

APROXIMACIONS EXPERIMENTALS A L'ESTUDI DEL PROCÉS D'AGREGACIÓ DE LA PROTEÏNA β -AMILOIDE: UNA AVALUACIÓ CRÍTICA

MONTSERRAT CRUZ, DOLORS GRILLO, FRANCESC RABANAL* I ERNEST GIRALT*

Departament de Química Orgànica. Facultat de Química. Universitat de Barcelona.

* Adreça per a la correspondència: Departament de Química Orgànica. Facultat de Química. Universitat de Barcelona. Carrer de Martí i Franquès, 1-11. 08029 Barcelona. Adreça electrònica: giralt@qo.ub.es; rabanal@qo.ub.es.

Paraules clau: Proteïna β -amiloide, malaltia d'Alzheimer, fibril·logènesi, estudis estructurals, cinètica.

Keywords: β -amyloid protein, Alzheimer's disease, fibrillogenesis, structural assays, kinetics.

RESUM

L'estudi de les proteïnes amiloides i del seu comportament en solució ha adquirit en els darrers anys una rellevància especial a causa de la implicació que tenen en una àmplia varietat de malalties, com la malaltia d'Alzheimer. Aquest article és una recopilació sobre els diferents aspectes de l'agregació de les proteïnes amiloides, on es descriuen les diverses tècniques emprades en aquest camp per a la detecció, quantificació i estudi estructural de les fibrilles amiloides, tot aprofundint en els seus avantatges i inconvenients. També s'analitzen alguns models rellevants proposats com a mecanisme de l'agregació amb la utilització aquestes tècniques.

SUMMARY

There is an increased interest in studying amyloid proteins and its properties due to their implication in a variety of disorders such as Alzheimer's disease. This article is an overview on the different aspects of amyloid aggregation. Several techniques that are commonly used to study amyloid fibril detection and quantification are summarised. Structural and kinetic studies as well as some of the most relevant models proposed are discussed.

INTRODUCCIÓ

Avui dia es coneixen en l'organisme humà més de vint proteïnes amb capacitat amiloïdògena (Kisilevsky, 2000). Aquestes proteïnes no estan relacionades en la seva estructura primària ni en el seu origen biològic, sinó que presenten com a característica comuna la seva capacitat d'associar-se, partint d'una estructura soluble, per a donar lloc a dipòsits de fibrilles insolubles amb una estructura central β creuada, com s'esquematitza a la figura 1 (Sunde i Blake, 1997), anomenades *fibrilles amiloides*. L'elevat interès en l'estudi d'aquestes proteïnes es justifica pel fet que els dipòsits amiloides estan relacionats amb malalties tan diverses i rellevants com són la malaltia d'Alzheimer, la diabetis de tipus II i la malaltia de Creutzfeldt-Jacob (incloent-hi la variant humana de l'encefalopatia espongi-forme bovina, popularment anomenada *malaltia de les «vaques boges»*). A més, s'ha observat que un elevat nombre de proteïnes i pèptids poden donar lloc a fibrilles amiloides *in vitro* sota condicions apropiades.

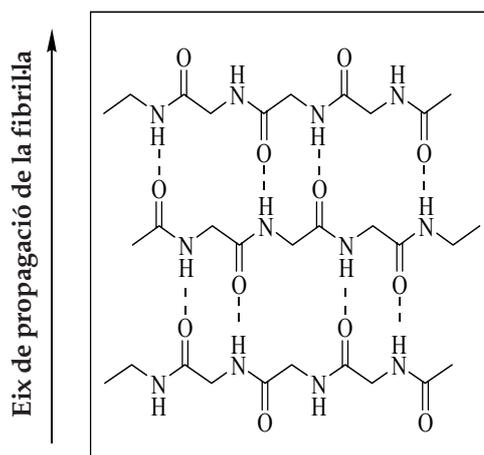


FIGURA 1. L'estructura β -creuada es caracteritza perquè presenta l'esquelet peptídic en forma de làmines β que es disposen perpendicularment a la direcció de creixement de la fibra. Els enllaços d'hidrogen són paral·lels a la direcció de creixement de la fibra.

Així doncs, l'estudi del procés de fibril·logènesi no solament té interès científic per a ampliar els coneixements sobre el plegament de proteïnes, sinó que també pot donar lloc a noves aproximacions a la prevenció i tractament de les malalties amiloïdògeniques. Un fet que cal destacar en aquestes malalties és que encara que algunes són sistèmiques (generalitzades), normalment els dipòsits es localitzen en un únic òrgan, cosa que sembla indicar l'existència de factors desencadenants del plegament anormal de les proteïnes amiloïdògeniques.

En el conjunt de les proteïnes amiloides, la proteïna β -amiloide (β A) és una de les més estudiades, ja que diverses dades apunten que té un paper destacat en la malaltia d'Alzheimer (Iversen *et al.*, 1995), el tipus de demència senil més comú —al voltant d'un 15 % de la població major de 65 anys presenta algun tipus de demència senil, i es calcula que d'aquí a 5 anys hi haurà uns 22 milions d'afectats només als Estats Units (George-Hyslop, 2001). La proteïna β A es presenta dipositada en forma de fibrilles en les anomenades *plaques neurítiques*. La hipòtesi amiloide sobre la malaltia d'Alzheimer sosté que la fibril·logènesi de la proteïna β A és la causant de la cascada de processos que desemboquen en la mort neuronal i el deteriorament de les capacitats cognitives pròpies d'aquesta alteració. Per aquesta raó, l'elucidació del mecanisme pel qual té lloc la fibril·logènesi presenta una rellevància especial.

El terme β A es fa servir en referència a una família de proteïnes amb una llargada que oscil·la entre 39 i 43 aminoàcids i que, en condicions normals, se segrega a les neurones per escissió d'una proteïna transmembranal anomenada *proteïna precursora de la proteïna β A* (APP) (Selkoe, 1998). Les mutacions que comporten tant la sobreproducció d'APP com un augment de l'activitat d'al-

gunes de les proteases implicades en la formació de β A poden donar lloc a l'inici prematur de la malaltia i a casos aguts, com succeeix en el cas de les persones amb síndrome de Down (Dumery *et al.*, 2001; Sinha i Lieberburg, 1999).

Malgrat que no s'ha descobert encara la funció fisiològica concreta de la proteïna β A, s'ha vist que es presenta en concentracions que oscil·len entre 10 i 500 pM en el líquid cerebrospinal i en el torrent sanguini de les persones sanes, i no es troben diferències significatives amb les concentracions observades als malalts d'Alzheimer. Les formes més abundants de la proteïna β A són β A(1-40) i β A(1-42), i encara avui existeix controvèrsia sobre el desencadenant del procés d'agregació *in vivo*, tot i que molts autors mantenen que és la variant de 42 aminoàcids la que presenta una major capacitat amiloïdogènica (Jarret *et al.*, 1993). Els estudis *in vitro* apunten que només les formes agregades d'estructura fibrillar de la proteïna β A són neurotòxiques; per tant, l'estudi del procés de fibril·logènesi (també anomenat *d'envelliment*) i dels seus factors prenen part en la comprensió de la malaltia (Zagorski *et al.*, 1999).

Tot i que molts aspectes de la malaltia d'Alzheimer no s'han aclarit encara, sembla que l'estudi i elucidació del mecanisme pel qual la proteïna β A agrega i dona fibrilles pot ser crucial per a comprendre els processos bioquímics i biofísics associats amb ella i, potser, amb altres malalties causades per proteïnes amiloides. Així doncs, avui dia trobem una gran quantitat de material bibliogràfic on, basant-se en diverses aproximacions, s'estudia tant l'estructura de les fibrilles amiloides madures de β A, com el procés que porta a la seva formació, a més de la seva citotoxicitat i interrelació amb altres compostos. Malgrat això, gran part de la bibliografia presenta resultats contradictoris i l'únic tema sobre el qual

tots els investigadors han estat sempre d'acord és la dificultat que implica l'estudi de β A.

L'inconvenient més important que es troba a l'hora de treballar amb un pèptid amiloide és la dificultat que implica la seva manipulació, proporcional a la seva capacitat amiloïdogènica. Un exemple clar el constitueix la discrepància de resultats que es poden obtenir fent servir lots diferents de pèptid β A, atribuïts, entre d'altres causes, a la diferència dels estats d'agregació inicial (Howlett *et al.*, 1995), a més de a la presència d'ions metàl·lics polivalents, sals, diferències de pH, dissolvents orgànics i contaminants de naturalesa diversa (Zagorski *et al.*, 1999). Així, l'elevat nombre de factors que influeixen en la fibril·logènesi, juntament amb la impossibilitat d'obtenir fibrilles de β A en forma cristal·lina per al seu estudi mitjançant tècniques d'alta resolució, com són difracció de raigs X o ressonància magnètica nuclear (RMN), són les principals causes de confusió en els articles especialitzats.

