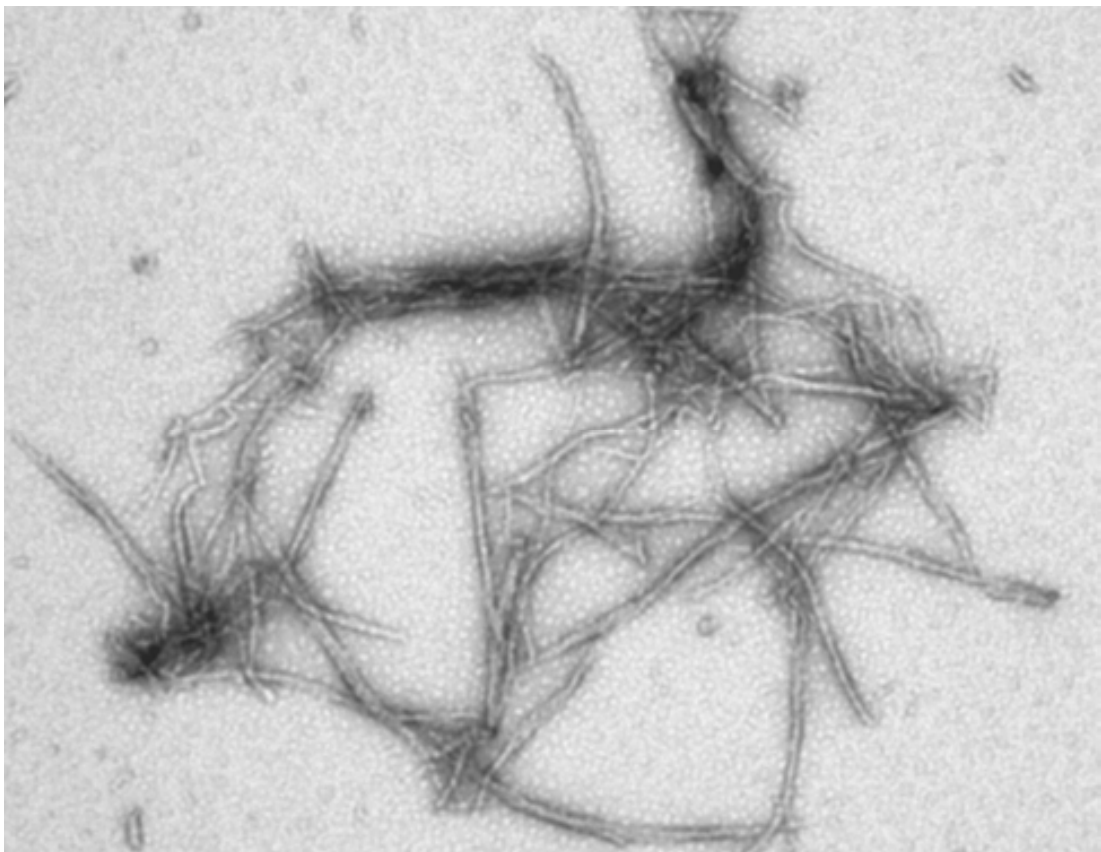


*Universitat Autònoma de Barcelona  
Dept. de Bioquímica i Biologia Molecular  
Unitat de Biofísica i Centre d'Estudis en Biofísica (CEB)*

## **TESI DOCTORAL**

---

***Propietats Amiloidogèniques Del Fragment  
185-208 de la Proteïna Priònica Humana.  
Comparació amb el Pèptid A $\beta$ (1-28) de la Malaltia d'Alzheimer***



***Marta Cortijo Arellano  
Febrer 2008***

***PROPIETATS AMILOIDOGÈNIQUES DEL  
FRAGMENT 185-208 DE LA PROTEÏNA  
PRIÒNICA HUMANA.***

*COMPARACIÓ AMB EL PÈPTID A $\beta$ (1-28) DE LA MALALTIA D'ALZHEIMER*

Marta Cortijo Arellano

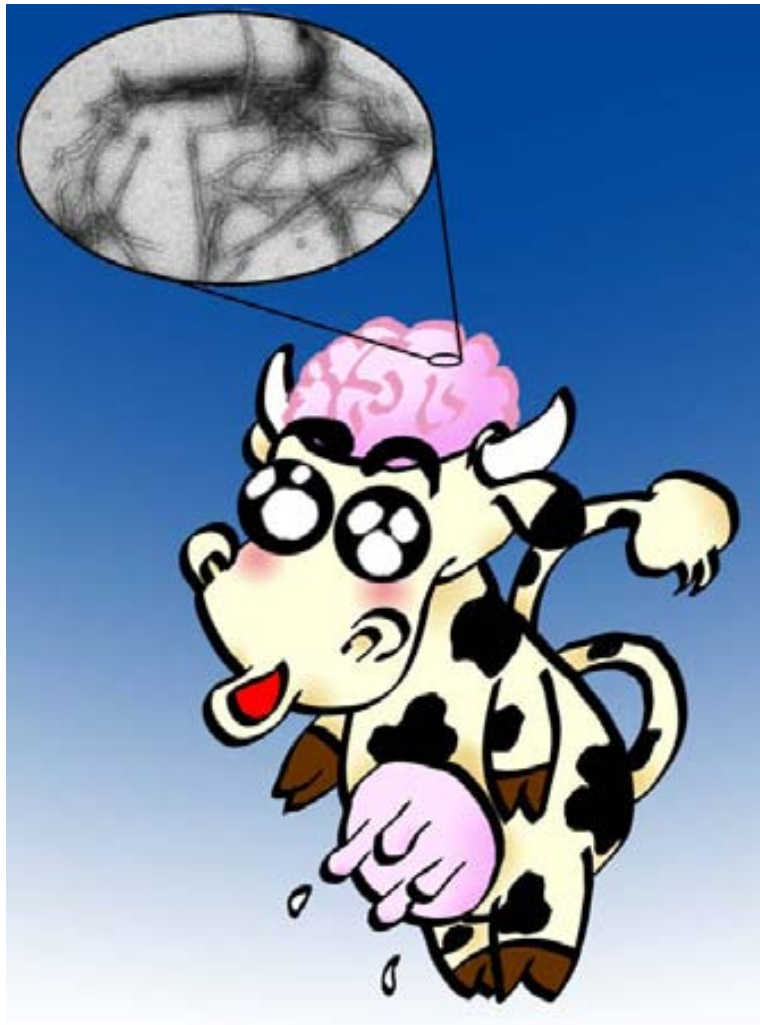
***PROPIETATS AMILOIDOGÈNIQUES DEL FRAGMENT  
185-208 DE LA PROTEÏNA PRIÒNICA HUMANA.  
COMPARACIÓ AMB EL PÈPTID  $A\beta(1-28)$  DE LA MALALTIA D'ALZHEIMER***

Marta Cortijo Arellano

Memòria de la Tesi presentada per optar al Grau de Doctora en Bioquímica i Biologia Molecular per la Universitat Autònoma de Barcelona.

Aquest treball ha estat realitzat a la Unitat de Biofísica i Centre d'Estudis en Biofísica (CEB) del Departament de Bioquímica i de Biologia Molecular de la Universitat Autònoma de Barcelona, sota la direcció del Dr Josep B. Cladera Cerdà.

Vist-i-plau del director  
Josep B. Cladera Cerdà



“Vaka prionika” (per Juana Padilla Bogallo “chunini”)

## AGRAÏMENTS

*Voldria agrair a totes aquelles persones que m'han ajudat en la realització d'aquesta tesi, tant a nivell científic com a nivell personal, des de que un dilluns 3 de març de 2003 vaig arribar a Biofísica. Concretament, agraeixo a:*

*El Dr. Josep B. Cladera Cerdà per la direcció i suport d'aquesta tesi, per donar-me la oportunitat de treballar en aquest projecte i per tot el coneixement adquirit en aquests anys.*

*El MEC, pel finançament del projecte que ha permès aquesta tesi (EET2002-05139).*

*La Dra. Maria Bryszewska i la Dra. Barbara Klajnert, de la Universitat de Lodz (Polònia), per les dues estades en el seu laboratori, que m'han permès estudiar i treballar amb els dendrímers.*

*La Dra. Núria Durany, de la Universitat Internacional de Catalunya, per haver permès dur a terme en el seu laboratori els experiments de viabilitat cel·lular exposats en aquesta tesi, i especialment a la Jovita Ponce per haver-me ensenyat a treballar amb cultius cel·lulars.*

*El Dr. Alejandro Perálvarez, Gonso-para-los-amigos, pels seus consells tant científics com informàtics, i fins i tot, personals, i per tots aquells bons moments compartits també amb la Irene el primer any de tesi. Amb ella, sempre recordarè la sala de cultius com el “confe” de Gran Hermano i aquells dies festius de treball non-stop sota el lema “el trabajo dignifica!!”.*

*L'Elodia, per tota la seva ajuda i ànims amb la preparació de les classes de pràctiques, que tant m'han estressat en els inicis de la meva tasca com a profe de pràctiques. Sense ella i la Mercè Yáñez el nostre laboratori s'ensorraria!!!*

*A mi Rosanilla, polo teu optimismo e humor, e os bos momentos compartidos tanto dentro como fóra do laboratorio (espero que el traductor no me haya fallado).*

*Les meves nenes: la meva Nurieta, la meva Eva Crossas, la meva Evilla i la meva Meri. Gràcies per les rialles, les cervetes, els cafès interminables, però sobretot, moltíssimes gràcies per tot el suport moral que he necessitat durant aquest últim any i que m'heu donat.*

*A Chunini, mi “psicóloga” e ilustradora particular. Entre gráfica y gráfica, me has ido alegrando via messenger (oh! revolucionario medio de comunicación!) esas largas y aburridas horas de tratamiento de datos con el ordenador, y lo más importante, me has puesto al día de la crónica rosa!!!*

*A mi Agus, siempre optimista, por hacerme olvidar la tesis en las cenas y quedadas de fin de semana.*

*A mis papis, que con una santa paciencia, me escucharon caaaaaaada noche mis problemas con los experimentos y mis “anécdotas” sobre las clases... y que ahora lo siguen y seguirán oyendo por teléfono. Después de años oyendo hablar de nosequé de una tesis, por fin podeis ver lo que es!!!*

*Y finalmente, mil gracias a mi “mosu”. Porque siempre estás ahí, en lo bueno y en lo malo, en la salud y en la enfermedad (jejeje) escuchándome, entendiéndome y apoyándome. Muchas gracias por tu paciencia en estos primeros meses de nuestra vida juntos. Como dice la canción... You... Just like heaven...*

*Y escuchando esta canción, pongo punto y final.*

*Bellaterra, 22 de enero de 2008.*

*A mi mami*

## **RESUM**

*La formació de fibres amiloides és un tret característic dels sistemes nerviosos afectats per malalties com la d'Alzheimer o les priòniques. En els teixits, les fibres es troben associades a les membranes cel·lulars i a elements de la matriu extracel·lular com els glicosaminoglicans. En les diferents malalties amiloidogèniques, pèptids i proteïnes amb una homologia seqüencial molt baixa, donen lloc a la formació d'agregats amiloides, de característiques físico-químiques molt semblants. Aquest fet implica la possibilitat que existeixi un mecanisme comú de formació d'agregats amiloides i, per tant, una possible via d'intervenció comuna a les diferents malalties. En aquest sentit, ha estat descrit recentment un hipotètic motiu estructural d'unió a esfingolípids que seria comú al fragment 1-28 del pèptid  $\beta$  amiloide, relacionat amb la malaltia d'Alzheimer, i el fragment 185-208 de la proteïna priònica humana. A més, les dues seqüències contenen residus d'His, involucrats en possibles motius d'unió a heparina. El fragment 1-28 del pèptid  $\beta$  amiloide ha estat molt estudiat pel que fa a la seva capacitat per formar fibres amiloides, a la influència de l'heparina en el procés d'agregació i, fins i tot, en la seva capacitat d'interacció amb membranes biològiques. Les propietats amiloidogèniques del fragment 185-208 de la proteïna priònica, en canvi, eren fins ara desconegudes. Combinant l'espectroscòpia d'IR i de fluorescència amb la microscòpia electrònica, hem procedit a la determinació de les característiques amiloidogèniques del fragment priònic. Els resultats mostren que aquest fragment és capaç de formar fibres amiloides, seguint el característic procés de polimerització nucleada, només en presència d'heparina i de membranes biològiques amb càrrega superficial negativa. Les fibres formades mostren la típica morfologia amiloide. A diferència del fragment 1-28 del pèptid de l'Alzheimer, el fragment priònic és citotòxic, reduint en un 25% la viabilitat cel·lular en una línia de neuroblastoma. Un cop caracteritzat el fragment priònic, s'han estudiat les capacitats anti-amiloidogèniques dels dendrímers, uns polímers ramificats amb càrrega superficial positiva capaços d'interferir en el procés d'agregació amiloide, modulant la formació de fibres.*



<b>I. INTRODUCCIÓ</b> .....	<b>3</b>
<b>I.1.- Les proteïnes i pèptids amiloides</b> .....	<b>1</b>
<b>I.2.- Malalties relacionades amb el plegament de proteïnes</b> .....	<b>3</b>
<b>I.3.- Mecanismes associats a la formació de fibres amiloides</b> .....	<b>5</b>
<b>I.4.- La Malaltia de l'Alzheimer</b> .....	<b>7</b>
I.4.1.- Proteïna precursora del pèptid A $\beta$ .....	8
I.4.2.- La hipòtesi de la cascada amiloide .....	10
I.4.3.- Model d'agregació del pèptid A $\beta$ .....	12
<b>I.5.- Les Encefalopaties Espongiformes Transmissibles</b> .....	<b>14</b>
I.5.1.- Descobriments de les Encefalopaties Espongiformes Transmissibles .....	14
I.5.2.- Prions .....	15
I.5.3.- La proteïna cel·lular del prió: PrP <sup>C</sup> .....	16
I.5.4.- Les formes patològiques del prió: PrP <sup>SC</sup> i PrP <sup>27-30</sup> .....	17
I.5.5.- Conversió de PrP <sup>C</sup> en PrP <sup>SC</sup> .....	18
<b>I.6.- Fragments peptídics utilitzats a l'estudi de la formació de fibres amiloides in vitro</b> .....	<b>21</b>
<b>I.7.- Amiloidogènesi i glicosaminoglicans</b> .....	<b>24</b>
I.7.1.- Interacció dels GAGs amb l'A $\beta$ .....	25
I.7.2.- Interacció dels GAGs amb la proteïna priònica .....	26
<b>I.8.- Amiloides i dendrímers</b> .....	<b>28</b>
<b>I.9.- Amiloides i membranes</b> .....	<b>31</b>
I.8.1.- Paper de les membranes biològiques en la fibril·logènesi de l'A $\beta$ .....	32
I.8.2.- Paper de les membranes biològiques en la propagació dels prions .....	33
<b>II. OBJECTIUS</b> .....	<b>35</b>
<b>III. MATERIALS I MÈTODES</b> .....	<b>39</b>
<b>III.1.- Materials utilitzats</b> .....	<b>41</b>
III.1.1.- Dissolvents i reactius .....	41
III.1.2.- Pèptids sintètics .....	43
<b>III.3.- Espectroscòpia de fluorescència</b> .....	<b>44</b>
III.3.1.- Fonaments teòrics .....	44
III.3.2.- Estudi de les cinètiques de formació de fibres amiloides .....	46
III.3.2.1.- La sonda fluorescent Tioflavina T .....	46
III.3.2.2.- Cinètiques d'agregació amb Tioflavina T (ThT) .....	47
<b>III.3.- Espectroscòpia d'infraroig amb transformada de Fourier</b> .....	<b>48</b>
III.3.1.- Fonaments teòrics .....	48
III.3.2.- Estudi de l'estructura de proteïnes mitjançant FTIR .....	50
III.3.3.- Funcionament d'un espectròmetre d'infraroig .....	51

III.3.4.- Adquisició d'espectres d'infraroig al llarg del temps .....	53
III.3.4.1.- Tria del tampó .....	53
III.3.4.2.- Preparació de les mostres de pèptids amiloidogènics .....	54
III.3.4.3.- Adquisició d'espectres .....	55
III.3.4.4.- Estudi de les cinètiques d'agregació .....	56
<b>III.4.- Obtenció d'imatges per microscòpia electrònica de transmissió .....</b>	<b>57</b>
III.4.1.- Condicions Experimentals .....	58
<b>III.5.- Cultius cel·lulars.....</b>	<b>59</b>
III.5.1.- Tripsinització de les cèl·lules.....	59
III.5.2.- Comptatge de les cèl·lules .....	59
III.5.3.- Crioconservació de les cèl·lules.....	60
III.5.3.1.- Congelació de les cèl·lules .....	60
III.5.3.2.- Descongelació de les cèl·lules .....	60
III.5.4.- Assaig de viabilitat cel·lular: tractaments amb pèptids amiloidogènics.....	61
III.5.4.1.- Procediment experimental .....	61
III.5.4.2.- Mostres estudiades .....	62
<b>III.6.- Experiments amb dendrímers.....</b>	<b>63</b>
<b>III.7.- Preparació de membranes model .....</b>	<b>64</b>
III.7.1.- Preparació de Liposomes Unilamel·lars Grans (LUVs) de 100 nm .....	64
III.7.2.- Determinació de la mida dels LUVs.....	64
III.7.4.- Composició dels LUVs.....	65
III.7.5.- Mesura del potencial dipolar de membrana .....	67
III.7.5.1.- La sonda fluorescent di-8-ANEPPS .....	67
III.7.5.2.- Marcatge dels LUVs amb la sonda fluorescent di-8-ANEPPS .....	68
III.7.5.3.- Mesura experimental del potencial dipolar amb la sonda di-8-ANEPPS .....	68
<b>IV. RESULTATS .....</b>	<b>71</b>
<b>IV.1.- Caracterització de la cinètica d'agregació del PrP(185-208) en comparació a la del pèptid A<math>\beta</math>(1-28).....</b>	<b>73</b>
IV.1.1.- Cinètiques d'agregació a baixa concentració de pèptid.....	75
IV.1.2.- Cinètiques d'agregació a elevada concentració de pèptid.....	76
IV.1.3.- Comparació del procés d'agregació a baixa i elevada concentració del pèptid A $\beta$ (1-28).....	78
IV.1.4.- Morfologia dels agregats i fibres formats durant les cinètiques d'agregació dels pèptids amiloidogènics .....	79
<b>IV.2.- Estudi de la influència de l'heparina en el procés d'agregació .....</b>	<b>81</b>
IV.2.1.- Cinètica d'agregació a baixa concentració del pèptid A $\beta$ (1-28).....	84
IV.2.2.- Canvis estructurals en el pèptid A $\beta$ (1-28) induïts per la presència d'heparina .....	85
IV.2.3.- Cinètica d'agregació a baixa concentració del pèptid PrP(185-208) .....	89
IV.2.4.- Canvis estructurals en el pèptid PrP(185-208) induïts per la presència d'heparina .....	90
IV.2.5.- Morfologia dels agregats i fibres formades a la cinètica d'agregació del pèptid A $\beta$ (1-28).....	92
IV.2.6.- Morfologia dels agregats i fibres formades a la cinètica d'agregació del pèptid PrP(185-208).....	94
IV.2.6.- Viabilitat cel·lular .....	95

<b>IV.3.- L'estudi de la influència dels dendrímers en el procés d'agregació .....</b>	<b>97</b>
IV.3.1.- Efecte dels dendrímers de poliamidoamina (PAMAM) en l'agregació dels pèptids amiloidogènics A $\beta$ (1-28) i PrP(185-208) .....	100
IV.3.1.1.- Cinètiques d'agregació en presència dels dendrímers PAMAM i efecte de la seva concentració .....	100
IV.3.1.2.- Ajustament matemàtic de les cinètiques d'agregació realitzades en presència dels dendrímers PAMAM .....	102
IV.3.2.- Efecte dels dendrímers PAMAM en l'agregació dels pèptids amiloidogènics A $\beta$ (1-28) i PrP(185-208), segons la generació de dendrímer .....	104
IV.3.3.- Influència dels P-dendrímers en l'agregació del pèptid PrP(185-208) .....	108
<b>IV.4.- L'estudi de la influència de la composició lipídica de membranes model en el procés d'agregació.....</b>	<b>115</b>
IV.4.1.- Efecte dels lípids sense càrrega neta en la cinètica d'agregació del pèptid A $\beta$ (1-28).....	118
IV.4.1.1.- Cinètica d'agregació del pèptid A $\beta$ (1-28) a baixa concentració peptídica .....	118
IV.4.1.2.- Morfologia dels agregats i fibres formades pel pèptid A $\beta$ (1-28) en presència de membranes model ....	119
IV.4.1.3.- Canvis estructurals en el pèptid A $\beta$ (1-28) induïts per la presència de lípid.....	120
IV.4.2.- Efecte de la composició lipídica sense càrrega neta en la cinètica d'agregació del pèptid PrP(185-208).....	125
IV.4.2.1.- Cinètica d'agregació del pèptid PrP(185-208) a baixa concentració peptídica.....	125
IV.4.2.2.- Canvis estructurals en el pèptid PrP(185-208) induïts per la presència de lípid.....	126
IV.4.3.- Efecte de les membranes model amb càrrega negativa neta en la cinètica d'agregació del pèptid A $\beta$ (1-28) .	129
IV.4.3.1.- Cinètica d'agregació del pèptid A $\beta$ (1-28) a baixa concentració peptídica .....	129
IV.4.3.2.- Canvis estructurals en el pèptid A $\beta$ (1-28) induïts per la presència de membranes model amb càrrega negativa neta .....	130
IV.4.4.- Efecte de les membranes model amb càrrega negativa neta en la cinètica d'agregació del pèptid PrP(185-208) .....	132
IV.4.4.1.- Cinètica d'agregació del pèptid PrP(185-208) a baixa concentració peptídica.....	132
IV.4.4.2.- Canvis estructurals en el pèptid PrP(185-208) induïts per la presència de membranes model amb càrrega negativa neta .....	134
IV.4.5.- Canvis en el potencial dipolar de membrana induïts per la presència de pèptid .....	135
<b>V. DISCUSSIÓ.....</b>	<b>137</b>
<b>V.1.- Caracterització de la cinètica d'agregació del PrP(185-208) en comparació a la del pèptid A<math>\beta</math>(1-28).....</b>	<b>142</b>
<b>V.3.- Estudi de la influència de l'heparina en el procés d'agregació.....</b>	<b>144</b>
V.3.1.- Cinètiques d'agregació i efecte de la substitució de les His per Ala. ....	144
V.3.2.- Disminució de la població cel·lular en cultius neuronals tractats amb PrP(185-208) .....	145
<b>V.4.- Influència dels dendrímers en el procés d'agregació i el seu possible ús en el disseny d'estratègies anti-amiloidogèniques. ....</b>	<b>146</b>
V.4.1.- Efecte dels dendrímers PAMAM en l'agregació dels pèptids A $\beta$ (1-28) i PrP(185-208) .....	146
V.4.2.- Efecte dels P-dendrímers en l'agregació del pèptid PrP(185-208).....	152
V.4.3.- Els dendrímers com a agents terapèutics anti amiloidogènics .....	153
<b>V.5.- Efecte dels membranes biològiques.....</b>	<b>154</b>

V.5.1.- Efecte dels lípids sense càrrega neta en la cinètica d'agregació del pèptid A $\beta$ (1-28) .....	154
V.5.2.- Efecte dels lípids sense càrrega neta en la cinètica d'agregació del pèptid PrP(185-208) .....	157
V.5.3.- Efecte dels lípids amb càrrega neta negativa en la cinètica d'agregació dels pèptids A $\beta$ (1-28) i PrP(185-208) .....	157
<b>V.6.- Fibres amiloides dels pèptids A<math>\beta</math>(1-28) i Prp(185-208): un model estructural.....</b>	<b>160</b>
<b>VI. CONCLUSIONS.....</b>	<b>163</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>167</b>
<b>VIII. PUBLICACIONS.....</b>	<b>181</b>

<i>A</i>	<i>Alanina</i>
<i>AA</i>	<i>Aminoàcid</i>
<i>APP</i>	<i>Amyloid Precursor Protein</i>
<i>Arg</i>	<i>Arginina</i>
<i>Asn</i>	<i>Asparragina</i>
<i>Asp</i>	<i>Àcid aspàrtic</i>
<i>A<math>\beta</math></i>	<i>Pèptid Beta Amiloide</i>
<i>BSE</i>	<i>Encefalopatia Espongiforme Bovina</i>
<i>Chol</i>	<i>Colesterol</i>
<i>CJD</i>	<i>Malaltia de Creutzfeldt-Jakob</i>
<i>CD</i>	<i>Dicroïsme circular</i>
<i>DCI</i>	<i>Clorhídric deuterat</i>
<i>Di-8-ANEPPS</i>	<i>1-(3-sulfonatopropil)-4-[<math>\beta</math>[2-(di-n-octilamino)-6-naftil]vinil] piridina</i>
<i>EET</i>	<i>Encefalopatia Espongiforme Transmissible</i>
<i>FTIR</i>	<i>Espectroscòpia d'Infraroig amb Transformada de Fourier</i>
<i>GAG</i>	<i>Glicosaminoglicà</i>
<i>Glu</i>	<i>Àcid Glutàmic</i>
<i>GalCer</i>	<i>Galactosilceramida</i>
<i>GPI</i>	<i>Glicofosfatidilinositol</i>
<i>Hepes</i>	<i>Àcid 4-(2-hidroxiètil)-1-piperazinetanosulfònic</i>
<i>HFIP</i>	<i>1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol</i>
<i>His</i>	<i>Histidina</i>
<i>LUVs</i>	<i>Liposomes Unilamel-lars Grans</i>
<i>Lys</i>	<i>Lisina</i>
<i>KDa</i>	<i>Kilodalton</i>
<i>MA</i>	<i>Malaltia de l'Alzheimer</i>
<i>MET</i>	<i>Microscòpia Electrònica de Transmissió</i>
<i>MLVs</i>	<i>Liposomes Multilamel-lars Grans</i>
<i>MTT</i>	<i>Bromur de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol</i>
<i>NaOD</i>	<i>Deuteròxid sòdic</i>
<i>NMR</i>	<i>Ressonància Magnètica Nuclear</i>
<i>PAMAM</i>	<i>Dendrimers de poliamidoamines</i>
<i>PBS</i>	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
<i>PC</i>	<i>Fosfatidilcolina</i>
<i>PG</i>	<i>Proteoglicà</i>
<i>Phe</i>	<i>Fenilalanina</i>
<i>PIPLC</i>	<i>Fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol</i>

## ***Abreviatures***

---

<i>PrP<sup>C</sup></i>	<i>Proteïna priònica cel·lular</i>
<i>PrP<sup>SC</sup></i>	<i>Proteïna priònica scrapie</i>
<i>PS</i>	<i>Fosfatidilserina</i>
<i>TFE</i>	<i>2,2,2-Trifluoroetanol</i>
<i>ThT</i>	<i>Tioflavina T</i>
<i>Tyr</i>	<i>Tirosina</i>
<i>SM</i>	<i>Esfingomielina</i>

# **I. INTRODUCCIÓ**

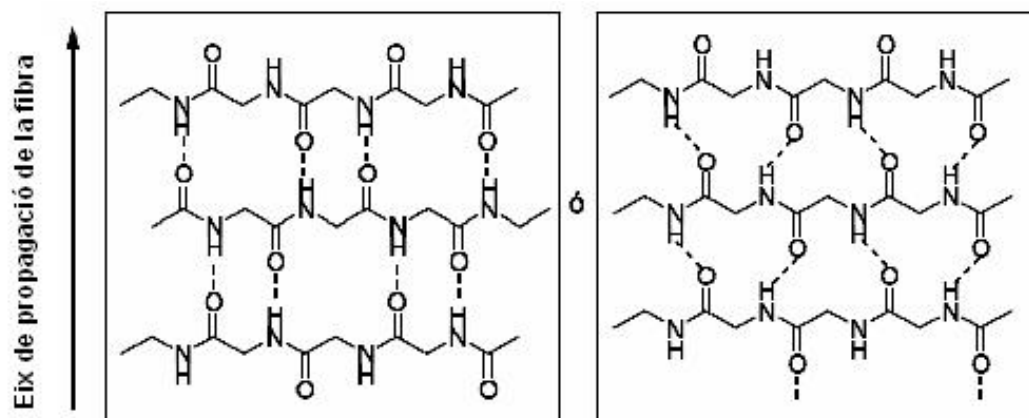
### ***1.1.- Les proteïnes i pèptids amiloides***

La paraula “amiloide” va ser utilitzada per primera vegada l’any 1854 pel metge alemany Rudolph Virchow, qui estudiant una mostra tissular d’aparença macroscòpica anormal va descobrir que la típica reacció de la cel·lulosa amb iode donava lloc a una coloració blavosa que es tornava de color lila amb el posterior tractament amb àcid sulfúric. R.Virchow va anomenar “amiloide” (del llatí amyllum i del grec amyilon) a la substància causant d’aquella coloració. També va estudiar mostres de teixits corresponents a les actualment conegudes com a amiloïdosis sistèmiques, trobant la mateixa reacció amb iode. La hipòtesi sobre la naturalesa dels dipòsits amiloides no va durar molt temps, ja que en 1859, Nicholas Friedreich i August Kekulé van demostrar que el component majoritari d’aquella substància amiloide no era la cel·lulosa, sinó que era proteïna. Finalment, en 1908 Hanssen va demostrar que els dipòsits amiloides es podien digerir amb pepsina i, per tant, va quedar confirmada la seva naturalesa proteica [1].

Es pot dir que la història moderna de les amiloïdosis va començar amb el descobriment, per Cohen i Calkins, mitjançant microscòpia electrònica que els dipòsits amiloides tenen una estructura fibril·lar [2]. Aquest descobriment es va confirmar en estudis posteriors [3-6] i va ser el punt de partida d’un concepte d’organització estructural totalment desconegut fins aquell moment. Aquelles fibres amiloides presentaven un alt grau d’estructuració molecular quan s’observaven amb llum polaritzada: la seva anisotropia produïa birefringència de color verd quan la mostra era tenyida amb el colorant Congo Red. Les fibres amiloides no eren ramificades, tenien uns 10 nm de diàmetre i una longitud variable. No tenien una orientació concreta, però apareixien properes a la membrana cel·lular en forma de feixos més o menys paral·lels [7, 8]. Estudis de Shirahama i Cohen, mitjançant microscòpia electrònica, van demostrar que les fibres estaven formades per elements més fins, anomenats protofibril·les [8].

Estudis de difracció de raigs X han fet palès el fet que la proteïna que forma part de les fibres amiloides s’estructura en forma de làmina  $\beta$  creuada, tal i com es mostra a la Figura 1:

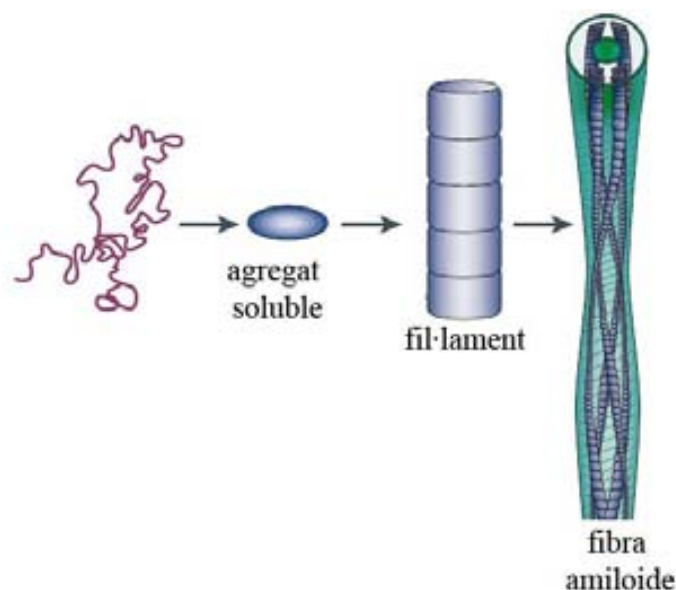




**Figura 1. Ordenació antiparal·lela i paral·lela d'una làmina  $\beta$ -creuada.** L'estructura  $\beta$ -creuada es caracteritza perquè presenta l'esquelet peptídica en forma de làmines  $\beta$  que es disposen perpendicularment a la direcció de creixement de la fibra. Els enllaços d'hidrogen són paral·lels a la direcció de creixement de la fibra.

El cor de la fibra sembla estar estabilitzat pels ponts d'hidrogen que s'estableixen al llarg de la cadena polipeptídica, ja que estudis fets amb polipeptíds de seqüències molt diferents donen lloc a fibres molt similars [9, 10].

Tot i que, fins ara, l'estructura atòmica de les fibres no ha estat totalment resolta, s'han proposat diversos models basats en les dades obtingudes en estudis de difracció de raigs X [9], criomicroscòpia electrònica [11] i ressonància magnètica nuclear en estat sòlid [12]. Estudis de microscòpia electrònica de transmissió i microscòpia de força atòmica posen de manifest que les fibres amiloides són estructures fibril·lars helicoïdals formades per dos o més filaments [13-16] i aquests filaments presenten un patró de difracció de raigs X corresponent a estructura  $\beta$ .



**Figura 2. Representació esquemàtica de l'estructura de les fibres amiloides.** Les proteïnes desplegadas o parcialment desplegadas s'associen entre si per formar agregats solubles, filaments i, finalment, fibres madures (esquema modificat de [17]).

## ***1.2.- Malalties relacionades amb el plegament de proteïnes***

Les proteïnes adquireixen la seva estructura tridimensional mitjançant un procés de plegament, en el qual cada seqüència proteica adopta una conformació nativa o de mínima energia. Gràcies a aquest procés, les proteïnes poden dur a terme la seva funció correcta i per aquest motiu, les cèl·lules tenen mecanismes per tal d'evitar o desfer els plegaments erronis. Tot i així, en els últims anys s'han descobert una sèrie de patologies relacionades amb el plegament incorrecte de certes proteïnes, provocant la formació irreversible d'uns agregats fibril·lars insolubles, coneguts amb el nom de fibres amiloides. Actualment es coneixen més de 20 proteïnes (Taula 1) involucrades en patologies relacionades amb la formació de fibres amiloides i molt probablement, aquesta llista anirà creixent al llarg del temps [18].

**Taula 1. Malalties relacionades amb el plegament anòmal de proteïnes (adaptat de C.M. Dobson [18]).**

<b>Malaltia</b>	<b>Proteïna</b>	<b>Lloc de plegament</b>
Hipercolesterolèmia	Receptor de la lipoproteïna de baixa densitat	ER
Fibrosi quística	Regulador transmembranal de la fibrosi quística	ER
Fenilcetonúria	Fenilalanina hidroxilasa	Citosol
Malaltia de Huntington	Huntingtina	Citosol
Síndrome de Marfan	Fibril·lina	ER
Osteogènesi imperfecta	Procolàgen	ER
Anèmia falciforme	Hemoglobina	Citosol
Deficiència de $\alpha$ -Antitripsina	$\alpha$ -Antitripsina	ER
Malaltia de Tay–Sachs	$\alpha$ -Hexosaminidasa	ER
Malaltia de l'Alzheimer	Pèptid $\beta$ Amiloide/Proteïna tau	ER
Malaltia de Parkinson	$\alpha$ -Sinucleïna	Citosol
Malaltia de Creutzfeldt–Jakob	Proteïna priònica	ER
Amiloïdosis Familiars	Transtiretina/lisozim	ER
Retinitis pigmentosa	Rodopsina	ER
Cataragtes	Cristalins	Citosol

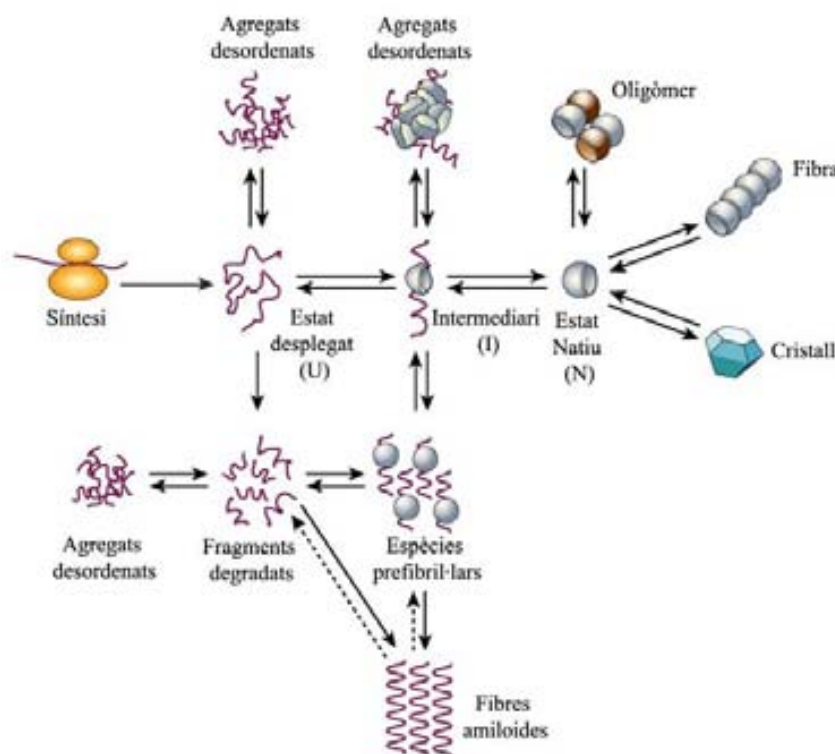
Apart de les proteïnes i pèptids amiloides relacionats amb patologies, també existeixen certes proteïnes que semblen no estar lligades a cap malaltia, com per exemple la mioglobina [19], el mòdul SH3 de la proteïna quinasa P13 [18] o homopolimers com la politreonina o la polilisisina [20], que tendeixen a agregar-se. De fet, sota condicions adequades, un gran nombre de proteïnes sense homologia seqüencial són capaces de formar fibres amiloides.

Aquesta característica comuna i el fet de què les proteïnes i pèptids amiloides no comparteixin un origen comú ni tinguin seqüències polipeptídiques similars, fa pensar en la possibilitat d'un mecanisme general d'agregació, de manera que la seva elucidació ajudaria a comprendre el mecanisme d'agregació de qualsevol proteïna o pèptid amiloide. Les fibres amiloides a les quals donen lloc presenten unes característiques moleculars comunes, que serveixen per a la seva diagnosi clínica:

- Es poden tenyir amb Congo Red, i donen lloc a una birefringència de color verd, si són observades sota llum polaritzada.
- Uneixen Tioflavina T, donant lloc a complexos fluorescents.
- Tenen una morfologia fibril·lar no ramificada i un diàmetre de 6-10 nm, quan s'observen per microscòpia electrònica.
- Les cadenes polipeptídiques adopten una estructura de fulla  $\beta$  creuada, on les fulles  $\beta$  individuals s'orienten perpendicularment a l'eix longitudinal de la fibra.
- Són resistents a l'acció de les proteases.

### I.3.- Mecanismes associats a la formació de fibres amiloides

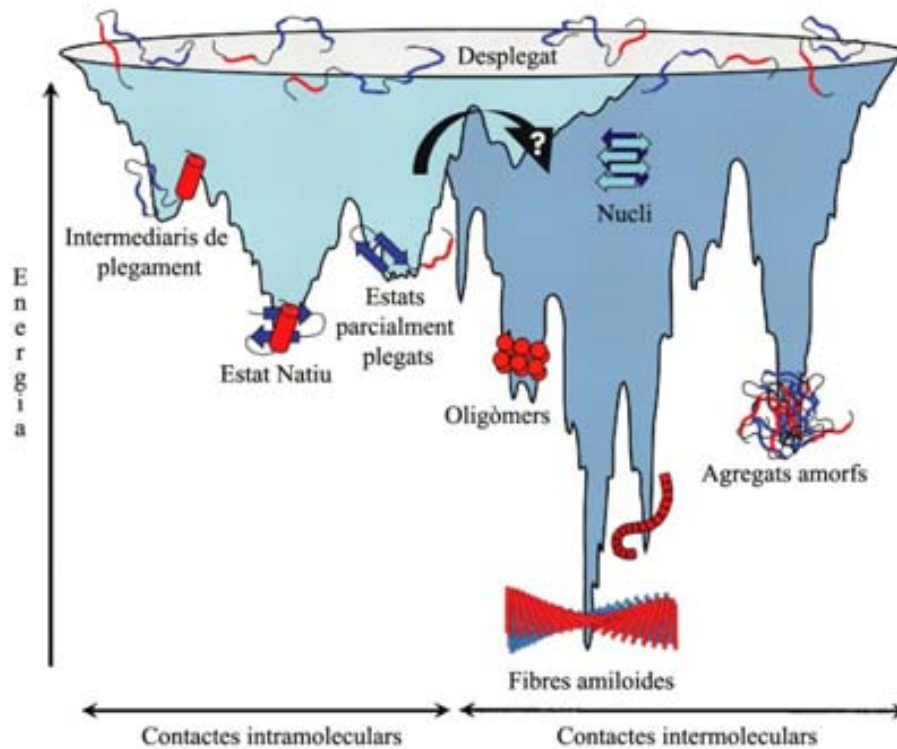
L'estructura covalent determina la llibertat conformacional dels àtoms en les molècules. En condicions fisiològiques, totes les proteïnes que tenen una determinada estructura covalent adopten una conformació tridimensional coneguda com "estat natiu" (N), que és la més estable i que determina les funcions d'aquella determinada proteïna a la cèl·lula (Figura 3). Però les proteïnes contenen multitud d'enllaços covalents que poden rotar, de tal manera que l'estat natiu no és més que un dels possibles estats conformacionals que pot adquirir la cadena polipeptídica. Entre els estats no natus es pot distingir "l'estat desnaturalitzat" (U), el qual es pot obtenir mitjançant temperatures elevades, pHs extrems o l'addició d'urea o clorur de guanidini. Com que aquest estat desnaturalitzat no té una estructura (secundària, terciària i/o quaternària) definida, es postula que les seves propietats són semblants a les presents en el ribosoma just després de la síntesi proteica.



**Figura 3. Representació esquemàtica sobre les possibles vies de plegament d'una proteïna, després de la seva síntesi ribosòmica.** El nombre d'espècies de cada població depèn dels equilibris cinètics i termodinàmics de cada estat. En sistemes vius el procés de plegament proteic és controlat per xaperones moleculars i altres mecanismes de control cel·lulars [17].

D'aquesta manera, per arribar al seu estat natiu, una determinada cadena polipeptídica passa per una població heterogènia d'intermediaris parcialment plegats, els quals es troben en un equilibri fluctuant [18]. Aquestes fluctuacions provoquen diferents interaccions entre els

residus aminoacídics, de tal manera que només les interaccions natives són les més estables i de mínima energia, donant lloc a l'estat natiu. En el mapa energètic (“energy landscape”) que descriu el procés de plegament (Figura 4), la formació d'estructures agregades suposa una ruta alternativa a la que condueix a l'estat natiu que pot tenir lloc a partir de certs intermediaris i contactes intermoleculars, poc coneguts avui dia.



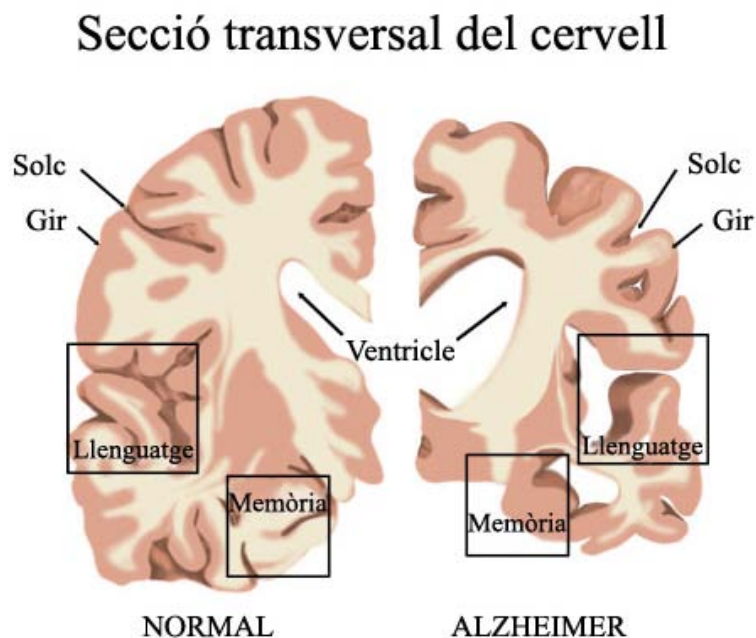
**Figura 4. Mapa energètic per al procés de plegament proteic.** L'esquema es representa amb forma d'embut, on multitud de conformacions desnaturalitzades condueixen a una estructura nativa única de mínima energia [17].

Des d'un punt de vista teòric, la formació d'agregats polipeptídics s'atribueix, bé a una reducció de l'estabilitat de l'estat plegat o natiu del polipèptid corresponent, o bé a un increment de la tendència a l'agregació d'una població accessible d'espècies desplegadas (ja siguin desestructurades, parcialment plegades, o plegades de forma no nativa); és a dir, a l'aparició d'un equilibri termodinàmic entre l'estat desnaturalitzat (U) i l'estat agregat (A) que entra en competició cinètica amb l'equilibri entre l'estat desnaturalitzat (U) i l'estat natiu (N). Ambdós factors assenyalats poden ser el resultat de mutacions puntuals (amiloïdosi d'origen hereditari o esporàdic), de l'aparició d'espècies que afavoreixin la formació de nuclis d'agregació que incloguin la seqüència nativa (encefalopaties espongiformes, Alzheimer), de canvis en condicions locals de pH, etc.

### ***1.4.- La Malaltia de l'Alzheimer***

En 1907, el metge alemany Alois Alzheimer, va descobrir un trastorn cerebral cognitiu que, actualment, és una de les patologies neurodegeneratives més freqüents, la malaltia de l'Alzheimer (MA), constituint la causa més habitual de demència en les persones de més de 65 anys, i possiblement, una de les malalties més estudiades des del punt de vista bioquímic i genètic durant la darrera dècada.

La patologia es caracteritza per una pèrdua progressiva i irreversible de la memòria, deguda a la mort neuronal, localitzada sobretot en el còrtex cerebral i en l'hipocamp. A nivell anatòmic i macroscòpic, s'observa una atròfia important del cervell acompanyada d'una disminució de pes, i un retall en els solcs i circumval·lacions del cervell (Figura 5).



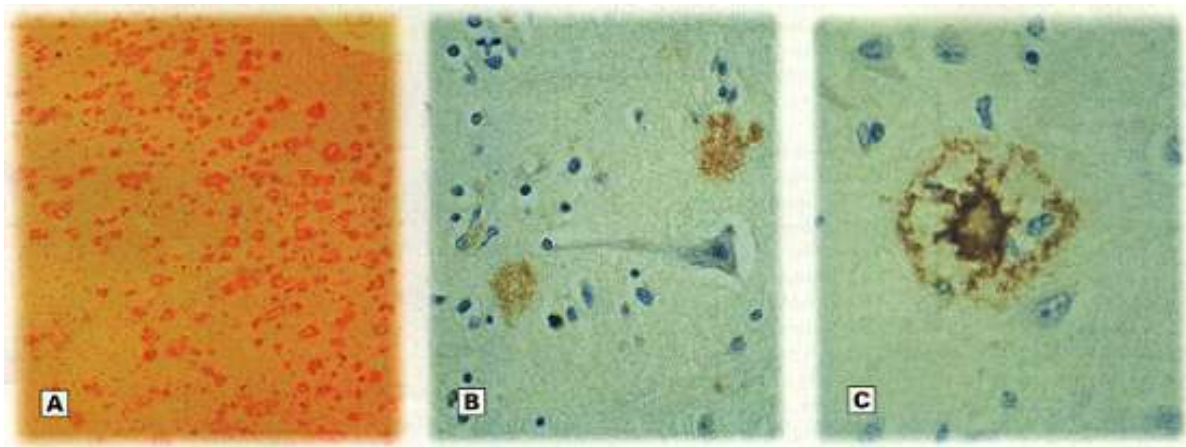
**Figura 5. Secció transversal d'un cervell normal i d'un cervell afectat per la MA.** A la malaltia de l'Alzheimer hi ha una disminució de la massa cerebral, els solcs estan més buits i els ventricles són més grans. La degeneració i mort neuronal, sobretot en tot el còrtex cerebral i l'hipocamp, associades a la malaltia comporten pèrdua de memòria i de les funcions cognitives, com per exemple, la capacitat de parlar. [adaptat de <http://www.ahaf.org/alzdis/about/BrainAlzheimer.htm>].

Com a mitjana, la seva durada és de 8-12 anys, al començament dels quals sol haver-hi un període de 2 a 3 anys en què la simptomatologia és inadvertida. Existeixen protocols de diagnosi clínica acuradament dissenyats, basats en l'examen neurològic i en l'exclusió d'altres causes de demència, però la certesa de la seva diagnosi només es confirma mitjançant l'examen post mortem del cervell de la persona afectada.

L'examen microscòpic dels cervells de pacients afectats revela la pèrdua neuronal i la presència de dues alteracions típiques: l'acumulació intracel·lular de cabdells neurofibril·lars i la presència extracel·lular de plaques senils o neurítiques. Aquestes lesions es localitzen principalment en el còrtex cerebral associatiu i a l'hipocamp, però en estadis més avançats de la malaltia es troben en gran part del teixit cerebral.

La degeneració neurofibril·lar és una lesió intracel·lular que afecta principalment a les neurones piramidals i que apareix com un cabdell format per fibril·les entrelaçades, molt insolubles, el component principal de les quals és la proteïna tau. Aquesta proteïna normalment forma part dels microtúbuls del citosquelet i del sistema de transport neuronal, però en la MA es troba hiperfosforil·lada, alterant la seva solubilitat i, per tant, la seva capacitat d'unió a microtúbuls.

Les plaques neurítiques o senils són estructures esfèriques, relativament grans (10-200  $\mu\text{m}$ ) que es dipositen a l'espai extracel·lular (Figura 6). Presenten una zona central més compactada rodejada de prolongacions neuronals alterades, astròcits i cèl·lules de microglia. El component principal de la zona compacta són les fibres amiloides, formades principalment pel pèptid  $\text{A}\beta$ , que també es troben associades a les parets de les arterioles, venes i capil·lars sanguinis del cervell [21].



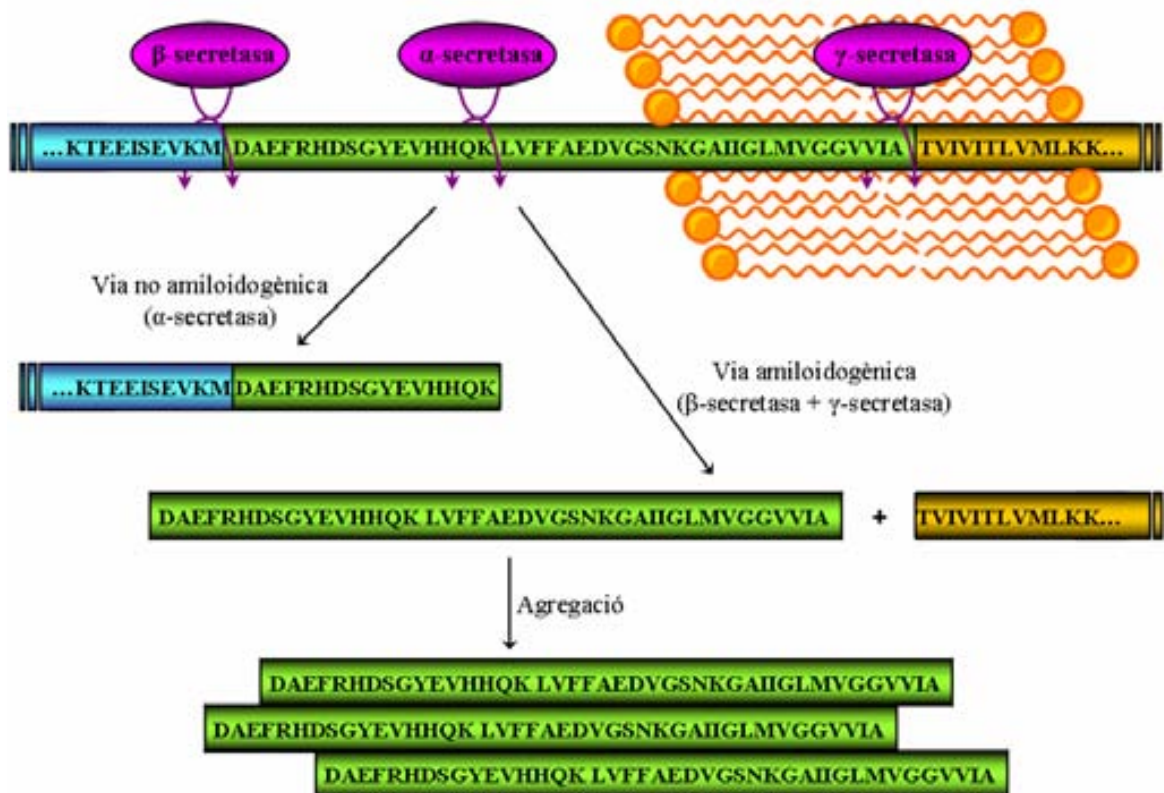
**Figura 6. Plaques senils.** (a) Plaques senils que han envaït massivament el còrtex cerebral (40x). (b) Localització extraneuronal de les plaques. (c) Zona compacta central d'una placa senil. [<http://www.ciencia-hoy.retina.ar/hoy41/protei1.htm>].

### **I.4.1.- Proteïna precursora del pèptid $\text{A}\beta$**

El component principal de les plaques senils és el pèptid  $\text{A}\beta$ , el nom del qual fa referència a una família de petits pèptids de 39-43 AA, formats a partir del processament d'un precursor proteic més gros, l'anomenada proteïna precursora de l'amiloide (amyloid precursor protein o APP) [22].

L'APP és una glicoproteïna de membrana, de 695 AA, present en tots els tipus neuronals i també en altres teixits. El seu extrem C-terminal es troba en el citoplasma de la cèl·lula, mentre que l'extrem N-terminal es localitza cap a l'exterior cel·lular o pot estar projectat cap al lumen de vesícules intracel·lulars, com les de l'aparell de Golgi o el reticle endoplàsmic, o bé, dels endosomes intracel·lulars. La seva funció biològica és encara desconeguda, tot i que es creu que pot estar relacionada amb l'adhesió cel·lular, la inhibició de serin-proteases o bé el creixement i protecció neuronals. Més recentment, s'han trobat evidències de la participació de l'APP en el tràfic de vesícules a través l'axó, de tal manera que les incidències donades en aquest procés de trànsit neuronal podrien estar relacionades amb la patogènesi de la MA [23].

L'APP és processada proteolíticament per uns enzims específics anomenats secretases. Se sap que l'acció conjunta d'almenys tres tipus de secretases ( $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ ) pot alliberar diferents pèptids, que varien en la seva longitud [21]. Així doncs, el processament de l'APP pot tenir lloc mitjançant dues vies (Figura 7):

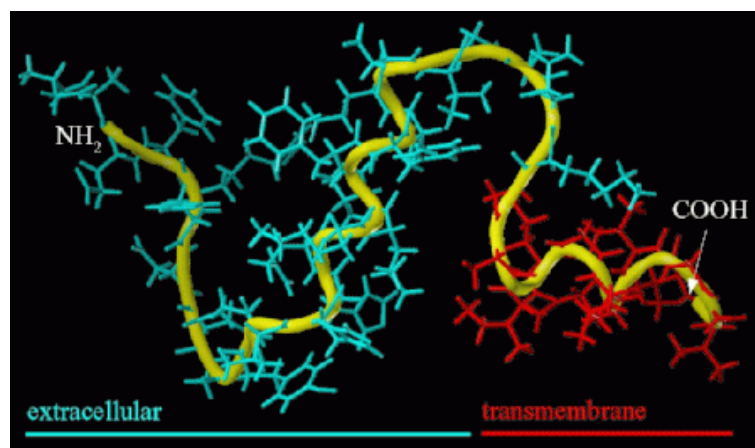


**Figura 7. Processament de l'APP.** El producte majoritari de la via amiloidegènica és el pèptid  $A\beta(1-40)$  mentre que el  $A\beta(1-42)$ , menys abundant, té un caràcter més hidrofòbic i una major capacitat de formació d'agregats.



A la via més freqüent, l' $\alpha$ -secretasa talla l'APP alliberant un fragment extracel·lular soluble, mentre que la part que queda integrada a la membrana és posteriorment processada, alliberant-se la part C-terminal del pèptid, possiblement dins de vesícules lisosomals per a la seva posterior degradació. Aquesta és la via no amiloidogènica, ja que l'acció de l' $\alpha$ -secretasa evita la formació del pèptid A $\beta$  i la seva conseqüent acumulació en forma de fibres amiloides [21]. Però una altra secretasa, la  $\beta$ -secretasa pot tallar l'APP alliberant un fragment C-terminal més llarg que, una vegada processat per la  $\gamma$ -secretasa, allibera el pèptid A $\beta$ , de baixa solubilitat. Aquesta és la via amiloidogènica, en què l'acció de la  $\beta$  i  $\gamma$ -secretasa produeix diversos tipus de pèptids.

La forma més comú és la de 40 AA (A $\beta$ 40), poc soluble, mentre que també existeixen altres formes més llargues, com la de 42 AA (A $\beta$ 42) o la de 43 AA (A $\beta$ 43), que són més insolubles que la forma A $\beta$ 40 i formen fibril·les de manera més ràpida. De fet, les plaques senils trobades in vivo solen contenir un nucli central de l'A $\beta$ 42, al qual s'uneix l'A $\beta$ 40.



**Figura 8. Pèptid A $\beta$ (1-40).** Estructura tridimensional resolta del pèptid A $\beta$ (1-40) en 40% (en volum) de TFE deuterat per NMR [24].

### **I.4.2.- La hipòtesi de la cascada amiloide**

La cascada amiloide és una de les principals teories sobre els processos patològics que succeeixen a la MA. Aquesta hipòtesi postula que la producció, agregació i deposició de l'A $\beta$  en les plaques amiloides és el fet desencadenant de la malaltia, conduint al trencament de la comunicació entre cèl·lules. Per tant, l'acumulació de cabdells neurofibril·lars, la resposta inflamatòria, la pèrdua i mort neuronal, el dany vascular i la demència associades serien conseqüència de la formació d'aquestes plaques [25].

L'observació post mortem dels cervells de pacients afectats per la MA revela que les plaques amiloides són les lesions més abundants [26]. La naturalesa citotòxica de l'A $\beta$  ha estat clarament demostrada amb la degeneració dendrítica observada en les zones d'acumulació de plaques amiloides. A més, les zones cerebrals afectades pels trastorns cognitius i la demència associada a la malaltia, com l'hipocamp i el còrtex frontotemporal, mostren colocalització dels dipòsits de l'A $\beta$  i la mort neural, tant en els pacients afectats com en ratolins transgènics [27, 28]. Totes aquestes observacions han portat als investigadors cap a l'estudi d'aquesta toxicitat tant en cultius cel·lulars com en models animals. Tot i que inicialment els resultats obtinguts en aquests estudis semblaven contradictoris, donada la gran variabilitat entre els diferents lots comercials del pèptid A $\beta$  [29], existeix un consens a l'hora d'afirmar que el procés de formació d'agregats és necessari per tal d'obtenir un efecte citotòxic [30-32].

La forma en què l'A $\beta$  produeix citotoxicitat és encara desconeguda. S'ha postulat una possible interacció amb receptors de la superfície cel·lular desencadenant una cascada de senyalització cel·lular però existeixen molt poques evidències experimentals. Per altra banda es coneix la capacitat de l'A $\beta$  per generar espècies reactives de l'oxigen (ROS) a través de la formació de peròxid d'hidrogen i l'estimulació de les cèl·lules inflammatòries [33-36]. De fet, els dipòsits de l'A $\beta$  es troben en zones on hi ha dany i estrès oxidatiu [37]. Tant l'acumulació de l'A $\beta$  com l'estrès oxidatiu són lesions que apareixen en els primers estadis de la malaltia [38], però no es coneixen amb exactitud els mecanismes moleculars concrets [39]. Les plaques amiloides es troben in vivo associades a certs metalls amb propietats d'oxidoreducció [40, 41], com el ferro i/o el coure, de tal manera que existeix la possibilitat de què, en interaccionar amb ells, es produeixin reaccions que impliquin l'alliberament de peròxid d'hidrogen i l'A $\beta$  oxidat i que, d'aquesta manera, es desencadeni una resposta inflammatòria i d'activació de la microglia [42].

Potser la major evidència per afirmar un paper clau de l'A $\beta$  en el desenvolupament de la malaltia sigui el fet de què certes mutacions en els gens per a l'APP i les presenil·lines 1 i 2 (identificades com a component de les  $\gamma$ -secretases involucrades en el processament de l'APP) estan relacionades amb l'increment de producció total de l'A $\beta$  a la variant familiar de la MA [43, 44]. A més les persones amb trisomia del cromosoma 21 o Síndrome de Down solen desenvolupar la MA ja que tenen una còpia extra del gen per a l'APP i, per tant, una sobreproducció i acumulació de l'A $\beta$ .

Totes aquestes evidències porten a pensar que A $\beta$  té un paper clau en la patogènesi de la malaltia i recolzen fortament la teoria amiloide, però en els darrers anys han sorgit

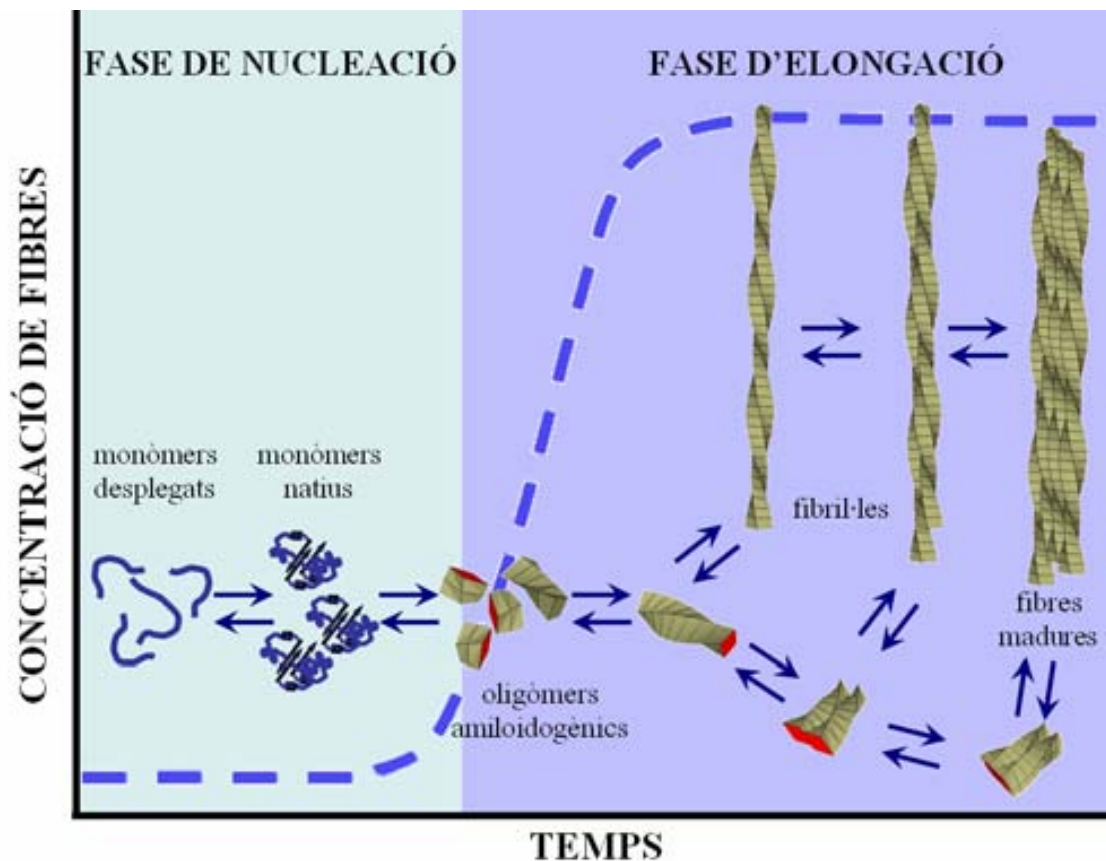
observacions i fets experimentals que qüestionen la implicació de les plaques d'A $\beta$ . Un exemple és que l'acumulació de plaques amiloides no és un fet específic de la malaltia sinó que sembla ser un marcador normal de l'envelliment [45] de tal manera que la presència de plaques en persones afectades per la MA seria només un indicador d'un envelliment accelerat. A més, existeixen poques evidències que relacionin directament l'acumulació de l'A $\beta$  amb la mort neuronal i pèrdua cognitiva [46]. Per altra banda, l'increment de la producció de l'A $\beta$  sembla també estar causada com a resposta a danys en el sistema nerviós central com, per exemple, la isquèmia [47]. Una altra prova en contra dels efectes neuro tòxics de l'A $\beta$  seria la manca de mortalitat cel·lular observada en cultius neuronals als quals se'ls ha inoculat plaques amiloides o bé s'han incubat en presència de l'A $\beta$  immobilitzat [48-50]. De fet, en una situació d'estrès energètic causat per un dany oxidatiu, la cèl·lula incrementaria els seus nivells de l'A $\beta$  com una mesura de protecció, ja que A $\beta$  podria actuar com a antioxidant [51]. D'aquesta manera A $\beta$  reduiria el nombre de ROS per tal d'evitar l'apoptosi neuronal i promoure la reparació dels danys. Totes aquestes proves i el fet que les formes oligomèriques i prefibril·lars que precedeixen a la formació de fibres amiloides semblen ser tòxiques [52] han fet revisar la tradicional teoria amiloide, de tal manera que els investigadors comencen a pensar que les fibres serien un mecanisme d'autoprotecció en comptes de que A $\beta$  sigui un agent desencadenant de la malaltia [53, 54].

### **I.4.3.- Model d'agregació del pèptid A $\beta$**

Avui dia no es coneixen amb detall els esdeveniments moleculars que tenen lloc en el procés d'agregació de l'A $\beta$  i de la conseqüent formació de les plaques senils. Tot i així, se sap que el pèptid és secretat a l'espai extracel·lular en forma monomèrica, on mitjançant un procés d'associació dona lloc a unes fibril·les que s'ensamblen entre sí per donar lloc a les conegudes fibres amiloides, resistents a les proteases.

Alguns dels estudis realitzats *in vitro* sobre la caracterització cinètica del procés de fibril·logènesi del pèptid A $\beta$  suggereixen una conversió d'estructura desordenada a estructura  $\beta$  a través d'un intermediari ric en estructura  $\alpha$  [55]. En aquests treballs el pèptid A $\beta$ 40 adopta una estructura desorganitzada una vegada dissolt i els espectres de CD mostren una transició conformacional del tipus estructura desorganitzada  $\rightarrow$  hèlix  $\alpha \rightarrow$  fulla  $\beta$ . El contingut de fulla  $\beta$  creix exponencialment fins la formació de fibres amiloides. En el cas del pèptid A $\beta$ 42 s'observa el mateix tipus de transformació estructural però amb una cinètica més accelerada. Tot i així, cal remarcar que la majoria d'aquests estudis són duts a terme en

presència de trifluoroetanol (TFE) o hexafluoroisopropanol (HFIP), que són agents que afavoreixen i estableixen l'estructura  $\alpha$ . [56] i, per tant, poden influir en la cinètica d'agregació. De fet, C. Soto et col. [57] mantenen que qualsevol canvi estructural que estableixi l'estructura  $\alpha$  podria tenir un efecte inhibitori de la formació de fibres. No obstant, aquest hipotètic intermediari  $\alpha$  no ha estat aïllat ja que, possiblement, sigui un intermediari transitori que va desapareixent de manera exponencial i simultània a l'aparició d'estructura  $\beta$  [55].

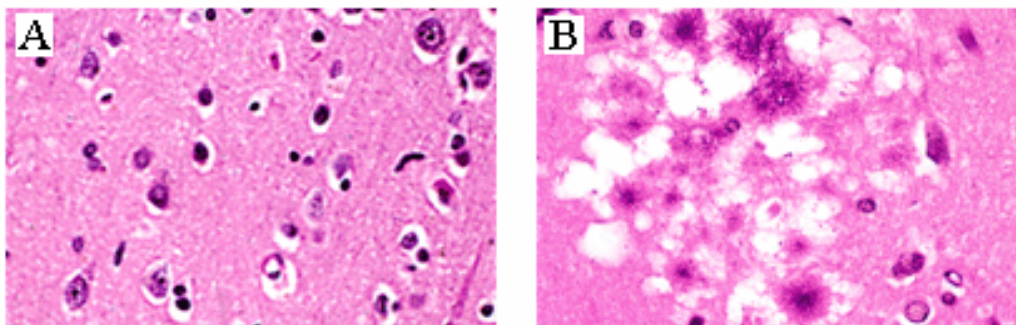


**Figura 9. Model d'agregació del peptid A $\beta$ .** El model depenent de la nucleació està basat en l'observació experimental d'una cinètica d'agregació sigmoïdal, amb una lenta fase d'inducció seguida d'una fase ràpida de nucleació per donar lloc a les fibril·les.

El model d'agregació majoritàriament acceptat consisteix en un mecanisme de polimerització depenent de nucleació (Figura 9). Aquest model comença amb una etapa lenta de formació de nuclis d'agregació (oligòmers de baix i elevat pes molecular, no fibril·lars i, per tant, que no poden unit Thioflavina T) que oligomertizarien donant lloc a protofibril·les. En la segona etapa, l'elongació, es formarien ràpidament les fibres madures per associació i/o addició de monòmers als extrems de les protofibril·les. Aquesta etapa d'elongació tindria un caràcter exponencial e irreversible [58, 59].

### ***1.5.- Les Encefalopaties Espongiformes Transmissibles***

Les encefalopaties espongiformes transmissibles (EETs) són un grup de malalties neurodegeneratives associades a un plegament aberrant de la proteïna priònica (Prp<sup>C</sup>). Àmpliament estudiades durant les darreres dècades, aquestes patologies tenen un gran impacte econòmic i social, sobretot l'encefalopatia espongiforme bovina (BSE), coneguda més col·loquialment com “malaltia de les vaques boges”, i la malaltia de Creutzfeldt-Jakob (CJD), l'anàloga en humans. La majoria dels pacients afectats presenten una demència progressiva i irreversible. L'aparença macroscòpica dels cervells és pràcticament normal i, a l'igual que en la MA, existeixen protocols de diagnosi ben estandarditzats, però és l'examen post mortem l'única eina eficaç fins ara per assegurar un bon diagnòstic. Tant en humans com en altres animals hi ha unes característiques histològiques comunes (Figura 10), com són la mort i pèrdua neuronal, amb la consegüent espongiosi, hipertròfia i proliferació de la astròglia, i formació de plaques amiloides, principalment a nivell del cerebel. Totes aquestes lesions neurològiques condueixen a una pèrdua gradual de la funció muscular i una aparició lenta i irreversible de demència, que acaben provocant inevitablement la mort del pacient.



**Figura 10. Comparació entre un cervell humà normal i un cervell infectat per prions.** (a) Tall histològic d'un còrtex humà normal, on no s'aprecien canvis patològics significants; (b) Tall histològic d'un còrtex humà afectat per CJD, on s'observa la típica vacuolització i espongiosi. [<http://www.inpro.com/images/figure1.gif>].

#### **1.5.1.- Descobriment de les Encefalopaties Espongiformes Transmissibles**

La primera descripció d'una encefalopatia de tipus espongiforme prové del segle XVIII, i fa referència a la tremolor de les ovelles o “scrapie”. Les ovelles i cabres afectades per la malaltia tenien tremolors i l'anàlisi post mortem dels seus cervells mostrava espongiosi, és a dir, presència de grans vacuoles òpticament buides en el teixit nerviós.

A meitat del segle XX, el pediatre C. Gajdusek estudiava una malaltia del sistema nerviós coneguda amb el nom de “kuru” (calfred) i que afectava a una tribu de Nova Guinea. Gajdusek va observar que el kuru no tenia una base genètica coneguda i va pensar que la seva

transmissió era deguda a les pràctiques de canibalisme d'aquella tribu. En 1959 el veterinari americà W.J. Hadlow va posar de manifest les similituds clíniques i neuropatològiques entre el kuru i l'"Scrapie" (tremolors) de les ovelles. Temps més tard, Gajdusek va demostrar similituds entre el kuru i la malaltia de Creutzfeldt-Jakob (CJD), una demència presenil descrita en humans a principis del segle XX.

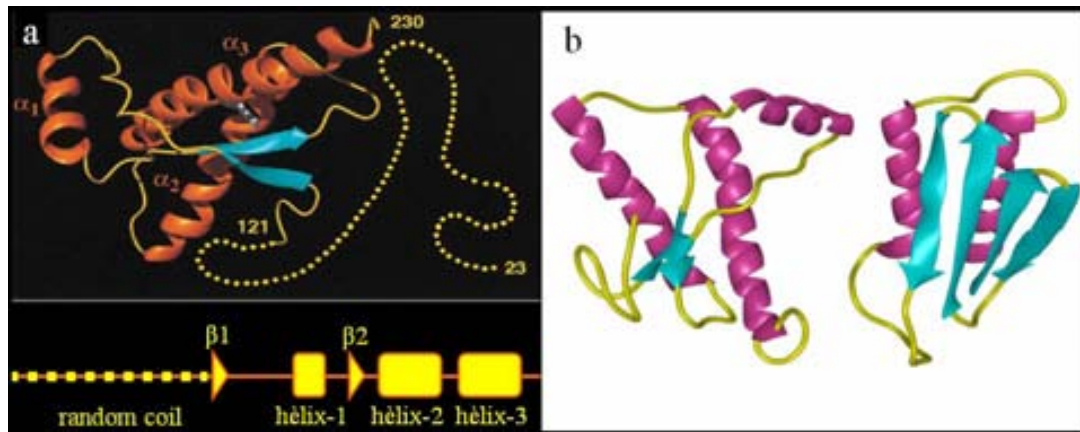
Des de finals dels anys 60 diferents malalties han estat agrupades sota el nom d'encefalopaties espongiformes transmissibles (EETs), fent referència a l'evolució lenta i irreversible i a la característica espongiosi cerebral trobada en els individus afectats, i que acaba amb la mort, i a la possibilitat de transmissió de la malaltia. Una vegada descobert el caràcter infecciós i transmissible d'aquestes malalties, els investigadors van començar la cerca de l'agent infecciós responsable. Concretament, T. Alper i J.S. Griffith, van suggerir de manera independent la possibilitat de l'existència d'un agent infecciós sense naturalesa d'àcid nucleic i capaç de causar i transmetre malalties. Però no va ser fins el 1982, que S.B. Prusiner [60] va aconseguir aïllar i purificar l'agent infecciós responsable d'aquestes patologies, i va introduir el terme prió (proteïnaceous infectious particle) per tal de diferenciar el nou agent infecciós d'altres agents patògens com els virus, viroids, bacteris, fongs o paràsits.

### **I.5.2.- Prions**

La proteïna priònica, identificada originàriament en ratolins infectats amb scrapie, està codificada per un gen cromosòmic de còpia única. Aquest gen està altament conservat i s'ha identificat en més de 13 espècies de mamífers [61, 62].

El prió és una glicoproteïna de membrana que s'expressa normalment en totes les cèl·lules del teixit nerviós, i de la qual se'n coneixen dues isoformes: la forma cel·lular (Prp<sup>C</sup>), que és la forma present normalment en les neurones, i la forma patògena (PrP<sup>SC</sup>), que és la forma aberrant causant de la malaltia, anomenada així perquè va ser descoberta en animals afectats per la malaltia Scrapie. Prp<sup>C</sup> i PrP<sup>SC</sup> comparteixen la mateixa seqüència polipeptídica, només difereixen en les seves estructures secundària i terciària (Figura 11).

La teoria priònica proposada per Prusiner suposa l'existència de 2 maneres diferents de plegament per a una mateixa seqüència polipeptídica i a més, el replegament de la Prp<sup>C</sup> per acció de la PrP<sup>SC</sup> implica un flux d'informació d'una proteïna a una altra a nivell d'estructura terciària i sense la participació d'àcids nucleics, contradient clarament al Dogma Central de la Biologia.



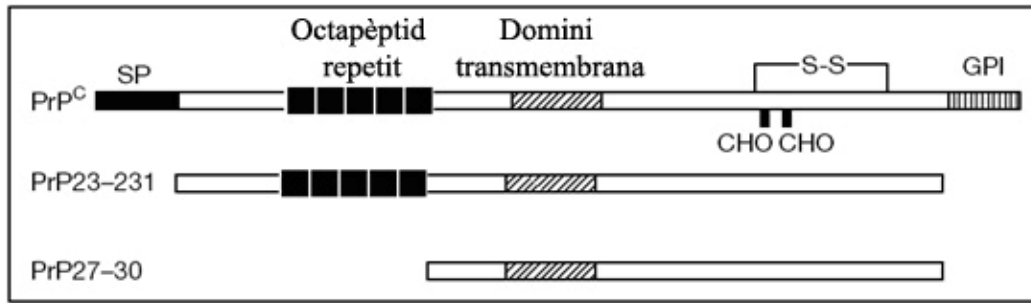
**Figura 11. PrP<sup>C</sup> i PrP<sup>SC</sup>** (a) Estructura tridimensional del fragment 23-230 de la PrP humana, resolta per NMR i esquema de la seva estructura secundària [63]. (b) Isoformes cel·lular (esquerra) i patògena de la PrP humana (dreta). A diferència de la forma cel·lular, la PrP<sup>SC</sup> presenta una gran proporció d'estructura  $\beta$  (43% de fulles  $\beta$  i 30% d'hèlix  $\alpha$ ) [64].

La funció biològica de la proteïna priònica encara roman desconeguda. Sembla ser que la seva presència en el sistema nerviós central pot estar relacionada amb la supervivència de les neurones de Purkinje [65, 66]. Per altra banda, la presència del tàndem PrP<sup>C</sup>-PrP<sup>SC</sup> sembla ser essencial per desenvolupar la malaltia [67]. També s'ha proposat un possible paper del prió en el transport axonal i en el metabolisme del coure, donada la presència d'un lloc d'unió per a aquest element [68, 69].

### **I.5.3.- La proteïna cel·lular del prió: PrP<sup>C</sup>**

La PrP<sup>C</sup> és una cadena polipeptídica d'uns 250 aminoàcids, depenent de l'espècie, en la qual hi ha una seqüència senyal de 22 residus a l'extrem N-terminal, una sèrie de repeticions d'un octapèptid PHGGGWGQ, quatre segments molt conservats en les posicions 109-122, 129-140, 178-191 i 202-218, i una regió hidrofòbica C-terminal d'unió a la membrana a través d'un glicofosfatidilinositol (GPI) [70, 71]. Aquesta cadena experimenta un procés de maduració covalent que comporta l'escissió proteolítica del pèptid senyal, l'addició d'un GPI a l'extrem C-terminal, la formació d'un pont disulfur intramolecular i, per últim, una doble glicosilació en els residus d'Asn 181 i 197 [72]. La cadena polipeptídica també conté una seqüència hidrofòbica a la part central de la proteïna que, en moltes isoformes transmembranals de la PrP, existiria com a domini transmembrana.

La PrP<sup>C</sup> és una forma sensible a proteases i està formada per 4 zones d'estructura secundària anomenades H1, H2, H3 i H4, on s'identifiquen 3 hèlices  $\alpha$  i 2 fulles  $\beta$ . És capaç d'unir específicament  $\text{Cu}^{2+}$ , de manera que podria estar implicada en l'homeòstasi d'aquest catió i els processos d'oxidoreducció [73, 74].



**Figura 12. Representació esquemàtica de l'estructura primària de les diferents espècies de PrP** SP representa el peptid senyal, S-S és el pont disulfur que uneix les histidines 179 i 214, CHO són els llocs de N-glicosilació i GPI és el lloc d'unió a la membrana a través d'un glicofosfatidilinositol [75].

La PrP<sup>C</sup> es troba principalment en les sinapsis neuronals. Respecte al metabolisme cel·lular de PrP<sup>C</sup>, estudis de translocació in vitro posen de manifest l'existència de 3 formes topològiques de PrP: una forma de secreció (idèntica a la forma ancorada a la membrana a través de GPI) i dues formes transmembrana que difereixen en la seva orientació (l'N-terminal luminal i el C-terminal luminal) [76]. La forma de secreció és transportada en vesícules de secreció a la superfície cel·lular, on s'uneix a la membrana a través del GPI i s'acumula preferentment en els dominis rics en colesterol o rafts lipídics [77, 78]. Una vegada a la membrana, algunes molècules són alliberades a l'espai extracel·lular per escissió del GPI mentre que la majoria són internalitzades en el compartiment endocític i passen a través d'un sistema de reciclatge cap a la membrana plasmàtica o bé són proteolitzades per l'extrem N-terminal i els posteriors fragments són expulsats cap a l'exterior cel·lular [79]. El metabolisme de les formes transmembranals no es coneix exactament, però se sap que la seva sobreacumulació està relacionada amb l'aparició d'estats neuropatològics [76].

#### **1.5.4.- Les formes patològiques del prió: PrP<sup>SC</sup> i PrP<sup>27-30</sup>**

A les patologies priòniques, PrP<sup>C</sup> és transformada post-traduccionament en una isoforma anomenada PrP<sup>SC</sup> [71, 72]. Aquesta conversió, que té lloc en caveolae i rafts, es caracteritza per un canvi dràstic en les propietats fisicoquímiques de la molècula [71, 78, 80]. PrP<sup>C</sup> és soluble en detergents mentre que PrP<sup>SC</sup> forma uns agregats insolubles. PrP<sup>C</sup> és alliberada de la membrana en forma soluble per digestió amb fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (PIPLC), mentre que PrP<sup>SC</sup> no és susceptible a l'acció enzimàtica i necessita d'un tractament desnaturalitzant previ per a poder eliminar el GPI. PrP<sup>C</sup> és sensible a l'acció de proteases, però PrP<sup>SC</sup> experimenta una proteòlisi limitada donant lloc a una forma truncada en el seu extrem N-terminal, anomenada PrP<sup>27-30</sup>. Aquesta forma manté intacta la seva



capacitat infecciosa [81] i és el nucli resistent a les proteases [60, 82]. De fet, és el principal component trobat en les plaques amiloides presents en els cervells dels individus afectats.

Les modificacions post-traduccionals de naturalesa covalent no semblen ser la causa directa del procés de conversió, però sí de la seva modulació. Així, el GPI determina la possibilitat de conversió ja que el procés té lloc en dominis específics de membrana, com rafts i caveolae, on les proteïnes unides a GPI tendeixen a ancorar-se [83]. Per altra banda, la glicosilació determina el tràfic intracel·lular de la proteïna [60].

Els estudis espectroscòpics han permès establir que l'estructura secundària de PrP<sup>SC</sup> solubilitzada amb detergents, a diferència de la PrP<sup>C</sup>, presenta majoritàriament fulles  $\beta$  intermoleculars capaces de formar fibres amiloides [84, 85]. Aquesta dualitat conformacional hèlix- $\alpha$ /fulla  $\beta$  sembla estar localitzada principalment a la regió 106-126, la qual produeix gran neurotoxicitat en forma de pèptid sintètic [86, 87].

