

15. Biofísica

Estudio comparativo de agregación proteica de variantes N-terminal de Apolipoproteína A-I humana

Gaddi, G.M (gisemg@gmail.com); Finarelli, G.S; Gisonno, R; Ramella, N.A, Rosú, S.A;
Tricerri, M. A.

Facultad de Ciencias Médicas
Universidad Nacional de La Plata

Resumen

Introducción: la Amiloidosis es un grupo heterogéneo de enfermedades causadas por plegamiento anómalo de proteínas. Existen variantes naturales de Apolipoproteína A-I causantes de la enfermedad: Leu60Arg (L60R) y Trp50Arg (W50R) presentes en depósitos amiloides renales con localización: glomerular o tubulointerstitial respectivamente.

Objetivo: analizar características estructurales de L60R y W50R para un estudio comparativo respecto a la proteína nativa (Wt) en cuanto estabilidad, susceptibilidad a la proteólisis y tendencia a la agregación frente a ligandos celulares: glucosaminoglucanos (heparina) y lípidos negativos (SDS). **Materiales y métodos:** Los parámetros estructurales fueron analizados a pH: 7.4 y 5 por fluorescencia frente a guanidina clorhídrica, acrilamida y sonda Bis Ans. La susceptibilidad a la proteólisis mediada por tripsina a pH 7.4 se analizó por SDS PAGE. La tendencia a la agregación se evaluó por incubación de las proteínas a 37 °C, 48 horas a los pH mencionados en presencia y ausencia de ligandos midiendo intensidad de fluorescencia ligada a tioflavina T. **Resultados:** L60R evidenció una inestabilidad estructural respecto a Wt y W50R, disminución de intensidad de Bis ANS que muestra pérdida de bolsillos hidrofóbicos por alteración de un dominio cremallera de leucina, un incremento en la agregación en presencia de SDS y una susceptibilidad mayor a la proteólisis con tripsina a pH 7.4; W50R mostró un ascenso de agregación con heparina a pH 5.

Conclusión: La desestabilización estructural de las variantes conduce a un plegamiento anómalo de las mismas, lo que podría producir exposición de sitios (para unión a ligandos o proteólisis) e inducir aumento de agregación, sobre todo en un micro entorno pro inflamatorio.

Palabras claves: Apolipoproteína A-I, Agregación, plegamiento anómalo, ligandos celulares.

Introducción

La Apolipoproteína A-I (Apo A-I) es el mayor componente proteico de las lipoproteínas de alta densidad humanas (HDL), las que se encuentran involucradas en la remoción de colesterol de los tejidos, homeostasis endotelial, entre otras funciones relevantes. Es sintetizada principalmente en hígado, aunque también en intestino y riñón.

Mutaciones puntuales de la Apo A-I pueden inducir plegamiento anómalo de la proteína que trae como consecuencia su disfunción causando la formación de depósitos órgano-específicos generando amiloidosis hereditaria, la cual se define como un grupo heterogéneo de enfermedades dadas por agregación proteica. Se han descrito más de 20 mutaciones causantes de la misma; localizadas en sitios de alta incidencia o “Hot-Spots” (Das; 2015) (Figura 1)

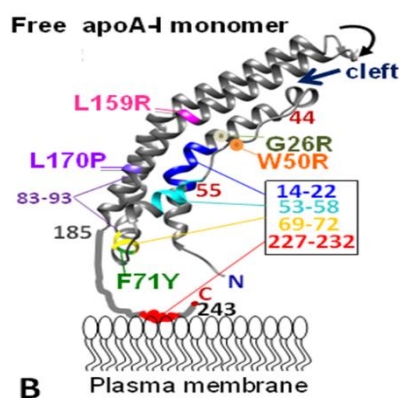


Figura 1: Apo A-I con sus puntos clave de mutación

Las variantes de Apo A-I localizadas en las posiciones 26 a 107 están involucradas en amiloidosis de tipo hepática y/o renal mientras que las situadas entre los residuos 173-178 producen daños en corazón, laringe y piel. En el presente trabajo se analizó el comportamiento de variantes naturales de Apo A-I del extremo N-terminal que presentan una sustitución de un aminoácido neutro (Tryptofano (W) ó Leucina (L) por uno con carga positiva dado por la arginina (R); ambas se encuentran involucradas en amiloidosis renal (Gregorini; 2005) tanto glomerular como en el caso de W50R (Booth, 1995) como túbulo intersticial identificada para el mutante L60R (Soutar (1992).

El mecanismo determinante de la toxicidad y órgano especificidad no es conocido.

Objetivos

En base a lo comentado arriba, el objetivo general de este plan de trabajo es determinar los efectos de las mutaciones en las variantes naturales de Apo A-I sobre el plegamiento anómalo de las mismas y la unión con ligandos, en un micro entorno celular que permita explicar la patología en amiloidosis familiar expresada a través de la tendencia a la agregación, la unión a ligandos, citotoxicidad y la respuesta inflamatoria.

Materiales y métodos

Desnaturalización proteica con guanidina clorhídrica

La guanidina clorhídrica (GndHCl) es un agente caotrópico, es decir que tiene la capacidad de generar pérdida del plegamiento proteico (desnaturalización) y en consecuencia exponer a los residuos aromáticos a la solución acuosa. En condiciones nativas, estos se hallan en superficies hidrofóbicas formando parte de la estructura terciaria de la proteína.