Un avantatge de les proteïnes amiloides que s'intenta aprofitar al màxim és l'elevada semblança en l'estructura de les fibrilles que formen, tot i estar constituïdes per una gran varietat de proteïnes i pèptids amb llargàries i seqüències molt variades. Aquesta observació és el fonament de molts estudis on s'extrapolen els resultats obtinguts amb proteïnes amiloides de més fàcil manipulació, com ara la transtiretina (TTR) o fragments peptídics sintètics, a proteïnes amiloides més problemàtiques, com la β A. Aquest elevat grau de similitud entre les estructures donades per diferents proteïnes amiloides porta a pensar en la possibilitat de trobar un mecanisme d'agregació general partint de l'estudi d'una d'aquestes proteïnes, cosa que podria comportar una forma de tractament universal per a les malalties amiloides.

EL PROCÉS D'AGREGACIÓ DE βA

El procés d'agregació, com ja hem dit, encara no es troba aclarit. Ara per ara només podem assegurar que βA és segregada a la membrana cel·lular en forma soluble i que mitjançant un mecanisme d'associació no totalment entès, dóna lloc a agregats fibrillars, els quals desencadenen la mort neuronal. Els experts encara es troben a l'estadi de postular noves hipòtesis basant-se en observacions experimentals realitzades en condicions cada vegada més properes a les condicions *in vivo* i acotant més els factors responsables de la variabilitat i irreproduïbilitat, a més de fer servir tècniques amb major sensibilitat. Però aquests models encara no estan lliures de possibles artefactes associats al treball *in vitro* i la precisió dels mètodes utilitzats no permet encara una resolució a nivell atòmic ni del procés d'agregació ni dels productes d'aquest.

Generalment s'ha acceptat que el procés d'agregació de les proteïnes amiloides té

lloc mitjançant un mecanisme dependent de nucleació, com s'indica a la figura 2. En aquest procés es postula que, partint d'una espècie soluble de βA , aquesta s'associa i dóna un nucli d'agregació al qual ràpidament s'incorporen més espècies solubles, i dóna lloc així a les fibrilles madures. Aquesta teoria es basa en l'observació d'una cinètica d'agregació sigmoïdal i és corroborada quan s'empren fibrilles madures per a sembrar (Jarret *et al.*, 1993; Goldsbury *et al.*, 2000).

Alguns autors, anant una mica més lluny, apunten que l'agregació de les proteïnes amiloides *in vivo* és consistent amb un procés de nucleació governat per factors específics de teixit, ja que tot i que molts pèptids amiloidogènics es troben circulant lliurement pel torrent sanguini i presenten la mateixa concentració en tots els òrgans, la seva deposició es fa de forma selectiva en alguns òrgans, cosa que fa pensar que el procés no solament depèn de la concentració

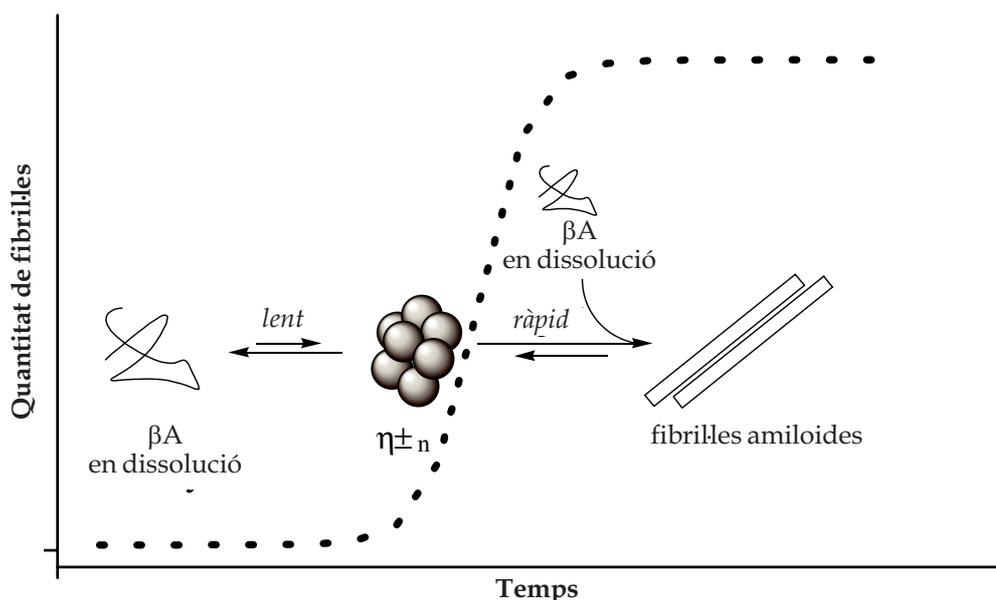


FIGURA 2. Mecanisme hipotètic d'agregació dependent de nucleació.

(com és el cas als processos dependents de nucleació) sinó que també està relacionat amb altres variables del medi fisiològic on es troben (Kisilevsky, 2000). Actualment, la utilització de noves tècniques en els estudis cinètics han donat lloc a models d'agregació més complexos que els que introduïm aquí. Per a poder determinar l'interès i les limitacions d'aquests models és necessari introduir alguns conceptes addicionals sobre les tècniques emprades en l'estudi d'aquestes estructures.

Les fibrilles amiloides, resultat final del procés d'agregació, es van descriure per primera vegada el 1959, gràcies a la utilització de la microscòpia electrònica, i el 1967 ja es va postular el primer model sobre la seva estructura (Shiraham i Cohen, 1967), el qual és vigent encara avui dia. Es va observar que les fibrilles de transtiretina presenten un diàmetre de 75-80 Å i estan formades per cinc protofibrilles de 25-35 Å. Aquestes protofibrilles estan formades a la seva vegada per subprotofibrilles de 10-15 Å, com es mostra a la figura 3.

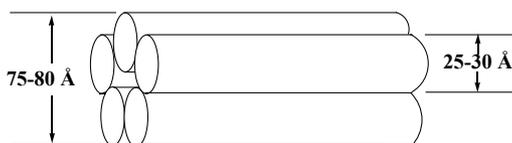


FIGURA 3. Fibrilla de TTR segons el model proposat per Shiraham i Cohen (1967).

Aquestes fibrilles no presenten ramificacions i, a més de caracteritzar-se per la seva morfologia, també poden ser identificades

per les seves propietats enfront de determinats colorants. Així l'ordenació en forma d'estructura β creuada fa que el roig Congo (CR) s'orienti en presència de fibrilles amiloides i doni, en ser observat sota llum polaritzada, birefringència d'un color verd poma característic, prova del caràcter amiloide de les estructures observades (Castaño *et al.*, 1986). Un comportament similar s'observa amb la tioflavina T (ThT), una substància fluorescent que presenta un augment en la seva intensitat d'emissió i un desplaçament en la seva longitud d'ona d'excitació, que passa de 415 nm a 450 nm en presència de fibrilles amiloides i que s'utilitza com a mètode de quantificació del grau de fibril·logènesi. Tot i que són àmpliament utilitzades actualment, la crítica més estesa a aquestes substàncies és el desconeixement sobre el tipus d'interacció amb les fibrilles amiloides.

Quan es vol començar a estudiar l'agregació de la proteïna β A, i atesos els problemes que comporta, sorgeix una pregunta molt important: Quina ha de ser la proteïna amb la qual s'ha de treballar? És millor treballar amb models peptídics o amb β A naturals? En els estudis del procés d'agregació de la proteïna β A es troben diverses aproximacions que intenten donar solució tant als problemes generals presents en les proteïnes amiloides, com als particulars de β A. D'aquesta forma hi ha estudis tant amb proteïnes β A naturals com amb diversos models. Dins dels treballs on es fa servir la proteïna natural, podem observar com una major part d'ells opten per l'ús de la variant

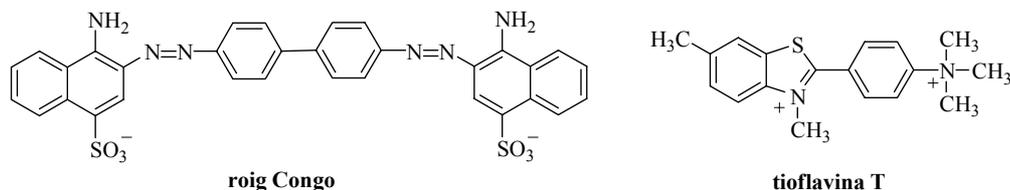


FIGURA 4. Estructura del roig Congo i la tioflavina T, compostos que interaccionen amb fibrilles amiloides.

