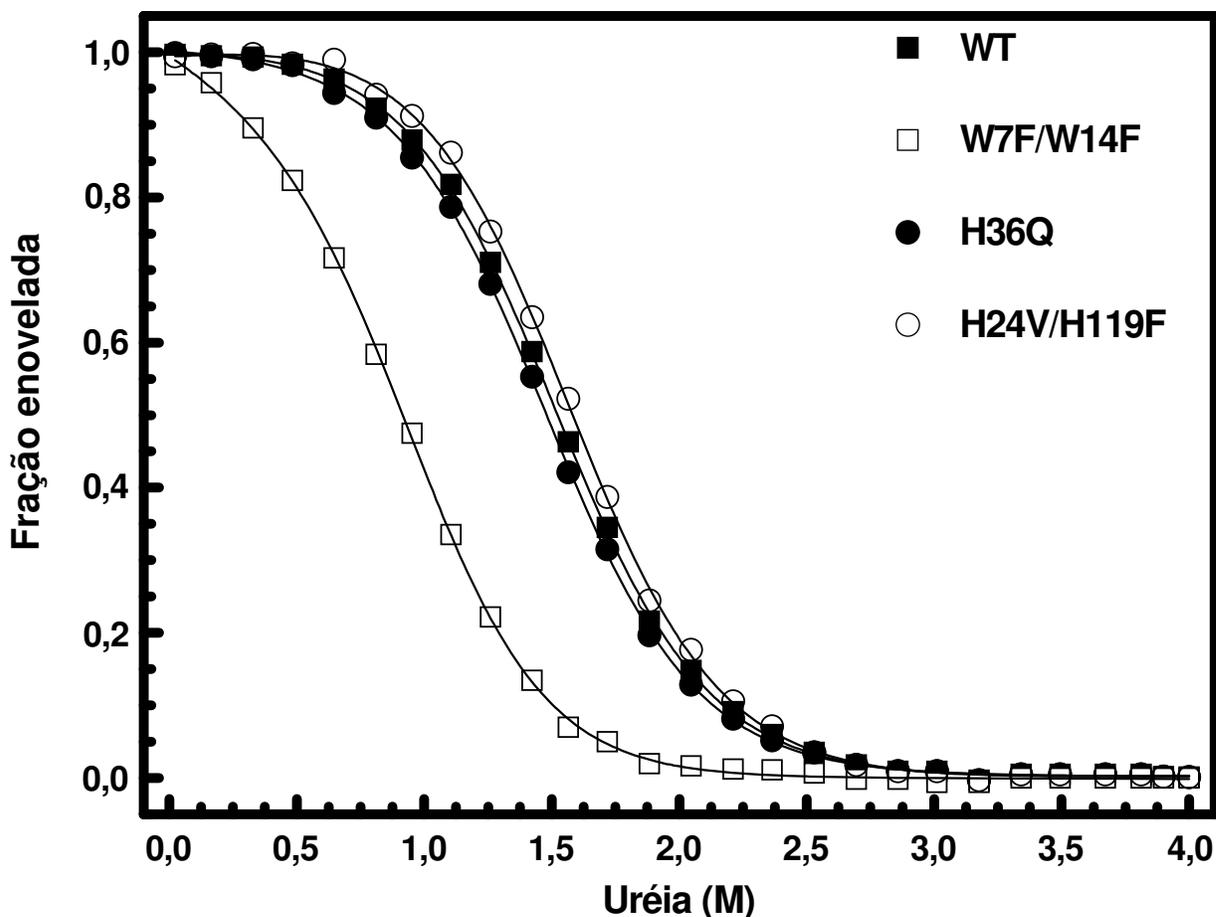
**Tabela 9. Predição – antes e após 15 dias de indução amiloidogênica – através do programa CDNN, das estruturas secundárias do tipo hélice- $\alpha$  e folhas- $\beta$  das apomioglobinas mostradas na Figura 22, pág. 111. Faixa de predição entre 200-260 nm.**

<b>Mutante</b>	<b>Antes (% de hélice-<math>\alpha</math>)</b>	<b>Após (% de folha-<math>\beta</math>)</b>
WT	65 $\pm$ 2	44 $\pm$ 2%
W7F/W14F	60 $\pm$ 2%	42 $\pm$ 3%
A15G/A74G	63 $\pm$ 2%	49 $\pm$ 2%
apoMb <sub>1-123</sub>	9 $\pm$ 1%	54 $\pm$ 4%
apoMb <sub>1-99</sub>	13 $\pm$ 1%	56 $\pm$ 3%
B_GHA	48 $\pm$ 3%	49 $\pm$ 2%
C_GHAB	50 $\pm$ 3%	46 $\pm$ 3%

#### **4.6 Desenovelamento químico por uréia das apomioglobinas selvagem e mutantes W7F/W14F, H24V/H119F e H36Q**

Nas Figuras 23 e 24 (págs. 113 e 115), apresentamos os resultados referentes ao estudo comparativo da estabilidade da apomioglobina selvagem e mutantes W7F/W14F, H36Q e H24V/H119F submetidos a concentrações crescentes de uréia em duas condições tamponantes.

Na Figura 23 (pág. 113), observamos o perfil de desenovelamento químico induzido por uréia na condição tamponante em pH 4,2. Constatamos que a proteína selvagem e os mutantes H36Q e H24V/H119F, começam a se desenovelar entre 0,7-0,75 M de uréia, estando totalmente desenovelados em aproximadamente 2,7 M de uréia. O mutante W7F/W14F, começa a se desenovelar antes de 0,2 M de uréia, estando totalmente desenovelado por volta de 1,8 M de uréia. Pelo fato do desenovelamento da apomioglobina, na condição tamponante em pH 4,2, se apresentar como do tipo dois estados (como discutido anteriormente no item 3.2.16, pág. 86), dos resultados apresentados (Figura 23, pág. 113), pudemos, através da extrapolação dos dados (equação 19, pág. 88), calcular os valores de variação da energia livre de desenovelamento  $\Delta G_{H_2O}$  das proteínas analisadas (Tabela 10, pág. 114).



**Figura 23. Desenovelamento químico por uréia da apoMb selvagem e dos mutantes H36Q, H24V/H119F e W7F/W14F em pH 4,2 a 4°C monitorado por dicroísmo circular a 222 nm.** 2  $\mu$ M de proteínas foram preparadas em tampão citrato de sódio 4 mM, pH 4,2, contendo concentrações crescentes de uréia (0-4 M) e lidas em cubeta de quartzo de 10 mm de caminho óptico como descrito no item 3.2.15, pág. 85. Os símbolos cheios representam as leituras em cada concentração de uréia correspondente; as linhas representam o melhor ajuste dos dados à Equação 19 (item 3.2.16, pág. 86).

**Tabela 10. Valores de  $C_m$  (M),  $\Delta G_{H_2O}$  (kCal/mol) e  $m$  (kCal/mol.M) do desenovelamento químico por uréia em pH 4,2 (Figura 23, pág. anterior). Valores retornados através da extrapolação linear dos dados pela Equação 19 (item 3.2.16, pág. 86).**

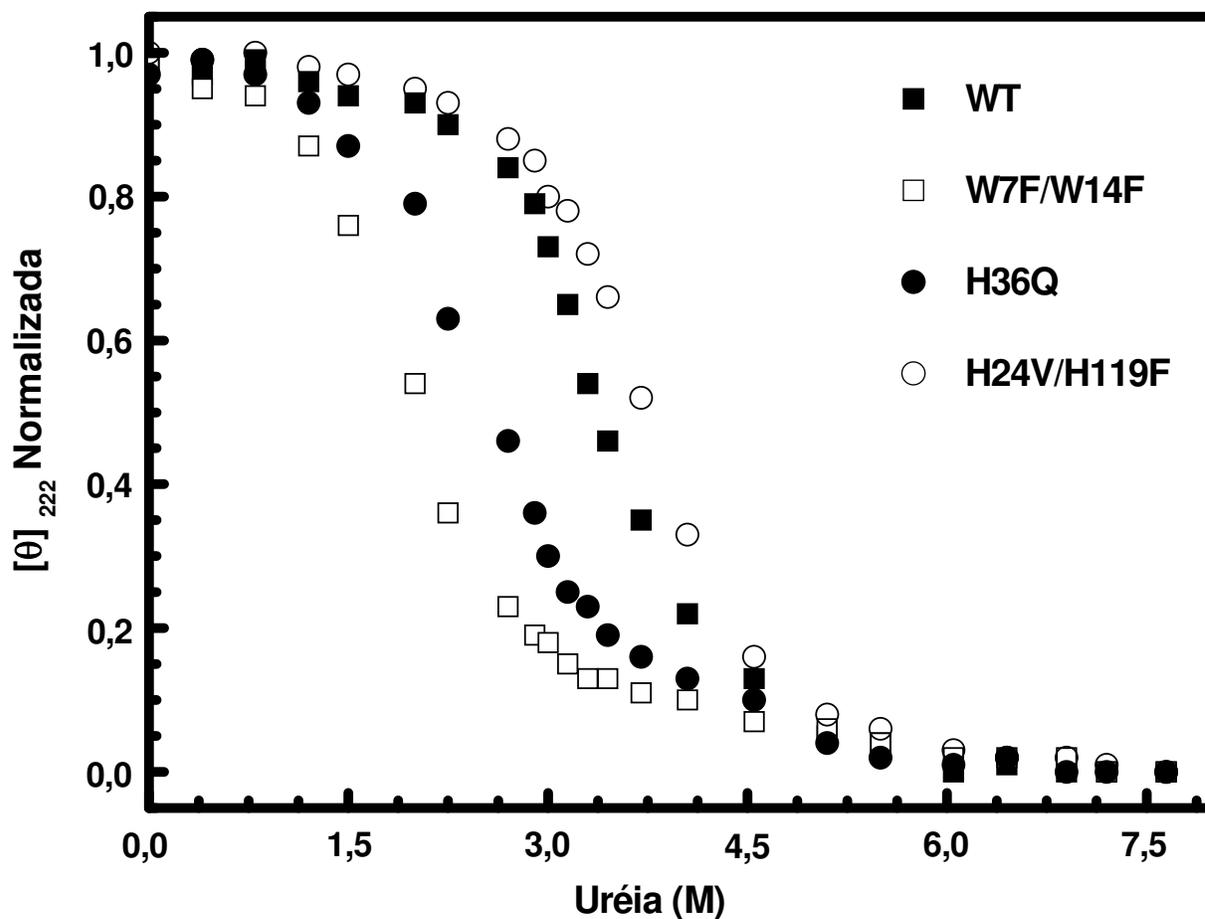
Proteína	$C_m$	$\Delta G_{H_2O}$	$m$
WT	$1,5 \pm 0,1$	$2,8 \pm 0,1$	$1,9 \pm 0,0$
W7/FW14F	$0,8 \pm 0,1$	$1,7 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,1$
H24V/H119F	$1,6 \pm 0,1$	$3,0 \pm 0,1$	$1,9 \pm 0,1$
H36Q	$1,4 \pm 0,1$	$2,7 \pm 0,1$	$1,8 \pm 0,0$

Na Figura 24 (pág. 115), observamos o perfil de desenovelamento químico induzido por uréia na condição tamponante em pH 7,8. Constatamos que a proteína selvagem e os mutantes W7F/W14F, H36Q e H24V/H119F, apresentam valores de  $C_m$  de 3,4, 2,1, 2,6 e 3,7, respectivamente.

#### **4.7 Desenovelamento ácido de apomioglobinas selvagem e mutantes W7F/W14F, H24V/H119F e H36Q**

Na Figura 25 (pág. 116) apresentamos os resultados referentes ao estudo comparativo da estabilidade da apomioglobina selvagem e mutantes W7F/W14F, H36Q e H24V/H119F submetidos a variação de pH.

Observamos que a proteína selvagem (WT) apresenta  $pH_m$  (pH no ponto médio de transição) do estado nativo (N) para o estado intermediário (I) em torno de 5,1 e da transição do estado I para o estado desenovelado (D) em torno de 3,2. O mutante W7F/W14F apresenta  $pH_m$  do estado N para I em torno de 6,3 e do estado I para D em torno de 4,3. O mutante H24V/H119F apresenta somente um  $pH_m$ , referente à transição do N para o D em torno de 3,1. Por fim, o mutante H36Q apresenta  $pH_m$  do estado N para I em torno de 6 e do estado I para U em torno de 3,1.



**Figura 24.** Desenovelamento químico por uréia da apoMb selvagem e dos mutantes H36Q, H24V/H119F e W7F/W14F em pH 7,8 a 4°C monitorado por dicroísmo circular a 222 nm. 2 μM de proteínas foram preparadas em tampão HEPES 10 mM, pH 7,8, contendo concentrações crescentes de uréia (0-8 M) e lidas em cubeta de quartzo de 10 mm de caminho óptico como descrito no item 3.2.15, pág. 85. Os símbolos cheios representam as leituras em cada concentração de uréia correspondente.

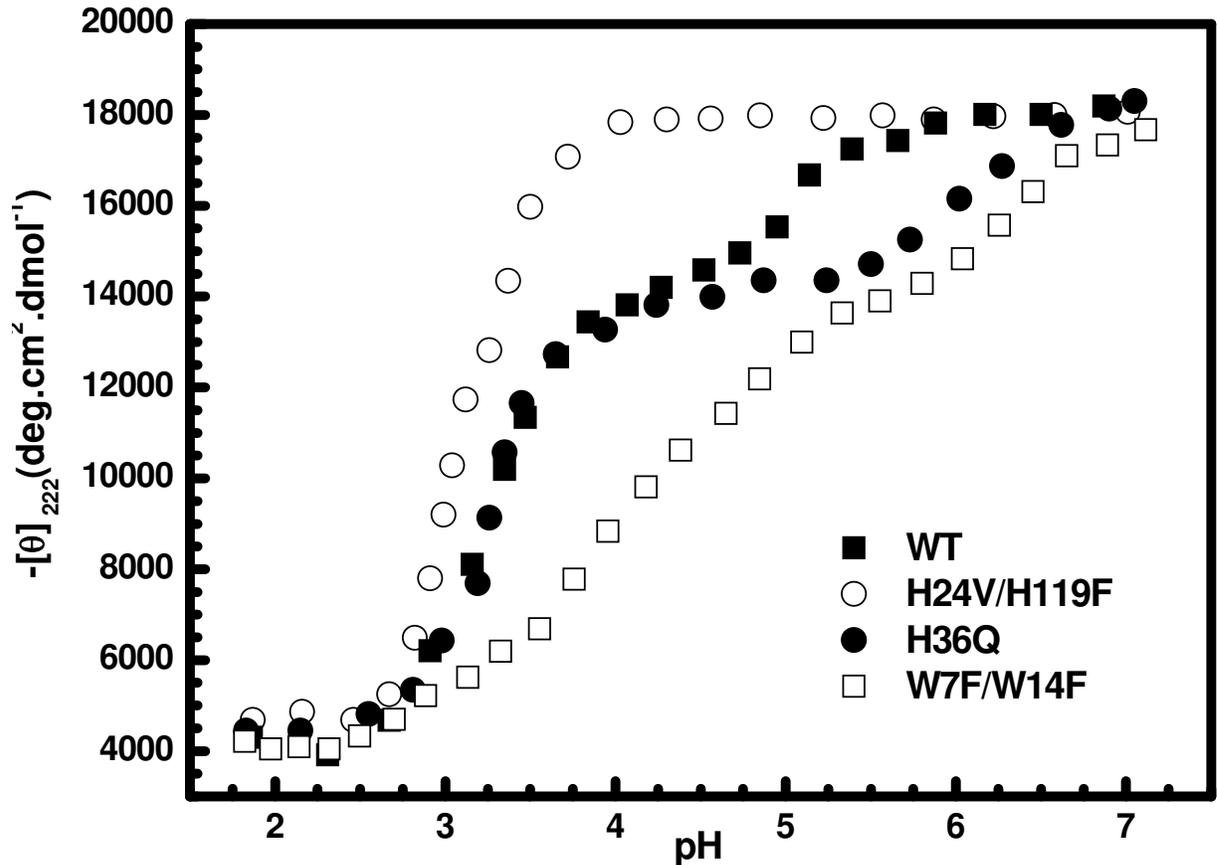


Figura 25. Desenovelamento ácido de apoMb selvagem (WT) e dos mutantes H36Q, H24V/H119F e W7F/W14F a 4°C monitorado por dicroísmo circular a 222 nm. 2 μM de proteínas foram preparadas em diferentes pHs como descrito no item 3.2.17, pág. 88.

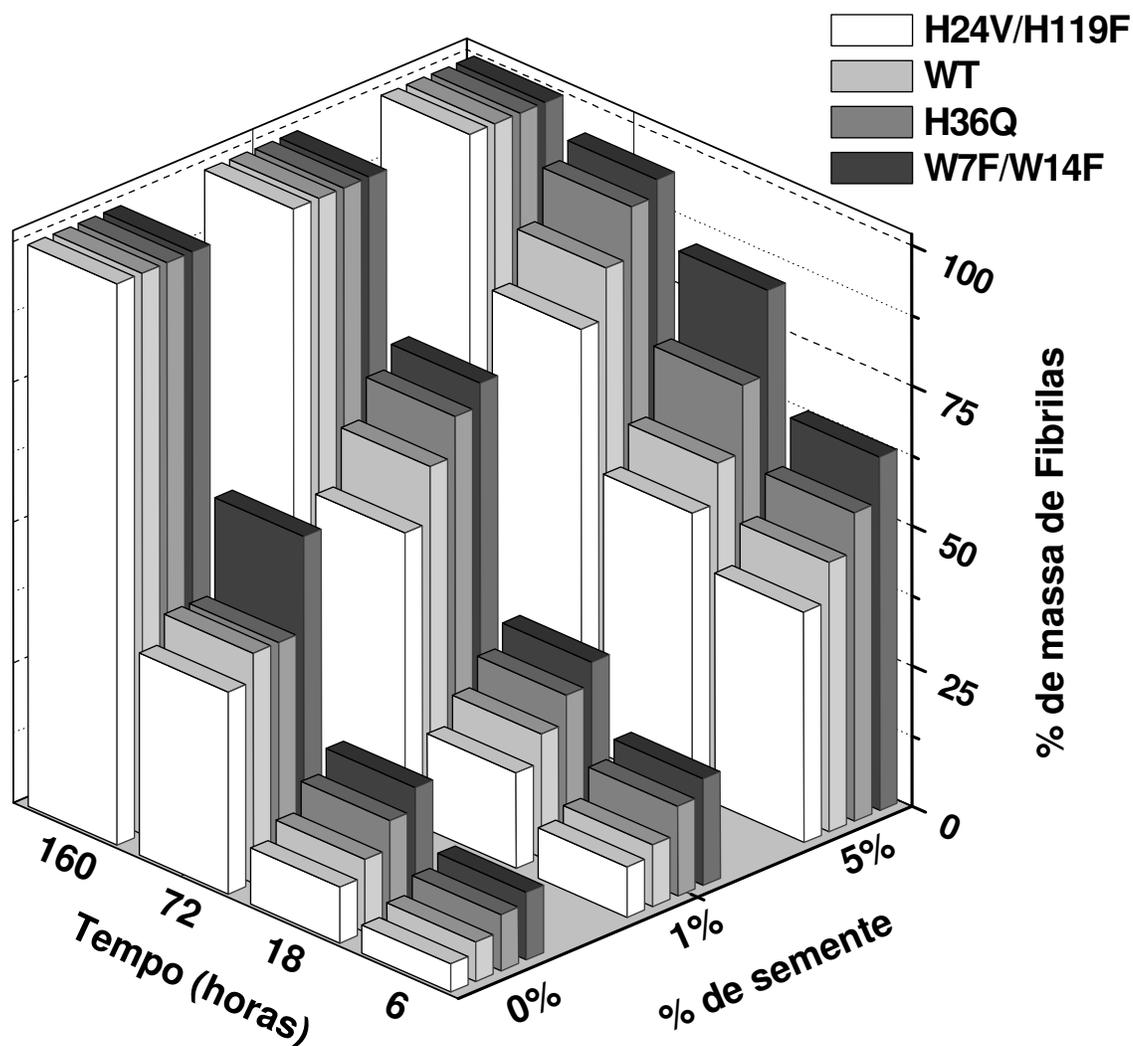
#### 4.8 Propriedade de sementeira dos agregados pré-fibrilares das apomioglobinas selvagem e mutantes W7F/W14F, H36Q, H24V/H119F, V10F/M131F, apoMb<sub>1-123</sub>, C\_GHAB e B\_GHA

Após constatado quais mutantes apresentaram cinética amiloidogênica significativamente ( $p < 0,001$ ) diferente da apomioglobina selvagem (ver Tabela 8, pág. 104), estudamos a capacidade de sementeira das formas pré-fibrilares da proteína selvagem e dos referidos mutantes. Nesse experimento visamos avaliar se a velocidade

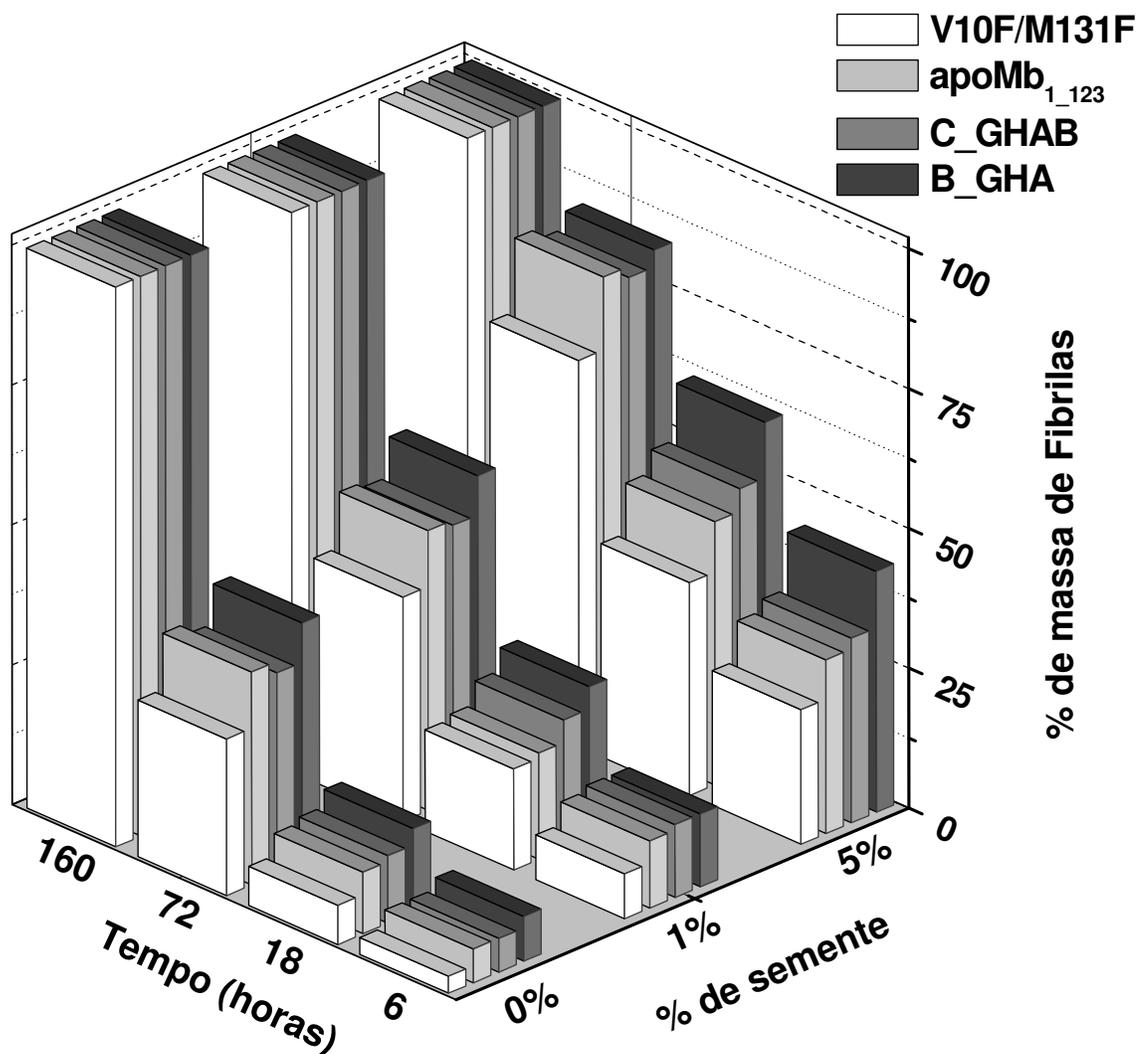
de formação das estruturas fibrilares seria mais rápida com a presença das sementes, fato previamente observado em outras amilóides. Nas Figuras 26 e 27 (págs. 118 e 119, respectivamente) apresentamos os resultados do monitoramento temporal da massa de fibrila amilóide formada durante a incubação das apomioglobinas selvagem e W7F/W14F, H36Q, H24V/H119F, V10F/M131F, apoMb<sub>1-123</sub>, C\_GHAB e B\_GHA, com diferentes proporções de “sementes” (como descrito no item 3.2.18, págs. 89 e 90). A formação de fibrilas amilóides de apomioglobinas por semeadura foi realizada utilizando-se duas condições: 1% e 5% em massa de agregados pré-fibrilares. A partir dos dados apresentados nas Figuras 26 e 27 (págs. 118 e 119, respectivamente) realizamos um ajuste exponencial simples (como o descrito na equação 7, pág. 88), tomando-se os devidos cuidados na adequação dos valores utilizados. Comparado ao modelo sem sementes, constatamos que houve um aumento significativo (Tabela 11, pág. 120) na velocidade de formação das amilóides no modelo de semeadura, não sendo possível, entretanto, após normalização dos dados, determinar efeitos distintos de semeadura entre as proteínas estudadas.

#### **4.9 Energia de ativação do processo de conversão de estrutura hélice- $\alpha$ para folha- $\beta$ e da formação de fibrilas amilóides das apomioglobinas selvagem e mutantes com cinética diferenciada**

Visando melhorar o conhecimento acerca da dinâmica da cinética amiloidogênica das apomioglobinas, analisamos a cinética de formação das fibrilas amilóides em diferentes temperaturas. Realizamos (como descrito no item 3.2.14, pág. 83) a monitoração da fluorescência de ThT a 482 nm e CD a 216 nm em quatro diferentes temperaturas, 35°C, 45°C, 55°C e 65°C. Assim sendo, obtivemos constantes aparentes ( $k_{app}$ ) para posterior cálculo da energia de ativação associada aos processos de conversão de estrutura hélice- $\alpha$  para folha- $\beta$  e da formação de fibrilas amilóides de apomioglobinas selecionadas. Os resultados estão apresentados na Figura 28 (pág. 121) e Tabelas 12 e 13 (pág. 122).



**Figura 26.** Efeito de semeadura dos agregados pré-fibrilares de apomioglobinas selvagem e mutantes H36Q, H24V/H119F e W7F/W14F. Após os tempos de incubação (6, 18, 72 e 160 horas), com diferentes proporções de sementes (como descrito no item 3.2.18, pág. 89), a quantificação da massa de fibrilas formadas foi realizada como descrito no item 3.2.18.1, pág. 90. Os resultados são expressos em porcentagem de massa de fibrilas referentes à massa total após 160 horas (tempo no qual toda a massa de proteína se apresentou na forma de fibrila madura).



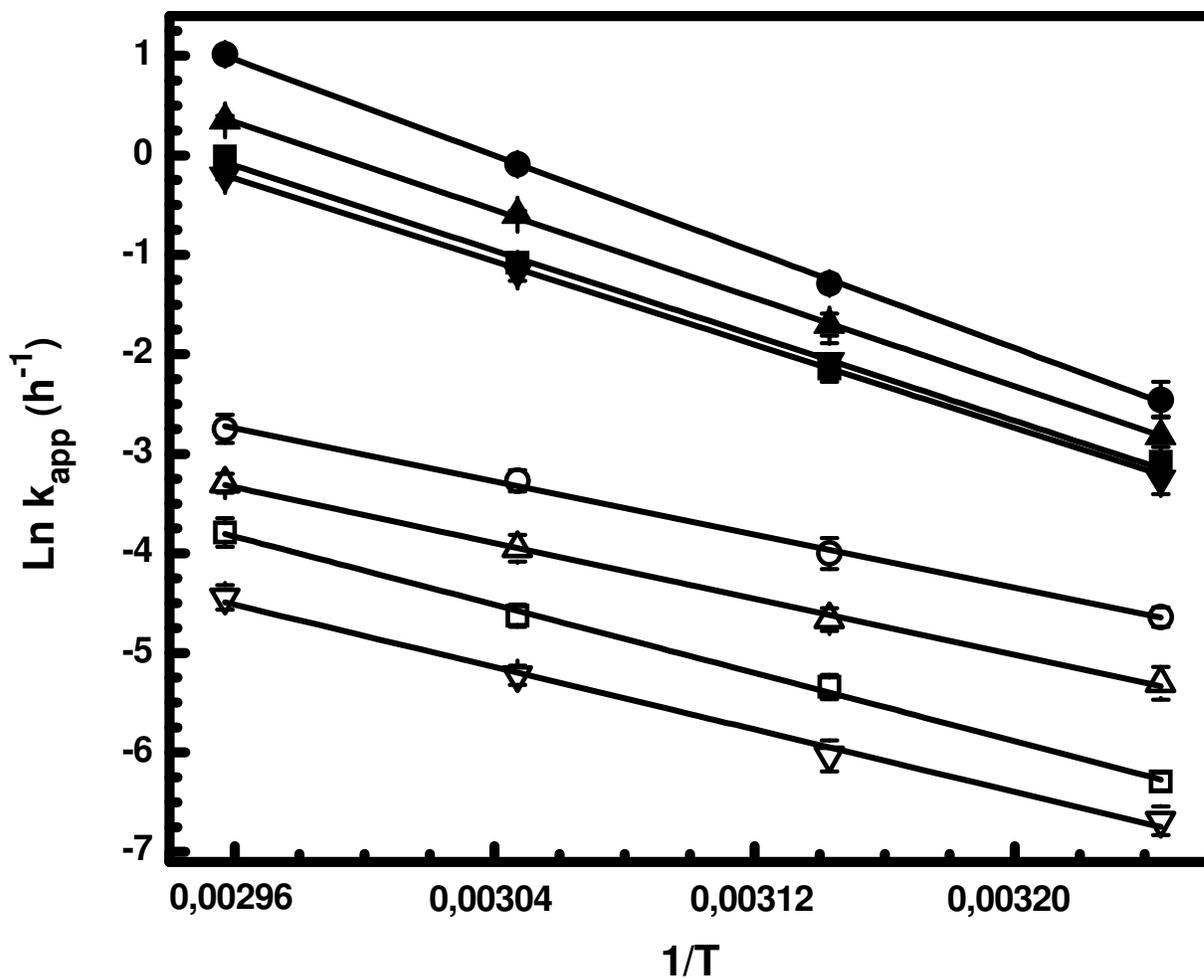
**Figura 27.** Efeito de semeadura dos agregados pré-fibrilares dos mutantes **V10F/M131F**, **apoMb<sub>1-123</sub>**, **C\_GHAB** e **B\_GHA**. Após os tempos de incubação (6, 18, 72 e 160 horas), com diferentes proporções de sementes (como descrito no item 3.2.18, pág. 89), a quantificação da massa de fibrilas formadas foi realizada como descrito no item 3.2.18.1, pág. 90. Os resultados são expressos em porcentagem de massa de fibrilas referentes à massa total após 160 horas (tempo no qual toda a massa de proteína se apresentou na forma de fibrila madura).

**Tabela 11. Taxa de formação de fibrilas amilóides ( $v$ ) aferida através do ajuste exponencial dos dados apresentados nas Figuras 26 e 27 (págs. 118 e 119, respectivamente), e variação da mesma antes e após semeadura de 1% e 5%.**

Proteína	( $v$ ) <sup>a</sup> antes	( $v$ ) <sup>a</sup> após 1%	( $v$ ) <sup>a</sup> após 5%	Valor de $p$ <sup>b,c</sup>
WT	0,006 ± 0,003 $R^2 = 0,96$	0,012 ± 0,002 $R^2 = 0,99$	0,061 ± 0,018 $R^2 = 0,89$	<sup>b</sup> (0,0449) <sup>c</sup> (0,0064)
W7F/W14F	0,011 ± 0,002 $R^2 = 0,99$	0,017 ± 0,002 $R^2 = 0,99$	0,159 ± 0,024 $R^2 = 0,98$	<sup>b</sup> (0,0213) <sup>c</sup> (0,0004)
H36Q	0,006 ± 0,003 $R^2 = 0,95$	0,015 ± 0,002 $R^2 = 0,99$	0,098 ± 0,023 $R^2 = 0,93$	<sup>b</sup> (0,0124) <sup>c</sup> (0,0024)
H24V/H119F	0,005 ± 0,002 $R^2 = 0,95$	0,008 ± 0,002 $R^2 = 0,98$	0,030 ± 0,010 $R^2 = 0,87$	<sup>b</sup> (0,1401) <sup>c</sup> (0,0132)
V10F/M131F	0,003 ± 0,002 $R^2 = 0,92$	0,006 ± 0,003 $R^2 = 0,95$	0,017 ± 0,004 $R^2 = 0,96$	<sup>b</sup> (0,2230) <sup>c</sup> (0,0056)
apoMb <sub>1-123</sub>	0,001 ± 0,000 $R^2 = 0,87$	0,008 ± 0,002 $R^2 = 0,97$	0,032 ± 0,007 $R^2 = 0,97$	<sup>b</sup> (0,0037) <sup>c</sup> (0,0016)
C_GHAB	0,005 ± 0,003 $R^2 = 0,95$	0,008 ± 0,003 $R^2 = 0,96$	0,037 ± 0,009 $R^2 = 0,95$	<sup>b</sup> (0,2879) <sup>c</sup> (0,0043)
B_GHA	0,006 ± 0,002 $R^2 = 0,96$	0,010 ± 0,002 $R^2 = 0,98$	0,065 ± 0,016 $R^2 = 0,93$	<sup>b</sup> (0,0705) <sup>c</sup> (0,0032)

<sup>a</sup> ( $v$ ): taxa de formação de fibrilas amilóides ( $h^{-1}$ ).

<sup>b,c</sup> significância estatística da diferença entre as taxas de formação de fibrilas amilóides ( $v$ ) antes (<sup>b</sup>) e após (<sup>c</sup>) semeadura de 1% e 5%, respectivamente. Diferenças significativas implicam valores de  $p < 0,05$  após aplicar teste “t” em par de Student, com distribuição bicaudal.



