

2 Elección, manipulación y síntesis de la proteína A β

2.1 Elección de una proteína A β

La elección de una de las formas de la proteína A β para su utilización, como modelo de fibrillogénesis, en la búsqueda de fármacos para la enfermedad de Alzheimer, no es una cuestión trivial. La primera aproximación a este problema que se realizó en nuestro laboratorio fue con el fragmento $\beta(12-28)$ ³³. Esto nos permitió experimentar lo que muchos científicos describen: la formación de fibras amiloides no es un proceso fácil de reproducir, en el cual intervienen un elevado número de variables, y del que dependen, además de la morfología de las fibras obtenidas, los resultados biológicos de citotoxicidad^{34,35}.

Secuencia	Pros	Contras
Fragmentos ($\beta(12-28)$, $\beta(25-35)$, $\beta(10-35)$, etc.)	- Síntesis y purificación relativamente sencilla	- Baja reproducibilidad en la formación de fibras - ¿Forman realmente fibras? Discrepancias en la bibliografía
$\beta A(1-40)$	- Mayor prevalencia en el cerebro (90% total) - Más soluble que $\beta(1-42)$	- Proceso de formación de fibras más lento que en el caso de $\beta(1-42)$
$\beta A(1-42)$	- Se cree que es el promotor del centro de nucleación (inicia la agregación <i>in vivo</i>) - Da fibras amiloides en tiempos muy breves	- Solubilidad extremadamente baja - Purificación muy compleja

Tabla 1. Resumen de los diferentes péptidos A β considerados, con sus ventajas e inconvenientes

En esta tesis se evaluaron diferentes secuencias de A β utilizadas en la bibliografía. En la Tabla 1 se muestran las secuencias que se valoraron, junto con las ventajas e inconvenientes más importantes que implica cada una de ellas.

A pesar del atractivo sintético y de manipulación que presentan los fragmentos sintéticos de A β descritos en la bibliografía³⁶, la experiencia previa del grupo con la

³³ Rabanal, F.; Tusell, J. M.; Sastre, L.; Quintero, M. R.; Cruz, M.; Grillo, M. D.; Pons, M.; Albericio, F.; Serratos, J.; Giralt, E. *J. Pept. Sci.*, **2002**, *8*, 578-588.

³⁴ Zagorski, M. G.; Yang, J.; Shao, H.; Ma, K.; Zeng, H.; Hong, A. *Methods Enzymol.* **1999**, *309*, 189-235.

³⁵ Howlett, D. R.; Jennings, K. H.; Lee, D. C.; Clark, M. S. G.; Brown, F.; Wetzell, R.; Wood, S. J.; Camilleri, P.; Roberts, G. W. *Neurodegeneration*, **1995**, *4*, 23-32.

³⁶ Lynn, D.; Meredith, S. C. *J. Struct. Biol.* **2000**, *130*, 153-173.

2 Elección, manipulación y síntesis de la proteína A β

secuencia β (12-28) hizo descartar esta opción. La formación de fibras amiloides a partir de esta secuencia no es reproducible³³, lo que probablemente sucede también con otros fragmentos de A β , ya que no existe consenso sobre la formación de fibras en la bibliografía consultada (es el caso de β (25-35), de la cual algunos afirman que su forma amidada en el extremo C-terminal no da lugar a fibras a pesar de ser citotóxica³⁷, mientras que otros muestran resultados que evidencian la capacidad amiloidogénica de esta secuencia³⁸ e incluso la necesidad de que esté agregada para interactuar con la membrana celular³⁹).

Uno de los objetivos de esta tesis es establecer en nuestro laboratorio un modelo que reproduzca, de forma sencilla, el proceso de fibrilogénesis que se da durante la enfermedad de Alzheimer. Los fragmentos mencionados en la Tabla 1 no se encuentran en el cerebro de los enfermos de Alzheimer⁴⁰. Además, puede ser que la omisión de algunos de los aminoácidos, tanto del extremo N- como del C-terminal, presentes en las secuencias nativas influya de forma decisiva en el resultado obtenido⁴¹. Por estos motivos, la elección de una proteína A β representativa fue restringida a las secuencias naturales.

Dentro de las secuencias de A β que podemos encontrar en el cerebro humano, las más relevantes son β (1-40) y β (1-42). La elección entre ambas no es sencilla. Aunque trabajar con proteínas amiloides siempre implica problemas en la preparación de muestras (baja solubilidad, difícil reproducibilidad, etc.), la proteína β (1-42) es especialmente difícil de manipular, ya que presenta una insolubilidad muy elevada, lo que dificulta también su purificación (en condiciones cromatográficas estándar eluye dando lugar a picos extremadamente anchos, con poca resolución³⁴, como hemos podido verificar en nuestro laboratorio (apartado 2.3), por lo que requiere el uso de sistemas cromatográficos no habituales en la química de péptidos, como mezclas de eluyentes de ACN/isopropanol^{42,43} y condiciones básicas⁴⁴).

³⁷ Forloni, G.; Lucca, E.; Angeretti, N.; Torre, P. D.; Salmona, M. *J. Neurochem.* **1997**, *69*, 2048-2054.

³⁸ Hughes, E.; Burke, R. M.; Doig, A. J. *J. Biol. Chem.* **2000**, *33*, 25109-25115.

³⁹ Hirakura, Y.; Satoh, Y.; Hirashima, N.; Suzuki, T.; Kagan, B. L.; Kirino, Y. *Biochem. Molec. Biol. Int.* **1998**, *46*, 787-794.

⁴⁰ Wang, R.; Sweeney, D.; Gandy, S. E.; Sisodia, S. S. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 31894-31902.