β A(1-40) i només alguns fan servir la proteïna β A(1-42) tot i que els resultats *in vitro* semblen indicar que aquesta segona és la iniciadora del procés d'agregació (Jarret *et al.*, 1993):

¹Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-Ile-Ala-⁴³Thr

Aquesta possible incongruència té un origen pragmàtic: la proteïna β A(1-42), per la seva elevada capacitat amiloïdogenica, resulta altament insoluble en condicions aquoses, sobretot entre pH 4 i 7, i això fa necessari l'ús d'additius per a poder iniciar l'experiment amb el pèptid en dissolució en les concentracions de treball habituals. Aquests additius (normalment dissolvents orgànics, com l'acetnitril, o agents desestructurants, del tipus del sulfòxid de dime-til, hexafluoroisopropanol, trifluoroetanol, urea o clorur de guanidini) poden influir de forma crítica en la cinètica d'agregació, a més de fer-ho sobre les propietats de les fibrilles obtingudes (Zagorski *et al.*, 1999; Goldsbury *et al.*, 2000). Tot i aquests inconvenients, l'ús d'additius és també freqüent amb el pèptid β A(1-40), amb el qual es fan servir per a facilitar la seva solubilitat o, simplement, per a obtenir resultats més reproduïbles. Una raó a favor de la utilització de β A(1-40) en lloc de β A(1-42) és el fet que, malgrat que sota un punt de vista cinètic els dos pèptids es comporten de manera molt diferent (i això fa que sigui tan difícil treballar amb β A(1-42) però també que, probablement, sigui l'iniciador del procés d'agregació *in vivo*), sembla que les fibrilles a les quals donen lloc presenten una estabilitat termodinàmica comparable, i a més presenten una morfologia equivalent (Jarret *et al.*, 1993).

Una altra aproximació comuna per a simplificar la problemàtica que presenta el treball experimental amb la proteïna β A, és

la utilització de models peptídics. Normalment es fan servir pèptids que, tot contenint part de la seqüència de la proteïna natural, són capaços de donar lloc a fibrilles amiloïdes *in vitro*. Així, podem trobar articles on es fan servir fragments relativament grans, com el β A(1-28) o el β A(10-35) i d'altres més curts com el β A(12-28), el β A(12-26) o el β A(26-42). En la majoria dels casos, tots aquest pèptids són molt més solubles que les formes naturals de la proteïna β A. L'elecció d'aquests pèptids model és complexa, ja que és molt desitjable que presentin el màxim nombre de propietats de la proteïna natural, i la capacitat de formació de fibrilles és la més important per a l'estudi del procés d'agregació, però no l'única important.

La majoria dels pèptids model inclouen el fragment β A(17-23), ja que experiments de mutagènesi dirigida han fet palesa la importància d'aquesta seqüència en el procés d'agregació (Wood *et al.*, 1995; Soto *et al.*, 1995), i els han identificat així com a residus importants en el plegament de la proteïna nativa que dona lloc a les fibrilles amiloïdes. D'altres estudis (Jarret *et al.*, 1993) també proven l'elevada importància de l'extrem C-terminal en la solubilitat cinètica dels pèptids β A; és a dir, que els fragments que no presenten aquesta regió transmembranal són solubles, de forma metaestable, tot i trobar-se molt per sobre del màxim de solubilitat a l'equilibri o solubilitat termodinàmica, la qual es molt semblant per a la majoria de segments de β A estudiats. Per aquest motiu els pèptids com el β A(26-42) no constitueixen bons models de β A, ja que presenten, de forma accentuada, els mateixos problemes de manipulació difícil associats a la proteïna natural.

Un altre criteri per a l'elecció d'un model peptídic, sobretot si es vol estudiar la relació estructura fibrillar/capacitat d'agregació i resposta *in vivo*, és la citotoxicitat, la qual és

característica de la proteïna β A natural. D'aquesta manera, un model molt emprat per a l'assaig d'inhibició de la toxicitat de β A és el fragment β A(25-35), del qual s'ha descrit que presenta toxicitat independentment del seu estat d'agregació (Forloni *et al.*, 1997), encara que la seva capacitat amiloïdogènica és encara motiu de controvèrsia. D'altres autors fan servir com a criteris d'elecció per als seus models, a més dels esmentats anteriorment, la capacitat del pèptid de dipositar-se sobre plaques amiloïdes madures (Lynn i Meredith, 2000), com és el cas del fragment β A(10-35), o bé criteris de solubilitat cinètica en les condicions de realització de l'experiment, molt important quan volen utilitzar-se tècniques que, com la ressonància magnètica nuclear, requereixen treballar amb concentracions elevades de pèptid.

Coneixent l'àmplia varietat de models que s'han fet servir en l'estudi del comportament del pèptid β A, cal no oblidar el risc que implica treballar-hi, ja que es poden treure conclusions no extrapolables a la proteïna natural, i aquesta probabilitat és major quan més simple és el model emprat. També és important, a l'hora de comparar resultats de diferents investigacions, parar atenció al pèptid model, ja que això ens pot donar una idea sobre la generalització de les observacions.

ESTUDIS CINÈTICS. EINES I RESULTATS

Un mètode molt emprat per a mesurar l'agregació en sistemes biològics és la turbidimetria. Aquesta tècnica, que es basa a mesurar la disminució de la llum transmesa a través d'una mostra a causa de les pèrdues per dispersió en incidir sobre les partícules en suspensió (normalment a una $\lambda \approx 350$ -450 nm), té l'avantatge de ser accessible a molts laboratoris, ja que requereix, simple-

ment, un espectrofotòmetre d'ultraviolat visible. Un inconvenient és que, per a obtenir una dependència lineal entre la turbidimetria (T) i la concentració, és necessari: *a*) que l'agregat sigui un cilindre rígid de monòmers òpticament isotròpics; *b*) que els cilindres siguin monodispersos; *c*) que estiguin orientats aleatòriament; *d*) que el diàmetre del cilindre sigui molt més petit que la seva longitud i més petit, també, que la longitud d'ona de la radiació utilitzada; *e*) que la relació entre la longitud del cilindre i la longitud d'ona sigui més gran que 3,5, cosa que implica, fent servir condicions estàndards de mesura, unes fibrilles de longitud superior a 1,2 μ m.

Quan es fa servir la turbidimetria com a mètode per a quantificar el procés de fibrillogènesi s'ha de tenir en compte que aquesta tècnica no proporciona ni informació estructural ni informació sobre els oligòmers més petits. A més, s'ha de recordar que les mostres normalment no són homogènies, com seria desitjable per a una mesura correcta, i poden coexistir agregats fibrillars juntament amb estructures amorfes, les quals també contribueixen a la dispersió total. Així doncs, tot i que els primers estudis cinètics de l'agregació de β A (Jarret *et al.*, 1993) es van fer mitjançant un seguiment turbidimètric i van donar una idea aproximada sobre el procés d'agregació, cal ser molt crítics a l'hora d'interpretar els resultats que proporciona. Per aquest motiu, tot i que avui dia encara es fa servir la turbidimetria per a avaluar l'estat d'agregació de β A (Goldsbury *et al.*, 2000), cal combinar-la sempre amb altres tècniques que donin informació sobre la naturalesa dels agregats, com són l'assaig de CR quantitatiu o bé les mesures de fluorescència amb ThT (Klunk *et al.*, 1999; LeVine, 1993).

Tant l'assaig de CR quantitatiu com el de fluorescència amb ThT resulten d'una gran utilitat quan es pretén determinar el contin-

gut, de forma quantitativa, d'estructures amiloides. Un problema que presenten, com ja hem dit, és la desconeixença que es té sobre la seva forma d'actuació. Per aquest motiu, i tot i la utilitat que han presentat en corroborar les dades cinètiques observades mitjançant turbidimetria, aquests assaigs s'han de fer servir amb molta cura, ja que s'ha observat inespecificitat de ThT en alguns casos, on no ha estat capaç de distingir fibrilles amiloides d'altres tipus de morfologies (Tjernberg, 1999). A més a més, hi ha descrites incongruències entre resultats amb ThT i CR: Goldsbury i els seus col·laboradors (2000) van observar en lots antics de $\beta A(1-40)$ una absència de resposta en presència de ThT, mentre que els assaigs de CR i l'observació mitjançant microscòpia electrònica de transmissió (TEM) amb tinció negativa donaven resultats equiparables als obtinguts amb lots nous. Així doncs, tot i la seva utilitat, per tal com són mètodes d'assaig fàcilment aplicables i donen normalment una bona estimació del contingut amiloide, no hem d'oblidar que el desconeixement del mecanisme mitjançant el qual interaccionen amb les fibrilles no permet confiar únicament en una d'aquestes tècniques.