La concentración de GndHCl necesaria para inducir la desnaturalización depende de la estabilidad conformacional de la proteína a analizar, ésto se siguió mediante el análisis del corrimiento de la fluorescencia intrínseca del Trp en función de la concentración del agente caotrópico.

Las variantes Wt, W50R y L60R se diluyeron en buffer tris pH 7.4 y buffer citrato fosfato pH 5.0 (0.1 M ácido cítrico y 0.2 M H₂PO₄) a una concentración final de 0.2 mg/ml, se construyó la curva de titulación con cantidades crecientes de GndHCl (0-3 M) y se registró el corrimiento de la intensidad de fluorescencia proveniente de los cuatro Trp de la secuencia de Apo A-I (8,50,72,108). El procedimiento se llevó a cabo en un espectrofluorómetro SLM4800. La longitud de onda de excitación fue 295 nm y la emisión se registró entre 310 y 400nm. Luego se calculó el centro de masa del espectro de fluorescencia a cada concentración de GndHCl.

A partir de los datos experimentales se puede calcular el ΔG° de desnaturalización, este parámetro indica la energía libre a la cual la proteína se encuentra en ausencia de agente desnaturalizante.

Apagado (Quenching) de fluorescencia Trp por acrilamida

El quenching hace referencia a los diversos procesos que traen en consecuencia un decaimiento de la emisión de una sustancia fluorescente en una solución acuosa en presencia de una sustancia denominada quencher. Se puede clasificar en estática cuando se forma el complejo fluoróforo-quencher o dinámico (colisional) cuando la disminución de fluorescencia ocurre por choque de las moléculas en solución.

En nuestro caso se analizó el quenching dinámico de los Trp usando como quencher acrilamida dada su solubilidad en medio acuoso. La efectividad de esta determinación nos permite conocer el grado de exposición de los aminoácidos al solvente, lo que permite inferir el entorno de los mismos en la proteína, los Trp menos accesibles se localizan en zonas de mayor hidrofobicidad.

Mediante la ecuación de Stern Volmer podemos calcular la constante Ksv que brinda información acerca de la exposición de los Trp expuestos al solvente

Ecuación de Stern Volmer

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv} \times [Q]$$

Donde F₀ y F son las intensidades de emisión fluorescente en ausencia y presencia del quencher, respectivamente, a una concentración del quencher [Q], y Ksv es la constante de Stern-Volmer, la cual indica la sensibilidad de fluoróforo al quencher. Un fluoróforo protegido en una macromolécula es usualmente inaccesible al quencher disuelto en solvente acuoso, resultando en un valor de Ksv bajo.

Las proteínas fueron disueltas en buffer tris p H 7.4 y buffer citrato fosfato a p H 5.0 a una concentración final de 0.1 mg/ml y los Trp fueron excitados a 295 nm y se siguió el corrimiento de la intensidad de fluorescencia en función de concentraciones crecientes de acrilamida (0-0.4 M) como fue descrito arriba.

Fluorescencia de Bis-ANS

La sonda Bis-ANS tiene la capacidad de unirse a los bolsillos hidrofóbicos expuestos de las proteínas especialmente cuando éstas se encuentran parcialmente desplegadas (Munishkina y Fink, (2007).

Se procedió a realizar la titulación de las proteínas en concentración final 0.1 mg/ml disuelta en buffer tris pH 7.4 en presencia de la sonda en concentraciones crecientes (0-16 μ M), la longitud de onda de excitación fue 395 nm y el rango de emisión 450-550 nm.

Luego del agregado de Bis-ANS hasta una concentración final de 16 μ M (en el que se observa la máxima unión a las distintas variantes, se comenzó a agregar cantidades crecientes de Gnd Cl (0-2 M) con el fin de estudiar la estabilidad de la conformación espacial de las proteínas a la desnaturalización química. Los espectros se registraron de la misma forma.

Detección de agregados proteicos por Tioflavina T

La sonda tioflavina T (ThT) tiene la capacidad de unirse a agregados tipo amiloide siendo el aumento de su rendimiento cuántico relacionado a la eficiencia de formación de dichos complejos.

Las proteínas fueron sometidas a una incubación a pH 7.4 y 5.0 en buffer citrato fosfato en una concentración final 0.2 mg/ml durante 48 h a 37 °C con agitación constante. Se registró la dispersión de la luz o scattering a 340 nm que brinda información del tamaño de las partículas en solución (un aumento por tanto del mismo podría evidenciar presencia de agregados) y luego se agregó ThT en relación molar 1: 1. Se midió utilizando filtro de excitación a 430 nm y emisión a 480 nm. Todas las determinaciones se realizaron en un lector de placas beckman DTX 880.

Procesamiento proteolítico de Apo A-I

En diversos trabajos se ha descrito que una respuesta inflamatoria trae consecuente liberación de proteasas al medio extracelular lo que causaría un clivaje proteolítico de diversas proteínas, incluida a Apo A-I Ramella (2011) y Rosú(2015).

En depósitos amiloides se evidenció la presencia del péptido 1-93 de la secuencia correspondiente al N-terminal que podría deberse al proceso mencionado anteriormente; por las razones expuestas se estudió la susceptibilidad a la proteólisis de Wt, W50R y L60R a pH 7.4 en presencia de Tripsina para conocer si las mutaciones podrían exponer un sitio de corte respecto a la secuencia nativa induciendo un incremento del rendimiento del procesamiento proteolítico de la misma.