**Figura 28.** Plot de Arrhenius da formação de fibrila amilóide monitorada por fluorescência de ThT a 482 nm e dicróismo circular a 216 nm. O Ln da constante observada ( $k_{\text{app}}$ ) foi obtido do ajuste dos dados da cinética amiloidogênica (Equação 7, pág. 84.), acompanhada pela fluorescência de ThT (símbolos abertos) e dicróismo circular a 216 nm (símbolos cheios), e graficados em função do inverso da temperatura absoluta ( $1/T$ ). WT (quadrados), W7F/W14F (círculos), H36Q (triângulos), H24V/H119F (triângulos invertidos). A energia de ativação foi obtida através do ajuste dos dados (linhas contínuas, obtidas pela Equação 8, pág. 85.) e são mostradas na Tabela 12 (pág. 122).

**Tabela 12. Energia de ativação ( $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) do processo de formação de fibrila amilóide monitorado por fluorescência de ThT e dicroísmo circular a 216 nm mostrados na Figura 28.**

Proteína	CD	ThT
WT	$89 \pm 4$	$70 \pm 4$
W7F/W14F	$60 \pm 2$	$53 \pm 3$
H36Q	$68 \pm 3$	$64 \pm 2$
H24V/H119F	$97 \pm 2$	$82 \pm 3$

Os mutantes V10F/M131F, apoMb<sub>1-123</sub>, C\_GHAB e B\_GHA, também foram estudados quanto à energia de ativação do processo de formação de fibrila amilóide, sendo os resultados obtidos, mostrados na Tabela 13 a seguir.

**Tabela 13. Energia de ativação ( $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) do processo de formação de fibrila amilóide monitorado por fluorescência de ThT e dicroísmo circular a 216 nm dos mutantes V10F/M131F, apoMb<sub>1-123</sub>, C\_GHAB e B\_GHA.**

Proteína	CD	ThT
V10F/M131F	$94 \pm 2$	$83 \pm 3$
apoMb <sub>1-123</sub>	$65 \pm 1$	$58 \pm 2$
B_GHA	$75 \pm 2$	$66 \pm 3$
C_GHAB	$80 \pm 1$	$71 \pm 3$

#### 4.10 Caracterização por difração de raios-X das fibrilas amilóides das apomioglobinas selvagem e mutantes W7F/W14F, H36Q e H24V/H119F

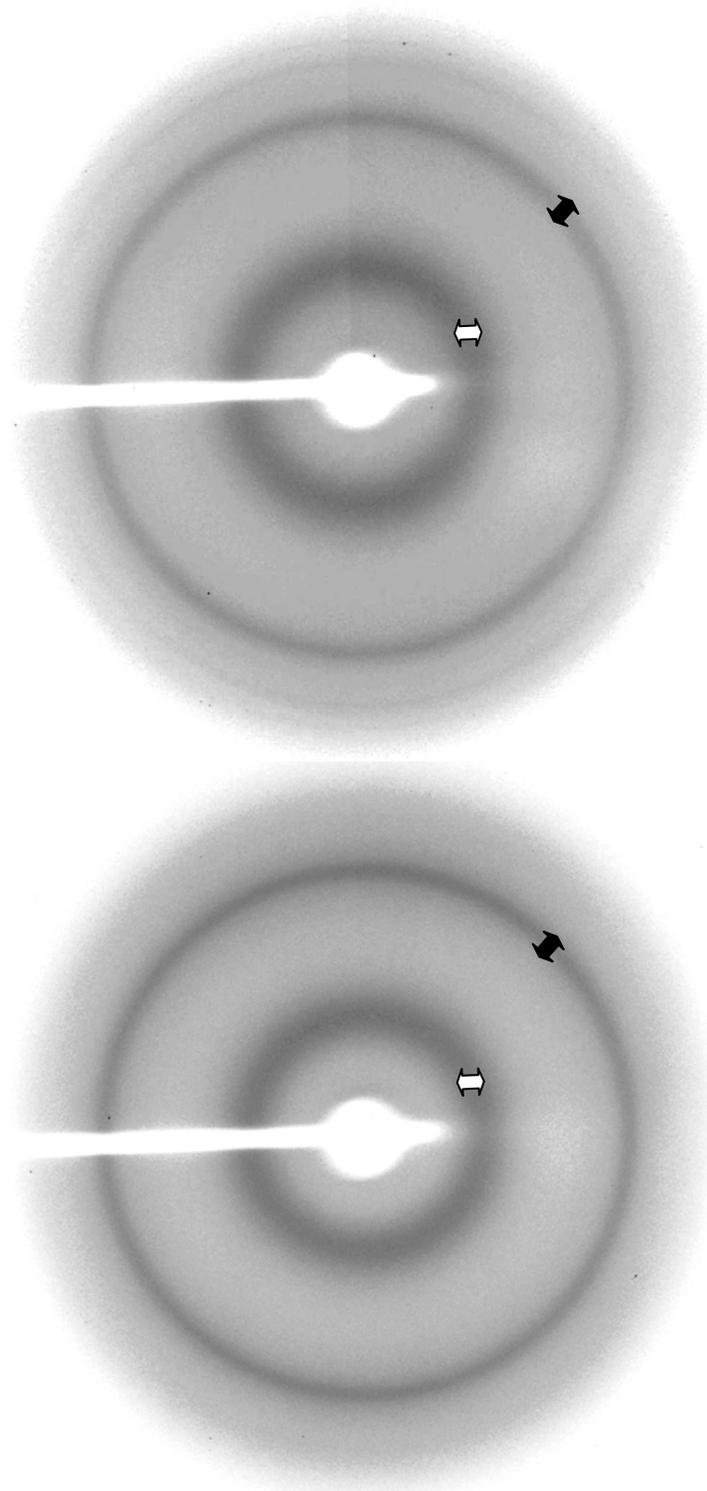
Apresentamos a seguir os resultados da caracterização estrutural das fibrilas amilóides por difração de raios-X. As amostras foram preparadas como descrito no item 3.2.21 (pág. 92), sendo posteriormente colocadas em aparato apropriado para que as mesmas fossem incididas com um feixe de raios-X. As coletas dos dados provenientes da difração das amostras de amilóides estudadas, foram realizadas na linha D03B-MX1

do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), tendo como parâmetros de coleta: feixe de luz monocromática de  $\lambda=1,488$  Å, distância entre a amostra e detector MAR345™ de 100 mm e aquisição da imagem de difração no modo de ângulo fixo por 15 minutos. Os dados foram escalonados e integrados com o programa HKL2000® (OTWINOWSKI e MINOR, 1997).

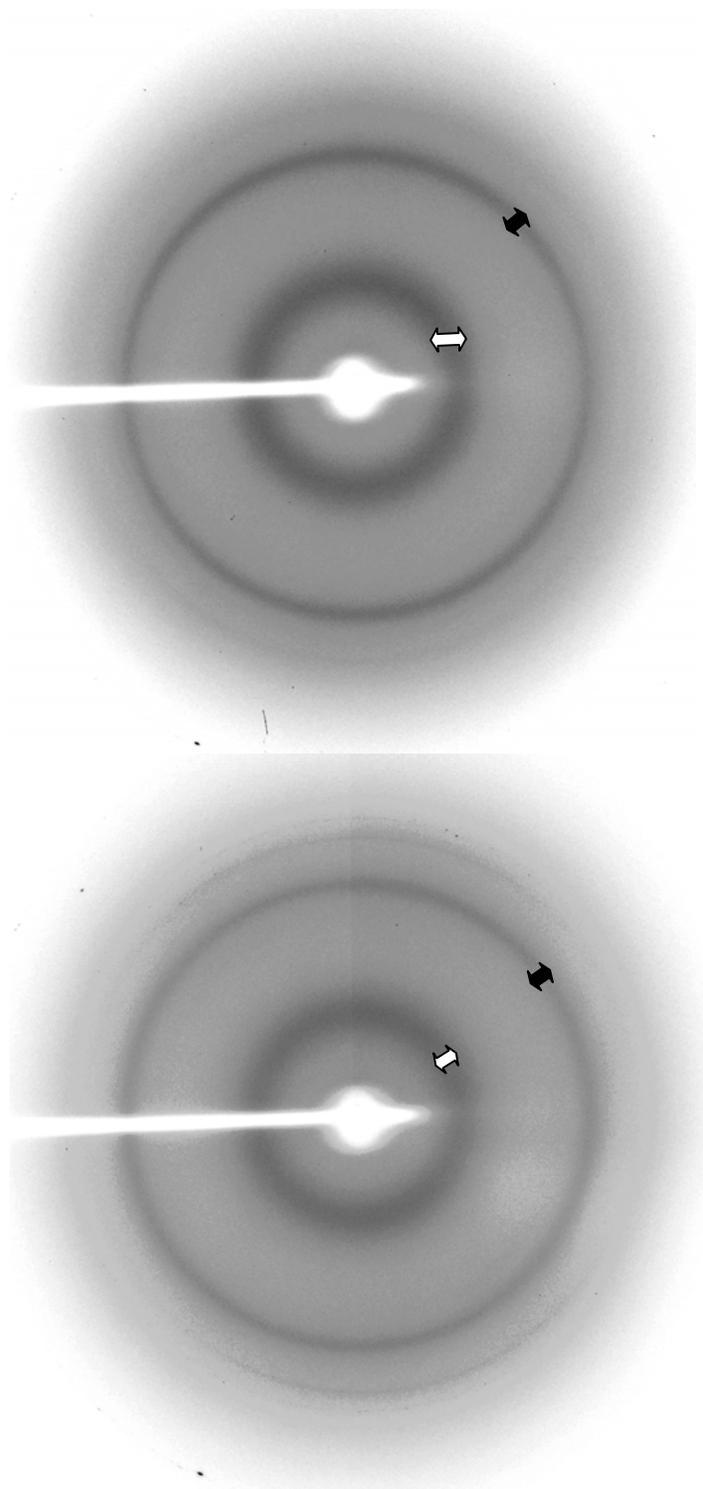
Como pode ser observado nas Figuras 29 e 30 (págs. 124 e 125, respectivamente), as formas fibrilares das apomioglobinas estudadas por difração de raios-X, mostram padrões de difração de raios-X da ordem de  $4,57 \pm 0,07$  Å e  $9,63 \pm 0,48$  Å, valores esses, indicativos das distâncias entre as fitas- $\beta$  e entre as folhas- $\beta$ , respectivamente. Na Figura 29 (pág. 124), mostramos o perfil de difração de raios-X das fibrilas amilóides da apomioglobina selvagem e do duplo mutante W7F/W14F, na Figura 30 (pág. 125), os do mutante H36Q e do duplo mutante H24V/H119F.

#### **4.11 Citotoxicidade em célula N2A das diferentes formas agregadas de apomioglobinas selvagem e mutantes W7F/W14F, H36Q, H24V/H119F, V10F/M131F, apoMb<sub>1-123</sub>, C\_GHAB e B\_GHA**

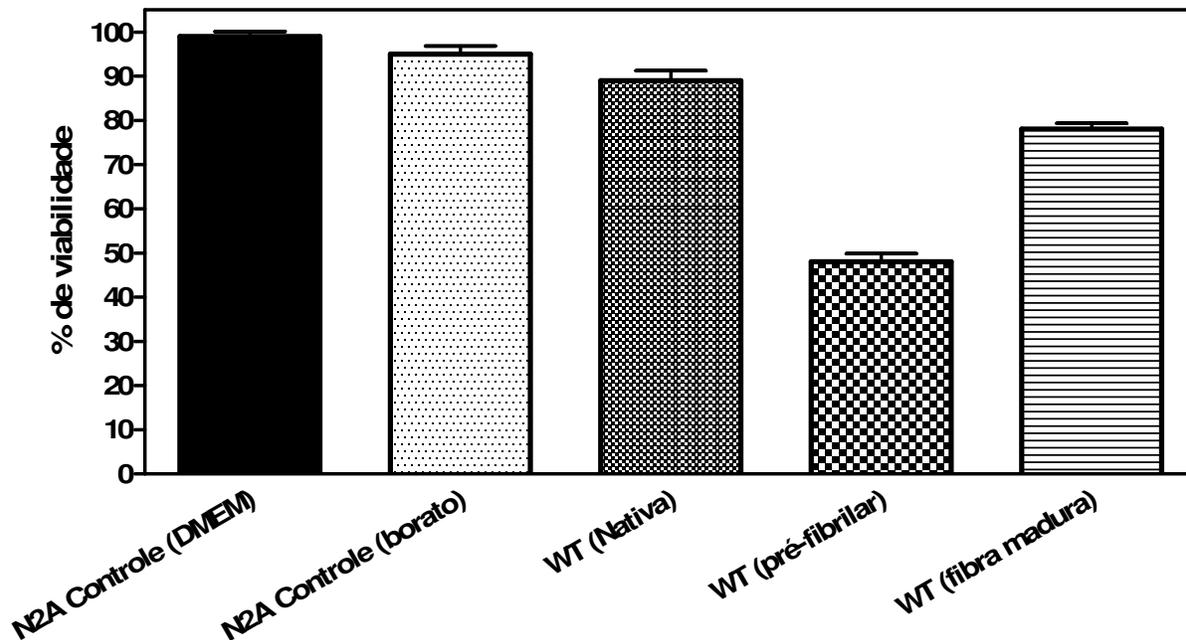
Para avaliar a citotoxicidade das diferentes formas de agregados do processo amiloidogênico das apomioglobinas, utilizamos a linhagem neuronal de neuroblastoma murino (N2A). A viabilidade celular foi avaliada pela capacidade de redução do MTT, para tanto, células N2A foram cultivadas, tratadas e processadas como previamente descrito no item 3.2.20, pág. 91. Avaliamos a citotoxicidade das formas nativas, pré-fibrilares e fibrilares das apomioglobinas selvagem e mutantes V10F/M131F, H24V/H119F, H36Q, W7F/W14F, apoMb<sub>1-123</sub>, B\_GHA e C\_GHAB. Observamos (Figuras 31 a 38, págs. 126 a 133), uma acentuada diminuição da viabilidade celular (Tabela 14, pág. 134) nas culturas tratadas com as formas pré-fibrilares de todas as proteínas estudadas. A viabilidade das células incubadas com as formas nativas das proteínas, ficaram próximas ao dos controles.



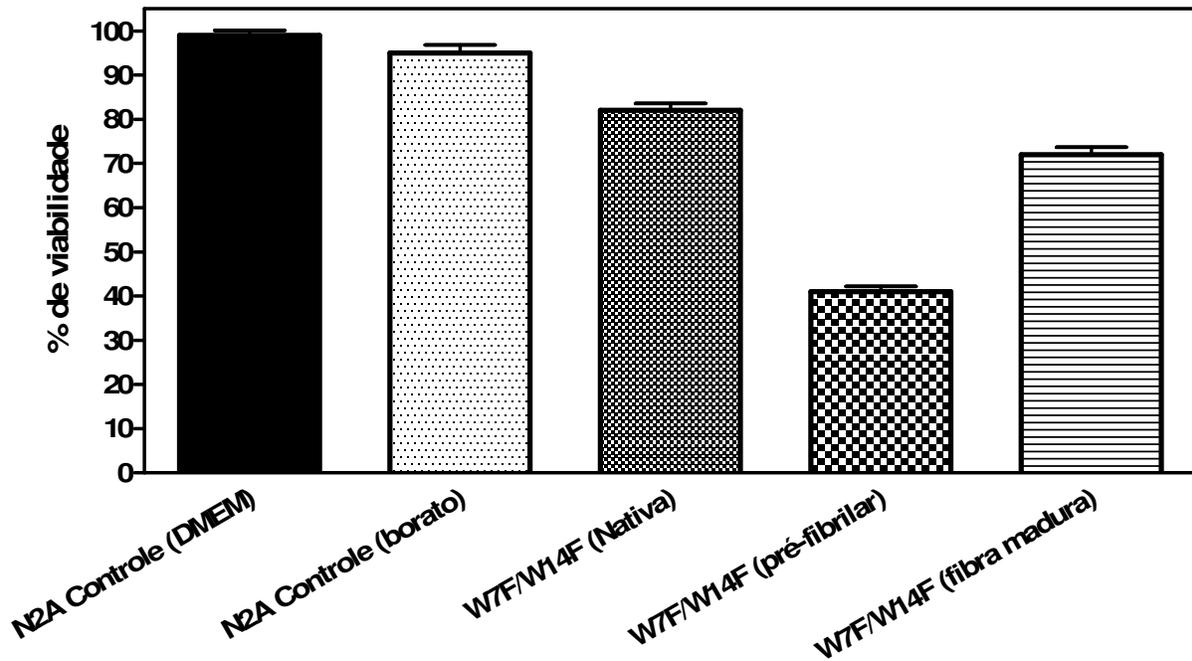
**Figura 29. Padrão de difração de raios-X de fibrila amilóide da proteína selvagem WT (superior) e mutante W7F/W14F (inferior).** Observa-se duas reflexões principais, uma centrada em 9,8 Å (WT) e 9,6 Å (W7F/W14F) (entre setas brancas) e uma segunda centrada em 4,5 Å (WT) e 4,5 Å (W7FW14F) (entre setas pretas).



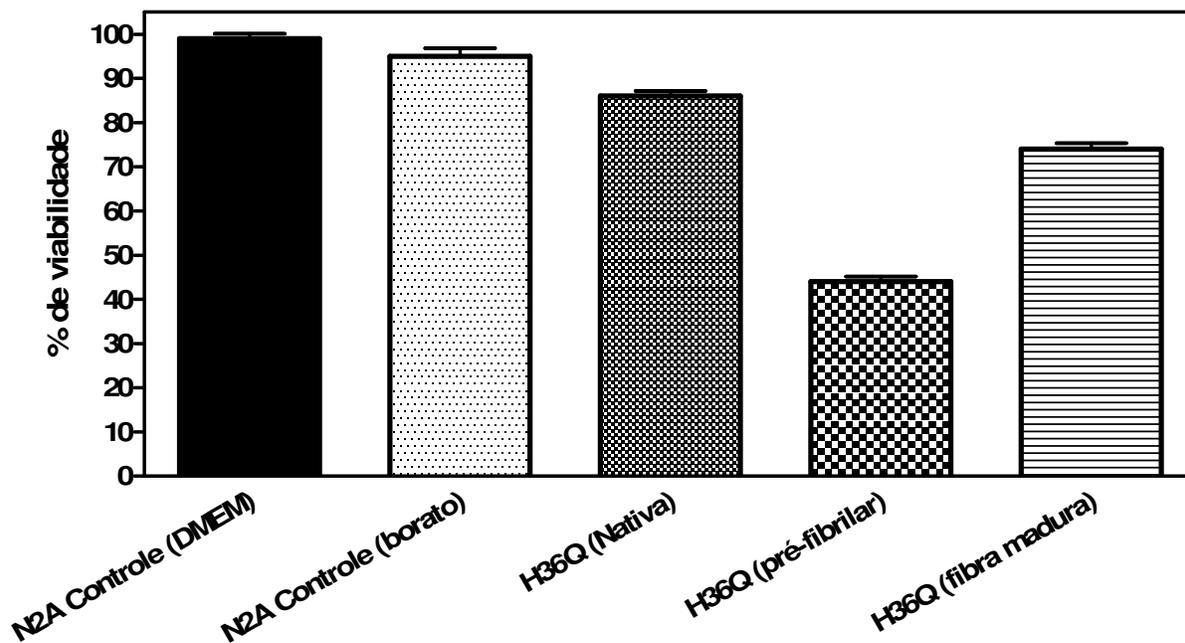
**Figura 30. Padrão de difração de raios-X de fibrila amilóide dos mutantes H36Q (superior) e H24VH119F (inferior).** Observa-se duas reflexões principais, uma centrada em 9,9 Å (H36Q) e 9,7 Å (H24VH119F) (entre setas brancas) e uma segunda centrada em 4,4 Å (H36Q) e 4,6 Å (H24VH119F) (entre setas pretas).



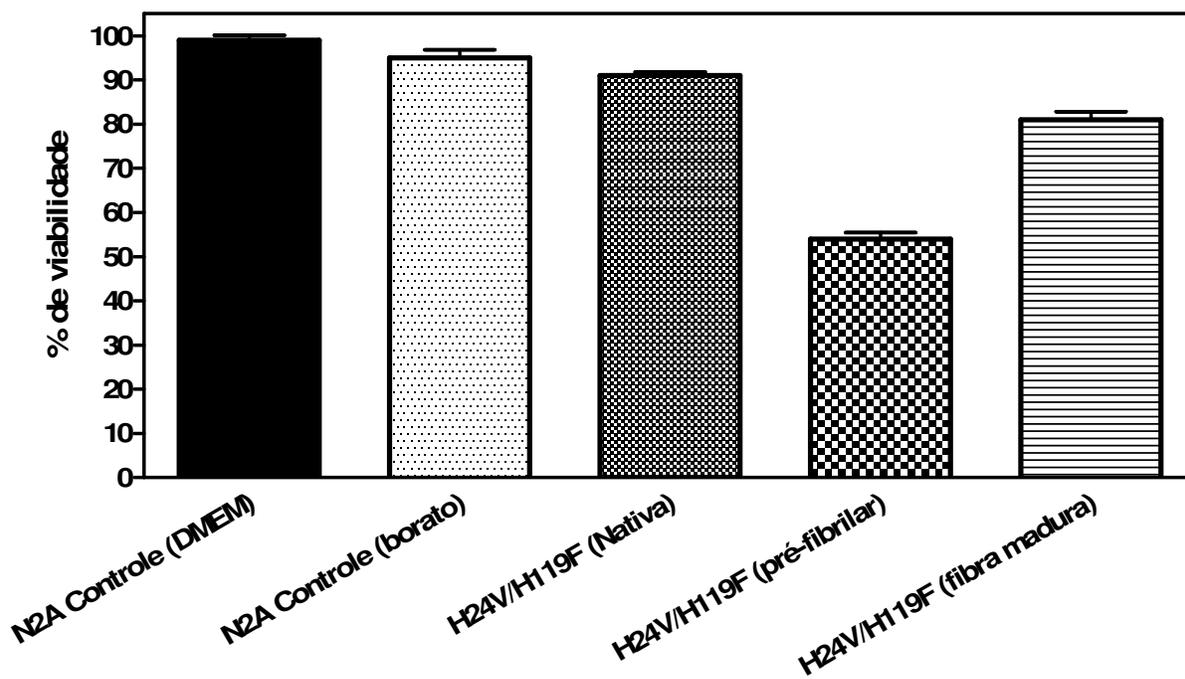
**Figura 31. Viabilidade celular determinada pelo teste de redução do MTT.** A viabilidade é representada em porcentagem, sendo 100% de viabilidade a cultura incubada sem proteína. As células foram incubadas com as formas nativa, pré-fibrilares e fibrilar da proteína selvagem como descrito no item 3.2.20, pág. 91. Os controles foram: células sem proteína e células só com o tampão idêntico ao das proteínas. Os dados apresentados são as médias de três experimentos independentes, sendo cada um deles realizado em oito replicatas; as barras sobre cada coluna representam o erro padrão entre os três experimentos.



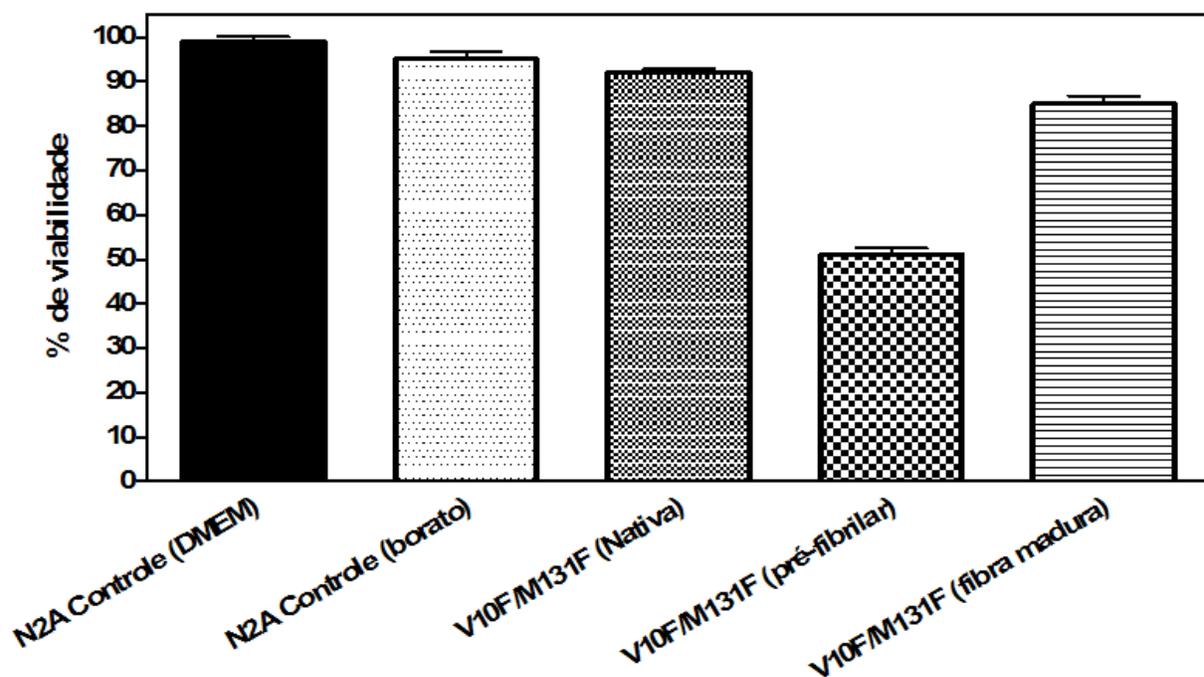
**Figura 32. Viabilidade celular determinada pelo teste de redução do MTT.** A viabilidade é representada em porcentagem, sendo 100% de viabilidade a cultura incubada sem proteína. As células foram incubadas com as formas nativa, pré-fibrilares e fibrilar do mutante W7F/W14F como descrito no item 3.2.20, pág. 91. Os controles foram: células sem proteína e células só com o tampão idêntico ao das proteínas. Os dados apresentados são as médias de três experimentos independentes, sendo cada um deles realizado em oito replicatas; as barras sobre cada coluna representam o erro padrão entre os três experimentos.



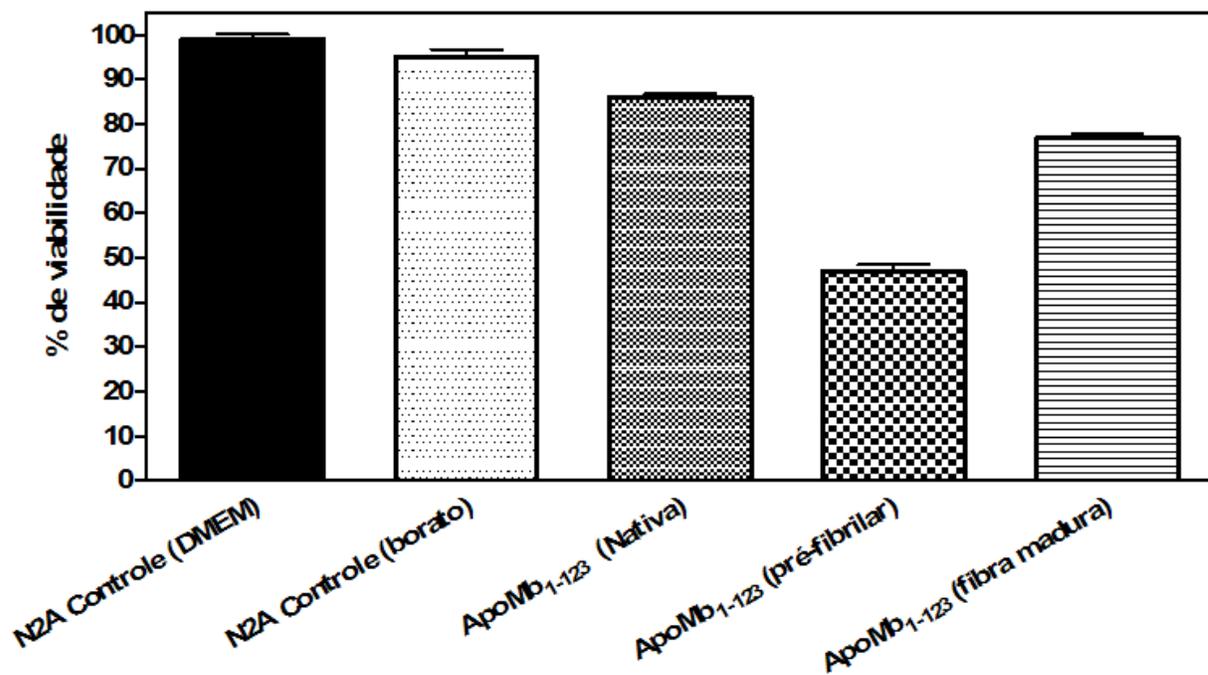
**Figura 33. Viabilidade celular determinada pelo teste de redução do MTT.** A viabilidade é representada em porcentagem, sendo 100% de viabilidade a cultura incubada sem proteína. As células foram incubadas com as formas nativa, pré-fibrilares e fibrilar do mutante H36Q como descrito no item 3.2.20, pág. 91. Os controles foram: células sem proteína e células só com o tampão idêntico ao das proteínas. Os dados apresentados são as médias de três experimentos independentes, sendo cada um deles realizado em oito replicatas; as barras sobre cada coluna representam o erro padrão entre os três experimentos.



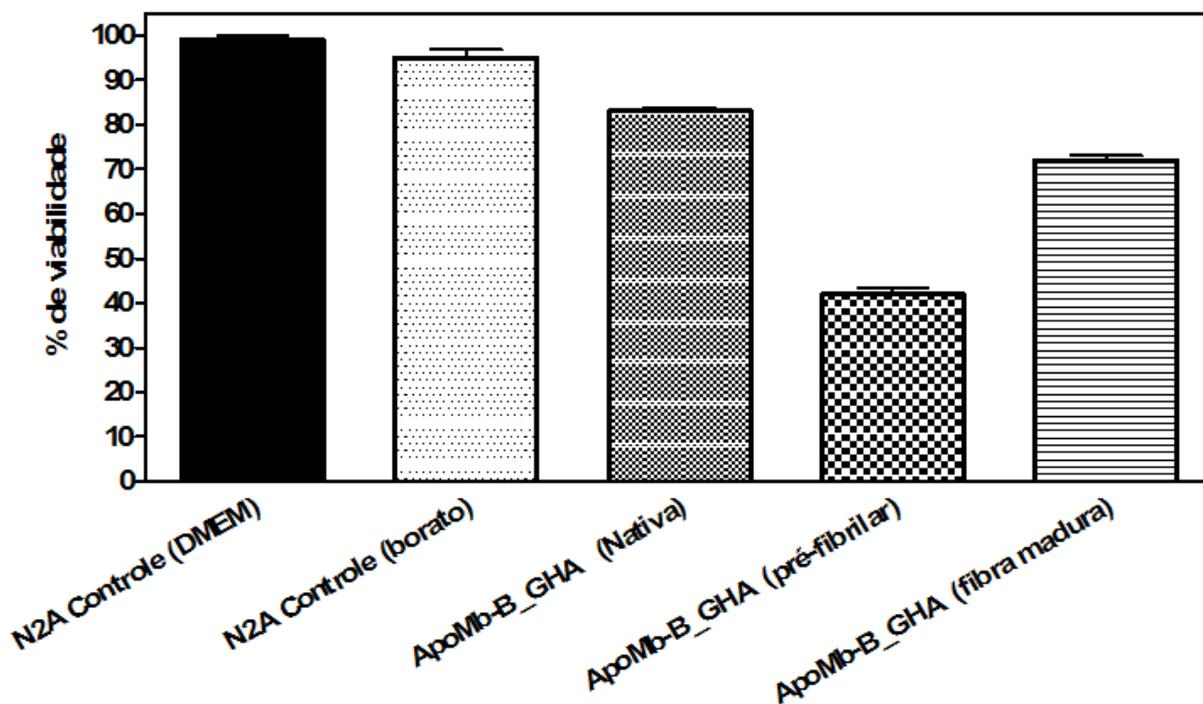
**Figura 34. Viabilidade celular determinada pelo teste de redução do MTT.** A viabilidade é representada em porcentagem, sendo 100% de viabilidade a cultura incubada sem proteína. As células foram incubadas com as formas nativa, pré-fibrilares e fibrilar do mutante H24V/H119F como descrito no item 3.2.20, pág. 91. Os controles foram: células sem proteína e células só com o tampão idêntico ao das proteínas. Os dados apresentados são as médias de três experimentos independentes, sendo cada um deles realizado em oito replicatas; as barras sobre cada coluna representam o erro padrão entre os três experimentos.



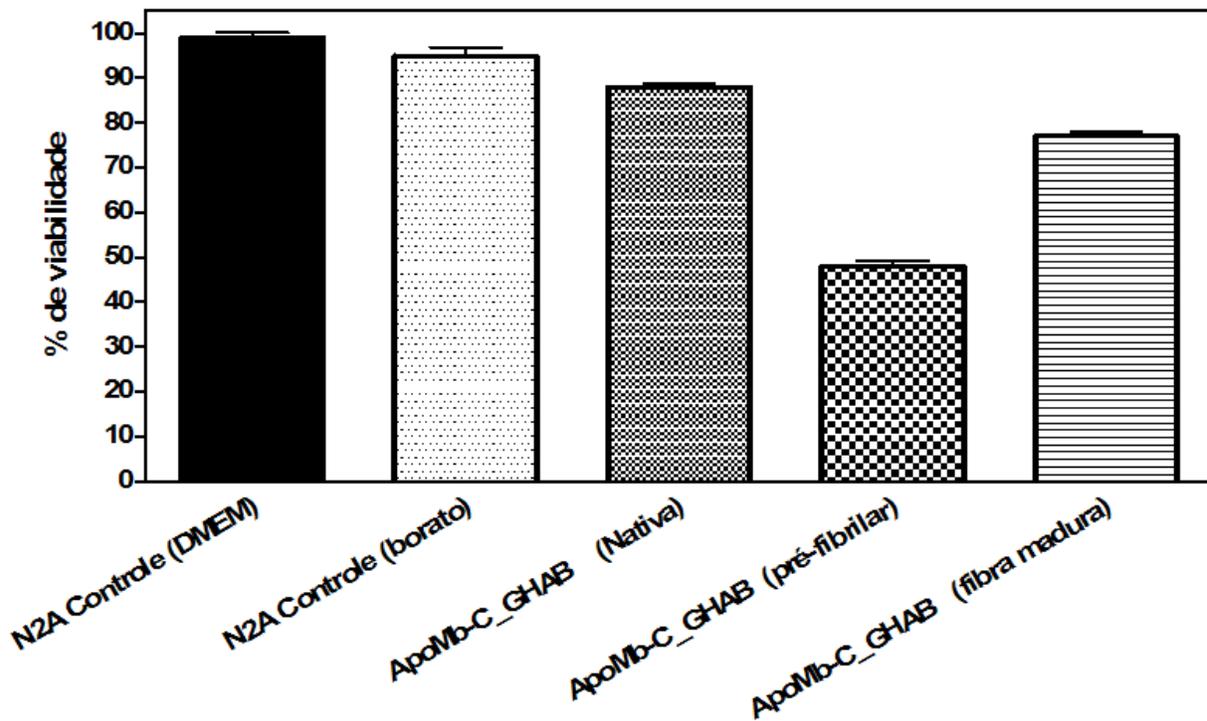
**Figura 35. Viabilidade celular determinada pelo teste de redução do MTT.** A viabilidade é representada em porcentagem, sendo 100% de viabilidade a cultura incubada sem proteína. As células foram incubadas com as formas nativa, pré-fibrilares e fibrilar do mutante V10F/M131F como descrito no item 3.2.20, pág. 91 Os controles foram: células sem proteína e células só com o tampão idêntico ao das proteínas. Os dados apresentados são as médias de três experimentos independentes, sendo cada um deles realizado em oito replicatas; as barras sobre cada coluna representam o erro padrão entre os três experimentos.