D'altres tècniques que poden donar informació sobre la quantitat d'estructura β , i per tant, fer una estimació indirecta de la formació de fibrilles amiloides, són el dicroisme circular i l'espectroscòpia infraroja de transformada de Fourier –la primera utilitzada només amb dissolucions (Szabo *et al.*, 1999). Aquestes tècniques, igual que les anteriors, no donen informació sobre la morfologia de les fibrilles presents, i no asseguren l'absència d'agregats d'estructura no fibrillar si aquests presenten el pèptid amb làmines β . Aquest darrer problema, però, queda aparentment resolt a partir dels estudis publicats molt recentment per Zurdo *et al.* (2001) en què s'aprofita la resistèn-

cia a proteases que presenten les fibrilles amiloides per a eliminar del medi els agregats amorfs que poden interferir en la detecció. D'altra banda, i sempre de manera complementària, s'han fet servir tècniques com la ultracentrifugació analítica i la cromatografia d'exclusió molecular com a eines en l'avaluació de la mida i la quantitat de les espècies solubles.

Les tècniques de dispersió de llum làser, tant estàtica com dinàmica, permeten obtenir informació estructural, ja que es basen en una utilització més elaborada de les propietats de dispersió de llum ja vistes en el cas de la turbidimetria. En aquestes tècniques es mesura la llum làser dispersada per les partícules a un angle, normalment entre 15 i 150°, respecte del feix incident. L'avantatge més significatiu és la possibilitat d'estimar la mida de les partícules en suspensió i obtenir informació sobre la seva morfologia mitjançant una combinació de les tècniques estàtiques i dinàmiques. Aquesta eina dona la possibilitat de fer un model tenint en compte no solament el contingut amiloide, sinó també l'evolució de les fibrilles formades al llarg del temps. Així, l'aplicació de l'espectroscòpia de dispersió quasi elàstica va permetre a Lomakin i als seus col·laboradors (1996) postular un model matemàtic detallat que permet descriure el comportament de $\beta A(1-40)$ en un medi de HCl 0,1 M, incloent-hi hipòtesis tant per a la generació de noves fibrilles com per al creixement d'aquestes. Aquest model es basa en l'observació de dos comportaments diferents, segons la concentració emprada: a concentracions superiors a 100 μM , concentració denominada *crítica*, la mida i la velocitat de creixement de les fibrilles és independent de la concentració, mentre que per sota sí que s'observa una dependència entre la velocitat de creixement i la concentració de monòmer. A més a més, s'obtenen fibrilles més llargues com més petita és la concentració.

Aquestes observacions es van explicar fent servir la capacitat tensioactiva de β A (Soreghan, 1994). Així, Lomakin va postular que per sobre de la concentració crítica, el pèptid β A era capaç de donar lloc a micelles, les quals donarien lloc a nuclis fibrillars que iniciarien de manera irreversible la formació de fibrilles per addició de monòmers, com s'esquemmatitza a la figura 4. En situacions on no s'arribés a la concentració crítica, la nucleació seria un procés heterogeni, desencadenat per petites partícules presents en la mostra. Aquest model estima que les micelles corresponen a un radi hidrodinàmic de 7 nm, mentre que el nucli fibrillar tindria un radi hidrodinàmic de només 4 nm.

La major crítica que es pot fer al model proposat per Lomakin i els seus col·laboradors és que es basa en assaigs realitzats en HCl 0,1 M com a dissolvent. Tot i que és comprensible la seva utilització, ja que permet un alentiment de la velocitat d'agregació, en principi massa elevada per a l'estudi detallat mitjançant aquesta tècnica, i que es pot justificar pel fet que mitjançant TEM no es van observar diferències amb les fibrilles obtingudes respecte a les observades a plaques amiloides, l'HCl 0,1 M es troba molt lluny de ser el que considerem *condicions fisiològiques*. Tenint en compte aquesta crítica, Murphy i Pallitto, (2000) van fer un estudi en condicions més similars a les fisiològiques (PBS, pH = 7,4). L'alentiment del procés d'agregació per al seu estudi espectroscòpic es va aconseguir en aquest cas treballant amb dissolucions mare de pèptid β A(1-40) desnaturalitzat amb urea 8 M, cosa que permet partir

de monòmers desestructurats, com va permetre corroborar la utilització de cromatografia d'exclusió molecular. Els resultats obtinguts amb aquest assaig semblen indicar que a concentracions elevades el creixement de les fibrilles es dona majoritàriament per associació entre els extrems de fibrilles més petites, mentre que a concentracions més baixes el que es formen són fibrilles d'un diàmetre de 4,8 nm, dada que és coherent amb el que es postula que presenten les protofibrilles, les quals acaben entrecruant-se i formant macroagregats que precipiten. Un fet observat, i que no estava inclòs al model de Lomakin i els seus col·laboradors, és la dissociació d'espècies solubles, molt probablement monòmers, de les fibrilles formades.

En aquest resultat, tot i obtenir-se en condicions més properes a les condicions fisiològiques, també es pot criticar la presència d'urea com a agent desestructurant en una concentració final de 0,4 M – cosa que podria influir en la morfologia de les fibrilles – i el fet de no fer servir tècniques complementàries, com la corroboració mitjançant TEM de les estructures fibrillars descrites mitjançant la tècnica de dispersió de llum làser estàtica.

ESTRUCTURA DE LES FIBRILLES AMILOIDES. RAIGS X I MICROSCÒPIA ELECTRÒNICA DE TRANSMISSIÓ

Una vegada analitzat el mecanisme de formació de les fibrilles amiloides, encara

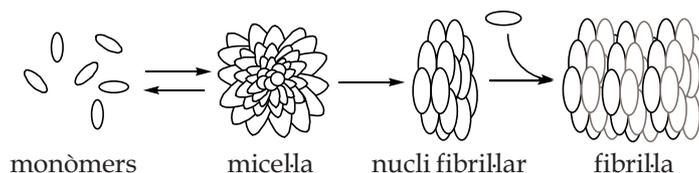


FIGURA 5. Mecanisme de nucleació homogeni proposat per Lomakin per a concentracions superiors a la crítica.