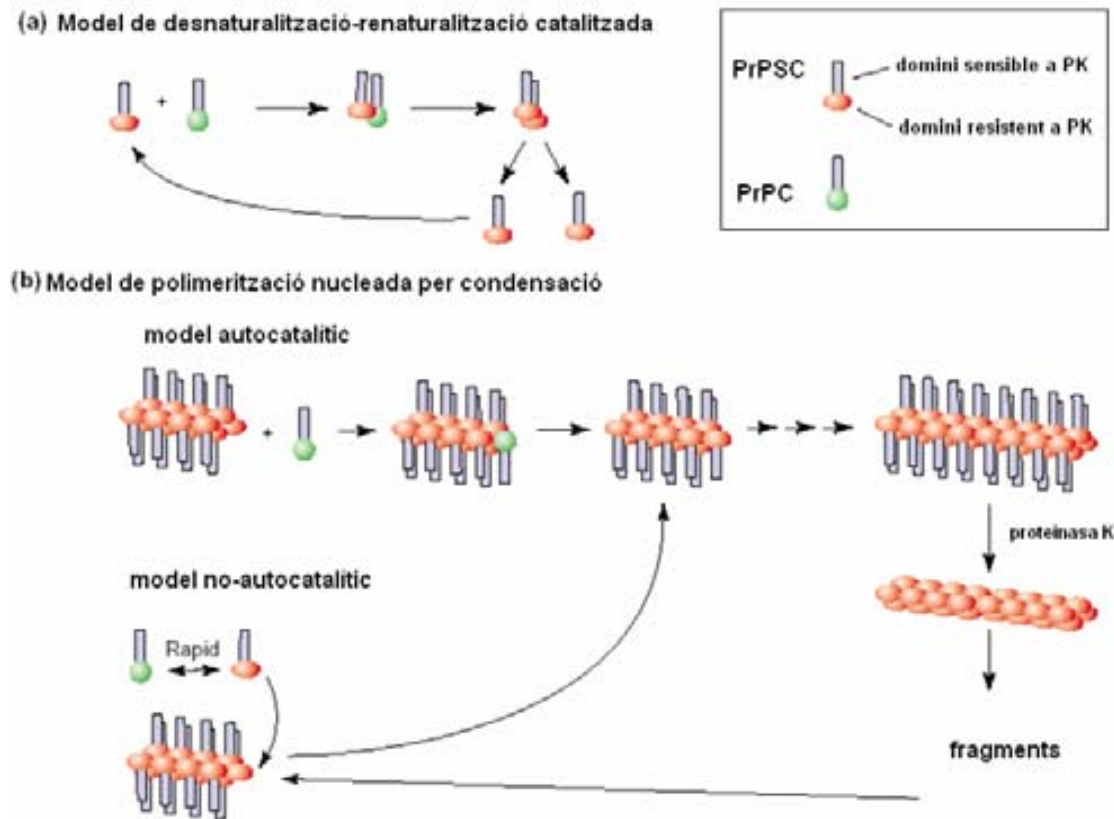
### **I.5.5.- Conversió de PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>SC</sup>**

El mecanisme mitjançant el qual es propaguen els prions no es coneix exactament. Tot i que alguns investigadors segueixen postulant la necessitat d'un àcid nucleic específic de prions, no hi ha prou evidències físiques ni químiques que demostrin la seva existència. En cas d'existir, caldria esperar que l'àcid nucleic dirigís la replicació dels prions a través d'un mecanisme semblant al dels virus.

La multiplicació de la infectivitat dels prions és un procés exponencial que implica obligatòriament la conversió post-traduccionals de PrP<sup>C</sup>  $\rightarrow$  PrP<sup>SC</sup>, un canvi conformacional en l'estructura de la proteïna, que pot ser induït per canvis en el microambient cel·lular, com per exemple, el pH o la concentració de cations divalents [88]. La participació de PrP<sup>C</sup> endògena en la conversió cap a la forma aberrant ha estat clarament demostrada en treballs amb models animals: els ratolins knock-out per al gen de PrP presenten resistència a la malaltia i són incapaços de produir noves partícules infeccioses [72], mentre que en els ratolins normals la producció de prions augmenta espectacularment durant la fase d'incubació. El nivell d'expressió de PrP<sup>C</sup> és directament proporcional a la velocitat de formació de PrP<sup>SC</sup> i, per tant, inversament proporcional a la durada del temps d'incubació. Aquests resultats han portat a pensar que PrP<sup>SC</sup> és capaç de replicar-se a sí mateixa a expenses de PrP<sup>C</sup>. El procés de propagació d'un prió comença amb la interacció de la PrP<sup>SC</sup> exògena amb PrP<sup>C</sup> o una forma parcialment desnaturalitzada PrP\* [89, 90]. El reconeixement de PrP<sup>SC</sup> té lloc a través de la regió 96-167, essent necessària però insuficient la identitat de la seqüència [67, 88, 91]. Per

altra banda, mutacions puntuals i variacions en la longitud de la cadena polipeptídica de PrP<sup>C</sup> i/o alteracions metabòliques poden desencadenar situacions patològiques [71, 92, 93].

Tot i aquestes premisses experimentals, encara es desconeix com PrP<sup>SC</sup> és capaç d'induir un canvi conformacional a PrP<sup>C</sup>. D'aquesta manera s'han proposat dos models per al procés de propagació de PrP<sup>SC</sup>.



**Figura 13.** Conversió de PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>SC</sup>. Models teòrics de conversió del príó per polimerització de l'heterodímer (a) i per polimerització [94].

El model de desnaturalització-renaturalització catalitzada [95] postula que el canvi conformacional és l'etapa limitant del procés ja que implica una desnaturalització i renaturalització de la cadena polipeptídica. PrP<sup>C</sup> és el substrat de la reacció i PrP<sup>SC</sup> és el producte, de tal manera que la velocitat de reacció depèn de la concentració de PrP<sup>C</sup> i és inversament proporcional al temps d'incubació. En aquesta reacció, PrP<sup>SC</sup> actuaria com un efector al·lostèric, regulant la conversió PrP<sup>C</sup>→PrP<sup>SC</sup>, i qualsevol anàleg de substrat, com per exemple, una molècula de PrP<sup>C</sup> de diferent espècie, retardaria la conversió i actuaria com un inhibidor competitiu. En aquest model, Prusiner proposa una interacció directa entre les dues isoformes, (Figura 13a) de manera que es formaria un intermediari heterodimèric PrP<sup>C</sup>-PrP<sup>SC</sup> que, fins ara, no ha estat possible detectar [94].

Un segon model és l'anomenat model de polimerització nucleada per condensació no covalent [90], el qual suposa un canvi conformacional lligat a un equilibri d'associació, de tal manera que ambdues conformacions coexisteixen en equilibri però l'estabilització de la isoforma patològica té lloc a través de la formació d'un nucli de PrP<sup>SC</sup>, procés que constitueix l'etapa lenta del procés. Una vegada format aquest nucli, tindria lloc un procés autocatalític, de manera que el nucli creixeria per addicions successives i ràpides de noves molècules de PrP<sup>C</sup>. Una variant d'aquesta teoria seria el model de polimerització no catalítica [96], on el canvi conformacional seria molt més ràpid i no necessitaria de la unió de PrP<sup>C</sup> al nucli preformat de PrP<sup>SC</sup> (Figura 13b).

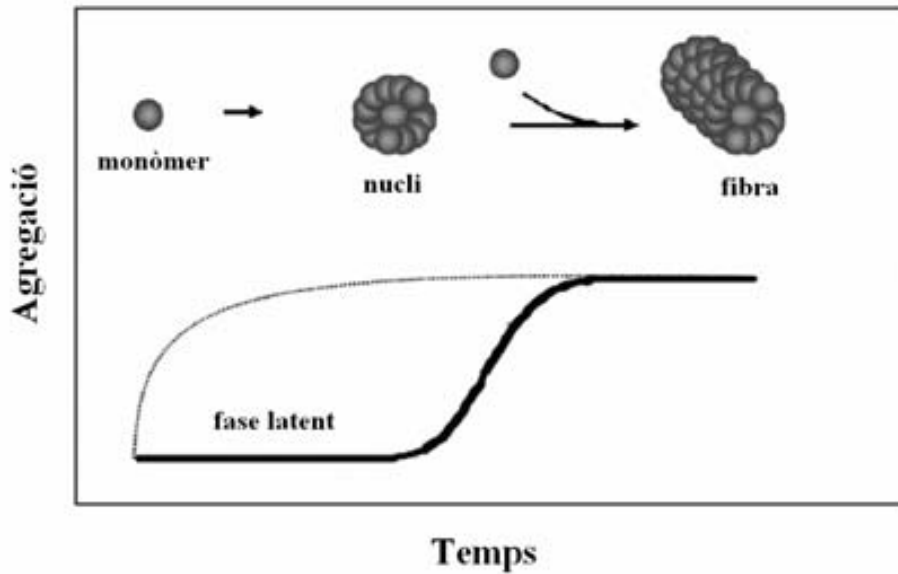
Tots aquests models expliquen l'existència de les tres variants patològiques. Les patologies infeccioses serien, doncs, resultat de la presència exògena de PrP<sup>SC</sup>, és a dir, del catalitzador o efector o bé, del nucli. Les patologies hereditàries tindrien lloc per una desestabilització de l'estructura de la PrP<sup>C</sup> o bé, per una estabilització de l'estructura de la PrP<sup>SC</sup>, afavorint la població de l'estat patològic. Finalment, les malalties esporàdiques, tot i tenir etiologia desconeguda, podrien venir donades per alteracions metabòliques o per mutacions espontànies que comportessin la formació de PrP<sup>SC</sup>. Ambdós fenòmens, tot i tenir lloc a una única cèl·lula, podrien desencadenar la formació de PrP<sup>SC</sup> i la seva autopropagació, la qual s'estendria per tot el sistema nerviós central.

### ***1.6.- Fragments peptídics utilitzats a l'estudi de la formació de fibres amiloides in vitro***

Una manera habitual d'estudiar els processos d'agregació dels pèptids relacionats amb les malalties amiloidogèniques és utilitzar fragments peptídics que contenen part de la seqüència polipeptídica de la proteïna natural. Aquests fragments solen tenir propietats fibril·logèniques i capacitat per produir efectes citotòxics en cultius cel·lulars i/o models animals. Cal tenir en compte, però, que la formació de fibres amiloides no és un procés fàcil de reproduir, ja que hi intervenen multitud de variables, i del que depenen la morfologia de les fibres i agregats formats i la seva citotoxicitat. D'aquesta manera, sovint hom troba dificultat en la reproductibilitat dels resultats experimentals duts a terme amb diferents lots d'una mateixa proteïna o pèptid [59, 97].

La formació de fibres amiloides a partir d'una forma soluble d'una proteïna amiloidogènica no té lloc de manera immediata, sinó que és un procés lent, depenent de la capacitat amiloidogènica de la pròpia seqüència polipeptídica, i es veu afectat per diferents factors externs, com per exemple la temperatura, el pH, la força iònica del medi, l'agitació, la presència de metalls i/o cations, etc. De fet, molts autors pensen que el procés de fibril·logènesi in vivo està governat per factors específics de teixit, ja que per a certes proteïnes sembla haver-hi una acumulació específica de dipòsits amiloides en determinats teixits [98].

Tal i com s'ha explicat anteriorment (*apartat 1.4.3.- Model d'agregació del pèptid A $\beta$* ), el procés d'agregació in vitro depèn de la formació d'un nucli d'agregació a partir d'espècies solubles i monomèriques, per tal de poder formar els intermediaris oligomèrics que, més tard, s'ensamblaran en forma de fibril·les i fibres amiloides. Així doncs, el resultat final d'aquest procés d'agregació dependrà, a part dels factors externs anteriorment citats, de l'estat inicial de la mostra. És a dir, la cinètica de la reacció serà molt depenent de si la mostra inicial ja conté oligòmers i/o fibril·les preformades, o si pel contrari, només conté espècies monomèriques capaces d'iniciar el procés. Per aquesta raó és important assegurar-se de l'estat dels stocks peptídics de partida (Figura 14).

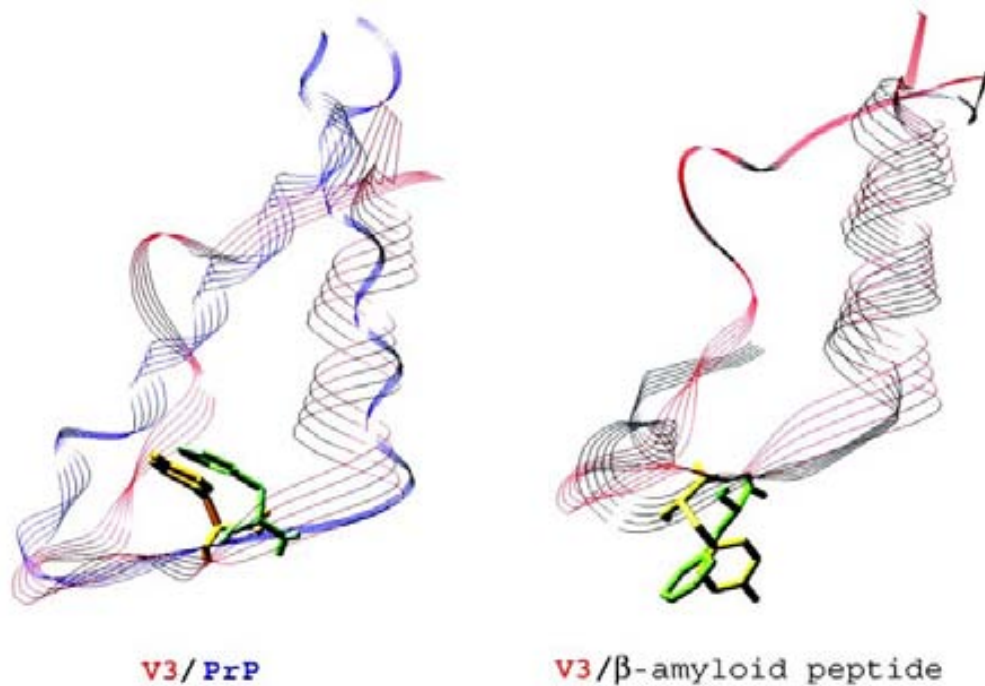


**Figura 14. Influència de l'estat inicial de la mostra en el seguiment cinètic del procés de formació de les fibres.** El procés d'agregació segueix una cinètica de tipus sigmoïdal, amb una fase de latència en que no s'observen fibres ni agregats. Una vegada començat el procés de formació del nucli d'agregació, la formació de fibres esdevé ràpida i exponencial. La fase de latència pot desaparèixer per addició d'un nucli d'agregació preformat (esquema adaptat de [99]).

En treballs sobre la MA, la forma A $\beta$ 42, juntament amb la forma A $\beta$ 40, es troba present en les plaques senils dels pacients afectats, bastant difícil de solubilitzar en solucions aquoses, sobretot a pH 4-7, donat el seu gran caràcter amiloidogènic. La forma A $\beta$ 40 és neurotòxica in vivo i en cultius neuronals, i també resulta poc soluble. Així, l'estudi d'aquestes formes requereix l'ús d'additius i dissolvents orgànics (TFE i/o HFIP, per exemple), que poden influir de manera crítica en el procés d'agregació. Per tant, molts dels estudis es porten a terme amb fragments més curts i més solubles, com per exemple el fragment A $\beta$ (25-35), que és el fragment indispensable per als efectes neurotòxics, o el fragment A $\beta$ (22-35), que forma agregats fibril·lars i citotòxics molt semblants als formats pel fragment A $\beta$ (1-42). Un altre pèptid àmpliament utilitzat com a model d'A $\beta$  és el fragment A $\beta$ (1-28), que correspon a l'extrem N-terminal del A $\beta$ , té caràcter soluble ja que no conté la regió transmembranal del pèptid natural, i és capaç de produir estructures fibril·lars i amb la mateixa capacitat antigènica que les trobades in vivo. A més, conté el segment 17-23, que es considera essencial per a la formació de les fibres amiloides [57].

Tradicionalment la majoria de treballs sobre les EETs s'han dut a terme amb la proteïna priònica sencera, ja sigui recombinant o purificada de cervells de pacients afectats, però en els darrers anys s'ha començat a treballar amb diferents fragments, com per exemple el fragment 90-145 que és la unitat infecciosa mínima [95]. Estudis recents han demostrat que el fragment PrP(106-126) té la capacitat de transformar-se i induir la transformació

$\text{PrP}^{\text{C}} \rightarrow \text{PrP}^{\text{SC}}$ . A més, s'ha demostrat que té propietats fisicoquímiques i patogèniques molt semblants a les de la  $\text{PrP}^{\text{SC}}$  [100]. Per altra banda, el fragment  $\text{PrP}(179-211)$  conté un possible motiu estructural d'unió a esfingolípids, comú al fragment 1-25 del pèptid  $\text{A}\beta$  de la MA i a una part de la proteïna gp120 del virus HIV, amb residus que podrien estar involucrats en la interacció amb esfingolípids (Figura 15). Aquest fragment inclou el lloc de la mutació E200K associada a la variant familiar de la malaltia de Creutzfeldt-Jacob [101].

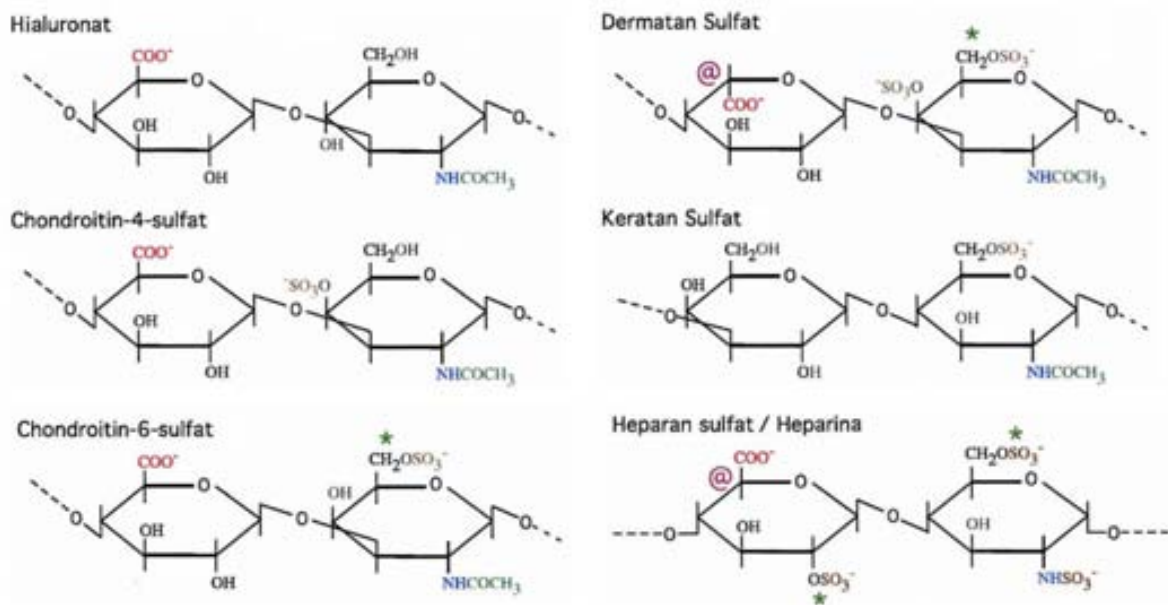


**Figura 15. Hipotètica homologia estructural entre la proteïna priònica, la proteïna gp120 del virus HIV i el pèptid  $\text{A}\beta$ .** Superposició del motiu estructural d'unió a esfingolípids del bucle V3 de la proteïna gp120 del virus HIV (vermell) amb el fragment 179-211 de la proteïna priònica humana (blau) i el fragment 1-25 del pèptid  $\text{A}\beta$  (negre).

**I.7.- Amiloidogènesi i glicosaminoglicans**

Els glicosaminoglicans (GAGs) són uns polisacàrids lineals i sense ramificar, formats a partir de la repetició d'un disacàrid, que normalment està format per una molècula d'àcid urònic (àcid D-glucorònic o àcid L-idurònic) i una molècula d'hexosamina (D-glucosamina o D-galactosamina). Segons el tipus de disacàrid, es coneixen 6 tipus de GAGs: àcid hialurònic, condroitin sulfat, dermatan sulfat, heparan sulfat, heparina, i keratan sulfat (en el cas d'aquest últim, el disacàrid està format per una hexosamina i una galactosa). Tots ells es caracteritzen per estar altament carregats de grups sulfat, excepte l'àcid hialurònic.

Els GAGs més habituals en el cervell de ratolins són el condroitin i l'heparan sulfat, la forma hipersulfatada del qual es coneix amb el nom d'heparina, tot i que l'heparina també es troba localitzada en les cèl·lules glials. L'àcid hialurònic, que és un GAG no sulfatat, també es troba present en quantitats importants en tot el teixit cerebral.



**Figura 16. Estructura dels diferents glicosaminoglicans.** El disacàrid base està format per una glucosamina i un àcid idurònic, tots dos amb grups sulfat units. Esquema adaptat de [102].

Els GAGs es troben normalment en la matriu extracel·lular de tots els teixits, i poden estar units a la bicapa externa de la membrana plasmàtica a través d'una proteïna, de tal manera que es parla de proteoglicans (PG). Tant GAGs com PGs semblen tenir un paper clau en multitud de processos cel·lulars, des de la modulació de l'activitat de molts receptors de membrana o l'entrada de virus a la cèl·lula, fins als processos d'angiogènesi en la proliferació tumoral [103].

Darrerament s'han publicat treballs que posen de manifest una possible relació entre la toxicitat cel·lular produïda per l'A $\beta$  i la proteïna priònica amb la interacció amb certs elements de la matriu extracel·lular, com ara els GAGs [103]. De fet, es creu que les càrregues negatives dels GAGs interaccionarien amb els residus aminoacídics bàsics de les proteïnes amiloidogèniques durant el transcurs de la de formació de fibres, de tal manera que els GAGs bloquejarien de manera transitòria una conformació que la proteïna no adoptaria habitualment i podrien, d'aquesta manera, servir d'anclatge per a les fibres amiloides.

L'heparina i l'heparan sulfat es poden unir a diversos efectors cel·lulars, com per exemple, factors de creixement, citoquines i quimoquines. La majoria d'estudis sobre la interacció dels GAGs amb proteïnes s'han dut a terme amb l'heparina com a GAG model, donada la seva facilitat d'obtenció en comparació amb altres GAGs, i d'aquests estudis s'ha proposat una seqüència consens per al lloc d'unió de l'heparina en pèptids i proteïnes. Aquesta seqüència és la següent: XBBBXXBX o XBBXBX, on X és un aminoàcid no bàsic i B és un aminoàcid bàsic (Arg, His o Lys) [104], de manera que les seqüències molt bàsiques poden unir heparina. Hi ha proteïnes que no tenen una seqüència consens, però uneixen heparina perquè tenen un motiu estructural definit per la reorganització dels residus aminoacídics bàsics en l'estructura tridimensional de la proteïna. La manca d'una seqüència consens conservada en algunes proteïnes amiloidogèniques suggereix que els motius d'unió a GAGs estan determinats per la reorganització estructural dels residus bàsics a l'estructura quaternària de les fibres amiloides [102].

### **I.7.1.- Interacció dels GAGs amb l'A $\beta$**

Avui dia, hi ha evidències a favor de què certs GAGs, com l'heparan, keratan, condroitin i dermatan sulfats, interaccionen amb el pèptid A $\beta$ , tant in vitro com in vivo, de la mateixa manera que també afavoreixen la seva polimerització i estableixen les fibril·les formades [105, 106]. A més, tant els GAGs com els PGs colocalitzen en els llocs on es dipositen els agregats de l'A $\beta$  en els cervells dels pacients afectats per la MA [107], de manera que és possible que els GAGs actuïn com a cofactors en la formació de les plaques amiloides.

L'A $\beta$  conté la seqüència consens d'unió a heparina VHHQKL. De fet, McLaurin et al. [105, 108] han demostrat la importància dels grups sulfats dels GAGs en la formació de les fibres amiloides i d'aquesta seqüència per a la interacció iònica entre l'A $\beta$  amb els GAGs. Els GAGs s'uneixen a les fibres amiloides de manera no covalent amb elevada afinitat.



Els complexes formats per les fibres d'A $\beta$ 40 i GAGs, per exemple, són suficientment estables com per protegir a les cadenes de glicans de la digestió amb heparanasa.

Alguns estudis fets amb línies cel·lulars en cultiu posen de manifest un possible paper neuroprotector per part dels GAGs [109]. L'heparan i condroitin sulfat atenuen els efectes neurotòxics de l'A $\beta$  en cultius neuronals, ja que és possible que segrestin els oligòmers de l'A $\beta$ , de tal manera que aquests oligòmers i els intermediaris protofibril·lars, que són altament neurotòxics [52], es podrien associar preferentment als GAGs. Aleshores, d'acord amb aquesta hipòtesi, la formació de les plaques neurítiques a la MA tindria un cert caràcter protector encaminat a reduir la neurotoxicitat de l'A $\beta$ .

### **I.7.2.- Interacció dels GAGs amb la proteïna priònica**

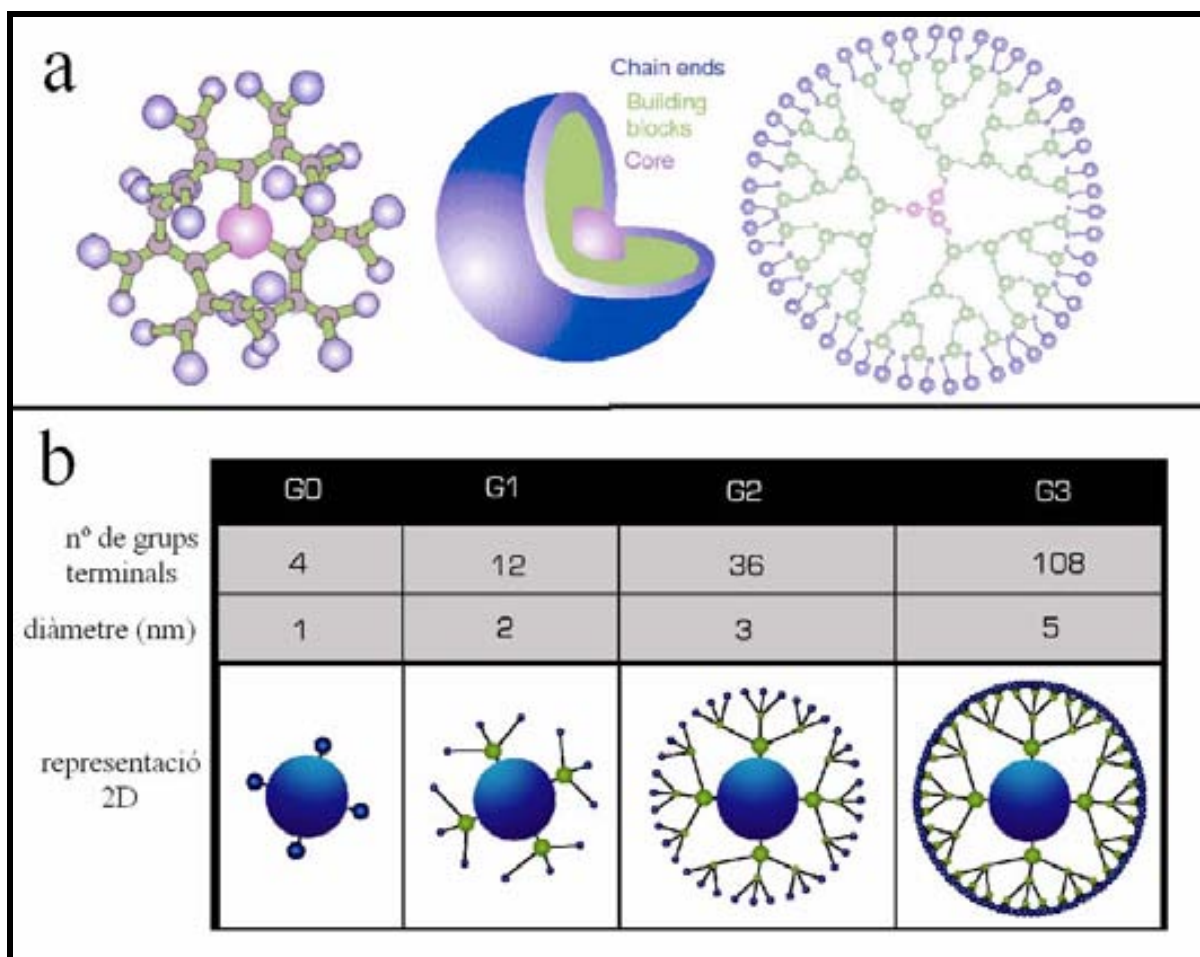
A diferència de com succeeix amb el pèptid l'A $\beta$ , en el cas dels prions sembla ser que els GAGs inhibeixen o, almenys retarden, la formació de les fibres amiloides. Es creu que la regió 109-122 de la proteïna priònica és essencial per al canvi conformacional PrP<sup>C</sup>  $\rightarrow$  PrP<sup>SC</sup> [87], i els estudis realitzats in vitro amb el pèptid sintètic 106-126 posen de manifest la seva capacitat per polimeritzar i donar lloc a fibres que resulten tòxiques en cultius neuronals [100]. Aquest pèptid conté un cor hidrofòbic (AGAAAAGA) i un possible motiu d'interacció amb GAGs amb la seqüència KTNMKH. De fet, els GAGs sulfatats s'uneixen in vitro a aquest pèptid i en disminueixen la seva capacitat per a polimeritzar, ja que les fibres formades tenen una morfologia diferent [110], però en canvi, l'àcid hialurònic no inhibeix la polimerització del pèptid, tot i que les fibres formades també tenen diferent morfologia. Així, és possible que la interacció entre el motiu KTNMKH i les càrregues negatives dels sulfats dels GAGs facin disminuir la capacitat del pèptid per a polimeritzar [110]. Tot i així, és important remarcar que els GAGs són capaços d'estimular la conversió PrP<sup>C</sup>  $\rightarrow$  PrP<sup>SC</sup>, però semblen inhibir la polimerització in vitro del pèptid 106-126 [110], la qual cosa indica que probablement són processos que tenen lloc de distinta manera i amb canvis conformacionals diferents.

Per altra banda, s'ha vist que els GAGs també poden interaccionar amb la proteïna priònica sencera [111], i certs GAGs, com l'heparan sulfat, poden estimular directament la conversió PrP<sup>C</sup>  $\rightarrow$  PrP<sup>SC</sup> [112]. Aquestes dades i el fet de trobar heparan sulfat i altres PGs associats a les plaques amiloides in vivo [107], suggereixen que els GAGs podrien facilitar la formació de PrP<sup>SC</sup> i, per tant, podrien ser cofactors essencials a la conversió in vivo.

De la mateixa manera que l'A $\beta$ , els GAGs semblen també poder tenir un paper neuroprotector en les malalties priòniques [113]. Heparan sulfat i altres GAGs semblen unir-se a PrP<sup>SC</sup> i, per tant, la bloquegen i n'impedeixen la seva propagació en cultius cel·lulars i models animals. Per altra banda, els GAGs també inhibeixen la toxicitat cel·lular induïda pel pèptid 106-126 en cultius neuronals. Tot i així, és una paradoxa el fet de que els GAGs tinguin aquest efecte neuroprotector i inhibitori de la formació de PrP<sup>SC</sup> in vivo [111] alhora que resulten estimuladors de la formació de PrP<sup>SC</sup> en els estudis in vitro [112, 114].

### **I.8.- Amiloides i dendrímers**

Els dendrímers són una nova classe de polímers globulars, molt ramificats i de gran mida que, gràcies a la seva estructura, permeten un gran ventall d'aplicacions biomèdiques, com per exemple l'encapsulament de fàrmacs o la teràpia gènica. El terme dendrímer deriva del grec dendron, que significa “arbre”, fent referència a la seva forma hiperramificada i arborescent. El primer dendrímer va ser sintetitzat per D.A. Tomalia i col·laboradors [115]. Al mateix temps i de manera independent, el grup de Newkome [116] va donar a conèixer la síntesi i, des d'aleshores els dendrímers han estat àmpliament estudiats degut a la seva forma única, representada a la Figura 17.



**Figura 17. Estructura dels dendrímers.** (a) Diferents representacions de l'estructura, mostrant les seves parts: nucli ramificacions, grups terminals i espais interns.(b) Diferents generacions de dendrímers.

Els primers dendrímers sintetitzats van ser els de tipus PAMAM (poliamidoamines), que estan formats per un nucli central d'amoni. Actualment, existeixen diferents companyies especialitzades en la síntesi de dendrímers a gran escala com Dendritech i també es poden

adquirir del catàleg de productes de la companyia Sigma, com qualsevol altre compost químic.

El procés de síntesi té lloc mitjançant una seqüència de reaccions iteratives, de tal manera que cada etapa de la reacció dóna lloc a una nova i major generació. La síntesi es pot donar de manera divergent (el dendrímer creix a partir d'un nucli central, per addició de monòmers) o convergent (el dendrímer creix per etapes, des de les branques cap al nucli central). Al final de cada branca hi ha tres grups amino lliures, els quals poden reaccionar amb dues molècules de metil acrilat i dues molècules d'etilendiamina. Cada seqüència de reaccions completa dóna lloc a una nova generació del dendrímer, amb unes propietats definides, podent arribar fins a 10 generacions. El nombre de grups reactius a la superfície es duplica amb cada generació, mentre que la massa molecular augmenta més de dues vegades.

Els dendrímers de generacions intermèdies (per exemple, 0.5, 1.5, 2.5) tenen caràcter aniònic, degut a la presència de grups carboxilats en la seva superfície. Els dendrímers de generacions baixes (per exemple, 0, 1 i 2) tenen una forma bastant asimètrica i contenen una estructura molt més oberta en comparació amb generacions més grans. A mida que el dendrímer creix, esdevé més ramificat i adopta una estructura més globular, fins que s'arriba a "l'estat ramificat crític", on el dendrímer ja no pot créixer més per manca d'espai. En el cas dels dendrímers PAMAM, aquesta situació s'observa a partir de la desena generació.

Els dendrímers són macromolècules monodisperses, a diferència dels polímers lineals, ja que la seva massa i mida molecular són controlades de manera específica durant el seu procés de síntesi. Degut a la seva arquitectura, els dendrímers en solució presenten una certa viscositat que augmenta a mida que augmenta la generació. La seva solubilitat ve determinada per la presència de grups terminals, de tal manera que els dendrímers amb grups terminals hidrofílics són més solubles en dissolvents polars mentre que els que tenen grups hidrofòbics són més solubles en dissolvents orgànics. La seva forma globular i la presència de cavitats internes confereixen als dendrímers unes propietats úniques, com la possibilitat d'encapsular fàrmacs en el seu interior i el seu posterior redireccionament cap a òrgans i teixits específics en el cas de la teràpia gènica.

La recerca i caracterització de molècules que interfereixin en el procés d'agregació de pèptids i proteïnes amiloides resulta del màxim interès en el desenvolupament d'estratègies per a combatre els mecanismes desencadenants de les patologies. En aquest sentit és interessant ressaltar l'efecte descrit dels dendrímers sobre la desagregació de fibres de proteïna priònica [117-119]. Treballs experimentals han demostrat que els dendrímers amb grups amino a la seva superfície, com els PAMAM (poliamidoamina) o

el PPI (polipropilenimina) són capaços d'eliminar les molècules de PrP<sup>SC</sup> de cultius neuronals infectats per prions [118, 119] i que la capacitat d'eliminació dels prions augmenta amb el nombre de generacions del dendrímer. J. Solassol et al. han estudiat l'efecte de 3 generacions (3<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup> i 5<sup>a</sup>) de P-dendrímers (dendrímers que contenen grups fosfats) com a agents anti priònics [120]. Aquests dendrímers es caracteritzen per la presència de grups fosfats en els seus enllaços i grups amino a la seva superfície, de tal manera que la superfície del dendrímer és hidrofílica i el seu interior és hidrofòbic, permetent una gran eficàcia de penetració en les membranes. Els resultats obtinguts demostren una capacitat d'eliminació dels prions existents en les cèl·lules infectades i de pèrdua de la infectivitat amb el tractament amb P-dendrímers. De fet, els P-dendrímers han estat el primer tipus de dendrímer estudiat in vivo i s'ha vist que poden inhibir la replicació de PrP<sup>SC</sup> a la melsa en ratolins infectats.

### ***1.9.- Amiloides i membranes***

Les interaccions lípid/proteïna tenen un paper clau en multitud de processos cel·lulars com per exemple les vies de transducció de senyals, el transport intracel·lular, la catàlisi enzimàtica, la defensa antimicrobiana o el control de la fusió de membranes [121-124]. La bicapa lipídica és la base estructural de les membranes biològiques, i comporta un determinat microambient per a les proteïnes que s'hi troben interaccionant. Aquestes interaccions, que afecten a l'estructura proteica, estan controlades no només per característiques fisicoquímiques de la membrana (estat de fase, curvatura i elasticitat de la bicapa lipídica, càrrega superficial o grau d'hidratació) si no també per la seva composició lipídica (insaturacions de les cadenes d'àcids grassos dels fosfolípids que en formen part o bé, la conformació tant dels grups dels seus caps com de les cadenes hidrocarbonades) [125]. Tots aquests factors afecten a la conformació de les proteïnes i al seu estat d'oligomerització, tal i com suggereixen diferents estudis sobre l'agregació de pèptids i proteïnes en presència de membranes [126-128]. En el cas dels pèptids i proteïnes amiloides, les membranes cel·lulars poden influir en el procés d'agregació i, a la vegada, els agregats amiloides semblen afectar l'estructura i propietats de les membranes. Ambdós aspectes poden resultar capitals a l'hora d'establir el paper dels pèptids i proteïnes amiloides en el desenvolupament de les patologies [129-132].

Cal destacar també el fet que els processos de formació de fibres amiloides al teixit cerebral semblen tenir lloc en uns dominis lipídics específics coneguts com a rafts i caveolae (Figura 18), rics en colesterol i esfingolípids [133]. Aquests microdominis lipídics serveixen de plataforma o ancoratge de diverses proteïnes perifèriques i integrals, com per exemple, les proteïnes unides a la membrana a través de GPI. Donada la seva capacitat de difusió lateral, els rafts estan implicats en l'activació de receptors cel·lulars i la transducció de senyals, així com les interaccions entre hostes i patògens.

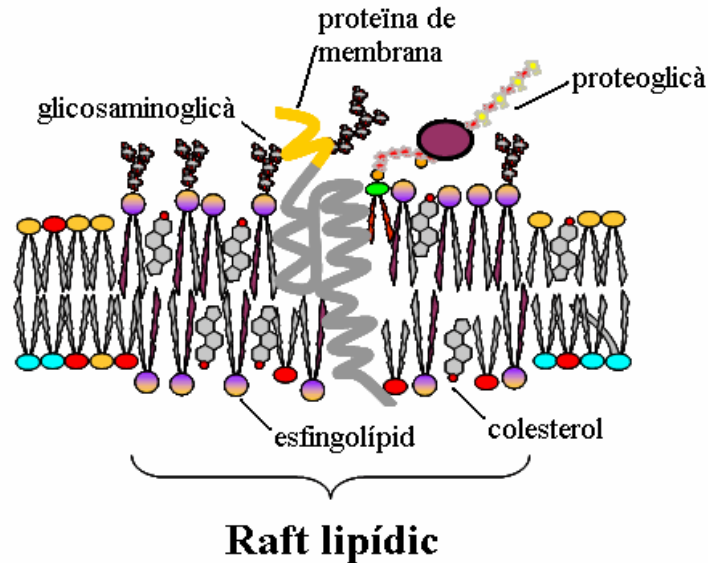


Figura 18. Representació esquemàtica d'un raft lipídic.

### **I.8.1.- Paper de les membranes biològiques en la fibril·logènesi de l'A $\beta$**

Diverses línies d'investigació suggereixen que la formació de fibres amiloides i la citotoxicitat cel·lular a la MA són processos associats a les membranes biològiques [134-138]. La bicapa lipídica actua com un lloc catalític per al procés de fibril·logènesi, proveint d'un entorn que facilitaria a les proteïnes adoptar una conformació i orientació apropiades per tal d'ensamblar-se formant estructures fibril·lars [136, 138-140].

La formació de fibres amiloides comporta una permeabilització de la membrana, de tal manera que l'estructura de la bicapa lipídica s'altera [139-143]. De fet, la capacitat d'associació del pèptid A $\beta$  a bicapes lipídiques és ben coneguda, en particular la capacitat de formació de canals iònics, la qual podria estar relacionada amb els efectes del pèptid sobre l'homeòstasi del calci en cultius neuronals [144].

Se sap que el pèptid A $\beta$  és capaç d'experimentar un canvi conformacional des d'una estructura desordenada cap a una estructura de fulla  $\beta$  mitjançant la unió a vesícules lipídiques riques en gangliòsids. De fet, aquestes zones de la membrana riques en gangliòsids i/o altres oligosacàrids servirien de lloc per a l'ensamblatge i formació del nucli d'oligòmers i la posterior formació de fibres madures [145, 146].

Estudis recents apunten a una correlació entre l'agregació del fragment C-terminal del pèptid A $\beta$  associat a bicapes lipídiques i la inducció d'apoptosi en neurones [147]. Alguns autors proposen dos tipus d'interacció entre el pèptid A $\beta$  i les membranes segons sigui la

conformació del pèptid i la càrrega elèctrica de les mateixes [135]. En forma de fulla  $\beta$ , el pèptid s'associaria a la membrana. Si les membranes estan carregades negativament, l'associació comportaria l'agregació del pèptid. Quan el pèptid no adopta una estructura regular, podria inserir-se a la bicapa i aquesta inserció seria major quant més negativa fos la superfície de la membrana.

### **I.8.2.- Paper de les membranes biològiques en la propagació dels prions**

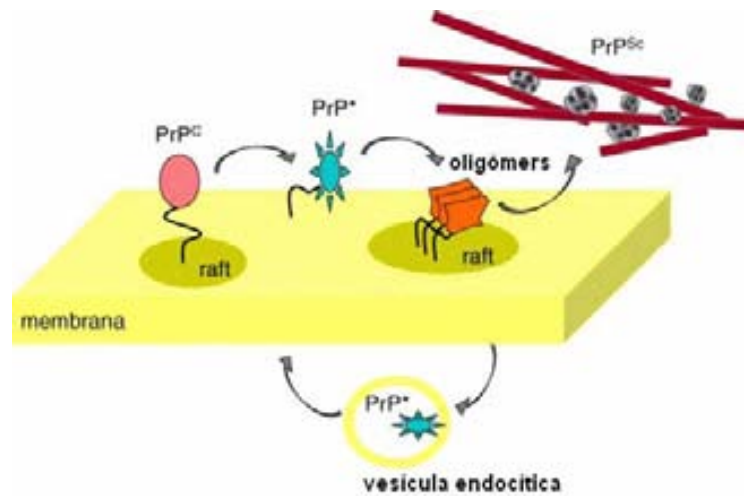
Com qualsevol altra proteïna unida a la membrana a través d'un GPI, PrP<sup>C</sup> té tendència a acumular-se en els rafts lipídics [77]. Se sap, a més, que la interacció amb la membrana juga un paper clau en la conversió PrP<sup>C</sup>  $\rightarrow$  PrP<sup>SC</sup> ja que a les extraccions de mostres de cervells afectats per la malaltia, la PrP<sup>SC</sup> copurifica amb restes lipídiques [148] i el tractament de les membranes amb PIPLC allibera PrP<sup>C</sup> però no PrP<sup>SC</sup> [77]. Tot i que la majoria de PrP<sup>SC</sup> d'animals infectats es troba unida a un GPI, també hi ha PrP soluble (sense GPI) en cultius cel·lulars i en cervells de ratolins [77]. De fet, hi ha treballs experimentals [149] que mostren que la conversió PrP<sup>C</sup>  $\rightarrow$  PrP<sup>SC</sup> no és possible si la PrP no ha perdut abans l'ancoratge de GPI, de tal manera que la PrP lliure de GPI actuaria com un iniciador en el procés de fibril·logènesi.

Els estudis estructurals i biofísics utilitzen una PrP recombinant que careix de l'ancoratge de GPI. Aquesta PrP es pot plegar donant lloc a 2 formes diferents: l' $\alpha$ -PrP i la  $\beta$ -PrP, que representen a la PrP<sup>C</sup> i la PrP<sup>SC</sup> respectivament [150]. Cadascuna d'aquestes formes té una diferent afinitat d'unió a membranes i mostren una unió diferent en funció del pH. Totes dues s'uneixen a membranes carregades negativament i que contenen fosfatidilglicerol (PG) o fosfatidilserina (PS), d'una manera dependent del pH, però cap d'elles s'uneix a membranes formades per fosfolípids zwitteriònics com la fosfatidilcolina (PC) [130, 132, 150]. En canvi, tant  $\alpha$ -PrP i com  $\beta$ -PrP s'uneixen a membranes model riques en colesterol i esfingomielina, que mimetitzen rafts lipídics, i de manera dependent del pH: les dues formes s'hi uneixen a pH neutre, però  $\beta$ -PrP ho fa més fortament que  $\alpha$ -PrP, i a més, la unió a les membranes ve afavorida per pH àcidic [151]. No se sap amb certesa el lloc concret on té lloc la conversió PrP<sup>C</sup>  $\rightarrow$  PrP<sup>SC</sup> a la cèl·lula, però el fet de què tant la unió a membranes com de què els processos de desplegament de proteïnes solen tenir lloc a pH baixos fa pensar que la conversió podria tenir lloc en els endosomes .

La unió de PrP a les membranes provoca una sèrie de canvis estructurals en la PrP que depenen del pH, de la composició lipídica de la membrana i de la pròpia conformació de la



PrP. Però la unió de PrP també provoca canvis en la bicapa lipídica que poden desestabilitzar la membrana. La unió tant de la isoforma  $\alpha$ -PrP com de la  $\beta$ -PrP a membranes model carregades negativament fa que la PrP adopti una estructura  $\beta$  [132, 152].



**Figura 19. Model il·lustratiu del paper dels rafts en la fibril·logènesi dels prions.** Esquema modificat de T.J.Pinheiro et al [150].

Donat que les dues isoformes de la PrP es troben normalment en els rafts lipídics, hom suposa que la conversió té lloc en aquests microdominis lipídics. Hi ha evidències experimentals de què la PrP<sup>C</sup> no unida a rafts no pot actuar com a substrat de la conversió PrP<sup>C</sup> → PrP<sup>SC</sup> [83, 153]. Per altra banda s'ha vist que l'eliminació dels esfingolípid i, per tant, desestabilització dels rafts lipídics promou la infecció per prions en cultius neuronals i un conseqüent augment de la formació de PrP<sup>SC</sup> [154], suggerint que la conversió PrP<sup>C</sup> → PrP<sup>SC</sup> podria tenir lloc fora dels rafts lipídics. Tenint en compte totes aquestes evidències els rafts lipídics semblen tenir un doble paper en la fibril·logènesi dels prions, de manera que s'ha proposat un model de conversió dels prions en ambients amb i sense rafts lipídics [150]. En aquest model el raft lipídic protegeix la PrP<sup>C</sup> de la conversió. Durant el seu trànsit intracel·lular, la PrP es pot unir a zones de la membrana riques en lípids amb càrrega negativa, fet que condueix cap a un estat ric en estructura  $\beta$ , PrP\*, i que té una elevada afinitat pels rafts lipídics i s'hi uneix. L'acumulació de PrP\* afavoreix les interaccions proteïna-proteïna donant lloc a oligòmers de PrP que formen l'anomenat nucli d'agregació, al qual s'uneixen més espècies oligomèriques donant lloc a fibril·les i, finalment, fibres amiloides (Figura 19).

## **II. OBJECTIUS**



Els pèptids i proteïnes amiloidogèniques no tenen el mateix origen fil·logenètic ni tenen una homologia seqüencial, però hi ha un fet comú que els caracteritza: la seva capacitat per formar agregats amiloides, els quals presenten unes característiques físico-químiques semblants. Aquesta semblança fa pensar en la possibilitat d'un mecanisme de formació dels agregats amiloides, comú als diferents pèptids i proteïnes. Tant la MA com les EETs semblen estar relacionades amb la formació d'aquest tipus d'agregats fibril·lars, rics en estructura  $\beta$  i per tant, la caracterització de trets comuns en la formació d'amiloides en un cas i altre, pot ser important a l'hora de definir estratègies per al tractament de les malalties. En aquest context resulta interessant la possible homologia estructural definida per R. Mahfoud et al. [101] entre pèptid  $A\beta(1-25)$  relacionat amb la malaltia d'Alzheimer i el fragment PrP(179-211) de la proteïna priònica humana. La proposta de R. Mahfoud [101] et al. implica la possibilitat de que el fragment priònic PrP(179-211) sigui un pèptid amiloide. En el moment d'iniciar aquesta tesi, però hi ha una manca total d'evidències experimentals que permetin definir-lo com a tal.

Així doncs, ens plantejarem com a objectiu general d'aquest treball l'estudi de la caracterització del fragment PrP(185-208) com a pèptid amiloide, en la relació a les propietats amiloides de l' $A\beta(1-28)$  i a més, l'ús dels dos fragments peptídics per determinar la influència dels dendrímers en el procés de formació d'agregats amiloides. L'assoliment d'aquest objectiu general s'ha plantejat a través dels següents objectius específics:

- La caracterització de la cinètica d'agregació dels dos pèptids.
- L'estudi de la influència dels glicosaminoglicans en el procés d'agregació.
- L'estudi de la influència de la diferent composició lipídica de les membranes biològiques en el procés d'agregació.
- L'estudi de la interacció dels dendrímers amb els dos pèptids amiloidogènics.
- L'estudi de l'efecte citotòxic in vitro dels diferents agregats i fibres amiloides obtinguts en els processos d'agregació.

En aquest treball s'han combinat diferents tècniques biofísiques com l'espectroscòpia d'infraroig amb Transformada de Fourier (FTIR), l'espectroscòpia de fluorescència i la microscòpia electrònica de transmissió, les quals proporcionen una informació altament complementària en l'estudi de la formació de les fibres amiloides.



### **III. MATERIALS I MÈTODES**



### **III.1.- Materials utilitzats**

#### **III.1.1.- Dissolvents i reactius**

**Taula 2. Dissolvents i reactius utilitzats en aquest treball**

<b>Principals dissolvents i reactius</b>	
Heparina	Sigma&Aldrich
Hepes	Sigma&Aldrich
D <sub>2</sub> O	Merck
NaOD	Sigma&Aldrich
DCl	Sigma&Aldrich
Tris	Melford
HCl	Merck
NaOH	Sigma&Aldrich
Metanol	Merck
Etanol	Merck
Cloroform	Scharlau
NaCl	Sigma&Aldrich
KCl	Sigma&Aldrich
H <sub>2</sub> O destil·lada	
<b>Lípids</b>	
L- $\alpha$ -Fosfatidilcolina (PC)	Sigma&Aldrich
L- $\alpha$ -Fosfatidilserina (PS)	Sigma&Aldrich
Colesterol (Chol)	Sigma&Aldrich
Esfingomielina (SM)	Sigma&Aldrich
Galactosilceramida (GalCer)	Sigma&Aldrich
Extracte lipídic de cervell	Avanti Polar Lipid



---

### **Pèptids sintètics**

---

A $\beta$ (1-28)

A $\beta$ (1-28)H13A

A $\beta$ (1-28)H14A

A $\beta$ (1-28)Y10A

Jerini Peptide Technologies

PrP(185-208)

PrP(185-208)H187A

PrP(185-208)F198A

---

### **Sondes fluorescents**

---

Tioflavina T (ThT)

Sigma&Aldrich

1-(3-sulfonatopropil)-4-[[ $\beta$ [2-(di-n-octilamino)-6-naftil]vinil]piridina (Di-8-ANEPPS)

Molecular Probes

---

### **Cultius cel·lulars**

---

Línia cel·lular de neuroblastoma SH-SY5Y

Subministrada per la Dra. Núria Durany (Universitat Internacional de Catalunya)

Medi de cultiu Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM/Ham's F12,1:1)

Biological Industries

L-Glutamina

Gibco

Solució de penicil·lina/estreptomicina

Gibco

Aminoàcids no essencials (MEM non-essential amino acids)

Sigma&Aldrich

Sèrum fetal boví

Gibco

Bromur de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT)

Sigma&Aldrich

Dimetilsulfòxid (DMSO)

Sigma&Aldrich

---

### III.1.2.- Pèptids sintètics

Els diferents pèptids estudiats es van adquirir de la companyia Jerini Peptide Technologies i tenen una puresa superior al 90%, determinada amb HPLC i espectrometria de masses. Normalment, els pèptids de síntesi química es comercialitzen amb àcid trifluoroacètic (TFA) com a contraió, el qual té una banda d'absorció al voltant de  $1674\text{ cm}^{-1}$  a la regió de l'espectre d'infraroig, suposant un problema per a l'estudi de la regió amida I, on absorbeixen les vibracions dels enllaços corresponents a les diferents estructures secundàries. En canvi, l'ió  $\text{Cl}^-$  no provoca aquest tipus d'interferència, raó per la qual els pèptids utilitzats en aquest treball van ser sintetitzats amb  $\text{Cl}^-$  com a contraió. A la Taula 3 es detalla la seqüència aminoacídica dels pèptids estudiats:

**Taula 3. Seqüències polipeptídiques.** En vermell es ressalta la mutació introduïda a cada seqüència respecte el pèptid wild type.

Nom del pèptid	Seqüència
A $\beta$ (1-28)	$\text{H}_3^+\text{N-DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNK-COO}^-$
A $\beta$ (1-28)H13A	$\text{H}_3^+\text{N-DAEFRHDSGYEV}\color{red}{\text{A}}\text{HQKLVFFAEDVGSNK-COO}^-$
A $\beta$ (1-28)H14A	$\text{H}_3^+\text{N-DAEFRHDSGYEVH}\color{red}{\text{A}}\text{QKLVFFAEDVGSNK-COO}^-$
A $\beta$ (1-28)Y10A	$\text{H}_3^+\text{N-DAEFRHDSG}\color{red}{\text{A}}\text{EVHHQKLVFFAEDVGSNK-COO}^-$
PrP(185-205)	$\text{H}_3^+\text{N-KQHTVTTTTKGENFTETDVKMMER-COO}^-$
PrP(185-205)H187A	$\text{H}_3^+\text{N-KQ}\color{red}{\text{A}}\text{TVTTTTKGENFTETDVKMMER-COO}^-$
PrP(185-205)F198A	$\text{H}_3^+\text{N-KQHTVTTTTKGEN}\color{red}{\text{A}}\text{TETDVKMMER-COO}^-$

El fragment 1-28 del pèptid A $\beta$  és molt hidrofílic i conté una gran proporció de residus carregats (un 46%) que, molt possiblement, estan involucrats en la generació d'interaccions electrostàtiques que es donen durant el procés d'agregació, ja sigui promovent-la o inhibint-la [155]. A la bibliografia es poden trobar diversos treballs en què aquest fragment peptídic produeix estructures oligomèriques agregades molt similars als trobats en els dipòsits amiloides in vivo. El pèptid derivat de la proteïna priònica humana, PrP(185-208), les propietats amiloidogèniques del qual són encara poc conegudes, presenta una possible homologia estructural amb el fragment 1-25 del pèptid A $\beta$  [101]. Ambdós pèptids contenen residus d'His, Tyr i/o Phe que faciliten la unió als anells de sucre de carbohidrats complexos.

### **III.3.- Espectroscòpia de fluorescència**

#### **III.3.1.- Fonaments teòrics**

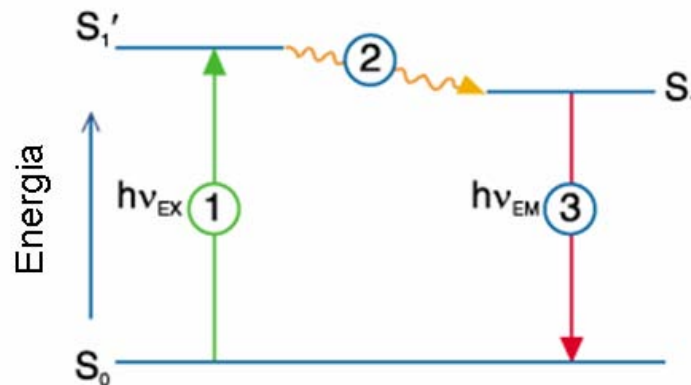
La fluorescència és un procés d'emissió a través del qual les molècules són excitades per l'absorció de radiació electromagnètica. Les espècies excitades es relaxen cap al seu estat fonamental, alliberant el seu excés d'energia en forma de fotons. Normalment, el temps de vida mitja d'una espècie excitada és petit perquè hi ha diferents maneres en què un àtom o una molècula excitada pot alliberar el seu excés d'energia i relaxar-se cap al seu estat fonamental. Aquestes diferents maneres són l'emissió de calor, la fosforescència i la fluorescència.

La fluorescència és el resultat d'un procés en 3 etapes que té lloc en certes molècules anomenades fluoròfors o sondes fluorescentes. El procés pel qual té lloc la fluorescència està representat a la Figura 20. A la primera etapa del procés de fluorescència, un fotó d'energia  $h\nu_{EX}$  és absorbit pel fluoròfor, els electrons del qual passen des del seu estat fonamental ( $S_0$ ) fins a un nivell electrònic excitat més elevat, donant lloc a un estat electrònic excitat de singlet ( $S_1'$ ).

A la segona etapa del procés, l'estat excitat de singlet roman durant un cert temps depenent del temps de vida mitja del fluoròfor (entre 1 i 10 nanosegons). Durant aquest temps, el fluoròfor experimenta una sèrie de canvis conformacionals però també està subjecte a possibles interaccions amb el seu entorn molecular. Aquests processos tenen dues conseqüències importants. La primera és que l'energia de l'estat electrònic excitat de singlet ( $S_1'$ ) es dissipa parcialment en forma de calor donant lloc a un estat electrònic relaxat de singlet ( $S_1$ ) des del qual s'origina la fluorescència. La segona conseqüència és que no totes les molècules que inicialment van ser excitades per absorció de radiació electromagnètica (etapa 1) retornen al seu estat basal ( $S_0$ ) per emissió de fluorescència, sinó que hi poden tenir lloc altres processos com la desactivació deguda a col·lisions laterals o la transferència d'energia de ressonància cap a altres molècules presents en el medi, els quals poden fer disminuir la població de molècules en l'estat excitat. La mesura de la quantitat relativa d'aquests processos és el rendiment quàntic que, es defineix com la relació entre el nombre de fotons fluorescents emesos (etapa 3) i el nombre de fotons absorbits (etapa 1).

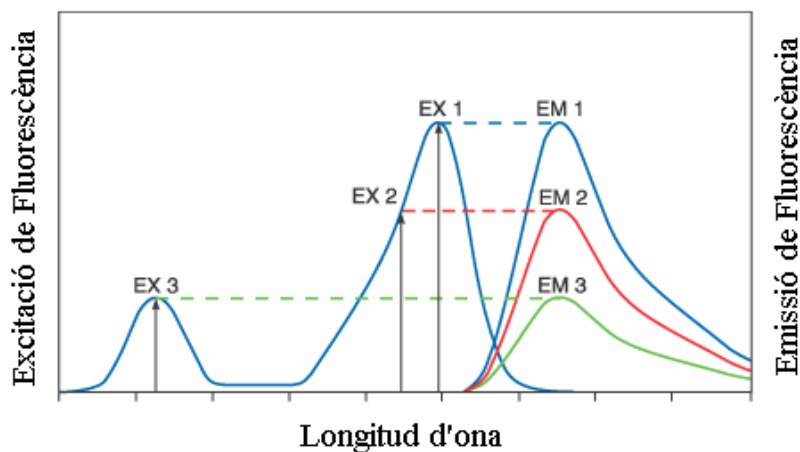
Finalment, a la tercera etapa el fluoròfor retorna al seu estat basal emetent un fotó d'una determinada energia  $h\nu_{EM}$ . L'energia emesa per aquest fotó és menor que l'energia absorbida degut a la dissipació de l'energia que s'ha produït anteriorment durant el temps de vida mitja de l'estat excitat, de manera que té lloc el desplaçament d'Stokes, és a dir, un

desplaçament de la longitud d'ona emesa respecte la longitud d'ona absorbida cap a longituds d'ona majors.



**Figura 20. Diagrama de Jablonski il·lustrant els processos implicats en la fluorescència.** Esquema adaptat de <http://probes.invitrogen.com/handbook/figures/0664.html>

La fluorescència és un procés cíclic, de tal manera que el mateix fluoròfor pot ser excitat i retornar al seu estat energètic fonamental repetides vegades. El fet de que un únic fluoròfor pugui donar lloc a milers de fotons detectables fa que la tècnica d'espectroscòpia de fluorescència tingui una gran sensibilitat de detecció. Per a molècules poliatòmiques en solució és freqüent parlar d'espectres d'emissió i excitació respectivament per fer referència a cascuna de les transicions electròniques representades a la Figura 21.



**Figura 21. Espectres d'emissió i d'excitació d'un fluoròfor determinat.** L'excitació a tres longituds d'ona diferents (EX1, EX2, EX3) no fa variar l'espectre d'emissió però provoca variacions en la intensitat de la fluorescència emesa (EM1, EM2, EM3), que correspon a l'amplitud de l'espectre d'excitació. Esquema adaptat de <http://probes.invitrogen.com/handbook/figures/0665.html>

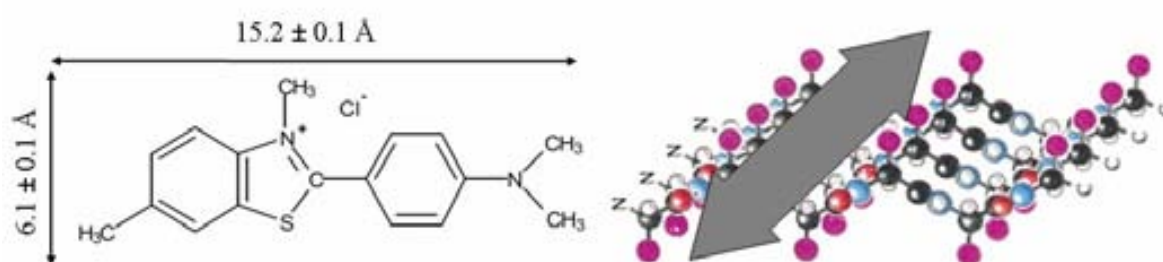
L'amplada de banda d'aquests espectres són paràmetres importants en aplicacions en què 2 o més fluoròfors són detectats simultàniament. De manera excepcional, l'espectre d'excitació d'un determinat fluoròfor en solució pot ser idèntic al seu espectre d'absorció. Normalment, l'espectre d'emissió és independent de la longitud d'ona d'excitació degut a que part de l'energia absorbida durant la seva excitació és dissipada en forma de calor. La intensitat de l'emissió és proporcional a l'amplitud de l'espectre (Figura 21).

### III.2.2.- Estudi de les cinètiques de formació de fibres amiloides

En aquest treball s'ha fet servir la tècnica d'espectroscòpia de fluorescència per a la caracterització de les cinètiques d'agregació dels pèptids amiloides mitjançant la sonda fluorescent Tioflavina T (ThT).

#### III.2.2.1.- La sonda fluorescent Tioflavina T

La ThT és una sonda fluorescent tradicionalment utilitzada en la detecció de plaques amiloides en pacients afectats per malalties amiloidogèniques. Aquesta sonda presenta una longitud d'ona d'excitació de 350 nm i d'emissió de 438 nm aproximadament. En presència de fibres amiloides, els seus espectres tant d'excitació com d'emissió es desplacen cap al vermell, concretament cap a 450 i 490 nm respectivament. Una particularitat d'aquesta sonda és el fet que només detecta estructura  $\beta$  i, per tant, només augmenta la seva fluorescència en presència de fibres amiloides [156].



**Figura 22. Estructura de la Tioflavina T.** Aquesta sonda s'intercala entre les fulles  $\beta$  que formen part de les fibres amiloides

### ***III.2.2.2.- Cinètiques d'agregació amb Tioflavina T (ThT)***

Per estudiar les cinètiques d'agregació dels diferents pèptids amiloidogènics per espectroscòpia de fluorescència es va fer un seguiment al llarg del temps de la variació de la fluorescència de la sonda ThT, que és una mesura indirecta de la concentració de fibres amiloides que es formen al llarg del temps.

Les mesures de fluorescència es van realitzar amb un fluorímetre SLM Aminco Brownam i una font d'il·luminació ELXE-500 (SLM instruments, inc.), fixant les longituds d'ona d'excitació i d'emissió a 450 i 490 nm respectivament, les quals corresponen al màxim d'absorció i d'emissió que presenta aquesta sonda quan interacciona amb fibres amiloides. La mostra es va mantenir en agitació contínua i a una temperatura constant de 37°C amb un bany termostatitzador d'aigua Haake F3.

La mostra es va mesurar en cubetes de poliestirè per a fluorescència, amb un pas òptic d'1cm, a les quals es va afegir el volum necessari per tal que les concentracions finals dels diferents reactius fos la següent: 50 µM de pèptid, 35 µM de ThT, 0.0416mg/ml d'heparina i 300 µM de liposomes.

### III.3.- Espectroscòpia d'infraroig amb transformada de Fourier

#### III.3.1.- Fonaments teòrics

La radiació d'infraroig es troba compresa entre 14000 i 200  $\text{cm}^{-1}$  a l'espectre electromagnètic, tot i que la regió entre 4000 i 1000  $\text{cm}^{-1}$  és la que té més interès per a estudis biològics, ja que és la zona en què absorbeixen les macromolècules (Figura 23).

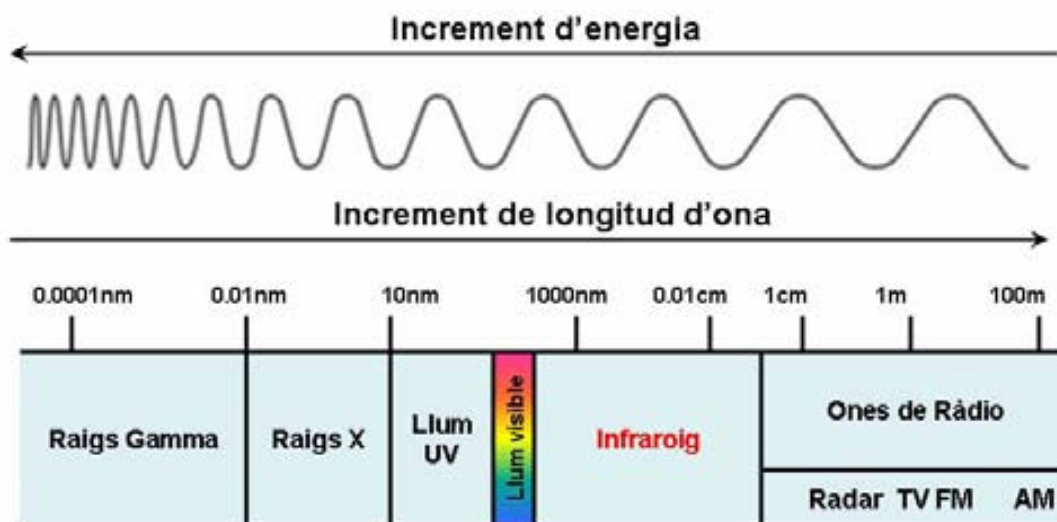


Figura 23. L'espectre electromagnètic.

Per què tingui lloc l'absorció de la llum infraroja cal que l'energia de la radiació incident es correspongui amb la diferència energètica existent entre dos nivells vibracionals adjacents, de manera que es produeixi un canvi en el moment dipolar de l'enllaç que absorbeix la radiació.

La posició de les bandes que s'observen a un espectre d'infraroig s'expressa normalment en números d'ona ( $\text{cm}^{-1}$ ). El número d'ona es relaciona amb la freqüència de la radiació a través de la següent expressió:

$$\nu = c \cdot \nabla \quad (\text{equació 1})$$

on  $c$  és la velocitat de la llum,  $\nu$  la freqüència i  $\nabla$  el número d'ona.

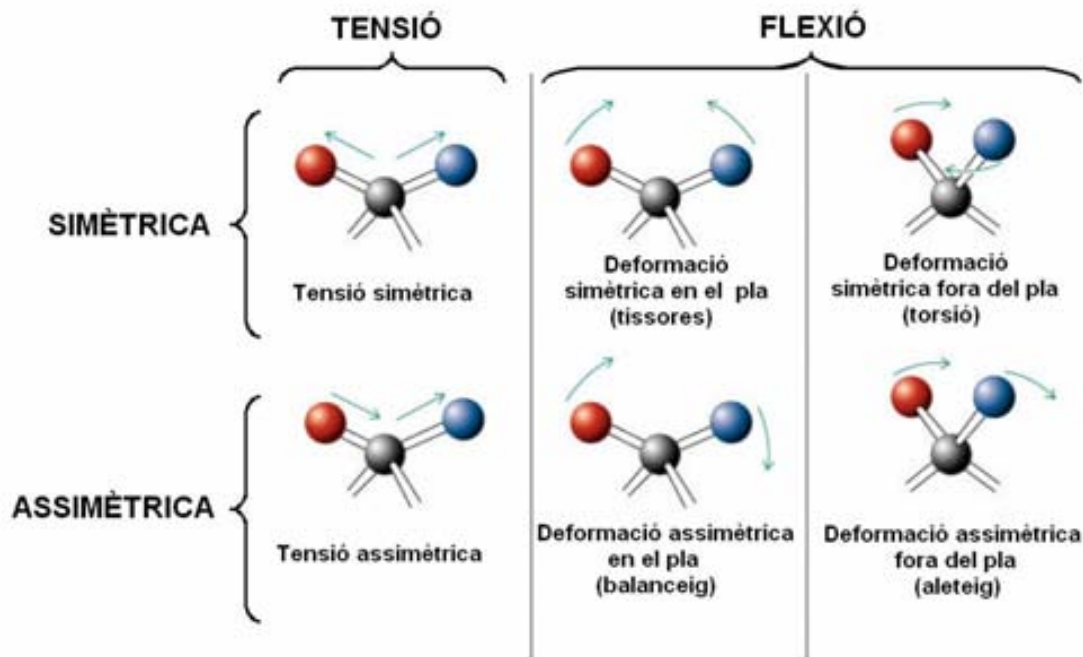
Per tal d'explicar l'absorció de llum infraroja per part de les molècules, el comportament d'un enllaç covalent es pot aproximar al d'un oscil·lador harmònic. Així doncs, la freqüència de vibració de l'enllaç vindrà donada per la següent expressió:

$$\nu = \frac{h}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (\text{equació 2})$$

on  $h$  és la constant de Plank,  $k$  és la constant de força de l'enllaç i  $\mu$  és la massa reduïda dels àtoms implicats en l'enllaç.

Per tant, la vibració de l'enllaç depèn de la massa dels àtoms que formen part de l'enllaç i de la seva força, de tal manera que cada grup químic vibra de manera diferent i, per tant, absorbeix en una zona diferent de l'espectre d'infraroig. D'aquesta manera si un dels àtoms de l'enllaç és substituït per un isòtop més pesat la freqüència de la vibració serà més petita i la banda de l'espectre d'infraroig apareixerà a números d'ona més baixos. Aquesta tècnica de substitució isotòpica és normalment utilitzada en l'estudi estructural de macromolècules, sobretot per l'estudi de l'estructura secundària de proteïnes mitjançant FTIR com s'explicarà més endavant.

Els enllaços tenen diferents modes de vibració, podent-se donar combinacions dels diferents modes de vibració en un mateix enllaç, tal i com es veu a la Figura 24. En el cas de les proteïnes, hi ha múltiples enllaços i vibracions diferents, la freqüència de vibració dels quals pot variar en funció de la interacció del grup químic amb l'entorn i en funció de l'acoblament amb els modes de vibració d'altres enllaços



**Figura 24. Modes vibracionals:** els de tensió o “stretching”, en que els àtoms vibren en la direcció de l'enllaç, i els de flexió o “bending”, que impliquen canvis en els angles entre 2 o més àtoms.



La posició exacta de les bandes a les diferents regions de l'IR depèn de les interaccions entre el grup químic que absorbeix la radiació i el seu entorn. Aquestes interaccions causen desplaçaments de les bandes que poden donar informació valuosa en sistemes biològics. Un altre factor influent en la posició de les bandes és l'acoblament de vibracions i, per tant, acoblament de moments dipolars de la transició entre dos nivells energètics vibracionals diferents. Aquests acoblaments provoquen també desplaçaments de les bandes, que en aquest cas poden donar informació sobre la conformació de les macromolècules biològiques.

### III.3.2.- Estudi de l'estructura de proteïnes mitjançant FTIR

El grup químic més abundant en les proteïnes és l'enllaç amida (Figura 25), en el qual les 2 formes de vibració més rellevants són l'Amida-I i l'Amida-II. L'Amida-I es correspon en un 80% a la vibració d'stretching de l'enllaç C=O i un 20% a la vibració de l'enllaç N-H, i dóna una banda característica en l'espectre d'infraroig entre 1700 i 1600  $\text{cm}^{-1}$ . Per altra banda, l'Amida-II es correspon a un 60% a la vibració de bending de l'enllaç N-H i en un 40% a la d'stretching de l'enllaç C-H, donant una banda entre 1500 i 1600  $\text{cm}^{-1}$ . Apart d'aquestes dues bandes, hi trobem una altra molt intensa al voltant de 3300  $\text{cm}^{-1}$ , que correspon a la vibració d'stretching de l'enllaç N-H, i que s'anomena Amida A.

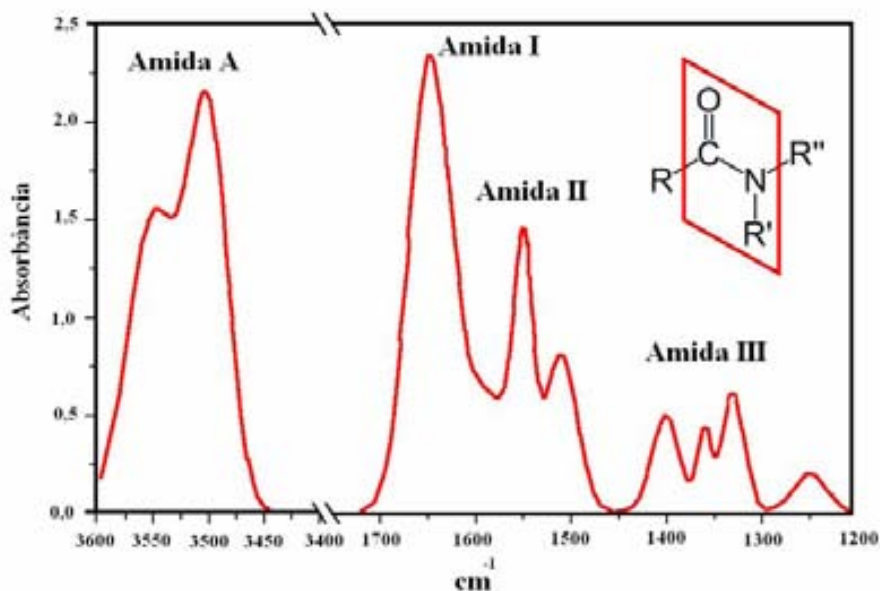


Figura 25. Representació esquemàtica de l'enllaç amida i espectre d'absorció d'IR, amb les bandes corresponents a cada forma de vibració.

En funció del tipus d'estructura secundària [157], les bandes corresponents a les diferents vibracions esmentades apareixen en diferents posicions de l'espectre d'IR, tal i com es pot veure a la Taula 4:

**Taula 4. Assignació de bandes per a les diferents vibracions de l'enllaç amida en D<sub>2</sub>O (cm<sup>-1</sup>)**

Estructura Secundària	Amida A	Amida I	Amida II
Estructura no regular	3250	1645-1650	1520-1545
Hèlix $\alpha$	3290	1650-1660	1545-1550
Estructures $\beta$	3290-3260	1620-1640 i 1680-1690	1520-1530

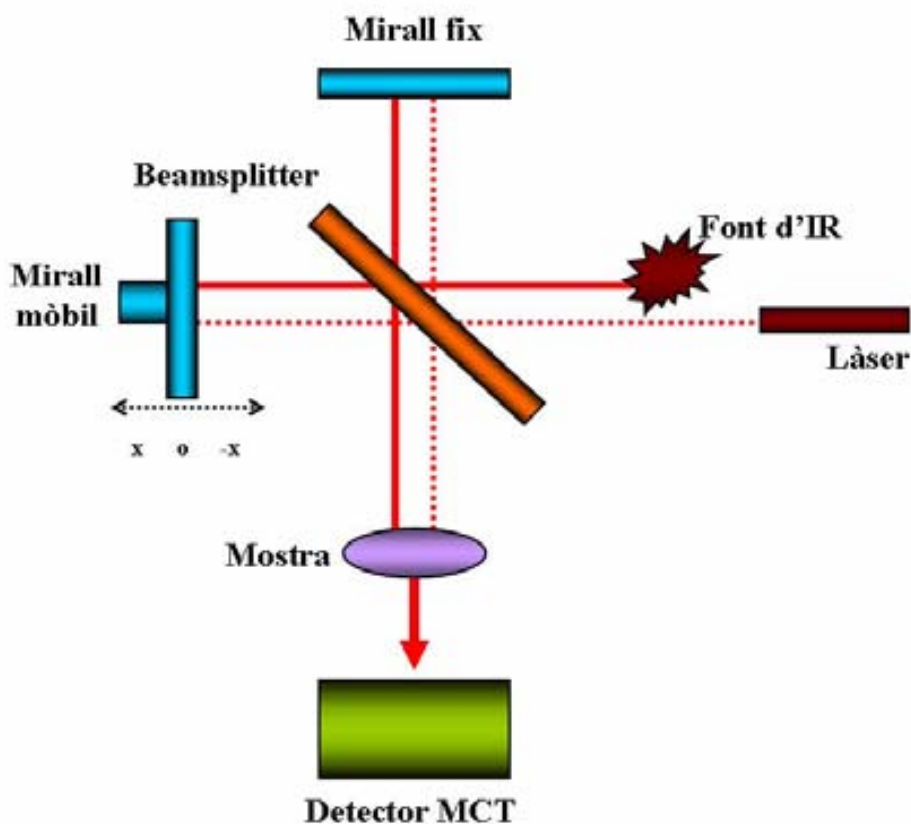
### III.3.3.- Funcionament d'un espectròmetre d'infraroig

Existeixen dos tipus d'espectròmetres que permeten l'obtenció d'espectres d'IR: els dispersius i els espectròmetres amb Transformada de Fourier (FTIR). Els espectròmetres dispersius consisteixen en un prisma o reixeta de difracció que descomposa la llum policromàtica en les diferents freqüències que la formen. Després de passar per una esclatxa estreta, que determina la resolució espacial del feix, cada freqüència passa de manera seqüencial per la mostra, degut a un canvi continu de l'angle que forma la reixeta de difracció amb l'angle incident, fins arribar al detector. En canvi, els espectròmetres d'IR amb transformada de Fourier es basen en l'interferòmetre de Michelson (Figura 26), en lloc d'utilitzar un monocromador.

L'interferòmetre consta de dos miralls situats perpendicularment, un dels quals es mou a una velocitat constant (mirall mòbil) mentre que l'altre és un mirall fix. Entre aquests miralls hi ha un beamsplitter o mirall divisor que reflecteix la meitat de la radiació incident i en deixa passar l'altra meitat. La meitat de la radiació provinent de la font d'IR és reflectida i dirigida cap al mirall fix, mentre que l'altra meitat arriba fins al mirall mòbil. Un cop els dos feixos són reflectits en els dos miralls, viatgen novament fins al beamsplitter o mirall divisor, on es recombinen. La recombinació dels dos feixos provinents dels miralls produirà un senyal en el detector que dependrà del nombre d'ones que estiguin en fase (interferència constructiva) o en oposició de fase (interferència destructiva). Després de la recombinació, la meitat anirà a parar a la font d'IR i l'altre meitat passa per la mostra fins arribar finalment al detector.

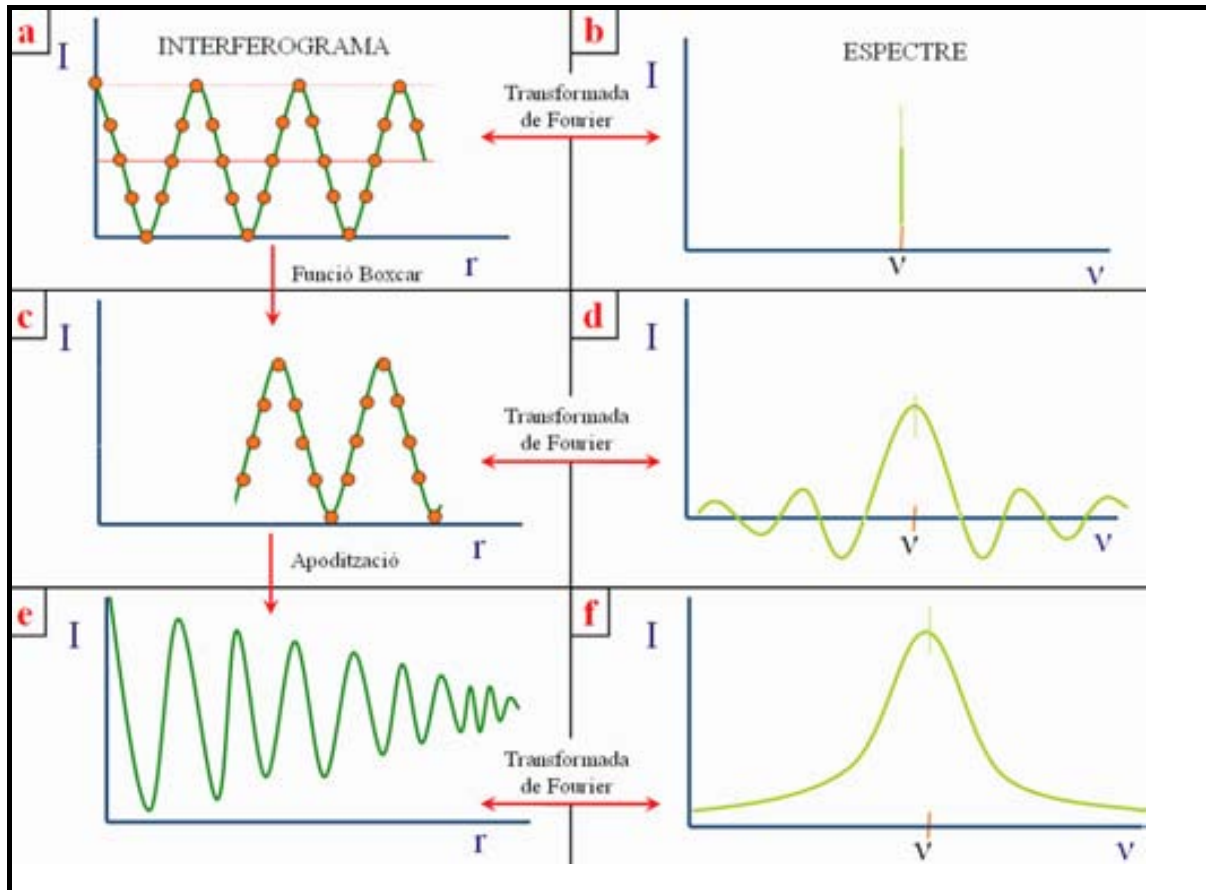
El senyal recollit és un interferograma, en el qual la intensitat que arriba al detector és funció de la diferència de camí òptic recorregut pel feix de llum. És a dir, com més gran és el

recorregut del mirall mòbil, més resolució tindrà l'espectre, però més temps trigarà en adquirir-se.



**Figura 26. Funcionament de l'interferòmetre de Michelson.** El feix d'IR que prové de la font de radiació es divideix en dos feixos mitjançant un mirall divisor del feix o "beamsplitter". El camí òptic d'un dels feixos es varia gràcies al mirall mòbil. Després, el feix provinent del mirall mòbil i el que prové del mirall fix es recombinen en el beamsplitter i el feix resultant passa a través de la mostra i arriba al detector.

Finalment, aplicant la Transformada de Fourier, s'obté un espectre de la intensitat d'absorció de la mostra en funció del número d'ona (Figura 27). Si el mirall mòbil es pogués moure fins a una distància infinita, la transformada de Fourier de l'interferograma resultant donaria lloc a un espectre on cada número d'ona estaria ben definit. Degut a que el mirall mòbil només es pot moure una certa distància finita, l'espectre resultant correspon a l'aplicació sobre l'interferòmetre d'una funció boxcar. Això dona lloc a un espectre amb una banda central flanquejada pels dos costats per uns lòbuls. Per tal de minimitzar aquests lòbuls laterals de l'espectre s'aplica una funció d'apodització a l'interferograma que, en el nostre cas, és la funció triangle que és la més utilitzada per l'espectroscòpia de FTIR per a mostres biològiques. La transformada de Fourier d'aquest interferograma ja apoditzat ens dona l'espectre d'absorció (Figura 27).



**Figura 27. Adquisició d'espectres de FTIR.** La interferència dels dos feixos depèn de la posició del mirall mòbil. Com més gran sigui el recorregut del mirall mòbil més resolució tindrà l'espectre, però més temps trigarà en adquirir-se. D'aquesta manera s'obté un interferograma que dona una relació entre la intensitat del senyal i la distància del mirall mòbil. En una situació ideal en la qual el mirall mòbil es pogués moure fins a una distància infinita, la transformada de Fourier de l'interferograma resultant donaria lloc a un espectre on cada número d'ona estaria ben definit (a). Per obtenir una relació entre la intensitat i cada número d'ona s'aplica la transformada de Fourier (b). Degut a que el mirall mòbil només es pot moure una certa distància, l'espectre resultant correspon a l'aplicació sobre l'interferograma d'una funció boxcar (c). Això dona lloc a un espectre amb una banda central flanquejada pels dos costats per uns lòbuls (d). Per tal de minimitzar aquests lòbuls laterals de l'espectre s'aplica una funció d'apodització a l'interferograma anomenada funció triangle (e), que és la més utilitzada per l'espectroscòpia de FTIR per a mostres biològiques. La transformada de Fourier d'aquest interferograma ja apoditzat dona lloc a l'espectre d'absorció (f).

### III.3.4.- Adquisició d'espectres d'infraroig al llarg del temps

#### III.3.4.1.- Tria del tampó

Una qüestió important a l'hora de treballar amb espectroscòpia d'IR, és la tria d'un tampó adequat. És freqüent la utilització de tampons deuterats, ja que l' $\text{H}_2\text{O}$ , degut a la vibració de l'enllaç O-H, dona lloc a una banda característica a  $3400\text{ cm}^{-1}$  i una altra, bastant intensa, al voltant de  $1650\text{ cm}^{-1}$ . Aquesta segona banda és molt més intensa que la banda de l'Amida-I, la qual pot quedar emmascarada, impossibilitant la obtenció d'informació sobre l'estructura secundària del pèptid o la proteïna d'estudi.