Para ello 0,3 mg/ml de Apo A-I y sus variantes fueron sometidas a proteólisis a pH fisiológico a 37°C, 700 rpm, por la enzima tripsina en una relación molar de 1000:1 apo:tripsina. Se

tomaron alícuotas cada 15 minutos durante una hora, las que fueron analizadas por SDS PAGE y posterior cuantificación de Intensidad de las fracciones por el software Image J.

Unión de las proteínas a ligandos celulares

Los glucosaminoglucanos (GAGs) son polisacáridos constituidos por dímeros (como por ejemplo ácido D-glucuronido y N-acetil D-glucosamina) que se localizan en la matriz extracelular de numerosos tejidos; poseen un elevado grado de sulfatación lo que le confieren carga negativa. Existe evidencia que los GAGs estarían involucrados en la agregación proteica y consecuente formación de depósitos amiloides. A fin de analizar la posibilidad de que Wt y sus variantes sean más retenidas en un micro entorno pro inflamatorio por unión a GAGs, se incubaron Wt y sus variantes a una concentración final de 0.2 mg/ml a pH 7.4 Y 5.0 con heparina (utilizada como modelo de GAG) en una relación molar 2:1 heparina:proteína durante 48 h a 37°C con agitación constante. Se midió scattering e intensidad de ThT siguiendo el mismo procedimiento anterior.

En células apoptóticas se detectan lípidos cargados negativamente en su membrana plasmática, lo que podría facilitar la interacción de tipo electrostática con Apo A-I y sus variantes y en consecuencia, favorecer su retención en el entorno micro celular. Para realizar el experimento se propone al dodecil sulfato de sodio (SDS) como modelo de lípido debido a su naturaleza anfipática: cabeza sulfatada y una cola hidrocarbonada de dodecilo.

Resultados y discusión

Comparación estructural y estabilidad

La estabilidad estructural fue analizada mediante curvas de desnaturalización en presencia de concentraciones crecientes de GndHCl (stock 6M) registrando los espectros de fluorescencia intrínseca Trp (8,50,72 y 108) y el máximo de intensidad de la misma a pH 7.4 y 5.0. Wt en condiciones fisiológicas responde a un modelo de dos estados (nativo-desnaturalizado) siguiendo una curva sigmoidea (figura 1A) gracias al efecto cooperativo de esta transición. Se calculó el ΔG° de desnaturalización: 2.3 +/- 0.1 Kcal/mol, típico de una proteína parcialmente plegada. W50R también responde al modelo mencionado pero su ΔG° es de 1.7 +/-0.1 kcal/mol (tabla 1). L60R evidenció una pérdida de efecto cooperativo en el proceso evidenciado ya que el agregado de pequeñas concentraciones de GndHCl produce un corrimiento hacia el rojo respecto a Wt consecuente de un grado de exposición mayor de Trp, por lo tanto, la curva no se logró ajustar al modelo de dos estados imposibilitando la

determinación de la energía libre de desnaturalización. En condiciones ácidas se pudo apreciar la misma tendencia.

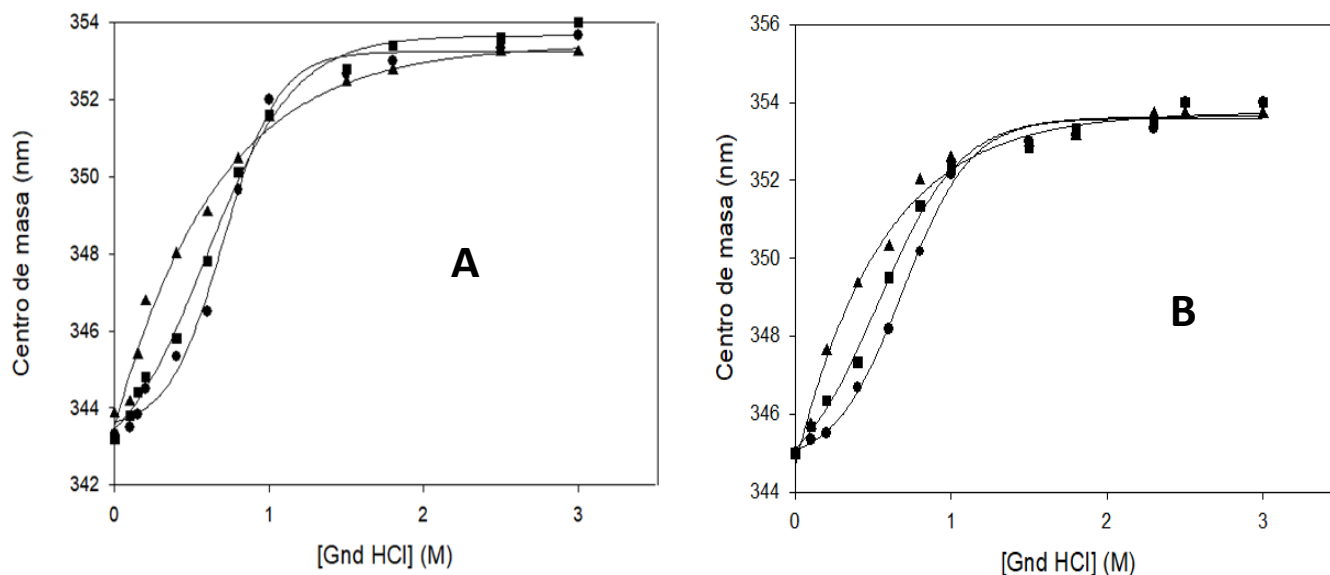


Figura 1: desnaturalización química A) pH 7.4 B) pH 5.0. Wt (círculo), W50R (cuadrado) y L60R (triángulo). 0.2 mg/ml de las proteínas fue titulado en presencia de concentraciones crecientes de GndHCl (0-3 M). Se midió la fluorescencia intrínseca de Trp mediante excitación a 295 nm y posterior registro del espectro de emisión de 310-400 nm. Con los datos obtenidos se calculó el centro de masa para cada concentración.