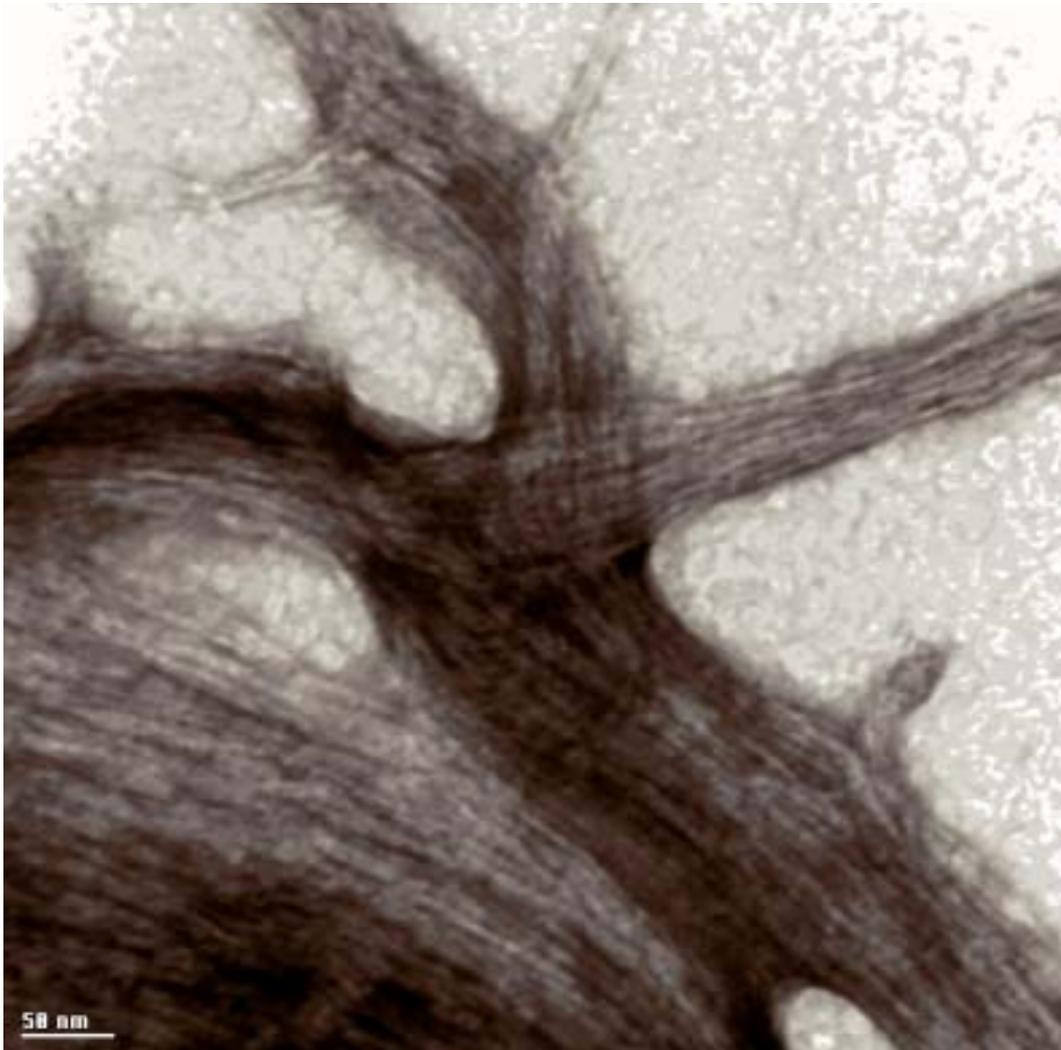


FIGURA 6. Micrografies: *a*) feix de fibrilles amiloides obtingut al nostre laboratori després d'envellir una dissolució 40 μ M del pèptid β A(1-42) en tampó fosfat amb pH = 7,4 (200.000 augments); *b*) feix de fibrilles observat en una dissolució aquosa de β A(25-35) envellida 7 dies (150.000 augments); *c*) fibrilles aïllades de β A(1-42) obtingudes en aigua a una concentració 100 μ M; *d*) fibrilles amiloides del pèptid β A(12-28) obtingudes a 600 μ M en tampó PBS i pH = 7,4; *e*) feix de fibrilles de β A(25-35) obtingudes en les mateixes condicions que a l'apartat *b*.

queda una pregunta cabdal: quina és l'estructura tridimensional d'aquest agregat? La resposta a aquesta qüestió, a més, podria donar també informació sobre la cinètica del procés d'agregació, sobretot si trobem una resposta a nivell atòmic que ens

permeti esbrinar quina és la conformació que presenta el pèptid a l'interior d'aquesta estructura ordenada i, per tant, quins són els requeriments previs per a la incorporació d'aquest sobre les fibrilles en creixement.

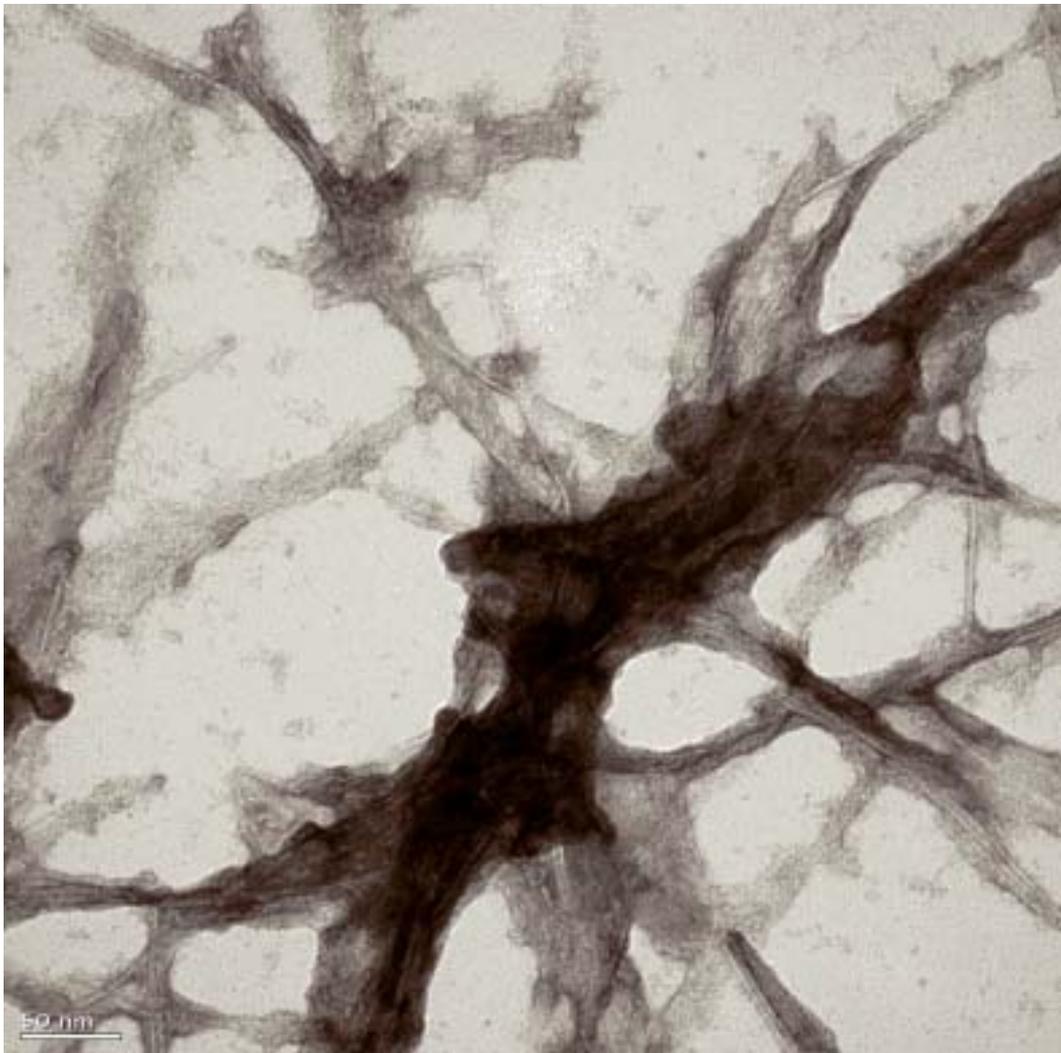


FIGURA 6b.

L'anàlisi mitjançant difracció de raigs X de diverses estructures amiloides presenta reflexions en forma d'arcs diametralment oposats, cosa que s'interpreta com a prova de la disposició de la proteïna en forma de làmina β -creuada. El model àmpliament acceptat per a aquest tipus d'estructura és el proposat per Pauling i Corey al 1951 per a la proteïna *fibroïna* de la seda (Pauling i Corey,

1951), on les làmines β es disposen de forma perpendicular a l'eix fibrillar, el qual és paral·lel a la direcció dels ponts d'hidrogen de l'esquelet. Els estudis amb TTR, la proteïna amiloide de la qual es disposa de més informació estructural i amb major resolució, van suggerir a Blake i Serpell (Blake i Serpell, 1996) que en realitat cada làmina β es troba empaquetada segons un gir de 15° res-