En dissolucions deuterades aquestes dues bandes queden desplaçades cap a un número d'ona menor, prop de  $2400\text{ cm}^{-1}$  i  $1200\text{ cm}^{-1}$  respectivament, ja que l'àtom de deuteri és més pesat que el d'hidrogen i, per tant, l'enllaç vibra amb una freqüència menor, quedant desemmascarada la banda corresponent a l'enllaç Amida-I.

En el present treball es va fer servir un tampó Hepes (Sigma&Aldrich) 10 mM en  $\text{D}_2\text{O}$ . Es va ajustar el pD corresponent amb solucions de NaOD i/o DCl (Sigma&Aldrich), mitjançant un pHmetre Metrohm, tenint en compte que la relació entre pD i pH ve donada per la següent expressió [158]:

$$\text{pD} = \text{lectura del pHmetre} + 0.4 \quad (\text{equació 3})$$

### **III.3.4.2.- Preparació de les mostres de pèptids amiloidogènics**

A la següent taula estan resumides les condicions experimentals en que es van estudiar els diferents pèptids d'aquest treball:

---

**Taula 5. Condicions experimentals per a l'estudi dels pèptids amiloidogènics**

---

Experiments sobre GAGs	A $\beta$ (1-28)	En absència d'heparina
	A $\beta$ (1-28)H13A	
	A $\beta$ (1-28)H14A	En presència d'heparina
	PrP(185-205)	
PrP(185-205)H187A		
Experiments amb liposomes*	A $\beta$ (1-28)	En absència de liposomes
	A $\beta$ (1-28)Y10A	
	PrP(185-205)	En presència de liposomes
	PrP(185-205) F198A	

---

\*La composició exacta dels diferents tipus de liposomes utilitzats s'especifica a la Taula 7.

---

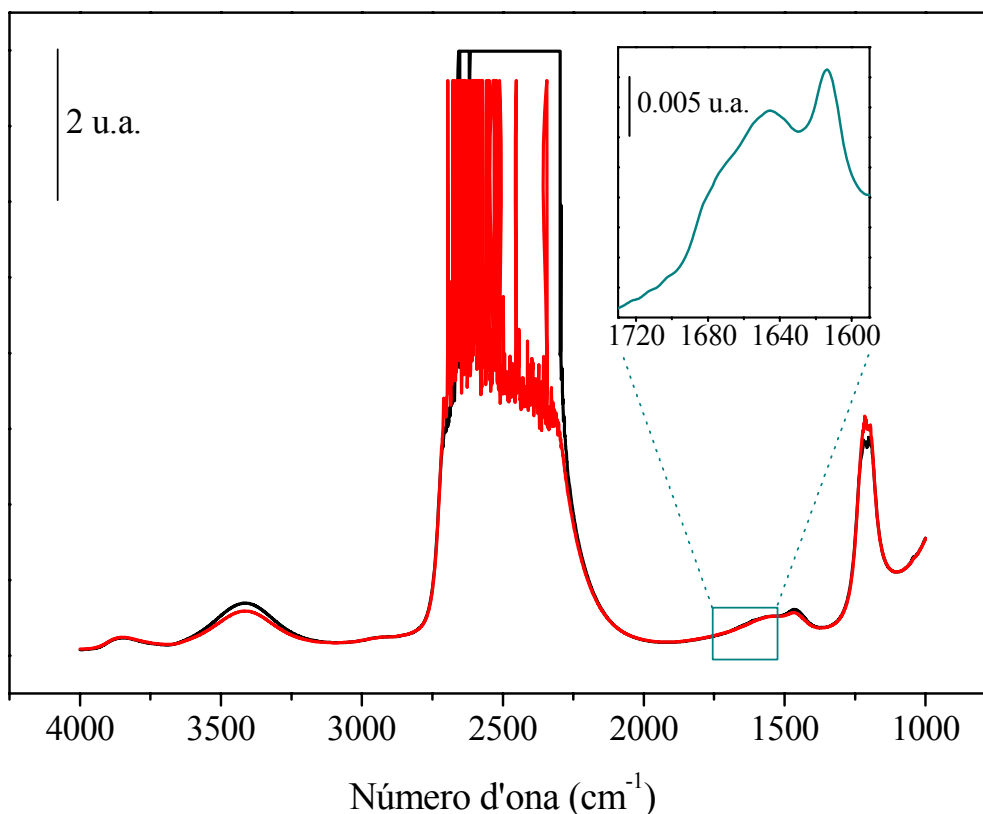
Les diferents mostres es van preparar a partir dels stocks peptídics liofilitzats i tampó Hepes 10 mM en  $\text{D}_2\text{O}$  pD7.5. Cada mostra contenia una concentració peptídica d'1.2 mM, en un volum de 40  $\mu\text{l}$ . Per aconseguir aquesta concentració en un volum tan petit, la quantitat de pèptid era tan petita que no es va poder pesar a la balança de precisió. El problema es va solucionar preparant una solució stock de major volum, aliquidant volums de 40  $\mu\text{l}$  i liofilitzant-los després. D'aquesta manera, en afegir 40  $\mu\text{l}$  de tampó a l'alíquota liofilitzada, es

va obtenir la concentració peptídica desitjada. Així doncs, es va partir d'una alíquota de 40  $\mu\text{l}$  de pèptid liofilitzat, a la qual se li va afegir el tampó corresponent i se li va ajustar el pD, considerant aquest moment com el temps d'inici de la cinètica.

Per analitzar la mostra, aquesta es va dipositar entre 2 finestres de  $\text{CaF}_2$  separades per un espaiador de 50  $\mu\text{m}$ . Aquest "sandvitx" de finestres amb mostra i el corresponent espaiador, es va posar en un portamostres, i aquest era introduït en l'espectròmetre d'infraroig Polaris (Mattson) amb transformada de Fourier, equipat amb un detector MCT (mercuri-cadmi-tel·luri). El portamostres de l'aparell estava muntat sobre una llançadora que permetia obtenir alternativament interferogrames de la referència (aire) i de la mostra sense necessitat d'obrir el compartiment, ja que l'interior de l'espectrofotòmetre estava sotmès a una purga contínua d'aire sec. La temperatura de la mostra era de 37°C gràcies a una cel·la termostetitzada per un bany Julabo Fp 50.

#### ***III.3.4.3.- Adquisició d'espectres***

Per a cadascuna de les condicions estudiades, es van adquirir espectres al llarg del temps amb una resolució nominal de 2  $\text{cm}^{-1}$ , amb el programa informàtic WinFirst. També es va adquirir un espectre de referència, és a dir, un espectre del tampó Hepes 10 mM en  $\text{D}_2\text{O}$  sense pèptid, i es va restar a cadascun dels espectres de la mostra adquirits al llarg del temps, tenint en compte l'obtenció d'una línia base recta en la zona compresa entre 1900 i 1750  $\text{cm}^{-1}$ . Gràcies a aquesta resta es va poder eliminar la contribució del tampó a l'absorbància total observada. Per tal d'eliminar les petites traces de vapor d' $\text{H}_2\text{O}$  que hi pogués haver, també es va restar un espectre de vapor. Finalment, es va aplicar una funció d'arrodoniment a tots els espectres d'absorbància (Figura 28).



**Figura 28. Adquisició d'espectres en FTIR.** En negre es representa l'espectre de la referència i en vermell l'espectre corresponent a una mostra amb pèptid. La diferència entre els dos dona com a resultat un espectre final on s'observen les bandes corresponents a la vibració de l'enllaç Amida-I, representat a l'insert

#### III.3.4.4.- Estudi de les cinètiques d'agregació

Per estudiar la cinètica d'agregació dels pèptids, es va fer el seguiment al llarg del temps de l'absorbància màxima al voltant de  $1620\text{-}1610\text{ cm}^{-1}$ , una banda que és característica d'estructures  $\beta$ -agregades, i de l'absorbància màxima a  $1645\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$ , corresponent a estructures  $\alpha$  i no regulars [157]. La representació gràfica de la intensitat màxima de la banda corresponent a l'estructura  $\beta$ -agregada al llarg del temps permet caracteritzar cinèticament el procés d'agregació que té lloc. Donat que a cada experiment les intensitats màximes tenien diferent magnitud degut a les petites variacions de la concentració peptídica originades a l'hora del reajustament del pD, no es podia fer comparacions entre els 2 pèptids ni entre les diferents condicions estudiades. Aquest problema es va solucionar representant, al llarg del temps, la relació entre la intensitat de la banda corresponent a les estructures  $\alpha$  i no regulars i la intensitat corresponent a la banda de l'estructura  $\beta$ -agregada.

### ***III.4.- Obtenció d'imatges per microscòpia electrònica de transmissió***

La microscòpia electrònica es basa en la irradiació de la mostra prima amb un feix lineal d'electrons de voltatge uniforme de 100 a 200 keV. Part d'aquests electrons es transmeten, una altra part són dispersats i una altra part dona lloc a interaccions que produeixen diferents fenòmens com l'emissió de llum, de raigs X o d'electrons secundaris. Totes aquestes senyals s'utilitzen per obtenir informació sobre la naturalesa de la mostra (morfologia, composició, estructura cristal·lina, estructura electrònica, etc.). El microscopi electrònic de transmissió utilitza la transmissió/dispersió d'electrons per formar imatges, la difracció dels electrons per obtenir informació sobre l'estructura cristal·lina i l'emissió de raigs X per tal de conèixer la composició elemental de la mostra.

Per a que es produeixi la transmissió d'electrons a través de la mostra és necessari que sigui prima, és a dir, transparent als electrons. Es recomana fer servir mostres de menys de 100 nm de gruixidesa ja que mostres més denses donen lloc a una pitjor qualitat en imatge. A més, les mostres han de tenir un diàmetre de 3 mm o estar suportades sobre una reixeta recoberta de carbó i d'aquestes dimensions.

Per tal d'accentuar l'estructura de la mostra, aquesta es tenyeix amb metalls pesants, els quals no deixen passar els electrons degut a la seva elevada densitat, donant contrast a la mostra. La resolució màxima d'aquesta tècnica ve determinada per la longitud d'ona dels electrons amb els quals s'irradia la mostra. Segons la dualitat ona-partícula descrita per DeBroglie, els electrons presenten també propietats d'ona i de partícula. Així doncs, un feix d'electrons pot, en determinades circumstàncies, comportar-se com una partícula o com una ona, la longitud d'ona de la qual dependrà de la seva energia, segons:

$$E = h \cdot \nu \quad (\text{equació 4})$$

on E és la energia, h és la constant de Planck i  $\nu$  és la freqüència. La freqüència és la inversa a la longitud d'ona segons:

$$\nu = 1 / \lambda \quad (\text{equació 5})$$

on  $\lambda$  és la longitud d'ona. D'aquesta manera, es pot modular la longitud d'ona dels electrons variant la seva energia. Aquesta modulació de l'energia dels electrons es realitza aplicant un camp elèctric a aquest feix d'electrons ja que són partícules amb càrrega negativa.



### **III.4.1.- Condicions Experimentals**

La tècnica de tinció utilitzada per a l'obtenció d'imatges per MET va ser la tinció negativa. Les diferents mostres es van dipositar sobre reixetes de coure recobertes amb una capa de carboni. Aproximadament 10 µl de cada mostra es van dipositar sobre les reixetes de coure, cada mostra es va deixar 10 minuts a temperatura ambient i es va eliminar l'excés de mostra per capil·laritat amb paper de filtre. A continuació es va tenyir cada mostra amb 10 µl d'una solució d'acetat d'uranil al 2% durant 90 segons i transcorregut aquest temps es va eliminar l'excés per capil·laritat amb un paper de filtre.

Les mostres van ser visualitzades amb un microscopi electrònic de transmissió Hitachi H-7000 aplicant un voltatge constant de 75kV.

### **III.5.- *Cultius cel·lulars***

En aquest treball s'ha fet servir la línia cel·lular de neuroblastoma SH-SY5Y, la qual s'ha mantingut en creixement en el següent medi complet: D-MEM/Ham's F12, 10% FBS, 2 mM glutamina, 100U/ml de penicil·lina, 100 µg/ml d'estreptomicina i aminoàcids no essencials, en un incubador a 37°C i atmosfera humida amb un 5% de CO<sub>2</sub>. Es va canviar el medi de cultiu 3 vegades a la setmana, fins arribar a la confluència de la placa. Una vegada confluents, les cèl·lules es van tripsinitzar

#### **III.5.1.- Tripsinització de les cèl·lules**

Per tal de fer un subcultiu a partir d'una placa confluent es van tripsinitzar les cèl·lules, desenganxant-les i permetent, doncs, el seu sembratge en una altra placa i a una densitat menor.

Per dur a terme aquesta tripsinització, es va aspirar el medi de la placa i es va fer 2 rentats amb PBS 1x per tal d'eliminar les restes de medi. Seguidament es va afegir la tripsina-EDTA 1x (1 o 2 ml en funció de la confluència de la placa), es va repartir uniformement per tota la placa i es va deixar incubant a 37°C durant 2 minuts. Una vegada transcorregut aquest temps, es va aturar l'acció de la tripsina amb medi de cultiu prèviament atemperat i es va pipetejar amunt i avall per tal de recollir totes les cèl·lules en un tub falcon estèril. Finalment es va procedir al comptatge de cèl·lules amb Blau de Tripà en una cambra de Neubauer.

#### **III.6.2.- Comptatge de les cèl·lules**

Per poder fer el comptatge es van agafar 20 µl de la suspensió de cèl·lules i es va afegir 10 µl de Blau de Tripà. Aquest colorant permet distingir les cèl·lules viables de les inviables perquè quan la cèl·lula té la membrana plasmàtica trencada i, per tant, és inviable, el seu citoplasma queda tenyit d'un color blau molt fosc. La mescla de cèl·lules amb el colorant va ser introduïda a la cambra de Neubauer per capil·laritat i es van contar les cèl·lules viables a cadascun dels quadrats de la cambra. L'àrea de cada quadrant és de 1mm<sup>2</sup> i l'alçada entre el cubreobjectes i la cambra és de 0.1 mm, de tal manera que el volum a cada quadrant és de 0.1 µl. Per tant, el nombre de cèl·lules/ml ve donat per la mitjana aritmètica de cèl·lules contades als 4 quadrants de la cambra multiplicada per 10<sup>4</sup>. Tenint en compte la dilució

realitzada inicialment amb el colorant i el volum de la suspensió inicial, es pot obtenir el nombre de cèl·lules/ml de la mostra i el nombre total de cèl·lules obtingudes.

### **III.5.3.- Crioconservació de les cèl·lules**

La conservació de les cèl·lules s'aconsegueix congelant-les a  $-80^{\circ}\text{C}$  o en nitrogen líquid i en presència d'un agent crioprotector que eviti els danys físics a la cèl·lula causats per la formació de cristalls i de l'alteració osmòtica causada per l'augment de la concentració de sals a l'exterior cel·lular. Aquesta congelació ha de ser progressiva i paulatina per tal d'evitar la formació de cristalls de gel a l'interior cel·lular. En canvi la descongelació de cèl·lules ha de ser un procés molt ràpid per tal de garantir la màxima supervivència cel·lular.

#### ***III.5.3.1.- Congelació de les cèl·lules***

Una vegada es va trispsinitzar i contar les cèl·lules, la suspensió obtinguda es va centrifugar durant 5 minuts a temperatura ambient i a 1000 rpm en una centrífuga Sorvall de sobretaula. Seguidament es va aspirar el medi de cultiu i es va ressuspèndre el pellet obtingut en un volum apropiat de medi de cultiu nou per obtenir  $4 \cdot 10^6$  cèl·lules/ml. Finalment es van afegir 900  $\mu\text{l}$  de cèl·lules en un criotub estèril i s'hi van afegir 100  $\mu\text{l}$  de DMSO que, prèviament s'havia mantingut en gel. D'aquesta manera les cèl·lules van quedar en un medi que contenia un 10% de DMSO. Es va barrejar bé el contingut del criotub en gel i es va deixar el criotub en presència d'isopropanol i a  $-80^{\circ}\text{C}$ , aconseguint una disminució gradual de temperatura d' $1-3^{\circ}\text{C}/\text{minut}$ . Aquest criotub es podia mantenir a temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  durant un temps màxim de 3 mesos i un mínim de 24 hores. Normalment, després d'una setmana es guardava el criotub en el tanc de nitrogen líquid.

#### ***III.5.3.2.- Descongelació de les cèl·lules***

Per dur a terme el procés de descongelació, es va treure el criotub del tanc de nitrogen líquid i es va introduir ràpidament en un bany a  $37^{\circ}\text{C}$  sense submergir-hi totalment el tub. Sense que estigués totalment descongelat (és a dir, s'hi podia observar una petita bola de gel en el seu interior) es va abocar el contingut del criotub en un tub de centrífuga estèril amb 6 ml de medi de cultiu, per tal de diluir el DMSO present en les cèl·lules congelades i evitar-ne el seu efecte tòxic. Es va barrejar bé i es va centrifugar en una centrífuga Sorvall de

sobretaula durant 5 minuts a 1000 rpm. Seguidament, es va eliminar el sobrenedant per decantació i es va ressuspendre el pellet obtingut en 10 ml de medi de cultiu. Finalment, es va abocar la suspensió de cèl·lules en una placa de 100 mm de diàmetre. A partir d'aquest punt, el cultiu de cèl·lules es va mantenir de manera normal.

### **III.5.4.- Assaig de viabilitat cel·lular: tractaments amb pèptids amiloidogènics**

En aquest treball es va assajar l'activitat citotòxica dels diferents pèptids amiloidogènics pel mètode del MTT descrit per M.B.Hansen et al.[159]. Aquest assaig implica la conversió del MTT (bromur de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol) en sals de formazà per part de les deshidrogenases presents en els mitocondris de les cèl·lules. Aquestes sals donen lloc a la formació d'un precipitat insoluble i colorejat, que té un màxim d'absorbància a 595 nm aproximadament. Per tant, la lectura d'absorbància a aquesta longitud d'ona és una mesura indirecta de la taxa de proliferació/mort cel·lular, ja que una major intensitat d'absorbància indica un major nombre de cèl·lules vives.

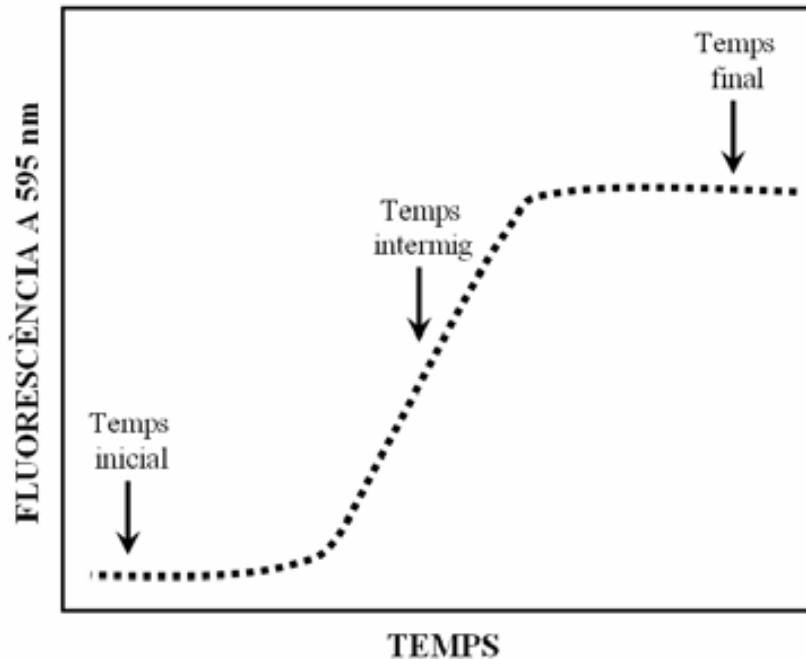
#### ***III.5.4.1.- Procediment experimental***

L'assaig es va dur a terme en plaques d'ELISA (IWAKI) estèrils i de 96 pous. A cada pou es van sembrar 12000 cèl·lules amb medi complet (conté 10% de sèrum) i es va deixar incubar durant 24 hores. Una vegada transcorregut aquest temps es va aspirar el medi i s'hi va afegir medi de cultiu amb 0.5% de sèrum. Aquesta quantitat de sèrum assegura la supervivència del cultiu però no la divisió de les cèl·lules, de tal manera que durant tot l'assaig el nombre de cèl·lules a cada pou es manté constant. Després es va afegir a cada pou el tractament corresponent i es va deixar incubant a 37°C durant 48 hores. Passat aquest temps es va afegir el volum necessari de MTT per a que la seva concentració a cada pou fos de 0.5mg/ml i es va deixar incubat a 37°C durant 90 minuts.

Finalment es va aspirar el medi, es va dissoldre el precipitat format amb 50 µl DMSO i es va mesurar l'absorbància del producte format a la longitud d'ona de 595 nm. La solució de MTT es va preparar en H<sub>2</sub>O destil·lada a una concentració de 5mg/ml i es va conservar protegida de la llum i a 4°C fins el moment de la seva utilització

### *III.5.4.2- Mostres estudiades*

A partir de les cinètiques d'agregació obtingudes amb la tècnica de fluorescència amb ThT (apartat III.2.2.2.- *Cinètiques d'agregació amb Tioflavina T (ThT)*) es van preparar les mostres per a l'assaig de MTT, corresponents a diferents temps d'incubació i, per tant, a diferents estats d'agregació de la mostra, tal i com s'esquematitza a la Figura 29.



**Figura 29. Mostres assajades pel mètode del MTT.** Es van preparar mostres peptídiques a diferents temps d'incubació, tenint en compte les corbes d'agregació per ThT obtingudes prèviament, enlloc d'agafar directament alíquotes als temps corresponents perquè la sonda ThT resulta tòxica per a les cèl·lules.

La concentració peptídica a cada pou era de 50  $\mu$ M i es van fer duplicats per a totes les mostres assajades. Es van estudiar mostres preincubades durant els temps indicats a la Figura 29, tant en absència com en presència d'heparina, dels pèptids A $\beta$ (1-28) i PrP(185-208) i dels seus respectius mutants.

### III.6.- Experiments amb dendrímers

En aquest treball es va estudiar l'efecte dels dendrímers en les cinètiques d'agregació dels pèptids A $\beta$ (1-28) i PrP(185-208) realitzades per fluorescència i FTIR (*apartats III.2.2.- Estudi de les cinètiques de formació de fibres amiloides i III.3.4.4.- Estudi de les cinètiques d'agregació*, respectivament). A la Taula 6 es detalla la composició dels diferents dendrímers utilitzats:

**Taula 6. Composició dels dendrímers**

Nom	Grups terminals	Nº de grups terminals	Pes molecular [Da]
PAMAM, Generació 3	-NH <sub>2</sub>	32	6909
PAMAM, Generació 4	-NH <sub>2</sub>	64	14215
PAMAM, Generació 5	-NH <sub>2</sub>	128	28826
P-DENDRÍMER	-NH(Et) <sub>2</sub>	96	33702

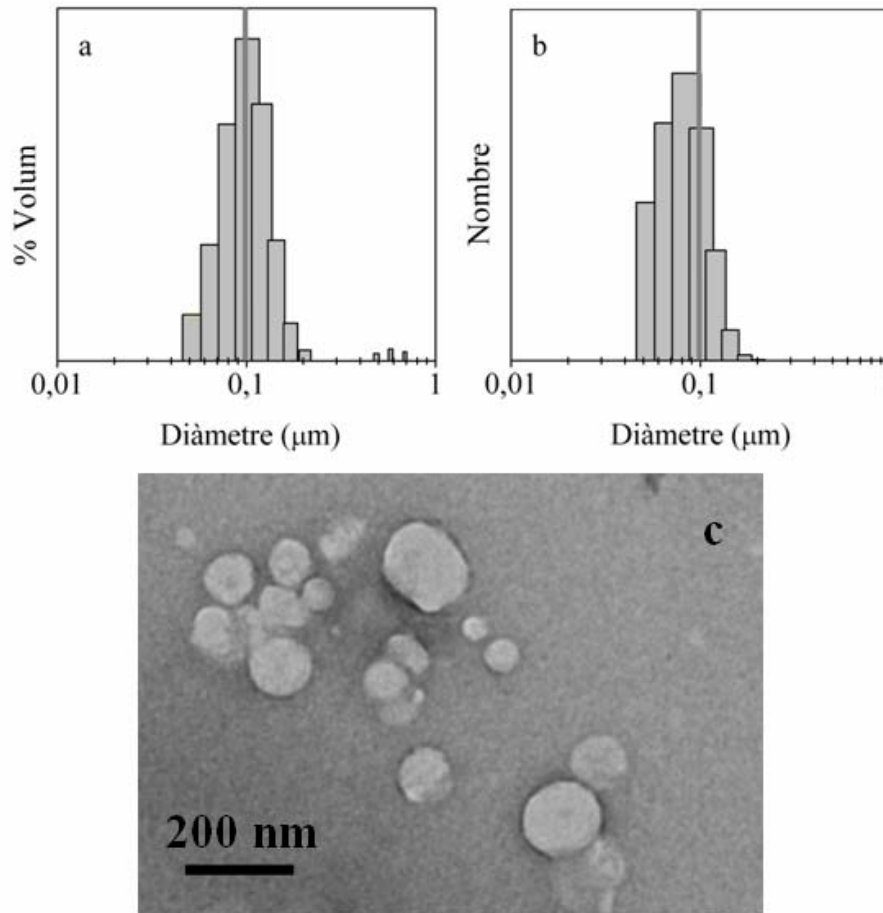
### ***III.7.- Preparació de membranes model***

#### **III.7.1.- Preparació de Liposomes Unilamel·lars Grans (LUVs) de 100 nm**

La preparació dels LUVs es va realitzar seguint el protocol de L.D. Mayer et al. [160]. En un baló es va afegir el volum necessari del lípid desitjat que, prèviament estava dissolt en cloroform i conservat a 4°C, per tal d'obtenir una concentració final de 10 mg/ml. Es va evaporar el cloroform amb un corrent de N<sub>2</sub> gas, quedant, així, una pel·lícula lipídica homogènia adherida a la superfície del baló. Aquesta pel·lícula va ser ressuspensa en un tampó aquós (10 mM Tris pH 7.5 per als experiments de fluorescència o 10 mM Hepes pD 7.5 per als experiments d'espectroscòpia d'IR, tal i com s'explicarà mes endavant) i vortejada fins que el lípid estava totalment dissolt, aconseguint una suspensió opaca que contenia liposomes multilamel·lars grans (MLVs). Després es van realitzar 5 cicles de congelació amb N<sub>2</sub> líquid i descongelació amb aigua calenta. Un cop realitzats aquests cicles de congelació i descongelació la suspensió encara opaca va ser extrusionada 10 vegades a través de 2 membranes de policarbonat (Armatis), amb un diàmetre de porus de 100 nm mitjançant un extrusionador (Liposofast, Avestin). La suspensió lipídica després de l'extrusió presentava un aspecte translúcid, ja que els liposomes unilamel·lars formats tenien un diàmetre menor, de 100 nm aproximadament. Els LUVs es van passar per una corrent de N<sub>2</sub> gas per tal d'eliminar l'oxigen present i evitar així la seva oxidació, i es van guardar a 4°C fins a la seva utilització .

#### **III.7.2.- Determinació de la mida dels LUVs**

La mida dels LUVs obtinguts es va comprovar amb un analitzador de partícules Microtrack UPA 150. Es va fer una dilució dels LUVs en tampó 10 mM Tris pH 7.5 per tal d'aconseguir una concentració que permetés obtenir un nivell de senyal adient per al detector de l'aparell. El temps de lectura va ser de 10 minuts. La resta de paràmetres van ser fixats segons R. Barnadas [161]. La Figura 30 mostra la distribució de mida dels liposomes unilamel·lars en funció del volum i del nombre.



**Figura 30. Liposomes unilamel·lars grans:** distribució de la mida dels LUVs en funció del volum (a), i en funció del nombre (b), i imatge de microscòpia electrònica per transmissió (c). Els LUVs presenten un diàmetre aproximat de 100 nm.

### III.7.4.- Composició dels LUVs

Es van preparar LUVs de diferents composicions lipídiques i que contenen els principals elements que in vivo es troben formant part dels microdominis lipídics coneguts amb el nom de rafts lipídics. També es van preparar membranes model a partir d'un extracte lipídic de cervell, amb el qual s'aconsegueix una ratio, molt similar a la fisiològica, dels principals components de la membrana (fosfolípids, gangliòsids, colesterol i esfingomielina). A la Taula 7 es detalla la composició lipídica dels diferents tipus de LUVs estudiats:



---

**Taula 7. Composició lipídica dels LUVs**

---

<b>Tipus de liposomes</b>	<b>Composició</b>
PC	Fosfatidilcolina
PC:Chol (9:1) v:v	Fosfatidilcolina + Colesterol
PC:PS (9:1) v:v	Fosfatidilcolina + Fosfatidilserina
PC:SM (1:1) v:v	Fosfatidilcolina + Esfingomielina
PC:GalCer (3:1) v:v	Fosfatidilcolina + Galactosilceramida
PC:GalCer:SM (2:1:1) v:v	Fosfatidilcolina + Galactosilceramida + Esfingomielina
PC:Chol:SM:GalCer (2:1:0.5:0.5) v:v	Fosfatidilcolina + Galactosilceramida + Esfingomielina + Colesterol
Extracte de cervell	Fosfatidiletanolamina + Fosfatidilserina + Fosfatidilcolina + Àcid fosfatídic + Fosfatidilinositol + altres*

---

\* La companyia Avanti Polar Lipid no especifica la composició exacta.

---

### **III.7.5.- Mesura del potencial dipolar de membrana**

Les membranes biològiques estan formades per diferents lípids i proteïnes que contenen càrregues elèctriques i grups amb moments dipolars. Donada la naturalesa amfipàtica dels elements que formen part de les membranes, els diferents grups polars tenen una orientació i una distància des del centre de la membrana fixes. Aquestes restriccions són compensades per les molècules d'aigua i electròlits presents en el medi. Tot això fa que les membranes biològiques tinguin associats 3 tipus de potencials: potencial transmembrana, potencial de superfície i potencial dipolar. Aquest últim ( $\psi_D$ ) és la diferència de potencial entre el centre de la bicapa lipídica i la interfície aigua-lípid, i s'origina gràcies a les polaritzacions associades a les molècules de lípid i proteïna presents en la membrana. Els principals dipols que es troben a les molècules de lípid són:

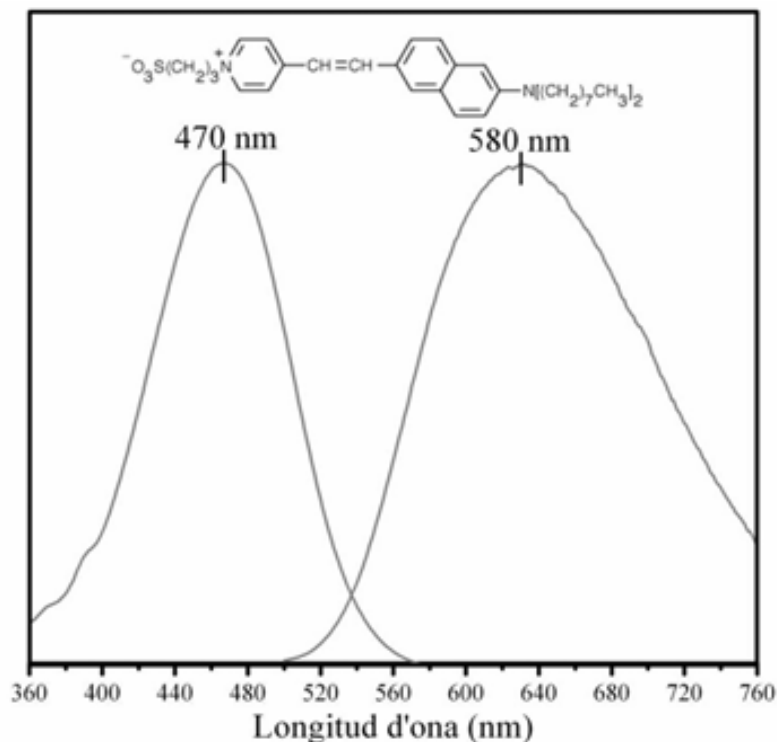
- els dipols associats als enllaços carbonils de l'enllaç èster del cap polar dels fosfolípids
- els enllaços dipolars fòsfor-oxigen i fòsfor-nitrògen del grup fosfat del cap polar dels fosfolípids
- determinats grups dels cap polar dels fosfolípids
- els moments dipolars de les molècules d'aigua orientades a la interfície aigua-lípid

El resultat vectorial de tots els moments dipolars d'una meitat de la membrana és un vector positiu orientat cap al centre de la membrana. Aquest tipus de potencial pot tenir un efecte en els grups polars de pèptids i proteïnes que hi puguin interaccionar [162], de manera que pot modular diferents processos cel·lulars com la conductivitat de canals de membrana [163], dirigir el plegament de proteïnes de membrana [164], variar la difusió de substàncies a través de la pell [165] o modificar la unió de pèptids senyals [166] o de fusió vírics amb la membrana [167, 168].

#### ***III.7.5.1.- La sonda fluorescent di-8-ANEPPS***

La betaïna 1-(3-sulfonatopropil)-4-[ $\beta$ [2-(di-n-octilamino)-6-naftil]vinil] piridina és sonda fluorescent, més coneguda amb el nom de di-8-ANEPPS, que s'utilitza per mesurar el potencial dipolar de membrana, ja que la seva fluorescència varia en funció del camp elèctric, independentment de les possibles variacions dels potencials de superfície. El desplaçament del màxim d'excitació d'aquesta sonda (al voltant de 470 nm) és sensible únicament a variacions del camp elèctric. Per poder seguir aquest desplaçament s'ha de calcular l'espectre de diferència després de normalitzar la intensitat dels espectres d'excitació (abans i després de la

pertorbació que causa la variació del camp elèctric). En el cas de compostos que provoquen un augment del potencial dipolar de membrana, com el cas del 6-KC o el colesterol, l'espectre de diferència reflecteix un desplaçament cap al blau amb un màxim al voltant de 430 nm i un mínim cap a 510 nm.



**Figura 31.** Estructura molecular de la sonda di-8-ANEPPS i els seus espectres d'excitació i emissió. Aquesta sonda té un màxim d'excitació a 470 nm i un màxim d'emissió a 580 nm.

### **III.7.5.2.- Marcatge dels LUVs amb la sonda fluorescent di-8-ANEPPS**

Es van preparar LUVs seguint el procediment anteriorment explicat i es van marcar amb la sonda fluorescent di-8-ANEPPS, tal i com es descriu al treball de J. Cladera i O'Shea [169]. En una cubeta que contenia LUVs a una concentració final de 300  $\mu\text{M}$ , es va afegir la sonda (d'una solució mare que estava dissolta en etanol) a una concentració final de 8  $\mu\text{M}$  i es va incubar durant 24 hores a les fosques i a 37°C per tal d'assegurar la màxima incorporació de la sonda als liposomes.

### **III.7.5.3.- Mesura experimental del potencial dipolar amb la sonda di-8-ANEPPS**

Les mesures de fluorescència per poder determinar la magnitud del potencial dipolar de membrana es van realitzar amb un fluorímetre SLM Aminco Brownam i una font d'il·luminació ELXE-500 (SLM instruments, inc.), fixant les longituds d'ona d'excitació i

d'emissió a 470 i 580 nm respectivament, les quals corresponen al màxim d'absorció i d'emissió de la sonda di-8-ANEPPS. La mostra es va mantenir en agitació contínua i a una temperatura constant de 37°C amb un bany termostatitzador d'aigua Haake F3.

La mostra es va mesurar en cubetes de poliestirè per a fluorescència, amb un pas òptic d'1cm, a les quals es va afegir diferents concentracions de pèptid. Per a cada concentració, es va adquirir un espectre d'excitació de la mostra abans i després d'afegir el pèptid a la cubeta, es van normalitzar les seves intensitats i es van restar per tal d'obtenir un espectre de diferència.



## **IV. RESULTATS**



*IV.1.- Caracterització de la cinètica d'agregació del PrP(185-208) en comparació a la del pèptid A $\beta$ (1-28)*

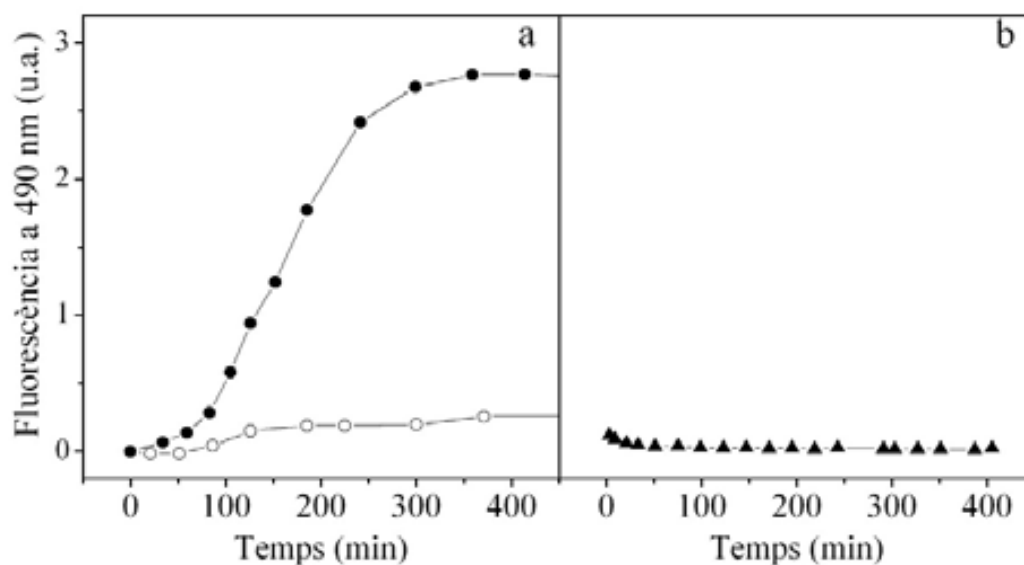




#### IV.1.1.- Cinètiques d'agregació a baixa concentració de pèptid

L'estructura secundària del pèptid A $\beta$ (1-28) en medi aquós és molt dependent del pH del medi en què s'estudia, de manera que a pH entre 1 i 4 o entre 7 i 10 el pèptid presenta majoritàriament una estructura no regular, la qual tendeix a adoptar una estructura  $\beta$  agregada a pH entre 4 i 7 [97], que a més es veu afavorida amb la temperatura. Tenint en compte això i el fet de què l'estat inicial de les mostres peptídiques afecta a la cinètica d'agregació (apartat I.6.- *Fragments peptídics utilitzats a l'estudi de la formació de fibres amiloides in vitro*) l'stock peptídic utilitzat per als experiments de fluorescència es va preparar en un tampó amb el pH ajustat a 7.5 per tal de garantir un estat monomèric.

Com s'ha explicat anteriorment (apartat III.2.2.1.- *La sonda fluorescent Tioflavina T*), la sonda ThT s'utilitza per a la detecció de fibres amiloides. En aquest treball s'ha estudiat la cinètica d'agregació dels pèptids A $\beta$ (1-28) i PrP(185-208) en presència d'aquesta sonda i mitjançant espectroscòpia de fluorescència. A la Figura 32a es mostra la cinètica d'agregació del pèptid A $\beta$ (1-28) a pH 5.5 i pH 7.5.

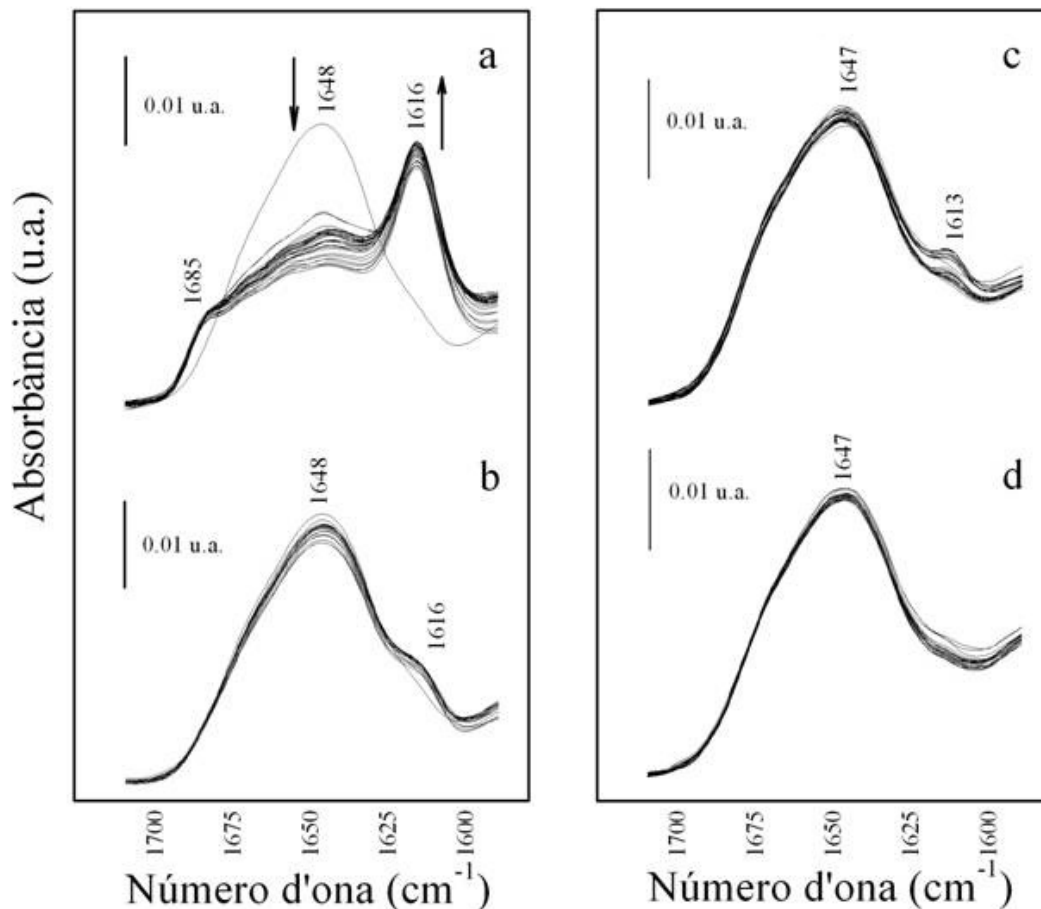


**Figura 32. Cinètica d'agregació dels pèptid A $\beta$ (1-28) i PrP(185-208) al llarg del temps.** La concentració final de pèptid va ser 50  $\mu$ M i la temperatura de 37°C. La concentració final de ThT va ser de 35  $\mu$ M. (a) A $\beta$ (1-28) a pH 5.5 (negre) i pH 7.5 (blanc). (b) PrP(185-208).

Durant el temps estudiat i a pH 5.5, aquest pèptid presenta la típica cinètica sigmoïdal de formació de fibres amiloides, característica d'un mecanisme de polimerització dependent de la nucleació. En canvi, a pH 7.5 l'agregació del pèptid és negligible. El fragment prioníic PrP(185-208) no mostra agregació en cap dels pH estudiats i durant l'escala de temps utilitzada (Figura 32b).

**IV.1.2.- Cinètiques d'agregació a elevada concentració de pèptid**

Per tal de determinar si l'absència d'agregació detectada en els experiments de fluorescència amb ThT per al pèptid A $\beta$ (1-28) a pH 5.5 i per al pèptid PrP(185-208) a pH 5.5 i 7.5 implicava una inhibició del procés de formació de fibres o tan sols un alentiment de la fase de nucleació, es va procedir a la realització de mesures a elevada concentració peptídica (~1.2 mM). Així doncs, el procés d'agregació es va seguir mitjançant espectroscòpia d'infraroig (FTIR).



**Figura 33. Canvis en l'estructura secundària dels pèptids amiloidogènics en tampó Hepes/D<sub>2</sub>O 10 mM al llarg del temps, mesurats per FTIR.** Es van adquirir espectres seqüencials cada minut i durant un temps total aproximat de 20 hores, fins que ja no es van observar canvis significatius en l'estructura secundària. Es va restar la contribució del tampó a tots els espectres. La temperatura va ser 37°C. La concentració final va ser 1.2 mM. Les fletxes indiquen regions de l'espectre on la intensitat augmenta (↑) o disminueix (↓) (a) A $\beta$ (1-28) a pD 5.5, (b) A $\beta$ (1-28) a pD 7.5, (c) PrP(185-208) a pD 5.5, (d) PrP(185-208) a pD 7.5.

A la Figura 33 es mostren els espectres d'IR en funció del temps dels dos pèptids amiloidogènics en tampó deuterat, tant a pD 5.5 com pD 7.5. En els espectres d'IR adquirits al llarg del temps per al pèptid A $\beta$ (1-28) a pD 7.5 (Figura 33b) es pot observar un màxim a

1648  $\text{cm}^{-1}$  a l'espectre inicial, que es pot assignar a una barreja d'estructures  $\alpha$  i no regulars, i una petita espatlla amb un màxim a 1616  $\text{cm}^{-1}$ , característica d'agregats proteics [157]. Aquesta espatlla no varia significativament la seva intensitat al llarg del temps. Segons els espectres es pot concloure, doncs, que l'agregació del pèptid A $\beta$ (1-28) a pD 7.5 és molt poc important. En canvi, a pD 5.5 aquest pèptid (Figura 33a) presenta una banda intensa a 1648  $\text{cm}^{-1}$ , la qual disminueix progressiva i gradualment la seva intensitat al mateix temps que comencen a aparèixer les bandes corresponents a estructures  $\beta$  agregades intermoleculares: 1616 i 1685  $\text{cm}^{-1}$ . Tot plegat indica que el pD 5.5 és un element inductor de l'agregació del pèptid A $\beta$ (1-28), d'acord amb el que s'havia descrit anteriorment [97]. En canvi, el fragment priònic PrP(185-208) no mostra cap indicatiu d'agregació a pD 7.5 ni a pD 5.5, ja que els espectres d'IR mostren una banda majoritària amb un màxim a 1647  $\text{cm}^{-1}$  i que no varia la seva intensitat al llarg del temps (Figura 33b).

Per tal de fer una comparació de les cinètiques de formació d'estructures agregades es va representar gràficament la relació d'absorbàncies entre la banda corresponent a les estructures  $\alpha$  i no regulars (1648 o 1647  $\text{cm}^{-1}$ ) i la de la banda corresponent a l'estructura  $\beta$  agregada (1616 o 1613  $\text{cm}^{-1}$ ) en funció del temps. A la Figura 34 es mostren els resultats obtinguts. La relació d'intensitats a 1616  $\text{cm}^{-1}$  i 1648  $\text{cm}^{-1}$  per al pèptid A $\beta$ (1-28) a pD 7.5 es manté gairebé constant, mentre que augmenta de manera exponencial quan el pD és ajustat a 5.5, la qual cosa indica una formació d'estructura  $\beta$  agregada intermolecular en favor de l'estructura  $\alpha$  i no ordenada. En el cas del fragment priònic PrP(185-208) la relació d'intensitats a 1613  $\text{cm}^{-1}$  i 1647  $\text{cm}^{-1}$  no experimenta cap canvi significatiu, de tal manera que la seva estructura secundària no varia al llarg del temps estudiat.

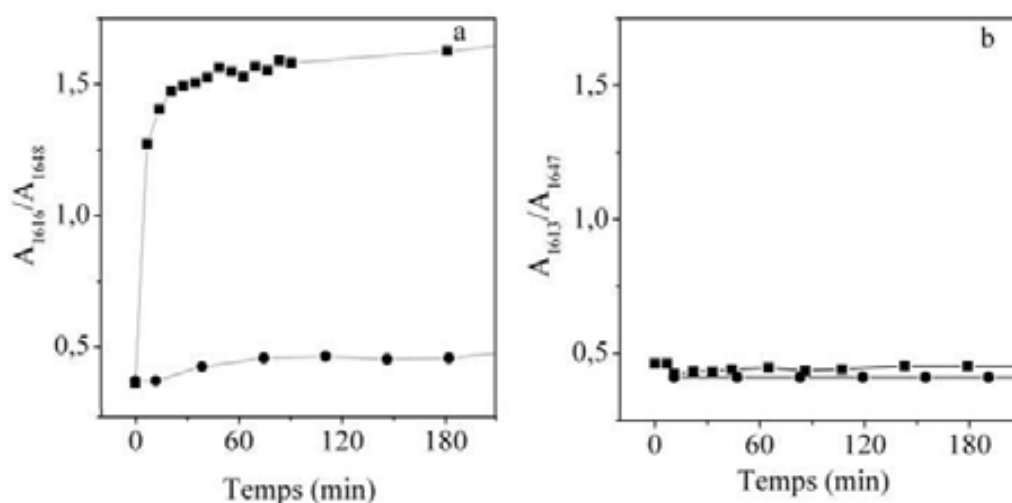
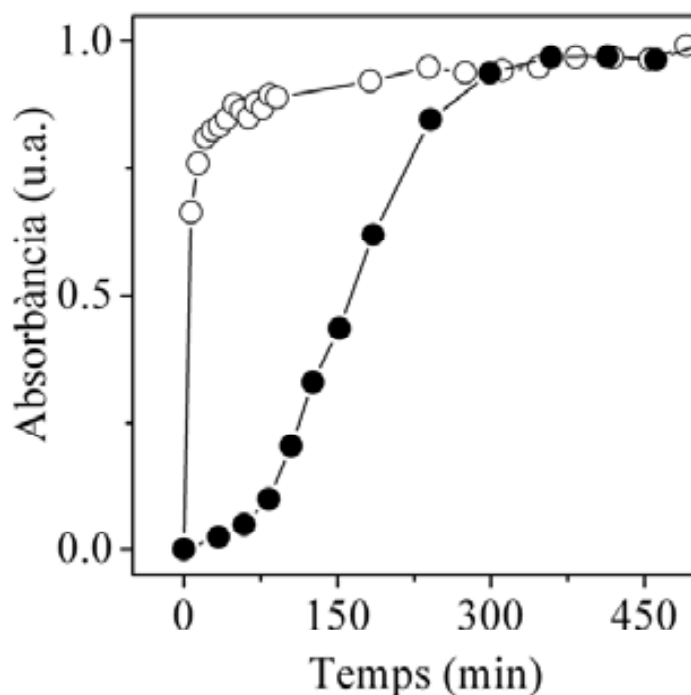


Figura 34. Representació de la relació d'intensitats a 1616 (o 1613)  $\text{cm}^{-1}$  i 1648 (o 1647)  $\text{cm}^{-1}$  obtingudes a partir de l'adquisició d'espectres de FTIR per a cadascun dels pèptids amiloidogènics en funció del temps. (a) pèptid A $\beta$ (1-28) a pD 5.5 (-■-) i pD 7.5 (-●-), (b) pèptid PrP(185-208) a pD 5.5 (-■-) i pD 7.5 (-●-).

#### IV.1.3.- Comparació del procés d'agregació a baixa i elevada concentració del pèptid A $\beta$ (1-28)

Per tal de poder comparar, des d'un punt de vista estrictament cinètic, els processos d'agregació que tenen lloc a baixa i a elevada concentració peptídica es va normalitzar els valors d'intensitat de les cinètiques obtingudes per al pèptid A $\beta$ (1-28) a pH 5.5 mitjançant espectroscòpia de fluorescència (Figura 32a) i espectroscòpia d'IR (Figura 34a) i es van representar conjuntament. El resultat obtingut es mostra a la Figura 35.

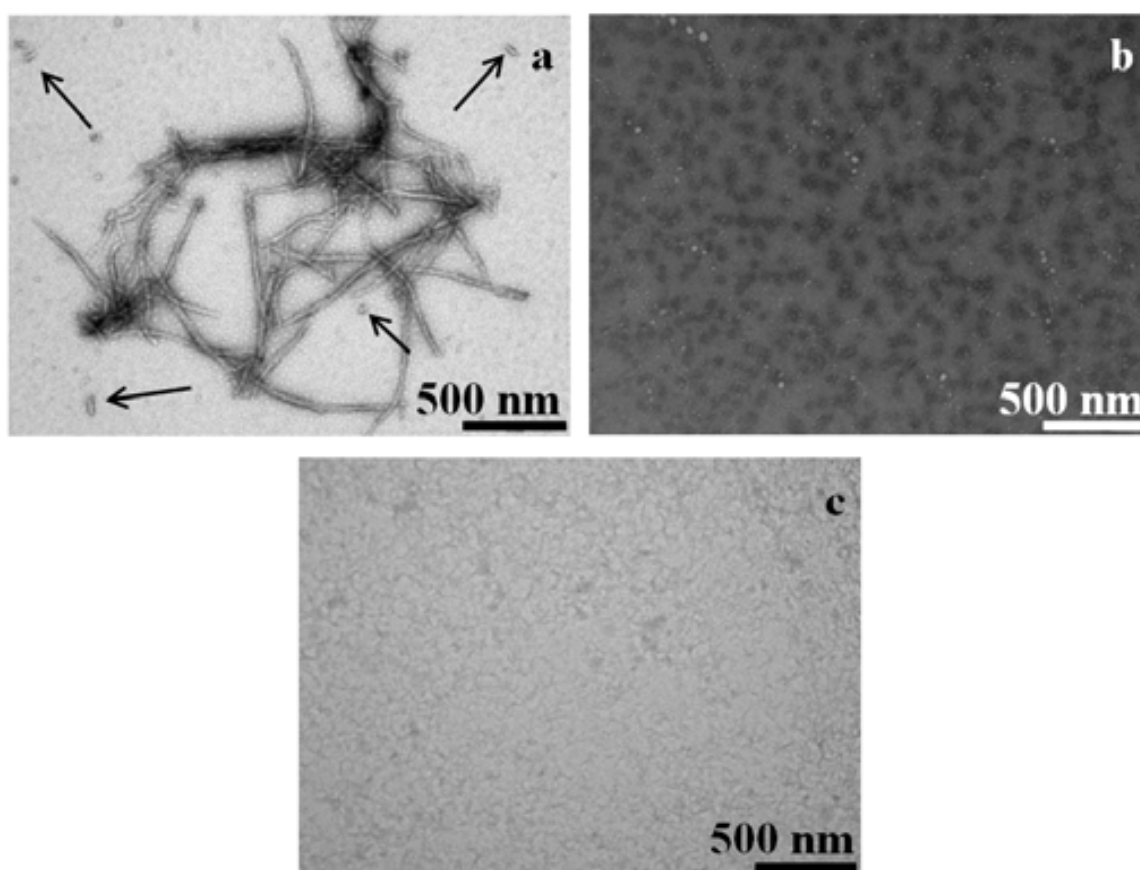
Com es pot observar, la velocitat d'agregació del pèptid varia en funció de la seva concentració. A elevada concentració, és a dir, 1.2 mM de pèptid, aquest s'agrega en la seva totalitat en 75 minuts aproximadament. En canvi, quan la concentració és baixa, és a dir, 50  $\mu$ M, transcorregut aquest temps la cinètica encara es troba en la seva fase de nucleació. En aquestes condicions, la cinètica d'agregació finalitza aproximadament als 400 minuts d'incubació. Aquests resultats indiquen que quan el pèptid és incubat a elevada concentració es formen estructures oligomèriques molt ràpidament, de manera que s'accelera l'agregació.



**Figura 35. Comparació de la velocitat d'agregació del pèptid A $\beta$ (1-28) a pH 5.5.** Baixa concentració (negre) i elevada concentració (blanc) de pèptid.

#### IV.1.4.- Morfologia dels agregats i fibres formats durant les cinètiques d'agregació dels pèptids amiloidogènics

La morfologia dels agregats formats durant les processos d'agregació de cadascun dels pèptids amiloidogènics es va estudiar per microscòpia electrònica de transmissió. Per a les mostres procedents dels experiments de fluorescència amb ThT, es va prendre una alíquota a l'estat final de la cinètica mostrada a la Figura 32, directament de la cubeta de fluorescència. Cadascuna de les mostres observades corresponen a un temps de 500 minuts de la cinètica d'agregació. Les micrografies obtingudes per al pèptid A $\beta$ (1-28) es mostren a la Figura 36.

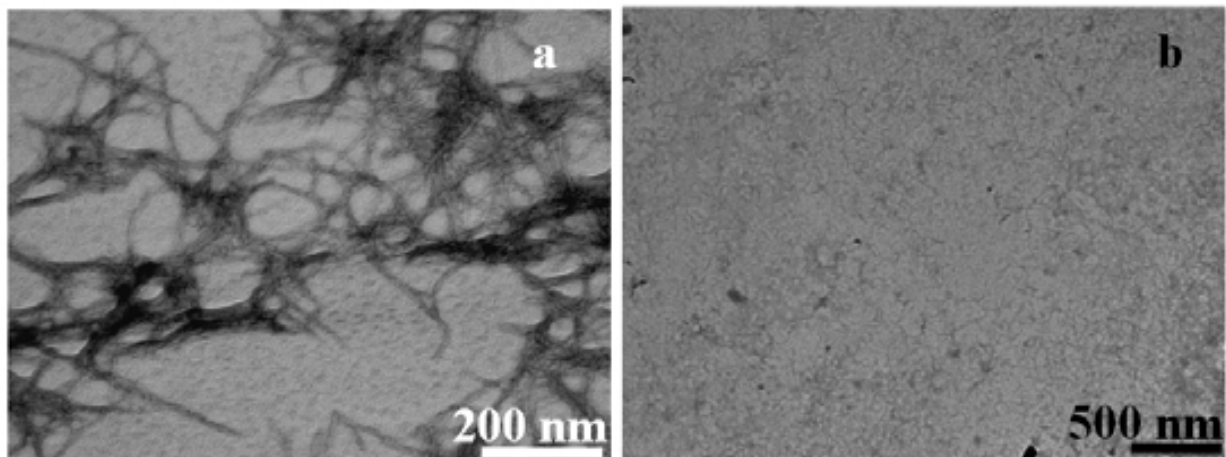


**Figura 36. Micrografies electròniques dels pèptids amiloidogènics a baixa concentració de pèptid.** Les mostres corresponen al temps final de la cinètica d'agregació per fluorescència amb ThT mostrada a la Figura 32 i van ser preses directament de la cubeta de fluorescència. La concentració de pèptid va ser 50  $\mu$ M i la temperatura 37°C. (a) Pèptid A $\beta$ (1-28 a pH 5.5 i (b) pH 7.5, (c) Pèptid PrP(185-208) a pH 5.5.

Tal i com suggereix la cinètica de tipus sigmoïdal (Figura 32a), en un temps aproximat de 400 minuts i pH 5.5 el pèptid A $\beta$ (1-28) forma fibres amiloides no ramificades i d'un diàmetre aproximat de 5-10 nm. Aquestes fibres també coexisteixen amb espècies oligomèriques similars a les trobades en altres estudis sobre el pèptid A $\beta$  [59, 170, 171], tal i

com indiquen les fletxes (Figura 36a). A pH 7.5 únicament s'observen oligòmers no fibril·lars (Figura 36b). Per altra banda, el fragment derivat de la proteïna priònica humana no forma cap mena d'agregat peptídic observable mitjançant microscòpia electrònica de transmissió (Figura 36c), ja que el pèptid s'estructura de manera desordenada i/o en hèlix  $\alpha$ , tal i com indica la senyal constant en la mesura de la fluorescència de l'estudi cinètic mitjançant la sonda ThT (Figura 32b).

Finalment, també es va comprovar la morfologia que presentaven els dos fragments peptídics a elevada concentració, és a dir, quan van ser estudiats mitjançant FTIR. Així doncs, es van preparar mostres equivalents a les dels experiments mostrats a la Figura 33a i Figura 33c i es van incubar durant 24 hores a 37°C. Transcorregut aquest temps es van adquirir les micrografies electròniques mostrades a la Figura 37a (pèptid A $\beta$ (1-28)) i Figura 37b (pèptid PrP(185-208)). Tal i com es pot veure, a elevada concentració, només el pèptid A $\beta$ (1-28) dóna lloc a fibres amiloides, de manera similar al que succeeix a baixa concentració peptídica.



**Figura 37. Micrografies electròniques dels pèptids amiloidogènics a elevada concentració de pèptid i pD 5.5.** Les mostres corresponen a l'estat final de les mostres estudiades per FTIR i mostrades a la Figura 33a,c. La concentració de pèptid va ser 1.2 mM i la temperatura 37°C. (a) pèptid A $\beta$ (1-28) i (b) pèptid PrP(185-208).

Els resultats obtinguts a partir dels estudis de fluorescència, de FTIR i de microscòpia electrònica demostren que, d'acord amb estudis que hom pot trobar a la bibliografia [108], la protonació de les histidines és un factor inductor de l'agregació del pèptid A $\beta$ (1-28), però no ho és en el cas del fragment priònic pèptid PrP(185-208).

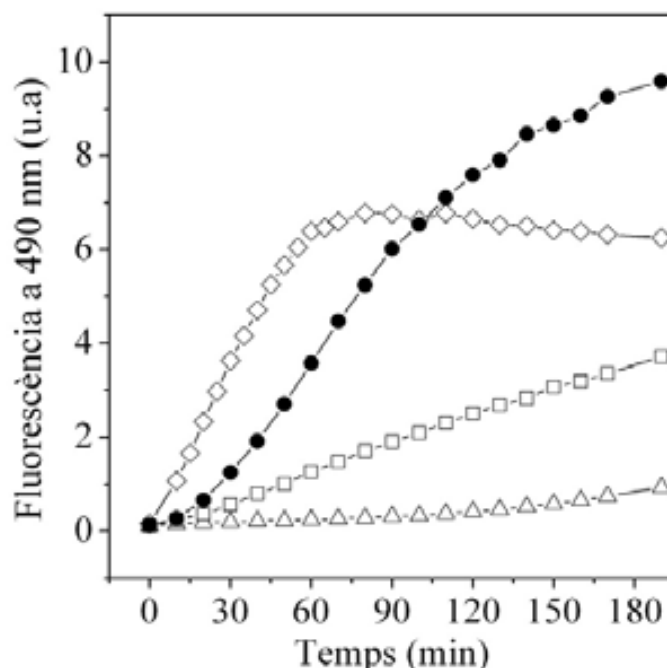
*IV.2.- Estudi de la influència de l'heparina en el procés d'agregació*





Tal i com s'ha vist anteriorment (apartat I.7.- *Amiloidogènesi i glicosaminoglicans*), se sap que la formació de les fibres amiloides pot ser modulada pels glicosaminoglicans que es troben presents en la matriu extracel·lular de les cèl·lules neuronals. Per tal d'estudiar l'efecte dels GAGs en l'agregació dels dos pèptids amiloidogènics d'aquest treball, es va escollir l'heparina com a GAG model.

Primer de tot es va voler determinar la concentració òptima de treball. Així doncs es va caracteritzar la cinètica d'agregació del pèptid A $\beta$ (1-28) en presència d'heparina a diferents concentracions. Els resultats obtinguts es mostren a la Figura 38. Per a aquesta escala de temps, s'obté una cinètica de tipus sigmoïdal quan la relació heparina/pèptid és 0.25, és a dir quan la concentració d'heparina és de 0.0416 mg/ml. Per a concentracions d'heparina majors, la cinètica està notablement més alentida, possiblement per la repulsió electrostàtica entre complexos pèptid-heparina a causa de la gran concentració de càrregues negatives.



**Figura 38.** Efecte de la concentració d'heparina en la cinètica d'agregació del pèptid A $\beta$ (1-28). La concentració final de pèptid va ser 50  $\mu$ M i la temperatura de 37°C. La concentració final de ThT va ser de 35  $\mu$ M. (-●-) 0.0416 mg/ml, (-◊-) 0.0083 mg/ml, (-□-) 0.208 mg/ml, (-△-) 0.416 mg/ml.

En el cas del pèptid PrP(185-208) es va veure que en aquesta mateixa relació heparina/pèptid s'obtenia també una cinètica sigmoïdal i durant el mateix interval de temps. Per tant, per caracteritzar les cinètiques d'agregació en presència de GAGs a baixa i a elevada concentració peptídica, i per a les dues seqüències peptídiques, es va mantenir la mateixa relació heparina/pèptid (0.25).

Com es va explicar a la Introducció (apartat I.7.- *Amiloidogènesi i glicosaminoglicans*) s'ha descrit una seqüència consens per a la unió de GAGs a pèptids i proteïnes, la qual es pot identificar en la seqüència polipeptídica tant del pèptid A $\beta$ (1-28) com del fragment priònic PrP(185-205). Així doncs, en el present treball es va plantejar l'estudi, a més de les seqüències wild type, de les seqüències mutants corresponents a la substitució de les His per Ala, per als dos pèptids, ja que hom troba a la literatura [108] que aquests residus aminoacídics són de vital importància en la unió de GAGs al pèptid A $\beta$ . Els mutants escollits es mostren a la Taula 8:

---

**Taula 8. Seqüències polipeptídiques utilitzades per als estudis d'agregació en presència d'heparina.**

---

A $\beta$ (1-28)	DAEFRHDSGYEV <b>HH</b> QKLVFFAEDVGSNK
A $\beta$ (1-28)H13A	DAEFRHDSGYEV <b>A</b> HQKLVFFAEDVGSNK
A $\beta$ (1-28)H14A	DAEFRHDSGYEV <b>H</b> AQKLVFFAEDVGSNK
PrP(185-205)	<b>KQHTV</b> TTTTTKGENFTETDVKMMER
PrP(185-205)H187A	<b>KQ</b> <b>A</b> TVTTTTTKGENFTETDVKMMER

---

La seqüència d'unió a l'heparina està assenyalada en negreta i els residus aminoacídics mutats a Alanina es mostren en color vermell

---

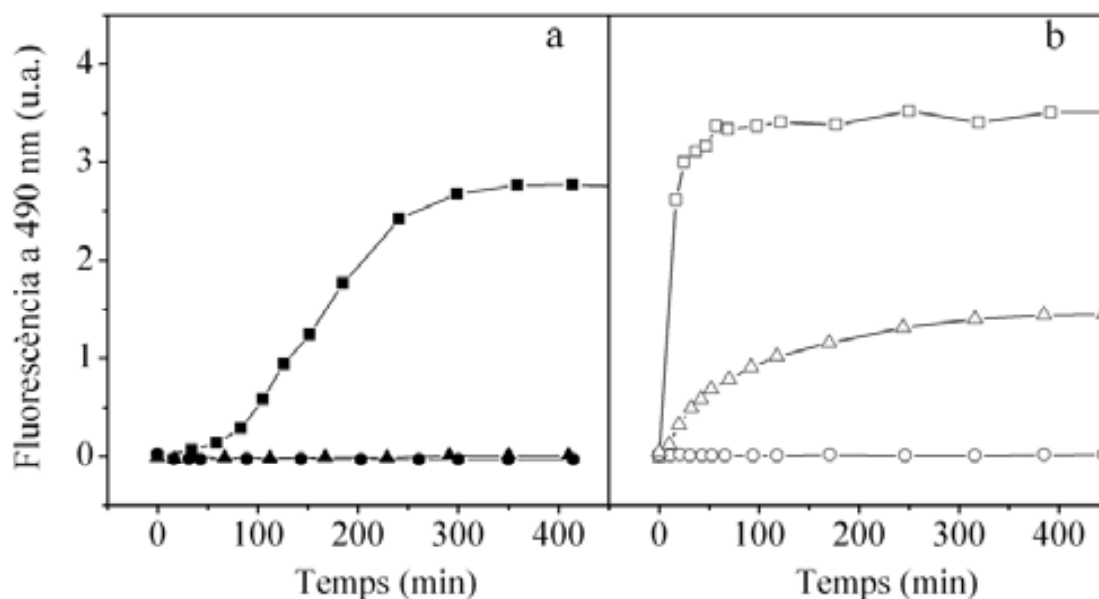
### IV.2.1.- Cinètica d'agregació a baixa concentració del pèptid A $\beta$ (1-28)

L'efecte de l'heparina sobre el procés d'agregació del pèptid A $\beta$ (1-28) ha estat estudiat anteriorment per J. McLaurin i P.E. Fraser [108] utilitzant discroïsmes circulars i microscòpia electrònica. En el present treball, s'han utilitzat altres tècniques, com l'espectroscòpia d'IR, i s'ha fet servir el pèptid A $\beta$ (1-28) com a referència per tal de poder-hi comparar l'agregació del pèptid priònic PrP(185-208).

Per tal d'estudiar l'efecte d'aquest glicosaminoglicà, primerament es van realitzar les cinètiques d'agregació per espectroscòpia de fluorescència amb la sonda ThT i pH 5.5 del pèptid A $\beta$ (1-28) i dels mutants His13A i His14A, en absència d'heparina. Els resultats obtinguts es mostren a la Figura 39a. Com es pot observar, cap dels dos mutants formen fibres detectables amb ThT durant l'escala de temps estudiada. En canvi, el pèptid A $\beta$ (1-28) dona lloc a la típica cinètica sigmoïdal característica de la formació de fibres amiloides.

En presència d'heparina, el pèptid A $\beta$ (1-28) presenta una cinètica d'agregació més ràpida i sense fase de nucleació que quan l'heparina no és present en el medi. A més, la intensitat final assolida en el plateau de la corba és major, la qual cosa indica una major

quantitat de fibres formades (Figura 39b). La mutació de la His14A dóna lloc a una cinètica de formació d'una menor quantitat de fibres, mentre que la mutació de la His13A provoca la total inhibició de l'agregació del pèptid en l'escala de temps estudiada (Figura 39b).



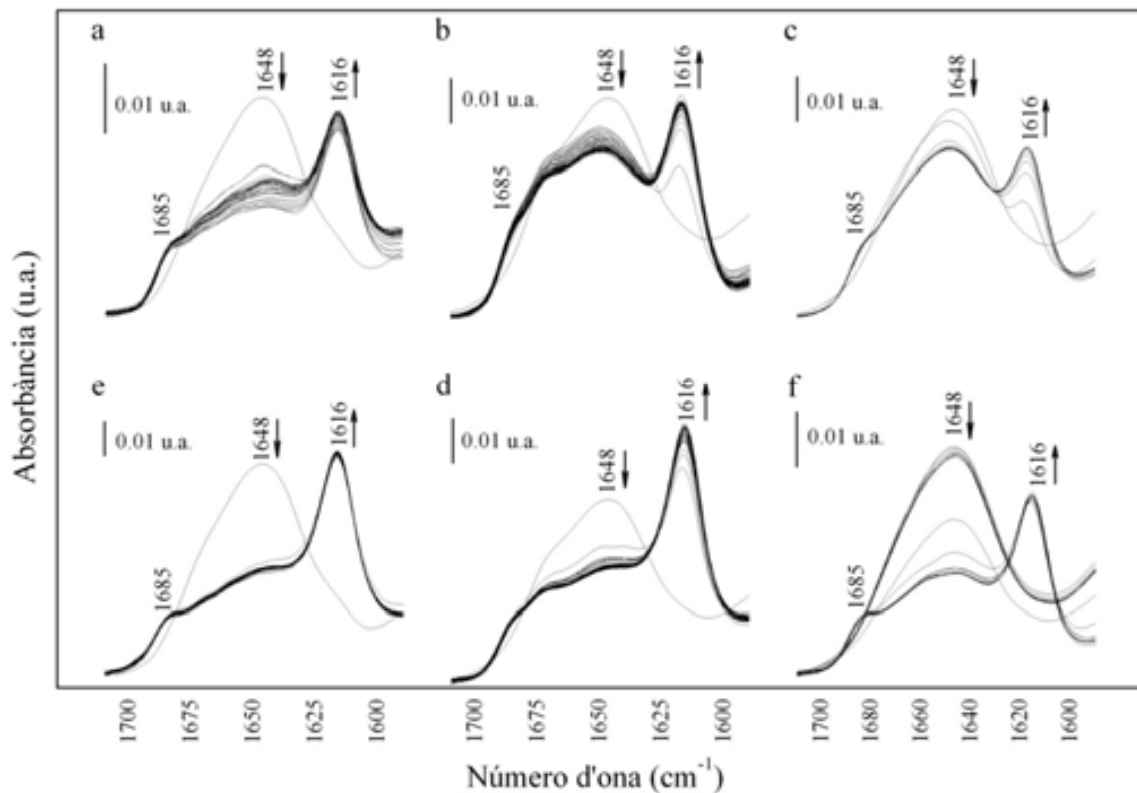
**Figura 39. Cinètica d'agregació a pH 5.5 del pèptid A $\beta$ (1-28) al llarg del temps.** La concentració final de pèptid va ser 50  $\mu$ M i la temperatura de 37°C. La concentració final de ThT va ser de 35  $\mu$ M. En absència d'heparina (a): (-■-) A $\beta$ (1-28), (-●-) A $\beta$ (1-28)H13A, (-▲-) A $\beta$ (1-28) H14A; En presència d'heparina (b): (-□-) A $\beta$ (1-28), (-○-) A $\beta$ (1-28)H13A, (-△-) A $\beta$ (1-28)H14A.

#### IV.2.2.- Canvis estructurals en el pèptid A $\beta$ (1-28) induïts per la presència d'heparina

Per estudiar els canvis estructurals induïts per la presència d'heparina en el pèptid A $\beta$ (1-28) i els seus mutants, i determinar així si l'efecte de la substitució de les His per Ala representa una inhibició o un alentiment de la formació de fibres, es van adquirir espectres seqüencials d'IR al llarg del temps, tant a pD 5.5 com pD 7.5. La concentració d'heparina estudiada va ser d'1mg/ml, de tal manera que es va mantenir la mateixa relació heparina/pèptid que en els experiments de fluorescència. Els resultats obtinguts es mostren a les Figures 40 i 41.

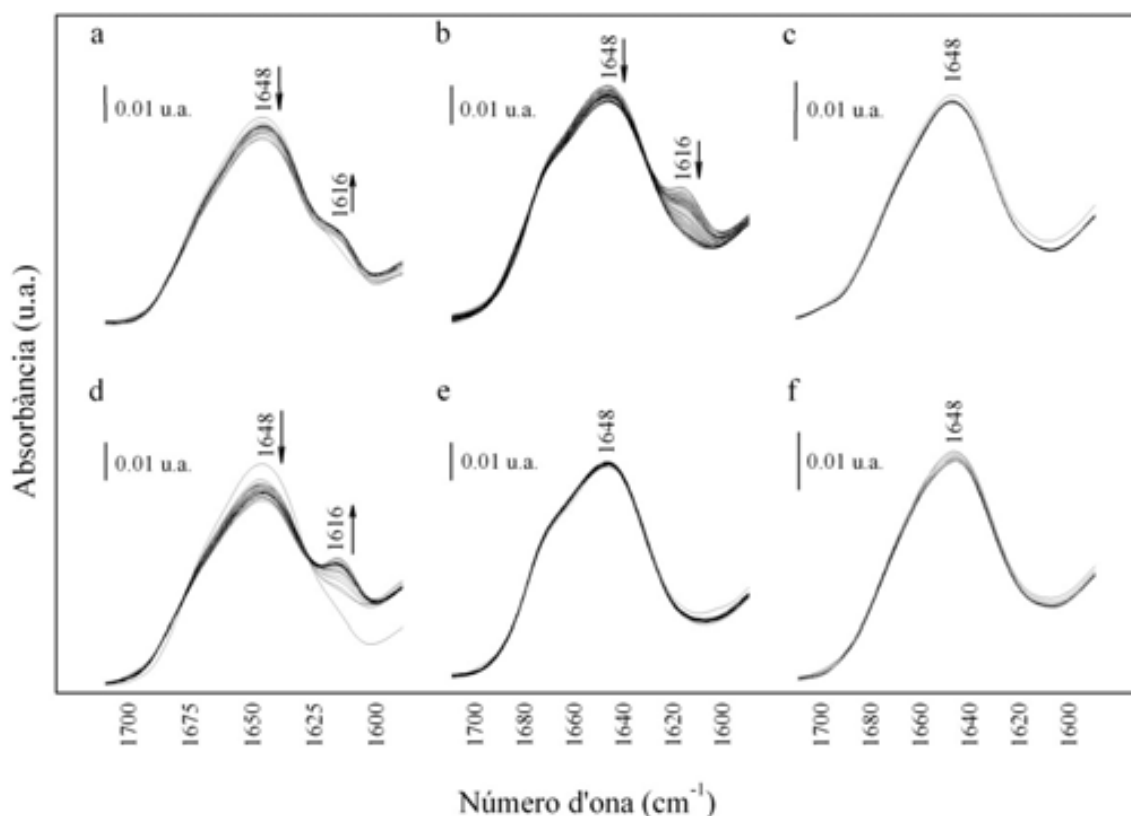
En els espectres d'IR adquirits al llarg del temps a pD 5.5 i absència d'heparina, tant el pèptid A $\beta$ (1-28) (Figura 40a) com els mutants His13Ala (Figura 40b) i His14Ala (Figura 40c) mostren una banda a 1648  $\text{cm}^{-1}$  a l'espectre inicial, característica d'una barreja d'estructures  $\alpha$  i desordenada. A mida que avança el temps, aquesta banda disminueix la seva intensitat i de manera simultània apareix una banda a 1616  $\text{cm}^{-1}$ , indicativa d'estructures  $\beta$  agregades. Quan

el medi conté heparina, els espectres adquirits són ben semblants, amb la única diferència que la banda corresponent a estructura  $\beta$  agregada és més intensa i la banda a  $1648\text{ cm}^{-1}$  és pràcticament inexistent, fet indicatiu de que l'estructura secundària present en els 3 fragments peptídics és majoritàriament  $\beta$  i que l'heparina actua com un intensificador del procés de formació d'agregats amiloides (Figura 40e-f).



**Figura 40. Canvis en l'estructura secundària del pèptid pèptid A $\beta$  en tampó Hepes/D<sub>2</sub>O 10 mM pD 5.5 al llarg del temps, mesurats per FTIR.** Es van adquirir espectres seqüencials cada minut i durant un temps total aproximat de 20 hores, fins que ja no es van observar canvis significatius en l'estructura secundària. Es va restar la contribució del tampó a tots els espectres. La temperatura va ser 37°C. La concentració final va ser 1.2 mM. Les fletxes indiquen regions de l'espectre on la intensitat augmenta ( $\uparrow$ ) o disminueix ( $\downarrow$ ). En absència d'heparina, (a) A $\beta$ (1-28), (b) A $\beta$ (1-28)H13A, (c) A $\beta$ (1-28)H14A. En presència d'heparina, (e) A $\beta$ (1-28), (f) A $\beta$ (1-28)H13A, (g) A $\beta$ (1-28)H14A.

En general, a pD 7.5 i tant en absència com en presència d'heparina, l'agregació del pèptid A $\beta$ (1-28) és inexistent o molt incipient durant l'interval de temps estudiat, no experimenta un procés d'agregació ja que la banda majoritària present en els espectres d'IR té un màxim a 1648  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 41). Aquest resultat fa pensar que l'estat de protonació de les His presents en la seqüència polipeptídica és essencial per a la interacció amb l'heparina.

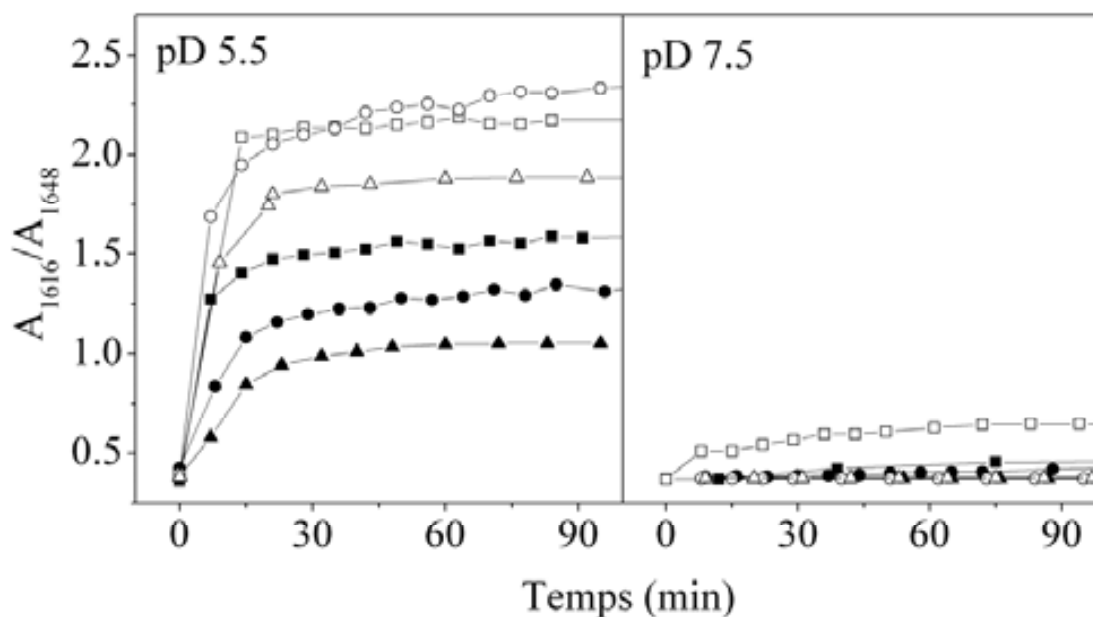


**Figura 41. Canvis en l'estructura secundària del pèptid pèptid A $\beta$  en tampó Hepes/D<sub>2</sub>O 10 mM pD 7.5 al llarg del temps, mesurats per FTIR.** Es van adquirir espectres seqüencials cada minut i durant un temps total aproximat de 20 hores, fins que ja no es van observar canvis significatius en l'estructura secundària. Es va restar la contribució del tampó a tots els espectres. La temperatura va ser 37°C. La concentració final va ser 1.2 mM. Les fletxes indiquen regions de l'espectre on la intensitat augmenta (↑) o disminueix (↓).

En absència d'heparina, (a) A $\beta$ (1-28), (b) A $\beta$ (1-28)H13A, (c) A $\beta$ (1-28)H14A.

En presència d'heparina, (e) A $\beta$ (1-28), (f) A $\beta$ (1-28)H13A, (g) A $\beta$ (1-28)H14A.

La representació gràfica de la relació d'absorbàncies entre la banda corresponent a les estructures  $\alpha$  i no regulars (1648  $\text{cm}^{-1}$ ) i la de la banda corresponent a l'estructura  $\beta$  agregada (1616  $\text{cm}^{-1}$ ) en funció del temps va permetre fer una comparació de les cinètiques d'agregació a elevada concentració peptídica, obtingudes en cadascuna de les condicions experimentals estudiades. Els resultats es mostren a la Figura 42.



**Figura 42.** Representació de la relació d'intensitats a  $1616\text{ cm}^{-1}$  i  $1648\text{ cm}^{-1}$  obtingudes a partir de l'adquisició d'espectres de FTIR per al pèptid A $\beta$  en funció del temps.

En absència d'heparina, A $\beta$ (1-28) (-■-), A $\beta$ (1-28)H13A (-●-), A $\beta$ (1-28)H14A (-▲-).  
 En presència d'heparina, A $\beta$ (1-28) (-□-), A $\beta$ (1-28)H13A (-○-), A $\beta$ (1-28)H14A (-△-).

Quan el pD del medi és ajustat a 5.5, tant per al pèptid A $\beta$ (1-28) com per als mutants His13A com His14A, la relació d'intensitats a  $1616\text{ cm}^{-1}$  i  $1648\text{ cm}^{-1}$  augmenta de manera exponencial, la qual cosa indica una formació d'estructura  $\beta$  agregada intermolecular simultània a la desaparició de l'estructura  $\alpha$  i no ordenada. El pendent inicial de la corba és lleugerament diferent per a cada pèptid, indicant petites diferències en la velocitat de formació dels agregats. També s'observa que per a cada pèptid el valor de la relació d'intensitats en el plateau de la corba és diferent, la qual cosa significa que la quantitat d'agregats formats també varia. Així doncs, es pot dir que, tant per la velocitat com per la quantitat d'agregats formats:

$$A\beta(1-28) > A\beta(1-28)H13A > A\beta(1-28)H14A$$

Quan el medi conté heparina, aquesta provoca una major formació d'estructura  $\beta$  i un augment, també de la velocitat de formació d'aquesta, respecte les cinètiques obtingudes en absència d'heparina. A pD 5.5, les mutacions de les His13 i His14 no semblen tenir cap mena d'efecte inhibitori del procés de formació d'agregats. La mutació His13A sembla no tenir efecte sobre la unió d'heparina, ja que la corba obtinguda és gairebé idèntica a la obtinguda en el cas del pèptid A $\beta$ (1-28). En canvi, la mutació His14A provoca una petita disminució de la intensitat i, per tant, en el nombre d'agregats formats, del plateau assolit en la cinètica.