Otro parámetro estructural a analizar es el grado de exposición de los Trp de Apo A-I al solvente y el entorno en el cual se encuentran los mismos mediante el análisis del apagado de señal con concentraciones crecientes de acrilamida. Se calculó la constante de Stern Volmer (K_{sv}) empleando la ecuación correspondiente (figura 2 A y B). A pH fisiológico W50R presenta K_{sv} 8,6 +/-0,4 y L60R 8,3 +/-0,4 respectivamente y ambas son mayores a Wt (5,6 +/-0,3), a pH ácido se observó la misma tendencia.

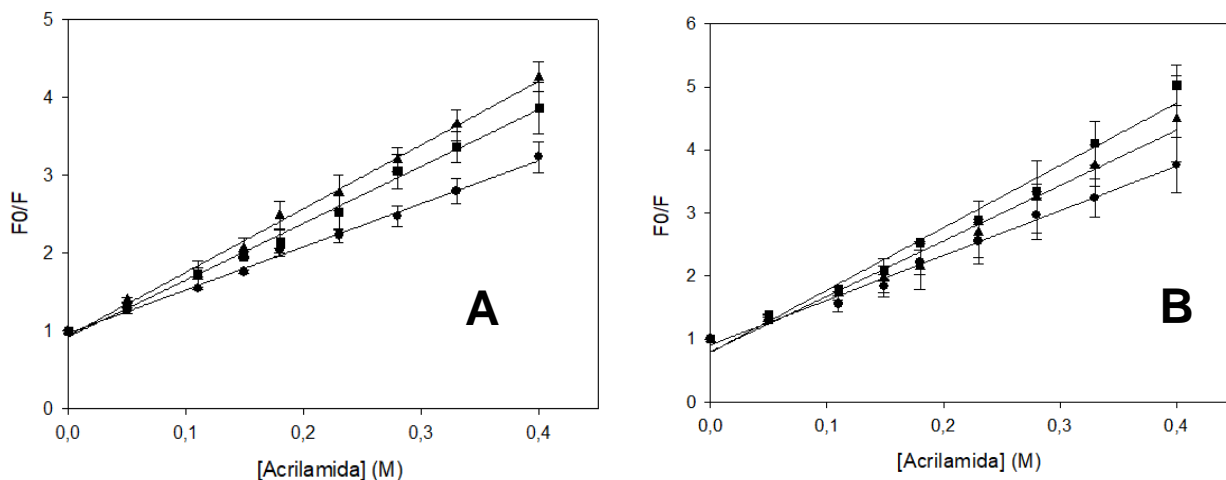


Figura 2: Quenching con acrilamida A) p H 7.4 B) p H 5.0. Wt (círculos), W50R (cuadrados) y L60R (triángulos). 0.1 mg/ml de las variantes fueron tituladas en presencia de concentraciones crecientes de acrilamida (0-0,4 M). Se excitó a 295 nm y se registró la fluorescencia intrínseca entre 310-400 nm. El gráfico muestra la relación lineal entre el cociente de fluorescencia en ausencia del quencher (F0) y la correspondiente a cada punto de la titulación (F) representada por la ecuación de Stern volmer

Para estudiar la conformación estructural de Apo A-I y sus variantes se realizó una titulación con una sonda fluorescente llamada Bis-ANS que presenta la capacidad de unirse a bolsillos hidrofóbicos de las proteínas o zonas flexibles de las mismas y en respuesta a ello aumentar su rendimiento cuántico (figura 3 A). La interacción se ve más favorecida en las formas parcialmente plegadas, como en el caso de la proteína de interés y en el estado de glóbulo fundido. Del mismo ensayo se desprende que la sonda no experimenta corrimiento del máximo cuando se une a las distintas variantes respecto a Wt, (figura 3B) indicando que la naturaleza de la unión proteína-sonda es similar.

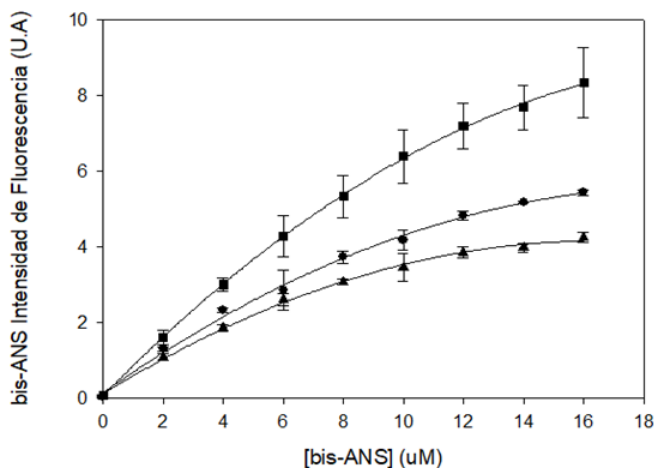


Figura 3A: titulación bis-ANS. 0.1mg/ml de las proteínas fueron tituladas en presencia de concentraciones crecientes de la sonda (0-16 u M); la cual fue excitada a 395 nm con registro de los espectros de fluorescencia en un rango de 450-550 nm. El gráfico representa la intensidad de fluorescencia máxima de cada punto en función de la concentración de sonda agregada. Wt (círculos), W50R (cuadrados) y L60R (triángulos)

El gráfico exhibe que L60R presenta menor superficie hidrofóbica accesible a la sonda lo que podría deberse a la pérdida de la leucina en posición 60, lo que irrumpe con el dominio de cremallera de leucina que le confiere estabilidad a Apo A-I (Gursky, 2012). En cambio W50R exhibe un comportamiento similar a otros mutantes estudiados con una intensidad mayor por lo tanto mayor exposición de los bolsillos hidrofóbicos.