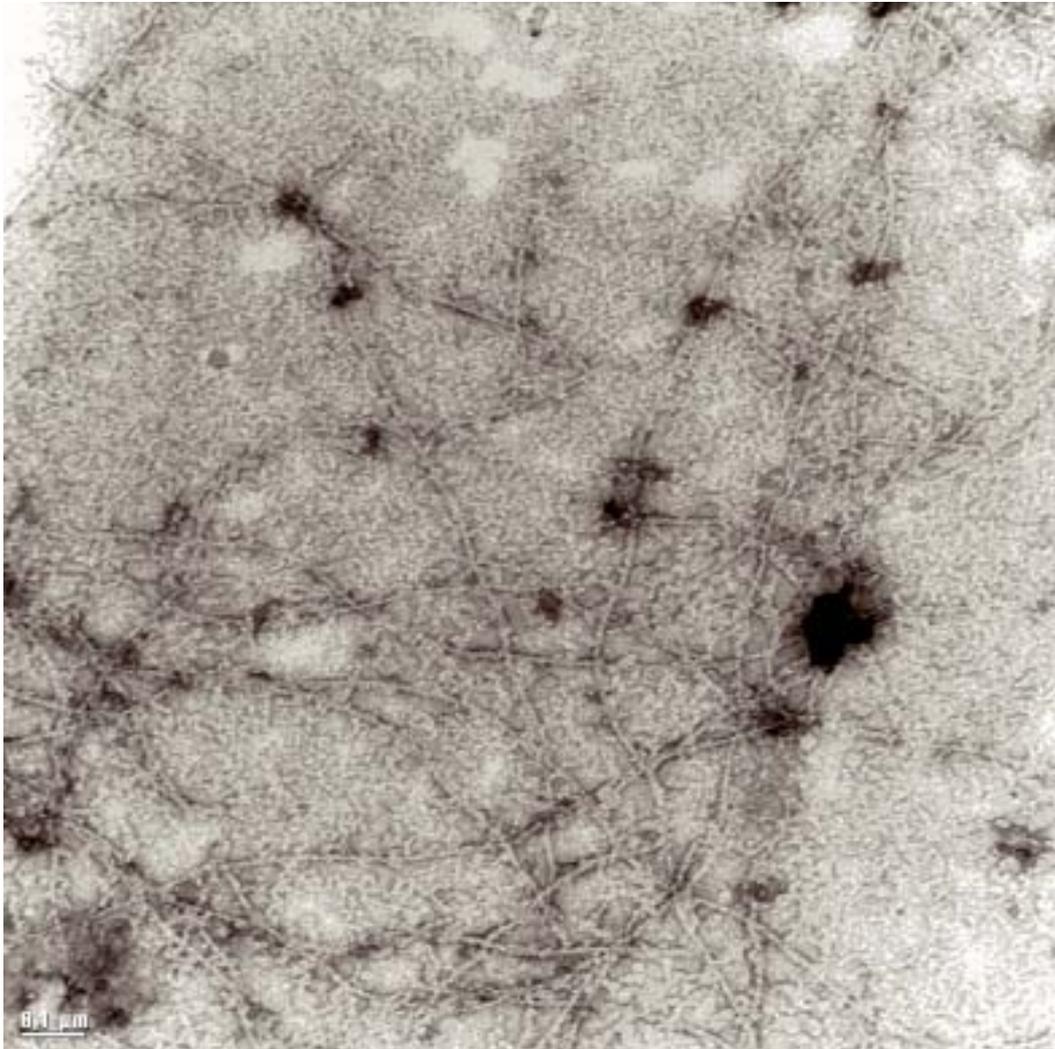


FIGURA 6c.

pecte del seu veí més proper, tot formant una «hèlix de làmines β » (Sunde i Blake, 1997), el qual es correspon amb dades obtingudes mitjançant la RMN en estat sòlid (Lansbury *et al.*, 1995). En aquest model cada protofibrilla està composta per quatre làmines β paral·leles. En canvi, Inouye i els seus col·laboradors (1998) van proposar, basant-se en resultats de difracció de raigs X molt

similars als de Blake i Serpell, un model format per monòmers de TTR apilats axialment per a donar lloc a una protofibrilla, on el monòmer no patia cap canvi de conformació i l'obtenció de fibrilles seria mitjançant la interacció lateral entre protofibrilles.

Com ja s'ha dit anteriorment, l'estudi mitjançant TEM de la proteïna TTR va donar lloc al model microscòpic, encara vàlid,

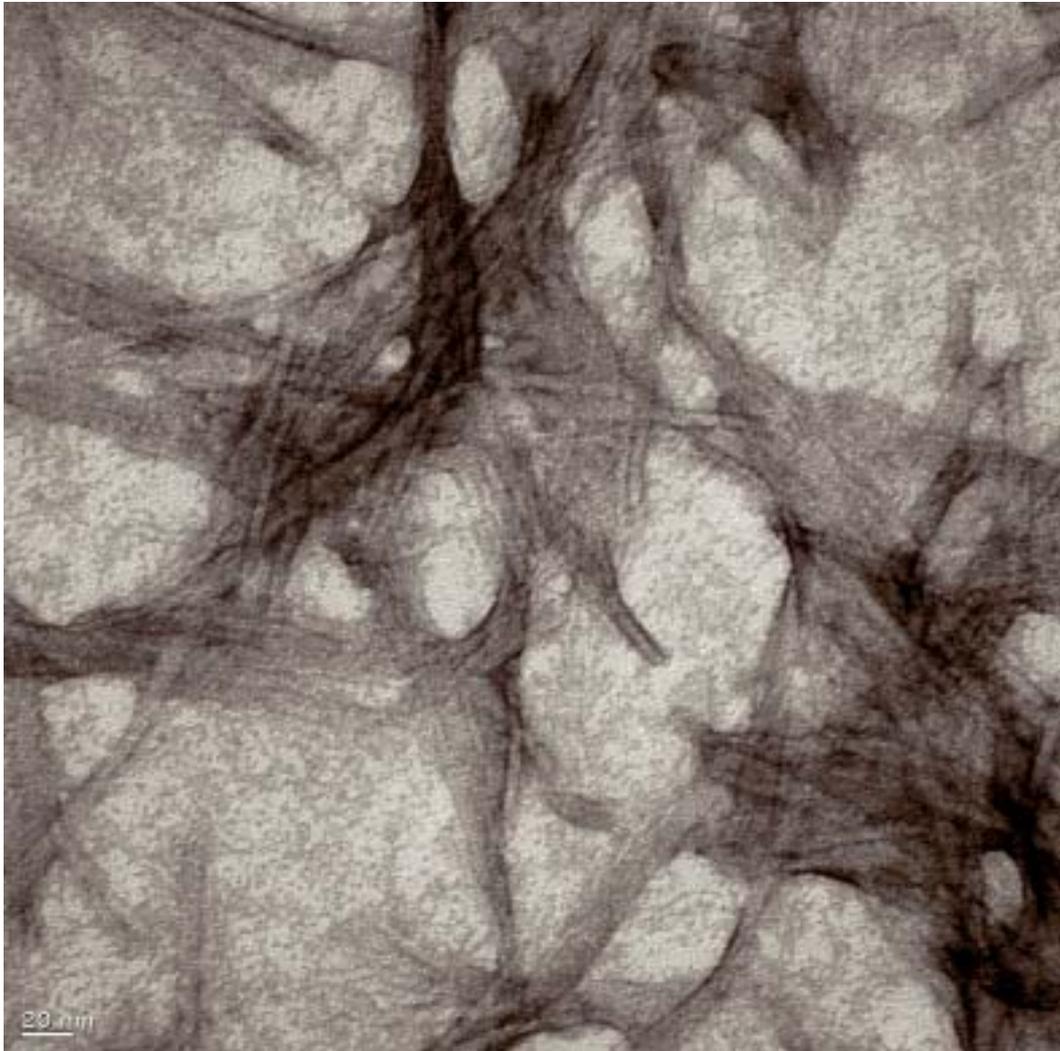


FIGURA 6d.

de la figura 3. L'anàlisi microscòpica de diverses proteïnes amiloides concorda amb aquestes dades, tot i que també es descriuen variacions en el nombre de protofibrilles associades lateralment per a donar la fibrilla amiloide. Goldsbury i els seus col·laboradors van fer recentment un intent d'explicar els diferents tipus de fibrilles observades per agregació de β A(1-40), tant en condi-

cions habituals com sota agitació. La combinació de TEM, i microscòpia electrònica de transmissió d'escombrat va permetre seguir l'evolució de les fibrilles amb el temps, a més d'estudiar la seva morfologia amb detall, cosa que els va permetre postular un model de fibril·logènesi que dóna lloc a tres tipus de fibrilles madures, compostes per dues, tres o quatre protofibrilles i en què



FIGURA 6e.

fins i tot es descriu l'existència d'estructures esfèriques d'una grandària corresponent a 50-200 monòmers i que podrien correspondre a les micelles descrites al model de Lomakin.

Tant els models microscòpics com els obtinguts a partir de raigs X no proporcionen prou dades per a saber l'orientació de les cadenes peptídiques. Per a obtenir més detalls

sobre el plegament del pèptid s'han fet servir tècniques de la RMN, les quals s'han dut a terme, en la majoria dels casos, amb pèptids model, o bé amb dissolvents orgànics o micelles. La RMN en estat sòlid dona informació sobre la disposició relativa de les cadenes peptídiques. Així, es pot trobar a la bibliografia els estudis de Lynn (Benzinger *et al.*, 1998; 2000), on es descriu una conforma-

ció de làmina β paral·lela per al fragment $\beta A(10-35)$, el qual es veu corroborat per les dades de la RMN en estat sòlid de *multiple quanta* obtingudes amb el pèptid $\beta A(1-40)$ pel grup de Tycko (Antzutkin *et al.*, 2000). Aquestes dades però, estan en discrepància aparent amb les de Lansbury i els seus col·laboradors (1995), que descriuen una estructura antiparal·lela a l'organització del pèptid $\beta A(34-42)$, com l'estructura descrita pel fragment $\beta A(16-22)$ també pel grup de Tycko (Balbach *et al.*, 2000). Aquestes dades semblen indicar que les proteïnes amiloides presenten una organització supramolecular variada, la qual depèn de la seqüència primària estudiada.

