



DESIGN DE PEPTÍDEOS MODULADORES DA INTERAÇÃO DE 4TLT DE AMILOIDOSE SISTÊMICA

ÉRICA APARECIDA BATISTA

RESUMO

A amiloidose sistêmica é uma doença rara e progressiva causada pelo acúmulo anormal de proteínas denominadas amiloides em diferentes órgãos e tecidos do corpo. Essas proteínas são produzidas em excesso e depositadas de forma anormal nos tecidos, interferindo em sua função normal. Existem diversos tipos de amiloidose, sendo os mais comuns a amiloidose primária, associada à imunoglobulina (AL), e a amiloidose associada à proteína sérica A (AA). Os sintomas da amiloidose sistêmica podem variar significativamente de acordo com os órgãos afetados, mas frequentemente incluem fadiga, fraqueza, perda de peso, inchaço abdominal, problemas cardíacos, renais e nervosos, entre outros. O diagnóstico da amiloidose geralmente envolve uma combinação de exames clínicos, testes laboratoriais, biópsias de tecidos afetados e, às vezes, exames de imagem. O tratamento da amiloidose sistêmica visa controlar os sintomas, retardar a progressão da doença e melhorar a qualidade de vida do paciente. Isso pode incluir terapias farmacológicas para reduzir a produção de proteínas amiloides, tratamento de suporte para órgãos afetados e, em alguns casos, transplante de órgãos. Devido à complexidade da doença e à sua raridade, o manejo da amiloidose sistêmica geralmente requer uma abordagem multidisciplinar, envolvendo diferentes especialistas. Embora a amiloidose sistêmica seja uma doença grave e potencialmente fatal, avanços recentes na compreensão da sua fisiopatologia e no desenvolvimento de novas terapias oferecem esperança para melhorar o prognóstico e a qualidade de vida dos pacientes afetados.

Palavras-chave: Fibras amiloides, Agregação de proteínas, Diagnostico, Bioinformática, Imunossensor colorimétrico.

1 INTRODUÇÃO

A amiloidose sistêmica é uma doença letal ocasionada por desdobramento incorreto de proteínas, por meio de secreções excessivas, dobramento que leva conformações incorretas e a subsequente agregação de cadeias leves e anticorpos livres a levam à deposição de placas amilóides em vários órgãos (Agosta & Hin, 2023).

Existem mais de 100 mutações que ocasionam diferentes manifestações das doenças amiloidogênicas, a forma mais comum de amiloidose hereditária sistêmica é a ocasionada pela modificação do aminoácido de metionina por valina na posição 30 da molécula de transtirretina (TTR V30M), herdada de modo autossômico dominante. A transtirretina é sintetizada pelo fígado, quando mutada ocasiona agregações proteicas em tecidos alvos principalmente coração e rins ocasionando proteinúria, insuficiência renal e cardíaca (Saelices et al., 2015; Fernandes et al., 2020).

A TTR liga facilmente no domínio V_L do anticorpo intimamente ligadas à deposição fibrilar, contudo os mecanismos moleculares pelos quais certas mutações induzem o dobramento incorreto e a agregação amilóide dos domínios do anticorpo possuem poucos estudos. Nesse mecanismo interacional pode haver cinco mutações presentes, onde duas destas levam a desestabilização da proteína e induzem a formação de fibras amiloides (Cao et al.,

2020).

Por meio do docking proteína proteína da 4TLT no domínio V_L do anticorpo região mais provável de desestabilização proteica e formação de fibras amiloidogênicas, identificar pontos de ligação de hidrogênio e prováveis interações com a parte proteica do anticorpo.