A partir de la máxima concentración de Bis-ANS agregado, se comenzó a titular con GndHCl para determinar la estabilidad conformacional de la proteína (figura 3B), la desorganización estructural observada a bajas concentraciones de guanidina pone en evidencia el estado parcialmente plegado de las proteínas.

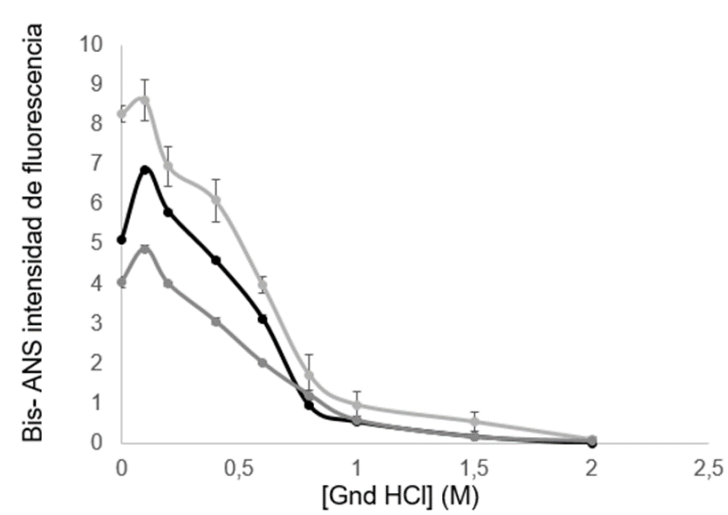


Figura 3B: desnaturalización química de GndHCl en presencia de Bis-ANS. 0,1 mg/ml de las proteínas con una concentración de 16 u M de la sonda fueron titulados por cantidades crecientes de Gnd HCl (0-2 M) a una longitud de onda de excitación de 395 nm y emisión de 490 nm. Wt (Negro), W50R (Gris Claro) y L60R (Gris Oscuro)

De los resultados estructurales mostrados se podría afirmar que las variantes de Apo A-I exhiben inestabilidad respecto que Wt; ya sea por una disminución en la energía libre de desnaturalización (W50R) o bien por pérdida de efecto cooperativo del desplegamiento proteico (L60R); además se demostró que ambas variantes presentan un aumento de Ksv indicando que los Trp tienen un mayor grado de exposición al solvente lo que sugiere alteración estructural, por ultimo L60R presenta una pérdida de bolsillos hidrofóbicos evidenciada por una disminución de intensidad Bis ANS en todos los puntos y W50R muestra una mayor exposición de los bolsillos hidrofóbicos respecto de WT en ambos casos. Todos los datos en conjunto sugieren que las variantes N-terminales presentan una estructura inestable respecto de la secuencia nativa que podría alterar su plegamiento proteico.

Procesamiento proteolítico de Apo A-I

Como fue explicado en materiales y métodos, las variantes de Apo fueron incubadas a distintos tiempos con tripsina y el producto resultante analizado por SDS- PAGE En la figura 4A se puede visualizar la proteólisis con tripsina y posteriormente el análisis mediante el

software Image J que da información de la intensidad de banda que permanece como monómero. Los resultados fueron normazados al tiempo 0 en cada una de las condiciones (figura4B)

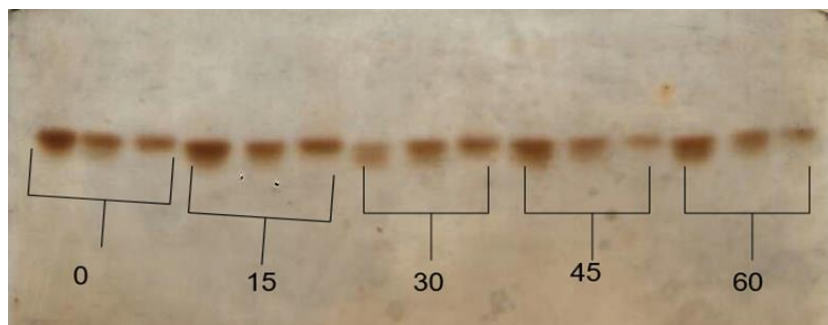


Figura 4 A: proteólisis con tripsina a pH 7,4 relación proteína- enzima 1000:1. A) Wt B) W50R C) L60R. Se sembraron 20 ul de cada una de las muestras a 0,3mg/ml en buffer muestra SDS en un gel SDS PAGE al 16% y revelado mediante tinción con nitrato de plata.