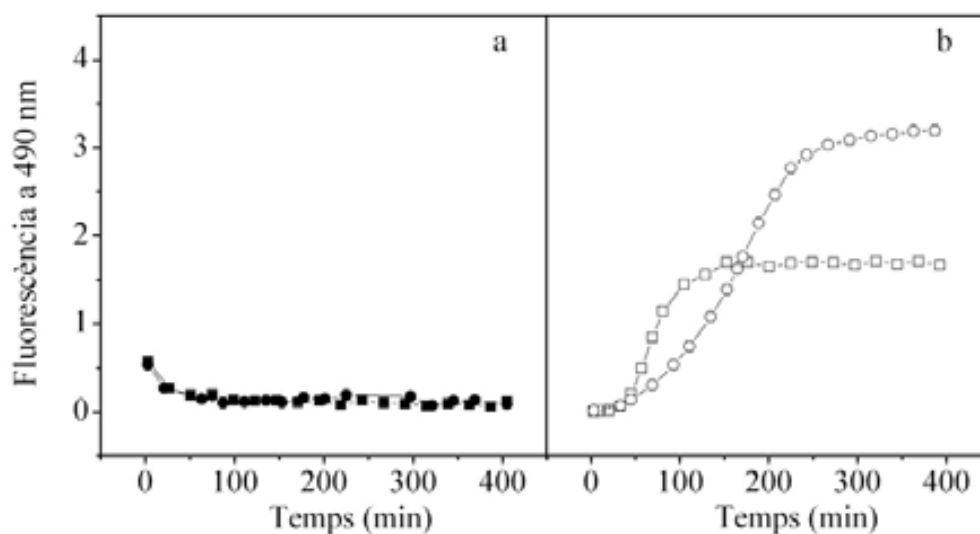
A pD 7.5 la relació d'intensitats a  $1616\text{ cm}^{-1}$  i  $1648\text{ cm}^{-1}$  pràcticament no varia, la qual cosa confirma que no hi ha canvis estructurals significatius en aquestes condicions.

Aquests resultats demostren que, d'acord amb els estudis de Fraser i McLaurin [108], la substitució de les His13 i His14 per Ala provoca un alentiment del procés de nucleació del pèptid  $A\beta(1-28)$ .

#### IV.2.3.- Cinètica d'agregació a baixa concentració del pèptid PrP(185-208)

Per estudiar el possible efecte de l'heparina en el procés d'agregació del fragment priònic PrP(185-208) es va identificar un possible motiu d'unió d'aquest GAG a la seqüència polipeptídica, per analogia a la seqüència d'unió present en el pèptid  $A\beta(1-28)$ . A la Taula 8 s'assenyala la possible seqüència d'unió en color groc. De la mateixa manera que es va plantejar amb el pèptid  $A\beta(1-28)$ , també es va escollir un mutant d'His d'aquesta seqüència per al fragment priònic.

Tal i com es va comprovar anteriorment (*apartat IV.1.1.- Cinètiques d'agregació a baixa concentració de pèptid*), el fragment priònic és incapaç d'agregar i formar fibres amiloides a pH 5.5 durant l'escala de temps estudiada. El mutant His187A presenta el mateix comportament (Figura 43a). En presència d'heparina, però, el pèptid priònic PrP(185-208) sí que forma agregats amiloides (Figura 43b), observant-se una cinètica sigmoïdal a la mateixa relació heparina/pèptid utilitzada per al pèptid  $A\beta(1-28)$ . En presència d'heparina, la seqüència mutant presenta una cinètica d'agregació més lenta.

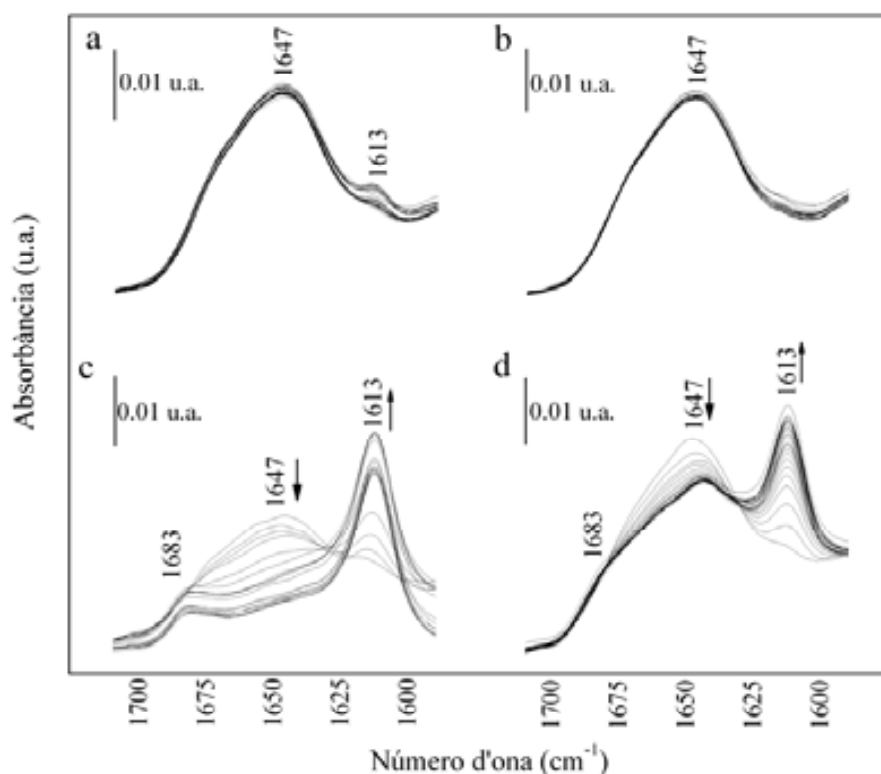


**Figura 43. Cinètica d'agregació a pH 5.5 del pèptid PrP(185-208) al llarg del temps.** La concentració final de pèptid va ser  $50\ \mu\text{M}$  i la temperatura de  $37^\circ\text{C}$ . La concentració final de ThT va ser de  $35\ \mu\text{M}$ . En absència d'heparina (a): (-■-) PrP(185-208), (-●-)PrP(185-208)H187A. En presència d'heparina (b): (-□-)PrP(185-208), (-○-)PrP(185-208)H187A.



#### IV.2.4.- Canvis estructurals en el pèptid PrP(185-208) induïts per la presència d'heparina

Els canvis estructurals experimentats pel fragment peptídic derivat de la proteïna priònica humana es van estudiar mitjançant espectroscòpia d'IR. Es van adquirir espectres seqüencials al llarg del temps, tant a pD 5.5 com pD 7.5. La concentració d'heparina estudiada va ser d'1mg/ml, de tal manera que es va mantenir la mateixa relació heparina/pèptid que en els experiments de fluorescència. Els resultats obtinguts es mostren a la Figura 44.

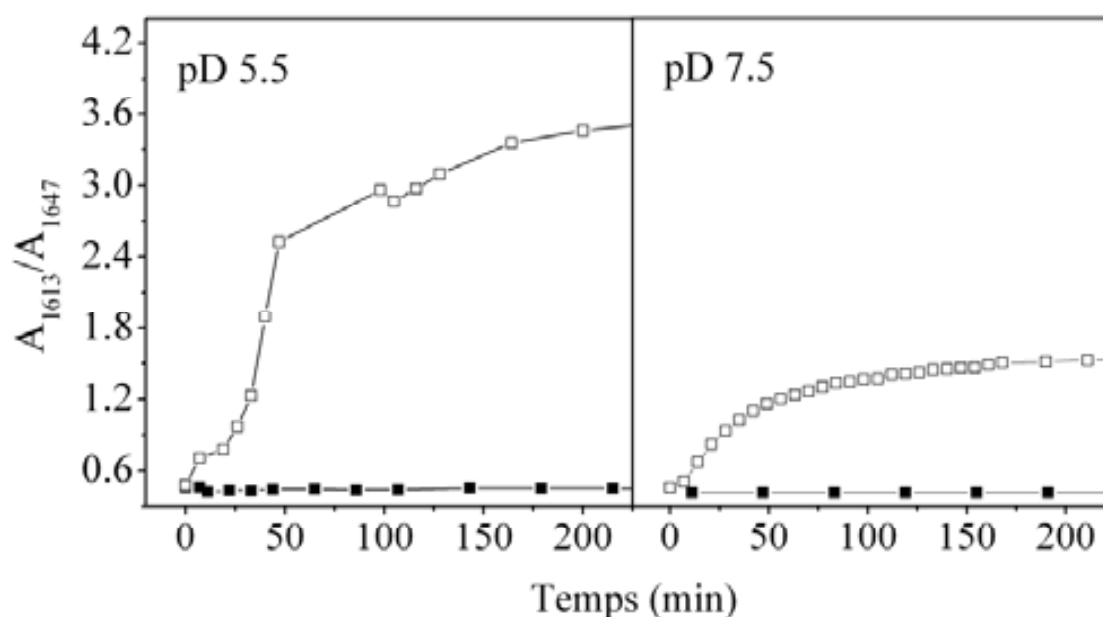


**Figura 44. Canvis en l'estructura secundària del pèptid PrP en tampó Hepes/D<sub>2</sub>O 10 mM al llarg del temps, mesurats per FTIR.** Es van adquirir espectres seqüencials cada minut i durant un temps total aproximat de 20 hores, fins que ja no es van observar canvis significatius en l'estructura secundària. A tots els espectres es va restar la contribució del tampó. La temperatura va ser 37°C. La concentració final va ser 1.2 mM. Les fletxes indiquen regions de l'espectre on la intensitat augmenta (↑) o disminueix (↓). En absència d'heparina, (a) pD 5.5, (b) pD 7.5. En presència d'heparina, (c) pD 5.5, (d) pD 7.5.

A pD 5.5 i durant el temps total d'adquisició d'espectres d'IR (unes 20 hores) el fragment priònic mostra una banda majoritària amb un màxim a 1647 cm<sup>-1</sup> i una petita espatlla a 1613 cm<sup>-1</sup>, la qual cosa indica que aquest pèptid presenta una barreja d'estructures  $\alpha$  i desordenada i una petita proporció de fulla  $\beta$  (Figura 44a). Per altra banda, a pD 7.5 la banda a 1647 cm<sup>-1</sup> no varia la seva intensitat indicant que l'estructura secundària en forma d'hèlix  $\alpha$

i desordenada es manté constant (Figura 44b). Quan hi ha heparina en el medi la seqüència d'espectres d'IR posa de manifest la disminució d'intensitat de la banda a  $1647\text{ cm}^{-1}$  gradual i simultània a l'augment d'intensitat de la banda a  $1613\text{ cm}^{-1}$ , la qual cosa indica que el glicosaminoglicà indueix la formació d'estructura  $\beta$  agregada (Figura 44c,d).

Per estudiar amb més detall els resultats obtinguts, es va representar gràficament la relació d'absorbàncies entre la banda corresponent a les estructures  $\alpha$  i no regulars ( $1647\text{ cm}^{-1}$ ) i la de la banda corresponent a l'estructura  $\beta$  agregada ( $1613\text{ cm}^{-1}$ ) en funció del temps obtinguda per a cada experiment sobre el fragment peptídic priònic PrP(185-208).



**Figura 45.** Representació de la relació d'intensitats a  $1613\text{ cm}^{-1}$  i  $1647\text{ cm}^{-1}$  obtingudes a partir de l'adquisició d'espectres de FTIR per al pèptid PrP en funció del temps. (-■-) PrP(185-208) en absència d'heparina, (-□-) PrP(185-208) en presència d'heparina.

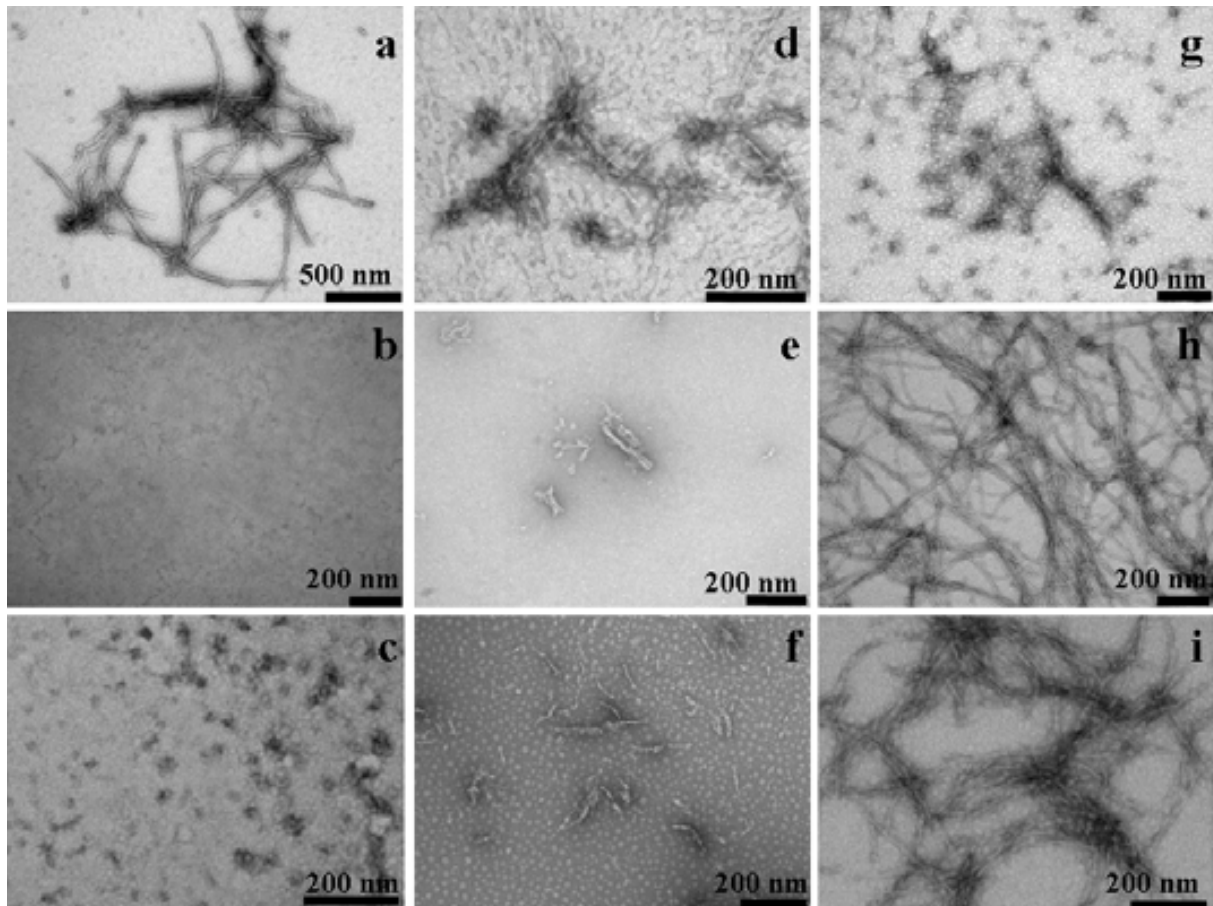
Com ja es desprèn de les seqüències d'espectres d'IR mostrades a la Figura 44, l'agregació és més important a pD 5.5 i en presència d'heparina. Aquests resultats es corroboren amb les cinètiques d'agregació representades a la Figura 45. El pèptid PrP(185-208) no forma agregats rics en estructura  $\beta$ , però a pD 5.5 i en presència d'heparina, presenta una cinètica de tipus sigmoïdal, amb una petita "lag-phase" d'uns 20 minuts, típica dels processos de formació de fibres amiloides. Quan el pD del medi augmenta (és a dir, pD 7.5) únicament s'observa formació d'estructura  $\beta$  si el medi conté heparina. El valor, però, del plateau final assolit a la cinètica d'agregació és molt menor que quan el pD del medi està ajustat a 5.5 indicant, doncs, la formació d'un menor nombre d'agregats rics en estructura  $\beta$ .

#### **IV.2.5.- Morfologia dels agregats i fibres formades a la cinètica d'agregació del pèptid A $\beta$ (1-28)**

Els agregats peptídics i fibres amiloides obtinguts en els diferents experiments a baixa concentració de pèptid van ser observats mitjançant microscòpia electrònica per estudiar-ne la seva morfologia. A la Figura 46, es mostren les micrografies obtingudes a partir de les mostres del temps final de les cinètiques d'agregació realitzades per fluorescència de la ThT i mostrades a la Figura 39.

El pèptid A $\beta$ (1-28) a pH 5.5 forma fibres amiloides en un temps d'incubació aproximat de 500 minuts i a 37°C, com ja s'intuïa amb la cinètica de tipus sigmoïdal observada i que caracteritza la formació de fibres amiloides. Aquestes fibres no estan ramificades i tenen un diàmetre aproximat d'uns 5 nm (Figura 46a). Pels mutants His13A i His14A, pels quals no hi ha un augment de la fluorescència de la ThT durant aquesta escala temporal, no s'observa formació de fibres. Però en el cas del mutant His14A s'observen formes oligomèriques que precedeixen a la formació d'agregats amiloides, que no són sensibles a la sonda ThT, ja que a la corresponent cinètica d'agregació en presència d'aquesta sonda no es va observar un augment de la seva fluorescència (Figura 39a).

La presència d'heparina en el medi accelera la formació de fibres per part del pèptid A $\beta$ (1-28) i indueix la formació d'agregats rics en estructura  $\beta$  per part del mutant His14A, però no produeix cap efecte d'agregació en el mutant His13A, tal i com es va veure en la Figura 39b. Aquests resultats queden corroborats amb les micrografies electròniques mostrades als panells d, e i f de la Figura 46. En presència d'heparina el pèptid A $\beta$ (1-28) forma fibres, de manera semblant a quan no hi ha heparina en el medi. Per altra banda, la presència del glicosaminoglicà indueix la formació d'agregats per part del mutant His14A i, en menor nombre, del mutant His13A. Els agregats del mutant His14A són rics en estructura  $\beta$  agregada, ja que són detectables mitjançant la fluorescència de la ThT, en canvi, els agregats als quals dona lloc el mutant His13A no uneixen la sonda ThT i, per tant, la seva estructura secundària no és fulla  $\beta$  agregada (Figura 39b).



**Figura 46. Micrografies electròniques del pèptid  $A\beta(1-28)$  i els seus mutants a pH 5.5.** Les mostres (a-f) corresponen al temps final de la cinètica d'agregació per fluorescència amb ThT mostrada a la Figura 39 i van ser preses directament de la cubeta de fluorescència. La concentració de pèptid va ser  $50 \mu\text{M}$  i la temperatura  $37^\circ\text{C}$ .

Les mostres dels panells (g-i) corresponen a l'estat final de les mostres estudiades per FTIR i mostrades a la Figura 45. La concentració de pèptid va ser  $1.2 \text{ mM}$  i la temperatura  $37^\circ\text{C}$ .

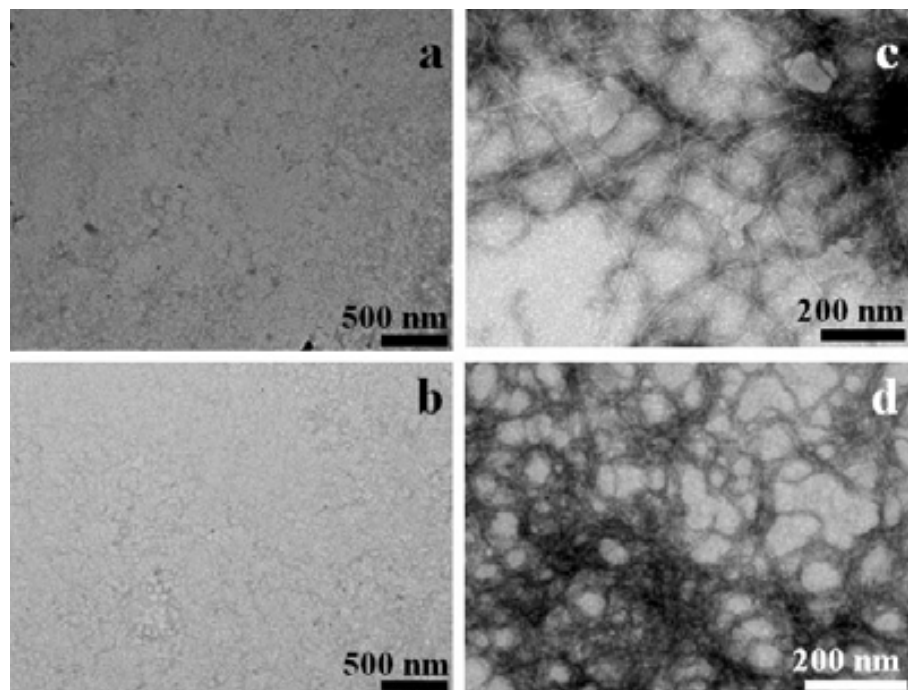
En absència d'heparina, (a)  $A\beta(1-28)$ , (b)  $A\beta(1-28)H13A$ , (c)  $A\beta(1-28)H14A$ ,

En presència d'heparina, (d,g)  $A\beta(1-28)$ , (e,h)  $A\beta(1-28)H13A$ , (f,i)  $A\beta(1-28)H14A$ .

Finalment, els panells g, h, i de la Figura 46 mostren l'estat final de les mostres de pèptid  $A\beta(1-28)$  i els seus dos mutants, en presència d'heparina i a elevada concentració peptídica, estudiades per espectroscòpia d'IR (Figura 40e,d,f). Tal i com posa de manifest el canvi en l'estructura secundària de cada fragment peptídic (des d'estructura  $\alpha$  i desordenada a estructura  $\beta$  agregada), després d'unes 20 hores d'incubació a  $37^\circ\text{C}$  es formen fibres amiloides sense ramificar i en major nombre que les mostres anàlogues estudiades a baixa concentració peptídica.

#### **IV.2.6.- Morfologia dels agregats i fibres formades a la cinètica d'agregació del pèptid PrP(185-208)**

La Figura 47 mostra les micrografies obtingudes sobre els experiments d'agregació en presència i absència d'heparina del pèptid PrP(185-208) a pH 5.5. Les corresponents cinètiques d'agregació realitzades amb el pèptid PrP(185-208) i el seu mutant His187A en presència de la sonda ThT no mostren augment en la seva fluorescència quan el medi no conté heparina, indicant que no hi ha formació de fibres amiloides en un període d'uns 400 minuts aproximadament. Aquest fet queda confirmat amb l'absència d'agregats amorfs o fibres amiloides en les micrografies mostrades als panells a i b de la Figura 47. En canvi, quan hi ha heparina en el medi, tant el fragment prioníic PrP(185-208) com el seu mutant His187A formen fibres amiloides sense ramificar i amb una aparença “entortolligada”, tal i com es veu en els panells c i d de la Figura 47.

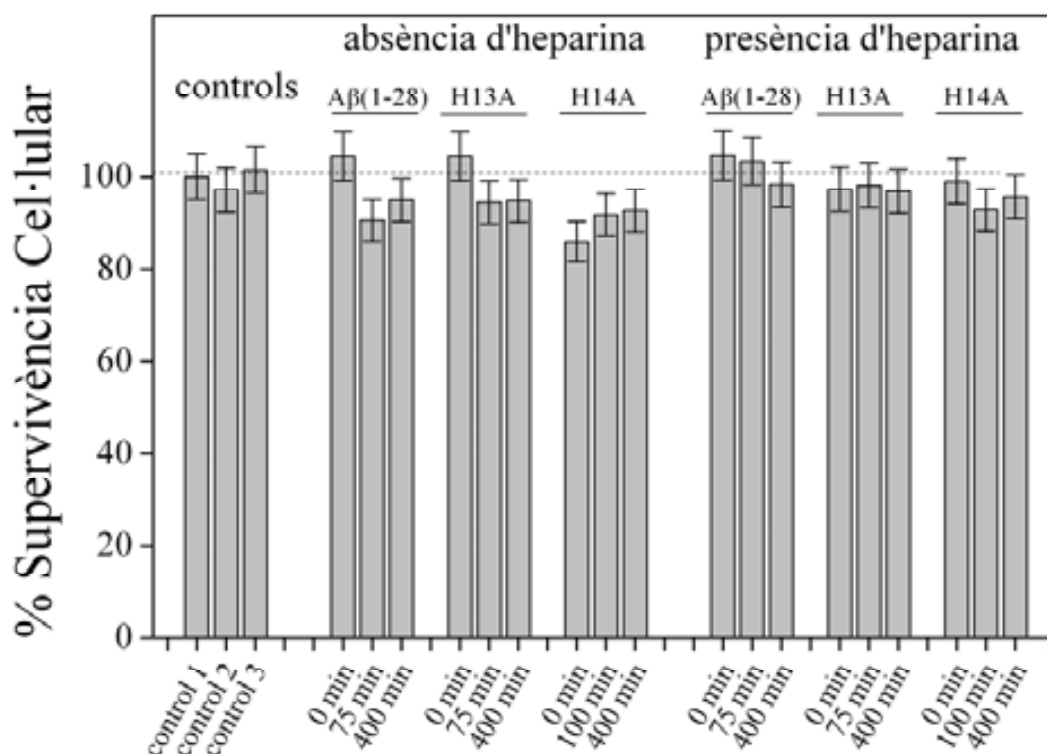


**Figura 47. Micrografies electròniques del pèptid PrP(185-208) i el seu mutant a pH 5.5.** Les mostres (a-d) corresponen a al temps final de la cinètica d'agregació per fluorescència amb ThT mostrada a la Figura 43 i van ser preses directament de la cubeta de fluorescència. La concentració de pèptid va ser 50  $\mu$ M i la temperatura 37°C.

En absència d'heparina, (a) PrP(185-208), (b) PrP(185-208)H187A,  
En presència d'heparina, (c) PrP(185-208), (d) PrP(185-208)H187A

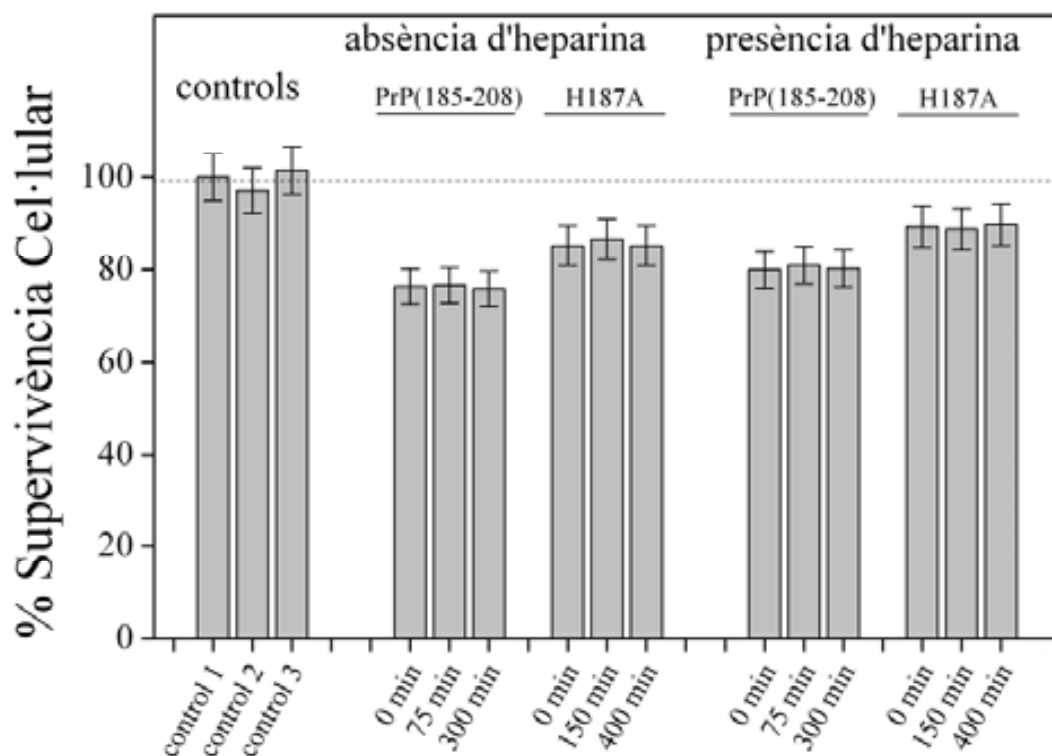
#### IV.2.6.- Viabilitat cel·lular

Es va estudiar el possible efecte citotòxic en cultius neuronals de mostres peptídiques de diferents temps d'incubació a baixa concentració de peptid (50  $\mu$ M), tant en presència com en absència d'heparina. Així doncs, a la Figura 48 es representa el % de cèl·lules vives després del tractament amb cadascuna de les mostres assajades del peptid A $\beta$ (1-28) i els seus dos mutants. La incubació del peptid A $\beta$ (1-28) no té un efecte citotòxic significatiu, ni quan els agregats contenen heparina o no. L'estat d'agregació de la mostra, és a dir, si el peptid és monomèric, es troba en forma d'agregats amorfs o bé, forma part de les fibres amiloides (temps 0, 75 i 400 minuts, respectivament) tampoc influeix en el % de cèl·lules que sobreviuen al tractament. Els mutants His13A i His14A tampoc presenten un efecte tòxic important, ja que per a totes les seves mostres assajades el % de supervivència després del tractament supera el 90%.



**Figura 48. Viabilitat cel·lular en cultius neuronals SH-SY5Y tractats amb el peptid A $\beta$ (1-28).** Els diferents temps corresponen a diferents temps d'incubació de cada peptid a 37°C per tal de simular els diferents estadis d'agregació assolits durant la cinètica de formació de fibres estudiada per fluorescència amb ThT per al peptid A $\beta$ (1-28) i els seus mutants (Figura 39). La concentració de peptid va ser 50  $\mu$ M. Control 1: cèl·lules sense tractar; control 2: cèl·lules tractades amb tampó Tris; control 3: cèl·lules tractades amb tampó Tris i heparina.

En canvi, totes les mostres de PrP(185-208) estudiades provoquen aproximadament un 20% de mortalitat cel·lular (Figura 49). El mutant His187A també té un efecte citotòxic, tot i que és menor que el del fragment priònic wild type. L'efecte citotòxic que presenten les dues seqüències polipeptídiques és independentment de la presència o absència d'heparina i de l'estat d'agregació que presenti la mostra, ja que per a totes les mostres s'observa un % de supervivència molt similar.



**Figura 49. Supervivència cel·lular en cultius neuronals SH-SY5Y tractats amb el pèptid PrP(187-208).** Els diferents temps corresponen a diferents temps d'incubació de cada pèptid a 37°C per tal de simular els diferents estadis d'agregació assolits durant la cinètica de formació de fibres estudiada per fluorescència amb ThT per al pèptid PrP(187-208) i el seu mutant (Figura 43). La concentració de pèptid va ser de 50 µM. Control 1: cèl·lules sense tractar; control 2: cèl·lules tractades amb tampó Tris; control 3: cèl·lules tractades amb tampó Tris i heparina.

*IV.3.- L'estudi de la influència dels dendrímers en el procés d'agregació*





Els resultats mostrats fins aquí posen de manifest una sèrie de característiques comunes per als dos fragments peptídics estudiats com poden ser la formació d'agregats i fibres amiloides rics en estructura  $\beta$  i la unió de la sonda fluorescent ThT. A més, els dos pèptids presenten una cinètica d'agregació sigmoïdal, la qual cosa indica que el procés de formació de les fibres segueix un mecanisme de polimerització nucleada. El fet de que ambdós pèptids presentin mecanismes comuns d'agregació és important ja que pot permetre el desenvolupament i el disseny de fàrmacs que puguin actuar en diferents punts del procés d'agregació. En aquest sentit, es va plantejar avaluar l'efecte dels dendrímers en la cinètica d'agregació del pèptid  $A\beta(1-28)$  i el fragment prionic PrP(185-208), ja que a la literatura es descriu la capacitat d'aquestes substàncies per interferir en l'agregació de la proteïna prionica i d'infectar les cèl·lules [60, 117-120].

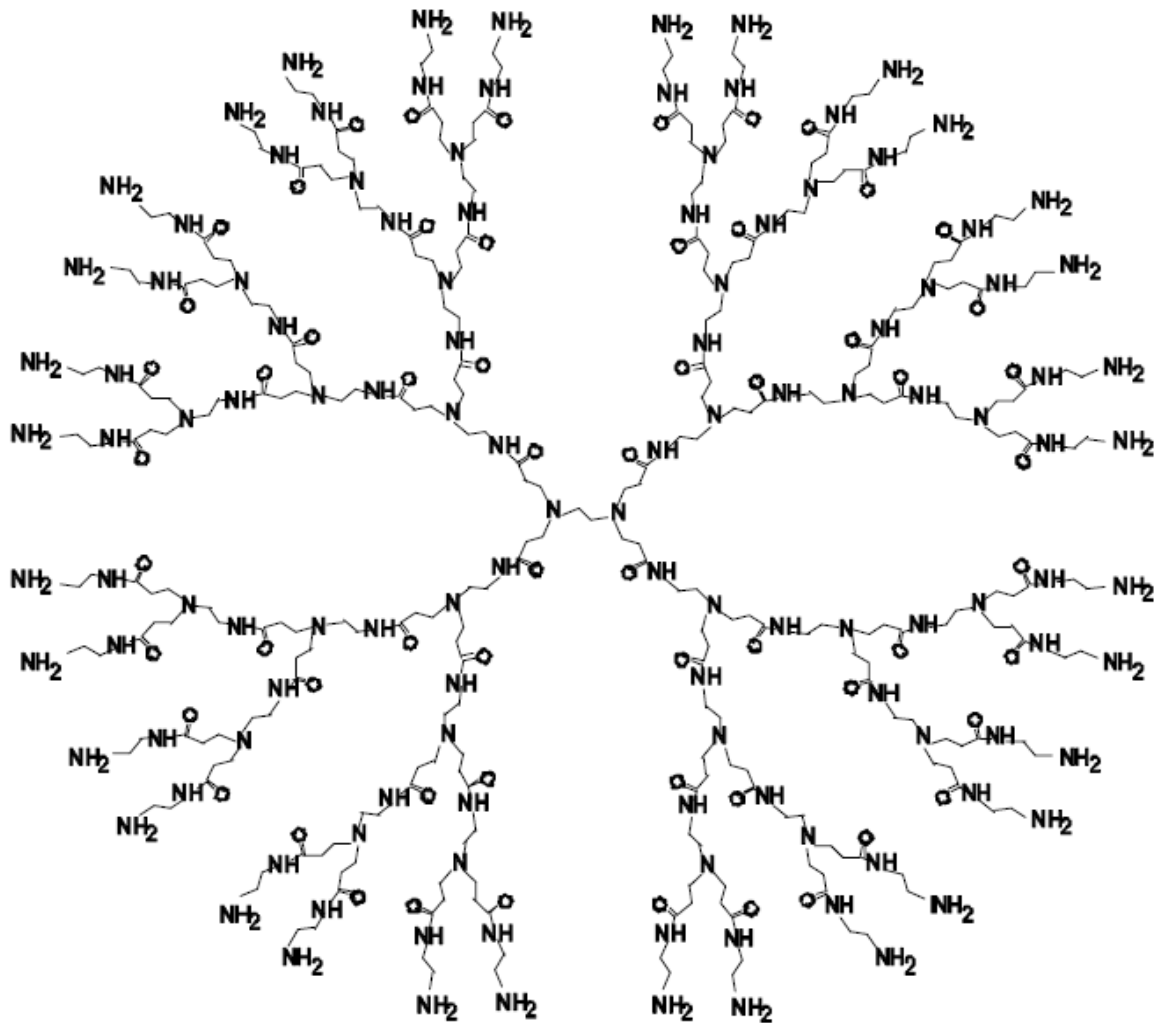


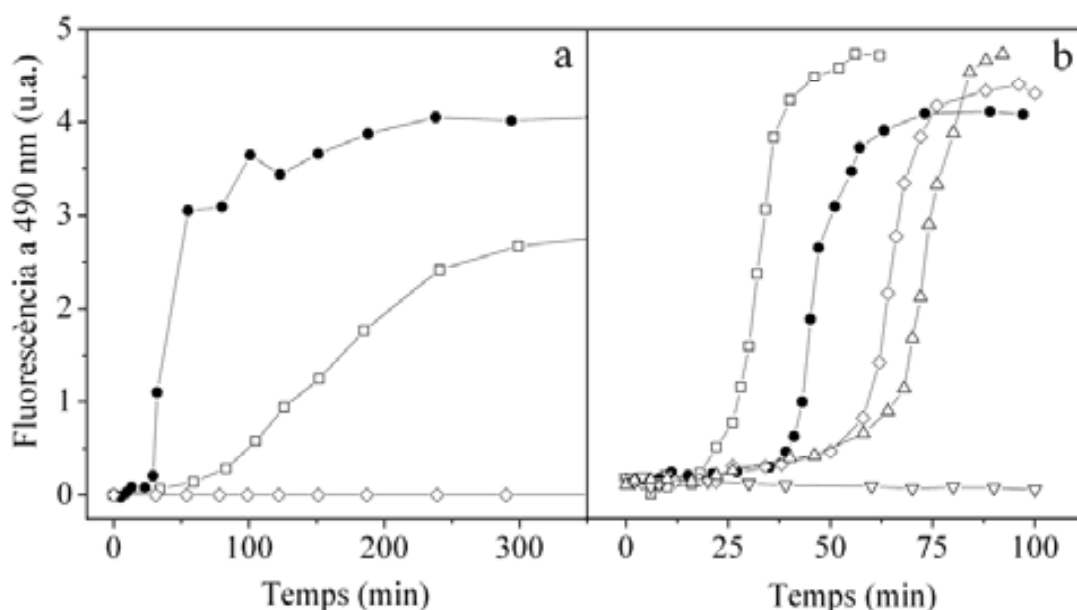
Figura 50. Estructura de la tercera generació del dendrímer PAMAM.

**IV.3.1.- Efecte dels dendrímers de poliamidoamina (PAMAM) en l'agregació dels pèptids amiloidogènics A $\beta$ (1-28) i PrP(185-208)**

**IV.3.1.1- Cinètiques d'agregació en presència dels dendrímers PAMAM i efecte de la seva concentració**

Per tal de comprovar si la presència de dendrímers interfereix en el procés de formació de fibres, es va escollir la tercera generació de dendrímers de tipus PAMAM, els qual tenen 32 grups amino a la seva superfície (Figura 50).

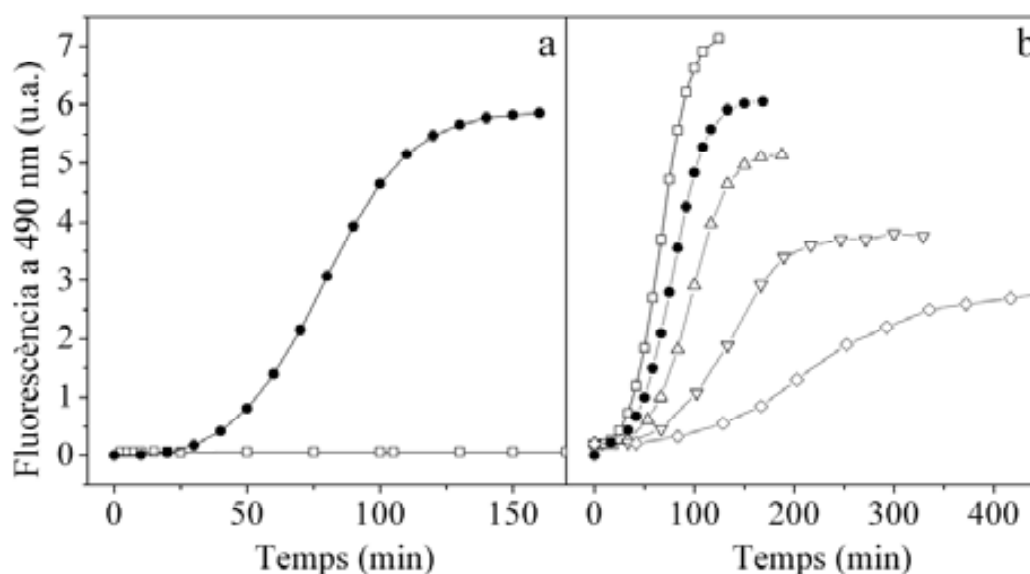
La Figura 51a mostra la variació de fluorescència de la ThT per al pèptid A $\beta$ (1-28) a pH 5.5. Tal i com es va veure a l'apartat IV.2.1.- *Cinètica d'agregació a baixa concentració del pèptid A $\beta$ (1-28)*, aquest pèptid presenta una cinètica d'agregació sigmoïdal, característica d'un procés de polimerització nucleada. En presència d'heparina, aquesta cinètica és més ràpida, escurçant la seva fase de nucleació. Per altra banda, la presència del dendrímer PAMAM (5  $\mu$ M) impedeix la formació de fibres amiloides en aquesta escala de temps.



**Figura 51. Cinètica d'agregació a pH 5.5 del pèptid A $\beta$ (1-28) al llarg del temps.** La concentració final de pèptid va ser 50  $\mu$ M i la temperatura de 37°C. La concentració final de ThT va ser de 35  $\mu$ M. (a) Capacitat amiloidogènica del pèptid A $\beta$ (1-28): (-□-) en tampó Tris 10 mM, (-●-) en presència d'heparina, (-◇-) en presència de 5  $\mu$ M de dendrímer. (b) Efecte de la concentració de dendrímer a la cinètica d'agregació del pèptid A $\beta$ (1-28) en presència d'heparina: (-□-) 0.001  $\mu$ M, (-●-) 0  $\mu$ M (control), (-◇-) 0.1  $\mu$ M, (-△-) 1  $\mu$ M, (-▽-) 5  $\mu$ M.

Per tal de poder comprovar l'efecte de la concentració dels dendrímers sobre el procés d'agregació dels pèptids A $\beta$ (1-28) i PrP(185-208), els experiments es van dur a terme en presència d'heparina, ja que aquest últim fragment peptídic només agrega en presència d'aquest GAG. Els resultats obtinguts es mostren a la Figura 51b. La variació de la fluorescència observada revela que la cinètica d'agregació està accelerada a concentracions baixes de dendrímer (0.001  $\mu$ M), mentre que concentracions elevades de dendrímer en el medi (0.1, 1 i 5  $\mu$ M) tenen un efecte alentidor del procés. Per altra banda, la intensitat final en el plateau assolit a la corba és gairebé la mateixa per a totes les concentracions de dendrímer estudiades, la qual cosa indica que la concentració de fibres formades al final del procés no és afectada per la presència de dendrímers en el medi.

De la mateixa manera que es va fer amb el pèptid A $\beta$ (1-28), es va comprovar la capacitat amiloidogènica del pèptid PrP(185-208) en presència d'heparina (Figura 52a). Tal i com es va veure a l'apartat IV.2.3.- *Cinètica d'agregació a baixa concentració del pèptid PrP(185-208)*, aquest pèptid en aquesta escala de temps només agrega si hi ha heparina en el medi. En aquestes condicions, doncs, es va estudiar l'efecte del dendrímer en la cinètica d'agregació. Els resultats es mostren a la Figura 52b.

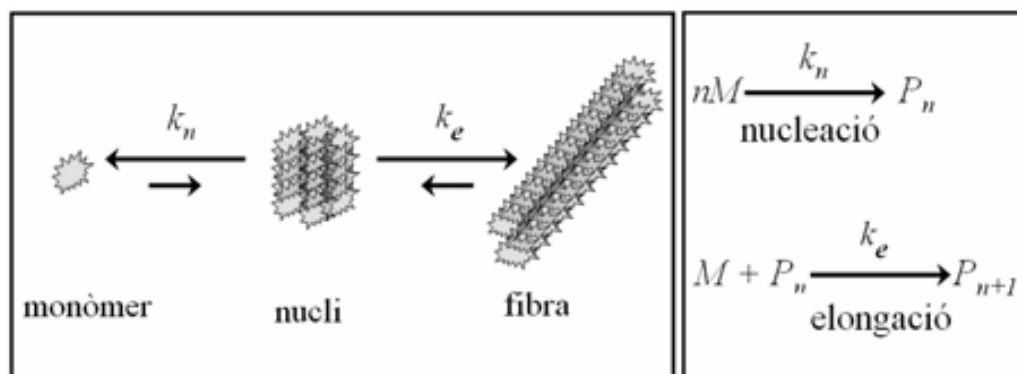


**Figura 52. Cinètica d'agregació a pH 5.5 del pèptid PrP(185-208) al llarg del temps.** La concentració final de pèptid va ser 50  $\mu$ M i la temperatura de 37°C. La concentració final de ThT va ser de 35  $\mu$ M. (a) Capacitat amiloidogènica del pèptid PrP(185-208): (-□-) en tampó Tris 10 mM, (-●-) en presència d'heparina. (b) Efecte de la concentració de dendrímer a la cinètica d'agregació del pèptid PrP(185-208) en presència d'heparina: (-□-) 0.01  $\mu$ M, (-●-) 0  $\mu$ M (control), (-△-) 0.15  $\mu$ M, (-▽-) 0.25  $\mu$ M, (-◇-) 1  $\mu$ M.

De la mateixa manera que passa amb el pèptid A $\beta$ (1-28), la concentració baixa de dendrímer (0.01  $\mu$ M) accelera la cinètica d'agregació mentre que les concentracions més elevades de dendrímer (0.15, 0.25 i 1  $\mu$ M) tenen un efecte alentidor del procés. En aquest cas, però, la presència del dendrímer en el medi afecta a la concentració final de fibres formades, ja que a mida que augmenta la concentració de dendrímer en el medi, disminueix el valor de la intensitat en el plateau assolit al final de cada cinètica d'agregació.

#### **IV.3.1.2- Ajustament matemàtic de les cinètiques d'agregació realitzades en presència dels dendrímers PAMAM**

Per tal d'analitzar les dades cinètiques en termes d'un mecanisme de polimerització dependent de nucleació, es va fer servir un model matemàtic descrit per R. Sabaté et al. [172]. Aquest model considera la formació de fibres amiloides com un procés autocatalític amb una etapa de nucleació seguida d'una segona etapa d'elongació, amb les seves respectives constants cinètiques,  $k_n$  i  $k_e$  (Figura 53).



**Figura 53.** Esquema del model autocatalític proposat per R. Sabaté et al. [172] per al procés d'agregació del pèptid A $\beta$ . El model considera dues etapes: la nucleació i l'elongació, cadascuna amb les seves respectives constants cinètiques. M indica pèptid monomèric i P $_n$  indica pèptid polimèric. Modificat de [172].

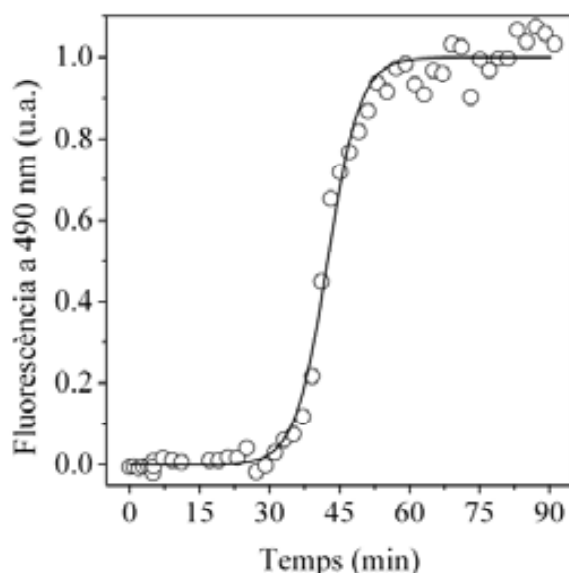
Els punts experimentals representats a les cinètiques d'agregació de les Figura 51b i Figura 52b es van ajustar a aquest model seguint la següent equació:

$$f = (\rho \{ \exp[(1 + \rho)kt] - 1 \} / (1 + \rho \exp[(1 + \rho)kt])) \quad \text{(equació 6)}$$

on  $f$  és la fracció fibril·lar,  $k = k_e a$ , essent  $a$  la concentració inicial de pèptid, i  $\rho = k_n / k$ .

Per fer aquest ajustament matemàtic, els punts experimentals de fluorescència van ser transformades en fracció fibril·lar, considerant  $f = 0$  quan  $t = 0$  i  $f = 1$  en el plateau de cada corba sigmoïdal.

A la Figura 54 es mostra l'ajustament matemàtic fet amb els punts experimentals de la cinètica d'agregació del pèptid A $\beta$ (1-28) en presència d'heparina. Es va fer aquest mateix ajustament amb les cinètiques d'agregació estudiades a diferents concentració de dendrímer. Les constants cinètiques que es deriven d'aquest ajustament es mostren a la Taula 9.



**Figura 54.** Anàlisi cinètic del procés d'agregació del pèptid A $\beta$ (1-28) en presència d'heparina. La línia contínua correspon a l'ajustament matemàtic amb l'equació 6, dels punts experimentals de la variació de fluorescència de la ThT al llarg del temps per al pèptid A $\beta$ (1-28) a 50  $\mu$ M i heparina 0.0416 mg/ml, a pH 5.5 (Figura 51a). Els punts experimentals de la variació de fluorescència van ser transformats en fracció fibril·lar.

**Taula 9.** Constants de nucleació i elongació calculades amb l'ajustament matemàtic dels punts experimentals mostrats a les Figura 51b i Figura 52b.

	Dendrímer ( $\mu$ M)	$k_n$ ( $s^{-1}$ )	$k_e$ ( $L mol^{-1} s^{-1}$ )
PrP(185-211)	0	$5.7 \cdot 10^{-6}$	22.2
	0.001	$2.5 \cdot 10^{-5}$	22.2
	0.01	$1.1 \cdot 10^{-5}$	22.6
	0.05	$1 \cdot 10^{-5}$	23.4
	0.15	$5.3 \cdot 10^{-6}$	17.2
	0.25	$5.4 \cdot 10^{-6}$	11
	1	$5.2 \cdot 10^{-6}$	5.6
A $\beta$ (1-28)	0	$2.1 \cdot 10^{-8}$	97
	0.001	$2.2 \cdot 10^{-6}$	98
	0.01	$7.3 \cdot 10^{-10}$	80
	1	$6.5 \cdot 10^{-10}$	70

Els paràmetres  $\rho$  i  $k$ , derivats de l'equació  $f = (\rho \{ \exp [(1 + \rho)kt] - 1 \}) / (1 + \rho \exp [(1 + \rho)kt])$  es van utilitzar per calcular les constants cinètiques de tal manera que  $k_n = \rho k$  i  $k_e = k/a$  ( $a$  = concentració inicial de pèptid). Les unitats de les constants es mostren segons R. Sabaté et al. [172].

D'acord amb aquesta taula, les concentracions baixes de dendrímer afecten a la constant de nucleació. Aquest efecte és clarament significatiu per al pèptid A $\beta$ (1-28): la presència del dendrímer a 0.001  $\mu$ M augmenta la constant de nucleació en dos ordres de magnitud. En el cas del pèptid PrP(185-208), tot i que l'efecte sobre la  $k_n$  és menor, la concentració de 0.001  $\mu$ M de dendrímer augmenta la  $k_n$  4 vegades. Per altra banda, concentracions per sobre de 0.1  $\mu$ M de dendrímer fan disminuir la constant d'elongació,  $k_e$ . Aquest efecte és major per al fragment prionic que per al fragment derivat del pèptid A $\beta$ .

### **IV.3.2.- Efecte dels dendrímers PAMAM en l'agregació dels pèptids amiloidogènics A $\beta$ (1-28) i PrP(185-208), segons la generació de dendrímer**

Com ja s'ha comentat anteriorment, els dendrímers han estat identificats com a possibles agents anti-prions [60, 117, 119, 120]. En aquest sentit, es va voler estudiar com l'estructura i el tamany del dendrímer poden afectar al procés d'agregació dels dos pèptids amiloidogènics d'aquest treball. Els dendrímers es sintetitzen de manera cíclica des d'un nucli o cor central que és rodejat per capes ramificades. Cadascuna d'aquestes capes s'anomena generació, de manera que a mesura que augmenta el número de generacions, augmenta també el tamany del dendrímer i el número de grups carregats a la seva superfície.

En aquest treball es va estudiar l'efecte de les generacions 3<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup> i 5<sup>a</sup> dels dendrímers de tipus PAMAM (Taula 6) en les cinètiques d'agregació dels pèptids A $\beta$ (1-28) i PrP(185-208), realitzades per fluorescència amb la sonda ThT. La Figura 55 mostra les cinètiques d'agregació, estudiades en presència de la sonda fluorescent ThT, dels pèptids A $\beta$ (1-28) i PrP(185-208) i de concentracions creixents de les tres generacions de dendrímers. Aquestes corbes van ser ajustades al model autocatalític proposat per R. Sabaté et al. [172] i explicat a l'apartat anterior. Les constants cinètiques que es deriven d'aquest ajustament matemàtic es presenten a la Taula 10.

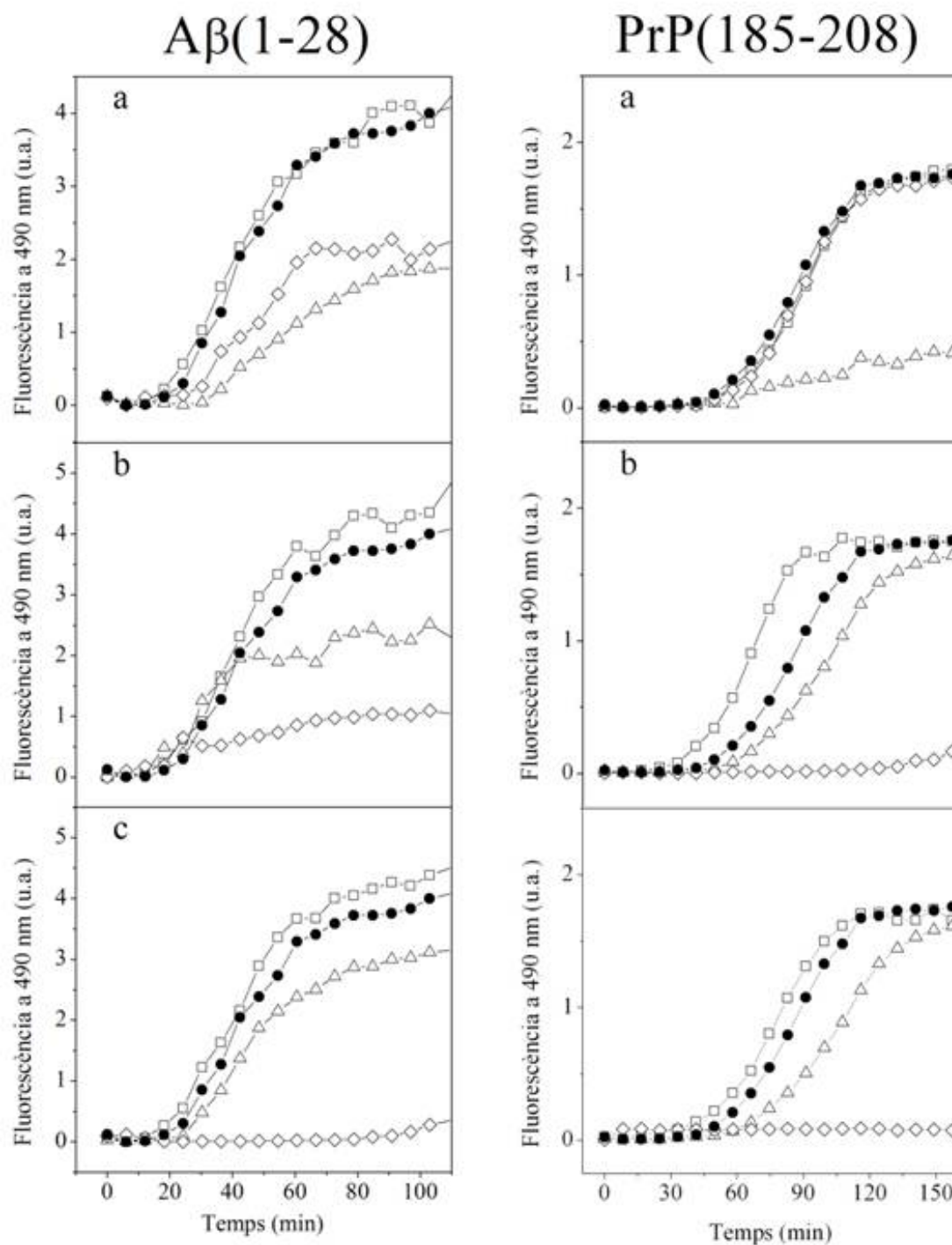


Figura 55. Cinètica d'agregació en presència de dendrímers de tipus PAMAM-G3 (a), PAMAM-G4 (b), PAMAM-G5 (c). La concentració final de pèptid va ser 50  $\mu\text{M}$  i la temperatura de 37°C. La concentració final de ThT va ser de 35  $\mu\text{M}$ . (-●-) 0  $\mu\text{M}$  (control), (-□-) 0.01 $\mu\text{M}$ , (-△-) 0.1  $\mu\text{M}$ , (-◇-) 1  $\mu\text{M}$ .



**Taula 10. Constants de nucleació i elongació calculades amb l'ajustament matemàtic dels punts experimentals mostrats a la Figura 55.**

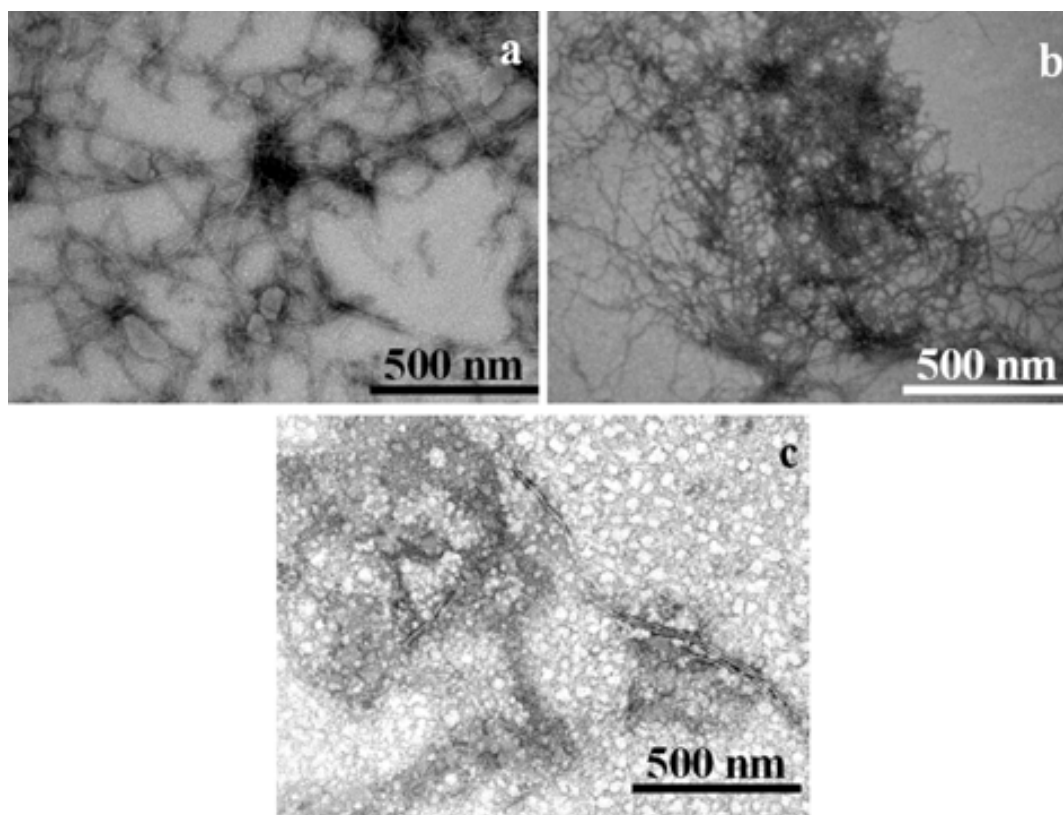
	Generació	Dendrimer (µM)	$k_n$ (s <sup>-1</sup> )	$k_e$ (L mol <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	
Prp(185-208)		0	$1.6 \cdot 10^{-6}$	26.2	
	G3	0.01	$1.4 \cdot 10^{-6}$	25.1	
		0.1	$8.6 \cdot 10^{-7}$	27.8	
		1	--	--	
	G4	0.01	$3.3 \cdot 10^{-6}$	31.2	
		0.1	$1.2 \cdot 10^{-6}$	22.8	
		1	--	--	
	G5	0.01	$3.3 \cdot 10^{-6}$	25.9	
		0.1	$1.0 \cdot 10^{-6}$	22.5	
		1	--	--	
	Aβ(1-28)		0	$3.9 \cdot 10^{-5}$	23.3
		G3	0.01	$5.6 \cdot 10^{-5}$	20.7
0.1			$1.3 \cdot 10^{-5}$	24.9	
1			$1.7 \cdot 10^{-5}$	29.9	
G4		0.01	$1.0 \cdot 10^{-4}$	18.6	
		0.1	$2.1 \cdot 10^{-4}$	20.8	
		1	--	--	
G5		0.01	$7.8 \cdot 10^{-5}$	23.8	
		0.1	$5.9 \cdot 10^{-5}$	22.5	
		1	--	--	

Els paràmetres  $\rho$  i  $k$ , derivats de l'equació  $f = (\rho \{ \exp [(1 + \rho)kt] - 1 \} / (1 + \rho \exp [(1 + \rho)kt] )$  es van utilitzar per calcular les constants cinètiques de tal manera que  $k_n = \rho k$  i  $k_e = k/a$  ( $a$  = concentració inicial de pèptid). Les unitats de les constants es mostren segons R. Sabaté et al. [172].

En el cas del pèptid Aβ(1-28) la presència dels dendrímers PAMAM gairebé no afecta a la constant de nucleació,  $k_n$ , i, per tant, no fa variar significativament la durada d'aquesta. La concentració baixa de dendrímer (0.01 µM) gairebé no afecta a la velocitat d'agregació, ja que el pendent de la part exponencial de la corba és pràcticament igual que el del control en absència de dendrímer. Per altra banda, la presència de PAMAM-G3 disminueix la constant d'elongació,  $k_e$ , quan és present en el medi a concentració 0.1 µM o 1 µM i redueix significativament la quantitat final de fibres formades (Figura 55a). Per aquestes mateixes concentracions de dendrímer, l'efecte de PAMAM-G4 i PAMAM-G5 en la fase d'elongació és molt més evident que en el cas del dendrímer PAMAM-G3, tot i que la concentració d'1 µM de PAMAM-G4 i de PAMAM-G5 inhibeix completament la formació de fibres amiloides durant l'interval de temps estudiat (Figura 55b,c). A mida que disminueix la generació del dendrímer, major és la influència d'aquest en la  $k_e$  i, per tant, en la fase d'elongació de la cinètica d'agregació del pèptid Aβ(1-28). Aquest efecte, però, és menys pronunciat per a generacions majors (G4 i G5). En general, per a les tres generacions estudiades, hi ha una disminució en la quantitat final de fibres formades a mida que augmenta la concentració de dendrímer en el medi.

En el cas del fragment prioníic PrP(185-208) la fase de nucleació dura gairebé el doble que en el cas del pèptid A $\beta$ (1-28). La concentració de 0.01  $\mu$ M i de 0.1  $\mu$ M de PAMAM-G3 no té cap efecte sobre la velocitat d'agregació del pèptid ni sobre la quantitat de fibres formades al final del temps mesurat. Quan el medi conté 0.01  $\mu$ M de PAMAM-G4 o PAMAM-G5, la  $k_n$  disminueix i el procés d'agregació sembla estar accelerat respecte el control, tot i que la variació en el pendent de la corba és petit. Per altra banda, la concentració de 0.1  $\mu$ M de PAMAM-G4 o PAMAM-G5 alenteix el procés. En general i per a les tres generacions estudiades, quan la concentració de PAMAM és d'1  $\mu$ M, l'agregació del pèptid Prp(185-208) està totalment inhibida durant l'interval de temps estudiat (Figura 55).

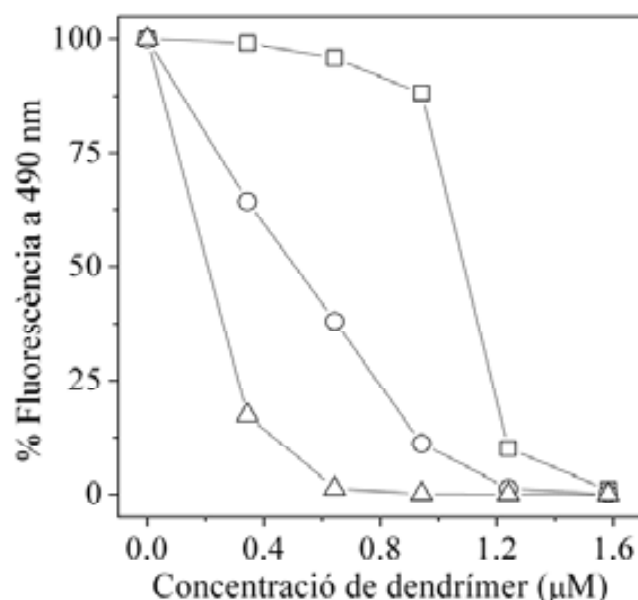
Per tal de completar els resultats dels experiments de fluorescència amb la sonda ThT, es va analitzar la morfologia de les mostres al final de la cinètica per microscòpia electrònica. La Figura 56 mostra les típiques fibres amiloides sense ramificar observades en la mostra control del fragment prioníic PrP(185-208). En presència de PAMAM-G3 les fibres no tenen una forma tan recta com el control, sinó que són més amorfes, i a més, s'organitzen en grups. En presència de PAMAM-G5 s'observa una menor quantitat de fibres.



**Figura 56. Micrografies electròniques del pèptid PrP(185-208).** Les mostres corresponen al temps final de la cinètica d'agregació per fluorescència amb ThT mostrada a Figura 55 i van ser preses directament de la cubeta de fluorescència. La concentració de pèptid va ser 50  $\mu$ M i la temperatura 37°C.

(a) absència de dendrímer (control), (b) 1 $\mu$ M de PAMAM-G3, (c) 1 $\mu$ M de PAMAM-G5.

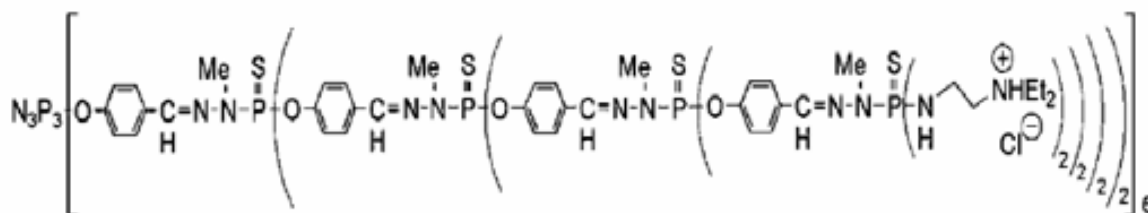
Finalment, es va avaluar la possible capacitat dels dendrímers per desagregar les fibres amiloides formades durant la cinètica. Es van afegir concentracions creixents de dendrímers a les mostres agregades i es va mesurar el canvi de fluorescència després de cada addició. Els resultats es mostren a la Figura 57. Els tres tipus de dendrímers estudiats (G3, G4 i G5) són capaços de disminuir la fluorescència a 490 nm, la qual cosa indica una desagregació de les fibres i agregats amiloides. A mida que augmenta la generació del dendrímer, menor és la concentració necessària del dendrímer per tal d'aconseguir la desagregació de les fibres. La concentració que correspon a una disminució del 50% de la fluorescència i, per tant, de la quantitat de fibres amiloides ( $C_{50}$ ) és de 0.2, 0.5 i 1.1  $\mu\text{M}$  de PAMAM-G5, PAMAM-G4 i PAMAM-G3, respectivament.



**Figura 57.** Canvi de fluorescència de la ThT durant el procés de desagregació del pèptid PrP(185-208) en presència de dendrímers. Es van afegir concentracions creixents de dendrímer directament a la cubeta de fluorescència de mostres que havien arribat al plateau de la seva corba d'agregació i es va mesurar la fluorescència després de cada addició. (-□-) G3, (-○-) G4, (-△-) G5.

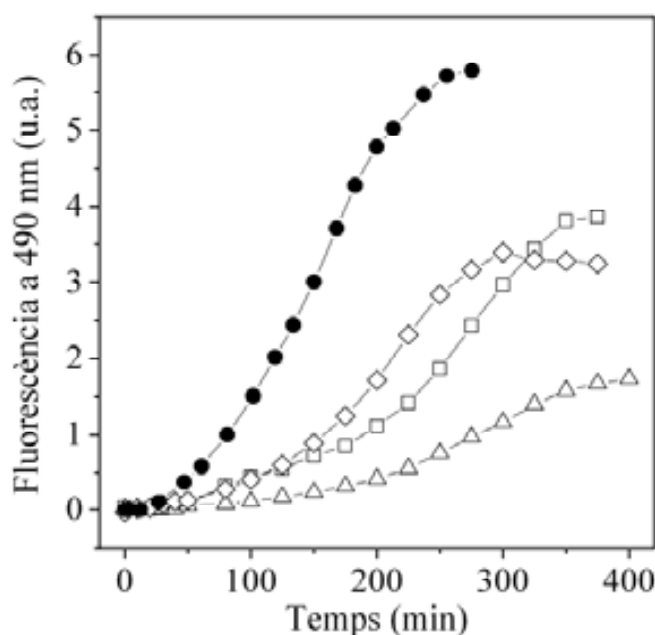
### IV.3.3.- Influència dels P-dendrímers en l'agregació del pèptid PrP(185-208)

Els dendrímers que contenen fòsfor (P-dendrímers, Figura 58) inhibeixen la formació de PrP<sup>SC</sup> en cultius cel·lulars, eliminen la PrP<sup>SC</sup> preexistent en cèl·lules infectades per prions, i la seva presència en el medi fa que les cèl·lules perdin la seva infectivitat [120]. De fet, aquest tipus de dendrímer ha estat el primer que s'ha estudiat en models animals.



**Figura 58. Estructura química del P-dendrimer.** Els P-dendrímers es caracteritzen per la presència d'enllaços amb aminotiofosfats en la seva estructura i per tenir una superfície rica en amines terciàries protonades [173].

Continuant amb l'estudi de les propietats antiprioniques dels dendrímers, en el present treball es va plantejar estudiar el procés d'agregació del pèptid PrP(185-208) en presència de la quarta generació de P-dendrimer. Així doncs, a la Figura 59 es mostra la cinètica d'agregació d'aquest pèptid prionic en presència d'heparina i diferents concentracions de P-dendrimer. La cinètica va ser estudiada mitjançant la variació de la fluorescència de la sonda ThT al llarg del temps.



**Figura 59. Cinètica d'agregació del pèptid prionic PrP(185-208) en presència de P-dendrimer.** La concentració final de pèptid va ser 50  $\mu\text{M}$  i la temperatura de 37°C. La concentració final de ThT va ser de 35  $\mu\text{M}$ . (-●-) 0  $\mu\text{M}$  (control), (-□-) 1  $\mu\text{M}$ , (-△-) 0.1  $\mu\text{M}$ , (-◇-) 0.01  $\mu\text{M}$ .

Tal i com es va veure en experiments anteriorment mostrats (apartat IV.2.3.- *Cinètica d'agregació a baixa concentració del pèptid PrP(185-208)*), el fragment prionic PrP(185-208) presenta una cinètica de formació de fibres amiloides de tipus sigmoïdal, que pot ser interpretada com un procés de polimerització nucleada. La presència de P-dendrimer en el medi origina una disminució en la quantitat final de fibres formades, ja que el plateau assolit al final de la corba presenta una menor intensitat respecte al control. La concentració d'1  $\mu\text{M}$

de dendrímer és la que més eficaçment redueix a la meitat la quantitat final de fibres formades, és a dir, quan la relació dendrímer/pèptid és de 0.02. Quan aquesta relació és 10 vegades major o 10 vegades menor, la quantitat final de fibres formades també es redueix considerablement, però a una velocitat més lenta.

Aquests resultats sobre les cinètiques de formació de fibres es van analitzar en termes del model de polimerització nucleada explicat anteriorment a l'apartat IV.3.1.2- *Ajustament matemàtic de les cinètiques d'agregació realitzades en presència dels dendrímers PAMAM*. A partir de l'ajustament matemàtic de les dades experimentals mostrades a la Figura 59 es van deduir les constants cinètiques  $k_n$  i  $k_e$ , corresponents als processos de nucleació i elongació respectivament. Aquestes constants estan resumides a la Taula 11.

**Taula 11. Constants de nucleació i elongació calculades amb l'ajustament matemàtic dels punts experimentals mostrats a la Figura 59.**

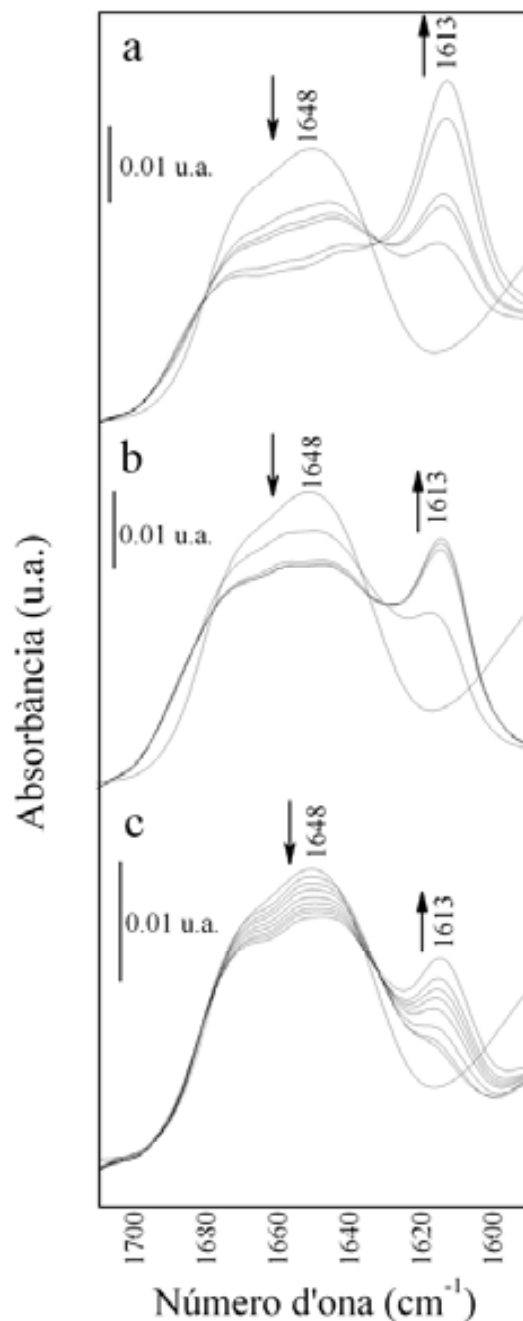
Dendrímer ( $\mu\text{M}$ )	$k_n$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_e$ ( $\text{L mol}^{-1} \text{s}^{-1}$ )
0 (control)	$9.5 \cdot 10^{-6}$	8.8
0.01	$3.5 \cdot 10^{-6}$	8.8
0.1	$1.9 \cdot 10^{-6}$	6.6
1	$3.0 \cdot 10^{-6}$	6.4

Els paràmetres  $\rho$  i  $k$ , derivats de l'equació  $f = (\rho \{ \exp [(1 + \rho)kt] - 1 \} / (1 + \rho \exp [(1 + \rho)kt] )$  es van utilitzar per calcular les constants cinètiques de tal manera que  $k_n = \rho k$  i  $k_e = k/a$  ( $a$  = concentració inicial de pèptid). Les unitats de les constants es mostren segons R. Sabaté et al. [172].

L'addició de P-dendrímer al medi provoca una disminució en les constants de nucleació i d'elongació. Aquest efecte, però, és major en el procés de nucleació, aconseguint la màxima disminució quan la relació dendrímer/pèptid és de 0.02, és a dir, que quan la concentració de dendrímer és 0.1  $\mu\text{M}$  la constant de nucleació disminueix 5 vegades respecte el control. Per altra banda, la disminució en la constant d'elongació depenent de la concentració de dendrímer en el medi.

Per estudiar els canvis estructurals del fragment priònic PrP(185-208) induïts per la presència de P-dendrímer en el medi es van adquirir espectres d'IR al llarg del temps i en presència d'heparina. Per a cada concentració de P-dendrímer estudiada (2 i 20  $\mu\text{M}$ ) es va mantenir la mateixa relació dendrímer/pèptid que en els experiments realitzats per fluorescència de la sonda ThT (Figura 59) i es va seguir el procés d'agregació en aquestes condicions a través de la relació d'absorbàncies de les bandes a  $1613 \text{ cm}^{-1}$  (estructura  $\beta$  agregada) i a  $1648 \text{ cm}^{-1}$  (mescla d'estructures desordenada i  $\alpha$ -hèlix). La seqüència

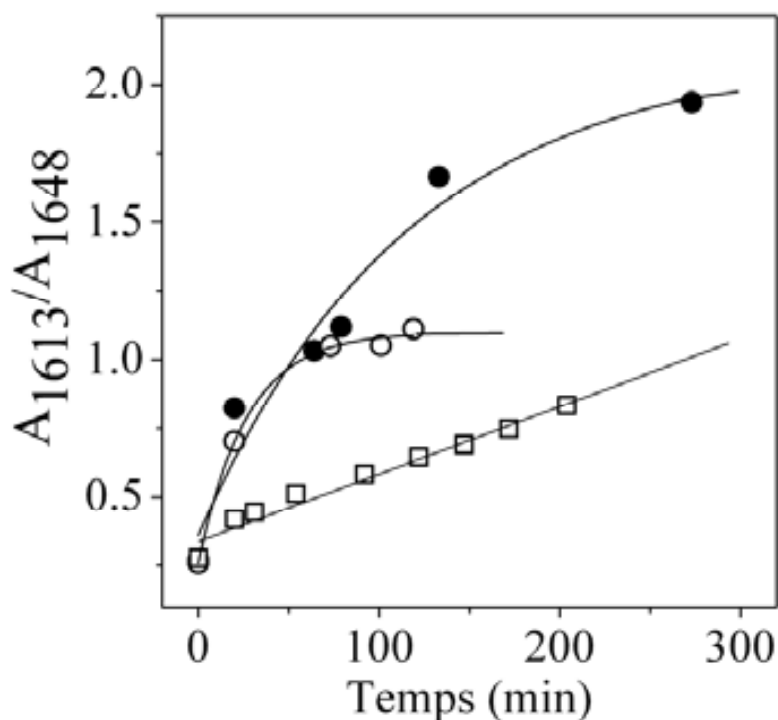
d'espectres d'IR per a cada concentració de P-dendrimer es mostra a la Figura 60. Tal i com es pot observar, aquestes dues bandes són presents tant en absència com en presència de P-dendrimer, amb la diferència que la banda característica a estructures  $\beta$  agregades augmenta a diferent velocitat, depenent de la concentració de dendrimer present.



**Figura 60. Canvis en l'estructura secundària del pèptid PrP en tampó Hepes/D<sub>2</sub>O 10 mM i heparina 1mg/ml al llarg del temps, mesurats per FTIR.** Es van adquirir espectres seqüencials cada minut i durant un temps total aproximat de 20 hores, fins que ja no es van observar canvis significatius en l'estructura secundària. A tots els espectres es va restar la contribució del tampó. La temperatura va ser 37°C. La concentració final va ser 1.2 mM. Les fletxes indiquen regions de l'espectre on la intensitat augmenta (↑) o disminueix (↓).

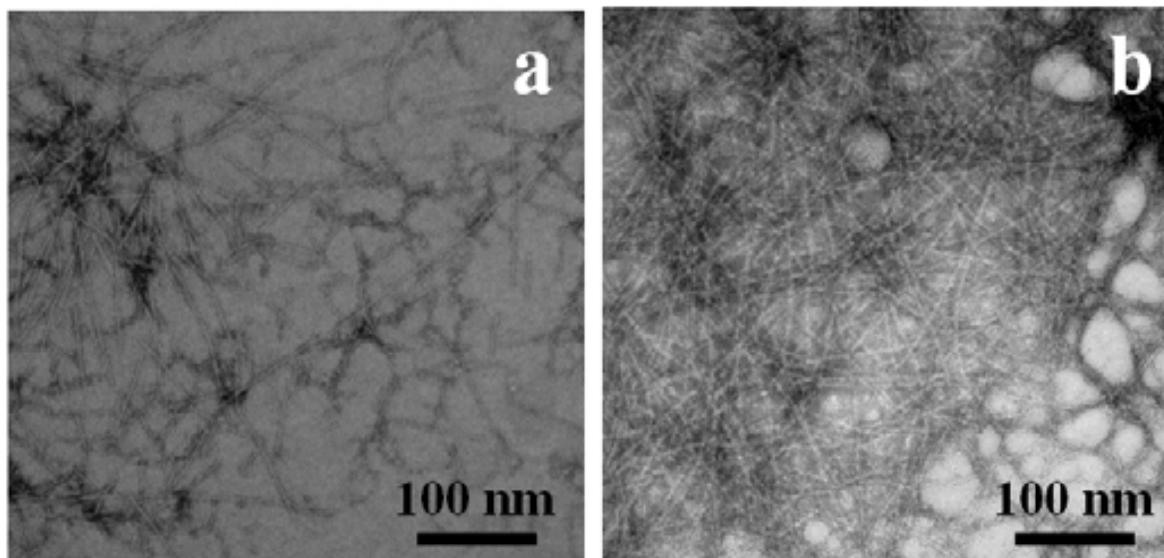
(a) 0  $\mu$ M de dendrimer (control), (b) 20  $\mu$ M de dendrimer (relació dendrimer/pèptid 0.02), (c) 2  $\mu$ M de dendrimer (relació dendrimer/pèptid 0.002).

Aquest fet queda palès a la Figura 61, on es mostra la representació gràfica de la relació d'intensitats a  $1613\text{ cm}^{-1}$  i  $1648\text{ cm}^{-1}$  obtingudes a partir de l'adquisició d'espectres de FTIR per al pèptid PrP(185-208) en funció del temps. D'aquesta figura es desprèn el fet de que per espectroscòpia d'IR no ha estat possible mesurar una fase de nucleació, a diferència dels experiments realitzats per fluorescència, on la concentració de pèptid és molt menor ( $50\text{ }\mu\text{M}$ ). Tot i així, s'observa que quan la relació dendrímer/pèptid és de 0.002, el procés d'agregació s'alenteix notablement. Per altra banda, una relació dendrímer/pèptid 10 vegades major (relació dendrímer/pèptid 0.02) l'accelera, tot i que el plateau assolit té menor intensitat, indicant la formació d'una menor quantitat de fibres i agregats amiloides, en comparació al control en absència de P-dendrímer. Aquests resultats estan en concordància amb els obtinguts per espectroscòpia de fluorescència.



**Figura 61.** Representació de la relació d'intensitats a  $1613\text{ cm}^{-1}$  i  $1648\text{ cm}^{-1}$  obtingudes a partir de l'adquisició d'espectres de FTIR per al pèptid PrP(185-208) en funció del temps. (-●-) 0  $\mu\text{M}$  de dendrímer (control), (-○-) 20  $\mu\text{M}$  de dendrímer (relació dendrímer/pèptid 0.02), (-□-) 2  $\mu\text{M}$  de dendrímer (relació dendrímer/pèptid 0.002).

Finalment, la morfologia dels agregats i fibres formades al final de les cinètiques d'agregació estudiades per fluorescència de la sonda ThT es va analitzar per microscòpia electrònica de transmissió. Com es pot comprovar a la Figura 62 en tots els casos s'observen les típiques fibres amiloides sense ramificar, la qual cosa significa que la presència de P-dendrímer en el medi no afecta a la morfologia de les fibres formades, sinó que només afecta a la quantitat final formada. Les micrografies electròniques no revelen presència d'altres tipus d'agregats proteics, com per exemple agregats amorfs.



**Figura 62. Micrografies electròniques del pèptid PrP(185-208).** Les mostres corresponen al temps final de la cinètica d'agregació per fluorescència amb ThT mostrada a la Figura 59 i van ser preses directament de la cubeta de fluorescència. La concentració de pèptid va ser 50  $\mu\text{M}$  i la temperatura 37°C. (a) absència de dendrímer (control), (b) 0.01  $\mu\text{M}$  de dendrímer.





*IV.4.- L'estudi de la influència de la composició lipídica de membranes model  
en el procés d'agregació*



Com ja es va comentar a la Introducció, a la literatura científica hom pot trobar treballs en què s'il·lustra el fet què les membranes biològiques afecten la cinètica d'agregació de les proteïnes i pèptids amiloidogènics, depenent de la seva composició lipídica [174, 175] i de la seva càrrega elèctrica neta [135]. Per altra banda, també hi ha evidències de què els processos de formació de fibres es localitzen en els microdominis específics de membrana, rics en esfingolípids i colesterol, coneguts amb el nom de rafts lipídics, de tal manera que aquests elements en poden resultar moduladors de l'agregació [133].