**Figura 36. Viabilidade celular determinada pelo teste de redução do MTT.** A viabilidade é representada em porcentagem, sendo 100% de viabilidade a cultura incubada sem proteína. As células foram incubadas com as formas nativa, pré-fibrilares e fibrilar do mutante apoMb<sub>1-123</sub> como descrito no item 3.2.20, pág. 91 Os controles foram: células sem proteína e células só com o tampão idêntico ao das proteínas. Os dados apresentados são as médias de três experimentos independentes, sendo cada um deles realizado em oito replicatas; as barras sobre cada coluna representam o erro padrão entre os três experimentos.



**Figura 37. Viabilidade celular determinada pelo teste de redução do MTT.** A viabilidade é representada em porcentagem, sendo 100% de viabilidade a cultura incubada sem proteína. As células foram incubadas com as formas nativa, pré-fibrilares e fibrilar do mutante B\_GHA como descrito no item 3.2.20, pág. 91. Os controles foram: células sem proteína e células só com o tampão idêntico ao das proteínas. Os dados apresentados são as médias de três experimentos independentes, sendo cada um deles realizado em oito replicatas; as barras sobre cada coluna representam o erro padrão entre os três experimentos.



**Figura 38. Viabilidade celular determinada pelo teste de redução do MTT.** A viabilidade é representada em porcentagem, sendo 100% de viabilidade a cultura incubada sem proteína. As células foram incubadas com as formas nativa, pré-fibrilares e fibrilar do mutante C\_GHAB como descrito no item 3.2.20, pág. 91. Os controles foram: células sem proteína e células só com o tampão idêntico ao das proteínas. Os dados apresentados são as médias de três experimentos independentes, sendo cada um deles realizado em oito replicatas; as barras sobre cada coluna representam o erro padrão entre os três experimentos.

**Tabela 14. Comparação da viabilidade celular de células N2A em reduzir MTT. Valores expressos em porcentagem de células viáveis após incubação com as diferentes formas agregadas das apomioglobinas selvagem (WT) e mutantes W7F/W14F, H24V/H119F, H36Q, V10F/M131F, apoMb<sub>1-123</sub>, C\_GHAB e B\_GHA.**

<b>Proteína</b>	<b>Forma nativa</b>	<b>Forma pré-fibrilar</b>	<b>Fibrila Madura</b>	<b>Valores de p<sup>a,b</sup></b>
<b>WT</b>	<b>89 ± 4 %</b>	<b>48 ± 3 %</b>	<b>78 ± 2 %</b>	<sup>a</sup> (<0,0001) <sup>b</sup> (0,0131)
<b>W7F/W14F</b>	<b>82 ± 3 %</b>	<b>42 ± 2 %</b>	<b>71 ± 3 %</b>	<sup>a</sup> (<0,0001) <sup>b</sup> (0,0109)
<b>H24V/H119F</b>	<b>91 ± 1 %</b>	<b>54 ± 2 %</b>	<b>81 ± 3 %</b>	<sup>a</sup> (<0,0001) <sup>b</sup> (0,0054)
<b>H36Q</b>	<b>86 ± 2 %</b>	<b>44 ± 2 %</b>	<b>74 ± 2 %</b>	<sup>a</sup> (<0,0001) <sup>b</sup> (0,0018)
<b>V10F/M131F</b>	<b>92 ± 3 %</b>	<b>51 ± 3 %</b>	<b>85 ± 4 %</b>	<sup>a</sup> (<0,0001) <sup>b</sup> (0,0724)
<b>Mb<sub>1-123</sub></b>	<b>86 ± 3 %</b>	<b>47 ± 3 %</b>	<b>77 ± 3 %</b>	<sup>a</sup> (<0,0001) <sup>b</sup> (0,0213)
<b>B_GHA</b>	<b>84 ± 2 %</b>	<b>42 ± 2 %</b>	<b>73 ± 3 %</b>	<sup>a</sup> (<0,0001) <sup>b</sup> (0,0062)
<b>C_GHAB</b>	<b>88 ± 2 %</b>	<b>48 ± 3 %</b>	<b>77 ± 3 %</b>	<sup>a</sup> (<0,0001) <sup>b</sup> (0,0062)

<sup>a,b</sup> Significância estatística da diferença entre a viabilidade celular de células N2A incubadas com as formas nativa e pré-fibrilar (<sup>a</sup>) e nativa e fibrila madura (<sup>b</sup>). Diferenças significativas implicam valores de p<0,01 após aplicar teste “t” em par de Student, com distribuição bicaudal.

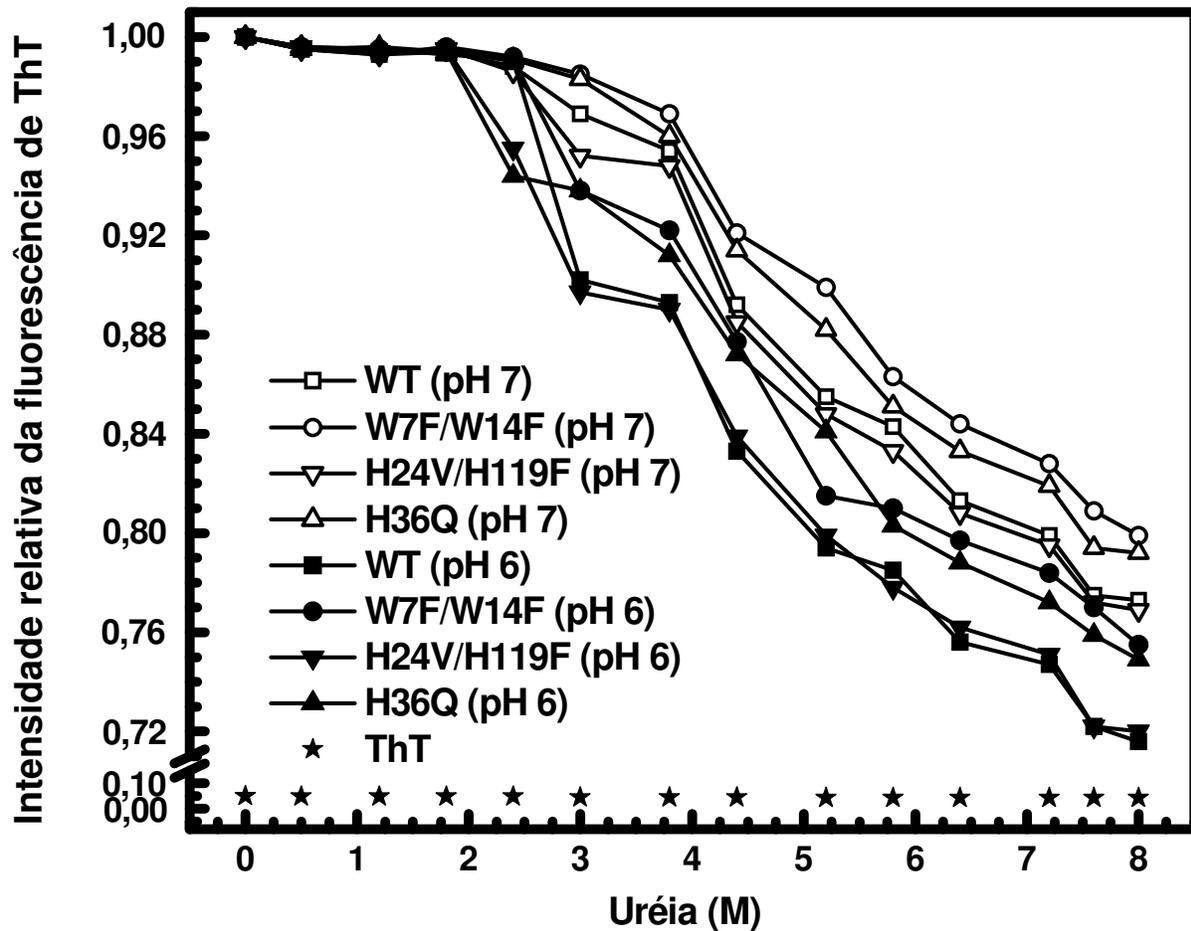
#### **4.12 Efeito da dissociação induzida por uréia das fibrilas amilóides em pH 6 e 7**

Para avaliar a estabilidade das fibrilas amilóides de apomioglobinas, realizamos experimentos de dissociação dessas estruturas, induzida por uréia em duas condições de pH (7 e 6), com descrito no item 3.2.23, pág. 94. Nossos resultados (Figura 39, pág. 136) mostram que houve uma sutil diferença do efeito dissociativo da uréia nas duas condições de pH. Comparadas com as fibrilas formadas pela proteína selvagem (designada por quadrados na Figura 39, pág. 136), as fibrilas formadas pelos mutantes W7F/W14F e H36Q (designadas por círculos e triângulos na Figura 39, pág. 136) se mostraram mais resistentes, equanto que as fibrilas formadas pelo mutante H24V/H119F (designado por triângulos invertidos na Figura 39, pág. 136), apresentou-se ligeiramente menos resistente. Os dados apresentados são referentes a 24 horas de incubação com uréia, sendo, entretanto, observado que mesmo ao se prolongar o tempo de exposição das fibrilas à ureia em até  $\cong$  60 horas, não observamos diferenças do efeito dissociativo nesses dois tempos.

#### **4.13 Atividade chaperona das sHsps (17 e 18) de cana-de-açúcar e Hsp40 (DjA1) humana, na prevenção da agregação e fibrilização do mutante W7F/W14F**

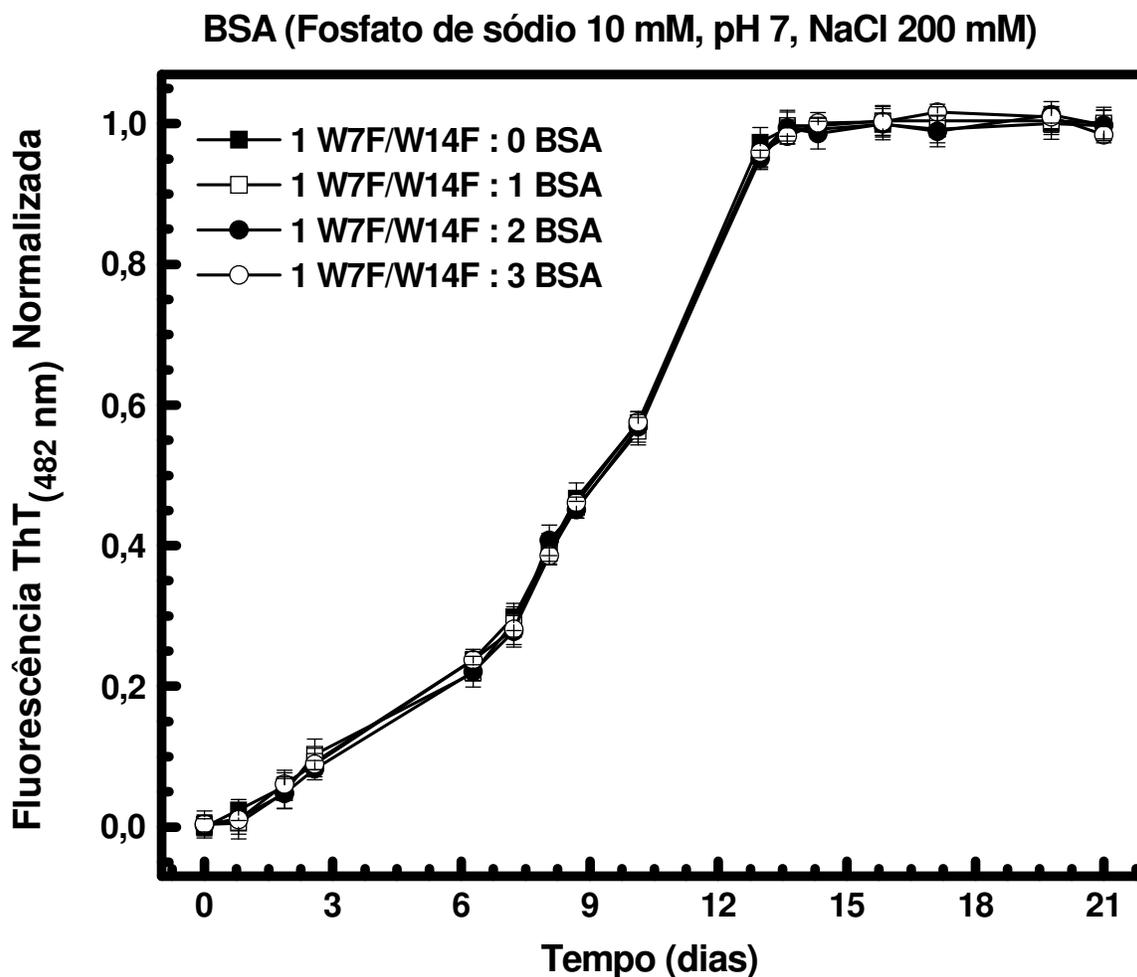
Mostramos a seguir, os resultados referentes à atividade chaperona das sHsps de cana-de-açúcar (17 e 18) e da Hsp40 (DjA1) humana descritas anteriormente (item 1.3.1, pág. 42), no processo de proteção contra agregação e fibrilização do mutante W7F/W14F. Os experimentos foram realizados utilizando como controle negativo de atividade chaperona a proteína BSA. Ao submetermos o mutante W7F/W14F, juntamente com a proteína BSA (item 4.13.1, pág. 137) ao processo amiloidogênico descrito especificamente no item 3.2.22, pág 93, e acompanhando ao longo do tempo a fluorescência de ThT dessa mistura, verificamos que não houve diferença entre a

formação de amilóides do mutante W7F/W14F sem e com a proteína BSA (Figura 40, pág. 137).



**Figura 39. Dissociação induzida por uréia das fibrilas amilóides em pH 6 e 7.** Fibrilas maduras, 20  $\mu$ M, foram incubadas com uréia (0-8 M), em tampão fosfato de sódio 25 mM, em pH 7 (símbolos abertos) e 6 (símbolos cheios), por 24 horas, a 25°C; em seguida uma alíquota foi misturada com solução estoque de ThT até a proporção final fibrila:ThT de 1:5 (4:20  $\mu$ M). A dissociação foi aferida pela monitoração da fluorescência de ThT, tendo como branco, a proteína selvagem preparada como descrito no item 3.2.23, pág. 94 (estrelas). WT (quadrados), W7F/W14F (círculos), H24V/H119F (triângulos invertidos) e H36Q (triângulos). As linhas contínuas servem apenas para guiar os olhos, sendo os erros menores do que os símbolos.

#### 4.13.1 BSA como controle negativo da atividade chaperona



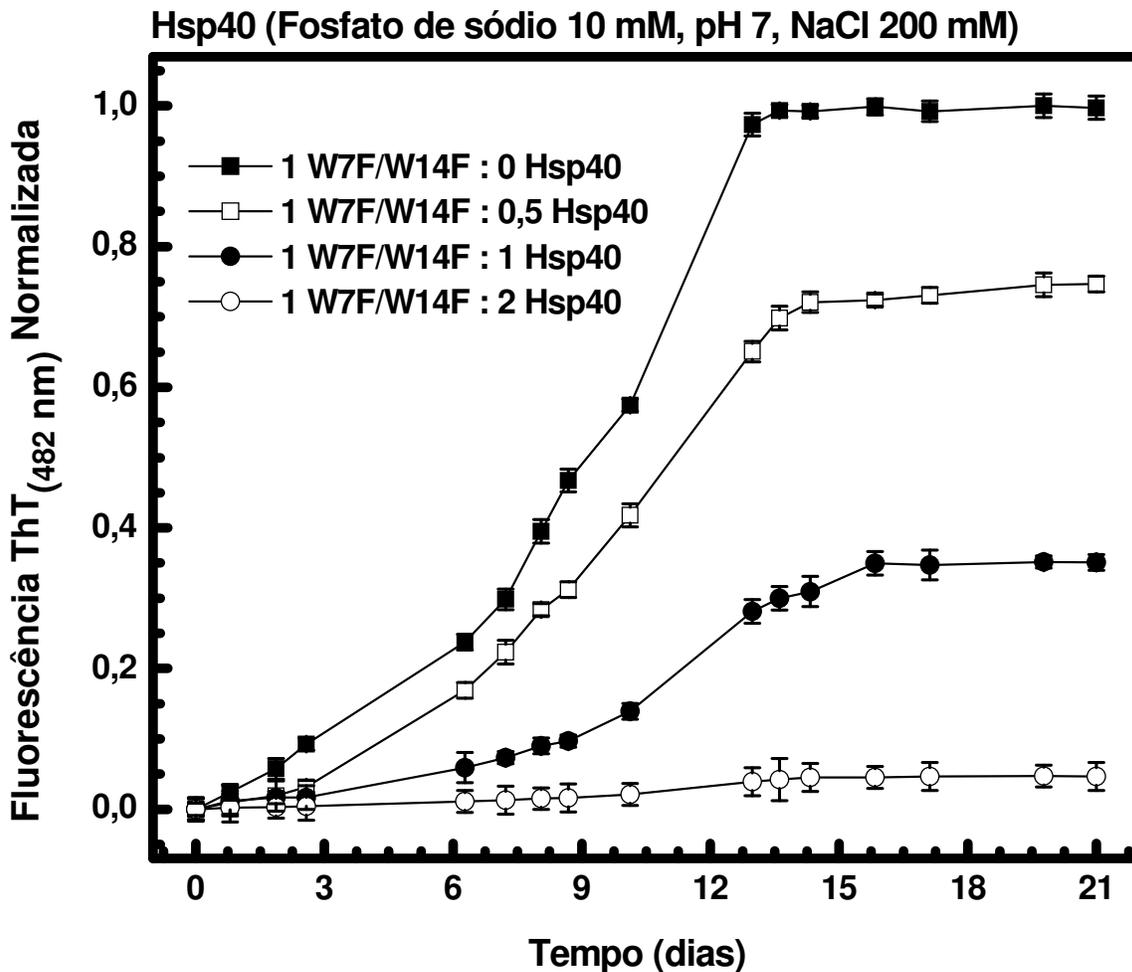
**Figura 40. Efeito de BSA na formação de fibrila amilóide da apomioglobina W7F/W14F.** A proteína W7F/W14F foi incubada com BSA, em diferentes proporções molares de monômeros, e a ligação de ThT foi monitorada por fluorescência. A BSA, nas 3 proporções testadas, não evitou a agregação/fibrilização de W7F/W14F. Os pontos são a média  $\pm$  desvio padrão de 5 leituras, de dois experimentos independentes. A fluorescência de ThT da BSA sozinha (0,010 – 0,013), ao longo do tempo, não foi significativa.

#### **4.13.2 Atividade chaperona das sHsp 17 e 18 de cana-de-açúcar e da Hsp40 (DJA1) humana**

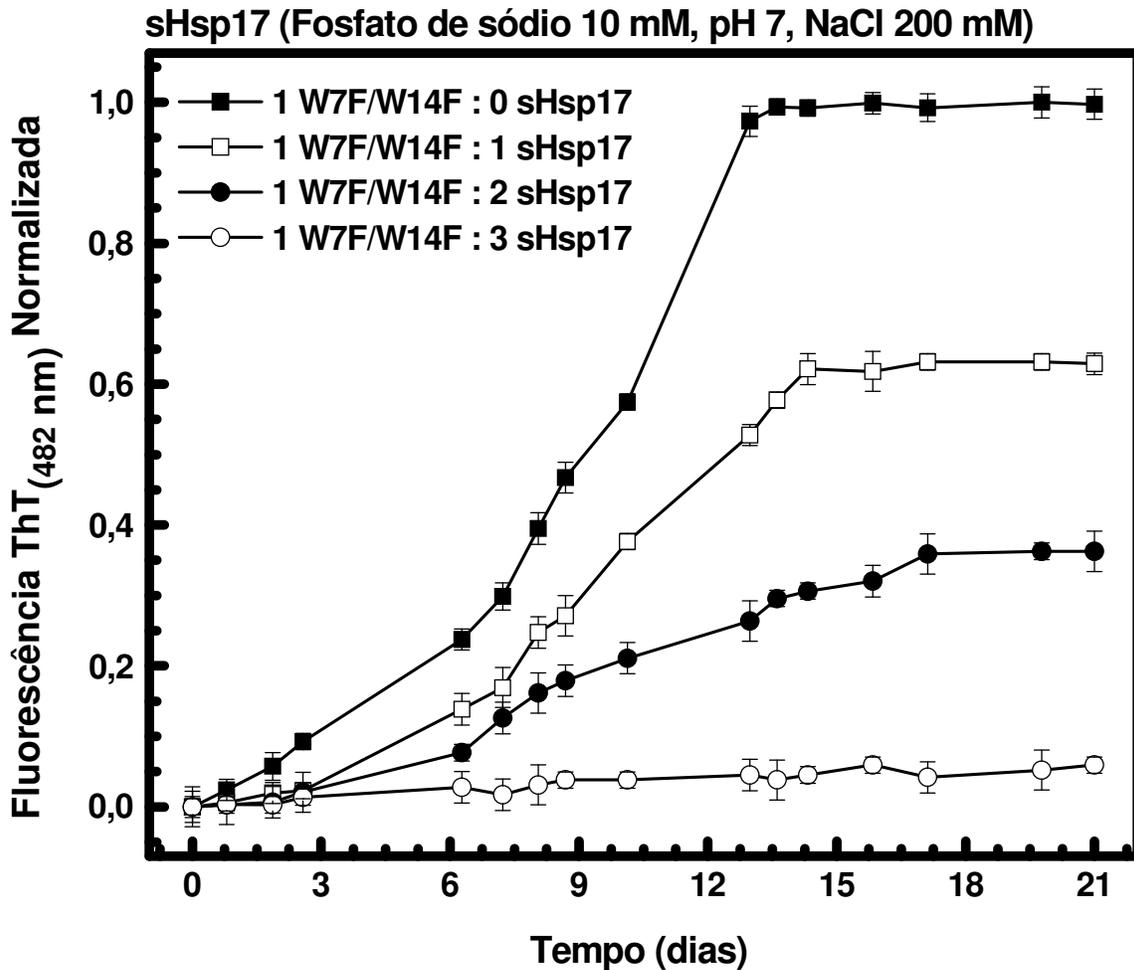
Nos experimentos com as chaperonas moleculares, submetemos o mutante W7F/W14F com diferentes proporções dos monômeros de cada chaperona estudada (item 3.2.22, pág 93). De forma semelhante ao realizado no controle negativo (item 4.13.1, pág. 137), acompanhamos ao longo do tempo a fluorescência de ThT da mistura do mutante W7F/W14F com as diferentes chaperonas.

Com relação ao experimento com a Hsp40 (DjA1) humana, pudemos observar que essa chaperona apresentou considerável efeito protetor (Figura 41, pág. 139) na prevenção do processo de agregação e fibrilização do mutante W7F/W14F (>60% na proporção de monômeros de W7F/W14F:Hsp40 de 1:1, e >95% na proporção de monômeros de 1:2).

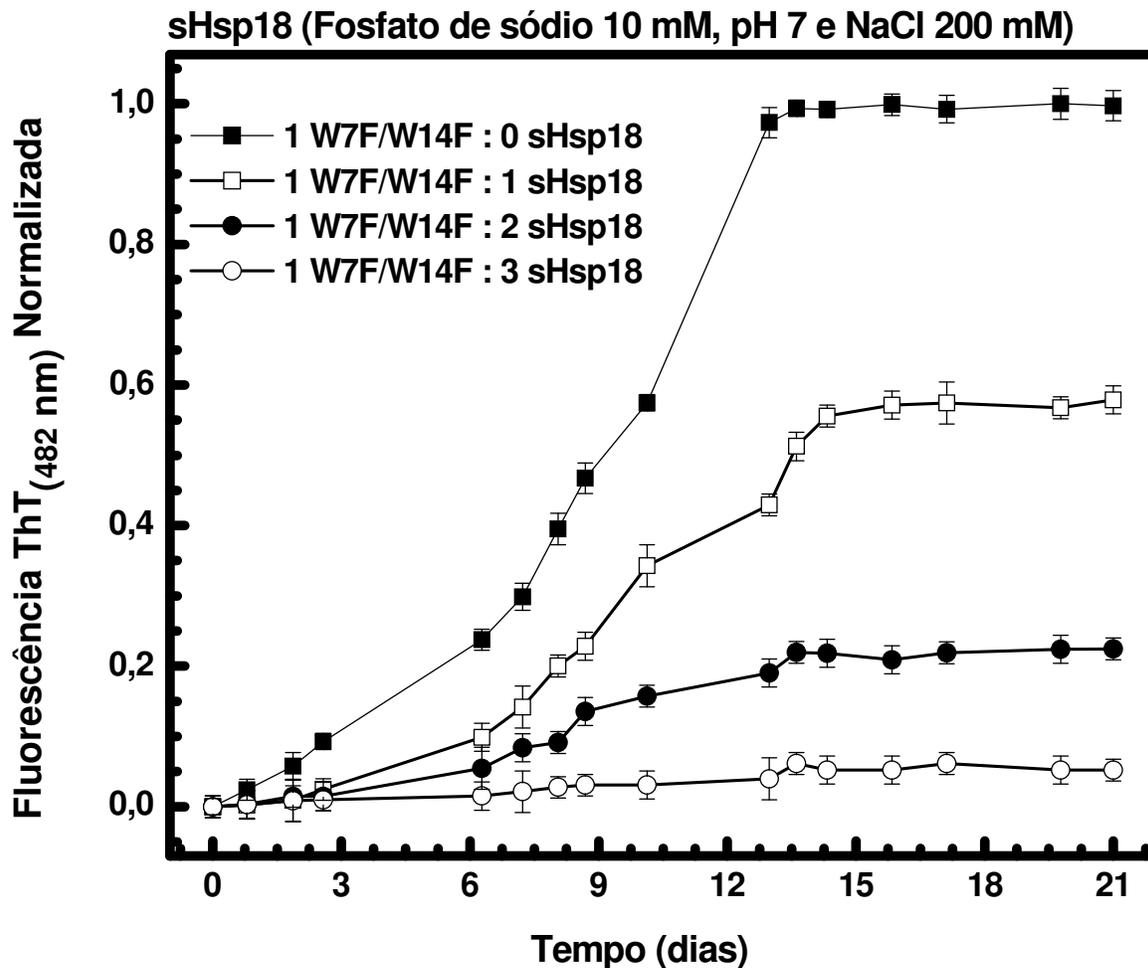
Quanto as sHsps 17 e 18 de cana-de-açúcar, constatamos que ambas também apresentaram considerável efeito protetor na prevenção do processo de agregação e fibrilização do mutante W7F/W14F. O mutante W7F/W14F, quando incubado com a sHsp 17 nas proporções de monômeros de 1:2 e 1:3 (Figura 42, pág. 140), observamos praticamente o mesmo efeito protetor como o averiguado no caso da incubação com a Hsp40 (DjA1) humana (Figura 41, pág. 139) nas proporções de 1:1 e 1:2, respectivamente. No estudo do efeito protetor da sHsp 18 na prevenção do processo de agregação e fibrilização da proteína W7F/W14F (Figura 43, pág. 141), observamos que nas mesmas proporções de monômeros utilizada no experimento com a sHsp 17 (Figura 42, pág. 140), os efeitos foram semelhantes, com exceção da proporção de monômero de W7F/W14F:sHsp de 1:2, situação na qual a sHsp 18 apresentou um efeito protetor >80%, enquanto que a sHsp 17 teve um efeito protetor >65%.



**Figura 41. Atividade chaperona de Hsp40 (DjA1) humana na prevenção da formação de fibrila amilóide da apomioglobina W7F/W14F.** A proteína W7F/W14F foi incubada com Hsp40 (DjA1) humana, em diferentes proporções molares relativa aos monômeros, e a ligação de ThT foi monitorada por fluorescência. A Hsp40, nas 3 proporções testadas, evitou de forma crescente e proporcional a agregação/fibrilização de W7F/W14F. Os pontos são a média  $\pm$  desvio padrão de 5 leituras, de dois experimentos independentes. A fluorescência de ThT da Hsp40 sozinha (0,014 – 0,018), ao longo do tempo, não foi significativa.



**Figura 42. Atividade chaperona de sHsp17 de cana-de-açúcar na prevenção da formação de fibrila amilóide da apomioglobina W7F/W14F.** A proteína W7F/W14F foi incubada com sHsp17, em diferentes proporções molares relativa aos monômeros, e a ligação de ThT foi monitorada por fluorescência. A sHsp17, nas 3 proporções testadas, evitou de forma crescente e proporcional a agregação/fibrilização de W7F/W14F. Os pontos são a média  $\pm$  desvio padrão de 5 leituras, de dois experimentos independentes. A fluorescência de ThT da sHsp17 sozinha (0,013 – 0,019), ao longo do tempo, não foi significativa.



**Figura 43. Atividade chaperona de sHsp18 de cana-de-açúcar na prevenção da formação de fibrila amilóide da apomioglobina W7F/W14F.** A proteína W7F/W14F foi incubada com sHsp18, em diferentes proporções molares relativa aos monômeros, e a ligação de ThT foi monitorada por fluorescência. A sHsp18, nas 3 proporções testadas, evitou de forma crescente e proporcional a agregação/fibrilização de W7F/W14F. Os pontos são a média  $\pm$  desvio padrão de 5 leituras, de dois experimentos independentes. A fluorescência de ThT da sHsp18 sozinha (0,012 – 0,015), ao longo do tempo, não foi significativa.

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Expressão e purificação das proteínas estudadas

Todas as apomioglobinas selvagem e os 19 mutantes, bem como as chaperonas utilizadas, foram devidamente expressas nas linhagens *E.coli* BL21(DE3) e *E. coli* BL21(DE3)pLysS. As apomioglobinas já se encontravam clonadas em vetor pET-T(7), enquanto as sHsps (17 e 18) de cana-de-açúcar e Hsp40 (DjA1) humana, por sua vez, estavam clonadas nos vetores pET3a (sHsps) e pET28a (Hsp40). As apomioglobinas e Hsp40 foram expressas na linhagem *E. coli* BL21(DE3), enquanto as sHsps na linhagem *E. coli* BL21(DE3)pLysS.

Testes de indução mostraram que as apomioglobinas utilizadas neste projeto foram devidamente expressas após 4-16 h de indução por IPTG 0,4 mmol/L a 42°C, ficando estocadas em corpos de inclusão, sendo que após a purificação, todas apresentaram grande solubilidade aquosa e considerável rendimento de expressão entre 18-40 mg/L de indução, perfazendo um total de massa de proteína entre 72-160 mg. A temperatura de indução (42°C), utilizada para a expressão das apomioglobinas, permite a obtenção da mioglobina no seu estado apo – sem a presença do grupamento heme. Devido a esse protocolo, as proteínas são purificadas a partir de estruturas chamadas de corpos de inclusão (RIBEIRO et al., 2003; RIBEIRO e RAMOS, 2004), estruturas normalmente produzidas em *E. coli*, em resposta à mudança brusca de temperatura (37°C para 42°C, como no caso do protocolo utilizado) e/ou quando as proteínas recombinantes a serem expressas tendem à formar agregados no citoplasma da bactéria (MARSTON e HARTLEY, 1990).

Nos processos de purificação das apomioglobinas, realizados em dois passos cromatográficos, os perfis foram muito semelhantes: no primeiro passo, uma cromatografia de troca aniônica em coluna DEAE-Sepharose, as proteínas foram eluídas antes do gradiente de NaCl, com início de eluição entre 5 e 11 mL após a aplicação da amostra. Esse perfil era esperado, uma vez que a apomioglobina, por

possuir um pI muito próximo de 9, sob a condição de pH (7,2) da fase móvel, apresenta-se positivamente carregada (carga  $\cong +3$ ); e, portanto, não interagiu com a matrix também positivamente carregada. No segundo passo, uma cromatografia de troca catiônica em coluna CM-Sepharose (para remoção de possíveis ácidos nucleicos contaminantes, RIBEIRO-JR et al., 2003), as apomioglobinas foram eluídas entre 13,5-18% de NaCl (135-180 mM). Nesse passo, particularmente realizado em pH 2, a apomioglobina apresenta-se muito carregada positivamente (carga  $>+15$ ) portanto, ligou-se fortemente à coluna negativamente carregada, só sendo eluída quando o íon  $\text{Na}^+$  competiu com a ligação pela matrix, concomitantemente à interação dos íons  $\text{Cl}^-$  com a proteína positivamente carregada. Após os dois passos de purificação, as apomioglobinas foram obtidas com alto grau de pureza ( $>95\%$ ) e praticamente livres da presença de ácidos nucleicos, apresentando relação de absorbância 280/260 nm  $>1,62$ .