2 METODOLOGIA

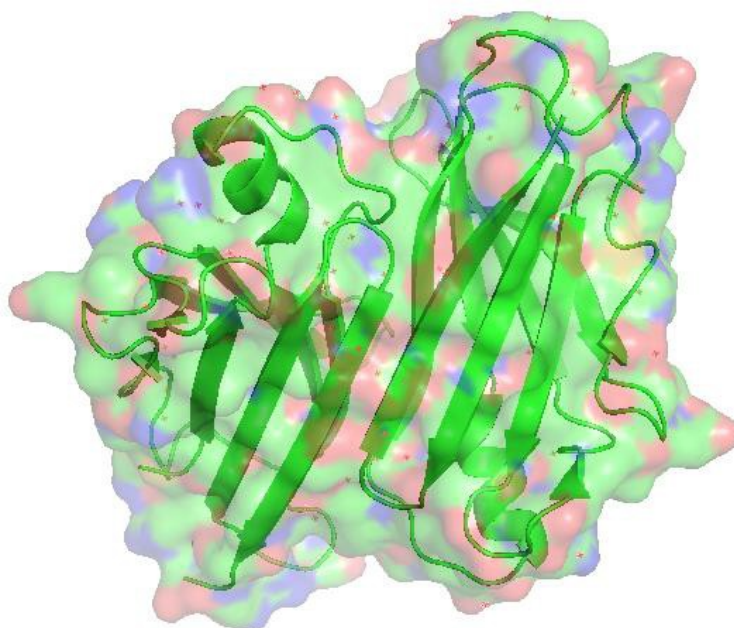
Inicialmente foi utilizado o PDB para encontrar a proteína alvo 4TLT, caso não a encontremos é modelada no servidor I-TASSER. Posteriormente, procuramos associação da nossa proteína alvo com outros via Biogrid, encontrando as relações prosseguimos na busca desta proteína no PDB ou modelagem. Após determinar Receptor e o ligante, fazer o docking proteína-proteína no servidor Cluspro2. Após a análise e interação é obtido a pose 00 e os dados submetidos no KFC2 para determinação dos hotspots.

Após a determinação dos hotspots, utilizamos o PyMol e COCOMAPS para determinar as regiões com interações de hidrogênio. A partir desta determinação são escolhidos os aminoácidos que serão mutados no PyMol, gerando proteínas mutantes, essas são dockadas novamente com a proteína ligante no cluspro2. Com a análise do docking no PyMol do complexo mutante determinamos se as mutações são importantes para o processo de ligação receptor-ligante. Caso seja relevante, fazemos os peptídeos mutantes no pymol que são dockadas novamente com a proteína ligante no cluspro2. Após a análise confirmar por meio do no pymol se o peptídeo se liga na mesma região ou se desloca para outras regiões do complexo.

3 RESULTADOS

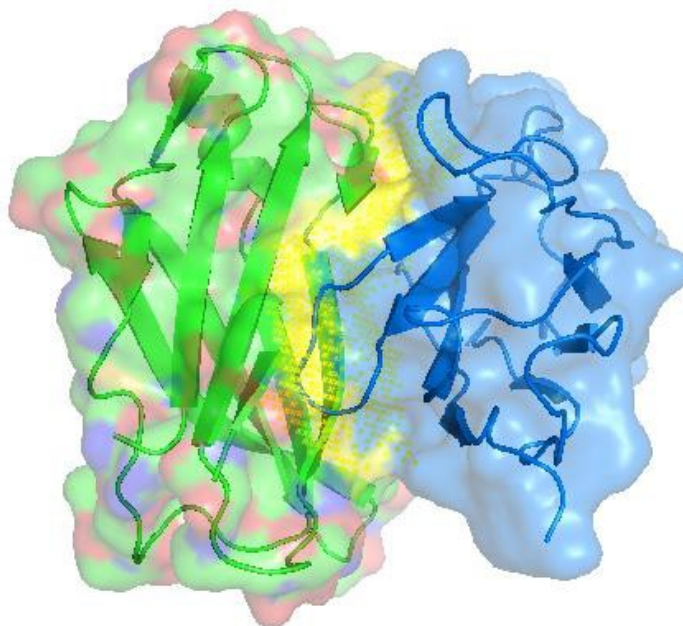
Na figura 1 há a estrutura tridimensional da superfície do mutante 4TLT na posição V30M, a mutação mais comum em casos de amiloises sistêmicas, derivadas da A transtirretina (TTR - Trasporter of Tiroxine and Retinol) e uma proteína globular plasmática, tetramérica de 55 kDa, composta por quatro subunidades idênticas de 127 resíduos de aminoácidos, arranjados em 8 fitas β , denominadas por letras de A a H.

Figura 1-Modelagem da 4TLT pelo Pymol, estrutura tridimensional da superfície da 4TLT.