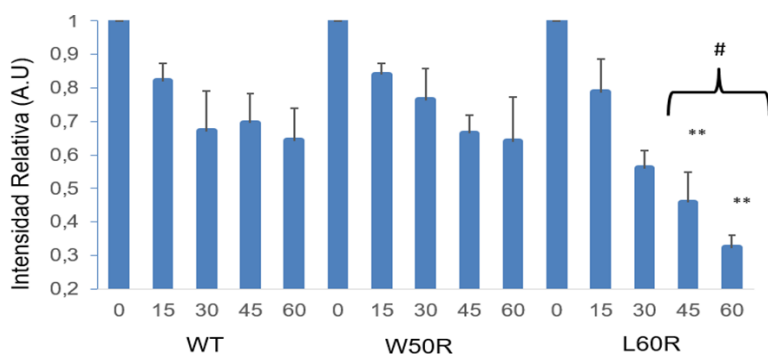


Figura 4B: Intensidad relativa de proteólisis. Los valores de intensidad fueron registrados en Image J software y normalizado respecto a cada proteína a tiempo 0. (**) Diferencia significativa respecto del Wt en su respectivo tiempo, (#) significativa respecto al tiempo 0 en cada variante con $p < 0.05$ usando test student

Las figuras sugieren que L60R presenta una susceptibilidad a la proteólisis significativa respecto de Wt a partir de los 45 minutos de iniciada la reacción indicando que esta mutante podría presentar exposición de un sitio de corte; si bien la tripsina no es un enzima con actividad fisiológica en circulación, podría dar idea que un procesamiento proteolítico permitiría la liberación de fragmentos que puedan, ya sea disminuir la vida media de la proteína funcional, o ser por si mismos inductores de citotoxicidad; por tanto este fenómeno sería de utilidad para explicar un posible mecanismo de la formación de los depósitos amiloides hallados en los tejidos blanco.

Unión a ligandos: Heparina

Se analizó la tendencia de agregación a ambos pHs mediante la unión de ThT en presencia o ausencia de heparina como se ha descripto en materiales y métodos. La Figura 5 muestra que, en base a la dispersión de luz (Fig 5A) y la unión a ThT (Fig 5B), que W50R forma complejos pro-amiloidogénicos con mayor eficiencia que Wt al unirse a heparina.

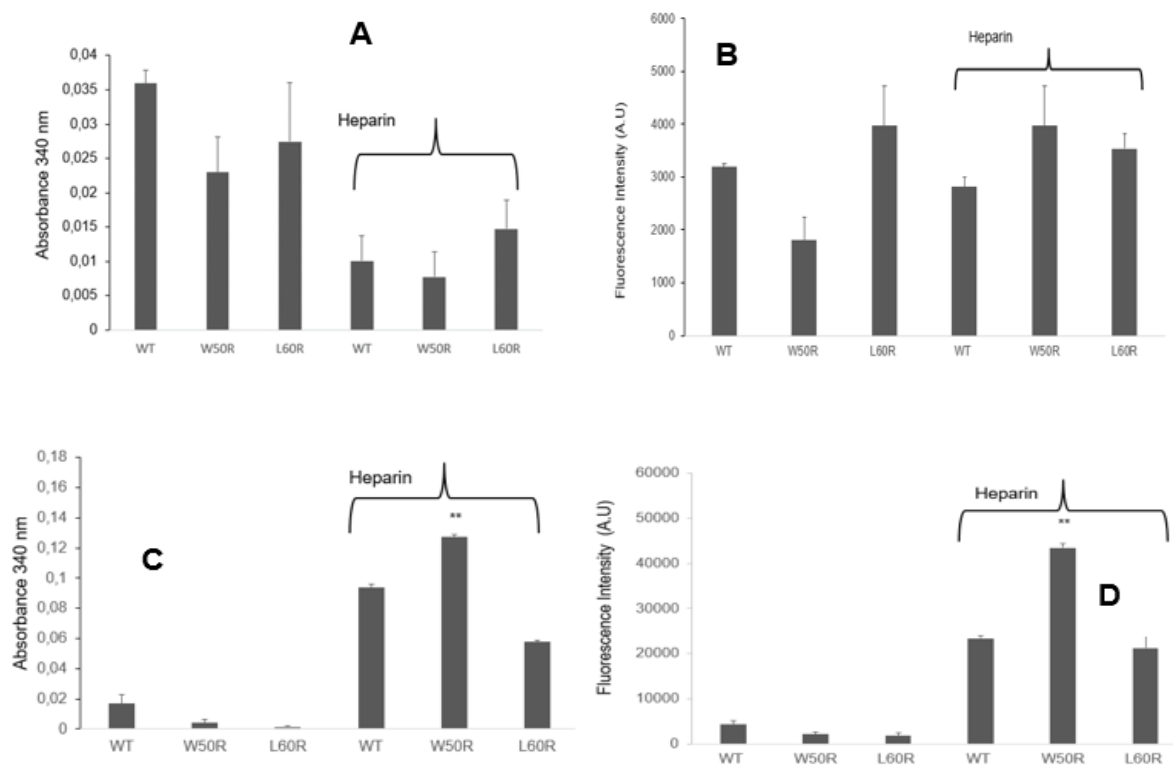


Figura 5: análisis de formación de complejos pro-amiloidogénicos en presencia de heparina.. 0,2 mg/ml de variantes de Apo fueron incubados a 37°C durante 48 horas en presencia o ausencia de heparina. A) Absorbancia a 340 nm a pH 7,4 B) fluorescencia de ThT a p H 7,4 C) absorbancia a 340 nm a pH 5,0 D) fluorescencia de ThT a pH 5,0. (**) Implica diferencia significativa respecto a Wt con heparina usando el test de student con $p < 0,05$