As sHsps (17 e 18) de cana-de-açúcar foram expressas em linhagem *E. coli* BL21(DE3)pLysS, transformadas com vetores de expressão pET3a contendo o cDNA da sHsp de interesse. As sHsps foram encontradas na fração solúvel do lisado bacteriano. Foram realizados dois passos cromatográficos: o primeiro, uma cromatografia de troca aniônica em coluna DEAE-Sepharose, na qual a fração solúvel proveniente da lise bacteriana foi utilizada como amostra; seguido de uma cromatografia de gel filtração em coluna HiLoad Superdex 200pg 26/60 (necessária para melhorar o grau de pureza e excluir um artefato de purificação, mais precisamente, uma pequena fração de agregado de aproximadamente 600 kDa).

A chaperona Hsp40 (DjA1) humana foi expressa em linhagem *E. coli* BL21(DE3), transformada com vetor de expressão pET28a contendo o cDNA da proteína de interesse. O vetor pET28a possui a particularidade de codificar 21 aminoácidos adicionais ao N-terminal da proteína, cujo cDNA esteja clonado nesse vetor, sendo que dos 21 aminoácidos adicionais incluem-se uma cauda de polihistidina (6 histidinas). O processo de purificação da Hsp40 foi realizado em dois passos cromatográficos: primeiro, uma cromatografia de afinidade em coluna HiTrap Chelating com íon  $\text{Ni}^{2+}$  imobilizado, passo apropriado uma vez que a Hsp40 expressa continha cauda de polihistidina, essa com grande afinidade ao níquel; segundo, uma cromatografia de gel filtração em coluna HiLoad Superdex 200pg 26/60, para melhorar o grau de pureza.

## 5.2 Cinética amiloidogênica e estabilidade protéica

Das análises dos dados de cinética amiloidogênica das apomioglobinas estudadas, constatamos que dos 19 mutantes, 7 apresentam cinética amiloidogênica significativamente diferente da apomioglobina selvagem, sendo dois com cinética mais lenta (H24V/H119F e V10F/M131F, 21% menor) e cinco com cinética mais rápida (W7F/W14F, apoMb<sub>1-123</sub>, B\_GHA, H36Q, C\_GHAB; 187%, 130%, 109%, 69% e 38% maiores, respectivamente). Dos sete mutantes citados, três (W7F/W14F, H36Q e H24V/H119F) tiveram sua estabilidade estudada através de experimentos de desenovelamento químico induzido por uréia em pH 7,8 e pH 4,2 – condição na qual avalia-se o intermediário da via de enovelamento da mioglobina estabilizado nesse pH – e por variação de pHs (desenovelamento ácido). Aparentemente, esses mutantes não causaram mudanças significativas na quantidade de estruturas em hélice- $\alpha$  da apomioglobina, como observado pelo sinal de CD a 222 nm (característico de hélice- $\alpha$ ) em  $18.300 \pm 500 \text{ grau.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$ , sendo, através da deconvolução pelo programa CDNN, estimado aproximadamente  $64 \pm 4\%$  de estrutura em hélice- $\alpha$  nessas proteínas. Embora não tenham causado mudanças aparentes na estrutura secundária da apomioglobina, esses três mutantes afetaram significativamente a estabilidade da proteína.

Para averiguar essas mudanças de estabilidade, os mutantes W7F/W14F, H24V/H119F e H36Q foram estudados mediante experimentos de desenovelamento químico induzido por uréia nos pHs 7,8 e 4,2 e por acidificação. Desses estudos, valores de  $\text{pH}_m$  e  $C_m$ , ou seja, pH e concentração de desnaturante no ponto médio de transição, foram obtidos. Sabe-se que em condições ligeiramente ácidas, a apomioglobina forma um intermediário, cujas hélices- $\alpha$  N- e C-terminais, denominadas de A, B, G e H, apresentam-se parcialmente enoveladas (JAMIM e BALDWIN, 1998). A apoMb selvagem começa a se desenovelar em pH 5,6, permanecendo parcialmente enovelada até pH 4,2, desenovelando-se por completo ao abaixar o pH além de 4,2. A proteína selvagem em pH 7,8, condição na qual não segue uma transição do tipo dois estados (RAMOS et al., 1999), quando submetida a um processo de desenovelamento

induzido por uréia, apresentou um  $C_m$  de 3,4 M. Em contrapartida, ao ser submetida ao mesmo processo em pH 4,2 (condição que favorece a formação de seu intermediário), desenovelou-se por efeito da uréia apresentando um  $C_m$  de 1,5 M. Comparados com a proteína selvagem, os mutantes foram afetados em sua estabilidade como segue: H24V/H119F nativo em pH 7,8 se apresentou mais estável comparado à forma selvagem, tendo intermediário pouco populado; H36Q nativo foi menos estável se comparado à proteína selvagem, e seu intermediário apresentou estabilidade semelhante ao observado na proteína selvagem. Ambos os estados: nativo e intermediário do mutante W7F/W14F, se apresentaram menos estáveis comparados à proteína selvagem. Com base nesses resultados, propusemos as seguintes questões: qual dos mutantes interfere, de maneira mais atuante, na alteração da propensão de formação de fibrilas amilóides em apomioglobinas? Seria o que afeta o estado intermediário? Seria o que desestabiliza o estado nativo? Seria o que desestabiliza ambos os estados, (como no caso do W7F/W14F) e por quê? Sabe-se que o mutante H24V/H119F não apresenta intermediário populável, que o H36Q propicia a formação do intermediário (BARRICK et al., 1994), e que W7F/W14F e H36Q desestabilizam o estado nativo (BARRICK et al., 1994; SIRANGELO et al., 2000). Uma das hipóteses sobre a formação de fibrilas amilóides em apomioglobina sugere que tal processo tem origem em estruturas parcialmente enoveladas (SIRANGELO et al., 2002), sendo estruturas como essas presentes no caso de intermediários. As hélices- $\alpha$  A, B, G e H estão envolvidas na formação do intermediário de apomioglobina estabilizado em pH 4,2 (JAMIN e BALDWIN, 1998); portanto, considerando-se a hipótese, alterações na estabilidade do intermediário deveriam propiciar variações na propensão amiloidogênica dessa proteína. No mutante H24V/H119F, duas cadeias laterais do núcleo hidrofóbico são substituídas por cadeias laterais hidrofóbicas de valina e fenilalanina, ambas com praticamente o mesmo volume; dessa maneira, estabilizando grandemente a proteína frente ao desenovelamento por acidificação (BARRICK et al., 1994). O resíduo H36 estabiliza o estado nativo em razão do empacotamento de sua cadeia lateral sobre a cadeia lateral dos resíduos D38 e F106, formando assim, uma ponte salina com o resíduo D38. O mutante H36Q, provavelmente elimina duas potenciais interações estabilizantes do estado nativo da apomioglobina, e portanto,

favorecendo a formação do intermediário mesmo em pH perto do neutro (BARRICK et al., 1994). Quanto ao mutante W7F/W14F, sabe-se que os dois triptofanos estão envolvidos no favorecimento da formação de interações terciárias específicas, na estrutura do estado nativo da apomioglobina, e a substituição desses resíduos diminui a estabilidade do estado nativo, perturbando de sobremaneira, tanto a estabilidade da hélice- $\alpha$  A, quanto o empacotamento dessa estrutura com a hélice- $\alpha$  G (SIRANGELO et al., 2002).

Dos demais mutantes (muitos já estudados quanto às suas estabilidades), pudemos constatar que aqueles que apresentaram estabilidade do estado nativo similar ao da proteína selvagem (E04A e R118A), apresentaram taxas de formação de fibrilas amilóides similares ao da proteína selvagem. Por outro lado, mutantes que apresentam desestabilização do estado nativo (H36Q e W7F/W14F), apresentaram taxa de formação de fibrilas amilóides aumentada. O mutante H24V/H119F, que estabiliza o estado nativo, apresentou taxa de formação de fibrila amilóide diminuída quando comparada à proteína selvagem. Quanto aos mutantes que afetam a estabilidade do estado intermediário (E04A, R118A, W7F/W14F e H24V/H119F), não foi encontrada uma relação entre os efeitos dessa mudança de estabilidade e a mudança da taxa de formação de fibrilas amilóides. Resumidamente, com base nesses resultados do efeito da alteração da estabilidade do intermediário na taxa de formação de fibrilas amilóides, sugere-se que para o modelo amiloidogênico em apomioglobina, o estado intermediário provavelmente não seja obrigatório para a formação das fibrilas amilóides, pois se o fosse, as alterações de estabilidade provocadas por tais mutantes deveriam afetar igualmente a taxa de formação de fibrilas amilóides. Embora tal sugestão seja fortemente corroborada pelos nossos resultados, dados preliminares da estabilidade do mutante M131A (KAY e BALDWIN, 1996) vêm contradizer nossa hipótese. Esse mutante é fortemente desestabilizado (0,9 kcal/mol) quanto ao seu nativo e intermediário, achado esse devido provavelmente ao resíduo M131 apresentar um significativo empacotamento de sua cadeia lateral, nas duas mais importantes interfaces entre hélices- $\alpha$  presentes na proteína (A-H e G-H), sendo a estabilização dessas interfaces fator de extrema importância na estabilidade tanto do estado nativo quanto do estado intermediário.

Pudemos ainda observar que tanto os mutantes que desestabilizam (E04 e W7F/W14F), quanto os que estabilizam (R118A e H24V/H19F) o estado intermediário, tiveram efeitos contraditórios na taxa de formação de fibrilas amilóides. O mutante H36Q, que não afetou o referido estado intermediário, aumentou significativamente a taxa de formação de fibrilas amilóides. Desse conjunto de observações, sugere-se, portanto, que: fibrilas amilóides provenientes de mutantes de apomioglobina que desestabilizam o estado nativo, possuem taxa de formação mais rápida, enquanto os que estabilizam, apresentam taxa mais lenta. Em contrapartida, a estabilização ou desestabilização do estado intermediário, aparentemente não causa efeito correlacionável sobre a taxa de formação de fibrilas amilóides.

O mutante V10F/M131F, que apresentou taxa de formação de fibrilas amilóides mais lenta, foi estudado quanto à sua estabilidade pela primeira vez durante este projeto; entretanto, não foi concluído. Os mutantes de permutação e deleção (apoMb<sub>1-123</sub>) de hélices- $\alpha$  apresentaram taxa de formação de fibrilas amilóides maiores, quando comparados à proteína selvagem. Esses resultados eram esperados, uma vez que trabalhos anteriores sobre o estudo das estabilidades desses mutantes (RIBEIRO-JR e RAMOS, 2005) mostram que os mesmos são instáveis e propensos à agregação.

### **5.3 Características estruturais das fibrilas amilóides de apomioglobinas**

Além dos resultados de cinética amiloidogênica, apresentamos resultados sobre a caracterização estrutural das fibrilas amilóides formadas. Os espectros de CD das proteínas, após o processo amiloidogênico, apresentaram o formato esperado de proteínas ricas em estruturas do tipo folha- $\beta$ , com sinal de CD a 216 nm bem definido, sendo a quantificação de tais estruturas, estimadas pelo programa CDNN, de  $48 \pm 9\%$ . Resultados de fluorescência de ThT corroboram o predomínio de estruturas em folha- $\beta$  estimados pelos dados de CD. A fluorescência de ThT é um teste clássico para identificação de fibrilas amilóides. Essa sonda aumenta sua intensidade de fluorescência, quando ligada de maneira a ficar intercalada nas folhas- $\beta$  das fibrilas

amilóides (NAIKI et al., 1989). O aumento da fluorescência de ThT, ligada às fibrilas amilóides, ocorre em função do seu dipolo excitável se alinhar paralelamente ao eixo dessas estruturas. Essa ligação ocorre aparentemente através de canais ao longo das folhas- $\beta$ , podendo, portanto, a ligação de ThT variar conforme a disposição das folhas- $\beta$  (KREBS et al, 2005). Medidas de fluorescência, da ThT ligada às fibrilas amilóides maduras de diferentes apomioglobinas (ANEXO B, Figura 4, pág. 196), mostram espectros coincidentes, sugerindo, em concordância com os resultados de CD, que não há diferenças estruturais entre as fibrilas amilóides formadas pelas diferentes apomioglobinas.

Com a finalidade de calcular a afinidade de ligação de ThT às fibrilas amilóides, realizamos a titulação de ThT em função do tempo de formação de fibrilas amilóides, obtendo, assim, uma constante de dissociação ( $K_{dis}$ ) de ThT que consiste na relação entre a ThT dissociada e à ligada às fibrilas amilóides. Observamos que a constante de dissociação de ThT diminuiu gradativamente, sugerindo que ao longo do tempo de formação das fibrilas, a ThT se ligou mais fortemente, já que quanto menor a  $K_{dis}$ , maior a afinidade. O decaimento da  $K_{dis}$  dos mutantes W7F/W14F e H36Q, comparado com o observado na proteína selvagem, foi mais acentuado entre as primeiras 130 horas de indução de fibrilas amilóides. Em vista do discutido acima, pode-se inferir que ao longo do processo de formação das fibrilas amilóides, em razão do notório aumento da organização das folhas- $\beta$ , deve ter ocorrido uma melhor interação entre a ThT e a fibrila amilóide, o que justifica a diminuição da  $K_{dis}$ . A diminuição da  $K_{dis}$  corrobora os dados de cinética da formação das fibrilas amilóides, sendo o menor valor de  $K_{dis}$  observado no mesmo instante de tempo no qual a fluorescência de ThT alcançou o platô, ou seja, quando as fibrilas amilóides já haviam completado a sua maturação.

Postula-se que a formação de fibrilas amilóides *in vitro*, dentre outros fatores, pode ser iniciada em condições que estabilizam estruturas parcialmente enoveladas (SIRANGELO et al., 2002), propiciando a formação inicial de agregados que servem de pontos de nucleação para a formação daquelas estruturas (FÄNDRICH et al., 2006). A sonda bis-ANS é pouco fluorescente em solução aquosa, mas apresenta um aumento no seu rendimento quântico de fluorescência quando complexada com estruturas parcialmente enoveladas (STRYER, 1965), estruturas essas que podem apresentar

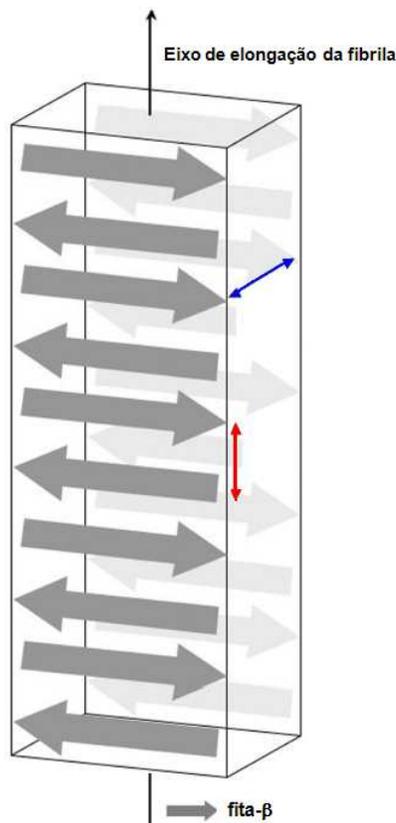
cavidades hidrofóbicas nas quais a referida sonda tende a se ligar. Para tanto, observamos o perfil de ligação de bis-ANS em função do tempo de formação das fibrilas amilóides. Observamos que houve um acentuado decaimento da fluorescência de bis-ANS ao longo do tempo, sendo esse decaimento muito semelhante para todas as proteínas. Ao final de 70 horas (~três dias) de indução amiloidogênica, a fluorescência do bis-ANS se igualou àquela observada na ausência de proteína, sugerindo, portanto, que não haviam mais sítios de ligação para o bis-ANS. Esse resultado vem constatar que ao final de três dias de indução amiloidogênica, as proteínas, em avançado processo de agregação/fibrilização, estariam compactadas de tal maneira a não mais apresentarem quaisquer sítios favoráveis à ligação do bis-ANS.

Medidas de difração de raios-X foram realizadas a fim de apresentar dados conclusivos da morfologia das estruturas típicas fibrilares. Fibrilas amilóides são longas, não ramificadas, compostas por folhas- $\beta$  orientadas perpendicularmente ao eixo fibrilar (PETKOVA et al., 2002). A estrutura quaternária típica de uma fibrila é do tipo folha- $\beta$  cruzada antiparalela (GLENNER et al, 1974), como demonstrada na Figura 44 (pág. 150).

Independentemente da cadeia polipeptídica, fibrilas amilóides apresentam um padrão de difração de raios-X característico, no qual pode-se observar duas reflexões, sendo uma centrada aproximadamente em 4,7 Å (com poucas variações), indicativa da distância entre as ligações de hidrogênio que ocorrem entre as fitas- $\beta$  de cada folha- $\beta$  (BONAR et al., 1969); e outra mais difusa, centrada aproximadamente em 9,5-11 Å, indicativa da distância entre as folhas- $\beta$  que compõem a fibrila amilóide (SUNDE et al., 1997), e que pode variar de acordo com a composição das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos da proteína (ARNOTT et al., 1967).

As formas fibrilares das apomioglobinas WT, W7F/W14F, H24V/H119F e H36Q, mostraram padrões de difração de raios-X ( $4,57 \pm 0,07$  Å e  $9,63 \pm 0,48$  Å) como os descritos anteriormente, confirmando que as estruturas formadas após a incubação no meio indutor de fibrilas amilóides se tratavam realmente de fibrilas amilóides, compostas por folhas- $\beta$  cruzadas. De forma conclusiva, esses resultados demonstram que a estrutura global das fibrilas amilóides, provenientes de diferentes mutantes de apomioglobinas, são muito similares, sendo que esses resultados são corroborados

pelos dados espectroscópicos de CD e ThT, das espécies fibrilares citadas anteriormente.



**Figura 44. Representação esquemática de um motivo  $\beta$ -cruzado.** O arranjo das fitas- e folhas- $\beta$  podem variar dependendo da sequência da proteína. Seta vermelha indica a distância das fitas- $\beta$  ( $\cong 4,8 \text{ \AA}$ ), seta azul a distância entre folhas- $\beta$  ( $10-11 \text{ \AA}$ ) (Adaptado de ESTERAS-CHOPO et al, 2008).

#### 5.4 Energia de ativação do processo amiloidogênico em apomioglobinas

Com o intuito de aprofundar o conhecimento acerca da dinâmica da cinética amiloidogênica das apomioglobinas, além da análise temporal da fluorescência de ThT, que nos permitiu calcular a taxa de formação das fibrilas amilóides, analisamos a cinética de formação das fibrilas amilóides em diferentes temperaturas de algumas

proteínas (WT, V10F/M131F, H24V/H119F, H36Q, W7F/W14F, apoMb<sub>1-123</sub>, B\_GHA e C\_GHAB). Para tanto, realizamos a monitoração da fluorescência de ThT a 482 nm e CD a 216 nm em quatro diferentes temperaturas, 35°C, 45°C, 55°C e 65°C. Medidas de CD a 216 nm possibilitam monitorar a formação de estruturas em folha- $\beta$ , uma característica clássica das fibrilas amilóides. Para ambos os experimentos, nas variadas temperaturas, os dados obtidos foram fitados para permitir o cálculo de constantes aparentes ( $k_{app}$ ) dos referidos processos, como especificado anteriormente, sendo essas constantes graficadas na forma de  $\ln k_{app} \times 1/T$ . Isso feito, da inclinação da reta obtida da regressão linear dos dados desse gráfico, obtivemos a energia de ativação associada ao processo analisado. Para que uma reação ocorra, a energia livre do sistema deve superar a energia de ativação. Sendo assim, quanto menor a energia de ativação, mais rápida é a reação (LAIDLER, 1987). Nossos resultados mostram que, em geral, a taxa de fibrilização das apomioglobinas correlaciona bem com o efeito de cada mutante, sendo que as energias de ativação dos dois processos analisados das referidas proteínas mostraram-se como segue:

W7FW14F < apoMb<sub>1-123</sub> < H36Q < B\_GHA < C\_GHAB < WT < V10FM131F < H24VH118F

Os resultados de energia de ativação sugerem fortemente que o processo amiloidogênico das apomioglobinas estudadas se inicia com a reorganização da estrutura protéica, processo no qual ocorre ganho rápido da quantidade relativa de folhas- $\beta$ , achado esse fundamentado pela observação de que a formação de folhas- $\beta$  nas apomioglobinas analisadas, atingiram seus máximos em poucas horas (<12 horas). Após a formação dessas estruturas  $\beta$ , ocorre a formação e alongamento da fibrila amilóide através da associação de monômeros de apomioglobinas, então previamente convertidas em estruturas do tipo folha- $\beta$ , formando, por fim, estruturas fibrilares maiores, que apresentam a estrutura básica de folhas- $\beta$  cruzadas, como aferido pela difração de raios-X. A seqüência de eventos do processo amiloidogênico de apomioglobinas aqui proposta (hlices- $\alpha$   $\rightarrow$  folhas- $\beta$   $\rightarrow$  alongamento  $\rightarrow$  maturação das fibrilas), é fundamentada pela observação do aumento contínuo da fluorescência de ThT, por 100-150 horas além das 12 horas iniciais, nas quais o sinal de CD a 216 nm, específico de estruturas  $\beta$ , chegou ao seu máximo, sem sofrer alteração, assim,

indicando que o processo de fibrilização continua após a formação das estruturas em folha- $\beta$ .

## 5.5 Propriedade de sementeira

Outra propriedade estudada das formas agregadas das apomioglobinas aqui relatadas foi a capacidade de sementeira das formas pré-fibrilares. Esses estudos foram realizados para avaliar se a velocidade de formação das estruturas fibrilares seria mais rápida com a presença de núcleos pré-formados por agregados não fibrilares, uma vez que núcleos pré-fibrilares pré-formados (“sementes”) são conhecidos por acelerarem a formação de fibrilas amilóides. Para tanto, monitoramos ao longo do tempo a massa de fibrila amilóide formada durante a incubação de algumas apomioglobinas com diferentes proporções de “sementes”. A formação de fibrilas amilóides de apomioglobinas por sementeira foi realizada utilizando-se duas condições: 1% e 5% em massa de agregados pré-fibrilares; nessas condições, comparativamente à condição sem semente, observamos um aumento significativo na velocidade de formação das fibrilas amilóides. Esses resultados demonstram que as “sementes” são realmente amiloidogênicas, capazes de acelerar a formação das formas fibrilares. Os experimentos de sementeira foram realizados com as proteínas selvagem e mutantes V10F/M131F, H24V/H119F, H36Q, W7F/W14F, apoMb<sub>1-123</sub>, B\_GHA e C\_GHAB, dos quais, não foi possível determinar, após normalização dos dados, efeitos distintos entre cada mutante quanto à eficiência de sementeira dos mesmos. Sabe-se que a propriedade de sementeira é caracterizada pela eliminação da fase lag, em razão da adição de agregados pré-fibrilares (núcleos pré-formados) à solução (HARPER e LANSBURY, 1997). Reporta-se que a formação de fibrilas amilóides obedece a um processo típico de nucleação, processo esse que apresenta uma fase inicial lag, devido provavelmente a um processo energeticamente desfavorável da associação das primeiras cadeias polipeptídicas. Secundariamente, após a formação de um núcleo ou

agregado oligomérico, a associação de outras cadeias passa a ser energeticamente favorável, sendo essa fase mais rápida (BADER et al., 2006).

## 5.6 Citotoxicidade das formas amilóides

Depósitos de fibrilas amilóides em tecidos e órgãos são comumente associados à doenças e os efeitos citotóxicos dessas estruturas em suas diferentes formas são amplamente estudados (QAHWASH et al., 2003). Estudos *in vitro* sugerem que as fibrilas amilóides são citotóxicas, tendo sido observado que essas estruturas induzem morte celular quando adicionadas em culturas celulares (LORENZO et al., 1994). Outros estudos também mostram que as formas fibrilares intermediárias, presentes durante o processo de formação das fibrilas, são ainda mais citotóxicas em culturas de células, se comparadas com as fibrilas amilóides maduras (BUCCIANTINI, et al., 2002; HARDY e SELKOE, 2002). Portanto, investigamos a citotoxicidade associada às diferentes formas encontradas durante o processo de formação de fibrilas amilóides de apomioglobinas. A forma pré-fibrilar do processo amiloidogênico é geralmente caracterizada por oligômeros solúveis, semelhantes à micelas, sendo denominados de agregados pré-fibrilares. Vários estudos de viabilidade celular com as formas pré-fibrilares mostram uma grande toxicidade por parte desses agregados, tendo como justificativa a sua estrutura anelar. De acordo com a hipótese do canal, essa estrutura insere-se na membrana celular, formando um poro, permeabilizando a mesma, e portanto, podendo desregular o balanço iônico da célula, despolarizar a membrana, provocar perda da função mitocondrial, e, por fim, podendo resultar na morte da célula (KAGAN et al., 2004). Esses agregados pré-fibrilares possuem superfícies hidrofóbicas não-nativas expostas que podem interagir de forma prejudicial com outros componentes celulares, provocando de alguma maneira a perda da função desses componentes (POLVERINO DE LAURETO et al., 2003). Para avaliar a citotoxicidade das diferentes formas de agregados do processo amiloidogênico (fibrilas maduras e formas pré-fibrilares), utilizamos como modelo celular uma linhagem neuronal denominada de N2A

(neuroblastoma murino). A viabilidade celular foi avaliada pela capacidade de redução do MTT. A redução do MTT é um dos métodos mais utilizados na avaliação da citotoxicidade de diversos compostos, devido especialmente à rapidez, simplicidade e alta reprodutibilidade do método (SUPINO, 1995). O teste se baseia na capacidade de células viáveis reduzirem um sal tetrazólio solúvel (MTT), num precipitado insolúvel conhecido como formazan. No processo de redução, os sais de tetrazólio atravessam a membrana celular e uma vez dentro do citoplasma, aceitam elétrons de quaisquer substratos reduzidos, ou de determinadas enzimas. Esse método é comumente considerado um parâmetro de viabilidade mitocondrial, devido à preferência do MTT em ser reduzido mediante a ação catalítica da enzima mitocondrial succinato desidrogenase (SUPINO, 1995).

Nos experimentos de citotoxicidade, avaliados pela redução de MTT, células N2A foram cultivadas e tratadas como descrito anteriormente, sendo posteriormente lisadas com HCl e SDS, e os cristais de formazan dissolvidos adequadamente e a absorbância da solução aferida espectrofotometricamente. Avaliamos a citotoxicidade das formas nativas, pré-fibrilares e fibrilares das apomioglobinas selvagem e mutantes V10F/M131F, H24V/H119F, H36Q, W7F/W14F, apoMb<sub>1-123</sub>, B\_GHA e C\_GHAB. Observamos uma acentuada diminuição da viabilidade celular nas culturas tratadas com as formas pré-fibrilares de todas as proteínas estudadas, com diminuição da viabilidade superior a 40%. A viabilidade das células incubadas com as formas nativas das proteínas, ficaram próximas ao dos controles.

Apesar dos relatos do teste de redução do MTT ser considerado um parâmetro de viabilidade mitocondrial, outros estudos desmonstram que a mitocôndria não tem esse papel exclusivo na redução do MTT, já que outras frações subcelulares importantes (núcleo, microssomos e citosol) também apresentam capacidade de reduzir o MTT (LIU, 1999). Nossos resultados também mostram que houve uma ligeira citotoxicidade induzida pelas fibrilas maduras. Esse achado é interessante, tendo-se em vista que no processo amiloidogênico, as formas pré-fibrilares, com o tempo, vão se modificando morfológicamente, adquirindo formas mais alongadas, denominadas de protofilamentos ou protofibrilas, e essas por sua vez se associam para formar as fibrilas maduras. O grande destaque desse processo de fibrilização se encontra na formação

de estruturas grandes e densas o bastante ao ponto dessas se depositarem, em grande quantidade, sobre tecidos e órgãos (HIRSCHFIELD, 2004); podendo, como consequência da grande massa desses depósitos protéicos, provocar a ruptura de órgãos (PEPYS, 1995). Em suma, nossos resultados da avaliação da citotoxicidade induzida pelas diferentes formas dos agregados do processo amiloidogênico, corroboram com os demais dados da literatura, os quais, em sua maioria, sugerem que o principal mecanismo de citotoxicidade seja a permeabilização da membrana, especialmente pelas formas pré-fibrilares (GLABE, 2006).

## **5.7 Chaperonas moleculares na prevenção da agregação amiloidogênica**

As chaperonas das famílias Hsp40 e sHsps têm a capacidade de ligarem proteínas parcialmente desenoveladas através de interações hidrofóbicas (RUDIGER et al., 2001); entretanto, sem promover o renovelamento dos substratos (HASLBECK, 2002). Por essa razão, são denominadas de “holdases”. De maneira geral, as “holdases” apresentam e transferem as proteínas parcialmente desenoveladas para outra chaperona do tipo “enovelase”, sendo essas as responsáveis por promover o renovelamento do substrato (MOGK et al., 2003). Essa relação entre as chaperonas “holdases” e “enovelases” é precisamente regulada; fator determinante para a alta eficiência no renovelamento dos substratos, sendo que sob condições adversas ao enovelamento, esses substratos permanecem ligados às “holdases”, evitando a agregação dos mesmos e, após as condições normais serem restabelecidas, os substratos são entregues às “enovelases” para o renovelamento (HOFFMANN et al., 2004). Devido a esse prévio conhecimento, o estudo do papel dessas “holdases” em nível funcional e estrutural é de grande interesse no campo biomédico. Constata-se que sHsps são bastante expressas em animais com doenças neurodegenerativas (CLARK e MUCHOWSKI, 2000), podendo essas proteínas serem potenciais alvos terapêuticos contra tais doenças, uma vez que os fatores determinantes da funcionalidade das mesmas sejam estabelecidos. Neste projeto, avaliamos a atividade chaperona de duas

sHsps de cana-de-açúcar (17 e 18) e da Hsp40 (DjA1) humana, no processo de proteção contra agregação/fibrilização da apomioglobina W7F/W14F. Observamos que as três chaperonas testadas foram capazes de inibir/proteger a agregação/fibrilização do mutante W7F/W14F, com maior eficiência conforme o aumento da proporção molar de monômeros de W7F/W14F:Hsp. Comparando-se as duas sHsps de cana-de-açúcar, constatou-se que tiveram a capacidade de prevenir a agregação do mutante W7F/W14F com eficiência muito parecida nas mesmas razões molares utilizadas. Ao se comparar a eficiência da Hsp40 (DjA1) humana contra as sHsps estudadas, os resultados mostram que as sHsps previnem em 95% a agregação/fibrilização da W7F/W14F na proporção de 1:3 (W7F/W14F:sHsp), sendo esse mesmo efeito obtido com a Hsp40 (DjA1) humana na proporção de 1:2 (W7F/W14F:Hsp40). Sabendo-se que funcionalmente a Hsp40 (DjA1) humana é dimérica (CHEETHAM e CAPLAN, 1998) e as sHsps (17 e 18) de cana-de-açúcar são dodecâmeros (TIROLI e RAMOS, 2007), e considerando-se que nos experimentos de atividade chaperona, a razão W7F/W14F:Hsp relaciona-se estequiometricamente ao estado monomérico das proteínas, conclui-se que a Hsp40 (DjA1) humana é bem mais eficiente do que as sHsps avaliadas neste projeto.

## **5.8 Dissociação de fibrilas amilóides por ação da uréia**

Fibrilas amilóides maduras são geralmente consideradas como agregados extremamente organizados, com compacticidade semelhante ou até mesmo superior ao encontrado em cristais de proteínas, além de serem resistentes às proteases e agentes desnaturantes, tais como uréia e cloreto de guanidina (ZHOU et al., 1996; GUO e AKHREMITCHEV, 2008). Com a finalidade de testar a estabilidade das fibrilas amilóides de apomioglobinas, realizamos experimentos de dissociação induzida por uréia dessas estruturas em duas condições de pH. No protocolo amiloidogênico utilizado neste projeto, o pH 9 do meio indutor de fibrilas amilóides é muito próximo do ponto isoelétrico ( $\cong$  9) das apomioglobinas, favorecendo o processo de agregação. Nos

experimentos de dissociação induzidos por uréia, utilizamos duas condições de pH (7 e 6) abaixo do pH 9. O experimento em pH 7 foi escolhido para testar o efeito dissociativo da uréia contra fibrilas amilóides já formadas e ambientadas em condições fisiológicas, mais especificamente, para avaliar o modelo de fibrila amilóide do mutante W7F/W14F, mutante esse que forma fibrila amilóide na condição de neutralidade (pH 7), (ao contrário das demais apomioglobinas estudadas que foram induzidas à fibrilas amilóides em pH 9). A segunda condição (pH 6) utilizada foi escolhida para avaliar o efeito de um fator adicional para desestabilizar as proteínas, mais especificamente, para proporcionar a protonação do grupo imidazólico das histinas (12 na selvagem e W7F/W14F, 11 na H36Q e 10 no H24V/H119F) presentes nas proteínas. Nessa condição, ocorre a repulsão de cargas, otimizando uma possível desestabilização do agregado amilóide. Nossos resultados mostram que houve uma ligeira diferença do efeito dissociativo da uréia nas duas condições de pH, sendo também observado que as fibrilas formadas pelos mutantes W7F/W14F e H36Q, se mostraram mais resistentes se comparados com a proteína selvagem, enquanto o mutante H24V/H119F foi ligeiramente menos resistente. Os dados apresentados são referentes a 24 horas de incubação com uréia, sendo, entretanto, observado que mesmo ao se prolongar o tempo de exposição das fibrilas à ureia até  $\cong$  60 horas, não foram observadas diferenças do efeito dissociativo da uréia nesses dois tempos. Com base nesses resultados, e com o prévio conhecimento que experimentos de dissociação reportam diretamente à estabilidade de complexos formados, realçamos a grande utilidade desses experimentos para avaliar a diferença de estabilidade de fibrilas amilóides provenientes de diferentes proteínas.

## 6 RESUMO DOS RESULTADOS

- Apomioglobinas de baleia foram devidamente expressas em linhagem de *E. coli* BL21(DE3), transformadas com vetor pET-T(7) e purificadas por métodos bem estabelecidos;
- Sete (V10F/M131F, H24V/H119F, H36Q, W7F/W14F, apoMb<sub>1-123</sub>, B\_GHA e C\_GHAB) dos 19 mutantes de apomioglobina de baleia apresentaram cinética de agregação/fibrilização amilóide, significativamente diferente da observada na proteína selvagem;
- Em geral, a alteração da cinética amiloidogênica em apomioglobinas de baleia se mostrou bem correlacionada com os mutantes que afetam a estabilidade do estado nativo, tendo sido observado aumento nos que desestabilizam e diminuição nos que estabilizam;
- Análises por difração de raios-X, fluorescência de ThT e dicroísmo circular, mostraram que não existem diferenças nas estruturas globais das fibrilas amilóides formadas pelos vários mutantes;
- As diferentes formas amilóides agregadas, encontradas durante o processo amiloidogênico, apresentaram citotoxicidade diferenciada frente a um conceituado modelo celular, sendo as formas pré-fibrilares as mais citotóxicas;
- Formas amilóides pré-fibrilares, utilizadas como sementes, mostraram considerável capacidade de acelerar o processo amiloidogênico;
- Fibrilas amilóides maduras se mostraram bem resistentes frente à dissociação induzida por uréia;
- Três modelos de chaperonas moleculares foram eficientes na prevenção da agregação/fibrilização do mutante W7F/W14F.