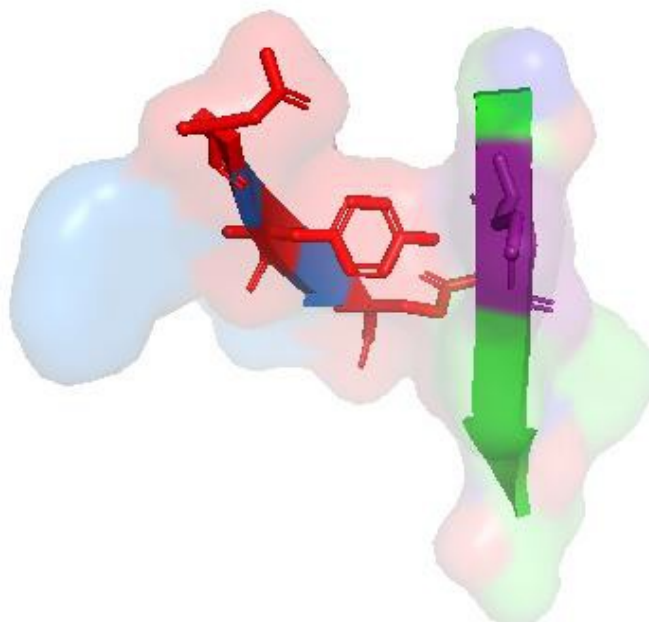
A TLT interage com o domíno VL do anticorpo, região de Cadeia leve (Light Chain) - VL (região variável, com 110 aa), tendo maiores interações Asparagina(N), tirosina(Y) e glutamina (Q) da VL nas posições 39, 41 e 43 como mostra a figura 3.

Figura 2-Interação entre 4TLT e o domínio V_L do anticorpo. Estrutura tridimensional da superfície da 4TLT com interação do domínio V_L do anticorpo.



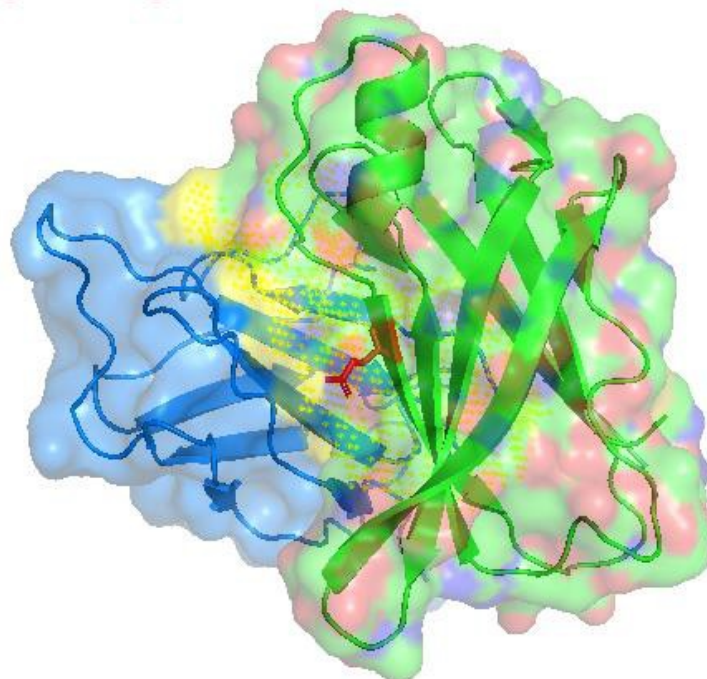
Também é possível observar na fig. 3 as interações no peptídeo da 4TLT nas posições 92 e 93 de glutamato (E) e valina (V), ratificando a dockagem no segmento 73 a 78, com as fibras 6dix no segmento 98 a 101 não encontrarem região de ligação.

Figura 3- Estrutura tridimensional dos peptídeos que interagem da 4TLT e o domínio V_L. Estrutura tridimensional da superfície dos peptídeos da 4TLT (AEVVFT, região de hotspot EV com interação do domínio V_L (NWYLQ), a região de hotspots NYQ do anticorpo).