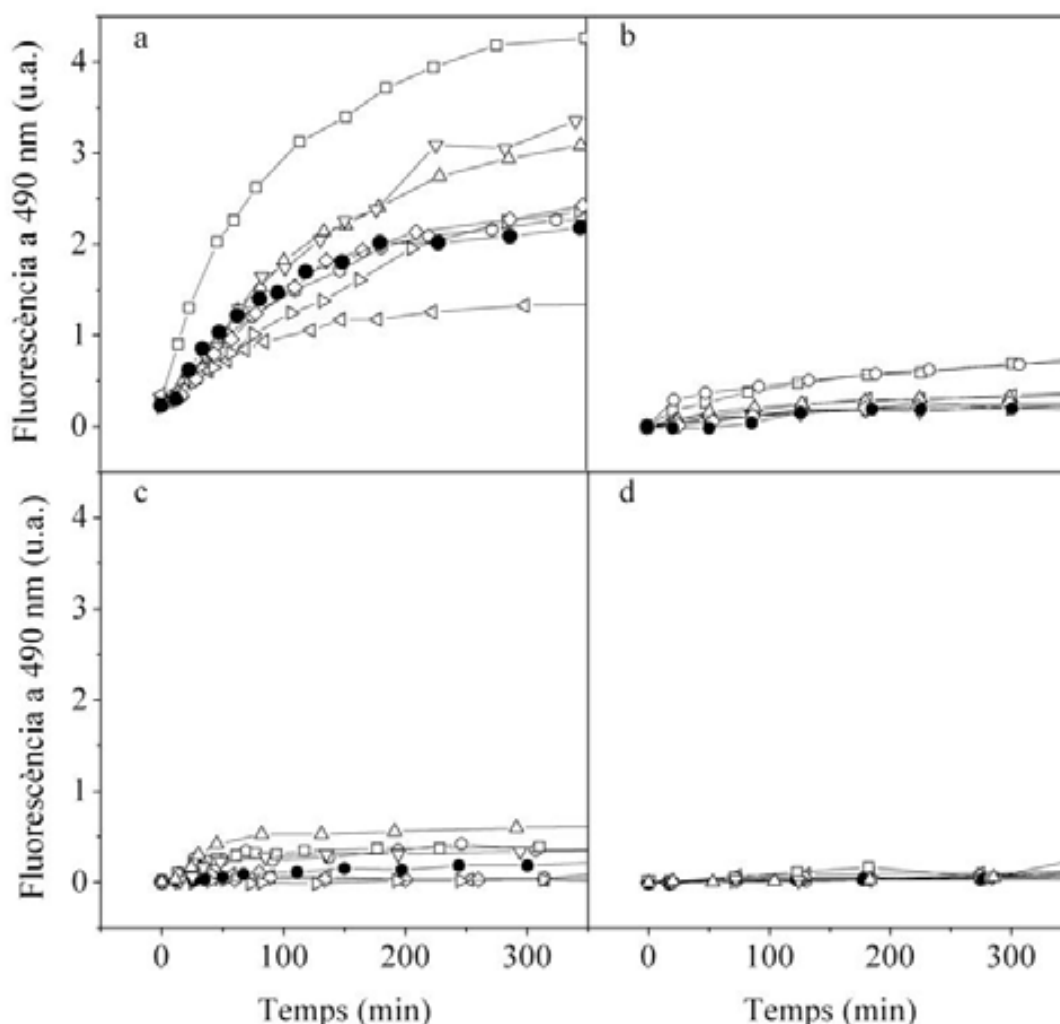
En aquest sentit l'elucidació de la relació existent entre els mecanismes d'agregació i dipòsit de les proteïnes i pèptids amiloidogènics en els dominis lipídics de les membranes cel·lulars i el possible efecte inductiu d'aquestes interaccions pot donar noves pistes sobre els mecanismes que desencadenen les patologies. Així doncs, en el present treball s'ha estudiat la cinètica d'agregació del pèptid A $\beta$ (1-28) i del fragment priònic PrP(185-208) en presència de membranes model de diferent composició lipídica i de diferent càrrega elèctrica.

Per altra banda, i com ja s'ha comentat anteriorment, R. Mahfoud et al [101] proposen un motiu d'unió a esfingolípids, comú al pèptid A $\beta$  i la proteïna priònica humana PrP i que conté residus de Tyr i/o Phe, els quals participen en la unió als anells de sucre de carbohidrats complexes. A més, aquests residus poden ser essencials per al reconeixement de la galactosilceramida. En el present treball es van fer servir seqüències mutades en aquestes posicions per tal d'estudiar el seu efecte en les cinètiques d'agregació en presència de membranes model.

**IV.4.1.- Efecte dels lípids sense càrrega neta en la cinètica d'agregació del pèptid A $\beta$ (1-28)**

**IV.4.1.1.- Cinètica d'agregació del pèptid A $\beta$ (1-28) a baixa concentració peptídica**

Seguint el mateix procediment que a l'apartat III.2.2.2.- *Cinètiques d'agregació amb Tioflavina T (ThT)*, es va estudiar la cinètica d'agregació del pèptid A $\beta$ (1-28) mitjançant l'augment de fluorescència d'aquesta sonda al llarg del temps, a baixa concentració de pèptid (és a dir, 50  $\mu$ M) i en presència i absència de membranes model (liposomes) de diferent composició lipídica. La concentració de liposomes estudiada va ser 300  $\mu$ M, de tal manera que la relació pèptid/lípid va ser 0.16.



**Figura 63. Cinètica d'agregació del pèptid A $\beta$ (1-28) en presència de membranes model.** La concentració final de pèptid va ser 50  $\mu$ M i la concentració final de ThT va ser de 35  $\mu$ M. La temperatura va ser de 37°C. La concentració final de liposomes va ser de 300  $\mu$ M i la seva composició exacta s'especifica a la Taula 7. A $\beta$ (1-28) wild type a pH 5.5 (a) i pH 7.5 (b), A $\beta$ (1-28)Y10A a pH 5.5 (c) i pH 7.5 (d). (-●-) control (absència de liposomes), (-□-) extracte de cervell, (-○-) PC, (-◁-) PCChol, (-▷-) PCGalCer, (-◇-) PCSM, (-△-) PCCholSMGalCer, (-▽-) PCGalCerSM.

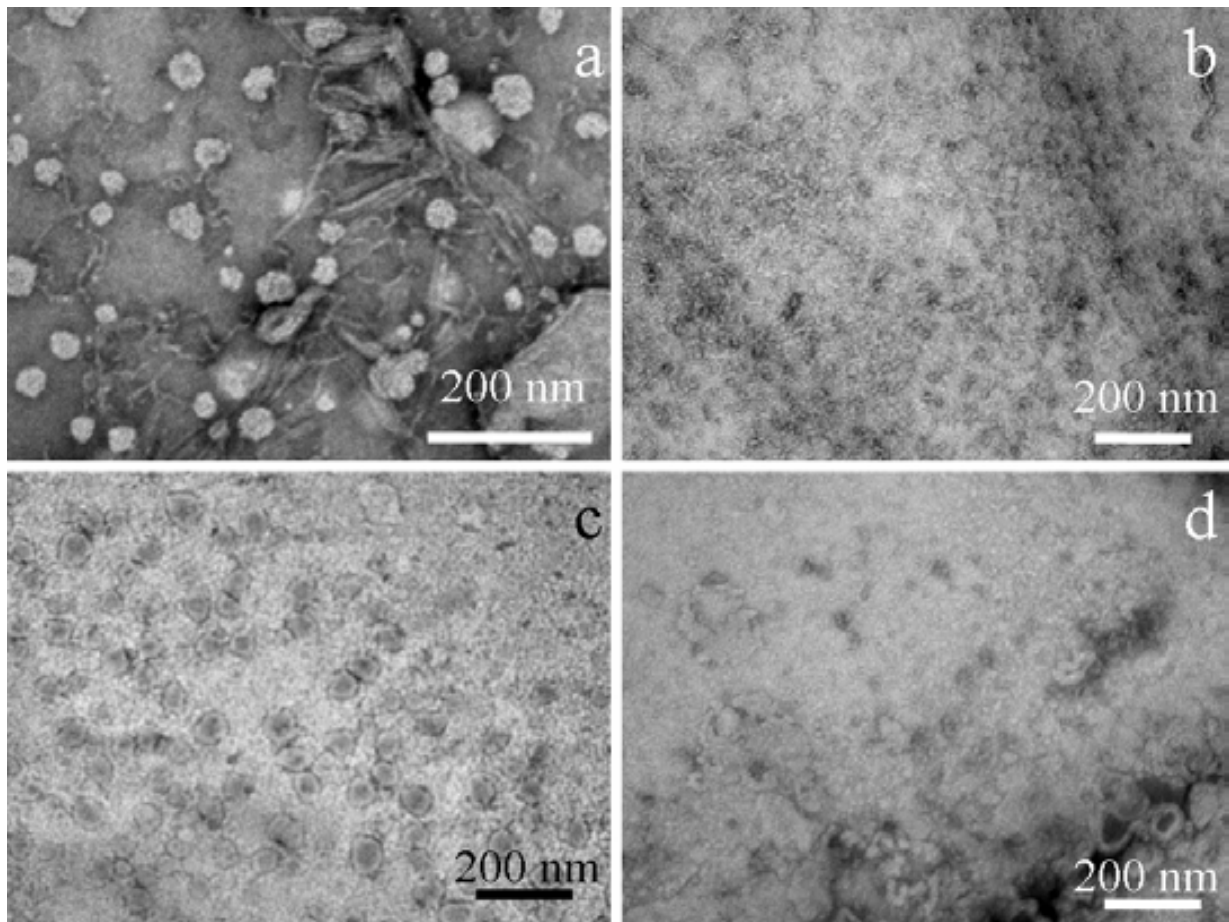
Tenint constància de que els rafts lipídics semblen tenir un paper modulador dels processos de formació de fibres, es van preparar membranes model amb fosfatidilcolina (PC) com a fosfolípid base i amb diferents elements dels rafts lipídics, com l'esfingomielina (SM), la galactosilceramida (GalCer) i el colesterol (Chol). També es van preparar liposomes amb extracte lipídic de cervell. La composició exacta d'aquests liposomes es detalla a la Taula 7. A la Figura 63 es mostra la cinètica d'agregació del pèptid A $\beta$ (1-28) en presència dels diferents tipus de liposomes.

A pH 5.5 (Figura 63a) i durant l'interval de temps estudiat, la cinètica d'agregació del pèptid es veu accelerada en presència de liposomes d'extracte lipídic de cervell i de liposomes PC:GalCer:SM (2:1:1) v:v i PC:Chol:SM:GalCer (2:1:0.5:0.5) v:v, que simulen un raft lipídic, i a més, la quantitat final de fibres formades és major que en el control. Per altra banda, la presència de només PC, SM o GalCer no afecten ni a la velocitat d'agregació ni a la quantitat de fibres formades, ja que el plateau assolit té la mateixa intensitat que el control. La presència de Chol sol disminueix la quantitat de fibres formades. Quan el medi té pH 7.5 (Figura 63b) gairebé no s'observen canvis en la fluorescència de la sonda ThT durant el temps estudiat. Finalment, la substitució del residu de Tyr10 per Ala provoca un alentiment de la cinètica d'agregació en totes les condicions estudiades, independentment del pH del medi, tal i com posa de manifest la Figura 63c,d, on la intensitat de fluorescència de la ThT pràcticament no varia durant el temps estudiat.

#### ***IV.4.1.2.- Morfologia dels agregats i fibres formades pel pèptid A $\beta$ (1-28) en presència de membranes model***

Tal i com es va procedir en els capítols anteriors, es van guardar alíquotes de les mostres estudiades per fluorescència, per a la seva posterior observació mitjançant microscòpia electrònica de transmissió i estudi de la morfologia dels agregats i fibres formades en presència de membranes model. A la Figura 64 es mostren les micrografies adquirides, procedents de mostres de pèptid A $\beta$ (1-28) agregades (final de la cinètica) en presència de liposomes d'extracte de cervell. Com es va veure en les corresponents cinètiques d'agregació de la Figura 63, en presència de membranes model la seqüència wild type del pèptid A $\beta$ (1-28) forma fibres amiloides en un temps d'incubació aproximat de 400 minuts. En tots els casos estudiats, és a dir, per als diferents tipus de liposomes, la morfologia de les fibres és ben similar a la mostrada a la Figura 64. Quan el pH del medi és 7.5 únicament s'observen espècies oligomèriques (Figura 64b). La mutació Y10A del pèptid A $\beta$ (1-28)

alenteix el procés de formació de fibres, de tal manera que durant l'interval de temps estudiat només s'observen agregats no fibril·lars (Figura 64c,d) semblants als que forma la seqüència wild type a pH 7.5.



**Figura 64. Micrografies electròniques del pèptid  $A\beta(1-28)$  i el seu mutant  $A\beta(1-28)Y10A$  en presència de membranes model d'extracte de cervell.** Les mostres corresponen al temps final de la cinètica d'agregació per fluorescència amb ThT mostrada a la Figura 63, i van ser preses directament de la cubeta de fluorescència. La concentració de pèptid va ser 50  $\mu\text{M}$  i la de liposomes de 10 mM. La temperatura va ser de 37°C.  $A\beta(1-28)$  a pH 5.5 (a) i pH 7.5 (b).  $A\beta(1-28)Y10A$  a pH 5.5 (c) i pH 7.5 (d)

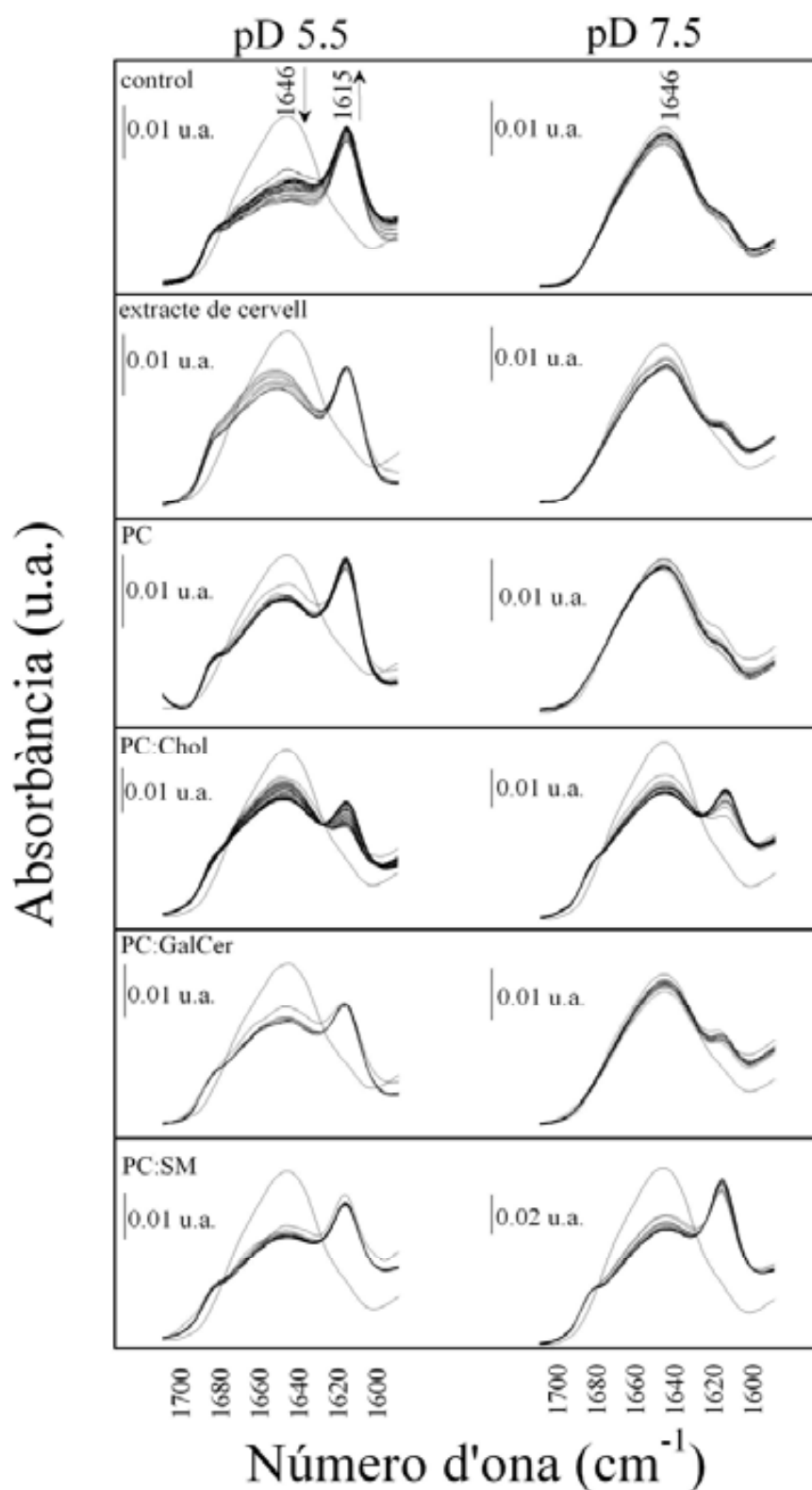
### *IV.4.1.3.- Canvis estructurals en el pèptid $A\beta(1-28)$ induïts per la presència de lípid*

Mitjançant espectroscòpia d'IR es van estudiar els canvis estructurals induïts per la presència dels diferents elements que formen part dels rafts lipídics, com Chol, SM i GalCer. També es van estudiar els canvis induïts en presència de membranes model preparades a partir d'extracte de cervell. Així doncs, es van adquirir espectres d'IR al llarg del temps fins que ja no es van observar canvis significatius en la estructura secundària del pèptid  $A\beta(1-28)$ . La concentració de pèptid va ser 1.2 mM i es va mantenir la mateixa relació pèptid/lípid que en els experiments a baixa concentració de pèptid.

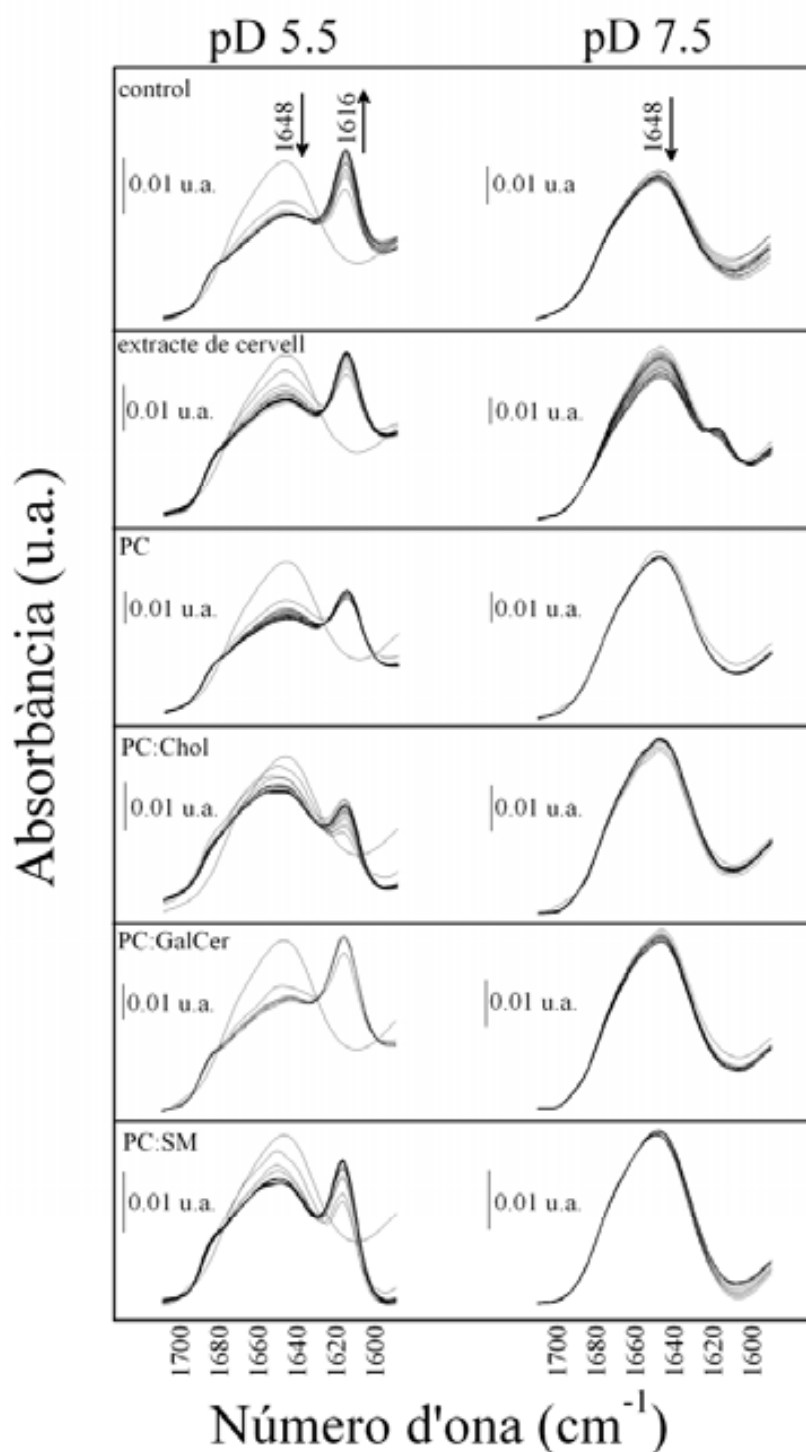
A la Figura 65 es mostren aquests canvis estructurals. A pD 5.5 s'observa un augment gradual de la banda a  $1615\text{ cm}^{-1}$ , corresponent a l'estructura  $\beta$ -agregada, i simultani a la desaparició de la banda a  $1646\text{ cm}^{-1}$ , corresponent a una mescla d'estructures desordenada i  $\alpha$ -hèlix, tant en el control (en absència de liposomes) com en les diferents composicions lipídiques de membranes model estudiades, la qual cosa indica un procés de formació d'agregats. En canvi, quan el pD del medi és 7.5, només s'observa aquest canvi estructural quan el pèptid és incubat en presència de membranes que contenen Chol o SM.

Els canvis estructurals induïts per la presència de lípid en el medi també van ser estudiats en el cas del pèptid  $A\beta(1-28)Y10A$ . Els espectres d'IR obtinguts es mostren a la Figura 66. A pD 7.5, el pèptid  $A\beta(1-28)Y10A$  no experimenta canvis estructurals significatius ja que la banda corresponent a estructures desordenada i hèlix  $\alpha$  ( $1648\text{ cm}^{-1}$ ) no varia la seva intensitat durant el temps estudiat. Per altra banda, a pD 5.5 el pèptid experimenta un procés d'agregació tant en absència com en presència dels diferents tipus de liposomes estudiats.



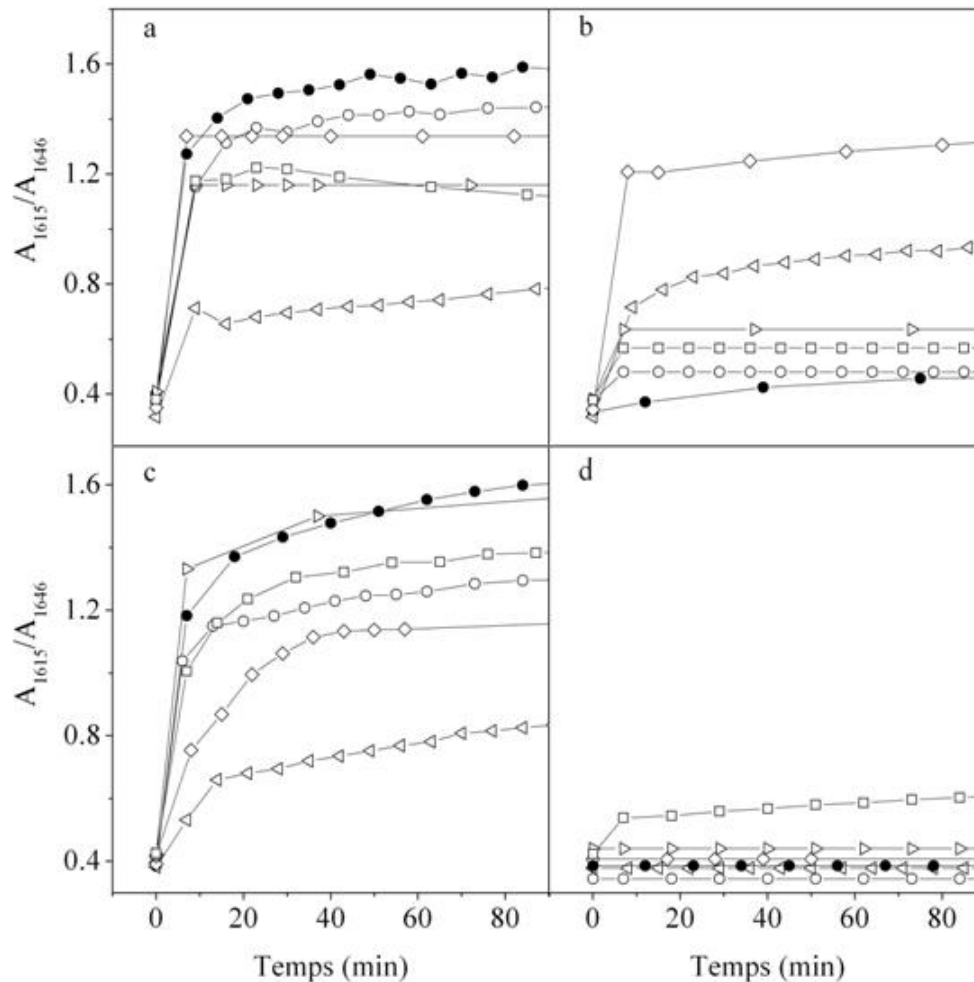


**Figura 65.** Canvis en l'estructura secundària del pèptid pèptid A $\beta$ (1-28) al llarg del temps, mesurats per FTIR, en presència de membranes model de diferent composició lipídica. Es van adquirir espectres seqüencials cada minut i durant un temps total aproximat de 20 hores, fins que ja no es van observar canvis significatius en l'estructura secundària. A tots els espectres es va restar la contribució del tampó. La temperatura va ser 37°C. Les concentracions finals de pèptid i de lípid van ser 1.2 mM i 10 mM, respectivament. Les fletxes indiquen regions de l'espectre on la intensitat augmenta ( $\uparrow$ ) o disminueix ( $\downarrow$ ). La composició exacta de cada tipus de liposoma es detalla a la Taula 7.



**Figura 66.** Canvis en l'estructura secundària del pèptid pèptid A $\beta$ (1-28)Y10A al llarg del temps, mesurats per FTIR, en presència de membranes model de diferent composició lipídica. Es van adquirir espectres seqüencials cada minut i durant un temps total aproximat de 20 hores, fins que ja no es van observar canvis significatius en l'estructura secundària. A tots els espectres es va restar la contribució del tampó. La temperatura va ser 37°C. Les concentracions finals de pèptid i de lípid van ser 1.2 mM i 10 mM, respectivament. Les fletxes indiquen regions de l'espectre on la intensitat augmenta ( $\uparrow$ ) o disminueix ( $\downarrow$ ). La composició exacta de cada tipus de liposoma es detalla a la Taula 7.

Finalment, per tal de comparar les cinètiques d'agregació obtingudes per al pèptid A $\beta$ (1-28) i el seu mutant, a elevada concentració peptídica i en presència dels diferents tipus de liposomes, es va representar gràficament la relació d'absorbàncies a 1615 i 1646 cm<sup>-1</sup> en funció del temps. Els resultats obtinguts es detallen a la Figura 67.



**Figura 67. Representació de la relació d'intensitats a 1615 cm<sup>-1</sup> i 1646 cm<sup>-1</sup> obtingudes a partir de l'adquisició d'espectres de FTIR per al pèptid A $\beta$ (1-28) en presència de membranes model. La composició exacta de cada tipus de liposoma es detalla a la Taula 7. A $\beta$ (1-28) wild type a pH 5.5 (a) i pH 7.5 (b), A $\beta$ (1-28)Y10A a pH 5.5 (c) i pH 7.5 (d). (-●-) control (absència de liposomes), (-□-) extracte de cervell, (-○-) PC, (-◁-) PCChol, (-▷-) PCGalCer, (-◇-) PCSM.**

En general, totes les cinètiques del pèptid A $\beta$ (1-28) a pD 5.5 (Figura 67a) tenen un pendent similar i, per tant, la mateixa velocitat d'agregació. La intensitat del plateau assolit té un valor similar en cadascuna de les corbes, indicant la formació d'una quantitat final de fibres aproximadament igual en tots els casos. Tot i així, la presència de liposomes amb Chol fa disminuir la quantitat final de fibres formades, tal i com succeeix en la cinètica a baixa concentració peptídica (Figura 63a). Per altra banda, a pD 7.5 (Figura 63b) la cinètica

d'agregació només es manté si el pèptid és incubat en presència de membranes model amb SM o Chol, mentre que la resta de liposomes no indueixen la formació d'agregats.

Respecte la seqüència mutada en la posició Y10, l'agregació només té lloc a pD 5.5 (Figura 63c,d). Tant en el control com en presència dels diferents tipus de liposomes, la velocitat d'agregació i la quantitat final de fibres formades és ben similar, excepte quan el medi conté liposomes amb Chol (Figura 63c), en què la velocitat és menor i es forma una menor quantitat de fibres i/o agregats rics en estructura  $\beta$ , tal i com succeeix amb la seqüència no mutada (Figura 63a).

#### **IV.4.2.- Efecte de la composició lipídica sense càrrega neta en la cinètica d'agregació del pèptid PrP(185-208)**

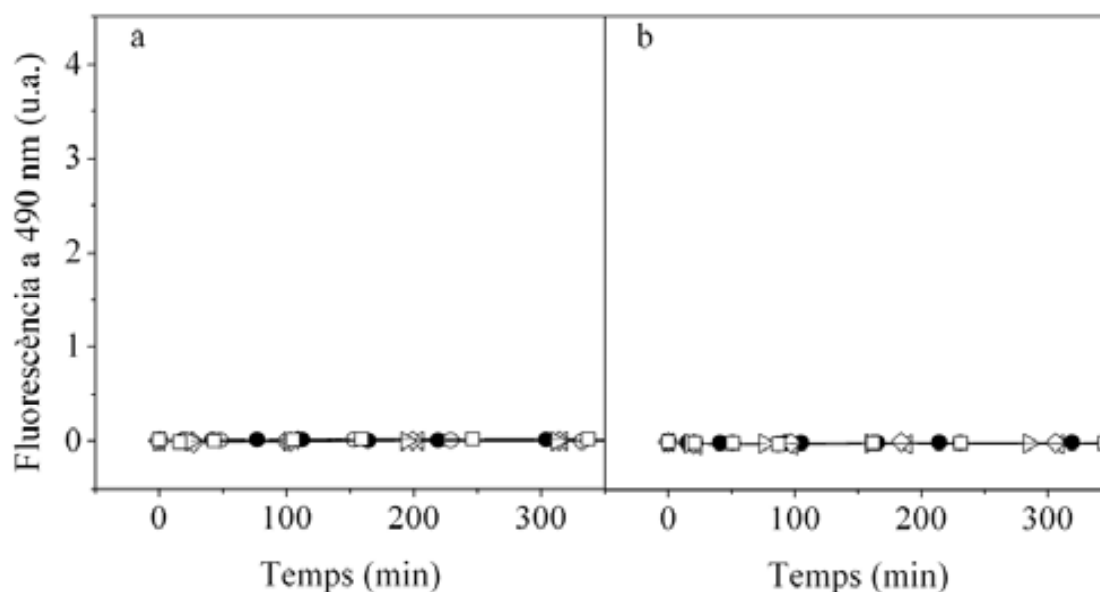
Tal i com es va fer amb el pèptid A $\beta$ (1-28), es va estudiar la cinètica d'agregació del pèptid PrP(185-208) en presència de membranes model, tant a baixa concentració peptídica i mitjançant el seguiment de l'augment de fluorescència de la sonda ThT al llarg del temps, com a elevada concentració peptídica i mitjançant l'adquisició seqüencial d'espectres d'IR. De manera anàloga, també es va analitzar l'efecte de la mutació Phe198Ala, considerat un residu específic i essencial per a la unió del lípid [101].

##### ***IV.4.2.1.- Cinètica d'agregació del pèptid PrP(185-208) a baixa concentració peptídica***

La Figura 68 mostra el seguiment de la fluorescència de la sonda ThT al llarg del temps per al fragment priònic PrP(185-208) i per al seu mutant PrP(185-208)F198A. En general, el pèptid PrP(185-208) és incapaç de formar fibres tant en absència com en presència de membranes model de diferent composició lipídica, independentment del pH del medi, durant el temps total estudiat. La mutació F198A tampoc té cap mena d'efecte inductor de l'agregació en aquesta escala de temps.

Cal remarcar, però que aquests experiments es van realitzar amb una concentració lipídica de 300  $\mu$ M, de tal manera que la relació molar lípid:pèptid va ser d'1:6, de manera que es podia pensar que l'absència d'agregació per part d'aquesta seqüència peptídica podria ser deguda a una concentració lipídica baixa. Per descartar aquesta possibilitat, es van realitzar experiments de fluorescència amb la sonda ThT en presència d'una major concentració, concretament, en presència d'1mM de liposomes d'extracte de cervell (relació molar lípid:pèptid 1:20). En aquestes condicions i durant l'interval de temps mesurat (uns 500

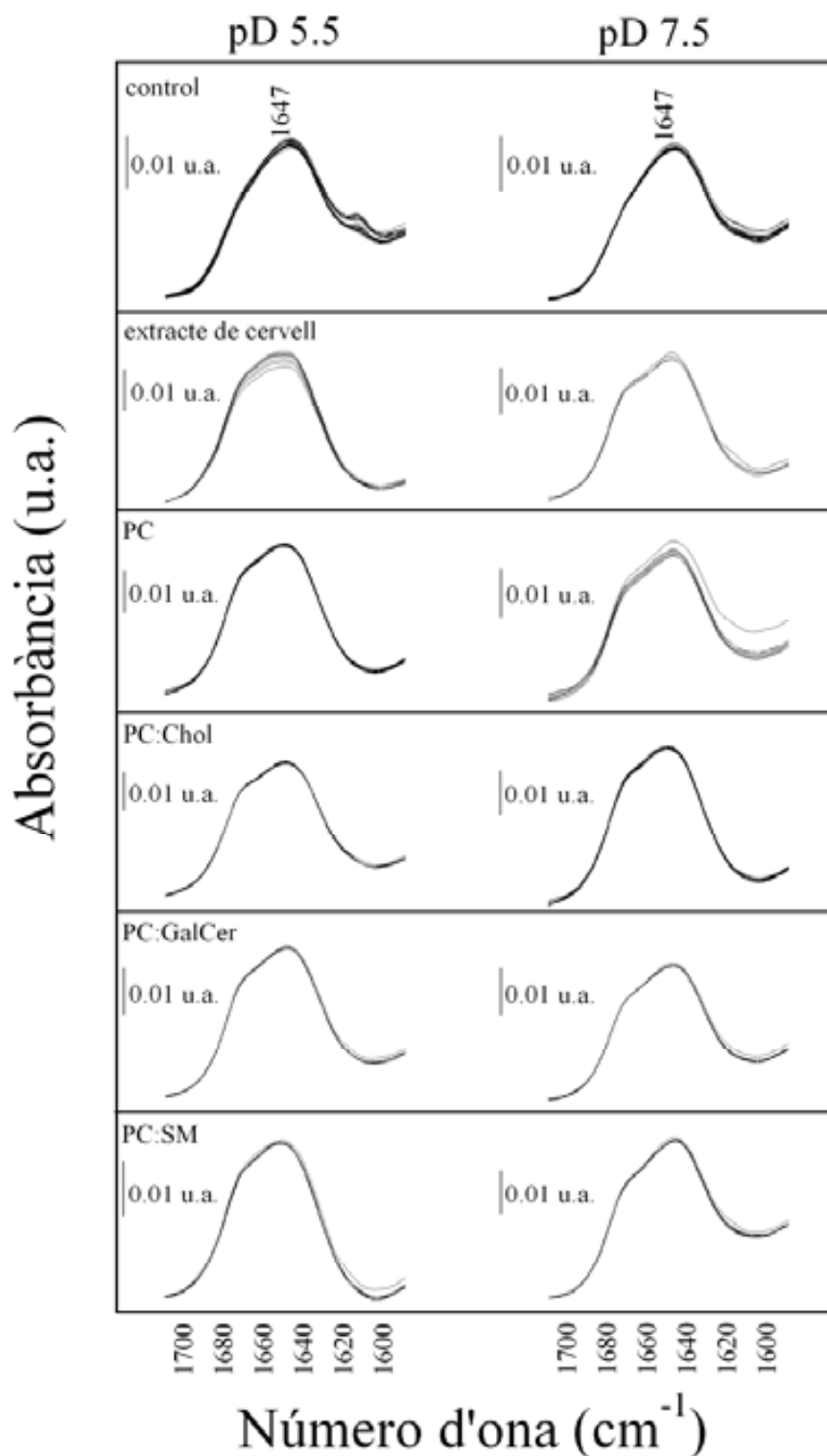
minuts) no es va observar augment de la fluorescència. Per tant, es pot afirmar que la presència de lípid no induïx l'agregació del fragment PrP(185-208).



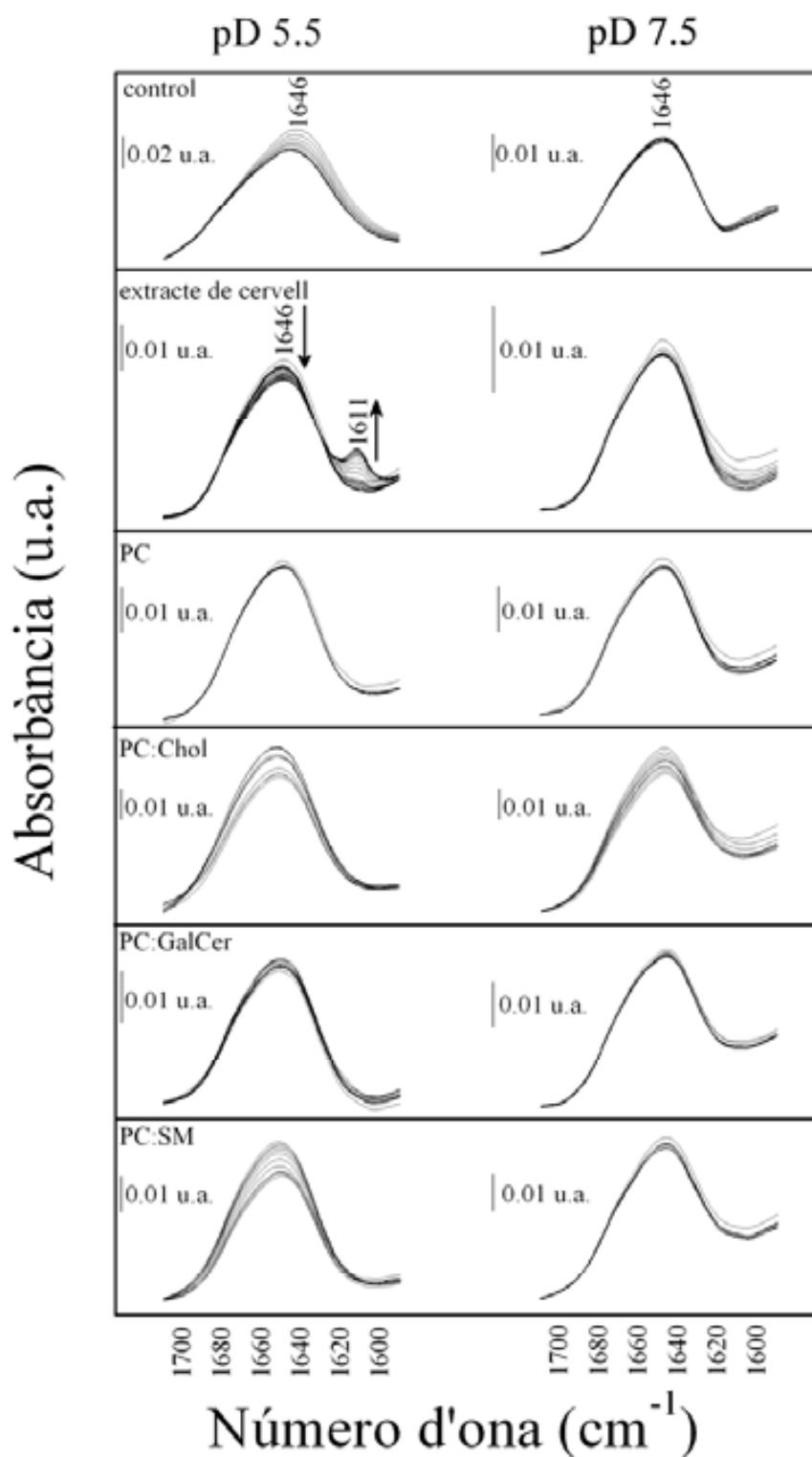
**Figura 68. Cinètica d'agregació del pèptid PrP(185-208) a pH 5.5 i en presència de membranes model.** La concentració final de pèptid va ser 50  $\mu\text{M}$  i la de ThT va ser de 35  $\mu\text{M}$ . La temperatura de 37°C. La concentració final de liposomes va ser de 300  $\mu\text{M}$  i la seva composició exacta s'especifica a la Taula 7. PrP(185-208) wild type (a) i PrP(185-208) F198A (b). (●) control (absència de liposomes), (□) extracte de cervell, (○) PC, (◁) PCChol, (▷) PCGalCer, (◇) PCSM.

#### IV.4.2.2.- Canvis estructurals en el pèptid PrP(185-208) induïts per la presència de lípid

Els espectres d'IR del fragment prionic en presència de membranes model adquirits al llarg del temps es mostren a la (Figura 69). Tal i com es pot observar, aquest fragment peptídic presenta una mescla d'estructures secundàries desordenada i d'hèlix  $\alpha$ , que no varia al llarg de l'interval de temps estudiat. El fragment mutat, és a dir, el pèptid PrP(185-208)F198A tampoc varia significativament la seva estructura secundària (Figura 70), excepte si el pèptid s'incuba en presència de membranes model d'extracte de cervell, en què s'observa un lleuger augment de la banda a 1611  $\text{cm}^{-1}$ , corresponent a estructures  $\beta$  agregades. En general, ni la seqüència wild type del fragment prionic ni la seqüència mutada formen fibres ni agregats peptídics rics en estructura  $\beta$  durant el temps estudiat.



**Figura 69.** Canvis en l'estructura secundària del pèptid pèptid PrP(185-208) al llarg del temps, mesurats per FTIR, en presència de membranes model de diferent composició lipídica. Es van adquirir espectres seqüencials cada minut i durant un temps total aproximat de 20 hores, fins que ja no es van observar canvis significatius en l'estructura secundària. A tots els espectres es va restar la contribució del tampó. La temperatura va ser 37°C. Les concentracions finals de pèptid i de lípid van ser 1.2 mM i 10 mM, respectivament. La composició exacta de cada tipus de liposoma es detalla a la Taula 7.



**Figura 70.** Canvis en l'estructura secundària del pèptid pèptid PrP(185-208)F198A al llarg del temps, mesurats per FTIR, en presència de membranes model de diferent composició lipídica. Es van adquirir espectres seqüencials cada minut i durant un temps total aproximat de 20 hores, fins que ja no es van observar canvis significatius en l'estructura secundària. A tots els espectres es va restar la contribució del tampó. La temperatura va ser 37°C. Les concentracions finals de pèptid i de lípid van ser 1.2 mM i 10 mM, respectivament. La composició exacta de cada tipus de liposoma es detalla a la Taula 7.

#### IV.4.3.- Efecte de les membranes model amb càrrega negativa neta en la cinètica d'agregació del pèptid A $\beta$ (1-28)

Per tal d'avaluar l'efecte del lípid amb càrrega es va escollir la fosfatidilserina per confeccionar membranes model amb un 10% de càrrega neta negativa (liposomes PC:PS (9:1) v:v.). Es van realitzar les cinètiques d'agregació del pèptid A $\beta$ (1-28) a baixa i elevada concentració peptídica en presència d'aquest tipus de membranes model, mitjançant el seguiment de la fluorescència de la sonda ThT i l'adquisició d'espectres d'IR, respectivament.

##### IV.4.3.1.- Cinètica d'agregació del pèptid A $\beta$ (1-28) a baixa concentració peptídica

A la Figura 71 es mostra la cinètica d'agregació a baixa concentració peptídica. A pH 5.5, s'observa la típica cinètica sigmoïdal de formació de fibres amiloides. En presència de liposomes carregats negativament, aquesta cinètica és més ràpida, tal i com indica el seu pendent, i es forma una major quantitat de fibres durant el temps estudiat. Per altra banda, a pH 7.5 la fluorescència de la sonda gairebé no varia, indicant que el procés d'agregació és notablement més lent.

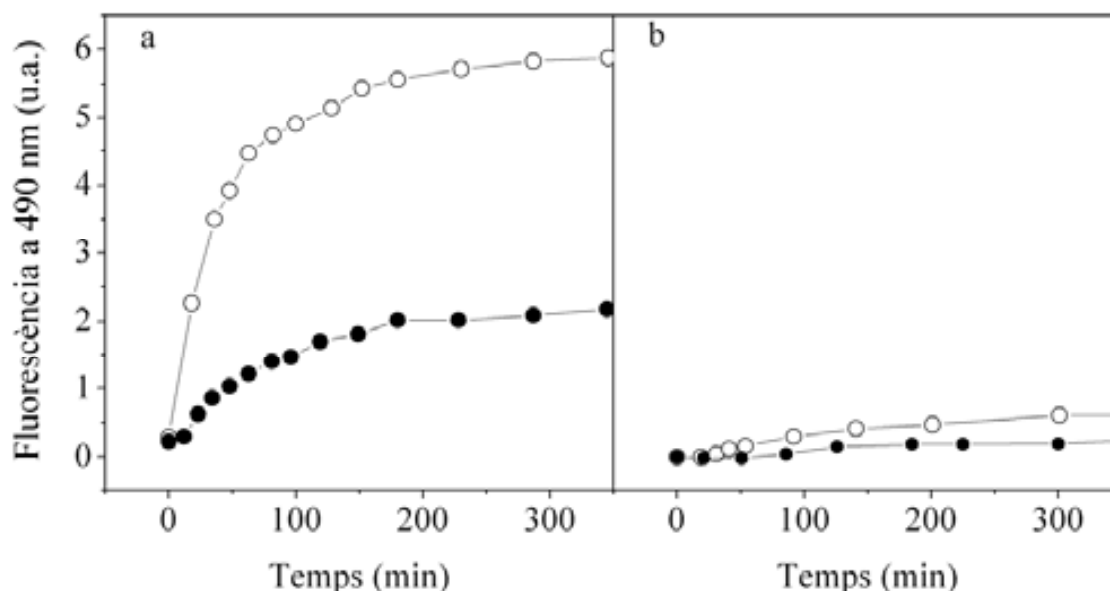
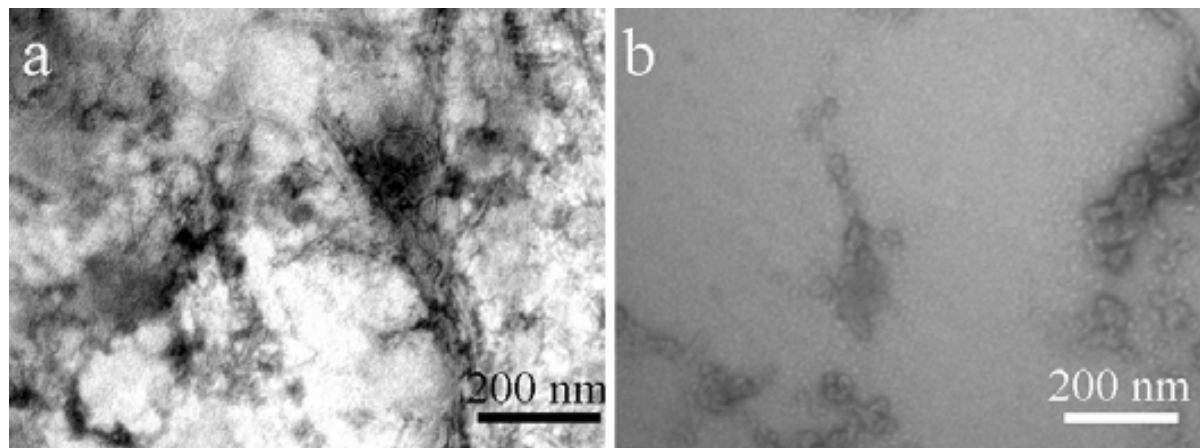


Figura 71. Cinètica d'agregació del pèptid A $\beta$ (1-28) en presència de membranes de PC:PS (9:1) v:v, a pH 5.5 (a) i pH 7.5 (b). La concentració final de pèptid va ser 50  $\mu$ M i la temperatura de 37°C. La concentració final de ThT va ser de 35  $\mu$ M. La concentració final de liposomes va ser de 300  $\mu$ M. (-●-) control (absència de liposomes), (-○-) PC:PS.



La naturalesa amiloide de les fibres formades al final de la cinètica a pH 5.5 queda palesa a la Figura 72, on s'observen feixos de fibres sense ramificar. En aquest interval de temps i a pH 7.5 només s'observen agregats amorfs i de baix pes molecular, que no són sensibles a la unió de ThT.

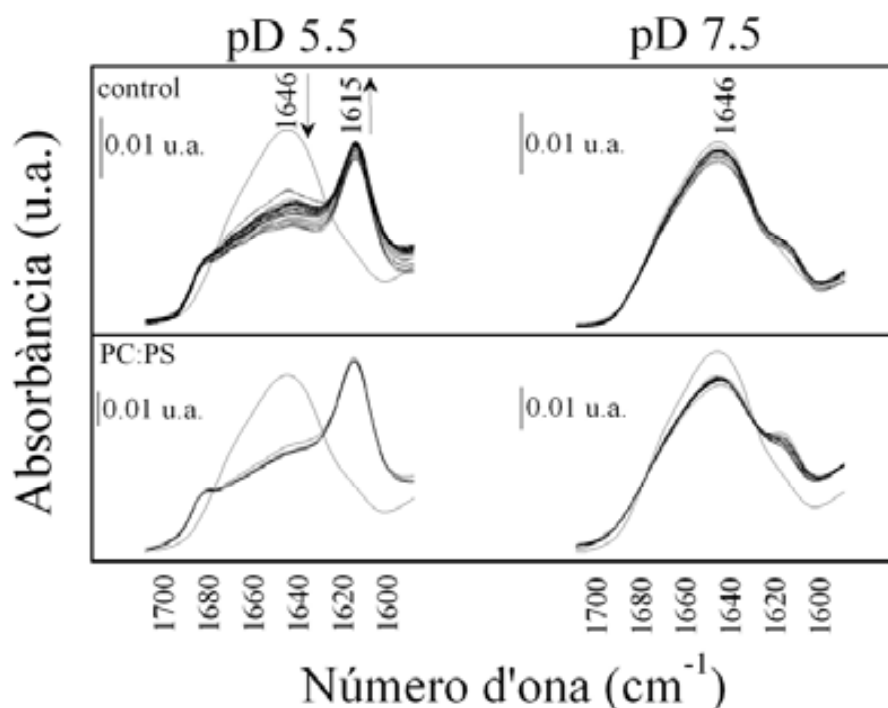


**Figura 72. Micrografies electròniques del pèptid A $\beta$ (1-28) en presència de membranes de PC:PS (9:1) v:v, a pH 5.5 (a) i pH 7.5 (b).** Les mostres corresponen al temps final de la cinètica d'agregació per fluorescència amb ThT mostrada a la Figura 63, i van ser preses directament de la cubeta de fluorescència. La concentració de pèptid va ser 50  $\mu$ M i la de liposomes de 10 mM. La temperatura va ser de 37°C.

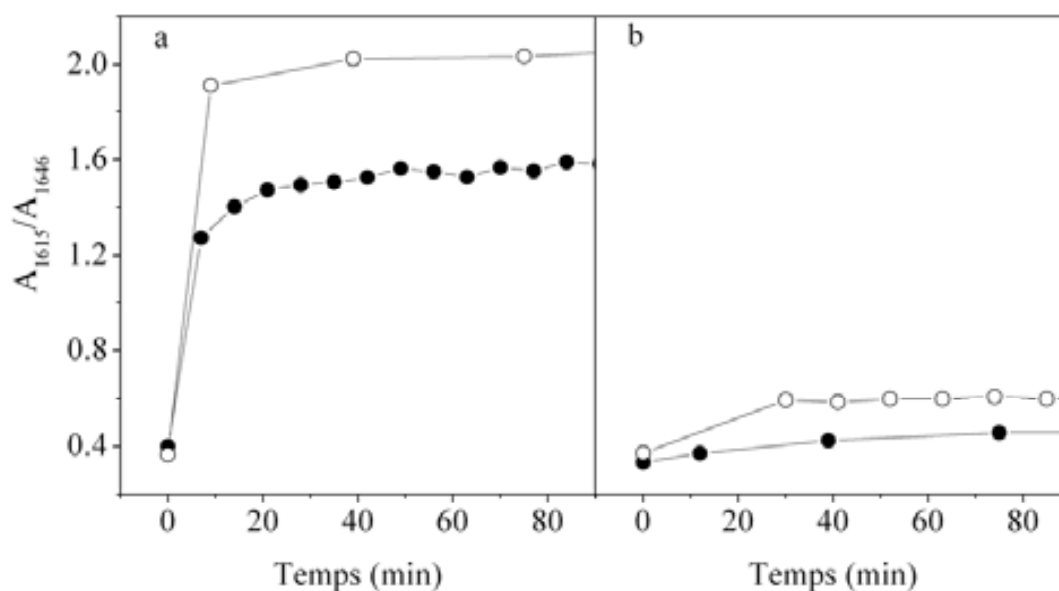
#### ***IV.4.3.2.- Canvis estructurals en el pèptid A $\beta$ (1-28) induïts per la presència de membranes model amb càrrega negativa neta***

Els espectres d'IR adquirits al llarg del temps (Figura 73) posen de manifest una disminució de les estructures desordenada i hèlix  $\alpha$  a expenses de l'augment de la formació d'estructures  $\beta$  agregades durant l'interval de temps estudiat, quan el medi té pD 5.5, indicant l'existència d'un procés d'agregació. A pD 7.5, l'estructura del pèptid A $\beta$ (1-28) pràcticament no experimenta canvis significatius.

Finalment, per avaluar les diferències entre aquestes cinètiques d'agregació es va representar gràficament la relació d'absorbàncies a 1615  $\text{cm}^{-1}$  i 1646  $\text{cm}^{-1}$ . El resultat apareix a la Figura 74, on s'observa gairebé la mateixa velocitat de formació d'estructura  $\beta$  a pD 5.5, independentment de la presència de les membranes model carregades negativament. Aquest tipus de liposoma únicament afecta a la quantitat final de fibres formades.



**Figura 73.** Canvis en l'estructura secundària del pèptid pèptid A $\beta$ (1-28) al llarg del temps, mesurats per FTIR, en presència de membranes de PC:PS (9:1) v:v. Es van adquirir espectres seqüencials cada minut i durant un temps total aproximat de 20 hores, fins que ja no es van observar canvis significatius en l'estructura secundària. A tots els espectres es va restar la contribució del tampó. La temperatura va ser 37°C. Les concentracions finals de pèptid i de lípid van ser 1.2 mM i 10 mM, respectivament. Les fletxes indiquen regions de l'espectre on la intensitat augmenta ( $\uparrow$ ) o disminueix ( $\downarrow$ ).

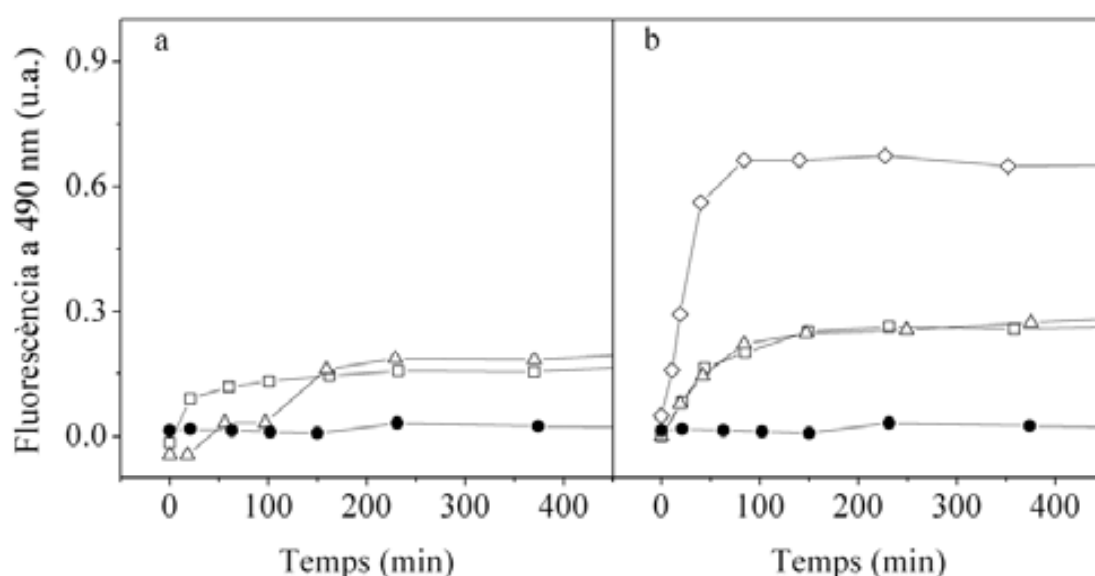


**Figura 74.** Representació de la relació d'intensitats a 1615 cm<sup>-1</sup> i 1646 cm<sup>-1</sup> obtingudes a partir de l'adquisició d'espectres de FTIR per al pèptid A $\beta$ (1-28) en presència de membranes de PC:PS (9:1) v:v, pH 5.5 (a) i pH 7.5 (b). (-●-) control (absència de liposomes), (-○-) PC:PS.

**IV.4.4.- Efecte de les membranes model amb càrrega negativa neta en la cinètica d'agregació del pèptid PrP(185-208)**

**IV.4.4.1.- Cinètica d'agregació del pèptid PrP(185-208) a baixa concentració peptídica**

De la mateixa manera que amb el pèptid A $\beta$ (1-28), en aquest treball es va avaluar si la presència de membranes lipídiques amb càrrega neta negativa indueix l'agregació del fragment priònic PrP(185-208). Així doncs, es va estudiar la seva cinètica d'agregació per fluorescència de la sonda ThT en presència de membranes de PC:PS (9:1) v:v. A la Figura 75 es mostra el resultat obtingut.

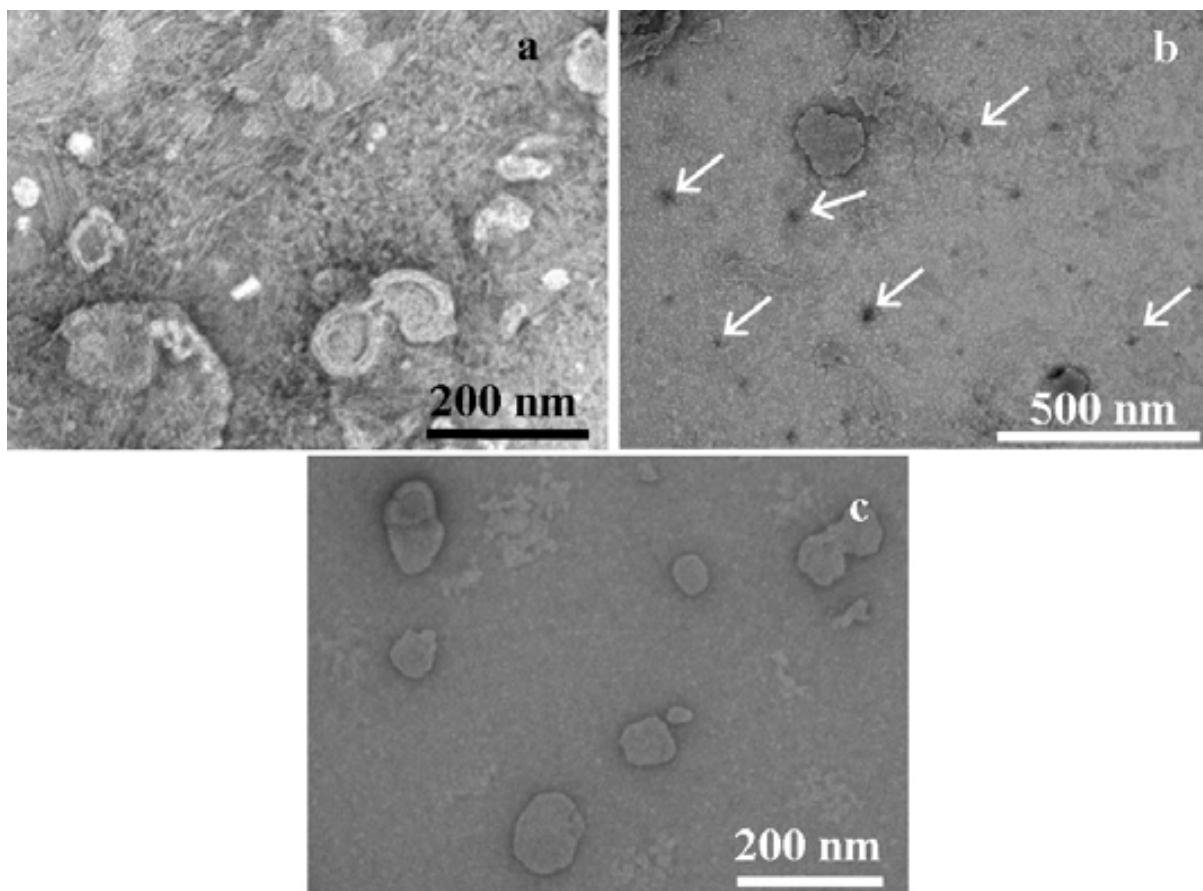


**Figura 75. Cinètica d'agregació del pèptid PrP(185-208) en presència de membranes de PC:PS.** La concentració final de pèptid va ser 50  $\mu$ M i la de ThT va ser de 35  $\mu$ M. La temperatura va ser de 37°C. (a) membranes de PC:PS (9:1) v:v. (-●-) control (absència de liposomes), (-□-) pH 5.5, (-Δ-) pH 7.5. En ambdós casos la concentració final de liposomes va ser de 300  $\mu$ M. (b) membranes de PC:PS (3:1) v:v. (-●-) control (absència de liposomes); (-□-) pH 5.5, (-Δ-) pH 7.5, a una concentració final de liposomes de 300  $\mu$ M, i (-◇-) pH 5.5 a una concentració final de liposomes d'1mM.

A la Figura 75 es mostra el seguiment de la fluorescència de la sonda ThT al llarg del temps per al fragment priònic PrP(185-208) en presència de liposomes PC:PS. Quan els liposomes contenen un 10% de càrrega negativa e independentment del pH del medi, la intensitat de la fluorescència pràcticament no varia, de tal manera que no s'indueix la formació d'agregats i fibres amiloides. S'obté un resultat ben similar quan el pèptid s'incuba en presència de liposomes amb un 25% de càrrega negativa. Únicament hi ha formació de fibres amiloides quan s'augmenta la concentració lipídica i la proporció de càrrega negativa conjuntament, tal i com mostra l'augment de la fluorescència de la ThT respecte el control en absència de liposomes. Cal remarcar, però, que tal i com s'ha comentat anteriorment (*apartat*

*IV.4.2.1.- Cinètica d'agregació del pèptid PrP(185-208) a baixa concentració peptídica)* la concentració elevada (1mM) de liposomes d'extracte de cervell no indueix l'agregació del fragment priònic. Segons el fabricant Avanti Polar Lipid, Inc., aquest extracte de cervell conté aproximadament un 10% en pes de fosfatidilserina. Així doncs, es pot afirmar que l'augment de fluorescència observat per al pèptid PrP(185-208) en presència d'1mM de PC:PS (3:1) v:v està degut a un augment conjunt tant de la concentració lipídica com de la proporció de càrrega negativa.

Per tal de demostrar aquests resultats es van adquirir micrografies electròniques corresponents al final de les cinètiques a pH 5.5 mostrades a la Figura 75.



**Figura 76. Micrografies electròniques del pèptid PrP(185-208) a pH 5.5 i en presència de membranes PC:PS.** Les mostres corresponen al temps final de la cinètica d'agregació per fluorescència amb ThT mostrada a la Figura 75, i van ser preses directament de la cubeta de fluorescència. La concentració de pèptid va ser 50  $\mu$ M i la temperatura va ser de 37°C.

- (a) PrP(185-208) en presència d'1mM PC:PS (3:1) v:v
- (b) PrP(185-208) en presència de 300  $\mu$ M PC:PS (3:1) v:v
- (c) PrP(185-208) en presència de 300  $\mu$ M PC:PS (9:1) v:v.

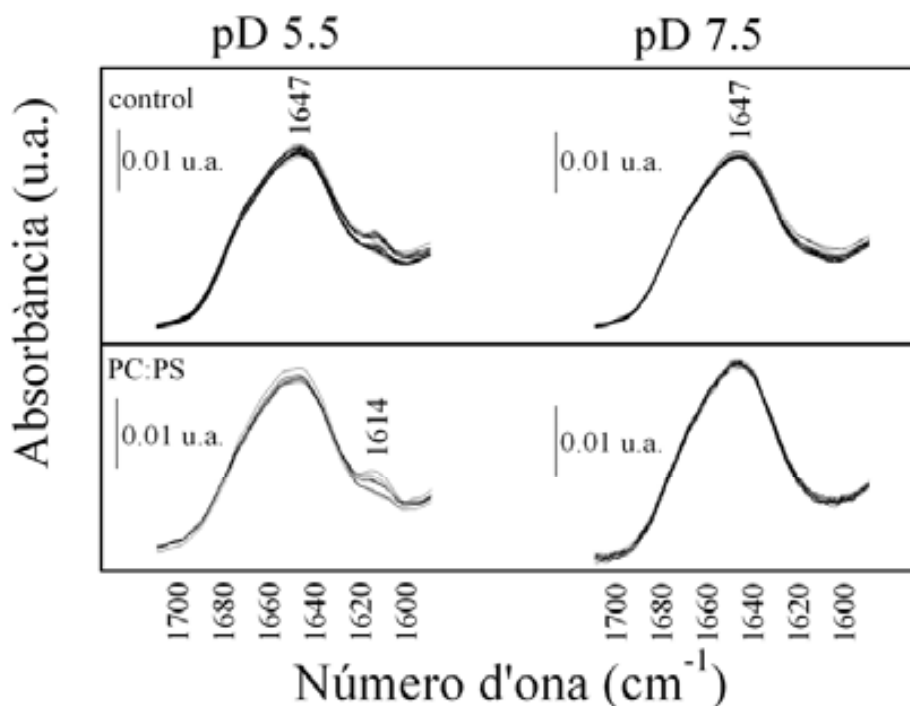
En presència d'una major concentració lipídica i una major proporció de càrrega negativa (Figura 75a) s'observen feixos amb les típiques fibres amiloides sense ramificar. Per altra banda, quan disminueix la proporció de càrrega negativa s'observen formes

oligomèriques que precedeixen a la formació d'agregats amiloides i que no són sensibles a la sonda ThT (Figura 75b). Aquestes espècies estan indicades a la Figura 76b amb fletxes. Finalment, quan tant la concentració de lípid i de càrrega negativa disminueixen conjuntament, no hi ha presència de cap mena d'oligòmer o agregat (Figura 75c).

Així doncs, en presència de membranes model amb un 25% de càrrega elèctrica negativa el pèptid PrP(185-208) forma petits oligòmers, mentre que l'augment de la concentració d'aquest tipus de liposomes accelera la formació de fibres amiloides.

#### IV.4.4.2.- Canvis estructurals en el pèptid PrP(185-208) induïts per la presència de membranes model amb càrrega negativa neta

La Figura 77 mostra els espectres d'IR adquirits al llarg del temps de mostres de pèptid PrP(185-208) en presència de membranes model de PC:PS (9:1) v:v.



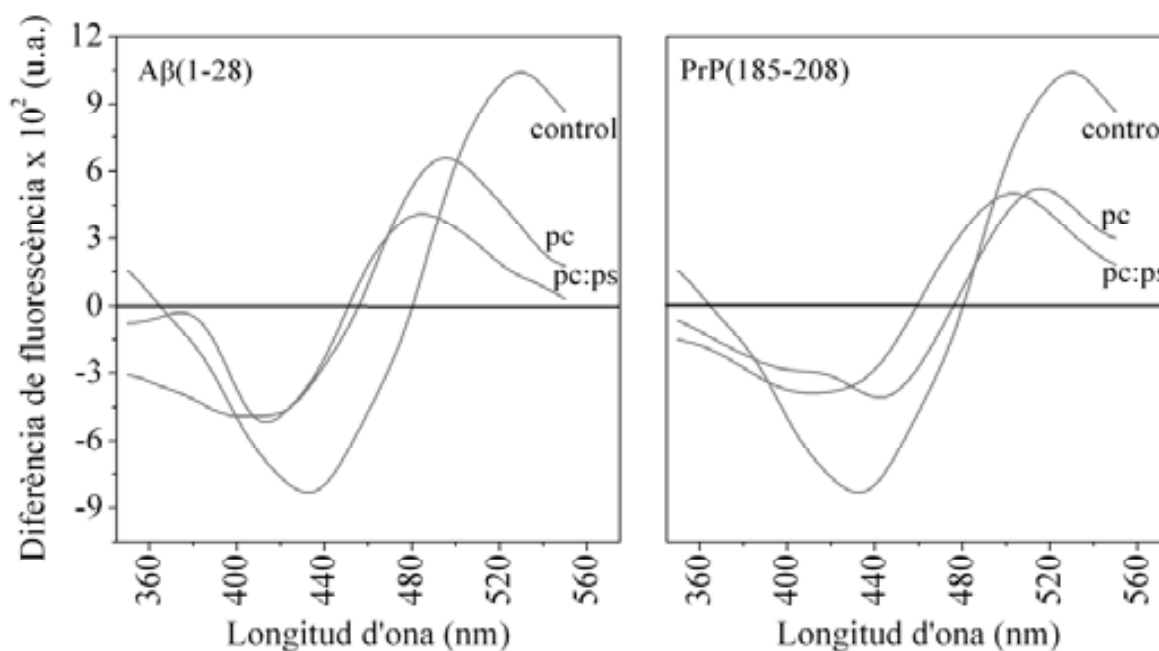
**Figura 77. Canvis en l'estructura secundària del pèptid PrP(185-208) al llarg del temps, mesurats per FTIR, en presència de membranes de PC:PS (9:1) v:v.** Es van adquirir espectres seqüencials cada minut i durant un temps total aproximat de 20 hores, fins que ja no es van observar canvis significatius en l'estructura secundària. A tots els espectres es va restar la contribució del tampó. La temperatura va ser 37°C. Les concentracions finals de pèptid i de lípid van ser 1.2 mM i 10 mM, respectivament. Les fletxes indiquen regions de l'espectre on la intensitat augmenta (↑) o disminueix (↓).

Durant l'interval de temps estudiat, aquest pèptid no presenta indicis d'agregació en cap de les condicions estudiades. Tant en presència com en absència de liposomes carregats negativament, el fragment prionic presenta una banda majoritària amb un màxim

d'absorbància a  $1647\text{ cm}^{-1}$ , que no varia la seva intensitat al llarg del temps i que correspon a una mescla d'estructures desordenada i hèlix  $\alpha$ . Només quan el pD del medi és ajustat a 5.5 s'observa una petita espatlla amb un màxim a  $1614\text{ cm}^{-1}$ , corresponent a estructura  $\beta$  agregada, l'intensitat de la qual és menyspreable en comparació amb la banda majoritària a  $1647\text{ cm}^{-1}$ .

#### IV.4.5.- Canvis en el potencial dipolar de membrana induïts per la presència de pèptid.

Tal i com s'ha explicat a Materials i Mètodes, es van adquirir els espectres d'emissió de fluorescència de liposomes marcats amb la sonda di-8-ANEPPS abans i després de l'addició de pèptid. Es van fer servir liposomes de PC, com a model de fosfolípid sense càrrega elèctrica, i liposomes de PC:PS (9:1 v:v). A més, es va fer servir un control intern de l'experiment amb un pèptid de fusió derivat del virus de l'HIV humà, per al qual ha estat prèviament descrit el seu efecte en el potencial dipolar [168]. A la Figura 78 es mostren els resultats obtinguts:



**Figura 78.** Espectres de diferència, obtinguts a partir de la diferència entre els espectres normalitzats d'excitació de LUVs marcats amb di-8-ANEPPS abans i després de l'addició de pèptid. Es van normalitzar les àrees dels espectres d'excitació adquirits abans de calcular l'espectre diferència. La temperatura va ser  $37^{\circ}\text{C}$ . Les concentracions finals de pèptid i de lípid van ser  $10\ \mu\text{M}$  i  $300\ \mu\text{M}$ , respectivament. Es va fer servir com a control, el pèptid de fusió de la proteïna gp41 del virus HIV humà, per al qual s'ha descrit el seu efecte disminuïdor del potencial dipolar [168].

Tal i com es pot veure a la Figura 78, l'addició del pèptid A $\beta$ (1-28) a la suspensió de liposomes de PC dóna lloc a un espectre de diferència amb un mínim al voltant de 430 nm i un màxim al voltant de 500 nm, indicatiu d'una disminució en el potencial dipolar de membrana. El fragment priònic PrP(185-208) exerceix el mateix efecte sobre les membranes de PC. Així doncs, es pot dir que les dues seqüències peptídiques poden interaccionar amb les membranes lipídiques.

Per tal de comprovar si aquesta interacció també té lloc en membranes carregades negativament, es van adquirir espectres de diferència en suspensions de liposomes amb un 10% de càrrega negativa (PC:PS 9:1 v:v). Els resultats es mostren a la Figura 78, on l'addició tant dels fragments A $\beta$ (1-28) com del fragment PrP(185-208) esdevenen en una disminució del potencial dipolar de membrana, demostrant també una interacció amb aquest tipus de membranes lipídiques.

## **V. DISCUSSIÓ**

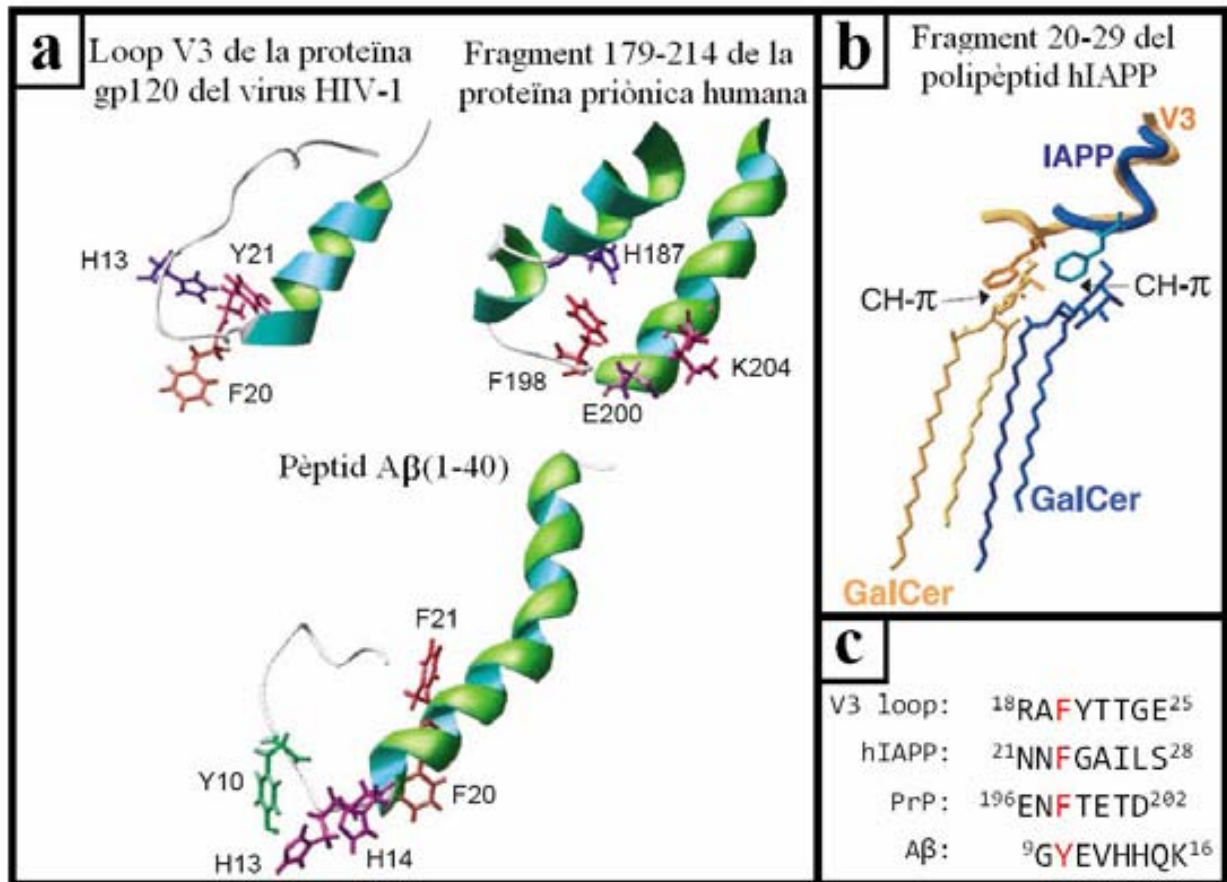




Quan hom examina la bibliografia sobre les anomenades malalties conformacionals, se n'adona de que les proteïnes i pèptids relacionats amb aquestes patologies, tot i que no tenen un origen comú ni presenten gaire homologia seqüencial, donen lloc a agregats proteics amiloides de característiques físico-químiques semblants. Aquesta semblança, permet pensar en la possibilitat de l'existència de mecanismes d'agregació comuns. La caracterització d'aquests mecanismes hauria de contribuir al disseny d'estratègies terapèutiques útils en el tractaments de moltes d'aquestes patologies.

Així doncs, i considerant com a punt de partida el treball publicat per R. Mahfoud et al. [101] en aquesta tesi es volgueren avaluar les possibles característiques amiloides del fragment peptídic derivat de la proteïna priònica humana, PrP(185-208), donada la seva possible homologia estructural amb el pèptid A $\beta$ (1-28). El citat treball posa de manifest que aquests dos fragments peptídics presenten un motiu semblant al bucle V3 de la proteïna gp120 del virus HIV, el qual és un domini d'unió a esfingolípid que intervé en la fusió de membranes durant el reconeixement cèl·lula-virus. Aquest motiu conté residus His, Tyr i/o Phe que poden facilitar la unió a esfingolípid mitjançant interaccions amb els anells de sucre dels glicoesfingolípid presents a les membranes biològiques. Concretament, el residu Tyr21 de la proteïna gp120 i la Phe198 de la proteïna priònica humana, que tenen la mateixa posició i orientació espacial, intervenen en el reconeixement i unió de galactosilceramida (GalCer), un dels elements constitutius dels rafts lipídics, mentre que la Tyr10 del pèptid A $\beta$  i la Phe20 de la proteïna gp120 també són residus superposables. De fet, tant A $\beta$ (1-28) com l'esmentat fragment priònic interaccionen amb monocapes de galactosilceramida i esfingomielina [176]. A més, el mateix grup de recerca ha trobat un domini d'unió a glicolípid present en el fragment 20-29 del polipèptid amiloide de l'illot humà, hIAPP, en el qual també existeix un residu aromàtic, Phe21, essencial per a la interacció amb la GalCer [177]. En aquest sentit i segons J. Fantini et al.[178, 179], les interaccions d'stacking  $\pi$ - $\pi$  entre aquests residus aromàtics i els anells dels carbohidrats tindrien un paper clau en el procés de formació de fibres amiloides. Tot i així, les propietats amiloidogèniques difereixen segons la proteïna o pèptid involucrat. En el cas de la proteïna priònica humana, els rafts lipídics actuarien com una mena d'ancoratge on s'uneix PrP<sup>C</sup> impeding el canvi conformacional  $\alpha \rightarrow \beta$  que condueix a la formació de fibres amiloides [178, 179]. En canvi, la interacció del fragment 20-29 del pèptid hIAPP amb la GalCer no impedeix la formació de fibres amiloides [177].

A la Figura 79 s'assenyalen les cadenes laterals d'algunes proteïnes amiloides, implicades en la unió a glicoesfingolípids en la membrana plasmàtica:



**Figura 79. Domini d'unió a esfingolípids comú a la proteïna gp120 del virus HIV-1 i altres pèptids amiloidogènics.**

(a) Comparació del loop V3 de la proteïna gp120 del virus HIV-1 amb el pèptid Aβ de la malaltia d'Alzheimer i la proteïna priònica humana. En tots ells, els residus aminoacídics implicats són His, Phe o Tyr.

(b) Superposició estructural del fragment 20-29 del polipèptid amiloide de l'illot amb el loop V3 de la proteïna gp120 del virus HIV-1 i interacció amb la GalCer.

(c) Alineament de seqüències del loop V3 de la proteïna gp120 del virus HIV-1, el pèptid Aβ, la proteïna priònica humana (PrP) i el polipèptid amiloide de l'illot humà (hIAPP).

Esquema adaptat de J.Fantini et al. [178] i M.Levy et al. [177].

En qualsevol cas, el treball de R. Mahfoud et al. [101] permet considerar la possibilitat de que el fragment priònic PrP(185-208) pugui tenir característiques amiloidogèniques, és a dir que, més enllà de la possible homologia estructural amb el pèptid Aβ(1-28), pogués formar fibres amiloides i respongués a la presència de elements moduladors com els glicosaminoglicans o les membranes biològiques.

Les característiques amiloides del fragment 1-28 del pèptid A $\beta$  de la Malaltia d'Alzheimer han estat àmpliament estudiades [105, 106, 108] i, per tant, aquest pèptid s'ha utilitzat com a control en l'estudi de les propietats amiloidogèniques del pèptid PrP(185-208).

Els resultats presentats en aquesta tesi demostren precisament, per comparació amb el pèptid amiloide A $\beta$ (1-28), que el pèptid priònic PrP(185-208) és capaç de seguir processos de formació d'agregats peptídics amb característiques fisicoquímiques típiques dels amiloides (capacitat d'unió de la sonda fluorescent ThT, detecció d'estructures fibril·lars per microscòpia electrònica, sigmoïdaliat de la corba experimental de la cinètica d'agregació, estructures agregades riques en estructura  $\beta$ ). Tal i com succeeix en el cas del pèptid A $\beta$ (1-28) i d'altres pèptids amiloides, aquests processos depenen, en el seu detall molecular, de la presència de glicosaminoglicans, i es veuen afectats per la presència de membranes biològiques. En aquest últim cas, i en relació al pèptid PrP(185-208), la càrrega superficial negativa d'aquestes membranes resulta de vital importància per la formació de fibres en presència de membranes model. Aquest fet es pot posar en relació amb la capacitat del pèptid per formar agregats amiloides en presència d'heparina, un polímer lineal carregat negativament. Els dos fets posen de manifest, la importància de les interaccions elèctrostàtiques entre el pèptid i els elements moduladors presents en el medi. Aquestes interaccions semblen explicar els efectes observats en el cas del pèptid priònic, molt per sobre d'altres possibles influències com poden ser la composició lipídica. Aquesta última, en canvi, sembla ser, juntament amb les interaccions electrostàtiques, un factor molt important en la modulació del procés d'agregació del pèptid A $\beta$ (1-28). Tots aquests aspectes es discuteixen de manera més detallada en els apartats que segueixen.

### ***V.1.- Caracterització de la cinètica d'agregació del PrP(185-208) en comparació a la del pèptid A $\beta$ (1-28)***

L'estructura secundària del pèptid A $\beta$ (1-28) en medi aquós depèn del pH del medi en que s'estudia, de manera que a pH entre 1 i 4 o entre 7 i 10 el pèptid no està agregat i presenta majoritàriament una estructura no regular. En canvi, tendeix a adoptar una estructura  $\beta$  agregada a pH entre 4 i 7, que a més es veu afavorida per la temperatura [97, 180]. Així doncs, per dur a terme els experiments exposats en aquesta tesi, es va treballar amb stocks peptídics amb un pH ajustat a 7.5, per tal de garantir un estat monomèric com estat de partida en els experiments d'agregació.

La dependència del pH que exhibeix el pèptid A $\beta$ (1-28) posa de manifest la importància de l'estat de protonació de les cadenes laterals dels aminoàcids que formen part de la seva seqüència (DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNK). Els residus aminoacídics que presenten un pK<sub>a</sub> en la franja de pH en la qual el pèptid agrega són les His (pK<sub>a</sub>~6), Asp i Glu (pK<sub>a</sub>~3), Lys (pK<sub>a</sub>~9) i Arg (pK<sub>a</sub>~10), de tal manera que quan el pH del medi està ajustat a pH 5.5, els Asp con els Glu estan desprotonats i, per tant, carregats negativament, mentre que els residus His es troben protonats i carregats positivament. En aquestes condicions, el pèptid A $\beta$ (1-28) presenta la típica cinètica d'agregació de tipus sigmoïdal (Figura 32), característica de pèptids i proteïnes amiloidogènics. La formació d'estructura  $\beta$  estaria afavorida per l'establiment intermolecular de ponts salins entre parells aminoacídics His-Asp/Glu, Lys-Asp/Glu, tal i com suggereixen alguns treballs [55, 155, 181, 182]. Per altra banda, aquesta estructura  $\beta$  quedaria estabilitzada per les interaccions hidrofòbiques e intermoleculars establertes en el clúster hidrofòbic LVFFV (residus 17-21) [155] (veure, més endavant, *apartat V.6.- Fibres amiloides dels pèptids A $\beta$ (1-28) i Prp(185-208): un model estructural.*).