## 7 CONCLUSÕES

- As apomioglobinas aqui estudadas, em condições apropriadas, se mostraram capazes de formar fibrilas amilóides com as mesmas propriedades das demais amilóides relacionadas às doenças amiloidogênicas reportadas em humanos;
- As fibrilas formadas pelas apomioglobinas selvagem e mutantes pontuais, apresentaram estruturas indistinguíveis entre si; esse achado apoia a hipótese de que, pelo menos para mutações sítio-dirigidas, fibrilas amilóides ricas em estruturas  $\beta$  são estruturalmente idênticas;
- Considerando nosso estudo das fibrilas amilóides maduras, constatamos que mutações que facilitam ou inibam o desenovelamento parcial de uma proteína, aparentemente não afetam a estrutura final da fibrila amilóide formada; entretanto, pode ser possível que os estados pré-amilóides de uma proteína selvagem e seus mutantes sejam estruturalmente distintos, ou até mesmo que os processos de formação de suas amilóides difiram umas das outras.

# REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

ANFINSEN, C.B. Principles that govern the folding of the protein chains. **Science.**, v. 181, n. 96, p. 223-30, 1973.

ANTONINI, E.; BRUNORI, M. **Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands.** Amsterdam, NOH, NL: North-Holland Pub. Co., 1971, North-Holland research monographs, Frontiers of Biology Series, v. 21, 436 p., ISBN 0444100962.

ARNOTT, S.; DOVER, S.D.; ELLIOTT, A. Structure of beta-poly-L-alanine: refined atomic co-ordinates for an anti-parallel beta-pleated sheet. **J. Mol. Biol.**, v. 30, n. 1, p. 201-208, 1967.

ASHBURNER, M. In: SCHLESINGER, M.J.; ASHBURNER, M.; TISSIÉRES, A. (Eds.). **Heat Shock, From Bacteria to man.** 1982, New York, NY, USA. **Proceedings of the meeting held in May 5-9 at Cold Spring Harbor Laboratory.** 440 p., illus., bibliographies, index, ISBN 0-87969-158-1.

AZÁROFF, L.V.; KAPLOW, R.; KATO, N.; WEISS, R.J.; WILSON, A.J.C.; YOUNG, R.A. **X-ray diffraction.** New York, NY, USA: McGraw-Hill, 1974, 664 p., ISBN-13 978-0070026728.

BADER, R.; BAMFORD, R.; ZURDO, J.; LUISI, B.F.; DOBSON, C.M. Probing the mechanism of amyloidogenesis through a tandem repeat of the PI3-SH3 domain suggests a generic model for protein aggregation and fibril formation. **J. Mol. Biol.**, v. 356, n. 1, p. 189-208, 2006.

BALDWIN, R.L. How does protein get started? **Trends. Biochem. Sci.**, v. 14, n. 7, p. 291-294, 1989.

---

<sup>1</sup> De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:** Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BALDWIN, R.L.\_The nature of protein folding pathways: the classical versus the new view. **J. Biomol. NMR.**, v. 5, n. 2, p. 103-109, 1995.

BALDWIN, R.L.; ROSE, G. D. Is protein folding hierarchic? I. Local structure and peptide folding. **Trends. Biochem. Sci.**, v. 24, n. 1, p. 26-33, 1999.

BARRICK, D.; HUGHSON, F.M.; BALDWIN, R.L. Molecular mechanisms of acid denaturation. The role of histidine residues in the partial unfolding of apomyoglobin. **J. Mol. Biol.**, v. 237, n. 5, p. 588-601, 1994.

BEISSINGER M.; BUCHNER, J. How chaperones fold proteins. **Biol. Chem.**, v. 379, n. 3, p. 245-259, 1998.

BERG, M.A.; CHASSE, G.A.; DERETAY, E.; FUZERY, A.K.; FUNG, B.M.; FUNG, D.Y.K.; HENRY-RIYAD, H.; LIN, A.C.; MAK, M.L.; MANTAS, A.; PATEL, M.; REPYAKH, I.V.; STAIKOVA, M.; SALPIETRO, S.J.; TANG, T.H.; VANK, J.C.; PERCZEL, A.; CSONKA, G.I.; FARKAS, O.; TORDAY, L.L.; SZEKELY, Z.; CSIZMADIA, I.G. Prospects in computational molecular medicine: a millennial mega-project on peptide folding. **J. Mol. Struct.: Theochem.**, v. 500, n. 1-3, p. 5-58, 2000.

BERTAGNA, A.M.; BARRICK, D. Nonspecific hydrophobic interactions stabilize an equilibrium intermediate of apomyoglobin at a key position within the AGH region. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 101, n. 34, p. 12514-12519, 2004.

BONAR, L.; COHEN, A.S.; SKINNER, M. Characterization of the amyloid fibril as a cross-beta protein. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 131, n. 4, p. 1373-1375, 1969.

BORGES, J.C.; FISCHER, H.; CRAIEVICH, A.F.; RAMOS, C.H.I. Low resolution structural study of two human HSP40 chaperones in solution. DjA1 from subfamily A and DJB4 from subfamily B have different quaternary structures. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 14, p. 13671-13681, 2005.

BORK, P.; DANDEKAR, T.; DIAZ-LAZCOZ, Y.; EISENHABER, F.; HUYNEN, M.; YUAN, Y. Predicting function: from genes to genomes and back. **J. Mol. Biol.**, v. 283, n. 4, p. 707-725, 1998.

BRESLOW, E.; BEYCHOK, S.; HARDMAN, K.D.; GURD, F.R.N. Relative conformations of sperm whale metmyoglobin and apomyoglobin in solution. **J. Biol. Chem.**, v. 240, p. 304-309, 1965.

BUCCIANTINI, M.; GIANNONI, E.; CHITI, F.; BARONI, F.; FORMIGLI, L.; ZURDO, J.; TADDEI, N.; RAMPONI, G.; DOBSON, C.M.; STEFANI, M. Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. **Nature.**, v. 416, n. 6880, p. 507-511, 2002.

BUCHNER, J.; GRALLERT, H.; JAKOB, U. Analyses of chaperone function using citrate synthase as a nonnative substrate protein. **Methods Enzymol.**, v. 290, p. 323-338, 1998.

CABRITA, L.D.; BOTTOMLEY, S.P. How do proteins avoid becoming too stable? Biophysical studies into metastable proteins. **Eur. Biophys. J.**, v. 33, n. 2, p. 83-88, 2004.

CASHIKAR, A.G.; DUENNWALD, M.; LINDQUIST, S.L. A chaperone pathway in protein disaggregation. Hsp26 alters the nature of protein aggregates to facilitate reactivation by Hsp104. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 25, p. 23869-23875, 2005.

CASPERS, G.J.; LEUNISSEN, J.A.; DE JONG, W.W. The expanding small heat-shock protein family, and structure predictions of the conserved "alpha-crystallin domain". **J. Mol. Evol.**, v. 40, n. 3, p. 238-248, 1995.

CASTANO, E.M.; FRANGIONE, B. Human amyloidosis, Alzheimer disease and related disorders. **Lab. Invest.**, v. 58, n. 2, p. 122-132, 1988.

CHEETHAM, M.E.; CAPLAN, A.J. Structure, function and evolution of DnaJ: conservation and adaptation of chaperone function. **Cell Stress Chaperones.**, v. 3, n. 1, p. 28-36, 1998.

CHITI, F.; STEFANI, M.; TADDEI, N.; RAMPONI, G.; DOBSON, C.M. Rationalization of the effects of mutations on peptide and protein aggregation rates. **Nature.**, v. 424, n. 6950, p. 805-808, 2003.

CLARK, J. I.; MUCHOWSKI, P. Small heat-shock proteins and their potential role in human disease. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v. 10, n. 1, p. 52-59, 2000.

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.

DE JONG, W.W.; LEUNISSEN, J.A.; VOORTER, C.E. Evolution of the alpha-crystallin/small heat-shock protein family. **Mol. Biol. Evol.**, v. 10, n. 1, p. 103-126, 1993.

DE JONG, W.W.; CASPERS, G.J.; LEUNISSEN, J.A. Genealogy of the alpha-crystallin--small heat-shock protein superfamily. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 22, n. 3-4, p. 151-162, 1998.

DILL, K.A.; BROMBERG, S.; YUE, K.; FIEBIG, K.M.; YEE, D.P.; THOMAS, P.D.; CHAN, H.S. Principles of protein folding: a perspective from simple exact models. **Protein Sci.**, v. 4, n. 4, p. 561-602, 1995.

DING, F.; JHA, R.K.; DOKHOLYAN, N.V. Scaling behavior and structure of denatured proteins. **Structure.**, v. 13, n. 7, p. 1047-1054, 2005.

DOBSON, C.M. Protein folding and misfolding. **Nature.**, v. 426, n. 6968, p. 884-890, 2003.

DUNHAM, L.J.; STEWART, H.L. A survey of transplantable and transmissible animal tumors. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 13, n. 5, p. 1299-1377, 1953.

DYSON, H.J.; WRIGHT, P.E. Intrinsically unstructured proteins and their functions. **Nature Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 6, n. 3, p. 197-208, 2005.

EDELHOCH, H. Spectroscopic Determination of Tryptophan and Tyrosine in Proteins. **Biochemistry.**, v. 6, n. 7, p. 1948-1954, 1967.

EHRNSPERGER, M.; GRABER, S.; GAESTEL, M.; BUCHNER, J. Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation. **EMBO J.**, v. 16, n. 2, p. 221-229, 1997.

ELIEZER, D.; JENNINGS, P.A.; WRIGHT, P.E.; DONIACH, S.; HODGSON, K.O.; TSURUTA, H. The radius of gyration of an apomyoglobin folding intermediate. **Science.**, v. 270, n. 5235, p. 487-488, 1995.

ELIEZER, D.; WRIGHT, P.E. Is apomyoglobin a molten globule? Structural characterization by RNM. **J. Mol. Biol.**, v. 263, n. 4, p. 531-538, 1996.

ELIEZER, D.; YAO, J.; DYSON, J.; WRIGHT, P.E. Structural and dynamic characterization of partially folded states of apomyoglobin and implications for protein folding. **Nature Struct. Biol.**, v. 5, n. 2, p. 148-155, 1998.

ESTERAS-CHOPO, A.; PASTOR, M.T.; SERRANO, L. In: MUÑOZ, V. (Ed.). **Protein Misfolding and  $\beta$ -Amyloid Formation**. 2008, Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry, **Protein Folding, Misfolding and Aggregation: Classical Themes and Novel Approaches**. 289 p., illus., bibliographies, index, ISBN-13 978-0854042579.

FÄNDRICH, M.; FLETCHER, M.A.; DOBSON, C.M. Amyloid fibrils from muscle myoglobin. **Nature.**, v. 410, n. 6825, p. 165-166, 2001.

FÄNDRICH, M.; DOBSON, C.M. The behaviour of polyamino acids reveals an inverse side chain effect in amyloid structure formation. **EMBO J.**, v. 21, n. 21, p. 5682-5690, 2002.

FÄNDRICH, M.; FORGE, V.; BUDER, K.; KITTLER, M.; DOBSON, C.M.; DIEKMANN, S. Myoglobin forms amyloid fibrils by association of unfolded polypeptide segments. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 100, n. 26, p. 15463-15468, 2003.

FÄNDRICH, M.; ZANDOMENEGHI, G.; KREBS, M.R.; KITTLER, M.; BUDER, K.; ROSSNER, A.; HEINEMANN, S.H.; DOBSON, C.M.; DIEKMANN, S. Apomyoglobin reveals a random-nucleation mechanism in amyloid protofibril formation. **Acta. Histochem.**, v. 108, n. 3, p. 215-219, 2006.

FERRARA, P.; CAFLISCH, A. Native topology of specific interactions: what is more important for protein folding? **J. Mol. Biol.**, v. 306, n. 4, p. 837-850, 2001.

FERREIRA, S.T.; DE FELICE, F.G. Protein dynamics, folding and misfolding: from basic physical chemistry to human conformational diseases. **FEBS Lett.**, v. 498, n. 2-3, p. 129-134, 2001

FERSHT, A.R. Nucleation mechanisms in protein folding. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v. 7, n. 1, p. 3-9, 1997.

FINK, A.L. Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. **Fold. Des.**, v. 3, n. 1, p. R9-R23, 1998.

FINKELSTEIN, A.V.; PTITSYN, O.B. **Protein Physics: A course of lectures (Soft condensed matter, complex fluids and biomaterials)**. San Diego, CA, USA: Academic Press Inc., 2002, 354 p., ISBN-13 978-0122567810.

FÖRSTL, H.; KURZ, A. Clinical features of Alzheimer's disease. **Eur. Arch. Psychiatry. Clin. Neurosci.**, v. 249, n. 6, p. 288-290, 1999.

FRIEDREICH, N.; KEKULÉ, A. Zur Amyloidfrage. **Virchows Arch. Pathol. Anat.**, v. 16, p. 50-56, 1859.

GASTEIGER, E.; HOOGLAND, C.; GATTIKER, A.; DUVAUD, S.; WILKINS, M.R.; APPEL, R.D.; BAIROCH, A. In: WALKER, J.M. (ed.). **The proteomics Protocols**. Totowa, NJ, USA: Humana Press Inc., 2005, p. 571-607, ISBN-13 978-1588295934.

GEIERSTANDER, B.; JAMIN, M.; VOLKMAN, B.F.; BALDWIN, R.L. Protonation behaviour of histidine 24 and histidine 119 in forming the pH 4 folding intermediate of apomyoglobin. **Biochemistry**, v. 37, n. 12, p. 4254-4265., 1998.

GHISO, J.; WISNIEWSKI, T.; FRANGIONE, B. Unifying features of systemic and cerebral amyloidoses. **Mol. Neurobiol.**, v. 8, n. 1, p. 49-64, 1994.

GLABE, C.G. Common mechanisms of amyloid oligomer pathogenesis in degenerative disease. **Neurobiol. Aging.**, v. 27, n. 4, p. 560-575, 2006.

GLENNER, G.G.; EANES, E.D.; BLADEN, H.A.; LINKE, R.P.; TERMINE, J.D. Beta-pleated sheet fibrils. A comparison of native amyloid with synthetic protein fibrils. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 22, n. 12, p. 1141-1158, 1974.

GLENNER, G.G. Amyloid deposits and amyloidosis. The beta-fibrilloses (first of two parts). **N. Engl. J. Med.**, v. 302, n. 23, p. 1283-1292, 1980.

GRANEL, B.; SERRATRICE, J.; VALEIX, S.; GRATEAU, G.; DROZ, D.; LAFON, J.; SAULT, M.C.; CHAUDIER, B.; DISDIER, P.; LAUGIER, R.; DELPECH, M.; WEILLER, P.J. A family with gastrointestinal amyloidosis associated with variant lysozyme. **Gastroenterology.**, v. 123, n. 4, p. 1346-1349, 2002.

GRIKO, Y.V.; PRIVALOV, P.L.; VENYAMINOV, S.Y.; KUTYSHENKO, V.P. Thermodynamic study of the apomyoglobin structure. **J. Mol. Biol.**, v. 202, n. 1, p. 127-138, 1988.

GUNASEKARAN, K.; TSAI, C.-J.; KUMAR, S.; ZANUY, D.; NUSSINOV, R. Extended disordered proteins: targeting function with less scaffold. **Trends. Biochem. Sci.**, v. 28, n. 2, p. 81-85, 2003.

GUO, S.; AKHREMITCHEV, B.B. Investigation of mechanical properties of insulin crystals by atomic force microscopy. **Langmuir.**, v. 24, n. 3, p. 880-887, 2008.

HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **J. Mol. Biol.**, v. 166, n. 4, p. 557-580, 1983.

HANSSEN, O. Ein Beitrag zur Chemie der amyloiden Entartung. **Biochem Z.**, v. 13, p. 185-198, 1908.

HARDY, J.; SELKOE, D.J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. **Science.**, v. 297, n. 5580, p. 353-356, 2002.

HARPER, J.D.; LANSBURY-JR, P.T. Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 66, p. 385-407, 1997.

HARRISON, R.F.; HAWKINS, P.N.; ROCHE, W.R.; MacMAHON, R.F.; HUBSCHER, S.G.; BUCKELS, J.A. 'Fragile' liver and massive hepatic haemorrhage due to hereditary amyloidosis. **Gut.**, v. 38, n. 1, p. 151-152, 1996.

HARRISON, S.C.; DURBIN, R. Is there a single pathway for the folding of a polypeptide chain? **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 82, n. 12, p. 4028-4030, 1985.

HASLBECK, M. sHsps and their role in the chaperone network. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 59, n. 10, p. 1649-1657, 2002.

HASLBECK, M.; BRAUN, N.; STROMER, T.; RICHTER, B.; MODEL, N.; WEINKAUF, S.; BUCHNER, J. Hsp42 is the general small heat shock protein in the cytosol of *Saccharomyces cerevisiae*. **EMBO J.**, v. 23, n. 3, p. 638-649, 2004.

HASLBECK, M.; FRANZMANN, T.; WEINFURTNER, D.; BUCHNER, J. Some like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins. **Nat. Struct. Mol. Biol.**, v. 12, n. 10, p. 842-846, 2005.

HAUGLAND, R.P. **Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals.** Eugene, OR, USA: Molecular Probes, Inc., 1992, 421 p., ISBN-13 978-9993203933.

HILL, R.B.; FLANAGAN, J.M.; PRESTEGARD, J.H. 1H and 15N magnetic resonance assignments, secondary structure, and tertiary fold of *Escherichia coli* DnaJ (1-78). **Biochemistry.**, v. 34, n. 16, p. 5587-5596, 1995.

HINSHAW, G.; WEILAND, J.L.; HILL, R.S.; ODEGARD, N.; LARSON, D.; BENNETT, C.L.; DUNKLEY, J.; GOLD, B.; GREASON, M.R.; JAROSIK, N.; KOMATSU, E.; NOLTA, M.R.; PAGE, L.; SPERGEL, D.N.; WOLLACK, E.; HALPERN, M.; KOGUT, A.; LIMON, M.; MEYER, S.S.; TUCKER, G.S.; WRIGHT, E.L. Five-Year *Wilkinson Microwave Anisotropy Probe* Observations: Data Processing, Sky Maps, and Basic Results. **Astrophys. J. Suppl. S.**, v.180, n. 2, p. 225-245, 2009.

HIRSCHFIELD, G.M. Amyloidosis: a clinico-pathophysiological synopsis. **Semin. Cell Dev. Biol.**, v. 15, n. 1, p. 39-44, 2004.

HOFFMANN, J.H.; LINKE, K.; GRAF, P.C.; LILIE, H.; JAKOB, U. Identification of a redox-regulated chaperone network. **EMBO J.**, v. 23, n. 1, p. 160-168, 2004.

HU, C.H.; ZOU, C.L. Disulfide containing proteins denatured in 6 mol/L guanidinium chloride are not completely unfolded. **Sci. China. B.**, v. 35, n. 10, p. 1214-1221, 1992.

HUGHSON, F.M.; WRIGHT, P.E.; BALDWIN, R.L. Structural characterization of a partly folded apomyoglobin intermediate. **Science.**, v. 249, n. 4976, p. 1544-1548, 1990.

JAHN, T.R.; RADFORD, S.E. The Yin and Yang of protein folding. **FEBS J.**, v. 272, n. 23, p. 5962-5970, 2005.

JAMIN, M.; BALDWIN, R.L. Refolding and unfolding kinetics of the equilibrium folding intermediate of apomyoglobin. **Nature Struct. Biol.**, v. 3, n. 7, p. 613-618, 1996.

JAMIM, M.; BALDWIN, R.L. Two forms of the pH 4 folding intermediate of apomyoglobin. **J. Mol. Biol.**, v. 276, n. 2, p. 491-504, 1998.

JAMIN, M. The folding process of apomyoglobin. **Protein Pept. Lett.**, v. 12, n. 3, p. 229-34, 2005.

JENNINGS, P.A.; WRIGHT, P.E. Formation of a molten globule intermediate early in the kinetic folding pathway of apomyoglobin. **Science.**, v. 262, n. 5135, p. 892-896, 1993.

KAD, N.M.; MYERS, S.L.; SMITH, D.P.; SMITH, D.A.; RADFORD, S.E.; THOMSON, N.H. Hierarchical assembly of beta2-microglobulin amyloid in vitro revealed by atomic force microscopy. **J. Mol. Biol.**, v. 330, n. 4, p. 785-797, 2003.

KAGAN, B.L.; AZIMOV, R.; AZIMOVA, R. Amyloid peptide channels. **J. Membr. Biol.**, v. 202, n. 1, p. 1-10, 2004.

KAMPINGA, H.H.; HAGEMAN, J.; VOS, M.J.; KUBOTA, H.; TANGUAY, R.M.; BRUFORD, E.A.; CHEETHAM, M.E.; CHEN, B.; HIGHTOWER, L.E. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. **Cell Stress Chaperones.**, v. 14, n. 1, p. 105-111, 2009.

KAY, M.S.; BALDWIN, R.L. Packing interactions in the apomyoglobin folding intermediate. **Nat. Struct. Biol.**, v. 3, n. 5, p. 439-445, 1996.

KAY, M.S.; BALDWIN, R.L. Alternative models for describing the acid unfolding of the apomyoglobin folding intermediate. **Biochemistry.**, v. 37, n. 21, p. 7859-7868, 1998.

KAY, M. S.; RAMOS, C.H.I.; BALDWIN, R.L. Specificity of native-like interhelical hydrophobic contacts in the apomyoglobin intermediate. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 96, n. 5, p. 2007-2012, 1999.

KELLY, J.W. Alternative conformations of amyloidogenic proteins govern their behavior. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v. 6, n. 1, p. 11-17, 1996.

KIM, P.S.; BALDWIN, R. L. Specific intermediates in the folding reactions of small proteins and the mechanism of protein folding. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 51, p. 459-489, 1982.

KIRBY, E.P.; STEINER, R.F. The tryptophan microenvironments in apomyoglobin. **J. Biol. Chem.**, v. 245, n. 23, p. 6300-6306, 1970.

KLEBE, R.J.; RUDDLE, F.H. Neuroblastoma: cell culture analysis of a differentiating stem cell system. **J. Cell. Biol.**, v. 43, p. 69A, 1969.

KLEIN-SEETHARAMAN, J.; OIKAWA, M.; GRIMSHAW, S.B.; WIRMER, J.; DUCHARDT, E.; UEDA, T.; IMOTO, T.; SMITH, L.J.; DOBSON, C.M.; SCHWALBE, H. I. Long-range interactions within a nonnative protein. **Science.**, v. 295, n. 5560, p. 1719-1722, 2002.

KLUNK, W.E.; PETEGREW, J.W.; ABRAHAM, D. H. Quantitative evaluation of Congo red binding to amyloid- like proteins with a beta-pleated sheet conformation. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 37, n. 8, p. 1273-1281, 1989.

KLUNK, W.E.; JACOB, R.F.; MASON, R.P. Quantifying amyloid by congo red spectral shift assay. **Methods. Enzymol.**, v. 309, p. 285-305, 1999.

KOVÁCS, GG.; TRANATTONI, G.; HAINFELLNER, J.A.; IRONSIDE, J.W.; KNIGHT, R.S.; BUDKA, H. Mutations of the prion protein gene phenotypic spectrum. **J. Neurol.**, v. 249, n. 11, p. 1567-1582, 2002.

KREBS, M.R.; BROMLEY, E.H.; DONALD, A.M. The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: localization and implications. **J. Struct. Biol.**, v. 149, n. 1, p. 30-37, 2005.

KUWAJIMA, K. The molten globule state as a clue for understanding the folding and cooperativity of globular protein structure. **Proteins.**, v. 6, n. 2, p. 87-103, 1989.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. **Nature.**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LAILER, K.J. **Chemical Kinetics 3<sup>rd</sup> ed.** Upper Saddle River, NJ, USA: Prentice Hall, 1987, 531 p., ISBN-13 978-0060438622.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy 3<sup>rd</sup> ed.** New York, NY, USA: Springer, 2006, 954 p., ISBN-13 978-0387312781.

LANSBURY, P.T.; COSTA, P.R.; GRIFFITHS, J.M.; SIMON, E.J.; AUGER, M.; HALVERSON, K.J.; KOCISKO, D.A.; HENDSCH, Z.S.; ASHBURN, T.T.; SPENCER, R.G. Structural model for the beta-amyloid fibril based on interstrand alignment of an

antiparallel-sheet comprising a C-terminal peptide. **Nat. Struct. Biol.**, v. 2, n. 11, p. 990-998, 1995.

LATTMAN, E.E.; ROSE, G.D. Protein Folding - What's the Question? **Proc.Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 90, n. 2, p. 439-441, 1993.

LE DUFF, C.S.; WHITTAKER, S.B.; RADFORD, S.E.; MOORE, G.R. Characterization of the conformational properties of urea-unfolded Im7: implications for the early stages of protein folding. **J. Mol. Biol.**, v. 364, n. 4, p. 824-835, 2006.

LEE, B.; RICHARDS, F.M. The interpretation of protein structures: estimation of static accessibility. **J. Mol. Biol.**, v. 55, n. 3, p. 379-400, 1971.

LEVINE, H. Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta- amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution. **Protein Sci.**, v. 2, n. 3, p. 404-410, 1993.

LEVINTHAL, C. In: DeBRUNNER, J.T.P.; MUNCK, E. (Eds.). **How to fold graciously**. 1969, Monticello, IL, USA. **Mossbauer Spectroscopy in Biological Systems: Proceedings of a meeting held at Allerton House, University of Illinois Press**. p. 22-24. Disponível em: <<http://www-miller.ch.cam.ac.uk/levinthal/levinthal.html>>. Acesso em: 24 fev. 2010.

LI, J.; UVERSKY, V.N.; FINK, A.L. Effect of familial Parkinson's disease point mutations A30P and A53T on the structural properties, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein. **Biochemistry.**, v. 40, n. 38, p. 11604-11613, 2001.

LI, J.; QIAN, X.; SHA, B. The crystal structure of the yeast Hsp40 Ydj1 complexed with its peptide substrate. **Structure.**, v. 11, n. 12, p. 1475-1483, 2003.

LINDORFF-LARSEN, K.; RØGEN, P.; PACI, E.; VENDRUSCOLO, M.; DOBSON, C.M. Protein folding and the organization of the protein topology universe. **Trends. Biochem. Sci.**, v. 30, n. 1, p. 13-19, 2005.

LIU, Y. Understanding the biological activity of amyloid proteins in vitro: from inhibited cellular MTT reduction to altered cellular cholesterol homeostasis. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol.**, v. 23, n. 3, p. 377-395, 1999.

LOH, S.N.; KAY, M.S.; BALDWIN, R.L. Structure and stability of a second molten globule intermediate in the apomyoglobin folding pathway. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 92, n. 12, p. 5446-5450, 1995.

LORENZO, A.; RAZZABONI, B.; WEIR, G.C.; YANKNER, B.A. Pancreatic islet cell toxicity of amylin associated with type-2 diabetes mellitus. **Nature.**, v. 368, n. 6473, p. 756-760, 1994.

LUO, Y.; BALDWIN, R.L. How Ala/Gly Mutations in Different Helices Affect the Stability of the Apomyoglobin Molten Globule. **Biochemistry.**, v. 40, n. 17, p. 5283-5289, 2001.

MARCON, G.; PLAKOUTSI, G.; CHITI, F. Protein Aggregation Starting From The Native Globular State. **Methods. Enzimol.**, v. 413, p. 75-91, 2006.

MARSTON, F.A.O.; HARTLEY, D.L. Solubilization of protein aggregates. **Methods. Enzimol.**, v. 182, p. 264-276, 1990.

MAURY, C.P.; ALLI, K.; BAUMANN, M. Finnish hereditary amyloidosis. Amino acid sequence homology between the amyloid fibril protein and human plasma gelsoline. **FEBS Lett.**, v. 260, n. 1, p. 85-87, 1990.

McCARNEY, E.R.; KOHN, J.E.; PLAXCO, K.W. Is there or isn't there? The case for (and against) residual structure in chemically denatured proteins. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.**, v. 40, n. 4, p. 181-189, 2005.

MICHELETTI, C.; MARITAN, A.; BANAVAR, J.R. A comparative study of existing and new design techniques for protein models. **J. Chem. Phys.**, v. 110, n. 19, p. 9730-9738, 1999.

MISHIMA, T.; OHKURI, T.; MONJI, A.; IMOTO, T.; UEDA, T. Amyloid formation in denaturated single-mutant lysozymes where residual structures are modulated. **Protein. Sci.**, v. 15, n. 10, p. 2448-2452, 2006.

MITTAG, T.; FORMAN-KAY, J.D. Atomic-level characterization of disordered protein ensembles. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v. 17, n. 1, p. 3-14, 2007.

MOGK, A.; SCHLIEKER, C.; FRIEDRICH, K.L.; SCHONFELD, H.J.; VIERLING, E.; BUKAU, B. Refolding of substrates bound to small Hsps relies on a disaggregation reaction mediated most efficiently by ClpB/DnaK. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 33, p. 31033-31042, 2003.

MOK, K.H.; PETTERSSON, J.; ORRENIUS, S.; SVANBORG, C. HAMLET, protein folding, and tumor cell death. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 354, n. 1, p. 1-7, 2007.

MORNON, J.P.; HALABY, D.; MALFOIS, M.; DURAND, P.; CALLEBAUT, I. TARDIEU, A. Alpha-Crystallin C-terminal domain: on the track of an Ig fold. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 22, n. 3-4, p. 219-227, 1998.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods.**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NAIKI, H.; HIGUCHI, K.; HOSOKAWA, M.; TAKEDA, T. Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavin T1. **Anal Biochem.**, v. 177, n. 2, p. 244-249, 1989.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger Principles of Biochemistry 4<sup>th</sup> ed.** New York, NY, USA: W.H. Freeman & Co., 2004, 1100 p., ISBN-13 978-0716743392.

NISHII, I.; KATAOKA, M.; TOKUNAGA, F.; GOTO, Y. Cold denaturation of the molten globule states of apomyoglobin and a profile for protein folding. **Biochemistry.**, v. 33, n. 16, p. 4903-4909, 1994.

NISHIMURA, C.; DYSON, H. J.; WRIGHT, P.E. The apomyoglobin folding pathway revisited: structural heterogeneity in the kinetic burst phase intermediate. **J. Mol. Biol.**, v. 322, n. 3, p. 483-489, 2002.

NISHIMURA, C.; WRIGHT, P.E.; DYSON, H.J. Role of the B helix in early folding events in apomyoglobin: evidence from site-directed mutagenesis for native-like long range interactions. **J. Mol. Biol.**, v. 334, n. 2, p. 293-307, 2003.

OHGUSHI, M.; WADA, A. 'Molten globule state': a compact form of globular proteins with mobile side-chains. **FEBS Lett.**, v. 164, n. 1, p. 21-24, 1983.

ONUFRIEV, A.; CASE, D.A.; BASHFORD, D. Structural details, pathways, and energetics of unfolding apomyoglobin. **J. Mol. Biol.**, v. 325, n. 3, p. 555-567, 2003.

OTWINOWSKI, Z. MINOR, W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. **Methods Enzymol.**, v. 276, p. 307-326, 1997.

PACE, C.N. Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. **Methods. Enzymol.**, v. 131, p. 266-280, 1986.

PACE, C.N.; VAJDOS. F.; FEE, L.; GRIMSLEY, G.; GRAY, T. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. **Protein Sci.**, v. 4, n. 11, p. 2411-2423, 1995.

PETTERSSON-KASTBERG, J.; AITS, S.; GUSTAFSSON, L.; MOSSBERG, A.; STORM, P.; TRULSSON, M.; PERSSON, F.; MOK, K.H. Can misfolded proteins be beneficial? The HAMLET case. **Ann. Med.**, v. 41, n. 3, p. 162-176, 2009.

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.F.; TERRY, C.J.; FEEST, T.G.; ZALIN, A.M.; HSUAN, J.J. human lysozyme gene mutations cause hereditary systemic amyloidosis. **Nature.**, v. 362, n. 6420, p. 553-557, 1993.

PEPYS, M.B. Amyloidosis. In: WEATHERALL, D.J.; LEDINGHAM, J.G.; WARRELL, D.A. (Eds.). **The Oxford Textbook of Medicine 3<sup>rd</sup> ed.** Oxford, Oxon, ENG: Oxford University Press, 1995, 5064 p., ISBN 0-19-262140-8.

PETKOVA, A.T.; ISHII, Y.; BALBACH, J.J.; ANTZUTKIN, O.N.; LEAPMAN, R.D.; DELAGLIO, F.; TYCKO, R. A structural model for Alzheimer's beta-amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 99, n. 26, p. 16742-16747, 2002.

POLVERINO DE LAURETO, P.; TADDEI, N.; FRARE, E.; CAPANNI, C.; COSTANTINI, S.; ZURDO, J.; CHITI, F.; DOBSON, C.M.; FONTANA, A. Protein aggregation and amyloid fibril formation by an SH3 domain probed by limited proteolysis. **J. Mol. Biol.**, v. 334, n. 1, p. 129-141, 2003.

PRIGOGINE, I. **O fim das certezas: Tempo, caos e as leis da natureza.** Tradução: Roberto Leal Ferreira. São Paulo, SP: Editora UNESP, 1997, 199 p., ISBN-13 9788571391314.

PRIP-BUUS, C.; WESTERMAN, B.; SCHMITT, M.; LANGER, T.; NEUPERT, W. SCHWARZ, E. Role of the mitochondrial DnaJ homologue, Mdj1p, in the prevention of heat-induced protein aggregation. **FEBS Lett.**, v. 380, n. 1-2, p. 142-146, 1996.

PRIVALOV, P.L.; KHENCHINASHVILI, N.N. A thermodynamic approach to the problem of stabilization of globular protein structure: a calorimetric study. **J. Mol. Biol.**, v. 86, n. 3, p. 665-684, 1974.