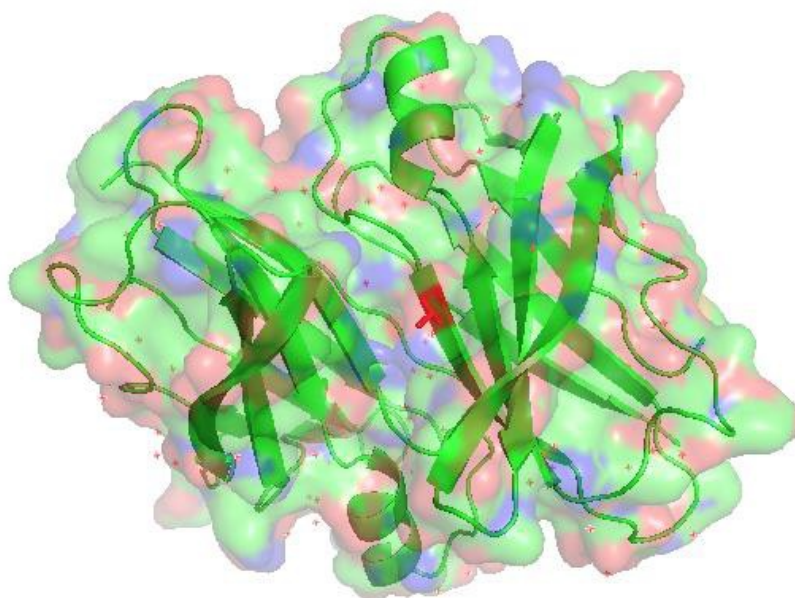


O 4TLT tem o aminoácido glutamato (E) no segmento 92 fig. 4 que foi modificado pelo aminoácido alanina (A), o glutamato é muito importante na zona interacional com o anticorpo, bem como visto na fig. 5 com a alanina.

Figura 4- 4TLT selvagem Glutamato no segmento 92. Estrutura tridimensional selvagem com o aminoácido Glutamato (E) no segmento 92, região que apresenta a menor ponte de hidrogênio 2.71 e diretamente relacionada com a zona interacional do domínio do anticorpo.



5) **Figura-** 4TLT mutado com Alanina no segmento 92. Estrutura tridimensional mutagênica com o aminoácido Alanina (A) no segmento 92, região que apresenta a menor ponte de hidrogênio 2.71 e modificando a área e a zona interacional do domínio do anticorpo.



Ao sobrepor as imagens são possíveis observar o deslocamento da zona de interação deslocando o anticorpo para outra região no qual não há interação com o V_L. Quando representado em segmentos menores como os peptídeos de 10 aminoácidos é possível observar na fig. 07 e 08 os aminoácidos selvagens e mutados, bem como a sobreposição e a mudança estrutural destes na fig. 09

Figura 6- Complexo selvagem e mutado A92E com deslocamento da zona de interação do anticorpo com proteína. Estrutura tridimensional mutagênica e selvagem com aminoácido glutamato(E) substituído por Alanina (A) no segmento 92, deslocando a interação proteína receptor no hotspot, a região azul ciano é a região de interação com o mutado deslocado da região laranja o receptor na interação com o complexo selvagem.

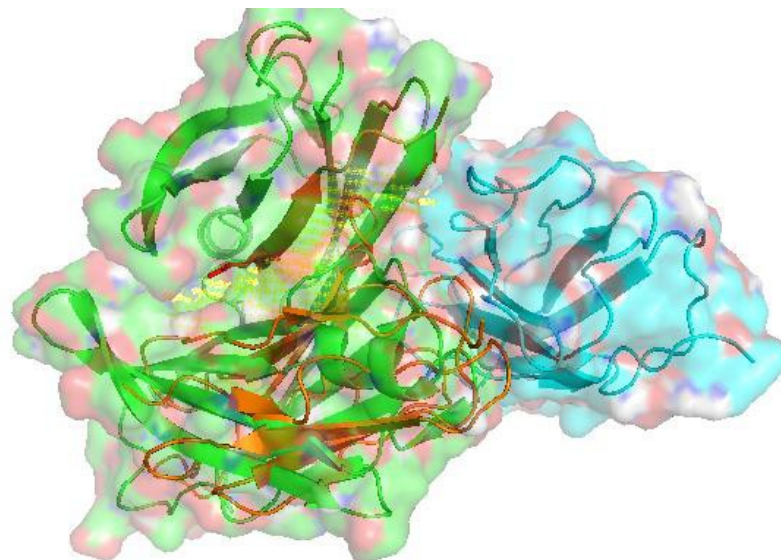


Figura 7- Peptídeo da estrutura selvagem no segmento 87-96. Estrutura tridimensional mutagênica e selvagem com aminoácido glutamato (E) substituído por Alanina (A) no segmento 92, evidenciado o glutamato.