Para visualizar la formación de agregados proteicos se tomaron imágenes de microscopia de transferencia electrónica (MET); para ello las muestras fueron incubadas durante una semana para pH 7,4 (figura 6) y un mes a pH 5,0 en presencia o ausencia de heparina figura 7)

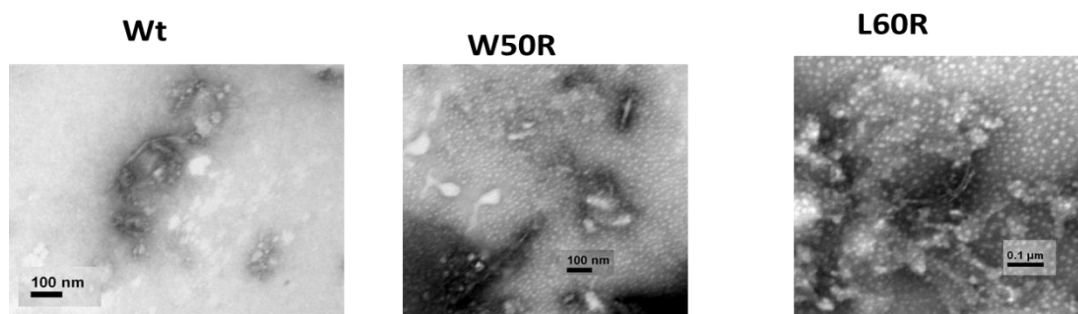


Figura 6: visualización de agregados tipo amiloide a p H 7,4. 0,6 mg/ml de proteína fueron incubados por 7 días a 37°C

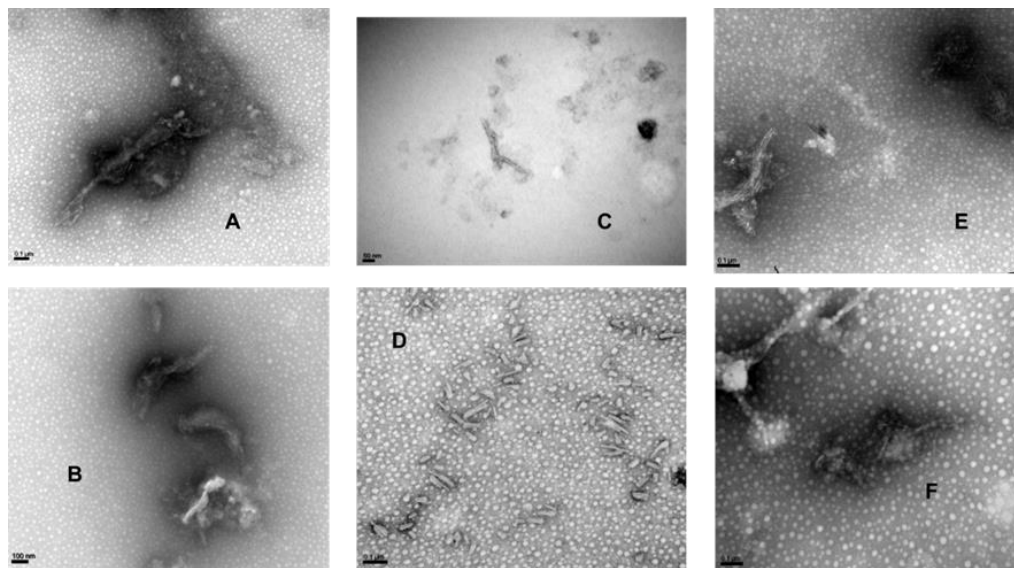


Figura 7: visualización de agregados tipo amiloide a pH 5,0 en presencia o ausencia de heparina. 0,6 mg/ml de proteína fueron incubados por 35 días a 37°C durante 48 horas. A) Wt, B) Wt con heparina C) W50R, D) W50R con heparina, E) L60R y F) L60R con heparina.

Las Figuras 6 y 7 indican que las distintas variantes forman agregados proteicos amorfos o tipo protofibras cuando son incubados por varios días en presencia de heparina. Esta formación de complejos es mayor a pH ácido. Incluso el Wt muestra este tipo de agregados a bajo pH aunque con menor eficiencia. Sin embargo W50R presenta una tendencia a la agregación mayor a Wt.

La variante W50R induciría la formación de agregados proteicos en presencia de heparina por plegarse de tal forma que deja expuesto un sitio de unión accesible a la misma y además en condiciones de ácidas se favorece una protonación de residuos Histidina que están presentes en dicho sitio (Ramella,2012), por lo tanto existe una interacción electrostática entre las cargas negativas del ligando y las positivas provenientes de la proteína.

Unión a modelos de lípidos negativos: SDS

El SDS es un detergente cargado negativamente que tiene la capacidad de imitar ciertas características de las membranas biológicas en cuanto a la unión de proteínas. Se ha encontrado que en concentraciones por debajo de la concentración micelar crítica (0.7mM) promueve la formación de fibras amiloides. Se midió intensidad de ThT siguiendo lo explicado anteriormente (figura 8)