PRIVALOV, P.L. Intermediate states in protein folding. **J. Mol. Biol.**, v. 258, n. 5, p. 707-725, 1996.

PTITSYN, O.B. How does protein synthesis give rise to the 3D-structure. **FEBS Lett.**, v. 285, n. 2, p. 176-181, 1991.

QAHWASH, I.; WEILAND, K.L.; LU, Y.; SAEVER, R.W.; KLETZIEN, R.F.; YAN, R. Identification of a mutant amyloid peptide that predominantly forms neurotoxic protofibrillar aggregates. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 25, p. 23187-23195, 2003.

RADFORD, S.E.; DOBSON, C.M.; EVANS, P.A. The folding of hen lysozyme involves partially structured intermediates and multiple pathways. **Nature.**, v. 358, n. 6384, p. 302-307, 1992.

RAMOS, C.H.I.; KAY, M.S.; BALDWIN, R.L. Putative salt-bridges involved in myoglobin stability. **Biochemistry.**, v. 38, n. 30, p. 9783-9790, 1999.

RAMOS, C.H.I.; FERREIRA, S.T. Protein folding, misfolding and aggregation: evolving concepts and conformational diseases. **Protein Pept. Lett.**, v. 12, n. 3, p. 213-222, 2005.

REGIS, W.C.B.; FATTORI, J.; SANTORO, M.M.; JAMIN, M.; RAMOS, C.H.I. On the difference in stability between horse and sperm whale myoglobins. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 436, n. 1, p. 168-177, 2005.

RIBEIRO-JR, E.A.; REGIS, W.C.B.; TASIC, L.; RAMOS, C.H.I. Fast Purification of the Apo form and of a Non-binding Heme Mutant of Recombinant Sperm Whale Myoglobin. **Prot. Expr. Pur.**, v. 28, n. 1, p. 202-208, 2003.

RIBEIRO-JR, E.A.; RAMOS, C.H.I. Origin of the anomalous circular dichroism spectra of many apomyoglobin mutants. **Anal. Biochem.**, v. 329, n. 2, p. 300-306, 2004.

RIBEIRO-JR, E.A.; RAMOS, C.H.I. Circular Permutation and Deletion Studies of Myoglobin Indicate that the Correct Position of Its N-Terminus Is Required for Native Stability and Solubility but Not for Native-like Heme Binding and Folding. **Biochemistry.**, v. 44, n. 12, p. 4699-4709, 2005.

RITOSSA, F. A new puffing pattern induced by a temperature shock and DNP in *Drosophila*. **Experientia.**, v. 18, n. 12, p. 571-573, 1962.

RUDIGER, S.; SCHNEIDER-MERGENER, J. BUKAU, B. Its substrate specificity characterizes the DnaJ co-chaperone as a scanning factor for the DnaK chaperone. **EMBO J.**, v. 20, n. 5, p. 1042-1050, 2001.

SALI, A.; SHAKHNOVICH, E.; KARPLUS, M. How does a protein fold? **Nature.**, v. 369, n. 6477, p. 248-251, 1994.

SANTORO, M.M.; BOLEN, D.W. Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 1. Unfolding of phenylmethanesulfonyl alpha-chymotrypsin using different denaturants. **Biochemistry.**, v. 27, n. 21, p. 8063-8068, 1988.

SCHLESSINGER, A.; PUNTA, M.; YACHDAV, G.; KAJAN, L.; ROST, B. Improved disorder prediction by combination of orthogonal approaches. **PLoS One.**, v. 4, n. 2, p. e4433, 2009.

SCHONBRUN, J.; WEDEMEYER, W.J.; BAKER, D. Protein structure prediction in 2002. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v. 12, n. 3, p. 348-354, 2002.

SERI, M.; CELLI, I.; BETSOS, N.; CLAUDIANI, F.; CAMERA, G.; ROMEO, G. A Cys634Gly substitution of the RET proto-oncogene in a family with recurrence of multiple endocrine neoplasia type 2A and cutaneous lichen amyloidosis. **Clin. Genet.**, v. 51, n. 2, p. 86-90, 1997.

SERPELL, L.C.; FRASER, P.E.; SUNDE, M. X-ray fiber diffraction of amyloid fibrils. **Methods. Enzymol.**, v. 309, p. 526-536, 1999.

SIRANGELO, I.; TAVASSI, S.; IRACE, G. Tryptophanyl contributions to apomyoglobin fluorescence resolved by site-directed mutagenesis. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1476, n. 2, p. 173-180, 2000.

SIRANGELO, I.; MALMO, C.; CASILLO, M.; MEZZOGIORNO, A.; PAPA, M.; IRACE, G. Tryptophanyl substitutions in apomyoglobin determine protein aggregation and amyloid-like fibril formation at physiological pH. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 48, p. 45887-45891, 2002.

SIRANGELO, I.; MALMO, C.; IANNUZZI, C.; MEZZOGIORNO, A.; BIANCO, M.R.; PAPA, M.; IRACE, G. Fibrillogenesis and cytotoxic activity of the amyloid-forming apomyoglobin mutant W7FW14F. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 13, p. 13183-13189, 2004.

SPEED, M.A.; WANG, D.I.; KING, J. Specific aggregation of partially folded polypeptide chains: the molecular basis of inclusion body composition. **Nat. Biotechnol.**, v. 14, n. 10, p. 1283-1287, 1996.

STANIFORTH, R.A.; GIANNINI, S.; HIGGINS, L.D.; CONROY, M.J.; HOUNSLOW, A.M.; JERALA, R.; CRAVEN, C.J.; WALTHO, J.P. Three-dimensional domain swapping in the folded and molten-globule states of cystatins, an amyloid-forming structural superfamily. **EMBO J.**, v. 20, n. 17, p. 4774-4781, 2001.

STRYER, L. The interaction of a naphthalene dye with apomyoglobin and apohemoglobin. A fluorescent probe of non-polar binding sites. **J. Mol. Biol.**, v. 13, n. 2, p. 482-495, 1965.

STRYER, L.; BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L. **Biochemistry 5<sup>th</sup> ed.**, New York, NY: W.H. Freeman & Co. Ltd., 2002, 1100 p., ISBN-13 978-0716746843.

STUDIER, F.W.; MOFFATT, B.A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. **J. Mol. Biol.**, v. 189, n. 1, p. 113-130, 1986.

STUDIER, F.W.; ROSENBERG, A.H.; DUNN, J.J.; DUBENDORFF, J.W. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. **Methods. Enzymol.**, v. 185, p. 60-89, 1990.

SUNDE, M.; SERPELL, L.C.; BARTLAM, M.; FRASER, P.E.; PEPYS, M.B.; BLAKE, C.C. Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction. **J. Mol. Biol.**, v. 273, n. 3, p. 729-739, 1997.

SUPINO, R. MTT Assays. In: O'HARA, S.; ATTERWIL, C.K. (Eds.). **Methods in Molecular Biology: In Vitro Toxicity Testing Protocols**. Vol. 43. Totowa, NJ, USA: Humana Press Inc., 1995, p. 109-118, ISBN-13 978-0896032828.

TAKANO, T. Structure of myoglobin refined at 2.0 Å resolution. I. Crystallographic refinement of metmyoglobin from sperm whale. **J. Mol. Biol.**, v. 110, n. 3, p. 537-568, 1977.

TAKETOMI, H.; UEDA, Y.; GO, N. Studies on protein folding, unfolding and fluctuations by computer simulation. I. The effect of specific amino acid sequence represented by specific inter-unit interactions. **Int. J. Pept. Protein. Res.**, v. 7, n. 6, p. 445-459, 1975.

TANFORD, C. Protein denaturation. **Adv. Protein Chem.**, v. 23, p. 121-282, 1968.

TIROLI-CEPEDA, A.O. **Caracterização da relação entre estabilidade, estrutura e função de duas sHsps de cana-de-açúcar e da Hsp40 da subfamília A humana, chaperones envolvidos com o reconhecimento e apresentação de proteínas parcialmente enoveladas**. 2007. 161 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.

TIROLI, A.O.; RAMOS, C.H.I. Biochemical and biophysical characterization of small heat shock proteins from sugarcane. Involvement of a specific region located at the N-terminus with substrate specificity. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, v. 39, n. 4, p. 818-831, 2007.

TOMPA, P. Intrinsically unstructured proteins. **Trends Biochem. Sci.**, v. 27, n. 10, p. 527-533, 2002.

TYCKO, R. Molecular structure of amyloid fibrils: insights from solid-state NMR. **Q. Rev. Biophys.**, v. 39, n. 1, p. 1-55, 2006.

UVERSKY, V.N.; FINK, A.L. Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1698, n. 2, p. 131-153, 2004.

VAN MONTFORT, R.; SLINGSBY, C. VIERLING, E. Structure and function of the small heat shock protein/alpha-crystallin family of molecular chaperones. **Adv. Protein Chem.**, v. 59, p. 105-156, 2001.

VAZ, D.C.; RODRIGUES, J.R.; SEBALD, W.; DOBSON, C.M.; BRITO, R.M. Enthalpic and entropic contributions mediate the role of disulfide bonds on the conformational stability of interleukin-4. **Protein Sci.**, v. 15, n. 1, p. 33-44, 2006.

VENDRUSCOLO, M.; DOBSON, C.M. Towards complete descriptions of the free-energy landscapes of proteins. **Philos. Transact. A Math. Phys. Eng. Sci.**, v. 363, n. 1827, p. 433-450, 2005.

VILASI, S.; DOSI, R.; IANNUZZI, C.; MALMO, C.; PARENTE, A.; IRACE, G.; SIRANGELO, I. Kinetics of amyloid aggregation of mammal apomyoglobins and correlation with their amino acid sequences. **FEBS Lett.**, v. 580, n. 6, p. 1681-1684, 2006.

VIRCHOW, R. Weitere Mittheilungen über das Vorkommen der pflanzlichen Cellulose beim Menschen. **Virchows Arch. Pathol. Anat.**, v. 6, 268-271, 1854a.

VIRCHOW, R. Zur Cellulose-Frage. **Virchows Arch. Pathol. Anat.**, v. 6, p. 416-426, 1854b.

VOET, D.; VOET, J.G. **Biochemistry 3<sup>rd</sup> ed.** Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2004, 1616 p., ISBN-13 978-0471193500.

WALL, J.; MURPHY, C.L.; SOLOMON, A. In vitro immunoglobulin light chain fibrillogenesis. **Methods. Enzymol.**, v. 309, p. 204-217, 1999.

WESTERHEIDE, S.D.; MORIMOTO, R.I. Heat shock response modulators as therapeutic tools for diseases of protein conformation. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 39, p. 33097-33100, 2005.

WESTERMARK, P.; SLETTEN, K.; JOHANSSON, B.; CORNWELL III, G.G. Fibril in senile systemic amyloidosis is derived from normal transthyretin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 87, n. 7, p. 2843-2845, 1990.

WETLAUFER, D.B. Nucleation, rapid folding and globular intrachain regions in proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 70, n. 3, p. 697-701, 1973.

WHITFORD, D. **Proteins: Structure and Function**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2005, 542 p., ISBN-13 978-0471498940.

WOLYNES, P.G. In: MUÑOZ, V. (Ed.). **The Protein Folding Energy Landscape: A Primer**. 2008, Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry, **Protein Folding, Misfolding and Aggregation: Classical Themes and Novel Approaches**. 289 p., illus., bibliographies, index, ISBN-13 978-0854042579.

YASAKI, M.; FARRELL, S.A.; BENSON, M.D. A novel lysozyme mutation Phe57Ile associated with hereditary renal amyloidosis. **Kidney. Int.**, v. 63, n. 5, p. 1652-1657, 2003.

ZARRANZ, JJ.; ALEGRE, J.; GÓMEZ-ESTEBAN, J.C.; LEZCANO, E.; ROS, R.; AMPUERO, I.; VIDAL, L.; HOENICKA, J.; RODRIGUEZ, O.; ATARÉS, B.; LLORENS, V.; GÓMEZ-TORTOSA, E.; DEL SER, T.; MUÑOZ, D.G.; DE YEBENES, J.G. The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. **Ann. Neurol.**, v. 55, n. 2, p. 164-173, 2004.

ZEROVNIK, E. Amyloid-fibril formation. Proposed mechanisms and relevance to conformational disease. **Eur. J. Biochem.**, v. 269, n. 14, p. 3362-3371, 2002.

ZHOU, Z.; SMITH, J.D.; GREENGARD, P.; GANDY, S. Alzheimer amyloid-beta peptide forms denaturant-resistant complex with type epsilon 3 but not type epsilon 4 isoform of native apolipoprotein E. **Mol. Med.**, v 2, n. 2, p. 175-180, 1996.

ZWANZIG, R.; SZABO, A.; BAGCHI, B. Levinthal's paradox. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 89, n. 1, p. 20-22, 1992.

**ANEXO A - CORRÊA, D.H.A.; RAMOS, C.H.I.** The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. **Afr. J. Biochem. Res.**, v. 3, n. 5, p. 164-173, 2009.

African Journal of Biochemistry Research Vol.3 (5), pp. 164-173, May, 2009  
Available online at <http://www.academicjournals.org/AJBR>  
ISSN 1996-0778 © 2008 Academic Journals

*Full Length Research Paper*

## The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function

Daniel H. A. Corrêa<sup>1,2</sup> and Carlos H. I. Ramos<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Chemistry, University of Campinas-UNICAMP. P. O. Box 6154, 13083-970, Campinas, SP, Brazil.

<sup>2</sup>Institute of Biology, University of Campinas-UNICAMP. P. O. Box 6154, 13083-970, Campinas, SP, Brazil.

Accepted 9 November, 2008

Circular Dichroism (CD) is a spectroscopic technique widely used for the evaluation of the conformation and stability of proteins in several environmental conditions like temperature, ionic strength, and presence of solutes or small molecules. Circular Dichroism spectroscopy is non-destructive, relatively easy to operate, requires small amount of sample and few data collection. Additionally, data analyses are fast. Chiefly because of the advantages associated with the technique, CD is present in almost all laboratories involved with protein analysis even though it mainly provides low resolution information when compared with other techniques. However, this technique is sometimes not well appreciated due to some over or misinterpretation while relating Circular Dichroism with structure. Here we present important principles and other valuable tips to help experimentalists with the analysis and interpretation of CD data.

**Key words:** Circular dichroism, protein folding, protein stability, spectroscopy.

### INTRODUCTION

#### Historical view and basic principles

Many macromolecules have molecular asymmetry, that is, its structure is not superimposable on its mirror image. In 1848, Louis Pasteur discovered that crystals can be classified according to their optical activity whether they rotate light clockwise (right) or anticlockwise (left). The discovery of this phenomenon, also known as chirality was very important because for the first time molecules were showed to be three-dimensional entities since two-dimensional structures are incapable of showing such phenomenon. CD uses a source of circularly polarized light, in which the vector oscillates rotationally to the right or to the left, forming a helix around the axis of propagation. To compare, when light is depolarized the electromagnetic vector oscillates in any direction perpendicular to the direction of propagation and when light is linearly

polarized in a plan the vector oscillates on a single plane in the direction of propagation.

To understand circular dichroism, as any spectroscopic method, it is important to be familiar with the Beer-Lambert law (Schellman, 1975). Briefly, a beam of light with intensity  $I_0$  passing thru a sample is absorbed and continues its trajectory with intensity  $I$ . Absorbance  $A$  at a determined wavelength is:

$$A = \log_{10} (I_0 / I) \quad (1)$$

$A$  is related to physical-chemical properties of the sample:

$$A = \epsilon \times l \times C \quad (2)$$

Where  $\epsilon$  is the molar extinction coefficient (an intrinsic property of the molecule) in  $M^{-1}.cm^{-1}$ ,  $l$  is the optical path-length in cm, and  $C$  is concentration in M.

Chirality, a property of molecules related to the structural conformation, is studied mainly by two methods. One is polarimetry, in which the sample is analyzed by linearly polarized monochromatic light. Sample optically

\*Corresponding author. E-mail: [cramos@iqm.unicamp.br](mailto:cramos@iqm.unicamp.br). Tel: 55-19-3521-3144; fax: 55-19-3521-3023.

**Abbreviations:** Mb; Myoglobin, WT; wild-type, TFE; trifluoroethanol, CD; circular dichroism [θ]; mean residue molar ellipticity, A; absorbance and UV; ultraviolet.



**Figure 1.** Three-dimensional structure of sperm whale myoglobin. Myoglobin is an all  $\alpha$ -helical protein involved in oxygen transport. It has 8  $\alpha$ -helices named A to H. The helices are shown as cartoon and the heme group as stick. The figure was created using the software Pymol (Delano Scientific LLC) and an Mb structure from PDB (2JHO).

active rotate the plane of the light and the angle of rotation,  $\alpha$  (in millidegrees), is measured. The polarimetry also follows Beer-Lambert law:

$$[\alpha] = \alpha \times l \times C \quad (3)$$

Where  $[\alpha]$  is the specific rotation. In this case data can also be measured as a function of the spectrum, and this method is known as optical rotatory dispersion or ORD.

The other method is Circular Dichroism in which circularly polarized light both to the left and to the right, pass through a sample and the difference in absorption of the components of left and right is measured. An optically active sample will absorb differently left and right circularly polarized light, also obeying the Beer-Lambert law:

$$\Delta A = A_L - A_R = \epsilon_L \times l \times C - \epsilon_R \times l \times C = \Delta \epsilon \times l \times C \quad (4)$$

Where  $L$  is left and  $R$  is right. The difference in absorption results in a true light which is elliptically polarized and its angle, named  $\Psi$  and usually represented by  $\theta$ , is measured as millidegrees. Ellipticity and absorption are related by the equations:

$$\Delta A = \frac{\theta}{32980} \quad (5)$$

$$\theta = \frac{2.303 (A_L - A_R)}{4l} \quad (6)$$

For more detailed reviews on the principles of circular dichroism see Johnson (1985), Kuwajima (1995), Kolowski et al. (2000) and references therein.

### CD and proteins: Principles

Circular Dichroism is chiefly used for the study of the secondary structure of proteins, although it can also be used to study the conformation of peptides and nucleic acids (Johnson, 1985; Woody, 1995; Woody, 1996). This technique is widely used because requires low sample

concentration (1 - 10 mg/ml), allows the study in a wide range of variables (temperature, pH, etc) and gives information on the effect of added ligands. For proteins the results are usually expressed as the mean residue molar ellipticity,  $[\theta]$ :

$$[\theta] = \frac{\theta \times 100 \times M}{C \times l \times n} \quad (7)$$

Where  $\theta$  is the ellipticity in degrees,  $l$  is the optical path in cm,  $C$  is the concentration in mg/ml,  $M$  is the molecular mass and  $n$  is in the number of residues in the protein. The mean residue molar ellipticity  $[\theta]$  is given in  $\text{deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$ . Such standardization allows independent comparison with results obtained from different batches of samples or from measurements taken in different laboratories or using different spectropolarimeters.

As an example to illustrate the above we can use the properties of sperm whale myoglobin (Figure 1), an all  $\alpha$ -helical protein involved in oxygen transport. Usually, 1 micromolar ( $\sim 17$  mg/l) of the holoprotein (153 residues,  $\sim 17$  kDa) in a cell of 1 cm gives  $-38$  millidegrees at 222 nm (Ramos et al., 1999; Ribeiro-Jr and Ramos, 2004). Using Equation 7:

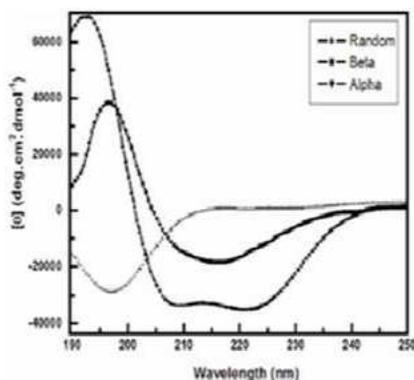
$$[\theta]_{222} = (-0.038 \times 100 \times 17,000) / (0.017 \times 1 \times 153) = -24,840 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$$

The same approach can be used to calculate  $[\theta]$  for other wavelengths generating  $[\theta]$  for an entire spectrum. Also very important, CD is a nondestructive method and often used to study protein folding and the processes of protein-protein interaction and protein-DNA interaction (Johnson, 1985; Sprecher et al., 1979).

### Protein structure

#### Secondary structure

CD probes the secondary structure of proteins because the peptide bond is asymmetric and molecules without a plan of symmetry show the phenomenon of circular dichroism. The amide chromophore of the peptide bond dominates the CD spectra of proteins below 250 nm. Amides have 2 electronic transitions of low energy that are well characterized with transitions  $n \rightarrow \pi^*$  and  $\pi_0 \rightarrow \pi^*$  showing circular dichroism at 215 - 230 nm and 185 - 200 nm, respectively (Woody, 1995; Woody, 1996; Woody and Koslowski, 2002). These two transitions dominate the phenomenon of circular dichroism at far-UV ( $<240$  nm). The transition  $n \rightarrow \pi^*$  is electrically prohibited but is magnetically permitted, being primarily responsible for the negative bands at 222 nm, characteristic of the  $\alpha$ -helix spectrum, and 216 - 218 nm, characteristic of the  $\beta$ -sheet spectrum. The transition  $\pi_0 \rightarrow \pi^*$  is primarily responsible for the positive band at  $\sim 190$  nm and the negative band at 208 nm, characteristic of the  $\alpha$ -helix spectrum, and for the positive band at  $\sim 198$  nm, characteristic of the  $\beta$ -sheet spectrum.



**Figure 2.** Characteristic far-UV CD spectra for an all- $\alpha$ -helix, an all- $\beta$ -sheet and a random coil protein. The spectrum for an all- $\alpha$ -helix protein (Alpha) has two negative bands of similar magnitude at 222 and 208 nm, and a positive band at ~190 nm. The spectrum for an all  $\beta$ -sheet protein (Beta) has in general a negative band between 210-220 nm and a positive band between 195 - 200 nm. The spectrum for a disorderly (random) protein has a negative band of great magnitude at around 200 nm.

In conventional CD instruments a far-UV spectrum is collected from 180 to 250 nm when well-behaved samples are used. However, further information is available in the vacuum UV region (<180 nm) which can be collected using synchrotron radiation CD, or SRCD. This is not discussed here and there are many good reviews in this area (Wallace and Janes, 2001).

Figure 2 shows characteristic far-UV CD spectra for an all- $\alpha$ -helix, an all- $\beta$ -sheet and a random coil protein. In a typical CD spectrum, the absence of signal means absence of circular dichroism, a negative signal means absorption of left circularly polarized light, and a positive signal means absorption of right circularly polarized light. The spectrum for an all- $\alpha$ -helical protein has two negative bands of similar magnitude at 222 and 208 nm, and a positive band at ~190 nm (Figure 2). The band at 222 nm is related to the strong hydrogen-bonding environment of  $\alpha$ -helices and is relatively independent of their length. The spectrum for an all  $\beta$ -sheet protein has, in general, a negative band between 210 - 220 nm and a positive band between 195 - 200 nm (Figure 2). Spectra for  $\beta$ -sheet proteins are more diverse than those for  $\alpha$ -helical proteins because  $\beta$ -sheets may be present at parallel, anti-parallel, or mixed conformations, and can be twisted in many ways. The spectrum for a disorderly (random coil) protein has a negative band of great magnitude at around 200 nm (Figure 2).

### Tertiary structure

Aromatic residues (tryptophan, tyrosine and phenylalanine) can also exhibit circular dichroism with  $\pi_0 \rightarrow \pi^*$  ab-

sorption at between 250 and 300 nm. Although the aromatic residues contribute mainly to the near-UV (> 250 nm) they also contribute to the far-UV spectra of a protein. In general the contribution is very small but when the content of these residues is very high the estimation of secondary structure is complicated. Disulfide bonds also have circular dichroism related to a transition  $n \rightarrow \sigma^*$  at approximately 260 nm. Generally, the peak for a disulfide bond is wider than that for an aromatic residue.

### Secondary structure prediction

One of the main applications of CD for the study of proteins is the estimation of secondary structure of proteins. There is an intense progress in cloning and purification techniques that allows the production of a large number of proteins. However, due to present technical difficulties, structural information at high resolution from X-ray diffraction or nuclear magnetic resonance is sometimes difficult or even impossible. Obviously, CD cannot compete with these techniques to provide details about the structure of a protein, but can give a very good estimation of the fraction of the residues in the structure which are involved in  $\alpha$ -helix,  $\beta$ -sheet or disorderly formation. This is extremely useful when information about the structure at high resolution does not exist. And even when such information exists CD gives important additional information about the effect of temperature (Hilário et al., 2005; Ribeiro-Jr and Ramos, 2005; Balan et al., 2006), pH (Ramos, 2004; Ribeiro-Jr and Ramos, 2004), charge (Ramos et al., 1999; Regis et al., 2005), ligands (Balan et al., 2005; Ribeiro-Jr and Ramos, 2005; Balan et al., 2006; Borges and Ramos, 2006; Ramos et al., 2007), etc., in the secondary structure.

Many methods have been developed to predict the secondary structure of a protein from its CD spectrum based on its primary sequence using statistical and/or physical-chemical information. In general, the fractional helicity,  $fH$ , or the mole fraction of helical backbone  $\alpha$ -carbons within the peptide or protein, is usually calculated as proportional to the experimental molar residue ellipticity at 222 nm,  $[\theta]_{222}$  (Marqusee and Baldwin, 1987).

One of the simplest methods, and yet fairly reliable, for estimating the quantity of  $\alpha$ -helix is the evaluation of the signal at 222 nm using one or both of the following equations:

$$fH = ([\theta]_{222} - 3,000)/(-36,000 - 3,000) \quad (8) \text{ (Morriset et al., 1973)}$$

$$[\theta]_{222} = (fH - iK/N) [\theta]_{HX} \quad (9) \text{ (Chen et al., 1974)}$$

where  $[\theta]_{222}$  is the mean molar residual ellipticity at 222 nm (in  $\text{deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$ ),  $fH$  is the fractional helicity (in %),  $i$  is the number of helices in the protein,  $K$  is a constant at ellipticity when 100% of the structure is  $\alpha$ -helical.  $[\theta]_{HX}$  is equal to  $-34,686 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$  and thus this value would be the theoretical maximum for an all  $\alpha$ -helical pro-

**Table 1.** Some free programs on the web for secondary structure prediction.

Program	Web address	Reference
CONTIN-CD	<a href="http://s-provencher.com/pages/contin-cd.shtml">http://s-provencher.com/pages/contin-cd.shtml</a>	Provencher and Glöckner (1981)
SELCON	<a href="http://srs.dl.ac.uk/VUV/CD/selcon.html">http://srs.dl.ac.uk/VUV/CD/selcon.html</a>	Sreerama and Woody (1994a, 1994b)
DICHROWEB	<a href="http://www.cryst.bbk.ac.uk/cdweb/html/home.html">http://www.cryst.bbk.ac.uk/cdweb/html/home.html</a>	Whitmore and Wallace (2004; 2008)
DICROPROT	<a href="http://dicroprot-pbil.ibcp.fr/">http://dicroprot-pbil.ibcp.fr/</a>	Deleage and Geourjon (1993)
K2D2	<a href="http://www.ogic.ca/projects/k2d2/">http://www.ogic.ca/projects/k2d2/</a>	Perez-Iratxeta and Andrade-Navarro (2008)

tein. Such information is useful to compare with the obtained experimental result. For example, if the result is much larger than that or equal to that when previous information point that the conformation of the protein should not be 100% helical, the calculation pre-experimental setups needs serious revision. Additional and valuable information is that the prediction of maximum value for a 100%  $\beta$ -sheet protein from its CD signal between 215 - 220 nm is around  $-20,000 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$ .

In addition to the aforementioned, Greenfield and Fasman (1969) showed that both  $\beta$ -sheet and random coil would have low ellipticity at 208 nm of about  $-4,000 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$  whereas a  $\alpha$ -helix would have a maximum at 208 nm equal to approximately  $-33,000 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$ . Therefore, they suggested that an approximated estimation of the  $\alpha$ -helical content may be made from  $[\theta]_{208}$ , the mean molar residual ellipticity in  $\text{deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$  at 208 nm:

$$fH = ([\theta]_{208} - 4,000) / (-33,000 - 4,000) \quad (10)$$

There are other methods that use the whole spectrum of a protein to predict its secondary structure content. These methods establish statistical methods that use combinations of linear far-UV spectra based on reference proteins with known tertiary structure. However, careful analysis is needed in the evaluation because some uncertainty may arise from the fact that the circular dichroism of a protein depends not only on the quantities of structure, but also on the extension of the chain. Other programs, which use non-linear methods, have been created to try to improve the quality of prediction.

Table 1 shows a list of some programs used to predict the structure of a protein and which are available on the web. A wise strategy is to combine different programs for reaching greater confidence. Additional information can be found in (Greenfield, 2006). It is also important to emphasize those errors in calculating the concentration of the protein leading to errors of the same magnitude or even higher in predicting the structure.

### Experimental parameters

#### Buffer choice

Ideally proteins should be diluted in pure water or at least in 10 mM phosphate, however many proteins are not soluble at these condi-

tions requiring the presence of additives. Anyway, buffers used to dilute proteins should be as transparent as possible since information on secondary structure is obtained at wavelengths below 240 nm, in which many buffers absorb light. Therefore, the chemical reagents used in the preparation of buffers must be of excellent quality, without impurities that could scatter light. If necessary, buffers should be filtered to remove particles.

The indication of absorption of light is given by the dynode voltage module (in volts, V), which measures the response of the photomultiplier during the measurement and is an indicator of the quantity of photons that are not absorbed or are scattered by the sample. The higher the amount recorded, the greater the absorption or the scattering. A high absorption causes an increase in noise and consequently increases the errors of ellipticity measurement. In general, the acceptable limit for reliable reading is 600 V, but acquisitions of up to 700 V are acceptable provided that the number of spectra collection and accumulation is highly enough to reduce the noise generated by absorption. It is advisable not to perform readings with voltage above 700 V as this may cause damage to the unit. The use of cells with thinner pathlengths decreases the number of photons that the sample is able to absorb. By using the Beer-Lambert law (Equation 2) one can vary the concentration of sample and the length of the optical path in order to optimize the measurement.

Table 2 presents the voltage obtained in a circular dichroism espectralpolarimeter Jasco, model J-810, with a lamp with approximately 400 h of use, for a series of solutions (no protein). Since the effect is cumulative and the protein will also contribute to the signal, the Table presents the lowest wavelength to achieve about 400 V in each condition. Reagents of high quality were used and readings were taken in cells of 10 and 1 mm (indicated in the Table). Additionally, solutions of  $\text{NaClO}_4$ , NaF or KF, at 10 mM, are virtually transparent at wavelengths down to 170 nm when using a 1 mm cell (Schmid, 1997). Further information can be found elsewhere (Greenfield, 2006; Kelly et al., 2005).

#### Protein concentration

The circular dichroism (CD) spectrum of a protein depends on both its conformation and concentration. Equation 7 (above) shows that the mean residue molar ellipticity depends on the optical pathlength (which is known), on the protein concentration (which must be known with great accuracy), and on the degree of protein secondary structure (which can be altered by mis-folding, physical-chemical properties of the solution, drastic mutation, etc). An accurate measurement of concentration is fundamental for the prediction of secondary structure. Errors in the order of 10% in the concentration measurement will give the same factor of error in the structure prediction, such as, for instance, assigning  $\beta$ -sheet structure to an all  $\alpha$ -helical protein.

Protein concentration is also an important parameter to reach the best signal to noise ratio. As a rough approximation for protein concentration start by using 0.1% (w/v) for 0.1 mm pathlength and 0.01% (w/v) for 1 mm pathlength (Schmid, 1997). Of course, the va-

**Table 2.** The lowest wavelength (cut off) to avoid absorbance higher than 400V for a series of solutions (no protein). The measurements were done using 10 mm and 1 mm pathlength cells as indicated. The effect is cumulative.

Buffer	Concentration (mM)	Wavelength (10 mm Cell)	Wavelength (1 mm Cell)
Sodium phosphate	20	205	190
	100	208	200
Sodium acetate	10	208	190
	50	-	200
Tris-Cl	10	212	200
	20	216	208
HEPES	10	220	208
NaCl	50	205	200
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	20	-	210
Beta-mercaptoethanol	1	212	200
Dithiothreitol	1	222	205
Glycerol	(5%)	208	-
	(10%)	-	200
Guanidinium chloride	1000	212	-
	6000	-	212
Urea	2000	222	-

lues may vary depending on the folding state of the protein but it may work as a good set up for initial measurements.

Among the most common methods to determine the concentration of proteins is the reliable method of Edelhoch (Gill and von Hippel, 1989; Pace et al., 1995; Ramos, 2004), which was established in 1967 and has the name of its inventor. Other methods, such as biuret and its derivatives, weighing and analysis of amino acids can result in errors in the order of 10%. For a discussion about several methods for determination of protein concentration for CD experiments (Kelly et al., 2005).

Basically, the method of Edelhoch uses the absorption, as measured by conventional spectrometer, of aromatic residues in the region between 270 -300 nm, assuming they are completely exposed when in 20 mM sodium acetate pH 6.5 and 6.0 M guanidinium chloride (Edelhoch, 1967). For better results a solution of 25 mM sodium acetate pH 6.5 and 7.2 mM guanidinium chloride (Edelhoch solution) is used in a proportion of 5:1 to dilute the buffer (blank) and the samples. Duplicates of each sample and several protein dilutions will also help the confidence in the result. At 280 nm the  $\epsilon_{280}$  for tryptophan is 5,690 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>, the  $\epsilon_{280}$  for tyrosine is 1,280 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> and the  $\epsilon_{280}$  for cystine is 120 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>. Therefore, the absorption of a protein at 280 nm ( $\epsilon_{280}$ ) under the conditions of buffer described above will be:

$$\epsilon_{280} [\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}] = n\text{TTrp} \times 5,400 + n\text{Tyr} \times 1,280 + n\text{SS} \times 120 \quad (11)$$

Where;

*n* is the number of residues.

SS means a disulfide bridge (cystine).