Finalment, una altra font de models que proven d'explicar l'estructura amiloide és el modelatge molecular. Així, podem trobar

models basats en l'homologia amb altres proteïnes amb capacitat amiloïdògena (Contreras *et al.*, 1999), o bé d'altres que uneixen dades biofísiques de diferents investigadors i proven de trobar una estructura que s'ajusti a totes les dades, com el que van fer Li i els seus col·laboradors (1999) en compatibilitzar el model de Blake (Blake i Serpell, 1996) amb la informació sobre els possibles girs presents a l'estructura (Hilbich *et al.*, 1991).

L'aparició de nous estudis, que combinen tècniques biofísiques d'elevada resolució, juntament amb altres estudis estructurals i de modelatge molecular, poden proporcionar en el futur una explicació més acurada sobre el mecanisme d'agregació de models peptídics i proteïnes amiloides i l'estructura tridimensional a la qual donen lloc,

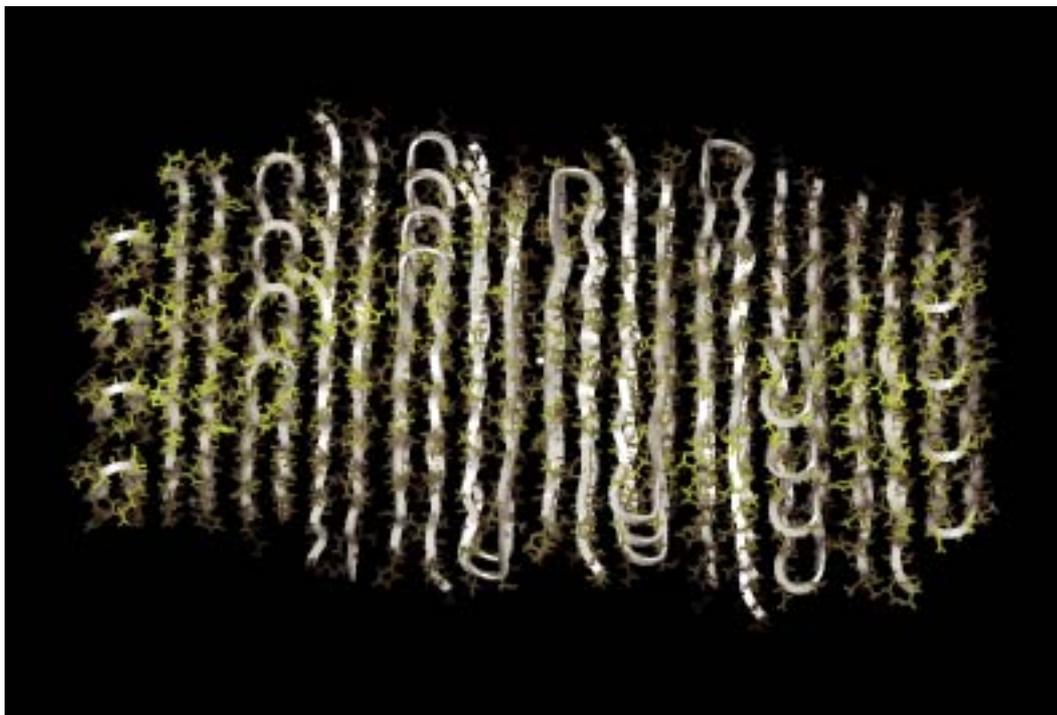


FIGURA 7. Modelització molecular del pèptid $\beta A(12-42)$ realitzat amb el programa Insight segons la proposta de Li *et al.* (1994). Les cintes en blanc representen l'esquelet peptídic de cada una de les 48 còpies de pèptid. En gris hi ha les cadenes laterals.

ja que, tot i que els models més recents expliquen moltes de les dades observades, no acaba d'haver-hi un acord entre diferents autors ni sobre quin és el model més raonable ni sobre la validesa de la majoria de condicions experimentals.

PERSPECTIVES FUTURES

El futur en aquest camp ve marcat per la manca de dades experimentals prou acurades que permetin obtenir d'una manera fiable una descripció a nivell atòmic de la proteïna β -amiloide agregada en forma de fibrilles. Fa de mal predir si serà la RMN (probablement en estat sòlid) o la difracció de raigs X, la tècnica que permetrà tenir accés a aquesta informació. També es fa difícil anticipar si caldrà esperar uns pocs mesos, alguns anys o moltes dècades. El que és, però, indubtable, és que en el moment en què aquest descobriment tingui lloc és produirà un canvi qualitatiu molt important amb vista a la comprensió de les malalties causades per proteïnes amiloïdògeniques.

El desenvolupament d'inhibidors del procés de fibril·logènesi és una de les aproximacions terapèutiques proposades per la malaltia d'Alzheimer, i tot i que no és l'aproximació més senzilla, el seu atractiu rau en la possibilitat d'obtenir una resposta extrapolable a diverses malalties molt importants.

Així, en el nostre laboratori hem descobert recentment que alguns pèptids N-metilats basats en la seqüència $\beta(17-21)$ són capaços d'interaccionar amb la proteïna $\beta A(1-42)$, n'inhibeixen la toxicitat enfront de cultius cel·lulars, i presenten, a més, una resistència enfront de proteases. Encara queda, però, trobar una correlació fiable entre l'activitat d'aquests pèptids i la forma en què interfereixen en el procés de fibril·logè-

nesi, encara que hi ha molts altres grups que es troben en la mateixa situació (Ghanta *et al.*, 1996; Lowe *et al.*, 2001; Gordon *et al.*, 2001)

Totes les aproximacions experimentals descrites en el present article prenen una importància especial en el context dels estudis de la relació entre l'estructura i l'activitat d'aquests inhibidors. En efecte, cal esperar que els propers anys siguin decisius per a veure si tots els esforços de tants laboratoris per entendre l'agregació de la proteïna β -amiloide permetran finalment desenvolupar un primer fàrmac eficaç per al tractament, o potser la prevenció, de malalties tan terribles per a la qualitat de vida com la malaltia d'Alzheimer.

BIBLIOGRAFIA

- ANTZUTKIN, O. N.; J. J. BALBACH; R. D. LEAPMAN; N. W. RIZZO; J. REED; R. TYCKO (2000). «Multiple quantum solid-state NMR indicates a parallel, not antiparallel, organization of β -sheets in Alzheimer's β amyloid fibrils». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 97, pàg. 13045-13050.
- BALBACH, J. J.; Y., ISHII; O. N. ANTZUTKIN; R. D. LEAPMAN; N. W. RIZZO; N. W. DYDA; J. REED; R. TYCKO (2000). «Amyloid fibril formation by a16-22, a seven-residue fragment of the Alzheimer's β -amyloid peptide, and structural characterization by solid state NMR». *Biochemistry*, núm. 39, pàg. 13748-13759.
- BENZINGER, T. L.; D. M. GREGORY; T. S. BURKOTH; H. MILLER-AUER; D. G. LYNN; R. E. BOTTO; S. C. MEREDITH (1998). «Propagating structure of Alzheimer's β -amyloid(10-35) is parallel β -sheet with residues in exact register». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 95, pàg. 13407-13412.
- BENZINGER, T. L.; D. M. GREGORY; T. S. BURKOTH; H. MILLER-AUER; D. G. LYNN; R. E. BOTTO; S. C. MEREDITH (2000). «Two-dimensional structure of β -amyloid(10-35) fibrils». *Biochemistry*, núm. 39, pàg. 3491-3499.
- BLAKE, C.; L. SERPELL (1996). «Synchrotron X-ray studies suggest that the core of the transthyretin amyloid fibrils is a continuous β -sheet helix». *Structure*, núm. 4, pàg. 989-998.
- CASTAÑO, E. M.; J. GHISO; F. PRELLI; P. D. GOREVIC; A. MIGHELI; B. FRANGIONE (1986). «*In vitro* formation of