El fragment priònic PrP(185-208) estudiat en aquest treball es troba formant part del loop comprès entre l'hèlix  $\alpha$ 2 i l'hèlix  $\alpha$ 3 de la PrP<sup>C</sup> humana i part d'aquestes dues hèlices. A la bibliografia no existeixen treballs sobre l'estructura del fragment peptídic PrP(185-208) o que tractin de les seves possibles característiques amiloidogèniques, però a l'estudi fet per W.Q. Zou et al.[183], el fragment priònic 195-213 exhibeix la típica cinètica sigmoïdal de formació de fibres amiloides amb una fase de nucleació inicial. A més la seva agregació es veu afavorida quan el pH del medi és baix. Aquestes condicions mimetitzen l'ambient del sistema endosoma/lisosoma, on es suposa que té lloc in vivo la transformació PrP<sup>C</sup>  $\rightarrow$  PrP<sup>SC</sup>.

A diferència d'aquest estudi i de la cinètica d'agregació del pèptid A $\beta$ (1-28), els resultats d'aquesta tesi mostren que el fragment priònic PrP(185-208) és incapaç d'agregar durant l'interval de temps estudiat, independentment del pH del medi d'incubació (Figura 32). Tal i com mostren els espectres d'IR a elevada concentració de pèptid (Figures 33 i 34) i a diferència del pèptid control A $\beta$ (1-28), el fragment priònic PrP(185-208) presenta al principi de la cinètica una mescla d'estructures desordenada i hèlix  $\alpha$ , que no es transformen al llarg del temps en estructures  $\beta$  (Figura 33 i 34). Aquest resultat demostra que la incapacitat del pèptid priònic d'agregar en els experiments de fluorescència no és tan sols degut a una diferència en la cinètica d'agregació entre el pèptid A $\beta$ (1-28) i el pèptid priònic a les concentracions a que s'han portat a terme els experiments amb ThT, sinó que el fragment priònic és incapaç d'agregar en aquestes condicions experimentals. En el fragment priònic també és possible l'establiment d'interaccions electrostàtiques entre residus His i residus carregats negativament, així com interaccions entre residus negatius i Arg i Lys, de manera semblant a com poden tenir lloc en el pèptid A $\beta$ (1-28), tot i que, aquesta possibilitat no resulta suficient per a la formació de fibres amiloides (veure, més endavant, *apartat V.6.- Fibres amiloides dels pèptids A $\beta$ (1-28) i Prp(185-208): un model estructural.*).

### ***V.3.- Estudi de la influència de l'heparina en el procés d'agregació***

#### **V.3.1.- Cinètiques d'agregació i efecte de la substitució de les His per Ala.**

Els glicosaminoglicans es troben associats als dipòsits amiloides formats in vivo per pèptids i proteïnes tan diversos com el pèptid A $\beta$ , la proteïna tau, l' $\alpha$ -sinucleïna, la  $\beta$ 2-microglobulina o la proteïna priònica [102]. Com ja s'ha comentat a la Introducció, aquests elements de la matriu extracel·lular poden actuar com a moduladors del procés de formació de fibres, ja que es poden unir al motiu consens d'unió a GAGs presents en la seqüència aminoacídica.

D'aquesta manera i continuant en la línia de la caracterització amiloide del fragment priònic PrP(185-208), en aquesta tesi es va plantejar l'estudi comparatiu de la influència dels GAGs en el procés d'agregació. Es va escollir l'heparina com a GAG model ja que és un dels més freqüent i fàcilment utilitzats.

D'acord amb els treballs publicats per McLaurin i Fraser [106, 108], la presència d'heparina en el medi d'incubació provoca una acceleració de la cinètica d'agregació del pèptid control A $\beta$ (1-28) (Figura 39b), a través de la seva interacció amb la seqüència consens VHHQKL. La substitució per Ala tant de la His14 com de la His13 provoca un alentiment de la mateixa. Tal i com s'ha mencionat anteriorment, quan el medi té pH 5.5 es poden establir fàcilment ponts salins entre diferents residus aminoacídics de càrrega elèctrica contrària. A més, aquestes condicions també afavoreixen l'establiment de ponts salins entre les càrregues positives del pèptid i les negatives de l'heparina, de tal manera que el glicosaminoglicà actuaria com una mena de lloc d'anclatge que facilitaria la formació d'estructura  $\beta$ .

En el present treball s'han portat a terme mesures del procés d'agregació del pèptid A $\beta$ (1-28) en presència d'heparina, equivalents a les realitzades en els treballs de McLaurin i Fraser [106, 108], però utilitzant dues tècniques que els autors no havien utilitzat: la mesura de la formació de fibres amiloides amb la sonda ThT i amb espectroscòpia d'IR. Els resultats obtinguts en el nostre cas, són totalment consistents amb els obtinguts per McLaurin i col·laboradors [106, 108] i reafirmen la importància de les His13 i His14 per al procés d'agregació i per l'efecte de l'heparina en aquest procés, en el sentit de produir l'efecte d'alentiment tot just comentat anteriorment.

En el cas del fragment priònic PrP(185-208), el qual no forma agregats amiloides a pH 5.5 (*apartat V.1.- Caracterització de la cinètica d'agregació del PrP(185-208) en*

*comparació a la del pèptid A $\beta$ (1-28)*), en presència d'heparina presenta una cinètica d'agregació (mesurada amb la sonda ThT) típica d'un procés de polimerització nucleada (forma sigmoïdal), semblant a la del pèptid A $\beta$ (1-28) en presència del mateix GAG. El fragment priònic es comporta, per tant, com un pèptid amiloide en presència d'heparina. Les micrografies electròniques obtingudes a partir de les mostres estudiades amb ThT al final del procés, han confirmat la formació de fibres equivalents, en quant a la seva morfologia, a les fibres que formen altres pèptids i proteïnes amiloides.

L'observació de la seqüència d'aminoàcids del fragment priònic PrP(185-208) posa de manifest l'existència d'una histidina (His187), que forma part d'un motiu (KQHTV), prou coincident amb el motiu VHHQKL d'unió a GAGs de l'A $\beta$ (1-28). De fet, els resultats del present treball sobre l'efecte de la substitució de la His187 per Ala en la seqüència del fragment priònic, mostren que es produeix un efecte d'alentiment del procés d'agregació, tal i com s'ha observat en el cas del pèptid A $\beta$ (1-28), tot i que en el cas del pèptid priònic l'efecte és menys accentuat (Figura 39 i Figura 43).

### **V.3.2.- Disminució de la població cel·lular en cultius neuronals tractats amb PrP(185-208)**

D'acord amb treballs ja publicats [184], el pèptid A $\beta$ (1-28), tot i ser capaç de formar agregats amiloides morfològicament equivalents als que formen altres pèptids amiloides citotòxics, no indueix citotoxicitat en cultius cel·lulars (Figura 48). En canvi el pèptid priònic PrP(185-208), tal com s'exposa en aquesta tesi, disminueix en un 20-25% la població cel·lular en cultius de neuroblastoma (Figura 49). Aquest efecte sembla ser independent de la presència d'heparina o del temps d'incubació del pèptid en el moment d'afegir-lo en el cultiu. Tot i així, aquest fet no significa que la interacció del GAG amb el fragment priònic no sigui important per produir un efecte tòxic o que l'espècie tòxica sigui el pèptid monomèric. D'una banda, és possible que, un cop afegit en el medi el pèptid interaccioni amb els GAGs i/o proteoglicans presents en la superfície cel·lular, i de l'altra, que durant el procés d'incubació del pèptid amb les cèl·lules experimenti un procés d'agregació.



***V.4.- Influència dels dendrímers en el procés d'agregació i el seu possible ús en el disseny d'estratègies anti-amiloidogèniques.***

**V.4.1.- Efecte dels dendrímers PAMAM en l'agregació dels pèptids A $\beta$ (1-28) i PrP(185-208)**

Com ja s'ha mostrat prèviament, la presència d'heparina, un polímer amb una elevada densitat de càrrega negativa, en el medi incrementa i accelera el procés d'agregació tant del pèptid A $\beta$ (1-28) com del pèptid PrP(185-208). Considerant els resultats obtinguts amb heparina, es va plantejar la possibilitat de que polímers amb càrrega elèctrica positiva puguin afectar el procés d'agregació i, per tant, va sorgir la possibilitat d'estudiar l'efecte dels anomenats dendrímers. Aquests polímers ramificats són petites esferes que poden tenir una càrrega superficial positiva, negativa o neutra, i s'estudien en una varietat de processos biològics i d'interès biomèdic. En aquest sentit, a la bibliografia es descriu la seva capacitat d'interferir en la producció d'agregats amiloides prionics en cultius cel·lulars infectats [117-119].

Els dendrímers PAMAM, són estructures amb grups amino a la seva superfície i, per tant, carregades positivament a pH neutre. Com s'ha vist en els resultats presentats en aquest treball, són capaços de modular el procés d'agregació tant del pèptid A $\beta$ (1-28) com del PrP(185-208). En ambdós casos, a més, ho fan de manera molt semblant i la interacció depèn de la relació pèptid/dendrímer.

Tenint en compte que l'heparina té càrrega elèctrica negativa i els dendrímers PAMAM estan carregats positivament, és fàcil pensar en una possible interacció directa entre dendrímers i heparina, de manera que la influència del glicosaminoglicà en el procés d'agregació es veïés bloquejada. Els resultats obtinguts sobre l'efecte dels dendrímers PAMAM, demostren però que la possible neutralització de l'heparina no és l'únic efecte en joc en la influència d'aquests polímers en la capacitat del pèptid per formar agregats amiloides. Per una banda, en els experiments sobre l'efecte dels dendrímers en l'agregació del pèptid A $\beta$ (1-28) en absència d'heparina, es constata que els dendrímers són capaços d'interaccionar amb el pèptid (inhibint l'agregació en el temps mesurat, Figura 51). Per altra banda, examinant els resultats de les Figura 51 i Figura 51 (pàgs 100 i 101) es pot veure que si l'únic efecte dels dendrímers fos el de la neutralització de l'heparina, a baixes relacions dendrímer/pèptid, en que la neutralització de l'heparina en el medi seria mínima, la durada de la fase de latència podria aproximar-se a la del control (absència de dendrímer), però mai seria

més curta. És evident però, que a relacions dendrímer/pèptid prou baixes es donen fases de latència més curtes que les del control. Aquest fet implica que el dendrímer està interaccionant també amb el pèptid.

Els dendrímers PAMAM afecten les propietats amiloidogèniques d'ambdues seqüències polipeptídiques. L'ajust matemàtic realitzat per a cada cinètica d'agregació (Taula 9) posa de manifest que la presència del dendrímer afecta principalment la constant de nucleació en el cas del pèptid A $\beta$ (1-28), i la constant d'elongació en el cas del fragment priònic PrP(185-208). Per altra banda, la baixa concentració de PAMAM en el medi (0.01  $\mu$ M) augmenta la constant de nucleació per als dos pèptids estudiats, de tal manera que la formació del nucli d'agregació té lloc de manera més ràpida (fase de latència més curta). En canvi, l'elevada concentració de dendrímer afecta preferentment a la constant d'elongació, fent que aquesta etapa del procés d'agregació sigui més lenta. Aquests resultats fan pensar que quan la concentració de PAMAM és baixa, les molècules de dendrímer podrien actuar com un centre de nucleació, facilitant la interacció entre molècules de pèptid i, per tant, facilitant la formació del nucli d'agregació que precedeix a la formació de fibres. Per altra banda, quan la concentració de PAMAM és més alta, els dendrímers crearien una mena de capa al voltant del nucli d'agregació format pel pèptid, de manera similar a la descrita en treballs sobre la interacció del dendrímers amb l'albumina [185], i que dificultaria l'addició de més monòmers peptídics, alentint la fase d'elongació.

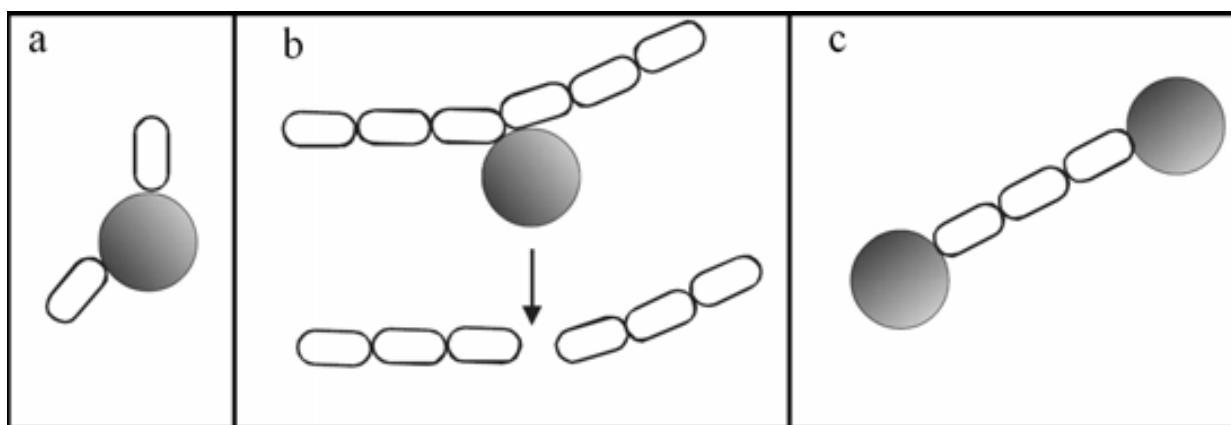
Aquest efecte modulador dels dendrímers pot ser interessant en la recerca de fàrmacs, la diana dels quals sigui la formació d'agregats amiloides i, en concret els intermediaris estructurals de baix pes molecular que podrien ser responsables de la toxicitat cel·lular. En aquest sentit, les baixes concentracions de PAMAM podrien accelerar la formació de fibres amiloides i, per tant, disminuir el temps de vida mitja dels agregats formats abans de les fibres (efecte neuroprotector). Aquest efecte seria més important en el cas del pèptid A $\beta$ (1-28) que en el pèptid PrP(185-208), per al qual la presència del dendrímer té un menor impacte en la fase de nucleació. Contràriament, l'elevada concentració de PAMAM alentiria la formació de fibres i augmentaria el temps de vida mitja de les espècies oligomèriques, de manera que contribuiria a l'augment de la citotoxicitat. Així doncs, les dades exposades en aquest estudi poden ajudar en l'estudi dels dendrímers com a possibles agents anti-amiloidogènics.

Pel que fa al disseny i desenvolupament de fàrmacs que actuïn sobre la formació de fibres, recentment s'han identificat diversos agents inhibidors (porfirines, ftalocianines i policicles aromàtics) [186-188]. Es poden distingir dos tipus d'inhibidors: cinètics o termodinàmics. [189] segons la forma de la corba d'agregació en comparació amb la corba

control, de tal manera que els inhibidors cinètics serien aquells que no afectarien al plateau assolit al final de la corba (quantitat final de fibres formades) sinó que afectarien a la durada de la fase de nucleació i, per tant, a la velocitat de formació de les fibres. Per altra banda, els inhibidors termodinàmics no afecten a la velocitat d'agregació sinó que redueixen la quantitat final de fibres formades.

A partir dels experiments portats a terme en aquesta tesi per tal d'avaluar la influència de la generació de dendrímer PAMAM, es pot dir que es podria donar una inhibició cinètica en el cas del fragment priònic PrP(185-208) en presència de 0.01 i 0.1  $\mu\text{M}$  PAMAM-G4 i de 0.01 i 0.1  $\mu\text{M}$  PAMAM-G5 (s'observa clarament un allargament de la fase de nucleació, però s'assoleix el mateix nivell de fluorescència al final de les sigmoides, Figura 55b,c). Per altra banda, en el cas del pèptid  $\text{A}\beta(1-28)$  en presència de PAMAM-G4 i PAMAM-G5 es pot observar un efecte d'inhibició termodinàmica, els quals tenen un efecte molt petit en les constants de nucleació i elongació (Taula 10) però que clarament disminueixen el valor del plateau final de la corba (Figura 55a,b).

Prenent en consideració els diferents mecanismes de formació de fibres amiloides i els diferents tipus d'inhibidors, a la bibliografia es poden trobar diferents models per a aquesta inhibició: per inhibició de la concentració efectiva de pèptid, per bloqueig dels extrems de creixement de les fibril·les, o per augment de la velocitat de trencament de les fibril·les. [189], tal com s'esquematitza a la Figura 80.



**Figura 80. Possibles vies d'inhibició de la formació d'agregats amiloides:** (a) per unió a les molècules de pèptid, (b) per trencament de les fibril·les, (c) per bloqueig dels extrems de creixement de les fibril·les. L'inhibidor de la formació d'agregats està representat per un cercle gris.

Els inhibidors, com per exemple els dendrímers, es poden unir a les molècules de pèptid i disminuir la concentració de pèptid capaç d'autoensamblar-se per formar fibres (Figura 81a). En aquest sentit, l'afinitat dels dendrímers per les proteïnes ha estat àmpliament

descrita a la bibliografia [185, 190]. Poden crear una mena de capa a la superfície de proteïnes com l'albumina i modificar, així, la seva conformació, o afectar l'activitat enzimàtica. Aquest mecanisme d'inhibició es pot donar en els experiments en presència dels dendrímers presentats en aquesta tesi. A baixa concentració de dendrímer però (baixa relació dendrímer/pèptid) l'efecte del bloqueig de monòmers no seria gaire eficaç (disminuiria poc la concentració efectiva de pèptid monomèric) i, de fet, en aquestes condicions encara s'observen clares agregacions sigmoïdals, això sí, amb les cinètiques afectades.

Un fet comú a ambdós pèptids és l'acceleració de la cinètica d'agregació quan el medi conté una concentració baixa de PAMAM (0.01  $\mu$ M), independentment de la seva generació. Aquest efecte és típic d'inhibidors que afecten a la velocitat de trencament de les fibril·les [191]. Un nivell de trencament moderat durant el transcurs del procés amiloidogènic pot augmentar la velocitat de formació de nous agregats peptídics ja que els fragments resultants dels trencaments poden actuar com a llocs de nucleació per donar lloc a fibres madures. Si la velocitat d'aquest trencament és massa elevada es pot donar el cas que disminueixi progressivament la població fibril·lar fins que en el medi només restin monòmers peptídics. D'aquesta manera si el mecanisme inhibitori de la fibril·logènesi té lloc per acceleració d'aquest procés de trencament, una baixa dosi d'inhibidor podria accelerar la fibril·logènesi, subministrant nous agregats que serveixin com a centres d'agregació (de nucleació). Aquest efecte ha estat demostrat en el cas del Congo Red [192].

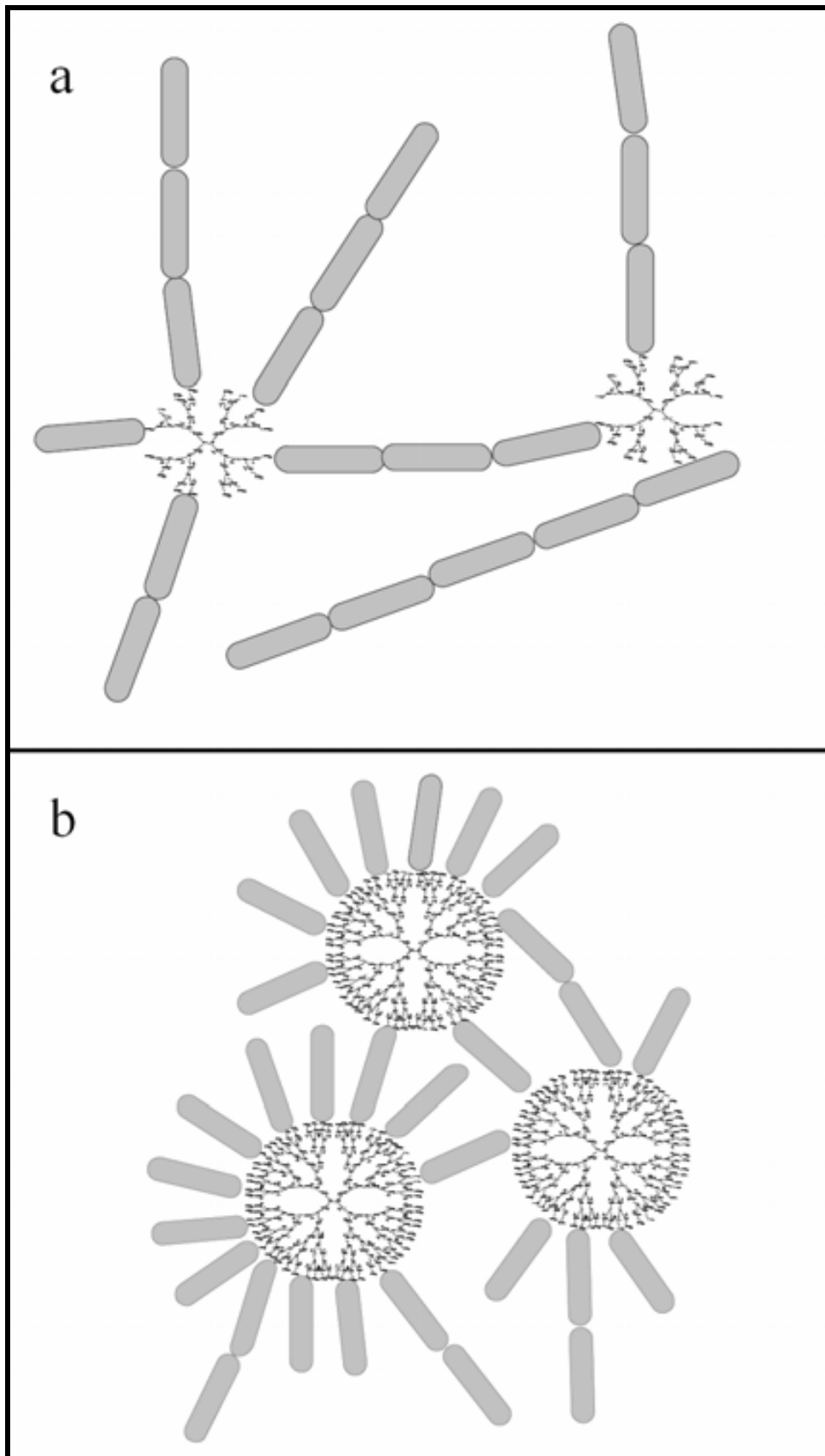
La capacitat dels dendrímers per desagregar fibril·les pre-existents es mostra a la Figura 57. A mida que disminueix el tamany del dendrímer, major és la concentració necessària per desagregar les fibril·les, d'acord amb l'efecte descrit de la poli-L-lisina sobre els agregats amiloides [191]. Aquest polipèptid té una gran capacitat per dissoldre els agregats amiloides, a diferència dels monòmers de L-lisina, de petit tamany en comparació amb el polipèptid.

Finalment, la formació de fibres amiloides pot ser inhibida per bloqueig dels extrems de creixement de les fibril·les. Sovint, els inhibidors que produeixen aquest efecte són semblants a les proteïnes i pèptids amiloides [193], de tal manera que es poden unir fàcilment als extrems de les fibril·les i en bloquejen la seva elongació degut a la seva diferent estructura. Tot i que, els dendrímers han estat considerats com a proteïnes artificials i que en alguns casos poden mimetitzar certes funcions [194], òbviament no mantenen una gran similitud amb les proteïnes, però de tota manera, és possible que puguin unir-se inespecíficament a les fibril·les amiloides afectant, així, a la seva elongació. Aquesta hipòtesi es recolza en les micrografies electròniques mostrades per al fragment prioníic PrP(185-208) a la Figura 56. En presència de

dendrímers de generació petita (PAMAM-G3) les fibril·les tenen una aparença més curvada i tendeixen a organitzar-se en grups, potser degut a la forma estrellada del dendrímer i el fet de que la superfície d'aquest conté un gran nombre de grups amb els que pot interaccionar amb els pèptids o les fibril·les, tal i com mostra el model proposat a la Figura 80a. El dendrímer PAMAM-G5, donat el seu major tamany i major nombre de grups a la seva superfície, sembla ser més efectiu per interaccionar amb els monòmers peptídics i/o per trencar de manera més eficient (i ràpida) les fibril·les pre-formades, ja que és menor la quantitat de fibres que s'observen per microscòpia electrònica (Figura 56c). Així, i tal com s'indica a la Figura 81b els PAMAM-G5 podrien acabar bloquejant els monòmers peptídics.

En general, com més gran és el tamany de la molècula de dendrímer, major és l'activitat observada contra la formació de fibril·les, fet que concorda amb estudis ja publicats sobre la capacitat de disrupció d'agregats prionics en cultiu cel·lular [118] i que mostren que els dendrímers de poliamidoamina i polipropileneimina són una eina eficaç per a l'eliminació de PrP<sup>SC</sup> degut a la seva gran ramificació. En els estudis presentats en aquesta tesi, 1  $\mu$ M de PAMAM-G5 és suficient per inhibir completament la formació de fibres (en l'interval de temps mesurat). Aquesta concentració de dendrímer correspon a una relació pèptid:dendrímer 50:1 i a una relació de pèptid:grups positius de la superfície de 2.56. Això il·lustra com concentracions molars relativament baixes de dendrímer poden ser eficients gràcies a l'elevat nombre de càrregues superficials.

Per altra banda, la naturalesa química d'aquests grups ( $-\text{NH}_2$ ) i, per tant, les interaccions electrostàtiques que puguin tenir lloc entre el pèptid i el dendrímer, són de gran importància, com posa de manifest l'ineficient efecte inhibitori dels dendrímers amb grups  $-\text{OH}$  en el treball de S. Supattapone et al. [118].



**Figura 81. Model d'interacció entre els pèptids i les fibril·les en presència de dendrímers PAMAM.**  
 (a) generació petita (PAMAM-G3), (b) generació gran (PAMAM-G5)

#### **V.4.2.- Efecte dels P-dendrímers en l'agregació del pèptid PrP(185-208)**

Els dendrímers que contenen fòsfor han estat descrits com a agents capaços d'interferir en la replicació dels prions en models animals [120]. De fet, els resultats exposats en aquesta tesi posen de manifest que aquest tipus de dendrímer és capaç també d'inhibir l'agregació del fragment priònic PrP(185-208). Concretament, la presència de P-dendrímers en el medi disminueix el nombre de fibres formades i augmenta la durada de la fase de nucleació, fent el procés de fibril·logènesi notablement més lent. Els resultats de fluorescència (Figura 59) semblen indicar que els P-dendrímers podrien interferir en les interaccions entre els monòmers i oligòmers peptídics que solen tenir lloc durant la fase de nucleació i que permeten la formació de fibres. Aquests resultats estan d'acord amb el treball de J.Solassol et al. [120] en que es descriu la capacitat dels P-dendrímers per unir-se a la proteïna priònica.

Els espectres de FTIR mostren una mescla inicial d'estructures  $\alpha$  i desordenada, a mida que avança el temps d'incubació apareix la banda característica d'agregats rics en estructura  $\beta$ . L'efecte del dendrímer en la cinètica d'agregació per FTIR és comparable a l'obtingut per fluorescència, mantenint les mateixes relacions dendrímer:pèptid. En tots dos casos existeix una concentració òptima de dendrímer amb la qual s'obté el màxim efecte en la fase de nucleació. En aquestes condicions, la relació dendrímer:pèptid és de 0.02 (1  $\mu$ M de dendrímer). Una relació dendrímer:pèptid 10 vegades menor o 10 vegades major suposa una fase de nucleació més ràpida, tot i que la concentració de fibres al final del procés sempre és menor que en el control.

L'activitat del dendrímer depèn dels grups catiónics que conté a la seva superfície, de tal manera que, molt probablement, les interaccions entre aquest i el pèptid i tinguin lloc mitjançant interaccions electrostàtiques. Les condicions de treball a pH 5.5 mimetitzen certs compartiments cel·lulars àcids, com els lisosomes, on tindria lloc la interacció entre els dendrímers i PrP<sup>SC</sup> [119]. A pH 5.5, aproximadament un 70% de les amines terminals presents a la superfície del dendrímer estan protonades. És possible que els 6 grups catiónics individuals de la superfície del dendrímer s'uneixin als monòmers i/o oligòmers formats durant la fase de nucleació, impeding que es puguin unir més molècules de pèptid o bé que els oligòmers es combinin per donar lloc a les fibres. Així doncs, tenint en consideració l'elevat nombre de grups catiónics i el seu elevat grau de protonació, es pot explicar que relacions relativament baixes dendrímer:pèptid puguin interferir de manera eficaç en el procés d'agregació.

Finalment, cal remarcar que els P-dendrímers són capaços d'eliminar ràpidament les molècules de PrP<sup>SC</sup> del medi d'incubació en un temps aproximat de 4 hores [120]. Aquesta activitat no solament suposa una unió als monòmers i la inhibició de la síntesi de novo sinó que, de manera semblant als dendrímers PAMAM, també pot tenir lloc un trencament dels oligòmers i/o fibril·les formades.

#### **V.4.3.- Els dendrímers com a agents terapèutics anti amiloidogènics**

La influència dels dendrímers en l'agregació dels prions ja ha estat estudiada prèviament [117-119], encara de manera molt limitada, però quan hom examina la bibliografia referent al pèptid A $\beta$  no troba cap treball experimental. Aquesta tesi exposa el primer estudi en que es descriu un efecte dels dendrímers sobre pèptids relacionats amb la malaltia d'Alzheimer i, a més, estén i detalla l'estudi de la influència dels dendrímers en els processos d'agregació dels pèptids i proteïnes priòniques. La gran semblança entre els efectes dels dendrímers en l'agregació dels pèptids estudiats (l'A $\beta$ (1-28) i el PrP(185-208)), suposa, afegida a la hipotètica homologia estructural proposada per R. Mahfoud et al. [101], una nova característica comuna entre aquests dos pèptids.

Així doncs, i segons el que hem discutit en els paràgrafs anteriors, els dendrímers semblen interferir en la formació de fibres amiloides de dues maneres diferents: per bloqueig del creixement fibril·lar i per trencament de les fibril·les formades, tot i que la seva eficiència és limitada i pot esdevenir en la formació d'agregats amorfs i no fibril·lars. Cal remarcar que les fibres amiloides, gràcies a la seva estructura, són resistents a les proteases. S. Supattapone et al. [119] han demostrat que en presència de dendrímers, els agregats resistents tornen a ser sensibles a l'atac per proteases. Aquest fet pot ser de gran utilitat en el disseny i desenvolupament de nous fàrmacs antripriònics. Tot i així, cal tenir en consideració el problema que suposa la barrera hematoencefàlica. En el cas dels P-dendrímers no existeix cap evidència experimental de que molècules tan grans puguin creuar aquesta barrera i entrar en el sistema nerviós central. En aquest cas, els dendrímers haurien d'ésser subministrats directament a través del fluid cerebrospinal o ésser sintetitzats com a pro-fàrmac amb capacitat per creuar la barrera hematoencefàlica [120]. Alternativament, resulta interessant seguir investigant les propietats del dendrímers per trobar estructures que no tinguin efectes indesitjables. Els dendrímers PAMAM poden resultar tòxics i d'altra banda, també caldria minimitzar la grandària, amb l'objectiu d'aconseguir substàncies que fossin capaces de travessar la barrera hematoencefàlica.



## ***V.5.- Efecte dels membranes biològiques***

### **V.5.1.- Efecte dels lípids sense càrrega neta en la cinètica d'agregació del pèptid A $\beta$ (1-28)**

Tal i com s'ha comentat a la Introducció, les proteïnes i pèptids amiloidogènics poden interaccionar amb les membranes biològiques i aquestes interaccions poden tenir un paper clau en els mecanismes de toxicitat. El pèptid A $\beta$  té un fragment C-terminal transmembrana, gràcies al qual podria pertorbar l'estructura de la bicapa lipídica, formar canals iònics o fins i tot afectar a la fluïdesa de la membrana [131, 144, 195-204]. En alguns d'aquests estudis però, s'ha vist que la interacció de la part hidrofílica del pèptid (segment 1-28) amb la superfície de la membrana també pot ser important, quan aquesta presenta una certa càrrega elèctrica. A més, la hipotètica afinitat tant del pèptid A $\beta$ (1-28) com del PrP(185-208) per esfingolípid, obre la porta a possibles interaccions d'aquests pèptids amb membranes que continguin aquests tipus de lípids.

En el present treball s'ha utilitzat un extracte lipídic de cervell, amb el qual s'aconsegueix una ratio molt similar a la fisiològica, dels principals components de la membrana (fosfolípids, gangliòsids, colesterol i esfingomielina). Tot i que el fragment del pèptid de l'Alzheimer estudiat no conté el segment transmembrana, s'ha vist que hi ha agregació i formació de fibres en presència d'aquestes membranes lipídiques (Figura 63). La presència de liposomes d'extracte de cervell accelera la cinètica d'agregació del pèptid A $\beta$ (1-28) a pH 5.5 i es forma un major nombre de fibres. A pH 7.5 la presència de membranes és necessària per a la formació de fibres a alta concentració de pèptid. A pH 7.5 i baixa concentració, en canvi, el pèptid no agrega independentment de la presència o absència de membranes. Aquest fet seria consistent amb els resultats presentats per C.M.Yip i J.McLaurin [174], en els que es va treballar a pH neutre i baixa concentració de pèptid (inferior a 50  $\mu$ M). Aquests autors conclouen que, tot i associar-se amb els caps polars dels fosfolípids de les membranes, el pèptid no podria formar estructures riques en fulla  $\beta$ . El mateix efecte accelerador i intensificador de la formació de fibres s'ha observat en presència de membranes, la composició lipídica de les quals simula la dels microdominis lipídics coneguts com a rafts (PC:GalCer:SM (2:1:1) v:v i PC:Chol:SM:GalCer (2:1:0.5:0.5) v:v). De fet, a la bibliografia hom troba diverses evidències de la influència dels rafts lipídics en el canvi estructural que ha d'experimentar el pèptid abans de formar fibres i en la seva oligomerització [178, 205-208]. Per altra banda, a baixa concentració de pèptid, membranes de PC:SM o de PC:GalCer, no

tenen cap influència en l'agregació del pèptid, mentre que les membranes de PC:Chol alenteixen el procés d'agregació i disminueixen el nombre final de fibres. Els estudis d'IR en canvi, efectuats mantenint la relació lípid/pèptid constant, però amb una concentració de pèptid 20 vegades més alta (1.2 mM), donen resultats diferents. Les diferents composicions lipídiques tendeixen a disminuir la formació d'estructura  $\beta$ .

En els cas de les mesures d'IR, s'ha de considerar que l'estructura  $\beta$  que es detecta no és només la de les fibres. Alguns dels oligòmers d'alt pes molecular que es formen durant la fase de latència i que al final del procés coexisteixen amb les fibres (Figura 36a) també contenen estructura  $\beta$  [209], que en els espectres d'infraroig serà detectada juntament amb la de les fibres. Per altra banda, en els estudis de fluorescència a baixa concentració de pèptid, la sonda ThT només detecta formació de fibres. D'aquesta manera, els resultats obtinguts (Figura 63a) mostren que les membranes d'extracte de lípid de cervell o amb composició lipídica típica de raft incrementen la formació de fibres. En aquest sentit, cal destacar que T.J.Pinehiro et al. [150] (Figura 19), han proposat un efecte semblant per a la proteïna priònica en presència de rafts lipídics. D'altra banda, els nostres resultats indiquen que les membranes fetes de PC i colesterol, disminueixen la formació de fibres.

Examinant els resultats obtinguts en l'estudi de la influència de les membranes d'extracte de cervell en el procés d'agregació a elevada concentració de pèptid (Figura 67a, mesures de FTIR), s'observa una menor formació d'estructura  $\beta$  en presència d'aquest tipus de membranes model. Com que s'ha mantingut la relació lípid/pèptid, la concentració del pèptid en les membranes pot ser la mateixa que la dels experiments amb ThT. Tenint aquest fet present, si les membranes d'extracte de cervell incrementen les fibres formades però disminueixen la quantitat total d'estructura  $\beta$ , és raonable pensar que la disminució d'estructura  $\beta$  és deguda a una disminució d'espècies  $\beta$  no fibril·lars (oligòmers d'alt pes molecular). Possiblement les membranes tenen una alta afinitat per les espècies no fibril·lars, formades durant la fase de nucleació, que contenen estructura  $\beta$  i les transformen en fibres més del que ho farien en absència de membranes. D'aquesta manera, en el medi quedarien espècies no-fibril·lars sense estructura  $\beta$ , possiblement en més abundància de les que hi queden quan no hi ha membranes. En resum, les membranes de lípid de cervell i les que simulen rafts augmenten la quantitat de fibres formades, respecte el control en absència de membranes, però disminueixen la quantitat d'espècies  $\beta$  no fibril·lars presents en el medi.

L'efecte del colesterol, que implica tant una disminució del nombre de fibres formades (experiments de ThT) com del total d'estructura  $\beta$  (experiments d'IR), podria ser degut a una

elevada afinitat per part de les espècies no-fibril·lars i sense estructura  $\beta$  per les membranes de PC:Chol. Aquesta interacció faria que aquestes espècies no-fibril·lars no progressessin ni cap a espècies fibril·lars amb estructura  $\beta$  ni cap a fibres.

Un altre aspecte interessant, és l'efecte de les membranes a pH 7.5 (Figura 63b i Figura 67b). En aquest cas, els experiments amb ThT conclouen que no es formen fibres durant l'interval de temps mesurat. Els experiments d'IR, però, ens indiquen que les membranes (unes composicions lipídiques més que altres) afavoreixen la formació d'estructura  $\beta$ . Aquesta estructura  $\beta$  correspondria en part a les fibres que s'han detectat per microscòpia electrònica i, en altra part, a oliogòmers  $\beta$  d'alt pes molecular (no fibril·lars). Per tant, quan les His del pèptid estan desprotonades i sense càrrega (pH 7.5) les membranes, afavoreixen la formació d'estructures  $\beta$ . És interessant observar que aquest efecte depèn de la presència de la Tyr10 en la seqüència del pèptid, ja que l'efecte no es produeix si es substitueix aquest residu per Ala. D'aquesta manera, la formació d'una major quantitat d'estructura  $\beta$ , dependria d'una interacció de la Tyr10 amb les membranes. Aquesta interacció, però, no sembla dependre de la presència de GalCer a les membranes.

La Tyr 10 és necessària també per a l'agregació del pèptid en absència de membranes. A pH 5.5 i baixa concentració de pèptid no s'observa formació de fibres (Figura 63c), però sí que s'observa formació d'estructura  $\beta$  en els experiments d'IR (Figura 67c), la qual correspon almenys en part a les fibres detectades per microscòpia electrònica. D'aquesta manera, s'entén que l'absència de la Tyr 10 alenteixi el procés d'agregació a pH 5.5 (His protonades i carregades) i que no s'observi agregació a pH 7.5 (Figura 67d).

Pel que fa a la interacció amb esfingolípid en general, tal i com suggereixen els treballs del grup de recerca de J. Fantini [101, 177-179], es podrien establir interaccions d'stacking  $\pi$ - $\pi$  entre els anells de sucre presents en esfingolípid com la GalCer i l'anell de la Tyr present en la seqüència del pèptid A $\beta$ (1-28). Els estudis realitzats en la present tesi amb una seqüència peptídica en la qual la Tyr10 del pèptid A $\beta$ (1-28) ha estat substituïda per Ala, demostren que aquest residu resulta de vital importància ja per l'agregació del pèptid en absència de membranes lipídiques, de manera que la seqüència mutant no agrega. De totes maneres, el resultat dels processos d'agregació de la seqüència wild type estudiats en presència de membranes que contenen GalCer, indiquen que no es produeixen interaccions específiques amb aquest esfingolípid que puguin influir en el procés d'agregació. Els efectes inductors de l'agregació depenen de la presència conjunta de GalCer i SM, i probablement depenguin d'altres tipus d'interaccions entre el pèptid i aquest lípid [101]

### **V.5.2.- Efecte dels lípids sense càrrega neta en la cinètica d'agregació del pèptid PrP(185-208)**

En examinar la bibliografia sobre prions, hom se n'adona de l'absència de treballs sobre fragments peptídics derivats de la proteïna priònica humana, ja que la major part de la recerca està centrada en la proteïna sencera, ja sigui recombinant o purificada. Únicament es poden trobar treballs sobre el fragment 106-126, l'anomenat "miniprió" donat el seu comportament citotòxic i amiloide, comparable al de la proteïna sencera. En tots dos casos, se sap que les membranes biològiques poden modular el seu procés d'agregació. Tenint com a punt de partida el treball en que R. Mahfoud et al. [101] proposen un motiu d'unió a esfingolípids present en el fragment priònic PrP(185-208), un dels objectius en aquesta tesi va ser comprovar si la composició lipídica influeix en el procés d'agregació del citat pèptid.

Tal i com mostren els resultats, el fragment priònic PrP(185-208) però, no agrega ni forma fibres en presència de cap de les membranes electroneutres model estudiades, ni en presència ni en absència de GalCer (el lípid que podria interaccionar específicament amb la Phe187 del fragment priònic). Aquest resultat es dona tant a concentració peptídica baixa com elevada, de tal manera que es pot dir que la incapacitat de formar fibres en presència de lípid és una característica intrínseca d'aquesta seqüència peptídica. No es tracta, però, de que el pèptid no interaccioni amb les membranes. De fet els resultats obtinguts d'estudiar la interacció del pèptid amb les mateixes membranes model electroneutres marcades amb la sonda di-8-ANEPPS, demostren que hi ha una certa interacció del pèptid amb les bicapes lipídiques, suficient com per produir una alteració del valor del potencial dipolar de membrana. En qualsevol cas, aquesta interacció no és rellevant per al procés de formació d'agregats amiloides i, certament, no sembla dependre de la presència de GalCer a les membranes. En aquest sentit, la hipòtesi de J. Fantini [101, 177-179], que implicaria l'existència d'una relació entre el procés d'agregació i la possible unió de anells aromàtics al sucre de la galactosilceramida, no és aplicable al cas del pèptid PrP(185-208).

### **V.5.3.- Efecte dels lípids amb càrrega neta negativa en la cinètica d'agregació dels pèptids A $\beta$ (1-28) i PrP(185-208)**

Hi ha treballs que posen de manifest la capacitat del pèptid A $\beta$  per interaccionar amb les membranes lipídiques i, en particular, amb les que contenen fosfolípids carregats negativament [129], els quals induïrien el canvi conformacional amb que s'inicia el procés de

fibril·logènesi. En aquest sentit, cal remarcar el treball d'A.Chauhan et al. [129] en que es posa de manifest una relació directa entre els fosfolípids aniònics (PS, PA, PI, PIP, PIP<sub>2</sub>) i la fibril·logènesi d'Aβ, i que aquesta augmenta amb el grau de fosforil·lació de PI (és a dir, PIP<sub>2</sub>>PIP>PI). En presència d'aquest tipus de fosfolípid es promou la fibril·logènesi d'Aβ, mentre que quan s'incuba Aβ en presència de gangliòsids o de fosfolípids aniònics sense grups fosfat, no hi ha indicis d'agregació. Així doncs, aquests autors suggereixen que els grups fosfat són necessaris per a que tingui lloc la interacció Aβ-lípid, mitjançant la unió als residus aminoacídics carregats positivament. En el cas dels pèptid Aβ(1-40) i Aβ(1-42) es produiria la interacció del fragment C-terminal dels pèptids amb la part hidrofòbica de la membrana. En aquest mateix treball, es conclou que el fragment peptídic Aβ(1-28) no interaccionaria amb membranes carregades negativament amb àcid fosfatídic. En canvi, en els resultats exposats en aquesta tesi queda demostrada la interacció del fragment Aβ(1-28) amb membranes de PC:PS i el seu procés de formació de fibres amiloides, tant a baixa com a elevada concentració peptídica. En presència de membranes model que contenen un 10% de càrrega negativa neta s'observa una cinètica d'agregació que dona lloc a fibres amiloides, amb la típica morfologia microscòpica. Aquesta cinètica, a més, es veu accelerada si el pH del medi està ajustat a 5.5. Aquests resultats no contradiuen necessàriament els d'A.Chauhan et al. [129], ja que si hom examina i compara les condicions experimentals pot veure que el pH del medi està ajustat a pH 7.4. En aquestes condicions de pH, nosaltres hem trobat que es formen agregats i formes oligomèriques d'una manera molt més lenta que a pH 5.5 i, probablement, no foren detectats en el treball d'A.Chauhan et al. A més, també hem comprovat, mitjançant mesures amb la sonda di-8-ANEPPS, que el pèptid Aβ(1-28) interacciona amb les membranes model, modificant la magnitud del potencial dipolar de membrana.

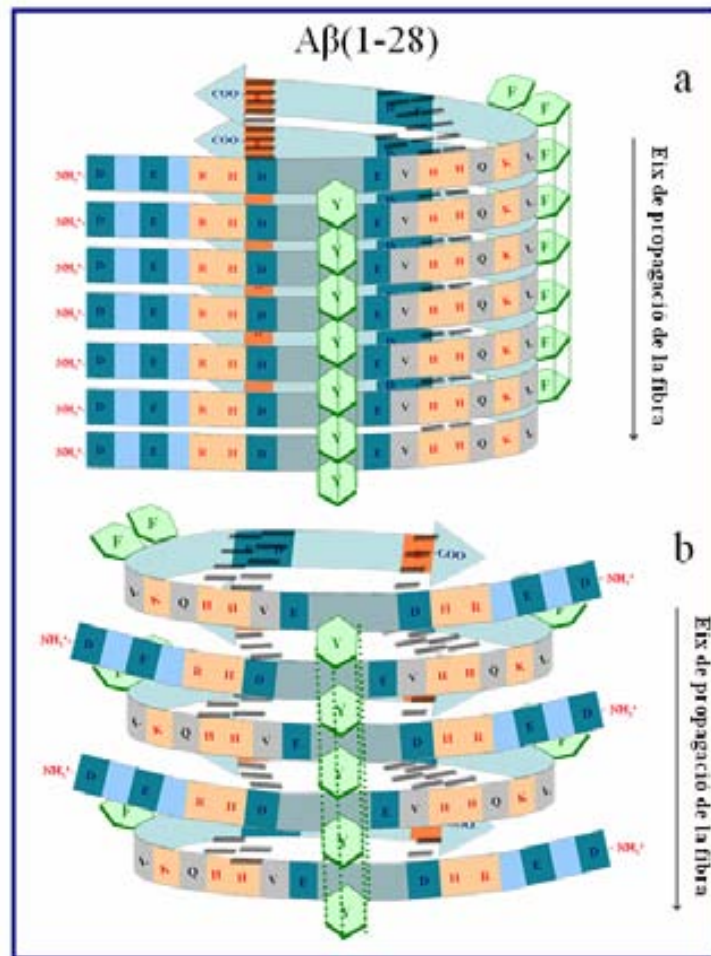
En el cas de la proteïna priònica se sap que es localitza en els caveolae, regions de la membrana que contenen colesterol i esfingolípids principalment, però també una quantitat significativa de gangliòsids amb càrrega negativa [130, 210]. Estudis fets amb membranes model posen de manifest la capacitat de PrP<sup>C</sup> per unir-se a membranes amb glicerofosfolípids carregats negativament i experimentar un canvi conformacional cap a la forma PrP<sup>SC</sup> [151, 152]. Aquesta unió pot tenir rellevància en el procés de conversió PrP<sup>C</sup> → PrP<sup>SC</sup> que té lloc en caveolae. Estudis recents mostren com el fragment priònic PrP(106-126) adopta estructura β en presència de membranes model amb càrrega negativa [211]. Els resultats obtinguts en aquesta tesi sobre el pèptid priònic PrP(185-208) demostren clarament que el pèptid és capaç de seguir una cinètica d'agregació amiloide amb formació de fibres en presència de

membranes carregades negativament amb PS. L'agregació d'aquest pèptid, que no forma agregats quan es troba sol en el medi, depèn de la presència d'una certa densitat de càrrega negativa, ja sigui associada a un polímer com l'heparina o a la superfície de les membranes biològiques.

La capacitat dels pèptids d'interaccionar amb la superfície de membranes carregades negativament i la influència que aquesta interacció pugui tenir en el procés d'interacció, és rellevant en relació a alguns processos biològics relacionats amb l'aparició de càrregues negatives a la superfície de les membranes. Els fosfolípids es distribueixen de manera asimètrica en la membrana plasmàtica: els fosfolípids àcids es troben orientats cap a la part citoplasmàtica de la membrana, mentre que els fosfolípids sense càrrega es troben orientats cap a l'exterior cel·lular. En situacions de dany cel·lular, com processos d'oxidació i d'apoptosi, la membrana perd la seva asimetria i els fosfolípids aniònics com la PS es transloquen des de la monocapa interna cap a la monocapa externa de la membrana. D'aquesta manera, la PS quedaria exposada cap a la superfície extracel·lular i així podria interaccionar amb el pèptid A $\beta$ . De fet, a la bibliografia existeixen diverses evidències que correlacionen la deposició d'A $\beta$  en la malaltia d'Alzheimer i l'estrés oxidatiu, de manera que la pèrdua d'asimetria i, per tant, la translocació de PS, generada amb l'estrés oxidatiu que acompanya a la malaltia, podria acabar provocant una major acumulació de pèptid amiloide en les membranes de les cèl·lules afectades.

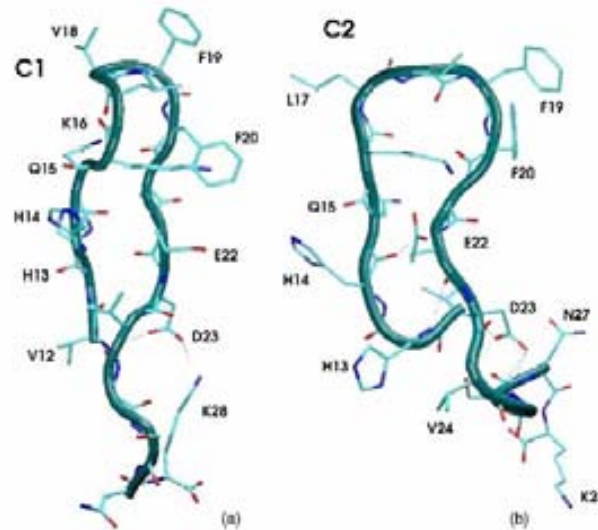
**V.6.- Fibres amiloides dels pèptids  $A\beta(1-28)$  i Prp(185-208): un model estructural.**

Els resultats obtinguts en l'estudi del pèptid  $A\beta(1-28)$  permeten, considerats en el seu conjunt i en relació a d'altres treballs, proposar un model d'estructura que explicaria la formació de fibres. Aquest model es presenta de manera esquemàtica a la Figura 82.



**Figura 82. Model estructural de les fibres amiloides formades pel pèptid  $A\beta(1-28)$ , (a) amb fulla  $\beta$  paral·lela o (b) amb fulla  $\beta$  antiparal·lela. En ambdós casos es podrien establir interaccions salines entre His-Glu/Asp i Asp-Lys i interaccions d'stacking  $\pi$ - $\pi$  a través de l'apilament intermolecular del residu de Tyr10. Les Phe19 i Phe20 també podrien apilar-se i establir interaccions d'stacking  $\pi$ - $\pi$  intermoleculars principalment en el cas de la fulla  $\beta$  paral·lela.**

La cadena polipeptídica en forma d'estructura  $\beta$  es tancaria sobre ella mateixa, formant una forquilla estabilitzada per la interacció entre residus His i residus Asp i Glu. La formació d'una forquilla d'aquesta mena, ha estat proposada per A.Baumketner i J.E. Shea [182] en una simulació per dinàmica molecular (Figura 83) per al fragment 12-28 del pèptid.



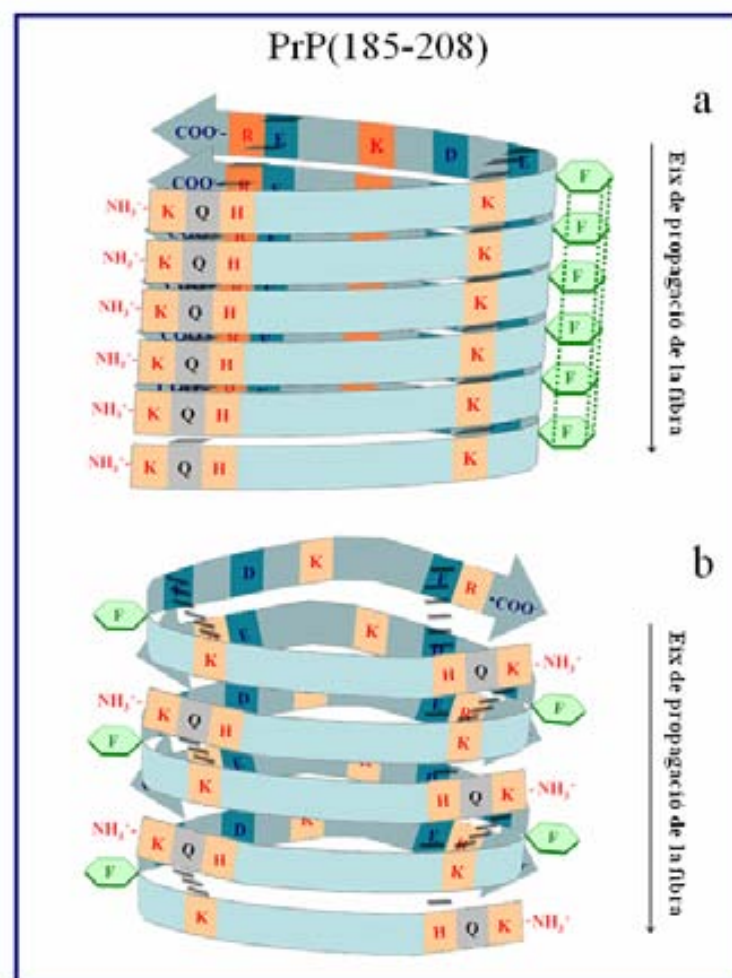
**Figura 83. Models estructurals proposats per al pèptid Aβ12-28.** Extret d'A.Baumketner i J.E. Shea [182].

La formació de la forquilla vindria possibilitada per la formació de ponts salins entre les His13 i His14 i els Glu22 i Asp23. Aquesta estructuració, permetria que l'apilament de forquilles donés lloc a un alineament dels anells aromàtics de la Tyr10, de tal manera que s'establirien interaccions d'apilament  $\pi$ - $\pi$ . Així doncs, a l'estructura de la fibra hi hauria una franja longitudinal de residus His que dibuixaria un possible lloc d'unió d'heparina i una altra franja longitudinal d'anells aromàtics dels residus de Tyr que interaccionarien entre ells, contribuint a estabilitzar l'estructura. Aquest model comporta, a més, l'apilament dels residus Phe19 i Phe20, que podrien contribuir també, a través d'interaccions entre els anells aromàtics, a l'estabilització de l'estructura.

El model permet explicar els efectes de la substitució dels residus His per Ala, i també, els resultats observats en els experiments en que les Tyr han estat substituïdes per Ala. La substitució del residu His13 o His14 per Ala impedeix la formació d'interaccions electrostàtiques que estabilitzin la forquilla. En aquestes condicions, però, les fibres es poden formar, tot i que més lentament, ja que encara es poden donar les interaccions per apilament  $\pi$ - $\pi$  dels residus de Tyr10 i els residus de Phe19 i Phe20. Per altra banda, l'apilament de les Tyr10 permet explicar l'alentiment de la cinètica d'agregació, quan es substitueix aquest residu per Ala a pH 5.5 (His carregades positivament) i inhibidor de la formació de fibres a pH 7.5 (His no carregades).



En el cas del pèptid priònic, la Figura 84 mostra la possible formació d'una forquilla similar a la del pèptid A $\beta$ (1-28). Fins i tot, amb un parell iònic prop del gir de la forquilla i amb un alineament de residus d'His i també de residus Phe, que podrien establir interaccions d'stacking  $\pi$ - $\pi$  a través de l'apilament de les cadenes aromàtiques. Tot i així, els resultats mostren clarament que el pèptid priònic per sí mateix no forma agregats amiloides. Examinant l'estructura esquematitzada a la Figura 84, sembla que aquest fet podria ser degut a l'existència de càrregues elèctriques no compensades que introduirien efectes repulsius, més importants que els atractius. La presència d'heparina o de membranes carregades negativament podria, però, contribuir a vèncer aquestes repulsions interaccionant amb la franja d'His i Lys, i afavorir així la formació de fibres, tal com s'ha vist en els resultats presentats.



**Figura 84. Model estructural de les fibres amiloides formades pel pèptid PrP(185-208), (a) amb fulla  $\beta$  paral·lela o (b) amb fulla  $\beta$  antiparal·lela. En ambdós casos es podrien establir interaccions salines entre His/Lys-Glu, però les interaccions d'stacking  $\pi$ - $\pi$  a través de l'apilament intermolecular del residu de Phe198 només es podria establir en el cas de la fulla  $\beta$  paral·lela.**

## **VI. CONCLUSIONS**



A partir dels resultats sobre el fragment peptídic 185-208 derivat de la proteïna priònica humana i del fragment 1-28 del pèptid A $\beta$  se'n deriven les següents conclusions:

1.- El fragment 185-208 de la proteïna priònica humana, PrP(185-208), forma agregats amiloides en presència d'heparina (polímer carregat negativament) o en presència de membranes biològiques amb càrrega superficial negativa. L'agregació del pèptid segueix la típica cinètica sigmoïdal, interpretable com a un procés de polimerització nucleada.

2.- A diferència del fragment A $\beta$ (1-28) del pèptid  $\beta$  amiloide relacionat amb la malaltia d'Alzheimer, amb el que comparteix una hipotètica homologia estructural, el fragment priònic no forma agregats amiloides en absència d'heparina o de membranes amb càrrega negativa.

3.- L'efecte de l'heparina sobre l'estat d'agregació del pèptid, es produeix en part a través de la His187, la qual formaria part d'un possible domini d'unió a glicosaminoglicans, KQHTV, per comparació amb el domini present en la seqüència del pèptid A $\beta$ (1-28), KQHVV. La substitució de la His187 per Ala, en la seqüència del fragment priònic, produeix un alentiment del procés d'agregació, de la mateixa manera que la substitució de les His13 o His14 en la seqüència de l'A $\beta$ (1-28), alenteix el seu procés d'agregació. En el cas del fragment priònic però, l'alentiment del procés és menys pronunciat que en el cas de l'A $\beta$ (1-28).

4.- Tal i com indiquen les mesures de variació del potencial dipolar de membrana, el pèptid PrP(185-208) interacciona amb membranes model. Tot i això, aquesta interacció no té cap repercussió en l'estat d'agregació del pèptid si les membranes estan formades per lípids electroneutres. En aquest sentit la hipòtesi de J.Fantini i col·laboradors segons la qual, una hipotètica interacció dels anells aromàtics del pèptid amb el sucre de la galactosilceramida de les membranes podria determinar l'estat d'agregació, resulta irrellevant en aquest cas. L'agregació del pèptid PrP(185-208) sí que es veu afavorida per la presència de membranes amb càrrega superficial negativa. Aquest fet, juntament amb l'efecte inductor observat per a l'heparina, posa de manifest la necessitat d'un substrat amb una determinada densitat de càrrega elèctrica negativa perquè el pèptid formi agregats amiloides.

## ***Conclusions***

---

5.- Contràriament al que estava descrit fins ara, la presència de membranes afecta clarament el procés d'agregació del pèptid amiloide A $\beta$ (1-28). L'efecte depèn de la composició lipídica i sembla produir-se a partir de la interacció de certes espècies agregades (no fibril·lars) que es formen durant la fase de nucleació amb les membranes. Les composicions lipídiques que simulen els rafts o microdominis de les membranes cel·lulars acceleren la formació i augmenten la quantitat de fibres amiloides. La presència de només colesterol en membranes de fosfatidilcolina, en canvi, alenteix el procés i fa que es formin menys fibres. La presència de galactosilceramida en les membranes (possibles interaccions amb els anells aromàtics del pèptid) no sembla tenir cap efecte específic sobre el procés d'agregació.

6.- La Tyr10 del pèptid A $\beta$ (1-28) és important per a la formació d'estructures amiloides. Quan les His13 i His14 estan carregades positivament, l'absència de la Tyr10 alenteix la formació de fibres. Si les His13 i His14 no estan carregades positivament, l'absència de la Tyr10 inhibeix la formació de fibres.

7.- Els polímers ramificats anomenats dendrímers, amb càrregues positives a la superfície tenen la capacitat d'interferir en el procés d'agregació dels pèptids amiloides A $\beta$ (1-28) i PrP(185-208). Ens els dos casos l'efecte observat sobre les cinètiques d'agregació depèn de la relació dendrímer/pèptid: a relacions elevades es produeix un alentiment de la fase de latència, mentre que a relacions prou baixes s'observa una acceleració d'aquesta fase. En el cas del fragment priònic la presència de dendrímers sembla afectar més la fase d'elongació i la quantitat final de fibres, mentre que en el cas del pèptid A $\beta$ (1-28), afecta principalment el procés de nucleació.

8.- El fragment PrP(185-208) de la proteïna priònica humana és citotòxic. S'ha demostrat que disminueix fins a un 25% la viabilitat d'una línia cel·lular de neuroblastoma en cultiu cel·lular.

## **VII. BIBLIOGRAFIA**



1. Marsh, R. F., Sipe, J. C., Morse, S. S. & Hanson, R. P. (1976) Transmissible mink encephalopathy. Reduced spongiform degeneration in aged mink of the Chediak-Higashi genotype, *Lab Invest.* 34, 381-6.
2. Cohen, A. S. & Calkins, E. (1959) Electron microscopic observations on a fibrous component in amyloid of diverse origins, *Nature.* 183, 1202-3.
3. Fruhling, L., Kempf, J. & Porte, A. (1960) [Structure and formation of the amyloid substance in experimental amyloidosis in the mouse. Electron microscopic study.], *C R Hebd Seances Acad Sci.* 250, 1385-6.
4. Caesar, R. (1960) [The fine structure of the spleen and liver in experimental amyloidosis.], *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 52, 653-73.
5. Battaglia, S. (1962) [Electronoptic studies on liver amyloid in mice.], *Beitr Pathol Anat.* 126, 300-20.
6. Cohen, A. S., Frensdorff, A., Lamprecht, S. & Calkins, E. (1962) A study of the fine structure of the amyloid associated with familial Mediterranean fever, *Am J Pathol.* 41, 567-78.
7. Cohen, H. J. (1972) Macular amyloidosis, *Arch Dermatol.* 106, 766-7.
8. Campistol, J. M., Shirahama, T., Abraham, C. R., Rodgers, O. G., Sole, M., Cohen, A. S. & Skinner, M. (1992) Demonstration of Plasma Proteinase-Inhibitors in Beta-2-Microglobulin Amyloid Deposits, *Kidney International.* 42, 915-923.
9. Sunde, M. & Blake, C. (1997) The structure of amyloid fibrils by electron microscopy and X-ray diffraction, *Adv Protein Chem.* 50, 123-59.
10. Dobson, C. M. (1999) Protein misfolding, evolution and disease, *Trends Biochem Sci.* 24, 329-32.
11. Jimenez, J. L., Guijarro, J. I., Orlova, E., Zurdo, J., Dobson, C. M., Sunde, M. & Saibil, H. R. (1999) Cryo-electron microscopy structure of an SH3 amyloid fibril and model of the molecular packing, *Embo J.* 18, 815-21.
12. Petkova, A. T., Ishii, Y., Balbach, J. J., Antzutkin, O. N., Leapman, R. D., Delaglio, F. & Tycko, R. (2002) A structural model for Alzheimer's beta -amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99, 16742-7.
13. Goldsbury, C. S., Cooper, G. J., Goldie, K. N., Muller, S. A., Saafi, E. L., Gruijters, W. T., Misur, M. P., Engel, A., Aebi, U. & Kistler, J. (1997) Polymorphic fibrillar assembly of human amylin, *J Struct Biol.* 119, 17-27.
14. Sumner Makin, O. & Serpell, L. C. (2004) Structural characterisation of islet amyloid polypeptide fibrils, *J Mol Biol.* 335, 1279-88.
15. Serpell, L. C., Sunde, M., Benson, M. D., Tennent, G. A., Pepys, M. B. & Fraser, P. E. (2000) The protofilament substructure of amyloid fibrils, *J Mol Biol.* 300, 1033-9.
16. Goldsbury, C., Kistler, J., Aebi, U., Arvinte, T. & Cooper, G. J. (1999) Watching amyloid fibrils grow by time-lapse atomic force microscopy, *J Mol Biol.* 285, 33-9.
17. Dobson, C. M. (2003) Protein folding and misfolding, *Nature.* 426, 884-90.
18. Dobson, C. M. (2004) Principles of protein folding, misfolding and aggregation, *Semin Cell Dev Biol.* 15, 3-16.
19. Laurine, E., Gregoire, C., Fandrich, M., Engemann, S., Marchal, S., Thion, L., Mohr, M., Monsarrat, B., Michel, B., Dobson, C. M., Wanker, E., Erard, M. & Verdier, J. M. (2003) Lithostathine quadruple-helical filaments form proteinase K-resistant deposits in Creutzfeldt-Jakob disease, *J Biol Chem.* 278, 51770-8.
20. Fandrich, M. & Dobson, C. M. (2002) The behaviour of polyamino acids reveals an inverse side chain effect in amyloid structure formation, *Embo Journal.* 21, 5682-5690.



21. Monsonego, A., Maron, R., Zota, V., Selkoe, D. J. & Weiner, H. L. (2001) Immune hyporesponsiveness to amyloid beta-peptide in amyloid precursor protein transgenic mice: implications for the pathogenesis and treatment of Alzheimer's disease, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98, 10273-8.
22. Selkoe, D. J. (1998) The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease, *Trends Cell Biol.* 8, 447-53.
23. Kamal, A., Stokin, G. B., Yang, Z., Xia, C. H. & Goldstein, L. S. (2000) Axonal transport of amyloid precursor protein is mediated by direct binding to the kinesin light chain subunit of kinesin-I, *Neuron.* 28, 449-59.
24. Sticht, H., Bayer, P., Willbold, D., Dames, S., Hilbich, C., Beyreuther, K., Frank, R. W. & Rosch, P. (1995) Structure of Amyloid a4-(1-40)-Peptide of Alzheimers-Disease, *European Journal of Biochemistry.* 233, 293-298.
25. Hardy, J. & Selkoe, D. J. (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics, *Science.* 297, 353-6.
26. Glenner, G. G. & Wong, C. W. (1984) Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein, *Biochem Biophys Res Commun.* 122, 1131-5.
27. Gordon, M. N., King, D. L., Diamond, D. M., Jantzen, P. T., Boyett, K. V., Hope, C. E., Hatcher, J. M., DiCarlo, G., Gottschall, W. P., Morgan, D. & Arendash, G. W. (2001) Correlation between cognitive deficits and Abeta deposits in transgenic APP+PS1 mice, *Neurobiol Aging.* 22, 377-85.
28. Naslund, J., Haroutunian, V., Mohs, R., Davis, K. L., Davies, P., Greengard, P. & Buxbaum, J. D. (2000) Correlation between elevated levels of amyloid beta-peptide in the brain and cognitive decline, *Jama.* 283, 1571-7.
29. Cotman, C. W., Pike, C. J. & Copani, A. (1992) beta-Amyloid neurotoxicity: a discussion of in vitro findings, *Neurobiol Aging.* 13, 587-90.
30. Pike, C. J., Burdick, D., Walencewicz, A. J., Glabe, C. G. & Cotman, C. W. (1993) Neurodegeneration induced by beta-amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state, *J Neurosci.* 13, 1676-87.
31. Lorenzo, A. & Yankner, B. A. (1996) Amyloid fibril toxicity in Alzheimer's disease and diabetes, *Ann N Y Acad Sci.* 777, 89-95.
32. Yankner, B. A. (1996) Mechanisms of neuronal degeneration in Alzheimer's disease, *Neuron.* 16, 921-32.
33. Mattson, M. P. (1995) Degenerative and protective signaling mechanisms in the neurofibrillary pathology of AD, *Neurobiol Aging.* 16, 447-57; discussion 458-63.
34. Hensley, K., Carney, J. M., Mattson, M. P., Aksenova, M., Harris, M., Wu, J. F., Floyd, R. A. & Butterfield, D. A. (1994) A model for beta-amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: relevance to Alzheimer disease, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91, 3270-4.
35. Huang, X., Cuajungco, M. P., Atwood, C. S., Hartshorn, M. A., Tyndall, J. D., Hanson, G. R., Stokes, K. C., Leopold, M., Multhaup, G., Goldstein, L. E., Scarpa, R. C., Saunders, A. J., Lim, J., Moir, R. D., Glabe, C., Bowden, E. F., Masters, C. L., Fairlie, D. P., Tanzi, R. E. & Bush, A. I. (1999) Cu(II) potentiation of alzheimer abeta neurotoxicity. Correlation with cell-free hydrogen peroxide production and metal reduction, *J Biol Chem.* 274, 37111-6.
36. Butterfield, D. A., Martin, L., Carney, J. M. & Hensley, K. (1996) A beta (25-35) peptide displays H2O2-like reactivity towards aqueous Fe<sup>2+</sup>, nitroxide spin probes, and synaptosomal membrane proteins, *Life Sci.* 58, 217-28.
37. Smith, M. A., Taneda, S., Richey, P. L., Miyata, S., Yan, S. D., Stern, D., Sayre, L. M., Monnier, V. M. & Perry, G. (1994) Advanced Maillard reaction end products are associated with Alzheimer disease pathology, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91, 5710-4.

38. Selkoe, D. J. (1999) Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease, *Nature*. 399, A23-31.
39. Nunomura, A., Perry, G., Pappolla, M. A., Friedland, R. P., Hirai, K., Chiba, S. & Smith, M. A. (2000) Neuronal oxidative stress precedes amyloid-beta deposition in Down syndrome, *J Neuropathol Exp Neurol*. 59, 1011-7.
40. Rottkamp, C. A., Raina, A. K., Zhu, X., Gaier, E., Bush, A. I., Atwood, C. S., Chevion, M., Perry, G. & Smith, M. A. (2001) Redox-active iron mediates amyloid-beta toxicity, *Free Radic Biol Med*. 30, 447-50.
41. Huang, X., Atwood, C. S., Moir, R. D., Hartshorn, M. A., Vonsattel, J. P., Tanzi, R. E. & Bush, A. I. (1997) Zinc-induced Alzheimer's Abeta1-40 aggregation is mediated by conformational factors, *J Biol Chem*. 272, 26464-70.
42. Atwood, C. S., Moir, R. D., Huang, X., Scarpa, R. C., Bacarra, N. M., Romano, D. M., Hartshorn, M. A., Tanzi, R. E. & Bush, A. I. (1998) Dramatic aggregation of Alzheimer abeta by Cu(II) is induced by conditions representing physiological acidosis, *J Biol Chem*. 273, 12817-26.
43. Citron, M., Oltersdorf, T., Haass, C., McConlogue, L., Hung, A. Y., Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Lieberburg, I. & Selkoe, D. J. (1992) Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production, *Nature*. 360, 672-4.
44. Cai, X. D., Golde, T. E. & Younkin, S. G. (1993) Release of excess amyloid beta protein from a mutant amyloid beta protein precursor, *Science*. 259, 514-6.
45. Davies, L., Wolska, B., Hilbich, C., Multhaup, G., Martins, R., Simms, G., Beyreuther, K. & Masters, C. L. (1988) A4 amyloid protein deposition and the diagnosis of Alzheimer's disease: prevalence in aged brains determined by immunocytochemistry compared with conventional neuropathologic techniques, *Neurology*. 38, 1688-93.
46. Giannakopoulos, P., Herrmann, F. R., Bussiere, T., Bouras, C., Kovari, E., Perl, D. P., Morrison, J. H., Gold, G. & Hof, P. R. (2003) Tangle and neuron numbers, but not amyloid load, predict cognitive status in Alzheimer's disease, *Neurology*. 60, 1495-500.
47. Gentleman, S. M., Nash, M. J., Sweeting, C. J., Graham, D. I. & Roberts, G. W. (1993) Beta-amyloid precursor protein (beta APP) as a marker for axonal injury after head injury, *Neurosci Lett*. 160, 139-44.
48. Canning, D. R., McKeon, R. J., DeWitt, D. A., Perry, G., Wujek, J. R., Frederickson, R. C. & Silver, J. (1993) beta-Amyloid of Alzheimer's disease induces reactive gliosis that inhibits axonal outgrowth, *Exp Neurol*. 124, 289-98.
49. Carpenter, M. K., Crutcher, K. A. & Kater, S. B. (1993) An analysis of the effects of Alzheimer's plaques on living neurons, *Neurobiol Aging*. 14, 207-15.
50. DeWitt, D. A., Perry, G., Cohen, M., Doller, C. & Silver, J. (1998) Astrocytes regulate microglial phagocytosis of senile plaque cores of Alzheimer's disease, *Exp Neurol*. 149, 329-40.
51. Cuajungco, M. P., Goldstein, L. E., Nunomura, A., Smith, M. A., Lim, J. T., Atwood, C. S., Huang, X., Farrag, Y. W., Perry, G. & Bush, A. I. (2000) Evidence that the beta-amyloid plaques of Alzheimer's disease represent the redox-silencing and entombment of abeta by zinc, *J Biol Chem*. 275, 19439-42.
52. Hartley, D. M., Walsh, D. M., Ye, C. P., Diehl, T., Vasquez, S., Vassilev, P. M., Teplow, D. B. & Selkoe, D. J. (1999) Protofibrillar intermediates of amyloid beta-protein induce acute electrophysiological changes and progressive neurotoxicity in cortical neurons, *J Neurosci*. 19, 8876-84.
53. Lee, H. G., Zhu, X., Castellani, R. J., Nunomura, A., Perry, G. & Smith, M. A. (2007) Amyloid- $\beta$  in Alzheimer Disease: The Null Versus the Alternate Hypothesis, *J Pharmacol Exp Ther*.
54. Rottkamp, C. A., Atwood, C. S., Joseph, J. A., Nunomura, A., Perry, G. & Smith, M. A. (2002) The state versus amyloid-beta: the trial of the most wanted criminal in Alzheimer disease, *Peptides*. 23, 1333-41.

55. Kirkitadze, M. D., Condron, M. M. & Teplow, D. B. (2001) Identification and characterization of key kinetic intermediates in amyloid beta-protein fibrillogenesis, *Journal of Molecular Biology*. 312, 1103-1119.
56. Zagorski, M. G. & Barrow, C. J. (1992) Nmr-Studies of Amyloid Beta-Peptides - Proton Assignments, Secondary Structure, and Mechanism of an Alpha-Helix-] Beta-Sheet Conversion for a Homologous, 28-Residue, N-Terminal Fragment, *Biochemistry*. 31, 5621-5631.
57. Soto, C., Castano, E. M., Prelli, F., Kumar, R. A. & Baumann, M. (1995) Apolipoprotein E increases the fibrillogenic potential of synthetic peptides derived from Alzheimer's, gelsolin and AA amyloids, *FEBS Lett*. 371, 110-4.
58. Jarrett, J. T., Berger, E. P. & Lansbury, P. T., Jr. (1993) The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease, *Biochemistry*. 32, 4693-7.
59. Goldsbury, C. S., Wirtz, S., Muller, S. A., Sunderji, S., Wicki, P., Aebi, U. & Frey, P. (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*. 130, 217-31.
60. Supattapone, S., Nguyen, H. O., Muramoto, T., Cohen, F. E., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B. & Scott, M. (2000) Affinity-tagged miniprion derivatives spontaneously adopt protease-resistant conformations, *J Virol*. 74, 11928-34.
61. Chesebro, B., Trifilo, M., Race, R., Meade-White, K., Teng, C., LaCasse, R., Raymond, L., Favara, C., Baron, G., Priola, S., Caughey, B., Masliah, E. & Oldstone, M. (2005) Anchorless prion protein results in infectious amyloid disease without clinical scrapie, *Science*. 308, 1435-1439.
62. Oesch, B., Westaway, D., Walchli, M., McKinley, M. P., Kent, S. B., Aebersold, R., Barry, R. A., Tempst, P., Teplow, D. B., Hood, L. E. & et al. (1985) A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein, *Cell*. 40, 735-46.
63. Zahn, R., Liu, A., Luhrs, T., Riek, R., von Schroetter, C., Lopez Garcia, F., Billeter, M., Calzolari, L., Wider, G. & Wuthrich, K. (2000) NMR solution structure of the human prion protein, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97, 145-50.
64. Merz, P. A., Kascak, R. J., Rubenstein, R., Carp, R. I. & Wisniewski, H. M. (1987) Antisera to scrapie-associated fibril protein and prion protein decorate scrapie-associated fibrils, *J Virol*. 61, 42-9.
65. Bueler, H., Fischer, M., Lang, Y., Bluethmann, H., Lipp, H. P., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B., Aguet, M. & Weissmann, C. (1992) Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein, *Nature*. 356, 577-82.
66. Sakaguchi, S., Katamine, S., Nishida, N., Moriuchi, R., Shigematsu, K., Sugimoto, T., Nakatani, A., Kataoka, Y., Houtani, T., Shirabe, S., Okada, H., Hasegawa, S., Miyamoto, T. & Noda, T. (1996) Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene, *Nature*. 380, 528-31.
67. Scott, M., Groth, D., Foster, D., Torchia, M., Yang, S. L., DeArmond, S. J. & Prusiner, S. B. (1993) Propagation of prions with artificial properties in transgenic mice expressing chimeric PrP genes, *Cell*. 73, 979-88.
68. McKenzie, D., Bartz, J., Mirwald, J., Olander, D., Marsh, R. & Aiken, J. (1998) Reversibility of scrapie inactivation is enhanced by copper, *J Biol Chem*. 273, 25545-7.
69. Pauly, P. C. & Harris, D. A. (1998) Copper stimulates endocytosis of the prion protein, *J Biol Chem*. 273, 33107-10.
70. Schatzl, H. M., Da Costa, M., Taylor, L., Cohen, F. E. & Prusiner, S. B. (1995) Prion protein gene variation among primates, *J Mol Biol*. 245, 362-74.

71. Yehiely, F., Bamborough, P., DaCosta, M., Perry, B. J., Thinakaran, G., Cohen, F. E., Carlson, G. A. & Prusiner, S. B. (1997) Identification of candidate proteins binding to prion protein, *Neurobiology of Disease*. *3*, 339-355.
72. Hsiao, K. & Prusiner, S. B. (1991) Molecular-Genetics and Transgenic Model of Gertsmann-Straussler-Scheinker Disease, *Alzheimer Disease & Associated Disorders*. *5*, 155-162.
73. Brown, D. R., Qin, K., Herms, J. W., Madlung, A., Manson, J., Strome, R., Fraser, P. E., Kruck, T., von Bohlen, A., Schulz-Schaeffer, W., Giese, A., Westaway, D. & Kretzschmar, H. (1997) The cellular prion protein binds copper in vivo, *Nature*. *390*, 684-7.
74. Stockel, J., Safar, J., Wallace, A. C., Cohen, F. E. & Prusiner, S. B. (1998) Prion protein selectively binds copper(II) ions, *Biochemistry*. *37*, 7185-93.
75. Rabenau, H. F., Cinatl, J. & Doerr, H. W. (2004) *Prions: A Challenge for Science, Medicine and the Public Health System*, 2nd edn, S. Karger AG (Switzerland).
76. Hegde, R. S., Mastrianni, J. A., Scott, M. R., DeFea, K. A., Tremblay, P., Torchia, M., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B. & Lingappa, V. R. (1998) A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative disease, *Science*. *279*, 827-34.
77. Stahl, N., Borchelt, D. R., Hsiao, K. & Prusiner, S. B. (1987) Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid, *Cell*. *51*, 229-40.
78. Taraboulos, A., Jendroska, K., Serban, D., Yang, S. L., Dearmond, S. J. & Prusiner, S. B. (1992) Regional Mapping of Prion Proteins in Brain, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. *89*, 7620-7624.
79. Shyng, S. L., Huber, M. T. & Harris, D. A. (1993) A prion protein cycles between the cell surface and an endocytic compartment in cultured neuroblastoma cells, *J Biol Chem*. *268*, 15922-8.
80. Caughey, B. & Raymond, G. J. (1991) The scrapie-associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease- and phospholipase-sensitive, *J Biol Chem*. *266*, 18217-23.
81. Bolton, D. C., Meyer, R. K. & Prusiner, S. B. (1985) Scrapie PrP 27-30 is a sialoglycoprotein, *J Virol*. *53*, 596-606.
82. Hope, J., Morton, L. J., Farquhar, C. F., Multhaup, G., Beyreuther, K. & Kimberlin, R. H. (1986) The major polypeptide of scrapie-associated fibrils (SAF) has the same size, charge distribution and N-terminal protein sequence as predicted for the normal brain protein (PrP), *Embo J*. *5*, 2591-7.
83. Taraboulos, A., Scott, M., Semenov, A., Avrahami, D., Laszlo, L., Prusiner, S. B. & Avraham, D. (1995) Cholesterol depletion and modification of COOH-terminal targeting sequence of the prion protein inhibit formation of the scrapie isoform, *J Cell Biol*. *129*, 121-32.
84. Caughey, B. W., Dong, A., Bhat, K. S., Ernst, D., Hayes, S. F. & Caughey, W. S. (1991) Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP 27-30 in water by infrared spectroscopy, *Biochemistry*. *30*, 7672-80.
85. Pan, K. M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R. J., Cohen, F. E. & et al. (1993) Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins, *Proc Natl Acad Sci U S A*. *90*, 10962-6.
86. Gasset, M., Baldwin, M. A., Lloyd, D. H., Gabriel, J. M., Holtzman, D. M., Cohen, F., Fletterick, R. & Prusiner, S. B. (1992) Predicted alpha-helical regions of the prion protein when synthesized as peptides form amyloid, *Proc Natl Acad Sci U S A*. *89*, 10940-4.
87. Forloni, G., Chiesa, R., Smiroldo, S., Verga, L., Salmona, M., Tagliavini, F. & Angeretti, N. (1993) Apoptosis Mediated Neurotoxicity Induced by Chronic Application of Beta-Amyloid Fragment 25-35, *Neuroreport*. *4*, 523-526.

88. Bueler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R. A., Autenried, P., Aguet, M. & Weissmann, C. (1993) Mice devoid of PrP are resistant to scrapie, *Cell*. *73*, 1339-47.
89. Scott, M., Foster, D., Miranda, C., Serban, D., Coufal, F., Walchli, M., Torchia, M., Groth, D., Carlson, G., DeArmond, S. J. & et al. (1989) Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques, *Cell*. *59*, 847-57.
90. Costa, P. R., Kocisko, D. A., Sun, B. Q., Lansbury, P. T. & Griffin, R. G. (1997) Determination of peptide amide configuration in a model amyloid fibril by solid-state NMR, *Journal of the American Chemical Society*. *119*, 10487-10493.
91. Telling, G. C., Scott, M., Mastrianni, J., Gabizon, R., Torchia, M., Cohen, F. E., DeArmond, S. J. & Prusiner, S. B. (1995) Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein, *Cell*. *83*, 79-90.
92. Westaway, D., DeArmond, S. J., Cayetano-Canlas, J., Groth, D., Foster, D., Yang, S. L., Torchia, M., Carlson, G. A. & Prusiner, S. B. (1994) Degeneration of skeletal muscle, peripheral nerves, and the central nervous system in transgenic mice overexpressing wild-type prion proteins, *Cell*. *76*, 117-29.
93. Hsiao, K., Baker, H. F., Crow, T. J., Poulter, M., Owen, F., Terwilliger, J. D., Westaway, D., Ott, J. & Prusiner, S. B. (1989) Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Straussler syndrome, *Nature*. *338*, 342-5.
94. Koster, A., Penninx, B. W. J. H., Bosma, H., Kempen, G. I. J. M., Newman, A. B., Rubin, S. M., Satterfield, S., Atkinson, H. H., Ayonayon, H. N., Rosano, C., Yaffe, K., Harris, T. B., Rooks, R. N., Van Eijk, J. T. & Kritchevsky, S. B. (2005) Socioeconomic differences in cognitive decline and the role of biomedical factors, *Annals of Epidemiology*. *15*, 564-571.
95. Cohen, F. E. & Prusiner, S. B. (1998) Pathologic conformations of prion proteins, *Annu Rev Biochem*. *67*, 793-819.
96. Hudde, T., Rayner, S. A., Comer, R. M., Weber, M., Isaacs, J. D., Waldmann, H., Larkin, D. F. & George, A. J. (1999) Activated polyamidoamine dendrimers, a non-viral vector for gene transfer to the corneal endothelium, *Gene Ther*. *6*, 939-43.
97. Ma, K., Clancy, E. L., Zhang, Y., Ray, D. G., Wollenberg, K. & Zagorski, M. G. (1999) Residue-Specific pKa Measurements of the  $\beta$ -Peptide and Mechanism of pH-Induced Amyloid Formation, *J. Am. Chem. Soc.* *121*, 8698-8706.
98. Kisilevsky, R. (2000) Review: amyloidogenesis-unquestioned answers and unanswered questions, *J Struct Biol*. *130*, 99-108.
99. Nilsson, M. R. (2004) Techniques to study amyloid fibril formation in vitro, *Methods*. *34*, 151-60.
100. Ettaiche, M., Pichot, R., Vincent, J. P. & Chabry, J. (2000) In vivo cytotoxicity of the prion protein fragment 106-126, *J Biol Chem*. *275*, 36487-90.
101. Mahfoud, R., Garmy, N., Maresca, M., Yahi, N., Puigserver, A. & Fantini, J. (2002) Identification of a common sphingolipid-binding domain in Alzheimer, prion, and HIV-1 proteins, *Journal of Biological Chemistry*. *277*, 11292-11296.
102. Alexandrescu, A. T. (2005) Amyloid accomplices and enforcers, *Protein Sci*. *14*, 1-12.
103. Bernfield, M., Gotte, M., Park, P. W., Reizes, O., Fitzgerald, M. L., Lincecum, J. & Zako, M. (1999) Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans, *Annu Rev Biochem*. *68*, 729-77.
104. Cardin, A. D. & Weintraub, H. J. (1989) Molecular modeling of protein-glycosaminoglycan interactions, *Arteriosclerosis*. *9*, 21-32.