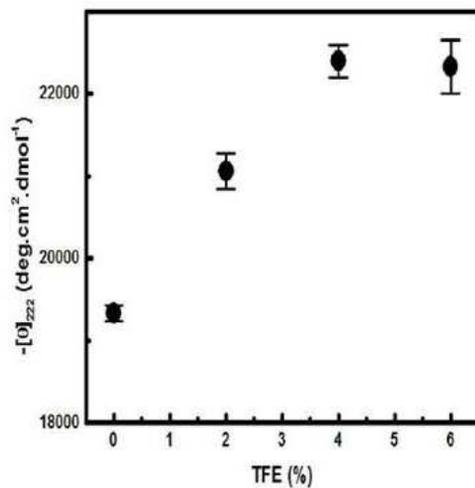
It is worth mentioning that the most reliable data are obtained using absorption from 0.1 to 0.9, in which the signal to noise ratio S/N will be optimum. Dilutions should be used, if necessary, to work in this range of absorbance. Measuring at least duplicates is also very important. The stability of the spectrophotometer used for concentration calculations should be examined periodically. The absorbance scale can be calibrated with a solution of 0.04 mg/ml of potassium chromate in 0.05 M KOH at 25°C. The absorbance of the solution in a 1 cm cell should be 0.633, 0.712, 0.149, 0.987 and 0.124 at wavelengths of 260, 280, 300, 370 and 420 nm, respectively (Schmid, 1997).

When using the Edelhoch method it is advisable to check for possible contamination with nucleic acids that also absorb at the far ultraviolet. See Ribeiro and Ramos (2004) for a method to separate nucleic acids from a protein sample and an example of how inaccuracies in the measurement of concentration can cause misleading interpretations on the structure of proteins.

There are several interesting methods that can give decent estimates of protein secondary structure content from circular dichroism (CD) spectra without any prior knowledge of sample concentration (Holtzer and Holtzer, 1992; McPhie, 2001; Raussens et al., 2003). However, the success of these approaches are less than that for currently available methods, but their simplicity and the fact that the concentration is not needed may be very attractive for the study of proteins and peptides for which an accurate concentration is not always available.

#### Other tips to improve measurement

Another important measurement is that of the absorption of the sample at the wavelength of interest prior CD experiments. The optimum absorbance is 0.87 because this gives the maximum signal to noise ratio. Absorbances higher than 1.2 should be avoided. See Kelly et al. (2005) for absorbance values of a protein solution of 1 mg/ml in a cell of 1 cm pathlength at various wavelengths in the UV. Constant flow of nitrogen should be used, usually 3 L/min for measurements at 260 nm, 5 L/min at 200 - 260 nm, 10 L/min at 180 - 200 nm, 50 L/min at 180 nm. The lamp should be let on for at least 30 min, however 60 min is the ideal total time, before measurements. The standard D(+)-camphorsulfonic acid is used for the calibration of the instrument: the concentration of 0.6 mg/ml gives an absorption of 188 millidegrees at 290.5 nm in a 1 cm cell and -38 millidegrees at 192.5 nm in a 1 mm cell. D(-)-pantolactone is also a good standard for the UV region and a 0.03% aqueous solution should give a signal of -186 millidegrees at 219 nm in a 1 cm pathlength cell. Some instrumental settings are important to reduce the signal to noise ratio. The slit width, which controls the spectral bandwidth should be as large as possible but not too large or the band will be distorted. A series of survey spectra with successively larger slit settings will help to determine the largest slit before a decrease in the measured absorbance. Additionally, signal to noise



**Figure 3.** Ellipticity at 222 nm as a function of increased TFE concentration for apomyoglobin. Circular dichroism measurements were recorded using a Jasco J-810 spectropolarimeter with 10 mm path-length cell. The signal at 222 nm was measured and each point shown is the average of at least 3 independent measurements.

level is proportional to the square root of the integration time, thus the simplest way to improve spectra quality is increasing the response time. However, in this case the speed of reading needs to be reduced to avoid distortions in the spectrum. For that, the speed of reading multiplied by the response time must be less than 0.33 nm (that is, for a speed of 200 nm/min the response time has to be less than 0.1 s and for a speed of 50 nm/min less than 0.4 s).

Another way to reduce noise is by accumulating readings. In this case, to improve the signal to noise ratio by a factor X, the accumulation time will be  $X^2$ . The type of solvent, the concentration of the sample and the optical pathlength can also be changed to improve the quality of the measured spectrum. We may suggest initial measurement parameters for protein analysis: spectral bandwidth of 2 nm for the far-UV region and 1 nm for the near-UV region; response time of 1 s; and scanning speed of 20 nm/min. Accumulation should be as many as necessary and spectrum should start in a wavelength in which no CD signal is present and should end up where HT is about 700 v. Sample should be run before buffer baseline since the exactly same parameters are used to better optimize the subtraction.

Cells should be made of quartz (because the readings are in the ultraviolet wavelength). Cells should be handled with gloves. Good quality cells are almost totally transparent and a measurement of the empty cell should give the same measurement than the empty sample holder (just air). Cells can be cleaned with ethanol or organic solvent such as acetone, but every residue must be washed up, and there are also specific commercial detergents for cleaning. In some cases it will be necessary to maintain the cell at 50% nitric acid for several hours to remove proteins sticking to the quartz (Ramos, 1999).

CD devices available in the market are mainly from four companies: Jasco (<http://www.jascoinc.com>), Aviv (<http://www.avivbio.com>), Applied Photophysics (<http://www.photophysics.com>) and Ollis (<http://www.ollisweb.com>). It is easy to find them on the web and to get information on their spectropolarimeters and accessories.

## Protein conformational changes

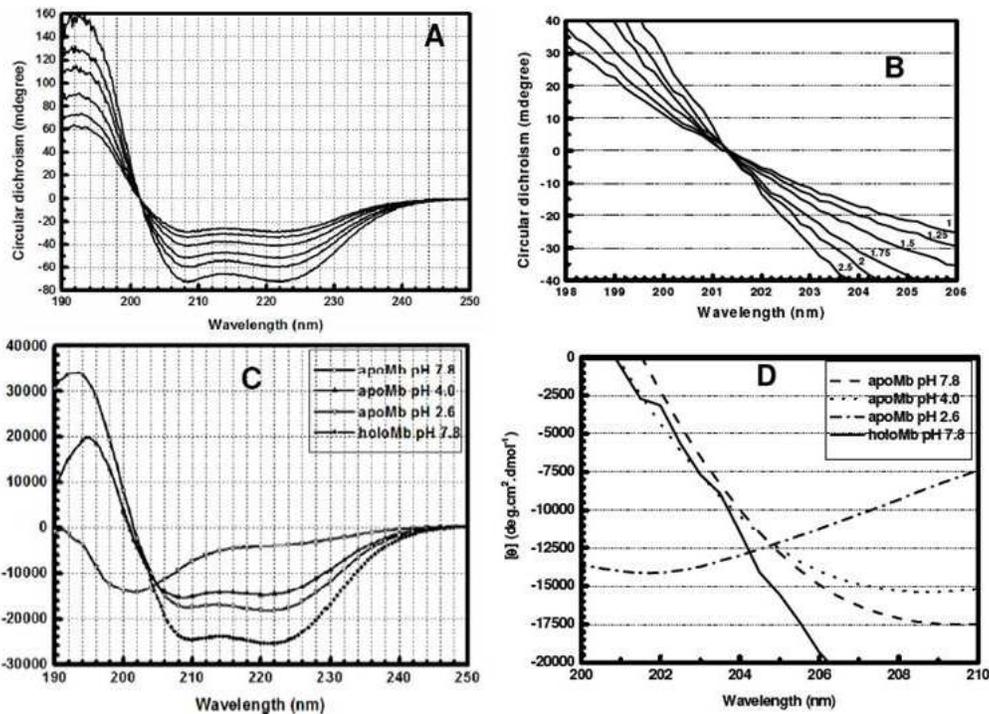
### Additives for increasing secondary structure propensity

Some additives are often used to increase the propensity of certain polypeptides to form secondary structure. They are trifluoroethanol (TFE), hexafluoroisopropanol, ethylene glycol, glycerol and others. Among these, the most widely used is TFE (Buck, 1998). Figure 3 shows the effect of increasing concentration of TFE on the  $[\theta]_{222}$  of the apo form of sperm whale myoglobin. Apomyoglobin is myoglobin without the heme group and in this form its  $[\theta]_{222}$  decreases from about -25,000 (holo form) to -19,000 deg.cm<sup>2</sup>.dmol<sup>-1</sup> (Ramos et al., 1999). It is a well studied monomeric protein with eight  $\alpha$ -helices which has been cloned and purified (Springer and Sligar, 1987; Ribeiro-Jr et al., 2003; Ribeiro-Jr and Ramos, 2004). nmR studies (Eliezer et al., 1998) showed that apomyoglobin is structurally similar to myoglobin, except for an unfolded F helix (Figure 1). The addition of TFE increases the amount of secondary structure of apoMb (Figure 3) probably by enhancing the helical conformation of helix F. Although TFE is often used at high concentrations (up to 100%) for the study of peptides (Mares-Guia et al., 2007), the same procedure is not advised for proteins. Previous results have shown that concentrations much larger than 10% affect the tertiary structure of a protein and therefore its native state. Small viscogenic cosolvents alter protein stability (Timasheff, 1993). Ramos et al. (2007) have used far- and near-UV CD to test the effect of a series of small viscogenic cosolvents on the stability and structure of apomyoglobin at pH 4.2. The solvents were sucrose, glycerol, sarcosine and trimethylamine N-oxide (TMAO) from 0.25 to 2.1 M. Firstly, the effect of increasing concentration of sucrose on the far- and near-UV spectra was analyzed showing an increase in the amount of CD signal at the whole spectrum. The effect of the viscogenic cosolvent was specific on secondary structure since no effects on tertiary structure were detected by the investigation of 1 H one-dimensional nmR spectra (Ramos et al., 2007). Secondly, the effect on stability was investigated by following the urea-induced unfolding of the protein using  $[\theta]_{208}$  to probe the conformation. Small viscogenic cosolvents increase the stability of apoMb pH 4 intermediate relative to the urea-induced unfolded form (Ramos et al., 2007). Since apomyoglobin at pH 4.2 is an intermediate, that is, a partially unfolded protein, viscogenic cosolvents can be used to stabilize protein preparations that are partially unfolded.

### Isodichroic point

The isodichroic or isobestic point is the wavelength where the molar absorptivity is the same for two (or more) protein spectra (Johnson, 1988; Woody, 1996). For any peptide that exhibits an additive or temperature-dependent multiple CD spectra with an isodichroic point at 203 nm, fractional helicity is conventionally calculated as proportional to the value of  $[\theta]_{222}$ . An isodichroic point near 203 nm in the CD spectra of peptides or proteins has been the standard test for a local two-state dichroic model that is applied to ellipticities at neighboring wavelengths. As noted by Holtzer and Holtzer (1992), for either  $\alpha$ -helical dimeric coiled coil proteins or a variety of helical peptides, a consistent ellipticity  $[\theta]_{203}$  of -13,000 to -17,000 deg.cm<sup>2</sup>.dmol<sup>-1</sup> is observed. Therefore these authors propose its use as a convenient monitor of peptide concentration.

A 203 nm isodichroic point is often taken to validate a global two-state helix-coil ellipticity model that extends to 222 nm (Gans et al., 1991; Nelson et al., 1986). However, Wallimann et al. (2003) remind us that a CD spectrum sums local ellipticity contributions, and the existence of an isodichroic point at short wavelength does not rule out contributions of local dichroic chromophores that significantly perturb ellipticity only at longer wavelengths. Therefore, sometimes a more rigorous test of the two-state model is needed (Wallimann et al., 2003).



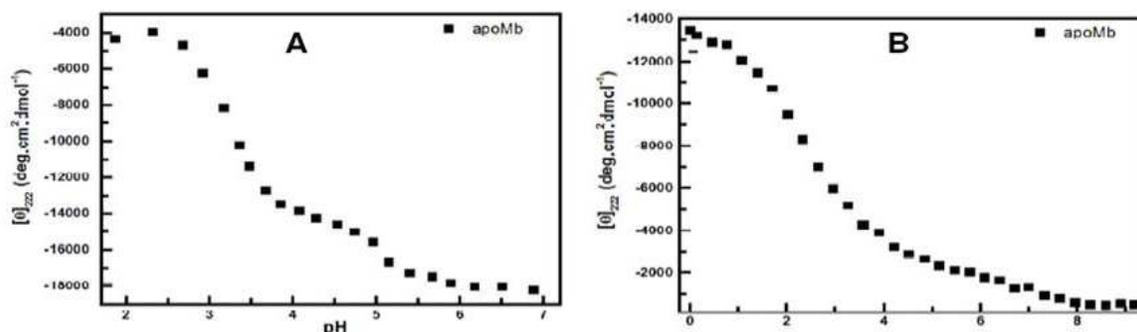
**Figure 4.** Circular dichroism spectra of apo and holo Myoglobin (Mb) as a function of concentration and pH for inspection of the isodichroic point. Circular dichroism measurements were recorded using a Jasco J-810 spectropolarimeter with 1 or 10 mm pathlength cell. Each spectrum was accumulated at least 16 times at room temperature. Dashed lines in the background are used to facilitate visualization. A and B Far-UV CD spectra of WT apoMb at concentrations of 1.00, 1.25, 1.50, 1.75, 2.00 and 2.50  $\mu\text{M}$ . The isodichroic point is at about 201.5 nm with no absorption of circularly polarized light. C and D Far-UV CD spectra of WT holoMb at pH 7.8 and apoMb at pHs 7.8, 4.0 and 2.6. The isodichroic point is at 204-205 nm with absorption of about  $-12,500 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$ . B and D are zoomed from A and C.

The isodichroic point of native myoglobin, both in the holo and in the apo forms, at several concentrations differ both in the magnitude and in the wavelength from the spectra of the same protein at conditions known to cause conformational changes. Apomyoglobin maintains a folded structure at neutral pH, forms an intermediate at pH 4.2 and is almost completely unfolded at acidic pH (Jamin, 2005). The isodichroic point for the apoMb spectra as a function of increased concentration from 1 to 2.5  $\mu\text{M}$  occurred at about 201.5 nm, with almost no absorption of circularly polarized light (about 0 millidegree) (Figure 4A and B). On the other hand, native, intermediate and acidified apoMb have an isodichroic point at about 204 - 205 nm, with considerable absorption of circularly polarized light. When apoMb lost its native structure during pH unfolding, the CD spectra showed an isodichroic point at about 205 nm with an absorption of circularly polarized light of about  $-12,500 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$  (Figure 4C and D). The same was verified for holoMb, which gained structure upon heme binding with isodichroic point at about 204 nm and  $[\theta]$  of about  $-12,500 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$  (Figure 4C and D). To sum up, for  $\alpha$ -helical proteins multiple spectra with decrease in concentration has isodichroic point at around 201 nm, with nearly no absorption of circularly polarized light. The isodichroic point for a change in secondary structure conformation occurs at a different wavelength (near 205 nm) from the isodichroic point for a decrease in concentration, and there is absorption of circularly polarized light.

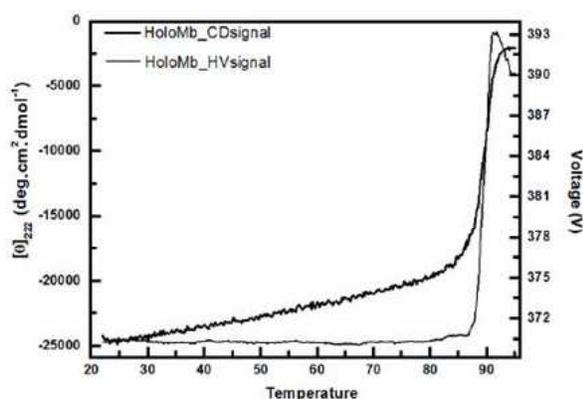
Potential applications for isodichroic analyses are:

i.) Researches working with proteins sometimes found that different preparations of the same protein have CD spectra that do not match each other. Usually the mismatch is caused by technical difficulties to measure the precise concentration of the protein. However, a correct diagnosis is crucial because spectra mismatch may be caused by modifications in the conformation of the protein and further, sometimes extensive, studies will be necessary to correct this problem. Concentration miscalculation were easily correct by using a spectroscopic method that relies on the absorbance of Trp and Tyr residues of proteins unfolded by high amount of denaturant and the mismatched CD spectra 'phenomenon' disappeared. As aforementioned the normalized spectrum depends chiefly on protein concentration.

ii.) The effect of additives and potential ligands on a protein. The addition of solutes will decrease the effective concentration of the protein and may also increase the scattering of light by the sample. In both cases it will reflect in a measured spectrum which will need correction for the effect of additives. In some cases may be difficult to differentiate concentration effect from conformational change just by looking at the shape of the spectrum. In this case analysis of the isodichroic point may help to identify if the ligand had effect on the structure. Note that the addition of heme to apoMb form holoMb and the spectra had characteristic isodichroic point of structural changes (Figure 4C and D). Isodichroic point analyses could be applied in high throughput tests where the effect of tenth or hun-



**Figure 5.** Circular dichroism spectra of apoMyoglobin (apoMb) as a function of denaturant conditions. Circular dichroism measurements were recorded using a Jasco J-810 spectropolarimeter with 10 mm pathlength cell. The signal at 222 nm was measured and each point shown is the average of at least 3 independent measurements. **A)** pH-induced equilibrium unfolding of sperm whale apoMb. **B)** urea-induced unfolding transition of sperm whale apoMb at pH 4.2.



**Figure 6.** Circular dichroism spectra of HoloMyoglobin (Mb) as a function of temperature. Circular dichroism measurements were recorded using a Jasco J-810 spec-tropolarimeter with 10 mm pathlength cell following the signal at 222 nm and the dynode voltage V as a function of temperature. A heat-induced change in the dynode voltage is originated from variations in the light scattering which depends on the particle size and thus from aggregation. The transitions indicate that the protein unfolds as verified by the decrease in CD signal and aggregates as verified by the increase in the voltage which is related to light scattering. A non-aggregated protein would have shown a constant dynode voltage throughout the whole scan.

dred of tenths or hundreds of compounds are analyzed. In this case, the protein compound spectrum that has an isodichroic point with the native protein spectrum characteristic of conformational change can be select for further analysis.

iii.) Studies on the effect of site-directed mutagenesis. A mutation can affect a particular method for calculating protein concentration generating a CD spectrum that will be different from that of wild-type even though this hypothetical mutation did not affect the native structure. The analysis of the isodichroic point will distinguish a mutation that affects protein concentration calculation from that affecting native structure (Ribeiro-Jr and Ramos, 2004).

#### Following protein thermal-induced unfolding or aggregation

Circular dichroism spectroscopy is widely used to follow the stability of a protein by increasing denaturant conditions. The most common denaturants are temperature, chemicals (usually urea and guanidinium chloride) and extremes of pH (usually acidic). As the denaturant condition increases the stability of the protein decreases and then unfolds (Ramos and Ferreira, 2005). CD is a convenient technique to follow protein unfolding because the spectra of folded and random coil are quite different (Figure 2). The unfolding transition can be easily determined by choosing a wavelength where the difference in signal for folded and unfolded protein is large. For instance,  $\alpha$ -helical proteins have a large CD signal at 222 nm in which unfolded proteins has none or little signal (Figure 2). Figure 5 shows two transitions for the unfolding of sperm whale apomyoglobin followed by CD at 222 nm, one induced by acidic pH (Figure 5A) and other induced by urea (Figure 5B). Note that the acidic-induced unfolding (Figure 5A) reveals an intermediate in the folding pathway of apomyoglobin which seems to unfold throughout a two-state like transition by urea-induced unfolding (Figure 5B).

CD can also be used to follow aggregation when heat-induced unfolding is followed (Figure 6). As discussed above the dynode voltage V (high-voltage applied to the photomultiplier of the UV detector to compensate for the reduction in the intensity light) is a result from light absorption or scattering and should be recorded for all CD measurements. For being related to scattering the recorded dynode voltage V can be used to probe the turbidity of the solution (Benjwal et al., 2006). Accordingly to the Beer-Lambert law a heat-induced change in the dynode voltage can only be originated from variations in the light scattering which depends on the particle size. Figure 6 shows the signal of CD at 222 nm and the dynode voltage V as a function of temperature. The curve profile shows that the CD signal starts to decrease at about 85°C followed by a two-state like transition. This transition indicates that the protein unfolds as verified by the decrease in CD signal and aggregates as verified by the increase in the voltage which is related to light scattering. To sum up, as the protein aggregated its size increased and more light was scattered.

#### Conclusion

In conclusion, CD spectroscopy is an important technique to study protein folding, form and function. It is probably the most important technique for the initial investigation of

purified proteins. In addition to that, CD spectroscopy can give fast and reliable information about the folded conformation and the stability of a protein with little time expending and for an affordable cost.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Research in the laboratory of CHIR is supported by grants from Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq), and NIH-R03TW007437 funded by the Fogarty International Center. DHAC holds a FAPESP fellowship.

## REFERENCES

- Balan A, Santa-Cruz, CP, Moutran A, Ferreira RCC, Medrano FJ, Pérez CA, Ramos CHI, Ferreira LCS (2006). The Molybdate-Binding Protein (ModA) of the Phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*. *Prot. Expr. Pur.* 50:215-222.
- Balan A, Souza CS, Moutran A, Ferreira RCC, Franco CS, Ramos CHI, Ferreira LCS (2005). Purification and *in vitro* characterization of the maltose-binding protein of the plant pathogen *Xanthomonas citri*. *Prot. Expr. Pur.* 43:103-110.
- Benjwal S, Verma S, Röhm KH, Gursky O (2006). Monitoring protein aggregation during thermal unfolding in circular dichroism experiments. *Protein. Sci.* 15:635-639.
- Borges, J.C., Ramos, C.H.I. (2006). Spectroscopic and thermodynamic measurements of nucleotide-induced changes in the human 70-kDa heat shock cognate protein. *Arch. Biochem. Biophys.* 452: 46-54
- Buck M (1998). Trifluoroethanol and colleagues: cosolvents come of age. Recent studies with peptides and proteins. *Q. Rev. Biophys.* 31: 297-355.
- Chen YH, Yang JT, Chau KH (1974). Determination of the helix and beta form of proteins in aqueous solution by circular dichroism. *Biochemistry.* 13:3350-3359.
- Deleage G, Geourjon C (1993). An interactive graphic program for calculating the secondary structure content of proteins from circular dichroism spectrum. *Comput. Appl. Biosci.* 2:197-199.
- Edelhoff H (1967). Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in protein. *Biochemistry.* 6:1948-1954.
- Eliez D, Yao J, Dyson HJ, Wright PE (1998). Structural and dynamic characterization of partially folded states of apomyoglobin and implications for protein folding. *Nat. Struct. Biol.* 5:148-155.
- Gans PJ, Lyu PC, Manning MC, Woody RW, Kallenbach NR (1991). The helix-coil transition in heterogeneous peptides with specific side-chain interactions: theory and comparison with CD spectral data. *Biopolymers.* 31:1605-1614.
- Gill SC, von Hippel PH (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* 182:319-326.
- Greenfield NJ (2007). Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nat. Protoc.* 1: 2876-2890.
- Greenfield NJ, Fasman GD (1969). Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry.* 8:4108-4116.
- Hilario E, da Silva SL, Ramos CHI, Bertolini MC (2004). Effects of cardiomyopathic mutations on the biochemical and biophysical properties of the human alpha-tropomyosin. *Eur. J. Biochem.* 271:4132-4140.
- Holtzer ME, Holtzer A (1992). Alpha-helix to random coil transitions: determination of peptide concentration from the CD at the isodichroic point. *Biopolymers.* 32:1675-1677.
- Jamin M (2005). The folding process of apomyoglobin. *Protein. Pept. Lett.* 12:229-234.
- Johnson WC Jr (1985). Circular dichroism and its empirical application to biopolymers. *Meth. Biochem. Anal.* 31:62-163.
- Johnson WC Jr (1988). Secondary structure of proteins through circular dichroism spectroscopy. *Annu. Rev. Biophys. Bio.* 17:145-166.
- Kelly SM, Jess TJ, Price NC (2005). How to study proteins by circular dichroism. *Biochim. Biophys. Acta.* 1751:119-139.
- Koslowski A, Sreerama N, Woody RW (2000). Theoretical Approach to Electronic Optical Activity. In Berova et al. (eds) *Circular Dichroism: Principles and Applications*, John Wiley & Sons, Inc. Publishers, New York, pp. 55-96.
- Kuwajima K (1995). Circular dichroism. *Methods. Mol. Biol.* 40:115-135.
- Mares-Guia TR, Maigret B, Martins NF, Maia ALT, Vilela L, Ramos CHI, Juliano-Neto L, Juliano MA, Mares-Guia ML, Santoro MM (2006). Molecular dynamics and circular dichroism studies of human and rat C-peptides. *J. Mol. Graph. Mol.* 25:532-542.
- Marqusee S, Baldwin RL (1987). Helix stabilization by Glu...Lys+ salt bridges in short peptides of de novo design. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84:8898-8902.
- McPhie P (2001). Circular dichroism studies on proteins in films and in solution: estimation of secondary structure by g-factor analysis. *Anal. Biochem.* 293:109-119.
- Morrisett JD, David JS, Pownall HJ, Gotto AM Jr (1973) Interaction of an apolipoprotein (apoLP-alanine) with phosphatidylcholine. *Biochemistry.* 12:1290-1299.
- Nelson JW, Kallenbach NR (1986). Stabilization of the ribonuclease S-peptide  $\alpha$ -helix by trifluoroethanol. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 1:211-217.
- Pace CN, Vajdos F, Fee L, Grimsley G, Gray T (1995). How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein. Sci.* 4:2411-2423.
- Perez-Iratxeta C, Andrade-Navarro MA (2008). K2D2: Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *BMC. Struct. Biol.* 8:25.
- Provencher SW, Glöckner J (1981). Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry.* 20:33-37.
- Ramos CHI (1999). Mapping subdomains in the C-terminal region of troponin I involved in its binding to troponin C and to thin filament. *J. Biol. Biochem.* 274:18189-18195.
- Ramos CHI (2004). A Spectroscopic-based Laboratory Course for Protein Conformational Studies. *Biochem. Mol. Biol. Edu.* 32:31-34.
- Ramos CHI, Ferreira ST (2005). Protein folding, misfolding and aggregation: evolving concepts and conformational diseases. *Protein Pept. Lett.* 12:213-222.
- Ramos CHI, Kay MS, Baldwin RL (1999). Putative interhelix ion pairs involved in the stability of myoglobin. *Biochemistry.* 38: 9783-9790.
- Ramos CHI, Weisbuch S, Jamin M (2007). Diffusive motions control the folding and unfolding kinetics of apomyoglobin pH 4 molten globule intermediate. *Biochemistry.* 46:4379-4389.
- Raussens V, Ruyschaert JM, Goormaghtigh E (2003). Protein concentration is not an absolute prerequisite for the determination of secondary structure from circular dichroism spectra: a new scaling method. *Anal. Biochem.* 319:114-121.
- Regis WCB, Fattori J, Santoro MM, Jamin M, Ramos CHI (2005). On the difference in stability between horse and sperm whale myoglobins. *Arch. Biochem. Biophys.* 436:168-177.
- Ribeiro-Jr EA, Ramos CHI (2004). Origin of the anomalous circular dichroism spectra of many apomyoglobin mutants. *Anal. Biochem.* 329:300-306.
- Ribeiro-Jr EA, Ramos CHI (2005). Circular permutation and deletion studies of myoglobin indicate that the correct position of its N-terminus is required for native stability and solubility but not for native-like heme binding and folding. *Biochemistry* 44:4699-4709.
- Ribeiro-Jr EA, Regis WCB, Tasic L, Ramos CHI (2003). Fast Purification of the Apo form and of a Non-binding Heme Mutant of Recombinant Sperm Whale Myoglobin. *Prot. Expr. Pur.* 28:202-208.
- Schellman J (1975). Circular dichroism and optical rotation. *Chem. Rev.* 75:323-331.
- Schmid FX (1997). Optical spectroscopy to characterize protein conformation and conformational changes. In Creighton. (ed) *Protein structure: a practical approach*, Oxford University Press, New York, pp. 261-297.
- Sprecher CA, Baase WA, Johnson WC Jr. (1979). Conformation and circular dichroism of DNA. *Biopolymers.* 18:1009-1019.
- Springer BA, Sligar SG (1987). High-level expression of sperm whale

- myoglobin in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. 84:8961-8965.
- Sreerama N, Woody RW (1994a). Poly(Pro)II type structure in globular proteins - Identification and CD analysis. Biochemistry. 33:10022-10025.
- Sreerama N, Woody RW (1994b). Protein secondary structure from circular dichroism spectroscopy - Combining variable selection principle and cluster analysis with neural network, ridge regression and self-consistent methods. J. Mol. Biol. 242:497-507.
- Timasheff SN (1993). The control of protein stability and association by weak interactions with water: how do solvents affect these processes? Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 22:67-97.
- Wallace BA, Janes RW (2001). Synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy of proteins: secondary structure, fold recognition and structural genomics. Curr. Opin. Chem. Biol. 5:567-571.
- Wallimann P, Kennedy RJ, Miller JS, Shalongo W, Kemp DS (2003). Dual Wavelength Parametric Test of Two-State Models for Circular Dichroism Spectra of Helical Polypeptides: Anomalous Dichroic Properties of Alanine-Rich Peptides. J. Am. Chem. Soc. 125:1203-1220.
- Whitmore L, Wallace BA (2004). DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. Nucleic Acids Res. 32:W668-W673.
- Whitmore L, Wallace BA (2008). Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. Biopolymers. 89:392-400.
- Woody RW, (1995). Circular dichroism. Method. Enzymol. 246:34-71.
- Woody, RW (1996). Theory of Circular dichroism of Proteins. In Fasman GD (ed) Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules, Plenum Press Publisher, New York, pp. 25-30.
- Woody RW, Koslowski A (2002). Recent developments in the electronic spectroscopy of amides and alpha-helical polypeptides. Biophys. Chem. 101-102:535-551.

## Insights on the Structure of Amyloid Fibrils from Site-Directed Mutagenesis

Daniel Henrique do Amaral Corrêa<sup>a,b</sup> and Carlos Henrique Inácio Ramos<sup>a,c,\*</sup>

<sup>a</sup>Institute of Chemistry and <sup>b</sup>Institute of Biology, University of Campinas-UNICAMP. P.O. Box 6154, 13083-970, Campinas, SP, Brazil; <sup>c</sup>Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Biologia Estrutural e Bioimagem, Brazil

**Abstract:** To test the hypothesis that the ability to form ordered  $\beta$ -rich amyloid fibers with identical structures is a generic property of proteins we present a study on the overall structures of fibers formed by apomyoglobin mutants that either stabilize or destabilize the native state or the intermediate. Our results indicate that, at least at the macroscopic level, ordered  $\beta$ -rich amyloid fibers have similar structures.

**Keywords:** Amyloid fibrils, protein folding, site-directed mutagenesis, intermediate, apomyoglobin.

**# Author Profile:** Carlos Ramos has completed B.Sc. in Biology from Federal University of Minas Gerais. Ph.D. in Biochemistry at the University of São Paulo. Post-Doctoral as a PEW Latin American Fellow at Stanford-USA. Visiting Professor at Université Joseph Fourier-France. Associate Investigator at Brazilian Synchrotron Laboratory. Associate Professor of Biochemistry at University of Campinas since 2007.



### 1. INTRODUCTION

A newly synthesized protein needs to fold into the correct three-dimensional structure that is essential for its function, thus the understanding of how the information contained in the amino acid sequence encodes the structure is a major goal in science [1]. As a matter of fact, failure to reach or maintain the correct folded structure can have serious consequences as this can lead to aggregation, which is often associated with the assembly of the misfolded protein into fibrillar aggregates commonly known as amyloid fibrils [1-3]. Amyloid fibrils are associated with more than 40 pathological disorders in humans, including Alzheimer's disease, type II diabetes, Parkinson's disease, and others [3-5].

Amyloid aggregate formation is not restricted to proteins associated with amyloid diseases, and many proteins are capable of aggregating into fibrils *in vitro* under special environmental conditions [6]. Amyloids are polypeptide aggregates that contain rigid, unbranched, straight fibrils of varying length, a diameter of 60-120 Å, and consisting of 2-6 protofilaments linked through a continuous cross- $\beta$  structure in which  $\beta$ -strands of the stacked  $\beta$ -sheets of each protofilament are perpendicularly aligned to the axis of the fibril [7-9]. Studies with circular dichroism (CD) and FT-IR spectroscopy have observed this high degree of  $\beta$ -structure, a clear hallmark of amyloid structure. Another probe for the regular  $\beta$ -sheet structure of amyloid fibrils is the fluorescence of the dyes Congo red or thioflavin T that is induced upon binding of amyloids [2]. In addition to these structural probes, cytotoxicity is another hallmark of fibrillar aggregates [1,2].

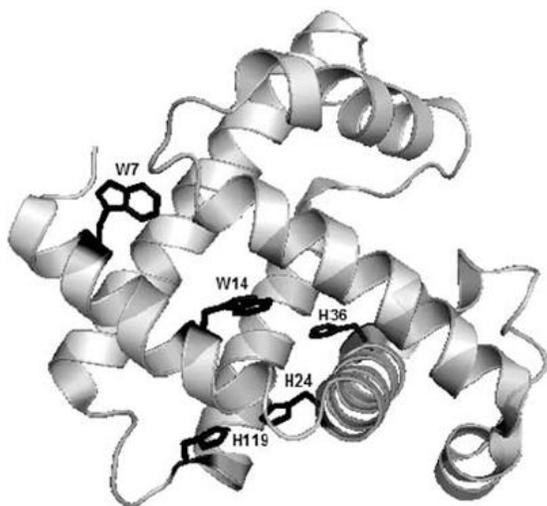
The ability of polypeptide chains to form amyloid structure is not restricted to proteins associated with recognized clinical disorders, but seems to be a generic feature of polypeptide chains [10]. Many other proteins and peptides can form fibrils *in vitro*, including well-characterized molecules such as myoglobin [11,12]. Since the stabilization of fibrillar structures involves the polypeptide backbone, it is possible that ordered  $\beta$ -rich amyloid fibers have identical structures [13]. Therefore, it is important to gather information on the structures of diverse amyloid fibers to test the aforementioned hypothesis. Sperm whale apomyoglobin (apoMb, Fig. (1)) is a well-characterized protein that forms an intermediate after either unfolding from the native state or dilution of the unfolded protein in a folding buffer [14]. Here we used apoMb to explore the overall structure of amyloid aggregates by asking whether different apoMb mutants would have different fibrillar structures. Our results show that the overall structures of amyloid fibrils from mutants that either stabilize or destabilize the native state or the intermediate were indistinguishable from the wild-type as measured by circular dichroism and thioflavin T fluorescence spectroscopy, X-ray diffraction and cytotoxicity assays. Our results indicate that, at least at the macroscopic level, ordered  $\beta$ -rich amyloid fibrils have similar structures.