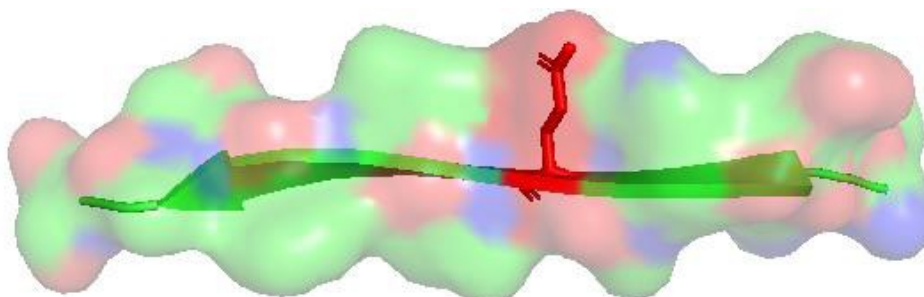
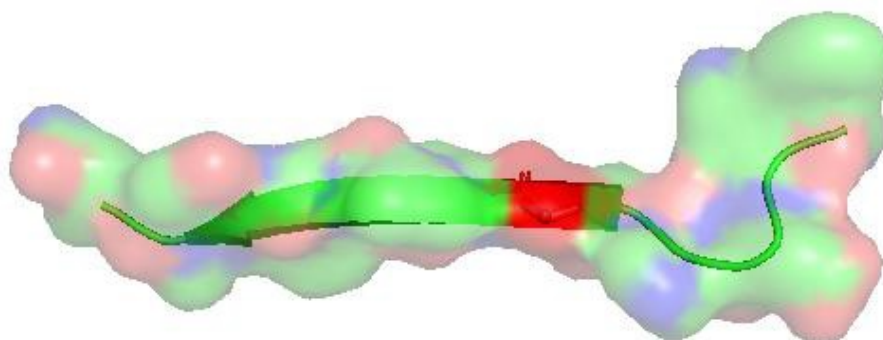
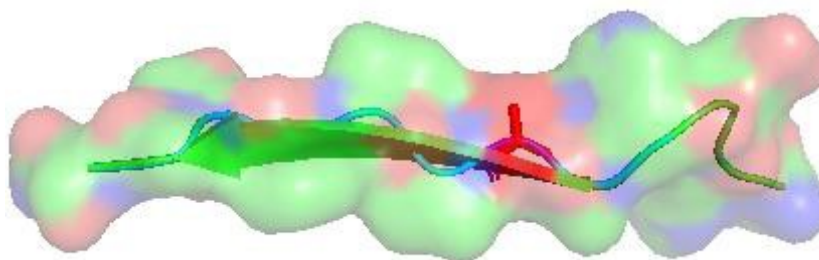


Figura 8- Peptídeo da estrutura mutada 87-96. Estrutura tridimensional mutagênica e selvagem com aminoácido glutamato (E) substituído por Alanina (A) no segmento 92, evidenciado a alanina.



- 9) Peptídeo selvagem e mutado sobreposto: Estrutura tridimensional mutagênica e selvagem com aminoácido glutamato (E) substituído por Alanina (A) no segmento 92 sobreposto.



4 CONCLUSÃO

A dockagem inicial com a inter-relação da proteína 4TLT e seu respectivo ponto de interação no V_L abriu precedentes para futuros estudos e desenvolvimento de Imunossensor aplicável no diagnóstico rápido da amiloidose sistêmica, possibilitando assim a minimização de materiais e reagentes para a confecção de um imunossensor colorimétrico.

REFERÊNCIAS

- Agosta, F. Cozzini, P. Hint approach on Transthyretin folding/unfolding mechanism comprehension. **Computers in Biology and Medicine**, Volume 155, 2023, 106667, ISSN 0010-4825, <https://doi.org/10.1016/j.combiomed.2023.106667>.
- Cao, Q. Anderson, D. Liang, W. Chou, J. Saelices, L. The inhibition of cellular toxicity of amyloid- β by dissociated transthyretin. **Journal of Biological Chemistry**, Volume 295, Issue 41, 2020, Pages 14015-14024, ISSN 0021-9258, <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.013440>.
- Fernandes, L., Messias, B., Pereira-Neves, A., Azevedo, E. P., Araújo, J., Foguel, D., & Palhano, F. L. Green Tea Polyphenol Microparticles Based on the Oxidative Coupling of EGCG Inhibit Amyloid Aggregation/Cytotoxicity and Serve as a Platform for Drug Delivery. **ACS biomaterials science & engineering**, 6(8), 4414–4423, 2020. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.0c00188>.
- Saelices, L. Johnson, L. Liang, W. Sawaya, M. Cascio, D. Ruchala, P. Whitelegge, J. Jiang, L. Riek, R. Eisenberg, D. Uncovering the Mechanism of Aggregation of Human Transthyretin*, **Journal of Biological Chemistry**, Volume 290, Issue 48, 2015, Pages 28932-28943, ISSN 0021-9258, <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.659912>.