105. Castillo, G. M., Ngo, C., Cummings, J., Wight, T. N. & Snow, A. D. (1997) Perlecan binds to the beta-amyloid proteins (A beta) of Alzheimer's disease, accelerates A beta fibril formation, and maintains A beta fibril stability, *J Neurochem.* 69, 2452-65.
106. McLaurin, J., Franklin, T., Zhang, X., Deng, J. & Fraser, P. E. (1999) Interactions of Alzheimer amyloid-beta peptides with glycosaminoglycans effects on fibril nucleation and growth, *Eur J Biochem.* 266, 1101-10.
107. Snow, A. D., Kinsella, M. G., Parks, E., Sekiguchi, R. T., Miller, J. D., Kimata, K. & Wight, T. N. (1995) Differential binding of vascular cell-derived proteoglycans (perlecan, biglycan, decorin, and versican) to the beta-amyloid protein of Alzheimer's disease, *Arch Biochem Biophys.* 320, 84-95.
108. McLaurin, J. & Fraser, P. E. (2000) Effect of amino-acid substitutions on Alzheimer's amyloid-beta peptide-glycosaminoglycan interactions, *Eur J Biochem.* 267, 6353-61.
109. Pollack, S. J., Sadler, II, Hawtin, S. R., Taylor, V. J. & Shearman, M. S. (1995) Sulfated glycosaminoglycans and dyes attenuate the neurotoxic effects of beta-amyloid in rat PC12 cells, *Neurosci Lett.* 184, 113-6.
110. Perez, M., Wandosell, F., Colaco, C. & Avila, J. (1998) Sulphated glycosaminoglycans prevent the neurotoxicity of a human prion protein fragment, *Biochem J.* 335 ( Pt 2), 369-74.
111. Priola, S. A. & Caughey, B. (1994) Inhibition of Scrapie-Associated Prp Accumulation - Probing the Role of Glycosaminoglycans in Amyloidogenesis, *Molecular Neurobiology.* 8, 113-120.
112. Wong, C., Xiong, L. W., Horiuchi, M., Raymond, L., Wehrly, K., Chesebro, B. & Caughey, B. (2001) Sulfated glycans and elevated temperature stimulate PrP(Sc)-dependent cell-free formation of protease-resistant prion protein, *Embo J.* 20, 377-86.
113. Caughey, B. (1993) Scrapie-Associated Prp Accumulation and Its Prevention - Insights from Cell-Culture, *British Medical Bulletin.* 49, 860-872.
114. Shaked, G. M., Meiner, Z., Avraham, I., Taraboulos, A. & Gabizon, R. (2001) Reconstitution of prion infectivity from solubilized protease-resistant PrP and nonprotein components of prion rods, *J Biol Chem.* 276, 14324-8.
115. Tomalia, D. A., Baker, H., Dewald, J., Hall, M., Kallos, G., Martin, S., Roeck, J., Ryder, J. & Smith, P. (1985) A New Class of Polymers - Starburst-Dendritic Macromolecules, *Polymer Journal.* 17, 117-132.
116. Newkome, G. R., Childs, B. J., Rourk, M. J., Baker, G. R. & Moorefield, C. N. (1998) Dendrimer construction and macromolecular property modification via combinatorial methods, *Biotechnol Bioeng.* 61, 243-53.
117. Heegaard, P. M., Pedersen, H. G., Flink, J. & Boas, U. (2004) Amyloid aggregates of the prion peptide PrP106-126 are destabilised by oxidation and by the action of dendrimers, *FEBS Lett.* 577, 127-33.
118. Supattapone, S., Nguyen, H. O., Cohen, F. E., Prusiner, S. B. & Scott, M. R. (1999) Elimination of prions by branched polyamines and implications for therapeutics, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96, 14529-34.
119. Supattapone, S., Wille, H., Uyechi, L., Safar, J., Tremblay, P., Szoka, F. C., Cohen, F. E., Prusiner, S. B. & Scott, M. R. (2001) Branched polyamines cure prion-infected neuroblastoma cells, *J Virol.* 75, 3453-61.
120. Solassol, J., Crozet, C., Perrier, V., Leclaire, J., Beranger, F., Caminade, A. M., Meunier, B., Dormont, D., Majoral, J. P. & Lehmann, S. (2004) Cationic phosphorus-containing dendrimers reduce prion replication both in cell culture and in mice infected with scrapie, *J Gen Virol.* 85, 1791-9.
121. Hollosi, M., Otvos, L., Jr., Kajtar, J., Percel, A. & Lee, V. M. (1989) Is amyloid deposition in Alzheimer's disease preceded by an environment-induced double conformational transition?, *Pept Res.* 2, 109-13.
122. Palsdottir, H. & Hunte, C. (2004) Lipids in membrane protein structures, *Biochim Biophys Acta.* 1666, 2-18.

123. Dowhan, W., Mileykovskaya, E. & Bogdanov, M. (2004) Diversity and versatility of lipid-protein interactions revealed by molecular genetic approaches, *Biochim Biophys Acta. 1666*, 19-39.
124. Kinnunen, P. K., Koiv, A., Lehtonen, J. Y., Rytomaa, M. & Mustonen, P. (1994) Lipid dynamics and peripheral interactions of proteins with membrane surfaces, *Chem Phys Lipids. 73*, 181-207.
125. Jensen, M. O. & Mouritsen, O. G. (2004) Lipids do influence protein function-the hydrophobic matching hypothesis revisited, *Biochim Biophys Acta. 1666*, 205-26.
126. Han, X. & Tamm, L. K. (2000) pH-dependent self-association of influenza hemagglutinin fusion peptides in lipid bilayers, *J Mol Biol. 304*, 953-65.
127. Fernandes, F., Loura, L. M., Prieto, M., Koehorst, R., Spruijt, R. B. & Hemminga, M. A. (2003) Dependence of M13 major coat protein oligomerization and lateral segregation on bilayer composition, *Biophys J. 85*, 2430-41.
128. Paquet, M. J., Laviolette, M., Pezolet, M. & Auger, M. (2001) Two-dimensional infrared correlation spectroscopy study of the aggregation of cytochrome c in the presence of dimyristoylphosphatidylglycerol, *Biophys J. 81*, 305-12.
129. Chauhan, A., Ray, I. & Chauhan, V. P. (2000) Interaction of amyloid beta-protein with anionic phospholipids: possible involvement of Lys28 and C-terminus aliphatic amino acids, *Neurochem Res. 25*, 423-9.
130. Morillas, M., Swietnicki, W., Gambetti, P. & Surewicz, W. K. (1999) Membrane environment alters the conformational structure of the recombinant human prion protein, *J Biol Chem. 274*, 36859-65.
131. Choo-Smith, L. P. & Surewicz, W. K. (1997) The interaction between Alzheimer amyloid beta(1-40) peptide and ganglioside GM1-containing membranes, *FEBS Lett. 402*, 95-8.
132. Kazlauskaitė, J. & Pinheiro, T. J. (2005) Aggregation and fibrillization of prions in lipid membranes, *Biochem Soc Symp*, 211-22.
133. Kakio, A., Nishimoto, S., Kozutsumi, Y. & Matsuzaki, K. (2003) Formation of a membrane-active form of amyloid beta-protein in raft-like model membranes, *Biochem Biophys Res Commun. 303*, 514-8.
134. Yip, C. M., Elton, E. A., Darabie, A. A., Morrison, M. R. & McLaurin, J. (2001) Cholesterol, a modulator of membrane-associated A $\beta$ -fibrillogenesis and neurotoxicity, *J Mol Biol. 311*, 723-34.
135. Bokvist, M., Lindstrom, F., Watts, A. & Grobner, G. (2004) Two types of Alzheimer's beta-amyloid (1-40) peptide membrane interactions: aggregation preventing transmembrane anchoring versus accelerated surface fibril formation, *J Mol Biol. 335*, 1039-49.
136. Thirumalai, D., Klimov, D. K. & Dima, R. I. (2003) Emerging ideas on the molecular basis of protein and peptide aggregation, *Curr Opin Struct Biol. 13*, 146-59.
137. Fernandez, A. & Berry, R. S. (2003) Proteins with H-bond packing defects are highly interactive with lipid bilayers: Implications for amyloidogenesis, *Proc Natl Acad Sci U S A. 100*, 2391-6.
138. Stefani, M. (2004) Protein misfolding and aggregation: new examples in medicine and biology of the dark side of the protein world, *Biochim Biophys Acta. 1739*, 5-25.
139. Sparr, E., Engel, M. F., Sakharov, D. V., Sprong, M., Jacobs, J., de Kruijff, B., Hoppener, J. W. & Killian, J. A. (2004) Islet amyloid polypeptide-induced membrane leakage involves uptake of lipids by forming amyloid fibers, *FEBS Lett. 577*, 117-20.
140. Zhao, H., Tuominen, E. K. & Kinnunen, P. K. (2004) Formation of amyloid fibers triggered by phosphatidylserine-containing membranes, *Biochemistry. 43*, 10302-7.
141. Lin, H., Bhatia, R. & Lal, R. (2001) Amyloid beta protein forms ion channels: implications for Alzheimer's disease pathophysiology, *Faseb J. 15*, 2433-44.

142. Michikawa, M., Gong, J. S., Fan, Q. W., Sawamura, N. & Yanagisawa, K. (2001) A novel action of alzheimer's amyloid beta-protein (A $\beta$ ): oligomeric A $\beta$  promotes lipid release, *J Neurosci.* 21, 7226-35.
143. Zhao, H., Jutila, A., Nurminen, T., Wickstrom, S. A., Keski-Oja, J. & Kinnunen, P. K. (2005) Binding of endostatin to phosphatidylserine-containing membranes and formation of amyloid-like fibers, *Biochemistry.* 44, 2857-63.
144. Arispe, N., Rojas, E. & Pollard, H. B. (1993) Alzheimer disease amyloid beta protein forms calcium channels in bilayer membranes: blockade by tromethamine and aluminum, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90, 567-71.
145. Matsuzaki, K. & Horikiri, C. (1999) Interactions of amyloid beta-peptide (1-40) with ganglioside-containing membranes, *Biochemistry.* 38, 4137-42.
146. Yanagisawa, K., Odaka, A., Suzuki, N. & Ihara, Y. (1995) GM1 ganglioside-bound amyloid beta-protein (A $\beta$ ): a possible form of preamyloid in Alzheimer's disease, *Nat Med.* 1, 1062-6.
147. Demeester, N., Mertens, C., Caster, H., Goethals, M., Vandekerckhove, J., Rosseneu, M. & Labeur, C. (2001) Comparison of the aggregation properties, secondary structure and apoptotic effects of wild-type, Flemish and Dutch N-terminally truncated amyloid beta peptides, *Eur J Neurosci.* 13, 2015-24.
148. Gabizon, R., McKinley, M. P. & Prusiner, S. B. (1987) Purified prion proteins and scrapie infectivity copartition into liposomes, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84, 4017-21.
149. Baron, G. S., Wehrly, K., Dorward, D. W., Chesebro, B. & Caughey, B. (2002) Conversion of raft associated prion protein to the protease-resistant state requires insertion of PrP-res (PrP(Sc)) into contiguous membranes, *Embo J.* 21, 1031-40.
150. Pinheiro, T. J. (2006) The role of rafts in the fibrillization and aggregation of prions, *Chem Phys Lipids.* 141, 66-71.
151. Critchley, P., Kazlauskaitė, J., Eason, R. & Pinheiro, T. J. (2004) Binding of prion proteins to lipid membranes, *Biochem Biophys Res Commun.* 313, 559-67.
152. Sanghera, N. & Pinheiro, T. J. (2002) Binding of prion protein to lipid membranes and implications for prion conversion, *J Mol Biol.* 315, 1241-56.
153. Kaneko, K., Vey, M., Scott, M., Pilkuhn, S., Cohen, F. E. & Prusiner, S. B. (1997) COOH-terminal sequence of the cellular prion protein directs subcellular trafficking and controls conversion into the scrapie isoform, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94, 2333-8.
154. Naslavsky, N., Shmeeda, H., Friedlander, G., Yanai, A., Futerman, A. H., Barenholz, Y. & Taraboulos, A. (1999) Sphingolipid depletion increases formation of the scrapie prion protein in neuroblastoma cells infected with prions, *J Biol Chem.* 274, 20763-71.
155. Fraser, P. E., Nguyen, J. T., Surewicz, W. K. & Kirschner, D. A. (1991) pH-dependent structural transitions of Alzheimer amyloid peptides, *Biophys J.* 60, 1190-201.
156. LeVine, H., 3rd. (1993) Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution, *Protein Sci.* 2, 404-10.
157. Byler, D. M. & Susi, H. (1986) Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra, *Biopolymers.* 25, 469-87.
158. Bates. (1973) *Determination of pH. Theory and Practice*, John Wiley and Sons Inc.
159. Hansen, M. B., Nielsen, S. E. & Berg, K. (1989) Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill, *J Immunol Methods.* 119, 203-10.



160. Mayer, L. D., Hope, M. J. & Cullis, P. R. (1986) Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure, *Biochim Biophys Acta.* 858, 161-8.
161. Barnadas, R. (1999) *Optimització de formulacions amb fosfolípids per a ús dermatològic.*, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra.
162. Brockman, H. (1994) Dipole potential of lipid membranes, *Chem Phys Lipids.* 73, 57-79.
163. Antonenko, Y. N., Rokitskaya, T. I. & Kotova, E. A. (1999) Effect of dipole modifiers on the kinetics of sensitized photoinactivation of gramicidin channels in bilayer lipid membranes, *Membr Cell Biol.* 13, 111-20.
164. Gilson, M. K. & Honig, B. H. (1988) Energetics of charge-charge interactions in proteins, *Proteins.* 3, 32-52.
165. Valenta, C., Cladera, J., O'Shea, P. & Hadgraft, J. (2001) Effect of phloretin on the percutaneous absorption of lignocaine across human skin, *J Pharm Sci.* 90, 485-92.
166. Asawakarn, T., Cladera, J. & O'Shea, P. (2001) Effects of the membrane dipole potential on the interaction of saquinavir with phospholipid membranes and plasma membrane receptors of Caco-2 cells, *J Biol Chem.* 276, 38457-63.
167. Cladera, J., Martin, I., Ruyschaert, J. M. & O'Shea, P. (1999) Characterization of the sequence of interactions of the fusion domain of the simian immunodeficiency virus with membranes. Role of the membrane dipole potential, *J Biol Chem.* 274, 29951-9.
168. Buzon, V. & Cladera, J. (2006) Effect of cholesterol on the interaction of the HIV GP41 fusion peptide with model membranes. Importance of the membrane dipole potential, *Biochemistry.* 45, 15768-75.
169. Cladera, J. & O'Shea, P. (1998) Intramembrane molecular dipoles affect the membrane insertion and folding of a model amphiphilic peptide, *Biophys J.* 74, 2434-42.
170. Mastrangelo, I. A., Ahmed, M., Sato, T., Liu, W., Wang, C., Hough, P. & Smith, S. O. (2006) High-resolution atomic force microscopy of soluble A $\beta$ 42 oligomers, *J Mol Biol.* 358, 106-19.
171. Lashuel, H. A., Hartley, D. M., Petre, B. M., Wall, J. S., Simon, M. N., Walz, T. & Lansbury, P. T., Jr. (2003) Mixtures of wild-type and a pathogenic (E22G) form of A $\beta$ 40 in vitro accumulate protofibrils, including amyloid pores, *J Mol Biol.* 332, 795-808.
172. Sabate, R., Gallardo, M. & Estelrich, J. (2003) An autocatalytic reaction as a model for the kinetics of the aggregation of beta-amyloid, *Biopolymers.* 71, 190-5.
173. Loup, C., Zanta, M. A., Caminade, A. M., Majoral, J. P. & Meunier, B. (1999) Preparation of Water-Soluble Cationic Phosphorus-Containing Dendrimers as DNA Transfecting Agents *Chem. Eur. J.* 5 3644-3650.
174. Yip, C. M. & McLaurin, J. (2001) Amyloid-beta peptide assembly: A critical step in fibrillogenesis and membrane disruption, *Biophysical Journal.* 80, 1359-1371.
175. Murphy, R. M. (2007) Kinetics of amyloid formation and membrane interaction with amyloidogenic proteins, *Biochim Biophys Acta.* 1768, 1923-34.
176. Mahfoud, R., Garmy, N., Maresca, M., Yahi, N., Puigserver, A. & Fantini, J. (2002) Identification of a common sphingolipid-binding domain in Alzheimer, prion, and HIV-1 proteins, *J Biol Chem.* 277, 11292-6.
177. Levy, M., Garmy, N., Gazit, E. & Fantini, J. (2006) The minimal amyloid-forming fragment of the islet amyloid polypeptide is a glycolipid-binding domain, *Febs J.* 273, 5724-35.
178. Fantini, J., Garmy, N., Mahfoud, R. & Yahi, N. (2002) Lipid rafts: structure, function and role in HIV, Alzheimer's and prion diseases, *Expert Rev Mol Med.* 4, 1-22.

179. Fantini, J. (2003) How sphingolipids bind and shape proteins: molecular basis of lipid-protein interactions in lipid shells, rafts and related biomembrane domains, *Cell Mol Life Sci.* 60, 1027-32.
180. Barrow, C. J., Yasuda, A., Kenny, P. T. & Zagorski, M. G. (1992) Solution conformations and aggregational properties of synthetic amyloid beta-peptides of Alzheimer's disease. Analysis of circular dichroism spectra, *J Mol Biol.* 225, 1075-93.
181. Tjernberg, L. O., Callaway, D. J., Tjernberg, A., Hahne, S., Lilliehook, C., Terenius, L., Thyberg, J. & Nordstedt, C. (1999) A molecular model of Alzheimer amyloid beta-peptide fibril formation, *J Biol Chem.* 274, 12619-25.
182. Baumketner, A. & Shea, J. E. (2006) Folding landscapes of the Alzheimer amyloid-beta(12-28) peptide, *J Mol Biol.* 362, 567-79.
183. Zou, W. Q., Yang, D. S., Fraser, P. E., Cashman, N. R. & Chakrabarty, A. (2001) All or none fibrillogenesis of a prion peptide, *Eur J Biochem.* 268, 4885-91.
184. Shearman, M. S., Hawtin, S. R. & Taylor, V. J. (1995) The intracellular component of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction is specifically inhibited by beta-amyloid peptides, *J Neurochem.* 65, 218-27.
185. Klajnert, B., Stanislawska, L., Bryszewska, M. & Palecz, B. (2003) Interactions between PAMAM dendrimers and bovine serum albumin, *Biochim Biophys Acta.* 1648, 115-26.
186. Caughey, B., Ernst, D. & Race, R. E. (1993) Congo red inhibition of scrapie agent replication, *J Virol.* 67, 6270-2.
187. Caughey, W. S., Raymond, L. D., Horiuchi, M. & Caughey, B. (1998) Inhibition of protease-resistant prion protein formation by porphyrins and phthalocyanines, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95, 12117-22.
188. Tagliavini, F., Forloni, G., Colombo, L., Rossi, G., Girola, L., Canciani, B., Angeretti, N., Giampaolo, L., Peressini, E., Awan, T., De Gioia, L., Ragg, E., Bugiani, O. & Salmona, M. (2000) Tetracycline affects abnormal properties of synthetic PrP peptides and PrP(Sc) in vitro, *J Mol Biol.* 300, 1309-22.
189. Masel, J. & Jansen, V. A. (2000) Designing drugs to stop the formation of prion aggregates and other amyloids, *Biophys Chem.* 88, 47-59.
190. Klajnert, B., Sadowska, M. & Bryszewska, M. (2004) The effect of polyamidoamine dendrimers on human erythrocyte membrane acetylcholinesterase activity, *Bioelectrochemistry.* 65, 23-6.
191. Nguyen, K. V., Gendrault, J. L. & Wolff, C. M. (2002) Poly-L-lysine dissolves fibrillar aggregation of the Alzheimer beta-amyloid peptide in vitro, *Biochem Biophys Res Commun.* 291, 764-8.
192. Esler, W. P., Stimson, E. R., Ghilardi, J. R., Felix, A. M., Lu, Y. A., Vinters, H. V., Mantyh, P. W. & Maggio, J. E. (1997) A beta deposition inhibitor screen using synthetic amyloid, *Nat Biotechnol.* 15, 258-63.
193. Ghanta, J., Shen, C. L., Kiessling, L. L. & Murphy, R. M. (1996) A strategy for designing inhibitors of beta-amyloid toxicity, *J Biol Chem.* 271, 29525-8.
194. Esfand, R. & Tomalia, D. A. (2001) Poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers: from biomimicry to drug delivery and biomedical applications, *Drug Discov Today.* 6, 427-436.
195. Mason, R. P., Estermyer, J. D., Kelly, J. F. & Mason, P. E. (1996) Alzheimer's disease amyloid beta peptide 25-35 is localized in the membrane hydrocarbon core: x-ray diffraction analysis, *Biochem Biophys Res Commun.* 222, 78-82.
196. Mason, R. P., Jacob, R. F., Walter, M. F., Mason, P. E., Avdulov, N. A., Chochina, S. V., Igbavboa, U. & Wood, W. G. (1999) Distribution and fluidizing action of soluble and aggregated amyloid beta-peptide in rat synaptic plasma membranes, *J Biol Chem.* 274, 18801-7.

197. McLaurin, J. & Chakrabartty, A. (1996) Membrane disruption by Alzheimer beta-amyloid peptides mediated through specific binding to either phospholipids or gangliosides. Implications for neurotoxicity, *J Biol Chem.* 271, 26482-9.
198. McLaurin, J. & Chakrabartty, A. (1997) Characterization of the interactions of Alzheimer beta-amyloid peptides with phospholipid membranes, *Eur J Biochem.* 245, 355-63.
199. McLaurin, J., Franklin, T., Fraser, P. E. & Chakrabartty, A. (1998) Structural transitions associated with the interaction of Alzheimer beta-amyloid peptides with gangliosides, *J Biol Chem.* 273, 4506-15.
200. Mirzabekov, T., Lin, M. C., Yuan, W. L., Marshall, P. J., Carman, M., Tomaselli, K., Lieberburg, I. & Kagan, B. L. (1994) Channel formation in planar lipid bilayers by a neurotoxic fragment of the beta-amyloid peptide, *Biochem Biophys Res Commun.* 202, 1142-8.
201. Pillot, T., Goethals, M., Vanloo, B., Talussot, C., Brasseur, R., Vandekerckhove, J., Rosseneu, M. & Lins, L. (1996) Fusogenic properties of the C-terminal domain of the Alzheimer beta-amyloid peptide, *J Biol Chem.* 271, 28757-65.
202. Pillot, T., Goethals, M., Vanloo, B., Lins, L., Brasseur, R., Vandekerckhove, J. & Rosseneu, M. (1997) Specific modulation of the fusogenic properties of the Alzheimer beta-amyloid peptide by apolipoprotein E isoforms, *Eur J Biochem.* 243, 650-9.
203. Terzi, E., Holzemann, G. & Seelig, J. (1994) Alzheimer beta-amyloid peptide 25-35: electrostatic interactions with phospholipid membranes, *Biochemistry.* 33, 7434-41.
204. Terzi, E., Holzemann, G. & Seelig, J. (1995) Self-association of beta-amyloid peptide (1-40) in solution and binding to lipid membranes, *J Mol Biol.* 252, 633-42.
205. Kim, S. I., Yi, J. S. & Ko, Y. G. (2006) Amyloid beta oligomerization is induced by brain lipid rafts, *J Cell Biochem.* 99, 878-89.
206. Yu, W., Zou, K., Gong, J. S., Ko, M., Yanagisawa, K. & Michikawa, M. (2005) Oligomerization of amyloid beta-protein occurs during the isolation of lipid rafts, *J Neurosci Res.* 80, 114-9.
207. Kakio, A., Yano, Y., Takai, D., Kuroda, Y., Matsumoto, O., Kozutsumi, Y. & Matsuzaki, K. (2004) Interaction between amyloid beta-protein aggregates and membranes, *J Pept Sci.* 10, 612-21.
208. Eehalt, R., Keller, P., Haass, C., Thiele, C. & Simons, K. (2003) Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts, *J Cell Biol.* 160, 113-23.
209. Benseny-Cases, N., Cocera, M. & Cladera, J. (2007) Conversion of non-fibrillar beta-sheet oligomers into amyloid fibrils in Alzheimer's disease amyloid peptide aggregation, *Biochem Biophys Res Commun.* 361, 916-21.
210. Kurganov, B., Doh, M. & Arispe, N. (2004) Aggregation of liposomes induced by the toxic peptides Alzheimer's Abetas, human amylin and prion (106-126): facilitation by membrane-bound GM1 ganglioside, *Peptides.* 25, 217-32.
211. Miura, T., Yoda, M., Takaku, N., Hirose, T. & Takeuchi, H. (2007) Clustered negative charges on the lipid membrane surface induce beta-sheet formation of prion protein fragment 106-126, *Biochemistry.* 46, 11589-97.

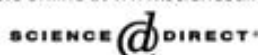
## **VIII. PUBLICACIONES**



A continuació es mostren les publicacions que han contribuït al treball experimental d'aquesta tesi:

- Klajnert, B., **Cortijo-Arellano, M.**, Bryszewska, M. & Cladera, J. (2006) Influence of heparin and dendrimers on the aggregation of two amyloid peptides related to Alzheimer's and prion diseases, *Biochem Biophys Res Commun.* 339, 577-82.
- Klajnert, B., **Cortijo-Arellano, M.**, Cladera, J. & Bryszewska, M. (2006) Influence of dendrimer's structure on its activity against amyloid fibril formation, *Biochem Biophys Res Commun.* 345, 21-8.
- **M. Cortijo-Arellano**, V. Buzón, N. Benseny-Cases, M. Cócera and J. Cladera. (2006) A $\beta$ 1-28 Amyloid Formation Depends on a Specific Membrane Lipid Composition, *Collection of Selected Articles of Papers Presented at the 10th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders (July 16-20, 2006, Madrid, Spain)*.
- Klajnert, B., **Cortijo-Arellano, M.**, Cladera, J., Majoral, JP., Caminade, AM., & Bryszewska, M (2007) Influence of dendrimer's structure on its activity against amyloid fibril formation, *Biochem Biophys Res Commun.* 364, 20-25.
- **M. Cortijo-Arellano**, J. Ponce, N. Durany, J. Cladera (2008) Amiloidogenic properties of the prion protein fragment PrP(185-208): Comparison with Alzheimer's peptide A $\beta$ (1-28), influence of heparin and cell toxicity, *Biochem Biophys Res Commun.* (En premsa).



Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

Biochemical and Biophysical Research Communications 339 (2006) 577–582

BBRC

[www.elsevier.com/locate/ybbrc](http://www.elsevier.com/locate/ybbrc)

## Influence of heparin and dendrimers on the aggregation of two amyloid peptides related to Alzheimer's and prion diseases

Barbara Klajnert<sup>a</sup>, Marta Cortijo-Arellano<sup>b</sup>, Maria Bryszewska<sup>a</sup>, Josep Cladera<sup>b,\*</sup><sup>a</sup> Department of General Biophysics, University of Lodz, ul. Banacha 12/16, Lodz 90-237, Poland<sup>b</sup> Biophysics Unit, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Catalonia, Spain

Received 7 November 2005

Available online 17 November 2005

### Abstract

Amyloid plaques composed of proteinaceous aggregates are commonly found in brains affected by Alzheimer's disease and spongiform encephalopathies. A structural homology has been recently described for the Alzheimer's peptide A $\beta$ 1–28 and the segment of the prion protein Prp185–208. In the present paper, further elements in common are reported: the aggregation processes are in both cases enhanced by the model glucosaminoglycan heparin and dendrimers can modulate the aggregation process by affecting the nucleation rate at low concentrations and the elongation rate at high concentrations. Nucleation and elongation rate constants are derived from fittings to a nucleation dependent polymerization model.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Amyloid; Alzheimer; Prion; Dendrimer; Heparin

The formation of amyloid plaques is a typical feature of the so-called conformational diseases, such as Alzheimer's disease and spongiform encephalopathies among others [1–4]. In these pathologies, structural changes affecting proteins or peptides otherwise normally expressed in the organism (amyloid peptide precursor protein, prion protein Prp<sup>C</sup>) lead to the formation of proteinase resistant fibrils composed of the aggregated abnormal forms of the proteins (A $\beta$  peptides, abnormal form of the prion protein Prp<sup>Sc</sup>). These aggregates are rich in  $\beta$ -sheet structure, and they are the main component of the amyloid plaques in the affected central nervous systems [5–8]. Proteinaceous fibrils are normally found associated to other elements, such as cell membranes and glycosaminoglycans (GAGs). The importance of the latter in the aggregation processes of both A $\beta$  peptides and prions has been established [9–12]. The aggregation of the Alzheimer's A $\beta$  peptide has been shown to be enhanced by GAGs such as heparin, hep-

aran sulfate, and others, whereas in the case of prion aggregation, inhibiting and stimulating conditions have been described in the presence of GAGs. As for the effects of these polymers on the development of the pathologies, some controversy exists at present since both possible protective and enhancing effects have been described.

Recently, Mahfoud et al. [13] have identified a possible sphingolipid binding domain, structurally homologous, in the segment 1–28 of the A $\beta$ 1–40 peptide and the segment 185–208 of the human prion protein.

The above-mentioned characteristics related to amyloid peptides could be part of a common aggregation mechanism, which detailed knowledge would be of paramount importance for the design of drugs that could act on the formation of the aggregates. In this respect, the branched polymers known as dendrimers have been reported to affect the capacity of the prion protein to aggregate and to infect cells [14–16].

Dendrimers are a new class of polymers which are synthesized in a stepwise manner with branched monomer units [17–24]. In the first step, branched monomers react with a polyfunctional core, leaving the reactive end groups

\* Corresponding author. Fax: +34 971935811907.

E-mail address: [josep.cladera@uab.es](mailto:josep.cladera@uab.es) (J. Cladera).



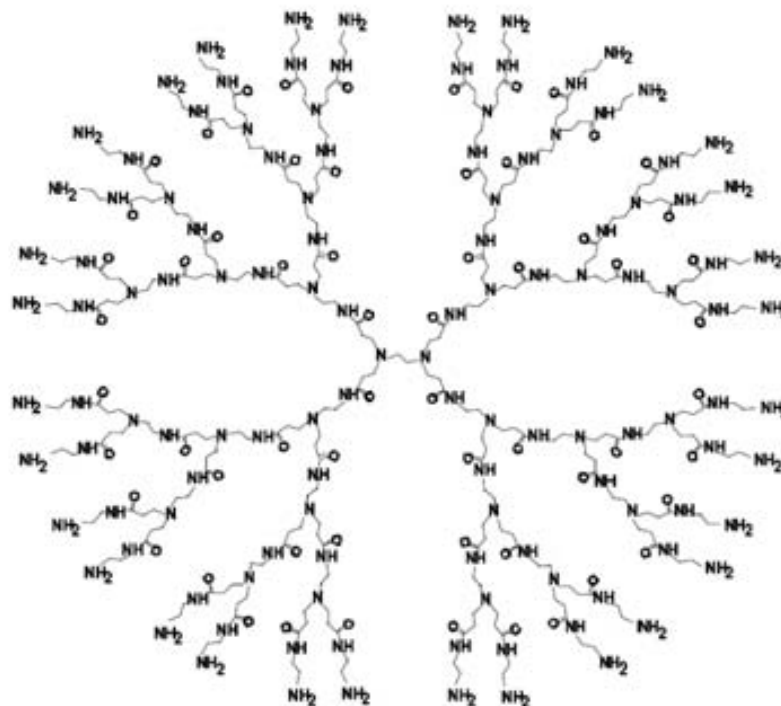


Fig. 1. Structure of a generation three (G3) PAMAM dendrimer.

on the surface. The more layers of monomers are attached, the higher the generation of the dendrimer synthesized. Polyamidoamine (PAMAM) dendrimers of the third generation, G3, for example, possess 32 amino groups on the surface (Fig. 1).

In the present work, we have compared the aggregation properties of the Alzheimer's amyloid peptide A $\beta$ 1–28 with those of the human prion protein fragment Prp185–208, which share the above-mentioned sphingolipid-binding motif [13]. Aggregation kinetics have been analyzed in terms of a nucleation dependent polymerization model, from which the nucleation and elongation apparent rate constants have been calculated. The effect of PAMAM-G3 dendrimers on the kinetic parameters has been determined.

### Materials and methods

Synthetic peptides A $\beta$ 1–28 [DAEDFQHDSDGYRHHQKLVFFKARDVGGNEK] and Prp185–208 [EQHTVTTTTEGEMPTRTDVEEMER] were purchased from JPT Peptides Technologies (Germany). Stock peptide solutions were kept in aqueous buffer at neutral pH. Thioflavin T was purchased from Sigma Chemical. PAMAM-G3 (generation 3) dendrimers were purchased from Dendritic Nanotechnologies (USA).

**Fluorescence measurements.** The aggregation kinetics of the amyloid peptides were monitored using the dye Thioflavin T (ThT), whose fluorescence is dependent on the formation of amyloid aggregates [25,26]. Fluorescence measurements were carried out in a SLM-Aminco 8000 spectrofluorimeter. Excitation and emission wavelengths were set at 450 and 490 nm, respectively. Temperature was controlled with a thermostatic

bath at 37 °C. The peptide concentration in the samples was always 50  $\mu$ M, and heparin was added at 0.041 mg/ml.

**Kinetic analysis.** Data were analyzed in terms of a nucleation dependent polymerization mechanism, as previously described [27,28]. The approach considers amyloid fibril formation as an autocatalytic process with a nucleation reaction followed by an elongation one with its respective kinetic constants,  $k_n$  and  $k_e$ . Experimental data can be fitted to such a model using the following equation:

$$f = (\rho(\exp[(1 + \rho)kt] - 1)) / (1 + \rho \exp[(1 + \rho)kt]), \quad (1)$$

where  $f$  is the fraction of the fibrillar form;  $k = k_e a$ , being  $a$  the initial peptide concentration; and  $\rho = k_n/k_e$ .

In order to fit the experimental data to Eq. (1), fluorescence was converted to fraction of fibril formation, considering  $f = 0$  at  $t = 0$  and  $f = 1$  at the plateau of each sigmoidal curve.

### Results

The time-dependent fluorescence variation of Thioflavin T (ThT), reflecting the formation of amyloid aggregates, is shown in Fig. 2 for A $\beta$ 1–28 and Prp185–208 in the absence and presence of heparin at pH 5.5. No aggregation was observed for A $\beta$ 1–28 at pH 7.5 whereas at pH 5.5 the typical sigmoidal trace was observed (Fig. 2A), in agreement with previous studies [29]. The presence of heparin in the medium (0.041 mg/ml) at pH 5.5 clearly shortened the lag time of the aggregation process and increased the slope of the sigmoid. However, the presence of the PAMAM-G3 dendrimer (5  $\mu$ M) completely inhibited aggregation in the monitored time interval.

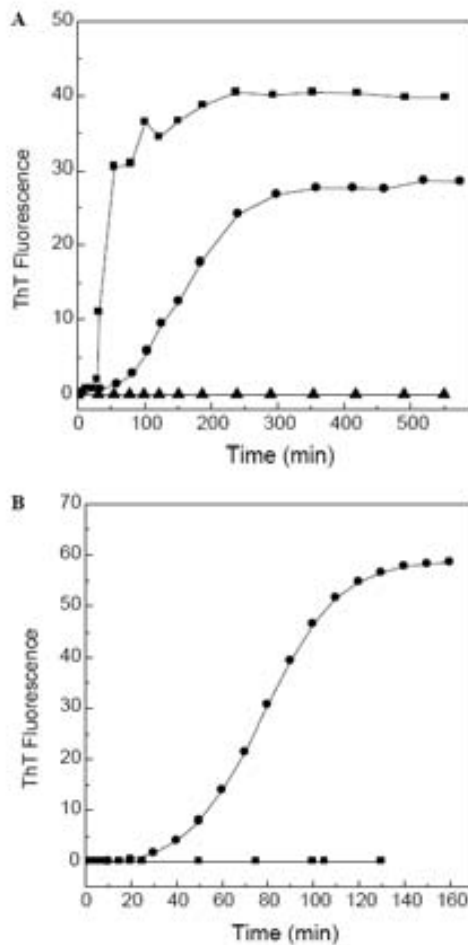


Fig. 2. Thioflavin T fluorescence variation during the aggregation processes of the amyloidogenic peptides in 10 mM Tris buffer, pH 5.5. (A) Aβ1-28 (●); Aβ1-28 in the presence of heparin 0.041 mg/ml (■); Aβ1-28 in the presence of 5 μM PAMAM-G3 (▲). (B) Prp185-208 (■); Prp185-208 in the presence of heparin 0.041 mg/ml (●). Peptide concentration was 50 μM. Temperature was set at 37 °C. The samples were continuously stirred during fluorescence measurements. ThT concentration was 35 μM.

In the case of Prp185-208 (Fig. 2B), no aggregation occurred independently of the pH of the suspension (5.5 or 7.5). The peptide did however aggregate in the presence of heparin and dendrimers inhibited the aggregation.

The effect of dendrimer concentration was then checked for both peptides in the presence of heparin. The results are shown in Fig. 3. The observed fluorescence changes reveal that at certain low concentrations of dendrimers the aggregation process is accelerated whereas higher concentrations do slow it down. Although the final concentration (fluorescence plateau) of Aβ1-28 aggregates does not seem to be significantly affected by the presence of dendrimers, they clearly lower it in the case of PrP 185-208.

In order to further analyze the kinetic data, experimental curves shown in Fig. 3 were fitted to Eq. (1). These

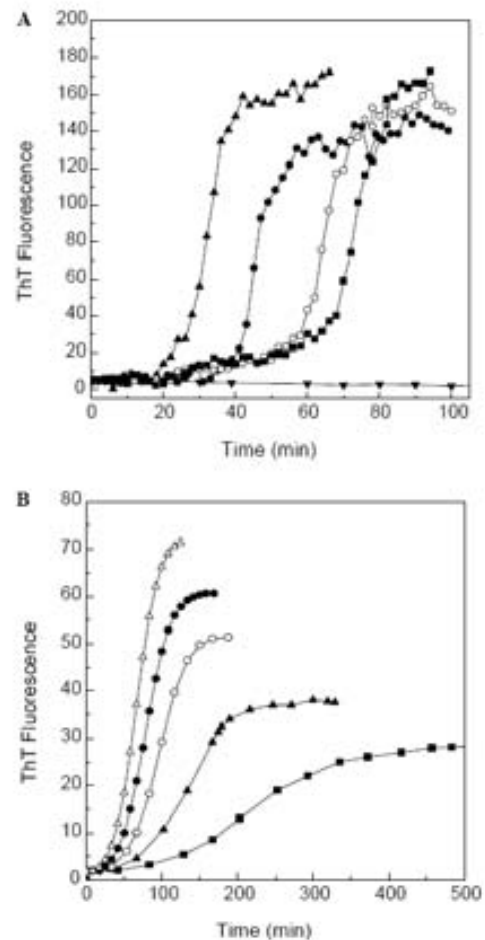


Fig. 3. Thioflavin T fluorescence variation during the aggregation processes of the amyloidogenic peptides in 10 mM Tris buffer, pH 5.5, and 0.041 mg/ml heparin, as a function of dendrimer PAMAM-G3 concentration. (A) Aβ1-28: 0.001 (▲), 0 (control) (●), 0.1 (○), 1 (■), and 5 (▼) μM PAMAM-G3. (B) Prp185-208: 0.01 (△), 0 (control) (●), 0.15 (○), 0.25 (▲), and 1 (■) μM PAMAM-G3. Experimental conditions were set as in Fig. 1.

implied analyzing the aggregation processes as an autocatalytic reaction, according to the following kinetic scheme, described in Sabaté et al. [27]:



where M stands for monomeric peptide and  $P_n$  for polymeric peptide.

Fig. 4 shows the mathematical fit of the Aβ1-28 aggregation kinetics in the presence of heparin to Eq. (1). Nucleation and elongation rate constants derived from this fitting and the rest of experimental curves in Fig. 3 are summarized in Table 1. According to the table, low concentrations of dendrimers affect the nucleation

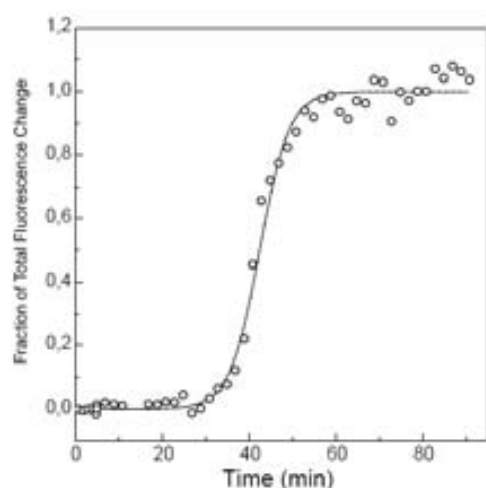


Fig. 4. Kinetic analysis of A $\beta$ 1–28 aggregation in the presence of heparin. The continuous line corresponds to the mathematical fit of the ThT fluorescence variation of 50  $\mu$ M A $\beta$ 1–28 in 10 mM Tris buffer and 0.041 mg/ml heparin, pH 5.5 (data from Fig. 2A), to Eq. (1). Prior to the fitting, data were transformed into fractions of total fibril formation. The nucleation and elongation constants derived from the fitting are given in Table 1.

Table 1  
Nucleation and elongation rate constants calculated by fitting experimental data in Fig. 2 to Eq. (1)

Dendrimer ( $\mu$ M)	$k_n$ ( $s^{-1}$ )	$k_e$ ( $L \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$ )
Prp 185–208		
0	$5.7 \times 10^{-6}$	22.2
0.001	$2.5 \times 10^{-5}$	22.2
0.01	$1.1 \times 10^{-5}$	22.6
0.05	$1 \times 10^{-5}$	23.4
0.15	$5.3 \times 10^{-6}$	17.2
0.25	$5.4 \times 10^{-6}$	11
1	$5.2 \times 10^{-6}$	5.6
A $\beta$ (1–28)		
0	$2.1 \times 10^{-8}$	97
0.001	$2.2 \times 10^{-6}$	98
0.1	$7.3 \times 10^{-10}$	80
1	$6.5 \times 10^{-10}$	70

The parameters  $\rho$  and  $k$ , derived from Eq. (1) have been used to calculate the rate constants:  $k_n = \rho k$  and  $k_e = k/a$  ( $a$  = initial peptide concentration). Rate constants units are given according to [27].

rate constant. This effect is particularly clear for A $\beta$ 1–28: the presence of dendrimer 0.001  $\mu$ M increases the nucleation rate constant by two orders of magnitude. For Prp185–208, the effect on  $k_n$  is smaller but nevertheless, the result of the calculations shows that in the presence of 0.001  $\mu$ M dendrimer  $k_n$  is four times larger. With respect to the elongation rate constant, dendrimer concentrations above 0.1  $\mu$ M do mainly affect the elongation process by decreasing the elongation rate constant. The effect on  $k_e$  is more pronounced for Prp185–208 than for A $\beta$ 1–28.

## Discussion

Amyloid peptides related to Alzheimer's disease and prion proteins are the main components of the so-called amyloid plaques found in brains affected by these pathologies. The aggregation process, which leads to the formation of the amyloid fibrils and plaques, has been shown to depend in both cases on the presence of other macromolecules such as glycosaminoglycans and lipids from the cell membrane [9–12]. Mahfoud et al. [13] have shown that A $\beta$ 1–28 (the hydrophilic part of A $\beta$ 1–42, the main component of amyloid fibrils in Alzheimer's disease) and Prp185–208 (a fragment of the human prion protein) may share a structural homology (a sphingolipid binding motif). Having this in mind we set up the present work in order to explore other possible common features between the two peptidic sequences in relation to their interaction with glycosaminoglycans and dendrimers. The results show that heparin enhances the aggregation capacity of both A $\beta$ 1–28 and Prp185–208, and that this aggregation can be modulated by the presence of dendrimers in the medium.

Contrary to what has been observed for A $\beta$ 1–28 [29], Prp185–208 does not aggregate at pH 5.5. In the case of A $\beta$ 1–28, this effect of pH on the aggregation properties of the peptide is related to the presence of several His residues in its sequence. Prp185–208 does also possess a His residue in its sequence, although as the results show, the aggregation capacity of the peptide does not depend on the protonation state of this residue.

Both peptides, on the other hand, aggregate in the presence of heparin. The effect of heparin can be again related to the His residues in the peptide sequences. A $\beta$ 1–28 contains a heparin binding consensus sequence (VHHQKL) [11,30] and the sequence VTHQK is present, at the N-ter of Prp185–208. The effect of heparin could be therefore related to the existence of these binding motives. When heparin is present it is obvious that dendrimers can interact electrostatically with both heparin and the peptides. The observed effect of a low dendrimer concentration (Fig. 3) helps proving that an interaction of dendrimers with both the peptides and heparin takes place. Low concentrations of dendrimers shorten the lag time (the nucleation process). If the effect of dendrimers were only through its interaction with heparin (impeding the interaction of the GAG with the peptides), lowering the dendrimer concentration would move the fluorescence curves from Fig. 3 in the presence of dendrimers towards the control trace (absence of heparin) but curves would not be found to the left of the control in the graph. Since this is not the case and we get curves with shorter lag times than the controls, it is clear that dendrimers also interact with the peptide molecules.

Dendrimers are shown to clearly affect the aggregation properties of both peptides. In the case of A $\beta$ 1–28, a direct interaction of dendrimers with the peptide can be deduced from the data presented in Fig. 2. It is clear that the presence of the dendrimer inhibits peptide aggregation. In the presence of heparin, the analysis of the data by treating

the nucleation polymerization process as an autocatalytic reaction (Eq. (1)) leads to the conclusion that dendrimers do affect mainly the nucleation rate constant in the case of A $\beta$ 1–28 and the elongation rate constant in the case of Prp185–208 (Table 1). On the other hand, for both A $\beta$ 1–28 and Prp185–208, low dendrimer concentrations do mainly affect the nucleation rate constant (Table 1) by increasing it (nuclei form faster). High dendrimer concentrations do mainly have an effect on the elongation rate constant. At low concentration dendrimers seem to act as nucleation centers whereas at high concentration they act on the interaction of monomers with the already formed aggregates. It could be that when the ratio of dendrimer/peptide is low, dendrimers facilitate the contacts between peptide molecules (accelerating the formation of the nucleus). On the other hand, at high dendrimer/peptide ratios there could be enough dendrimer to create a sort of layer surrounding the nucleus, in a similar way to what has been described for the interaction of dendrimers with albumin [31], which in this case could make difficult the elongation process.

The influence of dendrimers on prion-related aggregates has been previously shown [14–16] but it is reported here for the first time in relation to the Alzheimer's peptides.

In conclusion it can be said that the results presented clearly show that A $\beta$ 1–28 and Prp185–208 aggregation processes are in both cases enhanced by heparin and that dendrimers modulate the aggregation process by affecting the nucleation rate at low concentrations and the elongation rate at high concentrations. These newly defined common characteristics can be added to the already described ability of these sequences to adopt a homologous sphingolipid-binding motif.

The interest in the reported effect of dendrimers has to be considered within the ongoing search for compounds that can affect amyloid formation and in relation to the structural intermediates in this process which are responsible for the cytotoxic effects. Nowadays the idea that low molecular weight aggregates, rather than fibrils, would be the cytotoxic agents has gained considerable ground [32]. Low dendrimer concentrations could in this sense contribute to decrease the lifetime of low molecular weight intermediates and contribute to decrease the potential cytotoxic effects of the peptides. This would be particularly significant in the case of A $\beta$ 1–28 (larger effect on  $k_n$  than for Prp185–208). High dendrimer concentrations on the other hand could contribute to increase the cytotoxicity, since by decreasing the elongation rate constant and therefore decelerating the formation of fibrils, they could increase the lifetime of low molecular weight aggregates. Data reported in the present work can therefore be useful to evaluate any potential use of dendrimers as anti-amyloidogenic agents.

#### Acknowledgments

We thank Dr. E. Padrós, Dr. T. Lazarova, and V. Buzón for reading the manuscript and for their valuable sug-

gestions. This work has been funded by the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia (EET 2002-05139 and BIO 2003-02848). MC-A has a fellowship of the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia (EET 2002-05139).

#### References

- [1] R.J. Ellis, T.J. Pinheiro, Medicine: danger-misfolding proteins, *Nature* 416 (2002) 483–484.
- [2] C.M. Dobson, Protein misfolding, evolution and disease, *Trends Biochem. Sci.* 24 (1999) 329–332.
- [3] Y. Xing, K. Higuchi, Amyloid fibril proteins, *Mech. Ageing Dev.* 123 (2002) 1625–1636.
- [4] E. Zerovnik, Amyloid-fibril formation. Proposed mechanisms and relevance to conformational disease, *Eur. J. Biochem.* 269 (2002) 3362–3371.
- [5] L.C. Serpell, Alzheimer's amyloid fibrils: structure and assembly, *Biochim. Biophys. Acta* 1502 (2000) 16–30.
- [6] C.A. Rottkamp, C.S. Atwood, J.A. Joseph, A. Nunomura, G. Perry, M.A. Smith, The state versus amyloid-beta: the trial of the most wanted criminal in Alzheimer disease, *Peptides* 23 (2002) 1333–1341.
- [7] M.L. DeMarco, V. Daggett, From conversion to aggregation: protofibril formation of the prion protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (2004) 2293–2298.
- [8] S.B. Prusiner, Prions, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 13363–13383.
- [9] J. Diaz-Nido, F. Wandosell, J. Avila, Glycosaminoglycans and beta-amyloid, prion and tau peptides in neurodegenerative diseases, *Peptides* 23 (2002) 1323–1332.
- [10] J. McLaurin, T. Franklin, X. Zhang, J. Deng, P.E. Fraser, Interactions of Alzheimer amyloid-beta peptides with glycosaminoglycans effects on fibril nucleation and growth, *Eur. J. Biochem.* 266 (1999) 1101–1110.
- [11] K. Fukuchi, M. Hart, L. Li, Alzheimer's disease and heparan sulfate proteoglycan, *Front Biosci.* 3 (1998) d327–d337.
- [12] M. Perez, F. Wandosell, C. Colaco, J. Avila, Sulphated glycosaminoglycans prevent the neurotoxicity of a human prion protein fragment, *Biochem. J.* 335 (Pt 2) (1998) 369–374.
- [13] R. Mahfoud, N. Garny, M. Maresca, N. Yahi, A. Puigserver, J. Fantini, Identification of a common sphingolipid-binding domain in Alzheimer, prion, and HIV-1 proteins, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 11292–11296.
- [14] S. Supattapone, H.O. Nguyen, F.E. Cohen, S.B. Prusiner, M.R. Scott, Elimination of prions by branched polyamines and implications for therapeutics, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1999) 14529–14534.
- [15] S. Supattapone, H. Wille, L. Uyechi, J. Safar, P. Tremblay, F.C. Szoka, F.E. Cohen, S.B. Prusiner, M.R. Scott, Branched polyamines cure prion-infected neuroblastoma cells, *J. Virol.* 75 (2001) 3453–3461.
- [16] P.M. Heegaard, H.G. Pedersen, J. Flink, U. Boas, Amyloid aggregates of the prion peptide PrP106–126 are destabilised by oxidation and by the action of dendrimers, *FEBS Lett.* 577 (2004) 127–133.
- [17] M.J. Cloninger, Biological applications of dendrimers, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6 (2002) 742–748.
- [18] B. Klajnert, M. Bryszewska, Dendrimers: properties and applications, *Acta Biochim. Pol.* 48 (2001) 199–208.
- [19] B. Klajnert, M. Bryszewska, Fluorescence studies on PAMAM dendrimers interactions with bovine serum albumin, *Bioelectrochemistry* 55 (2002) 33–35.
- [20] B. Klajnert, M. Sadowska, M. Bryszewska, The effect of polyamidoamine dendrimers on human erythrocyte membrane acetylcholinesterase activity, *Bioelectrochemistry* 65 (2004) 23–26.
- [21] J. Sidhu, T.L. Bloor, S. Coudero-Azouani, J. Penfold, J.F. Holzwarth, E. Wyn-Jones, Interactions of poly(amidoamine) dendrimers with the surfactants SDS, DTAB, and C12EO6: an equilibrium and structural study using a SDS selective electrode, isothermal titration calorimetry, and small angle neutron scattering, *Langmuir* 20 (2004) 9320–9328.

- [22] Y.G. Kim, J.C. Garcia-Martinez, R.M. Crooks, Electrochemical properties of monolayer-protected Au and Pd nanoparticles extracted from within dendrimer templates, *Langmuir* 21 (2005) 5485–5491.
- [23] H. Ye, R.W. Scott, R.M. Crooks, Synthesis, characterization, and surface immobilization of platinum and palladium nanoparticles encapsulated within amine-terminated poly(amidoamine) dendrimers, *Langmuir* 20 (2004) 2915–2920.
- [24] M.F. Ottaviani, S. Jockusch, N.J. Turro, D.A. Tomalia, A. Barbon, Interactions of dendrimers with selected amino acids and proteins studied by continuous wave EPR and Fourier transform EPR, *Langmuir* 20 (2004) 10238–10245.
- [25] H. LeVine 3rd, Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution, *Protein Sci.* 2 (1993) 404–410.
- [26] M.R. Krebs, E.H. Bromley, A.M. Donald, The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: localisation and implications, *J. Struct. Biol.* 149 (2005) 30–37.
- [27] R. Sabate, M. Gallardo, J. Estelrich, An autocatalytic reaction as a model for the kinetics of the aggregation of beta-amyloid, *Biopolymers* 71 (2003) 190–195.
- [28] M. Kamihira, A. Naito, S. Tuzi, A.Y. Nosaka, H. Saito, Conformational transitions and fibrillation mechanism of human cationin as studied by high-resolution solid-state <sup>13</sup>C NMR, *Protein Sci.* 9 (2000) 867–877.
- [29] K. Ma, E.L. Clancy, Y. Zhang, D.G. Ray, K. Wollenberg, M. Zagorski, Residue-specific pKa measurements of the beta-peptide and mechanism of pH-induced amyloid formation, *J. Am. Chem. Soc.* 121 (1999) 8698–8706.
- [30] D.J. Watson, A.D. Lander, D.J. Selkoe, Heparin-binding properties of the amyloidogenic peptides Abeta and amylin. Dependence on aggregation state and inhibition by Congo red, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 31617–31624.
- [31] B. Klajnert, L. Stanislawska, M. Bryszewska, B. Palecz, Interactions between PAMAM dendrimers and bovine serum albumin, *Biochim. Biophys. Acta* 1648 (2003) 115–126.
- [32] M.P. Lambert, A.K. Barlow, B.A. Chromy, C. Edwards, R. Freed, M. Liosatos, T.E. Morgan, I. Rozovsky, B. Trommer, K.L. Viola, P. Wals, C. Zhang, C.E. Finch, G.A. Krafft, W.L. Klein, Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 6448–6453.



## Influence of dendrimer's structure on its activity against amyloid fibril formation

B. Klajnert <sup>a,\*</sup>, M. Cortijo-Arellano <sup>b</sup>, J. Cladera <sup>b</sup>, M. Bryszewska <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of General Biophysics, University of Lodz, Poland

<sup>b</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain

Received 3 April 2006

Available online 24 April 2006

### Abstract

Inhibition of fibril assembly is a potential therapeutic strategy in neurodegenerative disorders such as prion and Alzheimer's diseases. Highly branched, globular polymers—dendrimers—are novel promising inhibitors of fibril formation. In this study, the effect of polyamidoamine (PAMAM) dendrimers (generations 3rd, 4th, and 5th) on amyloid aggregation of the prion peptide PrP 185–208 and the Alzheimer's peptide A $\beta$  1–28 was examined. Amyloid fibrils were produced *in vitro* and their formation was monitored using the dye thioflavin T (ThT). Fluorescence studies were complemented with electron microscopy. The results show that the higher the dendrimer generation, the larger the degree of inhibition of the amyloid aggregation process and the more effective are dendrimers in disrupting the already existing fibrils. A hypothesis on dendrimer–peptide interaction mechanism is presented based on the dendrimers' molecular structure.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Dendrimer; Prion; Alzheimer; Amyloid peptide; Aggregation

Amyloid fibrils are aggregates of normally soluble peptides or proteins. There is a group of diseases that are characterized by the deposition of amyloid fibrils. Among them there are neurological disorders such as Alzheimer's and prion diseases. Thus, inhibition of fibril assembly is a potential strategy for therapeutic intervention. It has been recently shown that polyamidoamine and polypropyleneimine dendrimers are promising candidates for the treatment of prion diseases [1,2]. These relatively novel macromolecules are globular and are characterized by a densely packed surface. Due to their specific structure they are suitable for a variety of biomedical applications. Dendrimers promote the clearance of pre-existing PrP<sup>Sc</sup> (the abnormally folded prion protein, which forms amyloid fibrils). Dendrimers also prevent the conversion of the normal cellular PrP<sup>C</sup> into PrP<sup>Sc</sup> [1,2]. These branched polyamines are the first class of compounds that have been

shown to be able to cure a prion infection in living cells. This fact received considerable interest and other types of dendrimers were tested as possible anti-prion agents [3,4].

Amyloid fibrils can be produced *in vitro* by exposing disease-associated peptides to destabilizing conditions. We have chosen this approach with the aim of contributing to the molecular characterization of the interactions between dendrimers and peptides.

We have used the third, fourth, and fifth generation of polyamidoamine dendrimers (PAMAM G3, PAMAM G4, and PAMAM G5) in order to study how dendrimers' structure and size determine their effect on amyloid formation. Dendrimers are built in a cyclic manner from a central core molecule that is surrounded by layers of branched monomers. The more layers are attached, the higher the so-called generation. As generation increases, the amount of surface groups increases too, so the shape of the dendrimer changes from flat and ellipsoidal to globular [5]. In case of polyamidoamine dendrimers ethylenediamine is the core molecule and branched units are constructed from

\* Corresponding author. Fax: +48 42 635 44 74.

E-mail address: aklajn@biol.uni.lodz.pl (B. Klajnert).

Table 1  
Characterization of used dendrimers [32]

Name, generation	Terminal groups	Number of terminal groups	Molecular weight [Da]	Diameter [nm]
PAMAM, G3	-NH <sub>2</sub>	32	6,909	3.6
PAMAM, G4	-NH <sub>2</sub>	64	14,215	4.5
PAMAM, G5	-NH <sub>2</sub>	128	28,826	5.4

both methyl acrylate and ethylenediamine [6]. A summary of the characteristics of the dendrimers used in the present study is given in Table 1.

As a continuation of our previous studies we have chosen Alzheimer's peptide A $\beta$  1–28 and a segment of prion protein PrP 185–208 [7]. A structural homology has been recently described for these two sequences and a recent computational study has shown that residues 180–193 are one of the fibrilization sites in PrP [8,9].

Dendrimers were studied in a system containing heparin as a model glucosaminoglycan. It has been found that amyloid fibrils *in vivo* are normally associated with GAGs, and both PrP 185–208 and A $\beta$  1–28 have been previously shown to aggregate in the presence of heparin [10,11].

## Materials and methods

**Materials.** Synthetic peptides A $\beta$  1–28 [DAEFRHDSGYEVHHQ KLVFFAEDVGSNK] and PrP 185–208 [KQHTVTTTKGENFTET DVKMMER] were purchased from JPT Peptide Technologies GmbH (Germany). Stock peptide solutions were kept in aqueous buffer at pH 7.5. Thioflavin T (T-3516) and heparin-sodium salt (H-4784) were purchased from Sigma Chemical Company. Dendrimers PAMAM G3, PAMAM G4, and PAMAM G5 were obtained from Dendritic NanoTechnologies Inc. (USA) and dissolved in aqueous buffer. All other chemicals were of analytical grade. Water used to prepare solutions was double-distilled.

**Formation of amyloid fibrils—ThT assay.** The process of aggregation was monitored using the dye thioflavin T (ThT), whose fluorescence depends on the presence of amyloid structures [12,13]. A stock solution of peptide (1.2 mmol/l) in Tris buffer, pH 7.5, was diluted to a final concentration of 50  $\mu$ mol/l. Then ThT and heparin were added (final concentrations of 35  $\mu$ mol/l and 0.041 mg/ml, respectively) and pH was adjusted to 5.5 with aliquots of HCl. Fluorescence measurements were performed at 37 °C upon continuous shaking using a microplate reader (Wallac 1440 VICTOR<sup>3</sup> V Multilabel Counter from Perkin-Elmer). Aggregation kinetics were monitored by measuring the fluorescence intensity every 375 s using 450-nm excitation and 490-nm emission filters.

**Electron microscopy.** Ten microliters of sample from the fluorescence experiment (see previous paragraph) was placed on a carbon 400 mesh grid. It was dried and the excess of solution was removed with a filter paper. The sample was stained with 2% uranyl acetate for 2 min, dried, and then viewed using a Hitachi H-7000 electron microscope.

## Results

The fluorescence of thioflavin T is normally used to monitor the formation of amyloid fibrils. Figs. 1 and 2 show the fluorescence variation of ThT for A $\beta$  1–28 and PrP 185–208 in the absence and presence of increasing concentrations of dendrimers. The time-dependent increase in ThT fluorescence follows a sigmoidal curve typical of a nucleated polymerization reaction. Peptide monomers

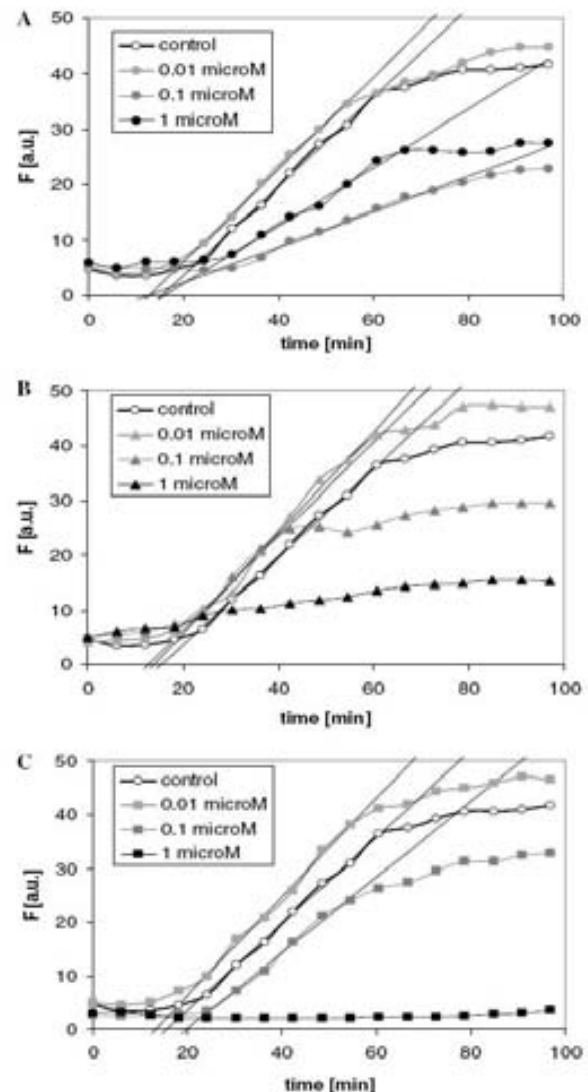


Fig. 1. Changes in fluorescence of ThT during the aggregation processes of A $\beta$  1–28 peptide in the presence of PAMAM G3 (A), PAMAM G4 (B), and PAMAM G5 (C).

slowly combine to form non-fibrillar structures known as nuclei (lag phase). Addition of peptide monomers to these nuclei and combination of nuclei, together with a conformational transition which implies the formation of fibrillar  $\beta$ -sheet structures, results in the so-called elongation phase

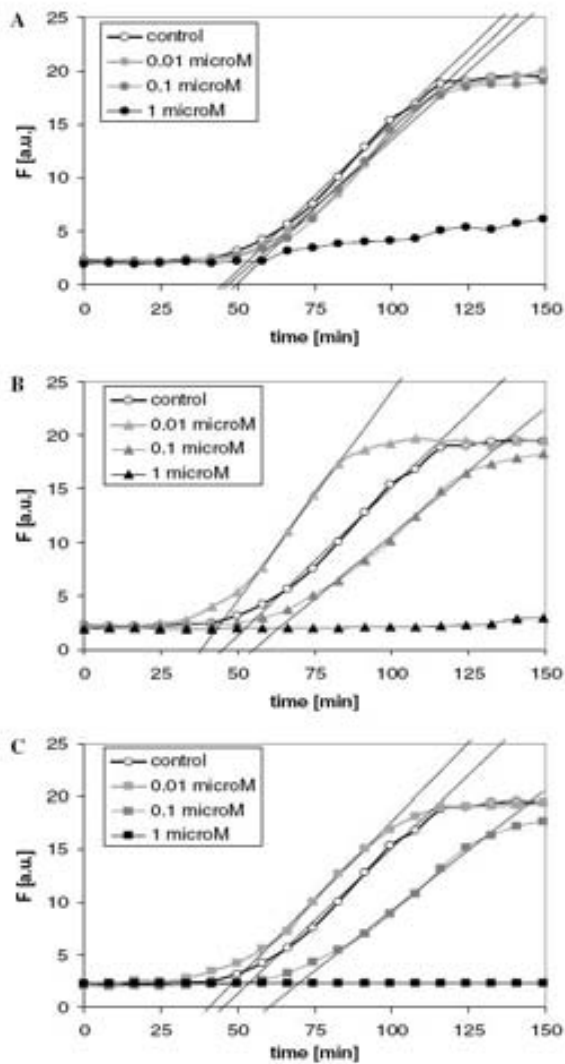


Fig. 2. Changes in fluorescence of ThT during the aggregation processes of PrP 185–208 peptide in the presence of PAMAM G3 (A), PAMAM G4 (B), and PAMAM G5 (C).

(the faster, exponential part of the sigmoid). In this latter process, breakage of long fibrils giving shorter structures that can act as seeds may be an important part of the mechanism [14]. From the graphs, the duration of the nucleation phase can be estimated by determining the point where the prolongation of the exponential part of the sigmoid cuts the time axis [15]. Fig. 1 shows that in the case of A $\beta$  1–28 the duration of the nucleation reaction (lag phase) does not change much, compared to the control, in the presence of PAMAM dendrimers. At low dendrimer concentration (0.01  $\mu\text{mol/l}$ ) there is no effect on the elongation rate (measured as the slope of the exponential part of the sigmoid) or at most a slight increase (in agreement with previous reports [7]). PAMAM G3 dendrimers, however,

clearly slow down the elongation reaction when present at 0.1 and 1  $\mu\text{mol/l}$ , significantly reducing as well, the amount of final fibrils formed. The effect of PAMAM G4, and PAMAM G5 at 0.1  $\mu\text{mol/l}$  on the elongation rate is much less evident than for PAMAM G3, although at 1  $\mu\text{mol}$  PAMAM G4 and PAMAM G5 completely inhibit the formation of fibers in the monitored time interval. Low generation PAMAM dendrimers have therefore a clear

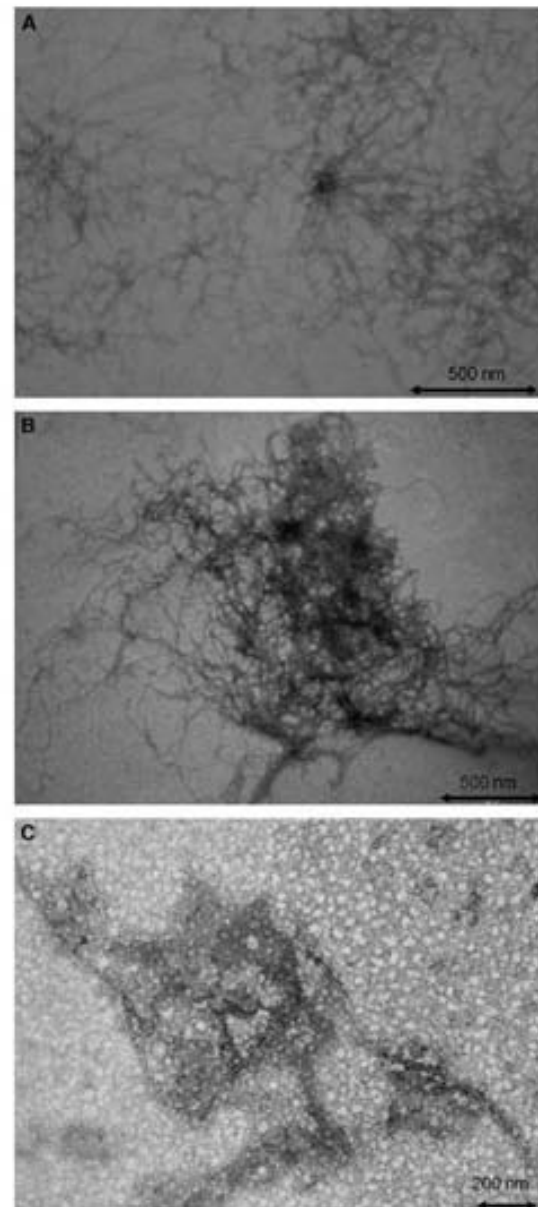


Fig. 3. Electron micrographs of PrP structures in the absence of dendrimers (A), in the presence of 1  $\mu\text{mol/l}$  PAMAM G3 (B) and 1  $\mu\text{mol/l}$  PAMAM G5 (C).



influence on the elongation rate of A $\beta$  1–28 aggregation, an effect which is less pronounced for higher generations (4th and 5th). In general (for all PAMAM G3, PAMAM G4, and PAMAM G5) there is a clear effect on the final concentration of fibrils: the higher the dendrimer concentration and the higher the generation, the smaller the amount of fibrils formed.

For PrP 185–208, the duration of the nucleation phase is in general slightly more than double that of A $\beta$  1–28 (Fig. 2). PAMAM G3 at 0.01 and 0.1  $\mu\text{mol/l}$  has no effect on the aggregation rate or in the final amount of fibrils. 0.01  $\mu\text{mol/l}$  of PAMAM G4 or PAMAM G5 seems to accelerate the whole process whereas 0.1  $\mu\text{mol/l}$  does slow it down. In both cases the final amount of fibrils does not change. In all cases however (PAMAM G3, PAMAM G4, and PAMAM G5) 1  $\mu\text{mol/l}$  dendrimer completely inhibits fibril formation in the monitored time interval.

In order to complement the ThT results, we analyzed the final products by electron microscopy (Fig. 3). The characteristic long, interweaved fibrils were observed for the control sample. In the presence of PAMAM G3 dendrimers, fibrils were not as straight and they were organized in clumps. Among the fibrils amorphous structures were noticeable. A clearly smaller amount of fibrils was visible in the presence of PAMAM G5, where amorphous structures predominated.

Finally, in order to check the dendrimers' ability to disaggregate amyloid fibrils we added dendrimers at increasing concentrations into samples where aggregates had already been formed and we monitored the changes in ThT fluorescence (Fig. 4). It turned out that all dendrimers were able to disrupt aggregates. The higher the generation, the lower the concentration needed to achieve the disaggregating effect. The concentration that corresponds to 50% decrease in the content of amyloid fibrils ( $c_{50}$ ) was 0.2, 0.5, and 1.1  $\mu\text{mol/l}$  for PAMAM G5, PAMAM G4, and PAMAM G3, respectively.

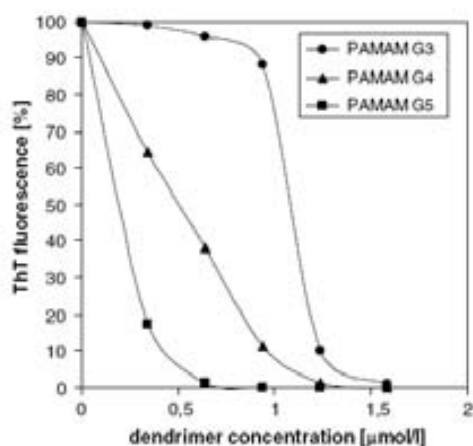


Fig. 4. Changes in fluorescence of ThT during the disaggregation process for PrP 185–208 peptide upon dendrimers.

## Discussion

The presence of abnormal aggregates, so-called amyloid fibrils, is observed in several neurodegenerative disorders such as prion diseases and Alzheimer's disease. The search for an effective treatment for these disorders is an up-to-date issue. Alzheimer's dementia is a disease that threatens to overwhelm a health care system in the developed world. In contrast to Alzheimer's disease, prion diseases can be transmitted from one organism to another. It was believed that the process cannot occur between species. Unfortunately a new variant of Creutzfeldt–Jakob disease (nvCJD) showed that this barrier was crossed. Several lines of evidence prove that a link between the nvCJD outbreak and a preceding epidemic of bovine spongiform encephalopathy (BSE) exists [16]. Although it is too early to predict the number of nvCJD cases that might eventually arise, it is clear that effective therapeutics for prion diseases are urgently needed. It seems that inhibition of fibril assembly can be a potential strategy for therapeutic intervention.

Several inhibitors (e.g., porphyrines, phthalocyanines, and polycyclic aromatics) have been recently identified [17–19]. Among these two main types can be distinguished: kinetic and thermodynamic inhibitors [14]. They can be identified by analyzing the shape of the kinetics curve in comparison to a control curve. In the case of kinetic inhibitors the final amount of fibrils is unchanged, the lag time however varies, but the control and inhibitor curves cannot be superimposed. We observed this type of kinetic inhibition for PrP 185–208 in the presence of 0.1  $\mu\text{mol/l}$  PAMAM G4 and 0.1  $\mu\text{mol/l}$  PAMAM G5 (1  $\mu\text{mol/l}$  completely inhibited amyloid formation in the monitored time interval). Thermodynamic inhibitors on the other hand do not affect amyloid formation rate but the final amount of fibrils is reduced. We observed this effect in the case of A $\beta$  1–28 aggregation in the presence of PAMAM G4 and PAMAM G5, which had only a small effect on both the nucleation and elongation rates but clearly decreased the sigmoid plateaus. PAMAM G3 did not affect the nucleation rate (lag phase duration) but significantly lowered the elongation rate (straight line slopes in Fig. 2A). PAMAM G3 reduced as well the final amount of fibrils, although to a lesser extent, compared with PAMAM G4 and PAMAM G5. Contrary to some specific inhibitors as, e.g., aplidine that blocks fibril formation for PrP 106–126 better than for A $\beta$  25–35 [20], dendrimers at higher concentrations (1  $\mu\text{mol/l}$ ) behaved similarly in the presence of both prion and Alzheimer's peptides.

Considering the different mechanisms that have been proposed for amyloid fibril formation, three different ways of inhibiting amyloidogenesis can be envisaged: by lowering the effective peptide concentration, by blocking the ends of growing fibrils, and by increasing the fibril breakage rate [14]. In order to interpret the effect of dendrimers, all these strategies should be considered (Fig. 5).

Dendrimers could lower the concentration of peptides that are capable of growing into fibrils by binding to the

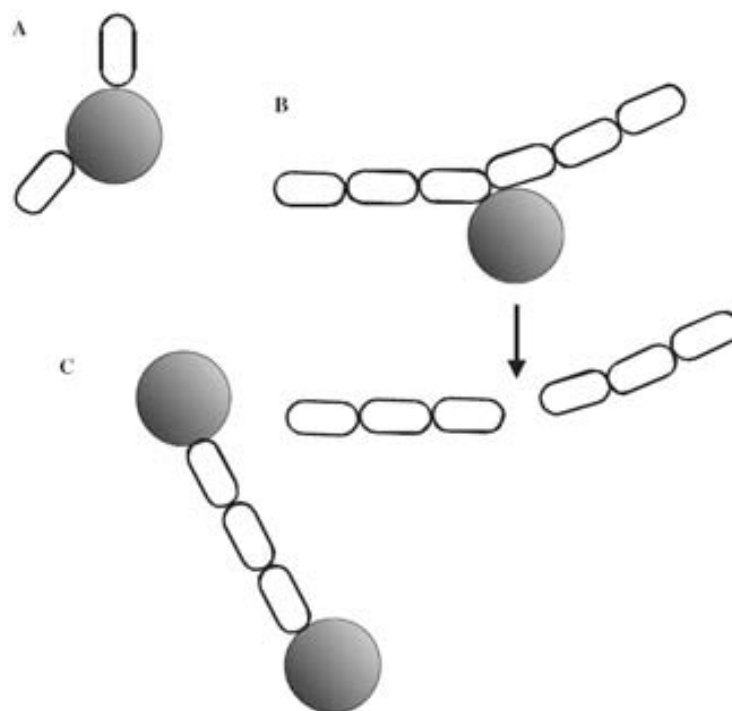


Fig. 5. Possible strategies of inhibition of amyloidogenesis by dendrimers: by binding to peptides (A), breaking fibrils (B), and blocking free ends of a fibril (C).

peptide monomers. It has been previously shown that dendrimers have an affinity for proteins, e.g., they create a layer on the surface of albumin and change its conformation [21]. Dendrimers can also affect proteins' functions, e.g., change an enzyme activity [22]. However, this inhibition mechanism is less likely to be observed under our experimental conditions since it is believed that this group of inhibitors is not effective if fibrils grow exponentially according to a second kinetic stage [14].

It can be observed in Figs. 1 and 2 that at low dendrimer concentration (0.01  $\mu\text{mol/l}$ ) fibril formation is accelerated. This behavior is typical of inhibitors that increase the fibril breakage rate. A moderated fibril breakage level in amyloidogenic processes may be responsible for speeding up the formation of aggregates by creating new free ends that can expand upon an attachment of new peptides. However, if breakage is very fast it can progressively break down all fibrils until only monomers are left. Therefore, if fibril breakage is the predominant mechanism of inhibition, then inhibitors administered in low doses can in fact accelerate fibrillogenesis by providing a larger amount of ends that serve as sites of replication. In higher doses however these inhibitors can be effective. Such a mechanism was previously found for Congo red [23]. Dendrimers' ability to disrupt already existing fibrils is illustrated in Fig. 4. The smaller the dendrimers, the higher the concentration needed to disrupt the aggregates. This is in a good agreement with the reported effect of poly-L-lysine on amyloid aggregates

[24]. Poly-L-lysine is a potent dissolver but its monomer L-lysine is not effective due to its small size.

Finally, amyloid formation can be inhibited by blocking the fibril ends. Usually effective end-blocking inhibitors are very similar to amyloid proteins [25]. This guarantees that they can bind to the fibril end, and the subtle differences in their structure prevent further fibril elongation. Although dendrimers have been called 'artificial proteins' and they can mimic some protein functions [26], it is obvious that they do not bear much resemblance to proteins. Nevertheless, it is possible that they bind unspecifically to fibrils affecting their growth. This hypothesis is supported by electron microscopy observations (Fig. 3). In the presence of low generations of dendrimers (PAMAM G3) fibrils seem to be more curved and they seem to tend to be organized in clumps. Fibril organization may have been somehow changed by the presence of dendrimers. Dendrimers possess many end groups on the surface. Each of them can interact with peptides or fibrils. The star structure of a dendrimer could be responsible for the formation of clumps (Fig. 6). Higher generations (PAMAM G5) seem to have been more effective in their interactions with monomeric peptides and/or breaking fibrils, since less fibrils were detected by electron microscopy (Fig. 3C). A schematic description of the way in which big dendrimers could hamper the formation of long fibrils is presented in Fig. 7. Besides a reduced amount of fibrils, peptides formed amorphous aggregates in the presence of PAMAM G5.

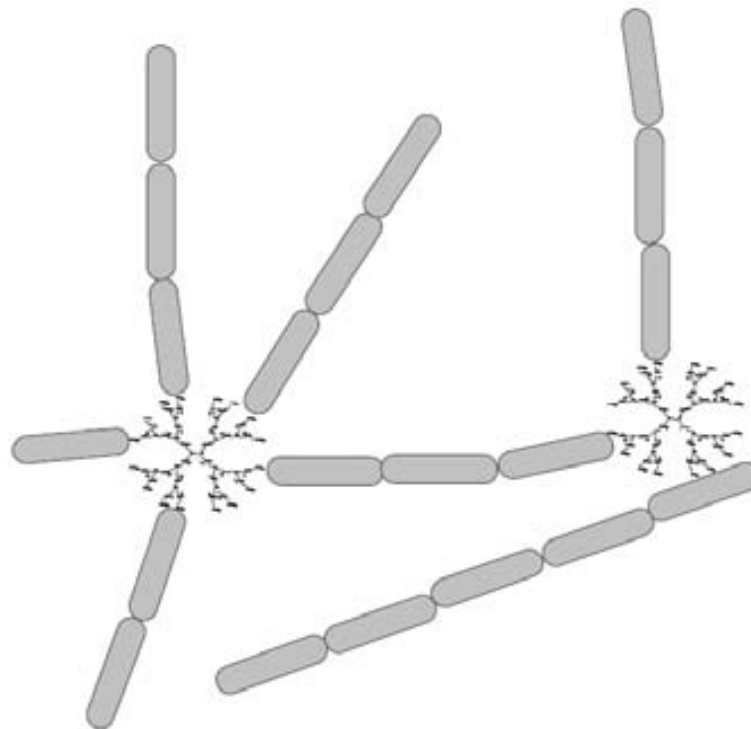


Fig. 6. The model of interaction between peptides and low generations of PAMAM dendrimers.

Amorphous random coil aggregates from Alzheimer peptides have been described at acidic pH of 5–6 [27,28]. ThT does not fluoresce in the presence of amorphous aggregates [13,29].

In our studies, heparin was added to all samples. Heparin is a mixture of unbranched anionic mucopolysaccharides joined by glycosidic linkages. It was previously shown that the presence of heparin in the medium at pH 5.5 shortened the lag time and increased the slope of the sigmoid [7]. It has been established that GAGs promote fibril formation and stabilize existing fibrils [30]. Since heparin is negatively charged and dendrimers possess cationic groups on the surface, it is obvious that electrostatic interactions between heparin and dendrimers can occur. However, it is important to notice that the role of dendrimers cannot be limited to the clearance of heparin from the system. If it were so, then we would not observe the acceleration the fibril formation process in the presence of low concentrations of dendrimers. Besides, it has been shown that A $\beta$  1–28 forms fibrils in the absence of heparin, although the process is considerably slower, and PAMAM G3 at high concentration was able to completely inhibit this process [7].

Generally, the bigger the dendrimer molecule, the higher the activity against fibrils was observed. It has been previously shown that polyamidoamine and polypropyleneimine dendrimers become more potent at eliminating PrP<sup>Sc</sup> as they are more branched [1]. Thus, the inhibiting processes are correlated with the number of amino groups on the sur-

face. However, it has been found that there is an optimum balance between the size of dendrimers and the number of end groups on their surface. The efficiency of phosphorus-containing dendrimers (which possess protonated terminal tertiary amines) against PrP<sup>Sc</sup> increased according to the order: generation 3rd < generation 5th < generation 4th [31]. In our studies, 1  $\mu$ mol/l PAMAM G5 was enough to completely inhibit the formation of fibrils. This concentration corresponds to a ratio of peptide:dendrimer of 50:1, and to a ratio of peptide:dendrimer's surface groups of 2.56. This illustrates how relatively low molar concentrations of dendrimers can be efficient due to the large number of surface groups. It is believed that the presence of amino groups is crucial, since it has been proven that hydroxy-terminated dendrimers are ineffective [1]. This means that electrostatic interactions between dendrimers and peptides are very important.