### 2. MATERIALS AND METHODS

#### 2.1. Protein Preparation

The procedures for site-directed mutagenesis of Sperm whale (SW) apomyoglobin (apoMb) were performed as described previously [15-17]. Briefly, the SW Mb cDNA containing the double mutation W7F-W14F was created by PCR using a forward primer that replaced the Trp07 and Trp14 codons with Phe codons, and a wild-type (WT) reverse

\*Address correspondence to this author at the Institute of Chemistry, University of Campinas-UNICAMP. P.O. Box 6154, 13083-970, Campinas, SP, Brazil and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Biologia Estrutural e Bioimagem, Brazil; Tel: 55-19-3521-3144; Fax: 55-19-3521-3023; E-mail: cramos@iqm.unicamp.br



**Figure 1.** Three-dimensional structure of sperm whale myoglobin. Myoglobin is an all  $\alpha$ -helical protein involved in oxygen transport. It has eight  $\alpha$ -helices named A to H. The helices are shown as cartoons. Residues that were mutated in this work are shown as sticks (residues 7, 14, 24, 36, and 119). The figure was created using the software Pymol (Delano Scientific LLC) and the PDB myoglobin structure (2JHO).

primer. The PCR product was then double-digested with *NdeI* and *SalI* and cloned into the pT7 vector as previously described [17]. The resulting product was confirmed by DNA sequencing. The H36Q and H24V/H119F mutants are described elsewhere [18]. Expression and purification of SW Mb in the apo form were performed as previously described [17] followed by a chromatographic step for removal of nucleic acid contamination to certify that  $A_{280/260}$  ratio  $>1.55$  [19]. The purity of the proteins was evaluated by SDS-PAGE, and apoMb concentration was determined spectrophotometrically [20]. Amyloid fibrils were obtained by dissolving 30  $\mu$ M apoMb in 50 mM sodium borate, pH 9.0 and incubating at 65°C in a Boekel analog dry bath incubator model 112002 (Boekel Scientific, Feasterville, PA, USA), conditions that destabilize the native fold substantially, resulting in the formation of fibrillar structures [11].

## 2.2. Circular Dichroism

Circular dichroism (CD) measurements were carried out using a Jasco J-810 spectropolarimeter (Jasco, Easton, MD, USA) equipped with a thermoelectric sample temperature controller (Peltier system) [21]. CD spectra were collected with 1–4  $\mu$ M protein in 1 cm path length cells at 4 °C. Scans were recorded from 200–260 nm with a resolution of 1 nm, scan speed of 20 nm/min, bandwidth of 1 nm, and 1-s integration time. Each spectrum was averaged over 32 scans and the results were expressed as mean residue ellipticity [ $\theta$ ] in units of degree.cm<sup>2</sup>.dmol<sup>-1</sup> [21]. CD spectra were analyzed with the CDNN software (using the complex spectrum database).

## 2.3. Urea and Acid-Induced Unfolding

Urea solutions were prepared fresh and filtered, and the concentration of urea was measured by refractive index as

previously described [22]. Urea-induced unfolding was studied at two different conditions to analyze the stability of native apoMb (10 mM Hepes, pH 7.8) and its intermediate (4 mM sodium citrate pH 4.2). The acid-induced unfolding was studied using a 2 mM sodium citrate buffer. The transitions were followed at 4°C using CD at 222 nm, with 15 min equilibration of samples prior to measurements. Urea-induced unfolding transitions at pH 7.8 were plotted as change of signal, and at pH 4.2 were first fit to a two-state equation as previously described [23], and afterwards plotted as fraction folded. Protein stability was analyzed by  $\Delta C_m$ , the denaturant concentration at the midpoint of the transition, or  $pH_{1/2}$ , the pH at the midpoint of the transition.

## 2.4. X-Ray Fiber Diffraction

Diffraction data were collected at the D03B-MX1 LNLS beamline, Campinas, Brazil, at 1.42 Å [24,25] with a sample to detector (MAR345) distance of 100 mm and diffraction image acquisition in fixed-angle mode for 5 min. Amyloid fibrils were induced for 15 days as described above and dialyzed extensively in double-distilled water afterwards. Samples were pelleted at 15,000 x g for 20 min at room temperature, and dried in a stove at 37°C overnight. After drying, the sample, a thin layer of gel-like fibers, was glued in the tip of an appropriate capillary.

## 2.5. Thioflavin T Fluorescence

Thioflavin T (ThT) emission fluorescence was measured using a Multifrequency Cross-Correlation and Modulation Fluorometer K2™ - ISS (ISS, Champaign, IL, USA) at room temperature. Typically, 5  $\mu$ M protein aliquots were incubated under the amyloid fibril induction conditions described above and mixed with ThT to a final ThT/protein molar ratio of 5:1. Samples, 300  $\mu$ L, were collected in a 10 x 2 mm cuvette cell and excited at 450 nm, and the emission spectrum was collected from 460 to 600 nm. The fluorescence emission of ThT under the conditions described above in the presence of native WT apoMb was used as the blank.

## 2.6. Cytotoxicity

The toxicity of the amyloid fibrils was tested using murine neuroblastoma (N2A) cells, a kind gift from Prof. Sérgio Ferreira (Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil), which were grown in 25-cm<sup>2</sup> cell culture flasks (Corning Inc., Corning, NY, USA) as monolayers in complete DMEM medium supplemented with 100  $\mu$ g/mL streptomycin and 100 U/mL of penicillin in a humidified incubator with 5% CO<sub>2</sub> in air at 37 °C. Cells were plated at a density of 1 × 10<sup>3</sup> cells/well in 96-well plates, and 24 hours after cell seeding semiconfluent cultures were exposed to samples of either native-like or mature fibril forms at a final concentration of 1 mg/mL of protein (in Tris-HCl 25 mM, pH 7.5, 100  $\mu$ g/mL streptomycin, 100 U/mL of penicillin and 1  $\mu$ g/mL of fungizone; previously subjected to UV light for 5 min) in each well. After 24 h, the MTT reduction activity was determined [26] as follows. Medium was removed and replaced with 100  $\mu$ L/well of fresh medium followed by addition to each well of 10  $\mu$ L of 12 mM MTT stock solution prepared in phosphate buffer saline (PBS). The culture was incubated for 4 h in a humidified incubator with 5% CO<sub>2</sub> in air at 37

°C. After incubation, 100  $\mu$ L of SDS-HCl solution (20% - 0.01 M) was added to each well, mixed thoroughly using a pipette and incubated again overnight in a humidified incubator with 5% CO<sub>2</sub> in air at 37 °C. After overnight incubation, the culture was remixed using a pipette and the absorbance at 570 nm was measured in a SpectraMax 190 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) microplate reader.

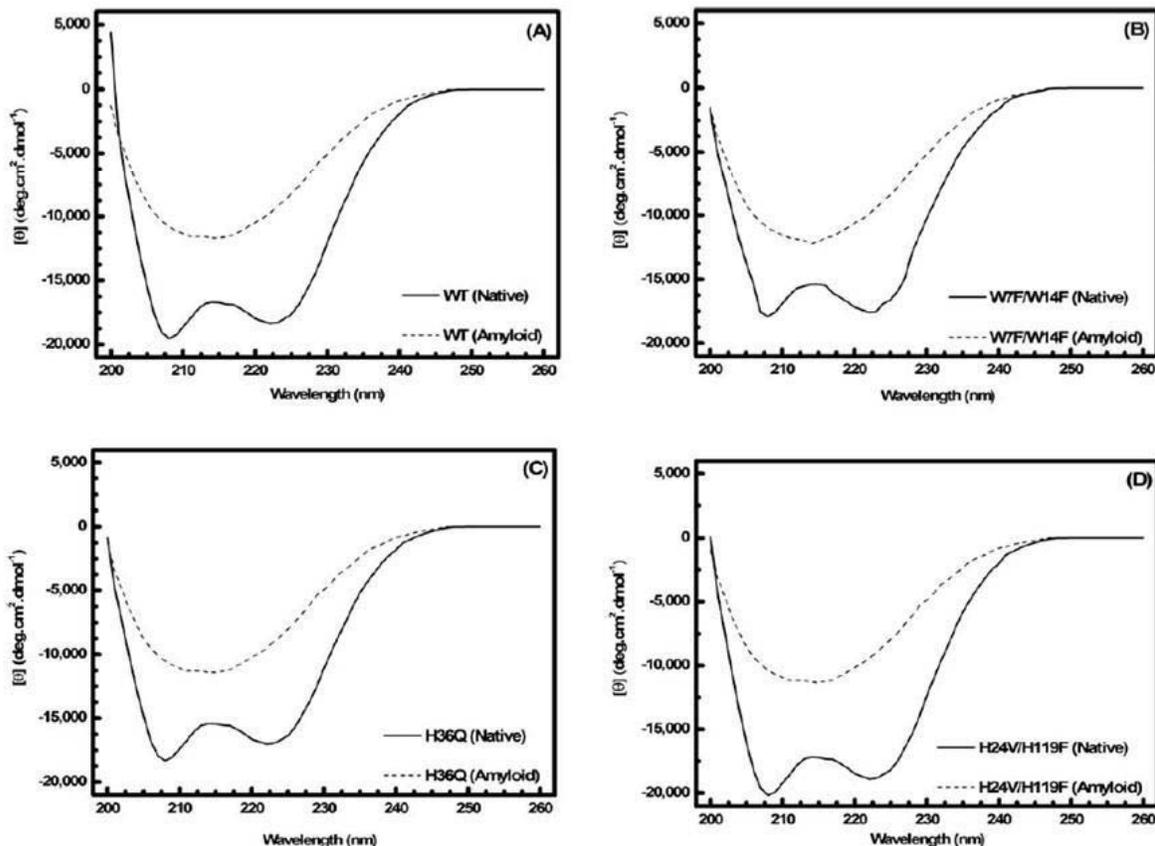
### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1. Stability of Wild-Type and Mutants

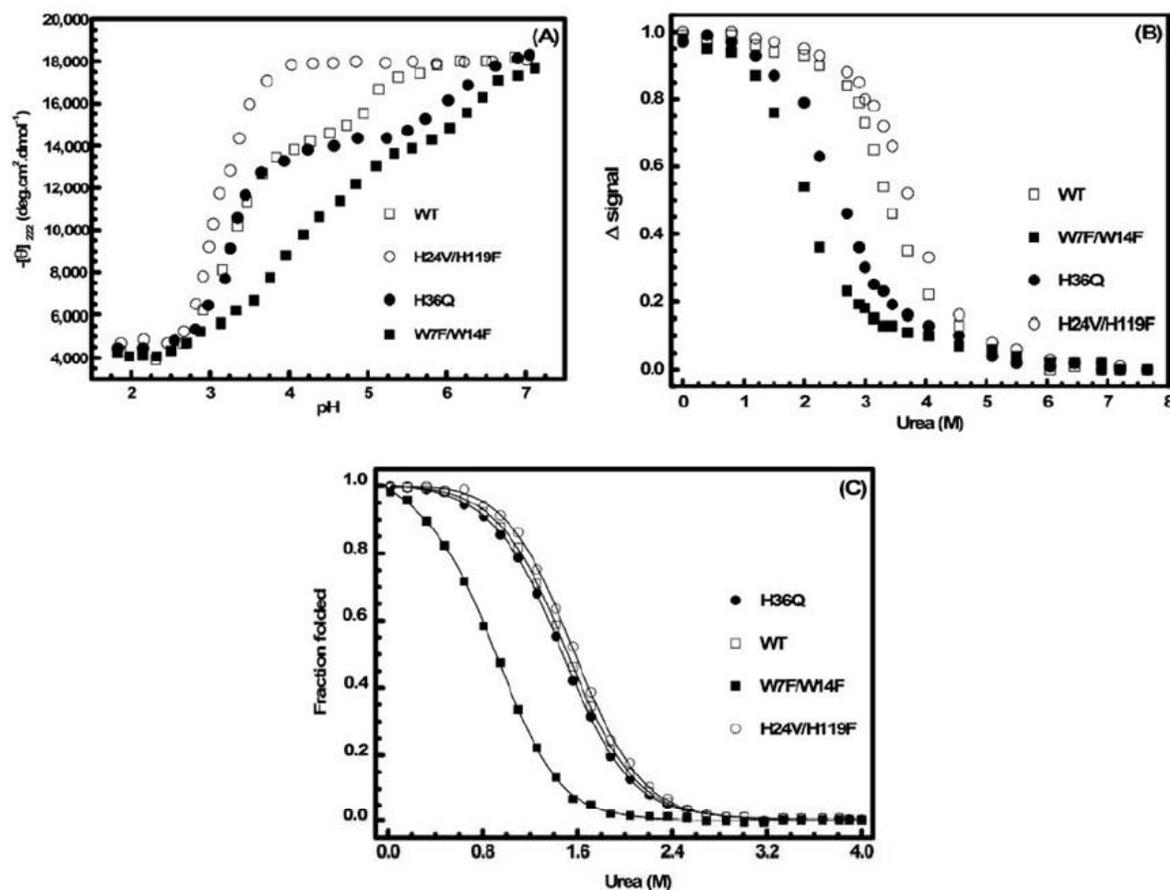
Myoglobin (Mb) is a soluble, globular heme binding protein, with approximately 75% of the main chain in an  $\alpha$ -helical conformation [27]. It is an archetype of the globin family that upon heme loss remains soluble and retains structure characteristic of the native protein; this product is referred to as apoMb. Wild-type (WT) and mutant apoMbs were purified (data not shown) and correctly folded as suggested by their CD spectra under native conditions (Fig. (2)), continuous lines). Apparently, the mutations studied here did not affect the structure of the protein. The CD signal at 222 nm was  $18,300 \pm 500$  deg.cm<sup>2</sup>.dmol<sup>-1</sup> and the secondary structure content was  $64 \pm 4\%$   $\alpha$ -helix for the WT and mu-

tant proteins under native conditions (Fig. (2)). Additionally, the mutations did not affect the function of apoMb as described previously [16,18,28].

Although the mutations caused no apparent change in protein structure they had large effects on the stability. The stabilities of WT, W7F/W14F, H36Q and H24V/H119F apoMbs were measured by acid-induced unfolding (Fig. (3A)) and urea-induced unfolding at pH 7.8 (Fig. (3B)) and 4.2 (Fig. (3C)). The values of the  $\Delta$ pH<sub>1/2</sub> and  $\Delta$ C<sub>m</sub>, the pH and the denaturant concentration at the midpoint of the transition minus that of the WT, are shown in Table 1. Under mildly acidic conditions, apoMb forms an intermediate in which the N- and C-terminal helices, namely A, B, G, and H are partially folded [14]. WT apoMb started to unfold at pH 5.6, remained partially folded at pH 4 and was unfolded by acid below pH 4.2 (Fig. (3A)). Native WT apoMb at pH 7.8, a condition in which the protein does not follow a two-state transition [16], was unfolded by urea with a C<sub>m</sub> (midpoint of the transition) of 3.4 M (Fig. (3B)) and the intermediate was unfolded by urea with a C<sub>m</sub> (urea concentration in which 50% of the molecules are unfolded) of 1.5 M (Fig. (3C)). Compared to the WT, the mutants were affected as follows



**Figure 2.** Far-UV circular dichroism spectra. Native apoMbs before (continuous lines) and after (dashed lines) treatment for 15 days to form amyloid aggregates. Upper left (WT), upper right (W7F/W14F), bottom left (H36Q), and bottom right (H24V/H119F). Protein concentration was 3  $\mu$ M. CD measurements were recorded at 4°C in 10 mM sodium phosphate, pH 6.5. CD spectra of mutants under either native or amyloidogenic conditions were indistinguishable from WT. For all proteins, secondary structure content was the same within error:  $64 \pm 4\%$   $\alpha$ -helix under native conditions and  $43 \pm 3\%$   $\beta$ -sheet under amyloidogenic conditions.



**Figure 3. Stability of WT and apoMb mutants.** The stabilities of WT (open squares), W7F/W14F (filled squares), H36Q (filled circles), and H24V/H119F (open circles), 2  $\mu$ M each, were measured at 4°C. A) Acid-induced unfolding. Mean residue ellipticity at 222 nm,  $[\theta]_{222}$ , as a function of pH titration. Buffer: 2 mM sodium acetate. B) Urea-induced unfolding at pH 7.8. Buffer: 10 mM HEPES, pH 7.8. Data are presented as changes in signal. C) Urea-induced unfolding at pH 4.2. Buffer: 4 mM sodium citrate, pH 4.2. Data are scaled as fraction folded and continuous lines through the data are the least-squares fits to a two-state model (see Material and Methods).

**Table 1. Urea - (pH 7.8 and 4.2) - and Acid-Induced Unfolding of Apomyoglobin Mutants.** The stability of WT and mutants are shown as  $\Delta$ pH<sub>1/2</sub> and  $\Delta$ C<sub>m</sub>, the pH and the denaturant concentration, respectively, at the midpoint of the transition minus that of the WT.  $\Delta\Delta G_{\text{unf}}$  (only applicable for experiments at pH 4.2 since unfolding at pH 7.8 does not follow a two-state transition [16]) was calculated considering a *m*-value for of -1.6 kcal/mol.M [16]. Errors are  $\pm$  0.1.

Apomyoglobin	$\Delta C_m$ (molar urea)		$\Delta\Delta G_{\text{unf}}$ (kcal/mol)	$\Delta$ pH <sub>1/2</sub>	
	pH 7.8	pH 4.2	pH 4.2	N $\rightleftharpoons$ I	I $\rightleftharpoons$ U
WT*	0.0 (3.4)	0.0 (1.5)	0.0 (-5.4)	0.0	0.0
W7F/W14F	-1.2	-0.6	-1.9	+1.2	+1.1
H24V/H119F**	+0.3	+0.1	+0.5	-	-
H36Q	-0.7	-0.1	-1.1	+0.9	-0.1

\*Raw values are in parenthesis; \*\*No intermediate is populated

(see Table 1): native H24V/H119F was more stable than the WT and its intermediate was poorly populated; native H36Q was less stable than the WT and its intermediate had similar stability than that of the WT; and both native and intermedi-

ate W7F/W14F were less stable than the WT. In the double mutant H24V/H119F, two polar side-chains from the hydrophobic core were replaced by the hydrophobic side-chains of valine and phenylalanine, which have about the same vol-

ume, strongly stabilizing the protein against acid-unfolding [18]. Residue H36 stabilizes the folded state by packing its side-chain against the side-chain of D38 and F106, forming a salt bridge with the first. Therefore, the H36Q mutation probably eliminates two potentially stabilizing interactions in native apoMb favoring the formation of the intermediate even near neutral pH [18]. In the case of double mutant W7F/W14F, the two tryptophans are involved in forming favorable, specific tertiary interactions in the native apomyoglobin structure, and their replacement decreases the stability of native apoMb by disrupting both the stability of helix A and its favorable packing with helix G [28].

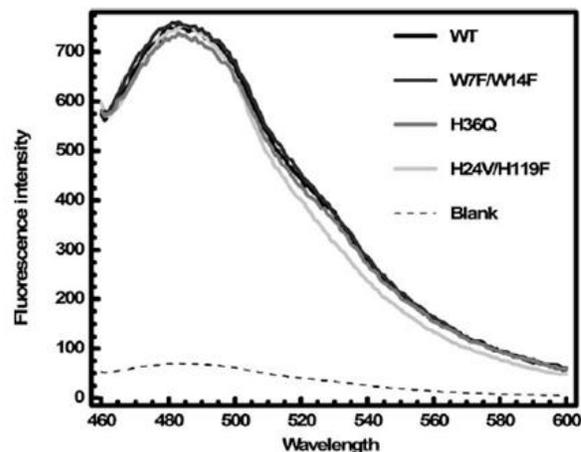
### 3.2. Fibrillar Structures

It is generally accepted that a folded protein needs to unfold, at least partially, to form aggregates [29]. Since apoMb is a model protein for partially folded intermediate in its folding/unfolding pathway we asked whether mutants that affect this intermediate could interfere with the overall structure of amyloid aggregates. As described above, the mutants either stabilized or destabilized the native state and stabilized or destabilized the intermediate. Myoglobin is a highly soluble protein whose native state properties do not suggest a predisposition to form amyloid fibrils, corroborated by its amino acid sequence organization in well-defined  $\alpha$ -helices with no  $\beta$ -sheet elements. However, even Mb form amyloid fibrils under certain conditions, suggesting that the ability to form fibrils is a common feature of all proteins [11].

The amyloidogenic state of the apoMb mutants was tested by incubation under conditions in which the formation of amyloids was facilitated [11]. After 15 days in these conditions the proteins were tested for amyloid features. The CD spectra of the proteins had the shape expected for  $\beta$ -sheet proteins (Fig. (2), dashed line). The signal at 216 nm was  $11,500 \pm 300 \text{ deg.cm}^{-1}.\text{dmol}^{-1}$  and the predicted secondary structure showed  $43 \pm 3\%$   $\beta$ -sheets for all proteins (Fig. (2)). CD spectra showed a high degree of  $\beta$ -structure, and this result was confirmed by investigating the binding of the dye molecule thioflavin T (ThT) by fluorescence emission (Fig. (4)). ThT fluorescence is a classical test for amyloids, although the mechanism of fluorescence enhancement is not well known. In agreement with the results from CD measurements (Fig. (2)), fibrils formed by the WT and mutant proteins had indistinguishable ThT binding (Fig. (4)), further suggesting similar overall fiber structures.

A reliable demonstration of fibril-like structure is provided by X-ray fiber diffraction data that report directly on the molecular structure. Amyloid fibrils have two characteristic signals of a cross- $\beta$  diffraction pattern [30]. The first signal is a sharp reflection at 4.7 Å along the same direction as the fiber, which has also been visualized by cryo-electron-micrography. The other signal is a diffuse reflection between 9.5 and 11 Å perpendicular to the fiber direction, which corresponds to the inter-sheet distance. Amyloidogenic apoMbs showed an X-ray diffraction pattern characteristic of fibrils with a sharp maximum in the X-ray scattering intensity in the direction of alignment (meridional direction) at a scattering angle that corresponded to a characteristic spacing of 4.7-4.8 Å and a broader maximum perpendicular to the direction of alignment (equatorial direction) at a scattering

angle that corresponded to a characteristic spacing of 8-10 Å (Fig. (5)). Consistent with the CD and ThT spectroscopy observations, the X-ray fiber diffraction showed that the WT and mutants fibrils had the same overall structure.



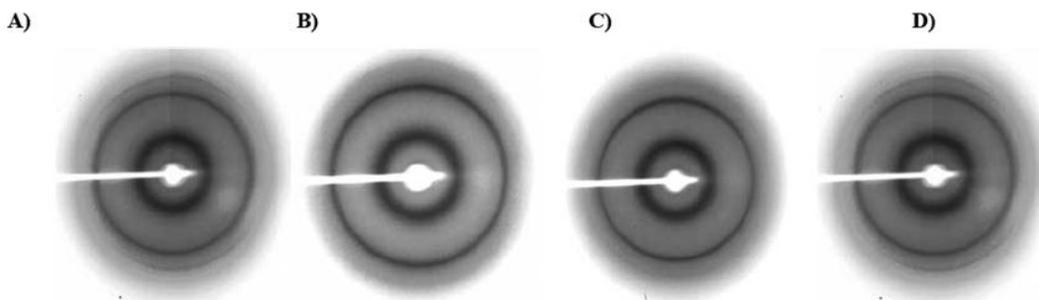
**Figure 4.** Emission spectra of Thioflavin T in the presence of amyloid fibrils. Proteins were incubated for 15 days under conditions that favored amyloid formation and were used at a concentration of 5  $\mu\text{M}$  with a ThT/protein molar ratio of 5:1. ThT excitation was at 450 nm and emission was followed from 460-600 nm. The emitted fluorescence of ThT under the conditions described above in the presence of native WT apoMb was used as a control.

### 3.3. Cytotoxicity

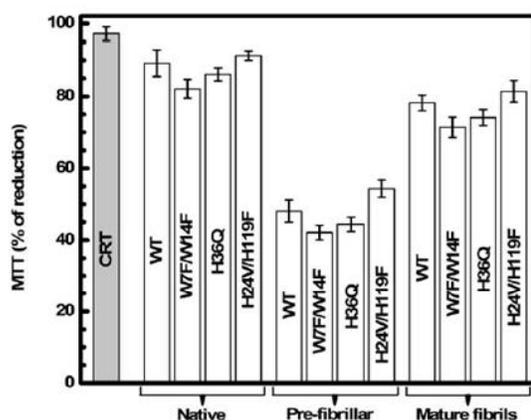
Amyloid deposits were found to be associated with disease, and their cytotoxic effects have been widely studied [31]. Therefore, we investigated the cytotoxicity of the mature fibrils produced in these experimental conditions and observed that WT and mutant apoMbs formed fibrillar structures that were similar to that of disease-related amyloid fibrils. ApoMb fibrils were capable of decreasing the viability of N2A cells by about 10% (Fig. (6)), an effect similar to that of other mature fibrils [31]. Pre-fibrillar aggregates are usually more cytotoxic than mature fibrils [1,3] and apoMb pre-fibril species reduced the viability of N2A cells by about 50% (Fig. (6)). Moreover, cells incubated with either WT or mutant mature fibrils or pre-aggregates presented similar loss of viability (Fig. (6)). It is noteworthy that the W7F/W14F mutation causes amyloid formation in a His-tagged cloned apoMb even at physiological pH [28], but the mature amyloid fibril had an overall structure and cytotoxicity similar to that of WT. Once more our results suggest a high degree of similarity among the amyloid fibers, demonstrating that the overall structures of mature fibers are independent of the site-directed mutations made.

## 4. CONCLUSIONS

The general amyloid hypothesis essentially states that the ability of proteins to form ordered, fibrillar, cross- $\beta$  structures is an intrinsic feature of the protein backbone and is independent of the structure of the native state [2]. Therefore, it is likely that ordered,  $\beta$ -rich amyloid fibers have identical structures. To test this hypothesis it is important to



**Figure 5. Amyloid fibril X-ray diffraction.** X-ray diffraction patterns for WT apoMb and mutants. Upper left (WT), upper right (W7F/W14F), bottom left (H36Q), and bottom right (H24V/H119F). The protein diffraction patterns had two clearly discernible diffraction rings in the meridional direction with a main chain spacing of  $4.57 \pm 0.07$  Å (greater thin ring) and in the equatorial direction with a side-chain spacing of  $9.63 \pm 0.48$  Å (minor thicker ring).



**Figure 6. Effect of apomyoglobin amyloid mature fibrils on N2A cell viability measured by the MTT assay.** N2A cells were incubated for 24 h with native apomyoglobins (left), pre-fibrillar aggregates (center) and mature fibrils (right). Data are expressed as the average percentage of MTT reduction  $\pm$  S.D. relative to cells treated with medium alone from pentaplicate wells from three separate experiments. Protein concentration was 1 mg/mL. CTR, control cell culture; Native, cell cultures exposed to native proteins; Pre-fibrillar, cell cultures exposed to pre-fibrillar aggregates; Mature fibrils, cell cultures exposed to mature fibrils.

study the structure of amyloids formed by different proteins and different mutants of the same protein. Since there is also the hypothesis that a folded protein needs to unfold, at least partially, to form aggregates [29] we decided to study mutants that either stabilize or destabilize the native state or the intermediate of apoMb, a model protein for the presence of intermediates in the folding and unfolding pathways.

In summary, our results showed that: 1) WT and mutant apoMbs form mature amyloid fibrils with properties similar to that of proteins related to amyloidogenic diseases. 2) The fibrils formed had indistinguishable overall structures, supporting the hypothesis that, at least for site-directed mutations, ordered,  $\beta$ -rich amyloid fibers have identical structures. 3) Mutations that facilitate or inhibit the partial unfold-

ing of a protein do not affect the final structure of the amyloid fiber formed. This investigation was dedicated to the study of mature fibrils, but it is also possible that the pre-amyloid states of the WT and mutant proteins are structurally distinct or that the processes of amyloid formation differ from each other.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

Research in the laboratory of CHIR is supported by grants from Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq), and NIH-R03TW007437 funded by the Fogarty International Center. DHAC holds a FAPESP fellowship.

#### REFERENCES

- [1] Ramos, C.H.I.; Ferreira, S.T. Protein folding, misfolding and aggregation: evolving concepts and conformational diseases. *Protein Pept. Lett.*, 2005, 12(3), 213-222.
- [2] Dobson, C.M. Experimental investigation of protein folding and misfolding. *Methods*, 2004, 34(1), 4-14.
- [3] Chiti, F.; Dobson, C.M. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu. Rev. Biochem.*, 2006, 75, 333-366.
- [4] Merlini, G.; Bellotti, V. Molecular mechanisms of amyloidosis. *N. Engl. J. Med.*, 2003, 349(6), 583-596.
- [5] Zerovnik, E. Amyloid-fibril formation. Proposed mechanisms and relevance to conformational disease. *Eur. J. Biochem.*, 2002, 269(14), 3362-3371.
- [6] Fändrich, M.; Dobson, C.M. The behaviour of polyamino acids reveals an inverse side chain effect in amyloid structure formation. *EMBO J.*, 2002, 21(21), 5682-5690.
- [7] Serpell, L.C.; Fraser, P.E.; Sunde, M. X-ray fiber diffraction of amyloid fibrils. *Methods. Enzymol.*, 1999, 309, 526-536.
- [8] Sunde, M.; Blake, C.C.F. The structure of amyloid fibrils by electron microscopy and X-ray diffraction. *Adv. Protein Chem.*, 1997, 50, 123-159.
- [9] Tycko, R. Molecular structure of amyloid fibrils: insights from solid-state NMR. *Q. Rev. Biophys.*, 2006, 39(1), 1-55.
- [10] Dobson, C.M. The structural basis of protein folding and its links with human disease. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 2001, 356(1406), 133-145.
- [11] Fändrich, M.; Fletcher, M.A.; Dobson, C.M. Amyloid fibrils from muscle myoglobin. *Nature*, 2001, 410(6825), 165-166.
- [12] Sirangelo, I.; Malmo, C.; Casillo, M.; Mezzogiorno, A.; Papa, M.; Irace, G. Tryptophanyl substitutions in apomyoglobin determine protein aggregation and amyloid-like fibril formation at physiological pH. *J. Biol. Chem.*, 2002, 277(48), 45887-45891.

- [13] Rousseau, F.; Schymkowitz, J.; Serrano, L. Protein aggregation and amyloidosis: confusion of the kinds. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2006**, *16*(1), 118-126.
- [14] Jamin, M. The folding process of apomyoglobin. *Protein Pept. Lett.*, **2005**, *12*(3), 229-234.
- [15] Springer, B.A.; Sligar, S.G. High-level expression of sperm whale myoglobin in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1987**, *84*(24), 8961-8965.
- [16] Ramos, C.H.I.; Kay, M.S.; Baldwin, R.L. Putative interhelix ion pairs involved in the stability of myoglobin. *Biochemistry*, **1999**, *38*(30), 9783-9790.
- [17] Ribeiro, E.A.; Regis, W.C.B.; Tasic, L.; Ramos, C.H.I. Fast purification of the Apo form and of a non-binding heme mutant of recombinant sperm whale myoglobin. *Protein Expr. Purif.*, **2003**, *28*(1), 202-208.
- [18] Barrick, D.; Hughson, F.M.; Baldwin, R.L. Molecular mechanisms of acid denaturation. The role of histidine residues in the partial unfolding of apomyoglobin. *J. Mol. Biol.*, **1994**, *237*(5), 588-601.
- [19] Ribeiro-Jr, E.A.; Ramos, C.H.I. Origin of the anomalous circular dichroism spectra of many apomyoglobin mutants. *Anal. Biochem.*, **2004**, *329*(2), 300-306.
- [20] Ramos, C.H.I. A Spectroscopic-based Laboratory Course for Protein. Conformational Studies. *Biochem. Mol. Biol. Edu.*, **2004**, *32*, 31-34.
- [21] Corrêa, D.H.A.; Ramos, C.H.I. The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. *African. J. Biochem. Res.*, **2009**, *3*(5), 164-173.
- [22] Pace, C.N. Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Methods. Enzymol.*, **1986**, *131*, 266-280.
- [23] Santoro, M.M.; Bolen, D.W. Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 1. Unfolding of phenylmethanesulfonyl alpha-chymotrypsin using different denaturants. *Biochemistry*, **1988**, *27*(21), 8063-8068.
- [24] Polikarpov, I.; Oliva, G.; Castellano, E.E.; Garratt, R.C.; Arruda, P.; Leite, A.; Craievich, A. The Protein Crystallography Beamline At LNLS, The Brazilian Synchrotron Light Source. *Nucl. Instrum. Meth. A.*, **1998**, *405*(1), 159-164.
- [25] Polikarpov, I.; Perles, L.A.; de Oliveira, R.T.; Oliva, G.; Castellano, E.E.; Garratt, R.C.; Arruda, P.; Leite, A.; Craievich, A. Set-up and Experimental Parameters of the Protein Crystallography Beamline at the Brazilian National Synchrotron Laboratory. *J. Synchrotron. Radiat.*, **1998**, *5*(2), 72-76.
- [26] Hansen, M.B.; Nielsen, S.E.; Berg, K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J. Immunol. Methods.*, **1989**, *119*(2), 203-210.
- [27] Takano, T. Structure of myoglobin refined at 2.0 Å resolution: I. Crystallographic refinement of metmyoglobin from sperm whale. *J. Mol. Biol.*, **1977**, *110*(3), 537-568.
- [28] Sirangelo, I.; Malmö, C.; Casillo, M.; Irace, G. Resolution of tryptophan-ANS fluorescence energy transfer in apomyoglobin by site-directed mutagenesis. *Photochem. Photobiol.*, **2002**, *76*(4), 381-384.
- [29] Kelly, J.W. The alternative conformations of amyloidogenic proteins and their multi-step assembly pathways. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **1998**, *8*(1), 101-106.
- [30] Makin, O.S.; Serpell, L.C. X-ray diffraction studies of amyloid structure. *Methods. Mol. Biol.*, **2005**, *299*, 67-80.
- [31] Qahwash, I.; Weiland, K.L.; Lu, Y.; Saever, R.W.; Kletzien, R.F.; Yan, R. Identification of a mutant amyloid peptide that predominantly forms neurotoxic protofibrillar aggregates. *J. Biol. Chem.*, **2003**, *278*(25), 23187-23195.

Received: June 24, 2009

Revised: August 04, 2009

Accepted: August 25, 2009