- amyloid fibril from two synthetic peptides of different lengths homologous to Alzheimer's disease β -protein». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, núm. 141, pàg. 782-790.
- CONTRERAS, C. F.; M. A. CANALES; A. ALVAREZ; G. V. DEFERRARI; N. C. INESTROSA (1999). «Molecular modeling of the amyloid- β -peptide using homology to a fragment of triosephosphate isomerase that forms amyloid *in vitro*». *Protein Eng.*, núm. 12, pàg. 959-966.
- DUMERY, L.; F. BOURDEL; Y. SOUSSAN; A. FIALKOWSKY; S. VIALE; P. NICOLAS; M. REBOUD-RAVAUX (2001). « β -Amyloid protein aggregation: its implication in the pathophysiology of Alzheimer's disease». *Pathol. Biol.*, núm. 49, pàg. 72-85.
- FORLONI, G.; E. LUCCA; N. ANGERETTI; P. D. TORRE; M. SALMONA (1997). «Amidation of β -amyloid peptide strongly reduced the amyloidogenic activity without alteration of the neurotoxicity». *J. Neurochem.*, núm. 69, pàg. 2048-2054.
- GEORGE-HYSLOP, P. H. (2001). «Componentes de la enfermedad de Alzheimer». *Investigación y Ciencia*, núm. febrer, pàg. 50-57.
- GHANTA, J.; C. SHEN; L. L. KIESSLING; R. M. MURPHY (1996). «A Strategy for Designing Inhibitors of β -Amyloid Toxicity». *J. Biol. Chem.*, núm. 271, pàg. 29525-29528.
- GOLDSBURY, C. S.; S. WIRTZ; S. A. MÜLLER; S. SUDERJI; P. WICKI; U. AEBI; P. FREY (2000). «Studies on the *in vitro* assembly of $A\beta$ 1-40: Implications for the search for $A\beta$ -fibril formation inhibitors». *J. Struct. Biol.*, núm. 130, pàg. 217-231.
- GORDON, D. J.; K. L. SCIARRETTA; S. C. MEREDITH (2001). «Inhibition of β -amyloid(40) fibrillogenesis and disassembly of β -amyloid(40) fibrils by short β -amyloid congeners containing n-methyl amino acids at alternate residues». *Biochemistry*, núm. 40, pàg. 8237-8245.
- HILBICH, C.; B. KISTERS-WOIKE; R. REED; C. L. MASTERS; K. BEYREUTHER (1991). «Aggregation and secondary structure of synthetic amyloid β -A4 peptides of Alzheimer's disease». *J. Mol. Biol.*, núm. 218, pàg. 149-163.
- HOWLETT, D. R.; K. H. JENNINGS; D. C. LEE; M. S. G. CLARK; F. BROWN; R. WETZEL; S. J. WOOD; P. CAMILLERI; G. W. ROBERTS (1995). «Aggregation state and neurotoxic properties of Alzheimer beta-amyloid peptide». *Neurodegeneration*, núm. 4, pàg. 23-32.
- INOUE, H.; F. S. DOMINGUES; A. M. DUMAS; M. J. SARAIVA; E. LUNDGREN; E. SANDGEN; D. A. KIRSCHNER (1998). «Analysis of X-ray-diffraction patterns from amyloid of biopsied vitreous-humor and kidney of transthyretin (Tr) Met30 familial amyloidotic polyneuropathy (Fap) patients – axially arrayed Tr monomers constitute the protofilament». *Amyloid: Int. J. Exp. Clin. Invest.*, núm. 5, pàg. 163-174.
- IVERSEN, L. L.; R. J. MORTISHIRE-SMITH; S. J. POLLACK; M. S. SHEARMAN (1995). The toxicity *in vitro* of β -amyloid protein». *Biochemistry*, núm. 311, pàg. 1-16.
- JARRET, J. T.; E. P. BERGER; P. T. LANSBURY (1993). «The carboxy terminus of the β amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease». *Biochemistry*, núm. 32, pàg. 4693-4697.
- KISILEVSKY, R. (2000). «Amyloidogenesis – Unquestioned answers and unanswered questions». *J. Struct. Biol.*, núm. 130, pàg. 99-108.
- KLUNK, W. E.; R. F. JACOB; R. P. MASON (1999). «Quantifying amyloid β -peptide ($A\beta$) aggregation using the Congo red (CR- $A\beta$) spectrophotometric assay». *Anal. Biochem.*, núm. 266, pàg. 66-76.
- LANSBURY, P. T.; P. R. COSTA; J. M. GRIFFITHS; E. J. SIMON; M. AUGER; K. J. HALVERSON; D. A. KOCISKO; Z. S. HENDSCH; T. T. ASHBURN; R. G. S. SPENCER (1995). «Structural model for the beta-amyloid fibril based on interstrand alignment of an antiparallel-sheet comprising a C-terminal peptide». *Nat. Struct. Biol.*, núm. 2, pàg. 990-998.
- LEVINE, H. (1993). «Thioflavin T interaction with synthetic Alzheimer's disease β -amyloid peptides: Detection of amyloid aggregation in solution». *Protein Sci.*, núm. 2, pàg. 404-410.
- LI, L.; T. A. DARDEN; L. BARTOLOTTI; D. KOMINOS; L. G. PEDERSEN (1999). «An atomic model for the pleated β -sheet structure of $A\beta$ amyloid protofilaments». *Biophys. J.*, núm. 76, pàg. 2871-2878.
- LOMAKIN, A.; D. S. CHUNG; G. B. BENEDEK; D. A. KIRSCHNER (1996). «On the nucleation and growth of amyloid β -protein fibrils: Detection of nuclei and quantitation of rate constants». *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, núm. 93, pàg. 1125-1129.
- LOWE, T. L.; A. STRZELEC; L. L. KIESSLING; R. M. MURPHY (2001). «Structure-Function Relationships for Inhibitors of β -Amyloid Toxicity Containing the Recognition Sequence KKLIVFF». *Biochemistry*, núm. 40, pàg. 7882-7889.
- LYNN, D. G.; S. C. MEREDITH (2000). «Model peptides and the physicochemical approach to β -amyloids». *J. Struct. Biol.*, núm. 130, pàg. 153-173.
- MURPHY, R. M.; M. M. PALLITTO (2000). «Probing the kinetics of β -amyloid self-association». *J. Struct. Biol.*, núm. 130, pàg. 109-122.
- PAULING, L.; R. COREY (1951). «Configuration of polypeptide chains with favoured orientation around single bonds: two new pleated sheets». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 37, pàg. 729-739.
- SELKOE, D. J. (1998). «The cell biology of β -amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease». *Tr. Cell Biol.*, núm. 8, pàg. 447-453.
- SHIRAHAM, T.; A. COHEN (1967). «High-resolution electron microscopic analysis of the amyloid fibril». *J. Cell Biol.*, núm. 33, pàg. 679-708.

- SINHA, S.; I. LIEBERBURG (1999). «Cellular mechanism of β -amyloid production and secretion». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 96, pàg. 11049-11053.
- SOREGHAN, B. (1994). «Surfactant properties of Alzheimer's beta peptides and the mechanism of amyloid aggregation». *J. Biol. Chem.*, núm. 269, pàg. 28551-28554.
- SOTO, C.; E. M. CASTAÑOS; B. FRANGIONE; N. C. INESTROSA (1995). «The α -helical to β -strand transition in the amino-terminal fragment of the amyloid β -peptide modulates amyloid formation». *J. Biol. Chem.*, núm. 270, pàg. 3063-3067.
- SUNDE, M.; C. BLAKE. (1997). «The structure of amyloid fibrils by electron microscopy and X-ray diffraction». *Advan. Prot. Chem.*, núm. 50, pàg. 123-159.
- SZABO, P.; E. KLEMENT; K. JOST; M. ZARÁNDI; K. SOÓS; B. PENKE (1999) «An FT-IR study of the β -amyloid conformation: standardization of aggregation grade» *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, núm. 265, pàg. 297-300.
- TEPLOW, D. B. (1998). «Structural and kinetic features of amyloid β -protein fibrillogenesis». *Amyloid: Int. J. Exp. Clin. Invest.*, núm. 5, pàg. 121-142.
- TJERNBERG, L. O.; D. J. E. CALLAWAY; A. TJERNBERG; S. HAHNE; C. LILLIEHÖÖK; L. TERENIUS; J. THYBERG; C. NORDSTEDT (1999). «A molecular model of Alzheimer amyloid β -peptide fibril formation». *J. Biol. Chem.*, núm. 274, pàg. 12619-12625.
- TEENG, B. P.; W. P. ESLER; C. B. CLISH; E. R. STIMSON; J. R. GHILARDI; H. V. VINTERS; P. W. MANTYH; J. P. LEE; J. E. MAGGIO (1999). «Deposition of monomeric, not oligomeric, $\alpha\beta$ mediates growth of Alzheimer's disease amyloid plaques in human brain preparations». *Biochemistry*, núm. 38, pàg. 10424-10431.
- WOOD, S. J.; R. WETZEL; J. D. MARTIN; M. R. HURLE (1995). «Prolines and amyloidogenicity in fragments of the Alzheimer's peptide β /A4». *Biochemistry*, núm. 34, pàg. 724-730.
- ZAGORSKI, M. G.; J. YANG; H. SHAO; K. MA; H. ZENG; A. HONG (1999). «Methodological and chemical factors affecting amyloid β -peptide amyloidogenicity». *Meth. Enzymol.*, núm. 309, pàg. 189-235.
- ZURDO, J.; I. GUIJARRO; C. M. DOBSON (2001). «Preparation and characterization of purified amyloid fibrils». *J. Am. Chem. Soc.*, núm. 123, pàg. 8141-8142.