To summarize, it seems that dendrimers can interfere with amyloid formation by combining at least two inhibiting strategies: blocking fibril growth and breaking existing fibrils. However, their efficiency is limited and their action can result in the formation of amorphous, non-fibrillar aggregates. It is worth reminding that amyloid fibrils are only one type of aggregates that is very specific due to its highly organized 'misfolded' structure. This structure is responsible for the protease K resistance. Previous studies have shown that in the presence of dendrimers the resistant forms become sensitive to protease K [2]. The fact that dendrimers can render amorphous aggregates in amyloid

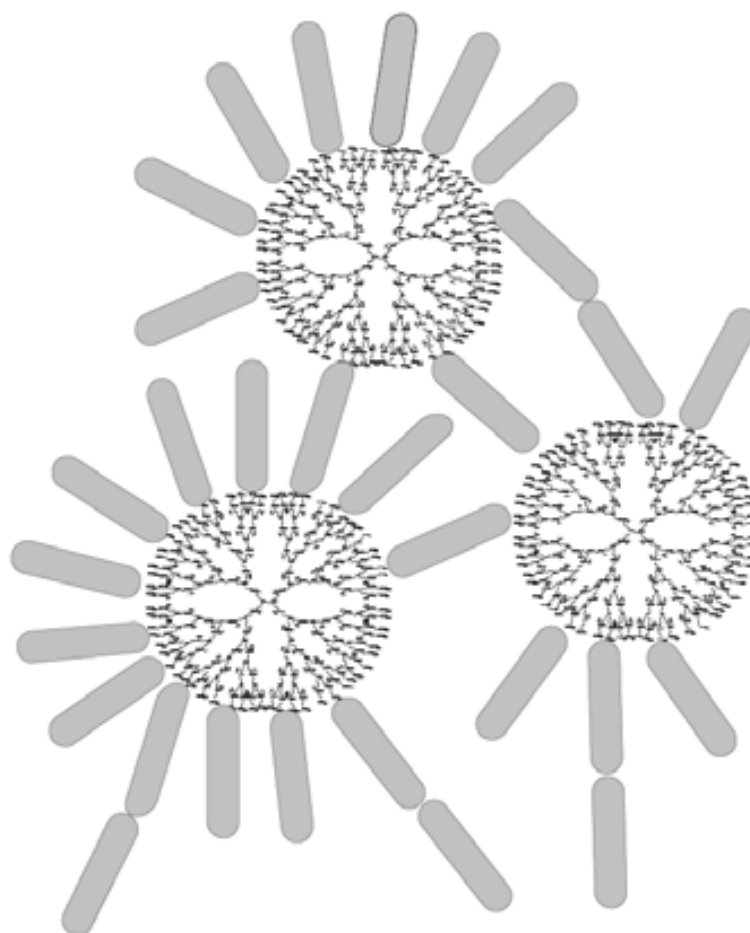


Fig. 7. The model of interaction between peptides and high generations of PAMAM dendrimers.

peptide suspensions is therefore worth considering in the path which leads to the design of successful pharmacological strategies.

#### Acknowledgments

This study was sponsored by Grant No. 12/IV/2005 from POLPHARMA Foundation for Development of Polish Pharmacy and Medicine and by Grants EET2002-05139 and BIO2003-02848 from the Spanish Ministry of Science and Education to J.C.

#### References

- [1] S. Supattapone, H.-O.B. Nguyen, F.E. Cohen, S.B. Prusiner, M.R. Scott, Elimination of prions by branched polyamines and implications for therapeutics, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1999) 14529–14534.
- [2] S. Supattapone, H. Wille, L. Uyechi, J. Safar, P. Tremblay, F.C. Szoka, F.E. Cohen, S.B. Prusiner, M.R. Scott, Branched polyamines cure prion-infected neuroblastoma cells, *J. Virol.* 75 (2001) 3453–3461.
- [3] J. Solassol, C. Crozet, V. Perrier, J. Leclaire, F. Beranger, A.M. Caminade, B. Meunier, D. Dormont, J.-P. Majoral, S. Lehmann, Cationic phosphorus-containing dendrimers reduce prion replication both in cell culture and in mice infected with scrapie, *J. Gen. Virol.* 85 (2004) 1791–1799.
- [4] P.M.H. Heegaard, H.G. Pedersen, J. Flink, U. Boas, Amyloid aggregates of the prion peptide PrP 106-126 are destabilised by oxidation and by action of dendrimers, *FEBS Lett.* 577 (2004) 127–133.
- [5] G. Caminati, N.J. Turro, D.A. Tomalia, Photophysical investigation of starburst dendrimers and their interactions with anionic and cationic surfactants, *J. Am. Chem. Soc.* 112 (1990) 8515–8522.
- [6] D.A. Tomalia, A.M. Naylor, W.A. Goddard III, Starburst dendrimers: molecular-level control of size, shape, surface chemistry, topology, and flexibility from atoms to macroscopic matter, *Angew. Chem. Int. Ed.* 29 (1999) 138–175.
- [7] B. Klajnert, M. Cortijo, M. Bryszewska, J. Cladera, Influence of heparin and dendrimers on the aggregation of two amyloid peptides related to Alzheimer's and prion diseases, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 339 (2006) 577–582.
- [8] I.B. Kuznetsov, S. Rackovsky, Comparative computational analysis of prion proteins reveals two fragments with unusual structural properties and a pattern of increase in hydrophobicity associated with disease-promoting mutations, *Protein Sci.* 13 (2004) 3230–3244.
- [9] R. Mahfoud, N. Garmy, M. Maresca, N. Yahi, A. Puigserver, J. Fantini, Identification of a common sphingolipid-binding domain in Alzheimer, prion, and HIV-1 proteins, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 11292–11296.

- [10] J. McLaurin, T. Franklin, X. Zhang, J. Deng, P.E. Fraser, Interactions of Alzheimer amyloid-beta peptides with glycosaminoglycans effects on fibril nucleation and growth, *Eur. J. Biochem.* 266 (1999) 1101–1110.
- [11] J. Diaz-Nido, F. Wandosell, J. Avilla, Glycosaminoglycans and beta-amyloid, prion and tau peptides in neurodegenerative diseases, *Peptides* 23 (2002) 1323–1332.
- [12] H. LeVine 3rd, Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution, *Protein Sci.* 2 (1993) 404–410.
- [13] M.R.H. Krebs, E.H.C. Bromley, A.M. Donald, The binding of thioflavin T to amyloid fibrils: localisation and implications, *J. Struct. Biol.* 149 (2005) 30–37.
- [14] J. Masel, V.A.A. Jansen, Designing drugs to stop the formation of prion aggregates and other amyloids, *Biophys. Chem.* 88 (2000) 47–59.
- [15] R. Sabaté, M. Gallardo, J. Estelrich, An autocatalytic reaction as a model for the kinetics of the aggregation of  $\beta$ -amyloid, *Biopolymers* 71 (2003) 190–195.
- [16] W.J. Patterson, M.J. Painter, Bovine spongiform encephalopathy and new variant Creutzfeldt Jakob disease: an overview, *Commun. Dis. Public Health* 1 (1999) 5–13.
- [17] B. Caughey, D. Ernst, R.E. Race, Congo red inhibition of scrapie agent replication, *J. Virol.* 67 (1993) 6270–6272.
- [18] W.S. Caughey, L.D. Raymond, M. Horiuchi, B. Caughey, Inhibition of protease-resistant prion protein formation by porphyrins and phthalocyanines, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 12117–12122.
- [19] F. Tagliavini, G. Forloni, L. Colombo, G. Rossi, L. Girola, B. Canciani, N. Angeretti, L. Giampaolo, E. Peressini, T. Awan, L. De Gioia, E. Ragg, O. Bugiani, M. Salmona, Tetracycline affects abnormal properties of synthetic PrP peptides and PrP(Sc) in vitro, *J. Mol. Biol.* 300 (2000) 1309–1322.
- [20] M. Pérez, M. Sadqi, V. Muñoz, J. Ávila, Inhibition by aplidine of the aggregation of the prion peptide PrP 106–126 into  $\beta$ -sheet fibrils, *Biochim. Biophys. Acta* 1639 (2003) 133–139.
- [21] B. Klajnert, L. Stanislawski, M. Bryszewska, B. Palecz, Interactions between PAMAM dendrimers and bovine serum albumin, *Biochim. Biophys. Acta* 1648 (2003) 115–126.
- [22] B. Klajnert, M. Sadowska, M. Bryszewska, The effect of polyamidoamine dendrimers on human erythrocyte membrane acetylcholinesterase activity, *Bioelectrochem* 65 (2004) 23–26.
- [23] W.P. Esler, E.R. Stimson, J.R. Ghilardi, A.M. Felix, Y.A. Lu, H.V. Vinters, P.W. Mantyh, J.E. Maggio, A  $\beta$  deposition inhibitor screen using synthetic amyloid, *Nat. Biotechnol.* 15 (1997) 258–263.
- [24] K.V. Nguyen, J.-L. Gendreau, C.-M. Wolff, Poly-L-lysine dissolves fibrillar aggregation of the Alzheimer  $\beta$ -amyloid peptide in vitro, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291 (2002) 764–768.
- [25] J. Ghanta, C.L. Shen, L.L. Kiessling, R.M. Murphy, A strategy for designing inhibitors of  $\beta$ -amyloid toxicity, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 29525–29528.
- [26] R. Esfand, D.A. Tomalia, Poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers: from biomimicry to drug delivery and biomedical applications, *Drug Discovery Today* 6 (2001) 427–436.
- [27] S.J. Wood, B. Maleeff, T. Hart, R. Wetzel, Physical, morphological and functional differences between pH 5.8 and 7.4 aggregates of the Alzheimer's amyloid peptide A $\beta$ , *J. Mol. Biol.* 256 (1996) 870–877.
- [28] B. Bohrmann, M. Adrian, J. Dubochet, P. Kuner, F. Müller, W. Huber, C. Nordstedt, H. Döbeli, Self-assembly of  $\beta$ -amyloid 42 is retarded by small molecular ligands at the stage of structural intermediates, *J. Struct. Biol.* 130 (2000) 232–246.
- [29] E.S. Voropai, M.P. Samstov, K.N. Kaplevskii, A.A. Maskevich, V.I. Stepuro, O.I. Povarova, J.M. Kuznetsova, K.K. Turoverov, A.L. Fink, V.N. Uverskii, Spectral properties of thioflavin T and its complexes with amyloid fibrils, *J. Appl. Spectrosc.* 70 (2003) 868–874.
- [30] J. McLaurin, D.-S. Yang, C.M. Yip, P.E. Fraser, Review: modulating factors in amyloid- $\beta$  fibril formation, *J. Struct. Biol.* 130 (2000) 259–270.
- [31] A.-M. Caminade, J.-P. Majoral, Water-soluble phosphorus-containing dendrimers, *Prog. Polym. Sci.* 30 (2005) 491–505.
- [32] <http://www.dendritech.com/pamam.html>.

## A $\beta$ 1-28 Amyloid Formation Depends on a Specific Membrane Lipid Composition

M. Cortijo-Arellano, V. Buzón, N. Benseny-Cases,  
M. Cócera and J. Cladera

*Biophysic's Unit and Center of Studies in Biophysics (CEB), Biochemistry and Molecular Biology Department, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra (Spain)*

### Summary

Lipids are essential components of biological membranes, in which they can be organized in different domains such as the so called lipid rafts. Rafts are rich in cholesterol and sphingolipids. Experimental evidence exists supporting the fact that the lipid membrane composition can influence the formation of amyloid fibrils. [1]. Lipid raft domains are thought to provide an appropriate environment for accumulation of A $\beta$  peptide in Alzheimer's disease. Our study on the interaction between liposomes of different lipid composition with A $\beta$ 1-28 peptide suggest that the presence of cholesterol, sphingosine or galactosylceramide in model membranes (liposomes) favours the conversion of  $\alpha$ -helical structures into b-amyloid aggregates at neutral pH.

### Introduction

Alzheimer's disease is a brain pathology characterized by memory loss and impairment of cognitive functions (speech and motor skills). A major pathological feature is the formation of extracellular amyloid plaques in the grey matter. These plaques are formed by fibrils in which the main component is the so called  $\beta$ -amyloid peptide [2]. This peptide is derived from the amyloid precursor protein (APP) by proteolytic cleavage. This cleavage appears to occur preferentially in cholesterol-rich lipid rafts. Extensive evidence for lipid membrane being an important factor in neurodegeneration and for the fact that it may influence the formation of fibrils exists in the literature [1]. Recently a specific region has been described in the  $\beta$ -amyloid peptide as a sphingolipid-binding motif [3]. The aggregation capacity of amyloid peptides depends on a conformational change which implies the conversion

of  $\alpha$ -helical structures into  $\beta$ -structures. This change is accepted to trigger the aggregation process, with sigmoidal kinetics, usually interpreted as describing a nucleation dependent polymerization.

## Materials and Methods

**Materials.** Synthetic peptide A $\beta$ 1-28 [DAEFRHDSGYEVHHQKL VFFAEDVGSNK] was purchased from JPT (Germany). Stock A $\beta$ (1-28) peptide solution were kept in 10 mM Hepes/D<sub>2</sub>O buffer at neutral pD. Final peptide concentration were 1.2 mM and pD were adjusted with NaOD and DCl solutions (Sigma&Aldrich). Phosphatidylcholine (PC), Cholesterol (Chol), Sphingomyelin (SM) and Galactosylceramide (GalCer) were purchased from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA).

**Membrane preparations.** Liposomes were made up by the extrusion method described in Mayer et al. [4]. The appropriate amount of lipids dissolved in chloroform were mixed in a round-bottom flask, and the solution was dried under a stream of nitrogen until a thin film was obtained. The film was resuspended in 10 mM Hepes/D<sub>2</sub>O pD 7.5 buffer. Finally the vesicle suspension was extruded 20 times through 2 polycarbonate filters of pore size 100 nm using an Avestin Liposofast Extruder (Ottawa, Ontario, Canada). Final lipid concentration were 10 mM.

**Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) Measurements.** FTIR spectra were recorded with a Mattson Polaris Fourier Transform spectrometer (Madison, WI, USA) at 37°C with a resolution of 2 cm<sup>-1</sup>. Samples were inserted between 2 CaF<sub>2</sub> windows using a 50 nm Teflon spacer. The sample chamber was purged continuously with N<sub>2</sub> to remove water vapour. A corresponding deuterated buffer spectrum was subtracted from the spectrum of each sample. FTIR spectra were acquired every 5 minutes. The aggregation process was followed by monitoring the increasing intensity of  $\beta$ -sheet band around 1615 cm<sup>-1</sup>.

## Results

In order to get information on the conformational changes taking place during aggregation process of the A $\beta$ 1-28 peptide, we analysed the spectral changes in the amide I region of the infrared spectrum as a function of time in the absence and presence of model membranes at pD 7.5, using FTIR. Bands at 1616 cm<sup>-1</sup> are characteristic of aggregated  $\beta$ -sheet structure and bands at 1647 cm<sup>-1</sup> can be assigned to a mixture of  $\alpha$ -helices and unordered structures [5, 6]. No aggregation was observed for A $\beta$ 1-28 in buffer (Figure 1A) and for  $\beta$ 1-28 in the presence of PC liposomes (Figure 1B). However, the presence of cholesterol, galactosylceramide and sphingomyelin in the PC liposomes did induce the formation of aggregated  $\beta$ -sheet structure (Figures 1C, D and E).

The time evolution of the aggregation process is presented in Figure 2 as the time variation of the absorbance ration  $A_{1616}/A_{1647}$ . It is clearly apparent

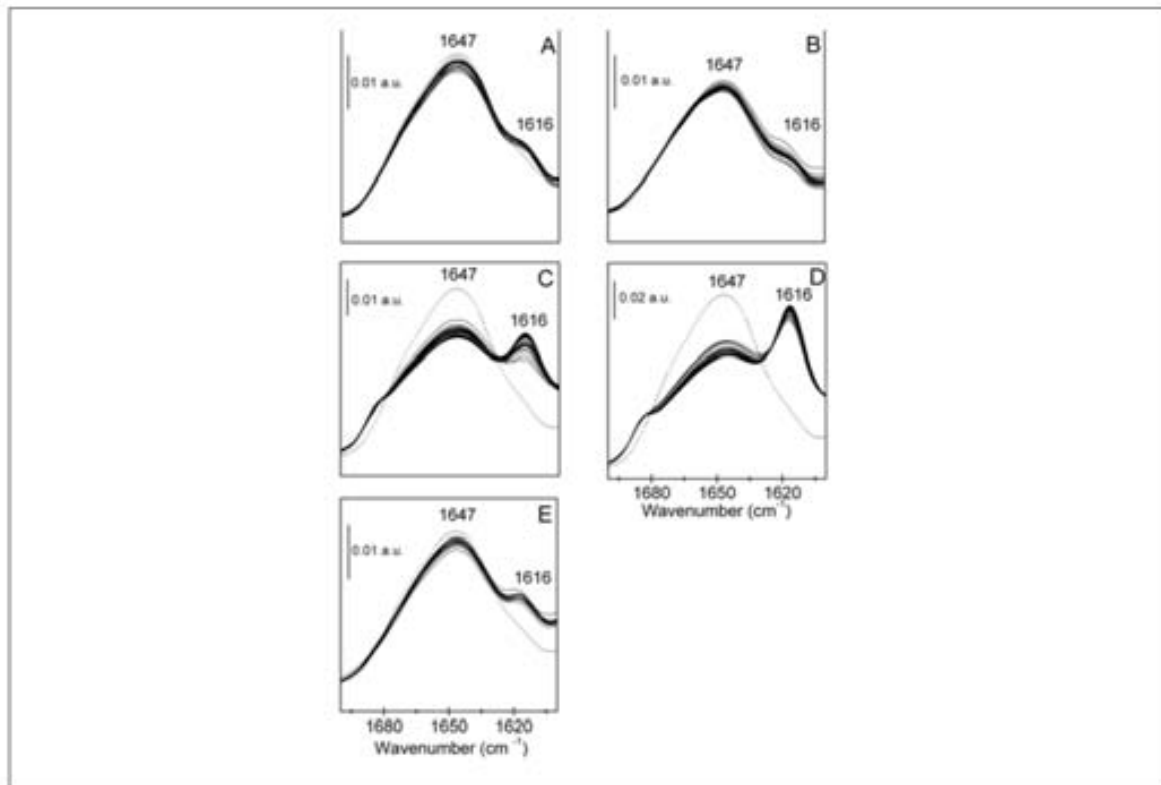


Figure 1. Fourier-transform infrared (FTIR) spectra of the amyloid Aβ1-28 peptide: (A) in the absence of liposomes; (B) in the presence of PC liposomes; (C) in the presence of PC:Chol liposomes; (D) in the presence of PC:SM liposomes; (E) in the presence of PC:GalCer liposomes. Spectra corresponding to the absence of aggregates is shown as a dotted line.

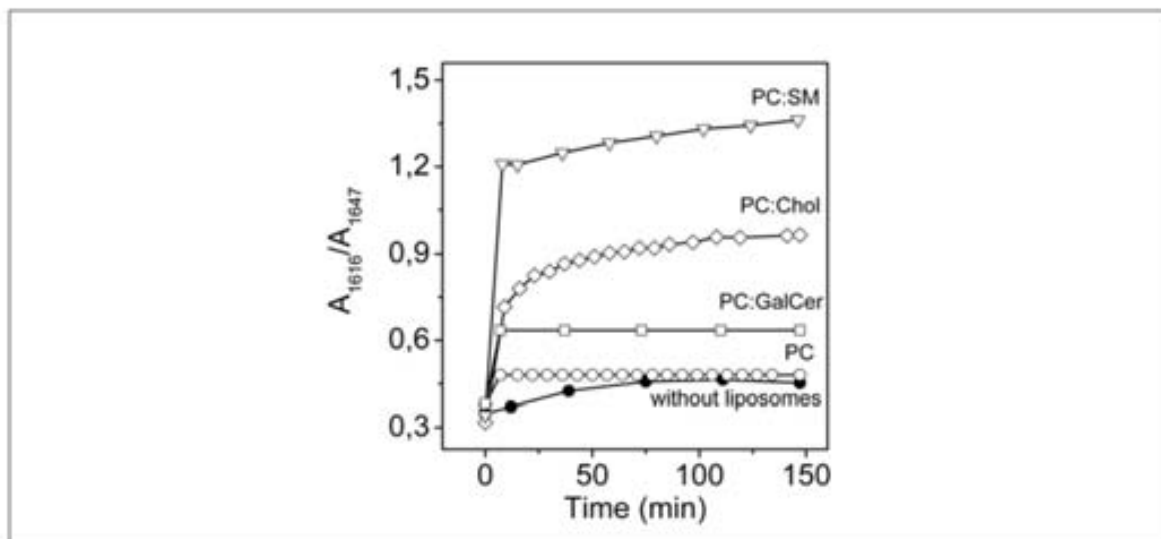


Figure 2. Time evolution of the formation of aggregated structures. The formation of aggregated β-structure from α-helical and unordered structures has been represented as the ratio of absorbances at 1616 and 1647 cm<sup>-1</sup> versus time.



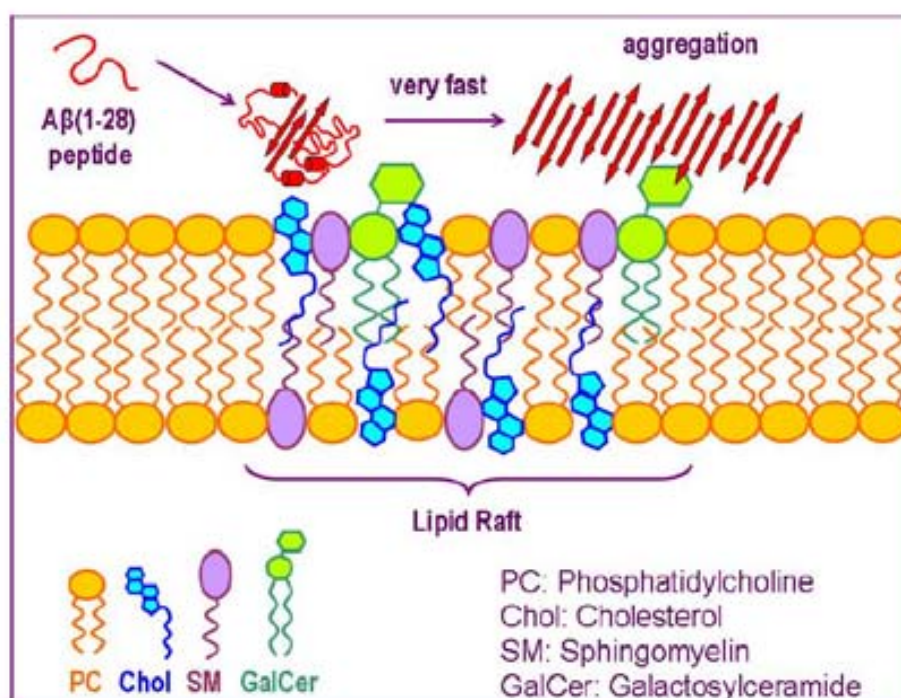


Figure 3. Scheme of Aβ1-28 raft-like membrane interactions. Aβ1-28 interaction with raft components implies a conformational  $\alpha \rightarrow \beta$  transition.

from the figure that cholesterol and sphingomyelin have a specially significant effect on the peptide aggregation.

Figure 3 schematically summarizes the experimental observations described above: raft elements, such as sphingomyelin, galactosylceramide or cholesterol would promote the  $\alpha \rightarrow \beta$  conformational change and the aggregated  $\beta$ -structure formation.

## Conclusions

Using model membranes (liposomes) and the Alzheimer's amyloid peptide Aβ1-28 we have shown that lipid bilayers may act as enhancers in the formation of  $\beta$ -sheet amyloid aggregates when raft components such as galactosylceramide, cholesterol and sphingomyelin are present.

## Abbreviations

PC: Phosphatidylcholine; Chol: Cholesterol; SM: Sphingomyelin; GalCer: Galactosylceramide.

## Acknowledgments

This work was funded by MEC (EET2002-05139). M.C.A and N.B.C has

Madrid, Spain, July 15-20, 2006

407

a fellowship funded by MEC (EET2002-05139). V.B. has a fellowship funded by "Fundació La Marató de TV3" (Exp: 020410). M.C has a post-doctoral fellowship funded by the Juan de la Cierva Program (MEC).

## References

1. Butterfield, D. A. & Lauderback, C. M. (2002) Lipid peroxidation and protein oxidation in Alzheimer's disease brain: potential causes and consequences involving amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress, *Free Radic Biol Med.* **32**, 1050-60.
2. Selkoe, D. J. (1999) Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease, *Nature.* **399**, A23-31.
3. Mahfoud, R., Garmy, N., Maresca, M., Yahi, N., Puigserver, A. & Fantini, J. (2002) Identification of a common sphingolipid-binding domain in Alzheimer, prion, and HIV-1 proteins, *J Biol Chem.* **277**, 11292-6.
4. Mayer, L. D., Hope, M. J. & Cullis, P. R. (1986) Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure, *Biochim Biophys Acta.* **858**, 161-8.
5. Goormaghtigh, E., Cabiaux, V. & Ruyschaert, J. M. (1994) Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. I. Assignments and model compounds, *Subcell Biochem.* **23**, 329-62.
6. Goormaghtigh, E., Cabiaux, V. & Ruyschaert, J. M. (1994) Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. III. Secondary structures, *Subcell Biochem.* **23**, 405-50.





Available online at www.sciencedirect.com

Biochemical and Biophysical Research Communications 364 (2007) 20–25

www.elsevier.com/locate/ybbrc

## Influence of phosphorus dendrimers on the aggregation of the prion peptide PrP 185–208

Barbara Klajnert <sup>a,\*</sup>, Marta Cortijo-Arellano <sup>b</sup>, Josep Cladera <sup>b</sup>, Jean-Pierre Majoral <sup>c</sup>,  
Anne-Marie Caminade <sup>c</sup>, Maria Bryszewska <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of General Biophysics, University of Lodz, 12/16 Banacha Street, 90-237 Lodz, Poland

<sup>b</sup> Center of Studies in Biophysics, Universitat Autònoma de Barcelona, Catalonia, Spain

<sup>c</sup> Laboratoire de Chimie de Coordination, CNRS Toulouse, France

Received 19 September 2007

Available online 1 October 2007

### Abstract

Inhibition of fibril assembly is a potential therapeutic strategy in prion diseases. The effect of cationic phosphorous dendrimers on the aggregation process of the prion peptide PrP 185–208 was studied using a spectrofluorometric assay with thioflavin T (ThT) and Fourier transformed infrared spectroscopy in order to monitor the kinetics of the process and the changes in the peptide secondary structure. The results show that phosphorous dendrimers are able to clearly interfere with PrP 185–208 aggregation process by both slowing down the formation of aggregates (by causing a decrease of the nucleation rate) and by lowering the final amount of amyloid fibrils, a common hallmark of conformational diseases. The dendrimers effect on the aggregation process would imply their interaction with peptide monomers and oligomers during the nucleation phase.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Amyloid; Fibril; Dendrimer; Polymer; Prion disease; Aggregation

Prion diseases are fatal neurodegenerative disorders that occur in hereditary and sporadic forms or can be transmitted from one organism to another [1]. Prion diseases result from conformational transformation from the normal cellular form of prion proteins (PrP<sup>C</sup>) to the infectious scrapie isoform (PrP<sup>Sc</sup>). The infectious form has a changed secondary structure from  $\alpha$ -helical into  $\beta$ -sheets. PrP<sup>Sc</sup> spontaneously form fibrils—amyloid-like structures. The accumulation of amyloids in the central nervous system precedes neurological dysfunction accompanied by neuronal vacuolation and astrocytic gliosis, leading eventually to death. Currently existing antiprion agents such as polyene antibiotics, anionic dyes, sulfated dextrans, anthracyclines, porphyrins, phthalocyanines, dapsone, and synthetic  $\beta$ -breaker peptides demonstrate only weak ability to stop prion propagation and none of them shows the

ability to remove the pre-existing prions from an infected organism, so they would need to be administered prophylactically [2–10]. The first publication, which described that dendrimers have their own potentially therapeutic activity against prion diseases were published in 1999 [11]. Dendrimers are synthetic polymers characterized by a specific structure. These macromolecules consist of a core to which branched monomers are radially attached. When a layer of monomers is attached, the so-called “generation” of dendrimers increases. Such a synthesis results in a globular shape and many end groups on the surface. It was proved that polyamidoamine (PAMAM) and polypropylenimine (PPI) dendrimers possessing cationic amino groups on the surface were able to eliminate PrP<sup>Sc</sup> from scrapie-infected neuroblastoma cells (ScN2a) [12]. The potency of both PAMAM and PPI dendrimers in purging PrP<sup>Sc</sup> from ScN2a cells enhanced as the generation increased. It suggested that the presence of amino surface groups that increases with generation was crucial for antiprion activity.

\* Corresponding author. Fax: +48 42 635 44 74.

E-mail address: akajn@biol.uni.lodz.pl (B. Klajnert).

These promising results encouraged to study other types of dendrimers. Solassol et al. tested three generations of phosphorus-containing dendrimers (3rd, 4th, and 5th) for anti-prion activity [13]. These dendrimers are characterized by the presence in their backbone of aminothiophosphates and they possess protonated tertiary amine groups on the surface [14]. Therefore, they have a hydrophilic surface and a hydrophobic backbone which allows very efficient membrane penetration. They are nontoxic in a broad concentration range and the presence of phosphorus atoms provides that dendrimers are stable against both nucleophilic attack and acid-catalyzed hydrolysis. It was shown that phosphorus dendrimers were able to inhibit the formation of PrP<sup>Sc</sup> in ScN2a cells and remove the pre-existing PrP<sup>Sc</sup> from infected cells as it was detected by Western blot after protease K digestion. Moreover, ScN2a cells lost their infectivity after the treatment with dendrimers. Even after up to eight passages PrP<sup>Sc</sup> could not be detected in the cells inoculated with dendrimer-treated cells, while cells inoculated with control ScN2a accumulated a significant level of PrP<sup>Sc</sup> after only three passages. The ability of dendrimers to purge pre-existing PrP<sup>Sc</sup> was confirmed by incubating them with brain homogenates infected with different prion strains. Phosphorus dendrimers were the first ones that were tested *in vivo*. They inhibited PrP<sup>Sc</sup> replication in the spleen of mice that had been intraperitoneally inoculated with scrapie. This is an important feature because it is known that a spleen accumulates PrP<sup>Sc</sup> long before the agent reaches a central nervous system [15].

There is an alternative method to animal- and cell-based assays to screen potential antiprion drugs. It is possible to use truncated prion peptides and in the absence of cellular factors expose them to destabilizing factors to mimic the conditions that lead to creation of fibrils. The accumulation of amyloids can be e.g. monitored by changes in the fluorescence of thioflavin T (ThT), which is sensitive to the presence of amyloid fibrils [16,17]. Additionally, it is possible to use circular dichroism (CD) or Fourier transformed infrared spectroscopy (FTIR) to follow transformation of secondary structure into  $\beta$ -forms characteristic for aggregates [18,19]. These structural techniques allow monitoring the kinetics of the process and give additional information about the inhibitors [20]. Such an approach has been previously applied several times to investigate the antiprion properties of PAMAM and PPI dendrimers [21–24].

In this work, we have studied the aggregation process of the prion peptide PrP 185–208 in the presence of the fourth generation of phosphorous dendrimers. This fragment of prion protein is especially interesting for several reasons. Firstly, it has been demonstrated that it easily forms fibrils [22]. Secondly, a computational study has shown that residues 180–193 are one of the fibrilization sites in the prion protein [25]. Finally, Mahfoud et al. identified a possible sphingolipid binding domain, structurally homologous in the Alzheimer's peptide 1–28 and in the fragment of prion

protein 185–208 [26]. It gives hopes to translate some results when searching for efficient drugs against Alzheimer's disease, since this disorder is also associated with the formation of amyloid aggregates. The results show that phosphorous dendrimers are able to clearly interfere with PrP 185–208 aggregation process by both slowing down the formation of aggregates and by lowering the final amount of amyloid fibrils, a common hallmark of conformational diseases.

## Materials and methods

**Materials.** Synthetic PrP 185–208 [KQHTVTTTTKGENFETDVKMMER] was purchased from JPT Peptide Technologies GmbH (Berlin, Germany). Stock peptide solutions were kept in aqueous buffer at pH 7.5. Thioflavin T (T-3516) and heparin-sodium salt (H-4784) were purchased from Sigma Chemical Company. The fourth generation of phosphorous dendrimers was synthesized in the Laboratoire de Chimie de Coordination de CNRS as described previously [14]. Molecular weight of this compound (C<sub>1296</sub>H<sub>2256</sub>N<sub>175</sub>Cl<sub>96</sub>O<sub>96</sub>P<sub>96</sub>S<sub>96</sub>) equals to 33702 Da. This dendrimer possesses 96 cationic end groups. The chemical structure was shown previously [13]. Dendrimers were dissolved in aqueous buffer. All other chemicals were of analytical grade. Water used to prepare solutions was double-distilled.

**Formation of amyloid fibrils—ThT assay.** The process of aggregation was monitored using thioflavin T (ThT)—a dye, which fluorescence depends on the presence of amyloid structures. A stock solution of peptide (1.2 mmol/l) in Tris buffer, pH 7.5, was diluted to a final concentration of 50  $\mu$ mol/l. Then ThT was added (final concentrations of 35  $\mu$ mol/l) and pH was adjusted to 5.5 with aliquots of HCl. The aggregation process was triggered by the addition of 0.041 mg/ml of heparin. Fluorescence measurements were carried out with a SLM-Aminco 8000 spectrofluorimeter. Excitation and emission wavelengths were set at 450 and 490 nm, respectively. Temperature was controlled with a thermostatic bath at 37 °C.

**Kinetic analysis.** Spectrofluorimetric data were analyzed in order to calculate the kinetic constants. It was assumed that the aggregation process proceeded according to a nucleation dependent polymerization mechanism [27,28]. The approach considers amyloid fibril formation as an autocatalytic process with a nucleation reaction followed by an elongation one with its respective kinetic constants,  $k_n$  and  $k_e$ . Experimental data can be fitted to such a model using the following equation:

$$f = \frac{\rho \cdot e^{(k_e + k_n)t} - 1}{1 + \rho \cdot e^{(k_e + k_n)t}} \quad (1)$$

where  $f$  is the fraction of the fibril form;  $k = k_e \cdot a$ , being  $a$  is the initial peptide concentration; and  $\rho = \frac{k_n}{k_e}$ .

In order to fit the experimental data to Eq. (1), fluorescence was converted to fraction of fibril formation, considering  $f = 0$  at  $t = 0$  and  $f = 1$  at the plateau of each sigmoidal curve.

**Changes in the secondary structure—Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) experiments.** The peptide was lyophilized and then dissolved in HEPES/D<sub>2</sub>O buffer (10 mmol/l) to a final concentration 1 mmol/l. pH was adjusted to 5.5. Then heparin was added (0.82 mg/ml). The sample was placed between two CaF<sub>2</sub> windows separated with a 50  $\mu$ m spacer. FTIR spectra were recorded at 37 °C with an FTIR Mattson Polaris spectrometer, equipped with a cooled liquid nitrogen mercury-cadmium-telluride (MCT) detector, at a nominal resolution of 2 cm<sup>-1</sup>. The spectrometer was continuously purged with dry air (dew point lower than -60 °C). All spectra were corrected for atmospheric water vapor contribution. Two-hundred scans were averaged per spectrum using the shuttle device. Spectra were collected as a function of time as indicated in Fig. 4. Solvent contributions were always subtracted from the spectra.

**Electron microscopy.** Ten microliters of sample from the fluorescence cuvette (see ThT assay) were placed on a carbon 400 mesh grid. It was

dried and the excess of solution was removed with a filter paper. The sample was stained with 2% uranyl acetate for 2 min, dried and then viewed using a Hitachi H-7000 electron microscope.

## Results

Changes in the fluorescence of ThT were used to monitor the formation of amyloid fibrils (Fig. 1). ThT is a highly selective dye which fluorescence depends on the formation of amyloid aggregates (fibrils). In agreement with previous results [22,23], PrP 185 formed amyloid fibrils following the characteristic sigmoid which can be interpreted as a nucleation-dependent polymerization. Adding dendrimers caused a decrease of the final concentration of fibrils. The dendrimer was most efficient at reducing the final fibril concentration when present at a dendrimer/peptide ratio of 0.02. Both, 10 times lower, and ten times higher ratios also reduced the amount of fibrils, but not to the same extent.

Results were analysed in terms of a nucleation dependent polymerization model [27], from which the nucleation and elongation rate constants were calculated (Table 1). The process of fibrilization can be divided into a nucleation phase (known also as a lag phase) and an elongation phase. During the lag phase, peptide monomers slowly combine to form nuclei. Addition of more peptide monomers to those nuclei can, according to the model, result in the exponential

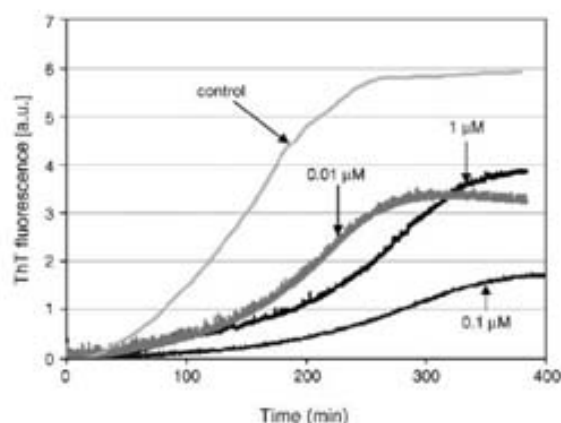


Fig. 1. Changes in ThT fluorescence during the aggregation process of PrP 185–208 in the presence of phosphorous dendrimers.

Table 1  
Nucleation ( $k_n$ ) and elongation ( $k_e$ ) rate constants calculated by fitting experimental data

Dendrimer concentration ( $\mu\text{mol/l}$ )	Dendrimer/peptide ratio	$k_n$ (1/s)	$k_e$ (l/mol s)
0 (control)	0	$9.5 \times 10^{-6}$	8.8
0.01	0.0002	$3.5 \times 10^{-6}$	8.8
0.1	0.002	$1.9 \times 10^{-6}$	6.6
1	0.02	$3.0 \times 10^{-6}$	6.4

elongation (fibril formation) phase, which is much faster than the lag phase. Adding dendrimers decreased both the nucleation and the elongation rate constants but the effect on the nucleation process was bigger and achieved maximum for a dendrimer/peptide ratio of 0.02 (dendrimer concentration  $0.1 \mu\text{mol/l}$ ) when the constant decreased five times. In the case of the elongation process the decrease was dendrimer concentration-dependent.

FTIR spectroscopy provides information on the secondary structure of proteins or peptides. Proteins known to be predominantly  $\alpha$ -helical exhibit amide I absorptions in the spectral range  $1645\text{--}1655 \text{ cm}^{-1}$ , while proteins with  $\beta$ -sheet structure absorb between  $1610$  and  $1640 \text{ cm}^{-1}$  [29,30]. Changes in the secondary structure of peptides incubated with heparin along time are shown in Fig. 2. Bands at  $1613 \text{ cm}^{-1}$  are characteristic of aggregated  $\beta$ -sheet structure and bands at  $1648 \text{ cm}^{-1}$  can be assigned to a mixture of  $\alpha$ -helices and random structures. These two bands were the main spectral characteristics of the different experimental

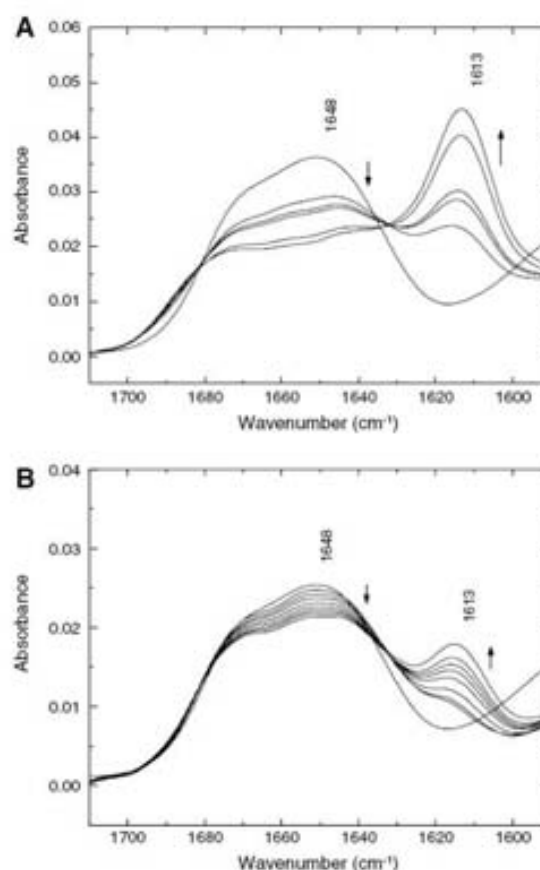


Fig. 2. Changes of Fourier-transform infrared spectra of PrP 185–208 depending on the time of incubation at pH 5.5 in the presence of heparin: (A) without dendrimer; (B) in the presence of dendrimer at a dendrimer/peptide ratio of 0.002.

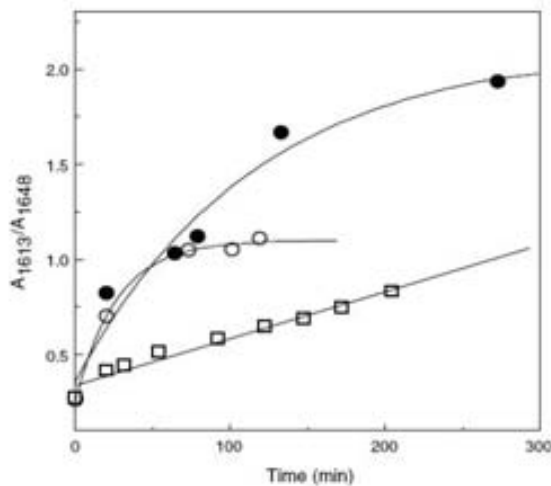


Fig. 3. Kinetics of the changes of the secondary structure. The formation of aggregated  $\beta$ -structure from  $\alpha$ -helical and unordered structures has been represented as the ratio of absorbances at 1613 and 1648  $\text{cm}^{-1}$  versus time. Full circles: control (PrP 1 mmol/l); hollow squares: PrP 1 mmol/l in the presence of dendrimer (dendrimer/peptide ratio = 0.002); hollow circles: PrP 1 mmol/l in the presence of dendrimer (dendrimer/peptide ratio = 0.02).

conditions checked (without and with dendrimers at different dendrimer/peptide ratios), although the aggregation band at 1613  $\text{cm}^{-1}$  appeared with time at a different rate, depending on the dendrimer concentration. This fact is illustrated in Fig. 3, where the absorbance ratio  $A_{1613}/A_{1648}$  versus time is shown. It is apparent from the curves in Fig. 3 that no lag phase was measured, as one would expect since in the FTIR experiments peptide concentration is higher than in ThT experiments and moreover with this technique we detect not only the  $\beta$ -sheet fibrils but also other  $\beta$ -sheet aggregated (non fibrillar) structures present maybe in the high molecular weight oligomers typical of the nucleation phase [31]. Clearly, the presence of dendrimer at a dendrimer/peptide ratio of 0.002 slows dramatically down the aggregation process. A ten fold increase in dendrimer concentration however (dendrimer/peptide ratio of 0.02) did again accelerate the process although it reached a lower plateau, compared to the control (absence of dendrimer). Both these facts are in agreement with the observations in the ThT experiments (Fig. 1).

The effect of dendrimers on the morphology of PrP 185–208 amyloid aggregates was analyzed under electron microscope (Fig. 4). In all cases the characteristic long, interweaved fibrils were observed at the end of the sigmoids as reported in Fig. 1. This means that although decreasing in number in the presence of dendrimers, typical amyloid fibrils are present at the sigmoid plateau. The electron micrographs do not reveal the presence of any other type of aggregated species (amorphous aggregates for example) as a consequence of the presence of dendrimers.

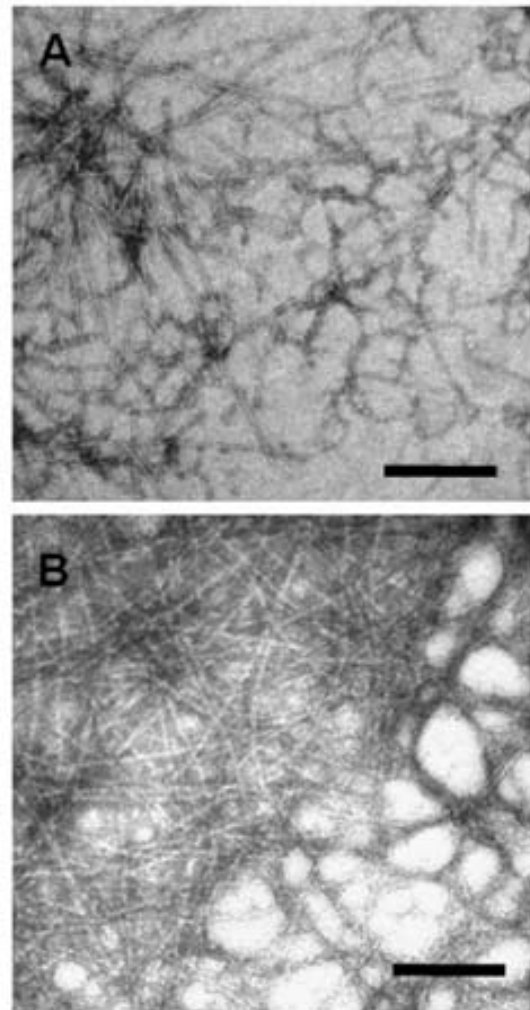


Fig. 4. Electron micrographs of PrP structures in the absence of dendrimers (A) and in the presence of phosphorous dendrimers at concentration 0.01 mmol/l (B). The length of the bar equals to 100 nm.

## Discussion

The characterization of the molecular mechanisms by which different peptides and proteins related to conformational diseases form amyloid aggregates and the possibility of interfering with such a process are part of the strategies directed to find ways of preventing and healing these pathologies. Many proteins related or not to different pathologies, with no sequential homology and fragments of these proteins have been shown to be able to form amyloid fibrils in vitro. PrP 185–208, a fragment of the human prion protein, is known to form amyloid aggregates in vitro, in the presence of heparin at pH 5.5, following the typical nucleation-dependent polymerization kinetics [22–24]. We have previously reported that the aggregation

of PrP 185–208 can be affected by PAMAM dendrimers. In the present work, we have used this peptide as a model system in order to check the capacity of phosphorus-containing dendrimers to interfere with the aggregation process. The kinetic analysis of the ThT fluorescence experiments clearly show that: (1) the presence of phosphorous dendrimers decreases the final amount of amyloid fibrils (inhibitory effect) and (2) dendrimers decrease the nucleation rate, that is, they have an effect on the nucleation phase of the polymerization process. The ThT results, seem therefore to indicate that, when present during the peptide aggregation process, phosphorus dendrimers do interfere with the molecular interactions between peptide monomers and/or oligomers, characteristic of the nucleation phase, that give eventually fibrils. This is in agreement with previous experiments. Solassol et al. demonstrated the retention of prion protein on phosphorus dendrimer-coated amberlite beads, therefore they postulated that these dendrimers can bind to prion protein molecules [13].

Until now no experimental structural data existed on PrP 185–208. Infrared spectra show that at pH 7.5 the peptide has a spectrum which denotes a mixture of helical and unordered structure, comparable to the infrared spectra of other amyloid peptides in non-aggregating conditions [32]. Upon aggregation at pH 5.5, the appearance of characteristic band at  $1613\text{ cm}^{-1}$  reveals an effect of dendrimers on the aggregation kinetics, compatible with what it is observed in the ThT experiments, at the same dendrimer/peptide ratios. In both cases the existence of an optimum dendrimer concentration, corresponding to a maximal dendrimer effect on the rate of the nucleation phase, becomes apparent: the maximal effect is observed at a dendrimer/peptide ratio of 0.002. A tenfold lower or tenfold higher ratio gives a faster nucleation phase, although in all cases the amount of final fibrils formed is lower than for the control.

When we consider the interactions between peptides and dendrimers, the fact that dendrimer activity is dependent on cationic surface groups leads us to the conclusion that electrostatic interactions are probably predominant. Our experiments were conducted at pH 5.5 that mimicked conditions that occur in acidic cell compartments like lysosomes, which are presumably the place where dendrimers interact with PrP<sup>Sc</sup> [12]. At pH 5.5 approximately 70% of terminal tertiary amines on the surface of dendrimers are protonated. It is possible that individual cationic groups on the surface of dendrimers might bind to monomers or oligomers during the lag phase. Moreover the dendrimer might pull away bound peptide molecules from the aggregated structures and/or prevent such molecules from reaggregating. The large number of surface groups and a high level of their protonation explain why relatively low concentrations of dendrimers were active against bigger concentration of the peptide.

Time-course experiments demonstrated that phosphorus dendrimers are able to remove quickly existing PrP<sup>Sc</sup> molecules and the clearance occurred within 4 h of treatment [13]. Because phosphorus dendrimers are able to clear

preexisting PrP<sup>Sc</sup>, their mechanism of action cannot simply involve binding to monomers and inhibiting de novo synthesis. Similarly as in the case of e.g. PAMAM dendrimers [23], the breakage of oligomers or whole fibrils caused by dendrimers cannot be excluded.

If dendrimers are going to be considered as therapeutic agents for prion diseases, some difficulties must be overcome first, e.g. the problem of crossing the blood–brain barrier. In the case of phosphorus dendrimers, there is no data reporting their entry into the central nervous system through the blood–brain barrier and for such big molecules it may turn out to be impossible. It seems likely that dendrimers would need to be administered directly to cerebrospinal fluid or perhaps synthesized as prodrugs capable of crossing blood–brain barrier [12]. However this does not exclude the possibility of using them in the treatment as post-exposure prion prophylaxis in the way proposed for other molecules [33].

#### Acknowledgments

Study sponsored by Grant No. 2 P05F 008 30 from the Polish Ministry of Science and Higher Education and by NATO Collaborative Linkage grant no EAP. C.L.G. 9811751.

#### References

- [1] S.B. Prusiner, Scrapie prions, *Annu. Rev. Microbiol.* 43 (1989) 345–374.
- [2] C.F. Farquhar, A.G. Dickinson, Prolongation of scrapie incubation period by an injection of dextran sulphate 500 within the month before or after infection, *J. Gen. Virol.* 67 (1986) 463–473.
- [3] D. McKenzie, J. Kaczowski, R. Marsh, J. Aiken, Amphotericin B delays both scrapie agent replication and PrP-res accumulation early in infection, *J. Virol.* 68 (1994) 7534–7536.
- [4] L. Ingrassio, A. Ladogana, M. Pocchiari, Congo red prolongs the incubation period in scrapie-infected hamsters, *J. Virol.* 69 (1995) 506–508.
- [5] F. Tagliavini, R.A. McArthur, B. Canciani, G. Giaccone, M. Porro, M. Bugiani, P.M.-J. Lievens, O. Bugiani, E. Peri, P. Dall'Ara, M. Rocchi, G. Poli, G. Forloni, T. Bandiera, M. Varasi, A. Suarato, P. Cassutti, M.A. Cervini, J. Lansen, M. Salmona, C. Post, Effectiveness of anthracycline against experimental prion disease in Syrian hamsters, *Science* 276 (1997) 1119–1122.
- [6] L. Manuelidis, W. Fritch, I. Zaitsev, Dapsone to delay symptoms in Creutzfeldt-Jakob disease, *Lancet* 352 (1998) 456.
- [7] K.T. Adjou, R. Demaimay, J.-P. Deslys, C.L. Lasmézas, V. Beringue, S. Demart, F. Lamoury, M. Seman, D. Dormont, MS-8209, a watersoluble amphotericin B derivative, affects both scrapie agent replication and PrP accumulation in Syrian hamster scrapie, *J. Gen. Virol.* 80 (1999) 1079–1085.
- [8] C. Farquhar, A. Dickinson, M. Bruce, Prophylactic potential of pentosan polysulphate in transmissible spongiform encephalopathies, *Lancet* 353 (1999) 117.
- [9] S.A. Priola, A. Raines, W.S. Caughey, Porphyrin and phthalocyanine antiscrapie compounds, *Science* 287 (2000) 1503–1506.
- [10] C. Soto, R.J. Kascsak, G.P. Saborio, P. Aucouturier, T. Wisniewski, F. Prelli, R. Kascsak, E. Mendez, D.A. Harris, J. Ironside, F. Tagliavini, R.J. Carp, B. Frangione, Reversion of prion protein conformational changes by synthetic beta-sheet breaker peptides, *Lancet* 355 (2000) 192–197.



- [11] S. Supattapone, H.-O.B. Nguyen, F.E. Cohen, S.B. Prusiner, M.R. Scott, Elimination of prions by branched polyamines and implications for therapeutics, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1999) 14529–14534.
- [12] S. Supattapone, H. Wille, L. Uyechi, J. Safar, P. Tremblay, F.C. Szoka, F.E. Cohen, S.B. Prusiner, M.R. Scott, Branched polyamines cure prion-infected neuroblastoma cells, *J. Virol.* 75 (2001) 3453–3461.
- [13] J. Solassol, C. Crozet, V. Perrier, J. Leclaire, F. Béranger, A.-M. Caminade, B. Meunier, D. Dormont, J.-P. Majoral, S. Lehmann, Cationic phosphorus-containing dendrimers reduce prion replication both in cell culture and in mice infected with scrapie, *J. Gen. Virol.* 85 (2004) 1791–1799.
- [14] C. Loup, M.A. Zanta, A.M. Caminade, J.P. Majoral, B. Meunier, Preparation of water-soluble cationic phosphorus-containing dendrimers as DNA transfecting agents, *Chem. Eur. J.* 5 (1999) 3644–3650.
- [15] C.I. Lasmezas, J.Y. Cesbron, J.P. Deslys, R. Demaimay, K.T. Adjou, R. Rioux, C. Lemaire, C. Locht, D. Dormont, Immune system-dependent and -independent replication of the scrapie agent, *J. Virol.* 70 (1996) 1292–1295.
- [16] H. LeVine 3rd, Thioflavin T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution, *Protein Sci.* 2 (1993) 404–410.
- [17] M.R.H. Krebs, E.H.C. Bromley, A.M. Donald, The binding of thioflavin T to amyloid fibrils: localisation and implications, *J. Struct. Biol.* 149 (2005) 30–37.
- [18] C. Selvaggini, L. De Goia, L. Cantu, E. Ghilaudi, L. Diomede, F. Passerini, G. Forloni, O. Bugiani, F. Tagliavini, M. Salmona, Molecular characteristics of a protease-resistant, amyloidogenic and neurotoxic peptide homologous to residues 106–126 of the prion protein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 194 (1993) 1380–1386.
- [19] M. Salmona, P. Malesani, L. De Goia, S. Gorla, M. Bruschi, A. Molinari, F. della Vedova, B. Pedrotti, M.A. Marrari, T. Awan, O. Bugiani, G. Forloni, F. Tagliavini, Molecular determinants of the physicochemical properties of a critical prion protein region comprising residues 106–126, *Biochem. J.* 342 (1999) 207–214.
- [20] J. Masel, V.A.A. Jansen, Designing drugs to stop formation of prion aggregates and other amyloids, *Biophys. Chem.* 88 (2000) 47–59.
- [21] P.M.H. Heegaard, H.G. Pedersen, J. Flink, U. Boas, Amyloid aggregates of the prion peptide PrP106–126 are destabilised by oxidation and by the action of dendrimers, *FEBS Lett.* 577 (2004) 127–133.
- [22] B. Klajnert, M. Cortijo-Arellano, M. Bryszewska, J. Cladera, Influence of heparin and dendrimers on the aggregation of two amyloid peptides related to Alzheimer's and prion diseases, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 339 (2006) 577–582.
- [23] B. Klajnert, M. Cortijo-Arellano, J. Cladera, M. Bryszewska, Influence of dendrimer's structure on its activity against amyloid fibril formation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 345 (2006) 21–28.
- [24] B. Klajnert, J. Cladera, M. Bryszewska, Molecular interactions of dendrimers with amyloid peptides: pH dependence, *Biomacromolecules* 7 (2006) 2186–2191.
- [25] I.B. Kuznetsov, S. Rackovsky, Comparative computational analysis of prion proteins reveals two fragments with unusual structural properties and a pattern of increase in hydrophobicity associated with disease-promoting mutations, *Protein Sci.* 13 (2004) 3230–3244.
- [26] R. Mahfoud, N. Garmy, M. Maresca, N. Yahi, A. Puigserver, J. Fantini, Identification of a common sphingolipid-binding domain in Alzheimer, prion, and HIV-1 proteins, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 11292–11296.
- [27] R. Sabate, M. Gallardo, J. Estelrich, An autocatalytic reaction as a model for the kinetics of the aggregation of beta-amyloid, *Biopolymers* 71 (2003) 190–195.
- [28] M. Kamihira, A. Naito, S. Tuzi, A.Y. Nosaka, H. Saito, Conformational transitions and fibrillation mechanism of human calcitonin as studied by high-resolution solid-state  $^{13}\text{C}$  NMR, *Protein Sci.* 9 (2000) 867–877.
- [29] A. Elliot, E.J. Ambrose, Structure of synthetic polypeptides, *Nature* 165 (1950) 921–922.
- [30] E.J. Ambrose, A. Elliot, Infrared spectroscopic studies of globular protein structure, *Proc. R. Soc. Lond. Ser. A* 208 (1951) 75–90.
- [31] M.D. Kirkitadze, M.M. Condrón, D.B. Teplow, Identification and characterization of key kinetic intermediates in amyloid beta-protein fibrillogenesis, *J. Mol. Biol.* 312 (2001) 1103–1119.
- [32] P.E. Fraser, D.R. McLachlan, W.K. Surewicz, C.A. Mizzen, A.D. Snow, J.T. Nguyen, D.A. Kirschner, Conformation and fibrillogenesis of Alzheimer Abeta peptides with selected substitution of charged residues, *J. Mol. Biol.* 244 (1994) 64–73.
- [33] S. Sethi, G. Lipford, H. Wagner, H. Kretzschmar, Postexposure prophylaxis against prion disease with a stimulator of innate immunity, *Lancet* 360 (2002) 229–230.

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

BBRC

Biochemical and Biophysical Research Communications xxx (2008) xxx–xxx

[www.elsevier.com/locate/ybbrc](http://www.elsevier.com/locate/ybbrc)

## Amyloidogenic properties of the prion protein fragment PrP(185–208): Comparison with Alzheimer's peptide A $\beta$ (1–28), influence of heparin and cell toxicity

Marta Cortijo-Arellano<sup>a</sup>, Jovita Ponce<sup>b</sup>, Núria Durany<sup>b</sup>, Josep Cladera<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> *Biophysics Unit and Centre of Studies in Biophysics, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Autonomous University of Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain*<sup>b</sup> *Health Science Faculty, International University of Catalonia, Barcelona, Spain*

Received 7 January 2008

### Abstract

Amyloid fibrils are a hallmark of Alzheimer's and prion diseases. In both pathologies fibrils are found associated to glycosaminoglycans, modulators of the aggregation process. Amyloid peptides and proteins with very poor sequence homologies originate very similar aggregates. This implies the possible existence of a common formation mechanism. A homologous structural motif has recently been described for the Alzheimer's peptide A $\beta$ (1–28) and the prion protein fragment PrP(185–208). We have studied the influence histidine residues and heparin on the aggregation process of both peptides and determined the possible amyloid characteristics of PrP(185–208), still unknown. The results show that PrP(185–208) forms amyloid aggregates in the presence of heparin. Histidines influence the aggregation kinetics, as in A $\beta$ (1–28), although to a lesser extent. Other spectroscopic properties of the PrP(185–208) fragment are shown to be equivalent to those of other amyloid peptides and PrP(185–208) is shown to be cytotoxic using a neuroblastoma cell line. © 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Prion; Alzheimer; Peptide; Amyloid; Fluorescence; Infrared

Amyloid diseases are related to anomalies in the folding processes of certain proteins involved in the formation of the so called amyloid fibrils, rich in  $\beta$ -sheet secondary structure [1]. The aggregation capacity of amyloid peptides and proteins depends on a conformational change which implies the conversion of unordered and  $\alpha$ -helical structures into  $\beta$ -structures. This change is accepted to trigger the aggregation process, which shows typically sigmoidal kinetics, usually interpreted as describing a nucleation-dependent polymerization. Fibrillar aggregates are a hallmark of central nervous systems affected by different neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's and prion diseases. Both are brain pathologies characterized by memory loss and impairment of cognitive functions (speech and motor skills). In both cases, fibrils are found in the affected

tissues associated with some elements of the extracellular matrix, such as glycosaminoglycans (GAGs) [2]. It seems that GAGs would be able to modulate amyloid aggregation and a cluster of basic residues (VHHQK) has been proposed as a GAG binding motif [3,4]. Alzheimer's A $\beta$  peptide aggregation has been shown to be enhanced by GAGs such as heparin, heparan sulfate, and others [2,3,5,6], whereas in the case of prion aggregation, inhibiting, and stimulating conditions have been described in the presence of GAGs [7,8]. As for the effects of these macromolecules on the development of the pathologies some controversy exists at present since both possible protective and enhancing effects have been described [9,10].

The fact that proteins and peptides with no sequence homology give place to proteinaceous aggregates with very similar physicochemical properties implies the existence of a possible common aggregation mechanism. Recently, a specific region has been identified as a possible

\* Corresponding author. Fax: +34 935811907.

E-mail address: [josep.cladera@uab.es](mailto:josep.cladera@uab.es) (J. Cladera).

a sphingolipid-binding motif, structurally homologous, in the fragment 1–28 of the Alzheimer's A $\beta$  peptide and the fragment 185–208 of the human prion protein [11]. Since both sequences contain His residues and possible heparin binding motifs, we have used in the present work a combination of spectroscopic techniques (Fourier-Transform Infrared Spectroscopy and Fluorescence Spectroscopy) complemented with electron microscopy in order to compare the influence of heparin on the aggregation process of both peptides and further characterize PrP(185–208) as an amyloidogenic peptide.

The results show that PrP(185–208) is able to form amyloid aggregates following a nucleation-dependent polymerization only in the presence of heparin. Protonation of the His residues or their substitution by Ala is shown to slow down the aggregation process, as it happens for the Alzheimer's A $\beta$ (1–28) peptide, although the effect in the case of the prion peptide is less pronounced. PrP(185–208) is shown to be cytotoxic using a neuronal cell line.

## Materials and methods

Synthetic peptides A $\beta$ (1–28), A $\beta$ (1–28)H13A, A $\beta$ (1–28)H14A, PrP(185–205), and PrP(185–205)H187A were purchased from JPT Peptides Technologies (Germany). Polypeptidic sequences are detailed in Table 1.

**FT-IR measurements.** Lyophilized peptides were dissolved in 10mM deuterated Hepes buffer and pH was adjusted with NaOD and DCl solutions (Sigma-Aldrich). The peptide concentration in the samples was always 1.2 mM, and heparin (Sigma-Aldrich) was added at 1 mg/ml. FT-IR spectra were recorded with a Mattson Polaris Fourier transform spectrometer at 37 °C at a resolution of 2 cm<sup>-1</sup>. Samples were inserted between CaF<sub>2</sub> windows using a 50  $\mu$ m Teflon spacer. The sample chamber was purged continuously with N<sub>2</sub> in order to remove water vapour. A corresponding deuterated buffer spectrum was subtracted from the spectrum of each sample.

**Fluorescence measurements.** The aggregation kinetics of the amyloid peptides were monitored using the dye Thioflavin T (ThT), which fluorescence is dependent on the formation of amyloid aggregates. Fluorescence measurements were carried out in a SLM-Aminco 8000 spectrofluorimeter. Excitation and emission wavelengths were set at 450 and 490 nm, respectively. Temperature was controlled with a thermostatic bath at 37 °C. The peptide concentration in the samples was always 50  $\mu$ M, and heparin was added at 0.041 mg/ml.

**MTT assay using SH-SY5Y neuroblastoma cells.** Cells were plated at 37 °C on 96-well plates (Iwaki) at a density of 12,000 cells per well to confluency, with 5% CO<sub>2</sub> in a humidified atmosphere with Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM/Ham's F12, 1:1) with phenol red (Sigma). L-Glutamine (4 mM; Gibco), penicillin (100 U/ml; Gibco), streptomycin (100  $\mu$ g/ml; Gibco), MEM non-essential amino acids (100 $\times$ ; Gibco) and 0.5% inactivated fetal bovine serum (FBS; Gibco) were added to the medium. The cells were incubated with peptide samples during 48 h. A 1/10 dilution of aqueous MTT solution (5 mg/ml) was then added to each well (100  $\mu$ l), and the mixture was incubated at 37 °C for 90 min.

After that time, medium culture was removed from the well-plate and the MTT reduction reaction was stopped adding 50  $\mu$ l of DMSO in each well. The amount of formazan product was determined by measuring the absorbance in a 96-well ELISA plate reader at 595 nm. All MTT assays were duplicated.

**Electron microscopy.** Aggregated and non-aggregated samples from the fluorescence assay were taken at three different times and then were used in order to obtain electron micrographs. Ten microliters of these suspensions were placed on grids covered by a carbon film. Excess fluid was withdrawn after 1 min, and the grids were negatively stained with 2% uranyl acetate. The stained grids were then examined and photographed in a Hitachi H-7000 electron microscope at 70 kV.

## Results

### Effect of histidine substitutions on the aggregation of A $\beta$ (1–28)

Fig. 1A and B illustrates how the substitution of either His13 or His14 in the A $\beta$ (1–28) sequence, affects peptide aggregation at pH 5.5. Formation of fibrils was monitored using the fluorescent dye Thioflavin T, in the absence (panel A) and presence of heparin (panel B). Measurements of wild-type A $\beta$ (1–28) in 10 mM Tris at pH 7.5 did not give any fluorescence increase within the monitored time interval (approximately 6 h, data not shown). At pH 5.5 and in agreement with previous reports [12], wild-type A $\beta$ (1–28) readily aggregates, following, as clearly seen in the figure, the typical sigmoid-shaped amyloid formation kinetics, which is accelerated in the presence of heparin. In agreement as well with previous works [3] both in the absence and the presence of heparin, the H13A mutant fails to show any aggregation during the monitored time interval. H14A however does still aggregate, although more slowly, in the presence of heparin.

Fig. 2A–F shows the Fourier-transform infrared spectra of A $\beta$ (1–28) and the His mutant sequences in the presence and absence of heparin at pH 5.5. For the infrared experiments the peptide concentration was 24 times higher than for the ThT experiments and at that peptide concentration (1.2 mM) the peptide is shown to aggregate very similarly under any of the tested experimental conditions: increase of the band at 1616 cm<sup>-1</sup>, corresponding to the formation of aggregated  $\beta$ -structures [13] whereas the broad band centered at 1648 cm<sup>-1</sup> (unordered and helical structures) decreases. The infrared data show therefore, that substituting either His 13 or His 14 for Ala does not preclude the formation of amyloid aggregates (they form when the concentration is increased 24 times), it just slows down the kinetics, as seen at low peptide concentration (ThT experiments). The electron micrographs shown in Fig. 3A–C,

Table 1  
Alzheimer's A $\beta$ (1–28) and prion PrP(185–208) sequences used in the present study

A $\beta$ (1–28)	H <sub>3</sub> <sup>+</sup> N-DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNK-COO <sup>-</sup>
A $\beta$ (1–28)H13A	H <sub>3</sub> <sup>+</sup> N-DAEFRHDSGYEVAHQKLVFFAEDVGSNK-COO <sup>-</sup>
A $\beta$ (1–28)H14A	H <sub>3</sub> <sup>+</sup> N-DAEFRHDSGYEVHAQKLVFFAEDVGSNK-COO <sup>-</sup>
PrP(185–205)	H <sub>3</sub> <sup>+</sup> N-KQHTVTTTTKGENFTETDVKMMER-COO <sup>-</sup>
PrP(185–208)H187A	H <sub>3</sub> <sup>+</sup> N-KQATVTTTTKGENFTETDVKMMER-COO <sup>-</sup>

Please cite this article in press as: M. Cortijo-Arellano et al., Amyloidogenic properties of the prion protein fragment ..., Biochem. Biophys. Res. Commun. (2008), doi:10.1016/j.bbrc.2008.01.049

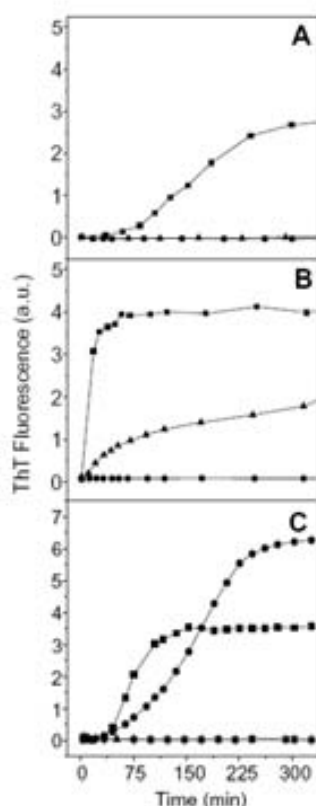


Fig. 1. Thioflavin T fluorescence variation. A $\beta$ (1–28) 50  $\mu$ M, pH 5.5, 37 °C. (A) in the absence of heparin, (B) in the presence of heparin (0.041 mg/ml): wild-type (squares), H14A mutant (triangles), and H13A mutant (circles). (C) PrP(185–208), 50  $\mu$ M, pH 5.5, 37 °C: wild-type in the presence of 0.041 mg/ml of heparin (squares), H187A mutant in the presence of 0.041 mg/ml of heparin (circles) and wild-type and H187A in the absence of heparin (up and down triangles).

illustrate that the aggregation detected by infrared spectroscopy does correspond in all cases to the formation of amyloid fibrils, equivalent to those detected in the fluorescence experiments.

The A $\beta$ (1–28) results are in agreement with and complement (with the ThT and infrared studies) the work by McLaurin and Fraser (electron microscopy and circular dichroism studies) [3]. They serve in our case as a control against which to compare the aggregation and amyloidogenic properties of the prion peptide PrP(185–208).

#### Effect of histidine substitutions on the aggregation of PrP(185–208)

Fig. 1C shows that PrP(185–208) readily forms ThT reactive aggregates in the presence of heparin at pH 5.5. As in the case of A $\beta$ (1–28), substitution of His187 for Ala slows down the aggregation process, although in this case, the effect is smaller and the final amount of fibrils

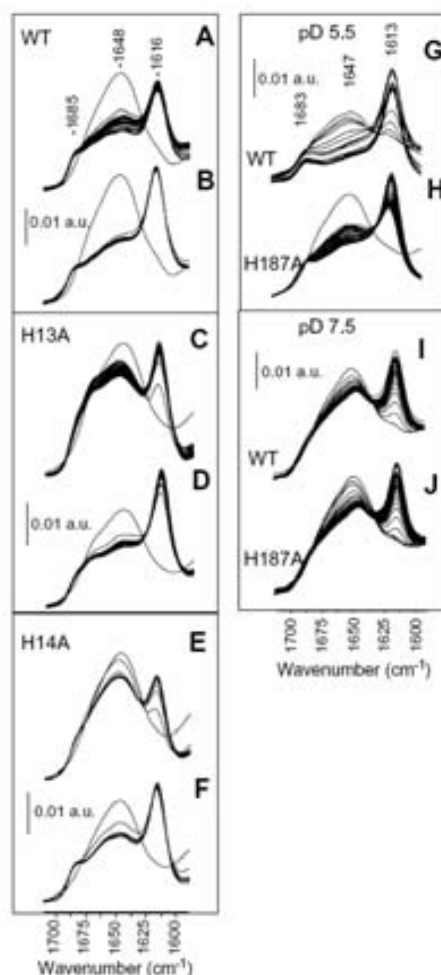


Fig. 2. Fourier-transform infrared spectra of A $\beta$ (1–28) 1.2 mM, wild-type (A and B) and His mutants H13A (C and D), and H14A (E and F), acquired as a function of time, in the absence (A, C, and E) and presence of heparin (B, D, and F) pH 5.5, 37 °C. Fourier-transform infrared spectra of PrP(185–208) 1.2 mM, wild-type (G and I) and His mutant H187A (H and J), acquired as a function of time, in the presence of heparin at pH 5.5 and pH 7.5. Temperature = 37 °C.

seems to be higher. No aggregation was observed in any case at pH 7.5.

Regarding the Fourier-transform infrared spectra (Fig. 2G–J), PrP(185–208) shows the same spectral features than A $\beta$ (1–28) in the infrared region. That is, the appearance of an intense band around 1613 cm<sup>-1</sup> (formation of aggregated  $\beta$ -structures [13]) as the spectra are acquired as a function of time, and the decrease of a broad band centered at 1647 cm<sup>-1</sup>, which can be assigned to a mixture of unordered plus helical structures. The infrared data show that at high concentration (1.2 mM) the PrP(185–208)

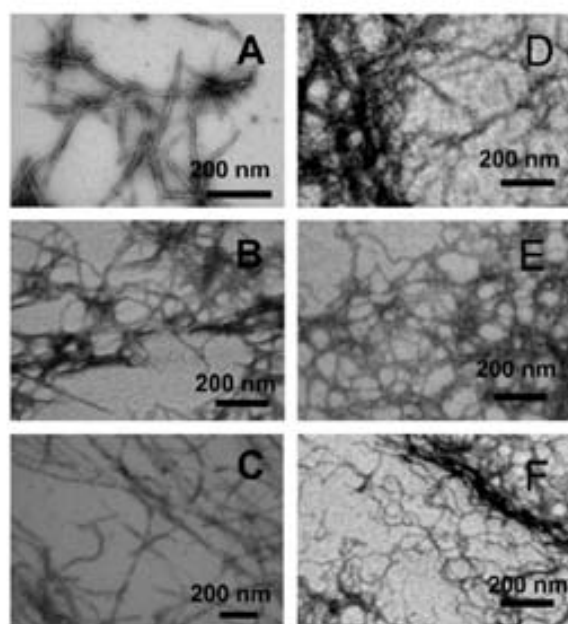


Fig. 3. Electron micrographs from sample aliquots corresponding to the end of the A $\beta$ (1–28) aggregation processes shown in Fig. 1A, WT (A) and in Fig. 2A (WT) and C (H187A) (B and C). Electron micrographs from sample aliquots corresponding to the end of the PrP(185–208) aggregation processes shown in Fig. 1C, WT (A) and in Fig. 2 G and I, WT and H187A pD 5.5 (B and C).

peptide does aggregate in the presence of heparin at both pD 5.5 and 7.5. This indicates that in contrast to A $\beta$ (1–28), PrP(185–208) aggregation kinetics are not so strongly affected by the protonation state of His: for A $\beta$ (1–28) no aggregation was measured by FT-IR at pD 7.5 under any experimental condition; PrP(185–208) (both WT and H187A) however, does clearly aggregate at pD 7.5. It is therefore clear that His187 has an influence on the aggregation kinetics but not as large as in the case of His 13 and 14 in A $\beta$ (1–28), and that the effect of heparin would greatly depend in this case of its interaction with other residues in the sequence.

The electron micrographs (Fig. 3D–F) show that amyloid fibrils, are detected at the end of the PrP(185–208) aggregation process monitored either by ThT fluorescence or FT-IR.

#### A $\beta$ (1–28) and PrP185–208 cell toxicity

Fig. 4 shows the effect of PrP(185–208) on cell viability. Peptide (WT and His mutants) was added to the cultured neuroblastoma cells having been pre-incubated at different times in the presence and absence of heparin. The MTT results show that the wild-type sequence of PrP(185–208) causes the mortality of around 20–25% of the cells, compared to the controls. Cell death does not depend on the preincubation time, nor in the absence or presence of hep-

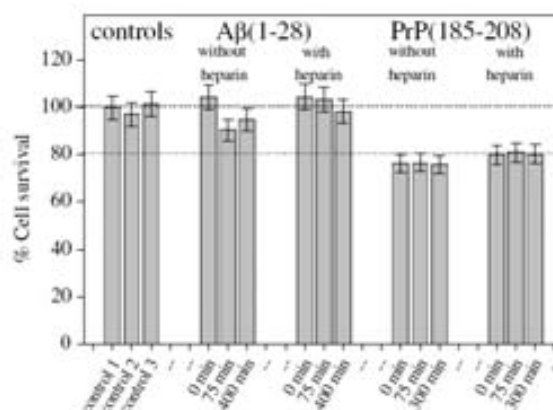


Fig. 4. Percentage of cell survival after addition of either A $\beta$ (1–28) or PrP(185–208). The peptides (50  $\mu$ M) were pre-incubated for aggregation before addition to the cell culture during the indicated times, in the absence and presence of heparin. Controls: (1) cells, (2) cells + tris buffer, (3) cells + heparin in tris buffer.

arin during preincubation. The addition of the His187A sequence has as well an effect on cell viability, although slightly smaller than the effect caused by the wild-type. In contrast, A $\beta$ (1–28) is shown not to have any effect on cell viability, in agreement with previous works.

#### Discussion

An important number of peptides and proteins with very poor sequential homology have been shown to have the capacity to form amyloid aggregates. The physicochemical similarity of such proteinaceous aggregates and their importance in relation to the so called 'conformational diseases', implies the possibility of a common molecular mechanism that could help explaining the onset and development of different pathologies. In this sense, the work by Mahfoud et al. [11] points out the interesting possibility that the Alzheimer's A $\beta$ (1–28) peptide and the prion protein PrP(185–208) fragment share a structurally homologous sphingolipid binding domain. Although the amyloid formation capacity of A $\beta$ (1–28) has been thoroughly studied [3,4,12], PrP(185–208) can be considered a newcomer to the family of amyloid peptides. It was therefore worthwhile, in our opinion, to explore in more detail the amyloid properties of this peptide. In previous works [14,15] we have shown that PrP(185–208) does react with Thioflavin T in the presence of heparin, following the typical nucleation-dependent polymerization. It is well known that the presence of GAGs has an enhancing effect on the amyloid formation capacity of Alzheimer's amyloid peptides [2–10] which is strongly related to the presence of His residues in the peptide sequence. There is a motif of three residues in the PrP(185–208) (VTHQK) sequence, similar to the A $\beta$ (1–28)'s heparin binding motif (VHHQK).

In the present work, we have undertaken the study of amyloid properties of PrP(185–208) in comparison to those

of A $\beta$ (1–28). We have focused on the determination of the possible influence of the His residue in the PrP(185–208) sequence on the interaction of the peptide with heparin and on the determination of the cell toxicity of the prion peptide, two aspects which are important in order to further define the amyloid character of PrP(185–208). The results show that PrP(185–208), not only reacts with ThT, as previously described, but it also gives place to the same spectroscopic variations in the infrared region, as those typically described by other amyloid peptides and proteins: a characteristic aggregation band between 1610–1620 cm<sup>-1</sup>, which intensity grows as the intensity of a broad band centered around 1645–1648 cm<sup>-1</sup> (unordered plus helical structures) decreases.

In the case of A $\beta$ (1–28) the combination of fluorescence and infrared techniques, confirms what had been previously reported by McLaurin and Fraser [3] using different techniques, that is, that the effect of heparin, used as a model GAG, has a kinetic effect (it accelerates) on the aggregation process. In our case this is confirmed by the fact that the substitution of His by Ala does not preclude aggregation at high concentration (FT-IR experiments). That is, the effect observed at low concentration (ThT experiments) has to be interpreted as a slowing down of the aggregation process. Such an influence of His-heparin interaction on the rate of aggregation is measured as well for PrP(185–208), although the effect is seen to be less pronounced than in the case of A $\beta$ (1–28). PrP(185–208) His-Ala mutants do even aggregate at pH 7.5 at high concentration (FT-IR experiments), in contrast to A $\beta$ (1–28). When PrP(185–208) forms amyloid fibrils, those are shown to be morphologically equivalent to A $\beta$ (1–28) fibrils, under the electron microscope.

PrP(185–208) is therefore a peptidic fragment of the human prion protein that undergoes a nucleation-dependent process which ends up in the formation of fibrils, rich in  $\beta$ -sheet structure. The process rate is dependent on the interaction with heparin, and at least partially on the interaction of heparin with His187. The results therefore further contribute to characterize the peptide as an amyloid peptide.

Finally, we considered interesting to check whether PrP(185–208) has any cytotoxic effect. The results of the MTT tests with a neuroblastoma cell line show that, whereas A $\beta$ (1–28) is not toxic, as already known, between 20 and 25% of the cell population died in the presence of PrP(185–208), under the conditions studied. Although the effect has been shown to be independent of the presence of heparin in the pre-incubation solution (before adding the peptide to the cell culture), this does not mean that the interaction of the peptide with heparin is not important for cell toxicity. It could be that the added peptide, interacts with the proteoglycans present at the cell surface, before they exert their toxic effect. This would be an interesting point to follow up in future studies.

The present paper, makes a contribution to the characterization of the PrP(185–208) prion peptide as an amyloid

peptide to be taken into account when designing experiments directed to elucidate the molecular nature of amyloid formation.

#### Acknowledgments

This work was funded by Grants ETT2002-05139 and BIO2003-02848 from the Spanish Ministry of Science and Education to J.C.

#### References

- [1] D.R. Booth, M. Sunde, V. Bellotti, C.V. Robinson, W.L. Hutchinson, P.E. Fraser, P.N. Hawkins, C.M. Dobson, S.E. Radford, C.C. Blake, M.B. Pepys, Instability, unfolding and aggregation of human lysozyme variants underlying amyloid fibrillogenesis, *Nature* 385 (1997) 787–793.
- [2] J. Diaz-Nido, F. Wandosell, J. Avila, Glycosaminoglycans and beta-amyloid, prion and tau peptides in neurodegenerative diseases, *Peptides* 23 (2002) 1323–1332.
- [3] J. McLaurin, P.E. Fraser, Effect of amino-acid substitutions on Alzheimer's amyloid-beta peptide-glycosaminoglycan interactions, *Eur. J. Biochem.* 267 (2000) 6353–6361.
- [4] J. McLaurin, T. Franklin, X. Zhang, J. Deng, P.E. Fraser, Interactions of Alzheimer amyloid-beta peptides with glycosaminoglycans effects on fibril nucleation and growth, *Eur. J. Biochem.* 266 (1999) 1101–1110.
- [5] G.M. Castillo, C. Ngo, J. Cummings, T.N. Wight, A.D. Snow, Perlecan binds to the beta-amyloid proteins (A beta) of Alzheimer's disease, accelerates A beta fibril formation, and maintains A beta fibril stability, *J. Neurochem.* 69 (1997) 2452–2465.
- [6] A.D. Snow, M.G. Kinsella, E. Parks, R.T. Sekiguchi, J.D. Miller, K. Kimata, T.N. Wight, Differential binding of vascular cell-derived proteoglycans (perlecan, biglycan, decorin, and versican) to the beta-amyloid protein of Alzheimer's disease, *Arch. Biochem. Biophys.* 320 (1995) 84–95.
- [7] S.A. Priola, B. Caughey, Inhibition of scrapie-associated Prp accumulation—probing the role of glycosaminoglycans in amyloidogenesis, *Mol. Neurobiol.* 8 (1994) 113–120.
- [8] M.D. Ledesma, M. Perez, C. Colaco, J. Avila, Tau glycation is involved in aggregation of the protein but not in the formation of filaments, *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* 44 (1998) 1111–1116.
- [9] B. Caughey, Scrapie-associated Prp accumulation and its prevention—insights from cell-culture, *Brit. Med. Bull.* 49 (1993) 860–872.
- [10] S.J. Pollack, Sadler H, S.R. Hawtin, V.J. Taylor, M.S. Shearman, Sulfated glycosaminoglycans and dyes attenuate the neurotoxic effects of beta-amyloid in rat PC12 cells, *Neurosci. Lett.* 184 (1995) 113–116.
- [11] R. Mahfoud, N. Garmy, M. Maresca, N. Yahi, A. Puigserver, J. Fantini, Identification of a common sphingolipid-binding domain in Alzheimer, prion, and HIV-1 proteins, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 11292–11296.
- [12] K. Ma, E.L. Clancy, Y. Zhang, D.G. Ray, K. Wollenberg, M.G. Zagorski, Residue-specific pKa measurements of the  $\beta$ 03B2; -peptide and mechanism of pH-induced amyloid formation, *J. Am. Chem. Soc.* 121 (1999) 8698–8706.
- [13] D.M. Byler, H. Susi, Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra, *Biopolymers* 25 (1986) 469–487.
- [14] B. Klajnert, M. Cortijo-Arellano, M. Bryszewska, J. Cladera, Influence of heparin and dendrimers on the aggregation of two amyloid peptides related to Alzheimer's and prion diseases, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 339 (2006) 577–582.
- [15] B. Klajnert, M. Cortijo-Arellano, J. Cladera, M. Bryszewska, Influence of dendrimer's structure on its activity against amyloid fibril formation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 345 (2006) 21–28.