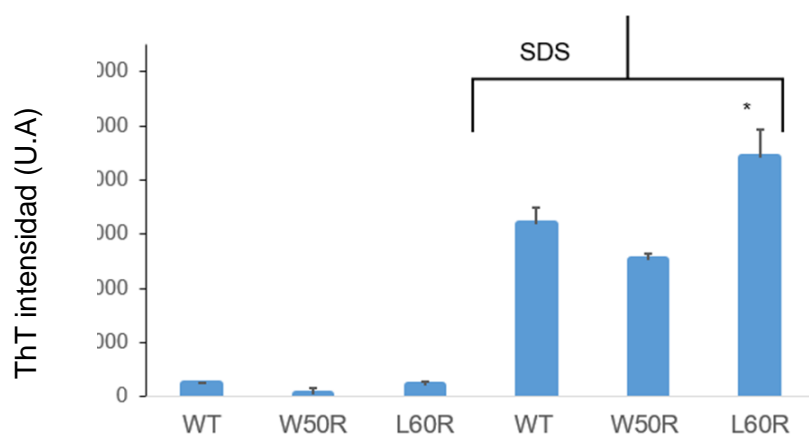


Figura 8: intensidad tioflavina T (ThT) de Wt y sus variantes. 0.2 mg/ml proteína en presencia o ausencia de 0.2 mM SDS. Se agregó una relación molar 1:1 de ThT en cada condición y posterior registro de la intensidad. (*) representa una diferencia significativa respecto de Wt con $p < 0.05$ aplicando test de student.

La figura indica que L60R mostraría una leve pero significativa mayor tendencia a formar agregados pro amiloides en presencia de SDS en las concentraciones submicelares haciendo factible la interacción de la variante con los lípidos negativos presentes en la membrana plasmática celular (Wettreich,1999) contribuyendo a la retención de la misma en un entorno pro inflamatorio.

Conclusiones

W50R evidencia una estructura secundaria relativamente menos estable respecto de la secuencia nativa teniendo en cuenta los resultados de la desnaturalización y un incremento en la unión a la sonda de Bis-ANS por lo que haría que esta mutación presente mayor flexibilidad. En cuanto a la unión con heparina la mutante presenta un incremento en la misma en condiciones ácidas, lo que podría implicar que el entorno pro inflamatorio tendría un papel importante en la agregación.

L60R por medio de la desnaturalización química con GndHCl evidenció una estructura secundaria menos estable que Wt y W50R, mostrando una pérdida del modelo de dos estados; teniendo en cuenta los resultados obtenidos de la unión proteína-Bis ANS resulta llamativo la disminución del rendimiento cuántico de la sonda pero este hecho se podría explicar debido a la disrupción del dominio cremallera de leucina por la incorporación de arginina (Gursky, 2012). En esta variante se observó un incremento de la tendencia de agregación en presencia de SDS, lo que favorecería la retención de L60R en un entorno pro inflamatorio (Wettreich,1999) donde se encuentran las proteasas al medio extracelular.

L60R presentó un incremento en la misma que podría explicarse por el hecho de la existencia de un sitio de clivaje para proteasas en la proteína, lo cual conduciría a una liberación de péptidos N-terminal en el intersticio renal.

Bibliografía

Booth, D. R., Tan, S. Y., Booth, S. E., Hsuan, J. J., Totty, N. F., Nguyen, O., Hutton, T..., Vigushin, D. M. (1995) A new apolipoprotein AI variant, Trp50Arg, causes hereditary amyloidosis Qjm 88, 695-702.

Das M, Mei X, Jayaraman S, Atkinson D and Gursky O. (2015) Structural Stability and Local Dynamics in Disease-Causing Mutants of Human Apolipoprotein A-I: What Makes the Protein Amyloidogenic? doi: 10.1016/j.jmb.2015.10.029

Gregorini G, Izzi C, Obici L, et al.(2005) Renal apolipoprotein A-I amyloidosis: a rare and usually ignored cause of hereditary tubulointerstitial nephritis. J Am Soc Nephrol.; 16(12):3680-3686. doi:10.1681/ASN.2005040382

Gursky O, Mei X, and Atkinson D. (2012) The Crystal Structure of the C-Terminal Truncated Apolipoprotein A-I Sheds New Light on Amyloid Formation by the N-Terminal Fragment.

Munishkina, L.A. and Fink, A.L. (2007) Fluorescence as a method to reveal structures and membrane interactions of amyloidogenic proteins. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1768, 1862–1885

Ramella, N. A., Rimoldi, O. J., Prieto, E. D., Schinella, G. R., Sanchez, S. A., Jaureguiberry, M. S....Tricerri, M.A (2011) Human apolipoprotein A-I-derived amyloid: its association with atherosclerosis PLoS One 6, e22532.

Ramella N.A, Schinella G.R and Ferreira S.T, et al. (2012) Human apolipoprotein A-I natural variants: molecular mechanisms underlying amyloidogenic propensity. PLoS One.;7 (8):e43755. doi:10.1371/journal.pone.0043755

Rosú S.A, Rimoldi OJ, Prieto E.D, Curto L.M, Delfino J.M, Ramella N.A and Tricerri M.A (2015). Amyloidogenic Propensity of a Natural Variant of Human Apolipoprotein A-I: Stability and Interaction with Ligands. PLoS ONE 10(5):e0124946.doi:10.1371/ journal.pone.0124946

Soutar, A. K., Hawkins, P. N., Vigushin, D. M., Tennent, G. A., Booth, S. E., Hutton, T., Nguyen, O., Totty, N. F....,Feest, T. G.,(1992) Apolipoprotein AI mutation Arg-60 causes autosomal dominant amyloidosis Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 89, 7389-7393

Wettreich A, Sebollela A, Carvalho MA, Azevedo SP, Ferreira T, and Coelho-sampaio T (1999). Acidic pH Modulates the Interaction between Human Granulocyte- Macrophage Colonystimulating Factor and Glycosaminoglycans *. 1999; 274(44):31468-31475