⁴¹ Teplow, D. B. *Neurobiol. Aging* **1999**, *20*, 71-73.

⁴² Snyder, S. W.; Ladror, U. S.; Wade, W. S.; Barrett, L. W.; Matayoshi E. D.; Huffaker, H. J.; Krafft, G. A.; Holzman, T. F. *Biophys. J.* **1994**, *67*, 1216-1228.

⁴³ Western Analytical Products, Inc. <http://www.WesternAnalytical.com/vydac/bamyloid>

⁴⁴ Näslund, J.; Karlström, A. R.; Tjernberg, L. O.; Schierhorn, A.; Terenius, L.; Nordstedt, C. *J. Neurochem.* **1996**, *67*, 294-301.

Partiendo de la hipótesis de que el fragmento 17-21 de la proteína nativa es el centro de nucleación⁴⁵, la elección de $\beta(1-40)$ o $\beta(1-42)$ parece indiferente (apartado 3.2.1). Por otro lado, si queremos utilizar un modelo de la fibrillogénesis que tiene lugar en la enfermedad de Alzheimer, la proteína $\beta(1-42)$ parece más adecuada que $\beta(1-40)$, ya que se cree que la proteína de 42 residuos es la iniciadora del proceso de agregación *in vivo*, habiéndose constatado su capacidad para promover la agregación de la secuencia con menor capacidad amiloidogénica^{42,46,47,48}. No obstante, esta afirmación, como muchas otras relacionadas con esta enfermedad, despierta discrepancias entre grupos de investigación y hay artículos que afirman que la forma $\beta(1-42)$, al contrario que la $\beta(1-40)$, no tiene capacidad para formar agregados amiloides en el cerebro de ratas^{49,*} e incluso otros muestran resultados en los que la administración de $\beta(1-42)$ fibrilar en cerebros de monos *rhesu* no resulta neurotóxica, al contrario de lo que se observa con $\beta(1-40)$ ⁵⁰. A pesar de estas observaciones aisladas, la opinión más generalizada entre la comunidad científica apoya la teoría de $\beta(1-42)$ como iniciador de la nucleación.

Tras la evaluación de todos estos pros y contras, escogimos para la realización de los ensayos descritos en la presente tesis la proteína $\beta(1-42)$.

2.1.1 Otros factores importantes en la agregación de A β

Un problema adicional que se describe en la bibliografía es la falta de reproducibilidad entre diferentes lotes de A β en los trabajos realizados con dicha

⁴⁵ Hilbich, C.; Kisters-Woike, B.; Reed, R.; Masters, C. L.; Beyreuther, K. *J. Mol. Biol.* **1991**, *218*, 149-163.

⁴⁶ Gravina, S. A.; Ho, L.; Eckman, C. B.; Long, K. E.; Otvos, L.; Younkin, L. H.; Suzuki, N.; Younkin, S. G. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 7013-7016.

⁴⁷ Jarrett, J. T.; Berger, E. P.; Lansbury, P. T. *Biochemistry* **1993**, *32*, 4693-4697.

⁴⁸ Weinreb, P. H.; Jarrett, J. T.; Lansbury, P. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 10835-10836.

⁴⁹ Shin, R.; Ogino, K.; Kondo, A.; Saido, T. C.; Trojanowski, J. Q.; Kitamoto, T.; Tateishi, J. *J. Neurosci.* **1997**, *17*, 8187-8193.

* El resultado obtenido en dicho artículo puede cuestionarse teniendo en cuenta que, tras la disolución de A β en H₂O a una concentración 700 μ M, proceden a filtrar la preparación y posteriormente diluirla, sin analizar la concentración real (700 μ M > 3 mg/mL, valor muy superior a la solubilidad descrita para $\beta(1-42)$). Probablemente este es el motivo de que los resultados que obtienen con $\beta(1-40)$ (mucho más soluble que $\beta(1-42)$) no sean comparables con los que obtienen con el péptido más amiloidogénico e insoluble (las concentraciones de ambas preparaciones pueden diferir entre sí hasta un orden de magnitud debido al protocolo de disolución utilizado).

⁵⁰ Geula, C.; Wu, C.; Saroff, D.; Lorenzo, A.; Yuan, M.; Yanker, B. A. *Nature Med.*, **1998**, *7*, 827-828.

2 Elección, manipulación y síntesis de la proteína A β

proteína^{34,35,51}. El problema es tan grave que ha provocado la imposibilidad de algunos laboratorios de reproducir los resultados obtenidos previamente por ellos mismos³⁴.

Además de esta falta de reproducibilidad entre lotes también se han descrito problemas al utilizar un mismo lote de péptido almacenado en forma de sólido liofilizado a -20°C durante largos periodos de tiempo⁵². Así, es recomendable evitar congelar y descongelar el péptido, además de almacenarlo preferiblemente a -80°C .

Por ello, y aunque en un principio se planteó la posibilidad de obtener el péptido sintético en nuestro laboratorio, como se describe en el apartado 2.3, la dificultad para obtener cantidades razonables de péptido, con una pureza elevada y de forma reproducible, hizo que se optara por recurrir a un proveedor comercial capaz de suministrar lotes de tamaño suficiente como para permitir la realización de diversos ensayos (del orden de 5-10 mg) sin necesidad de cambiar el mismo.

Puesto que uno de los mayores problemas que presenta la síntesis de A β es la etapa de purificación (el perfil cromatográfico de la proteína A β hace muy difícil la eliminación de las impurezas debidas a deleciones durante la síntesis³⁴), se optó por utilizar péptido obtenido mediante síntesis convergente. Así, se escogió A β comercializado por Peptide Institute, Inc. para la realización de todos los ensayos de esta tesis.

⁵¹ Poduslo, J. F.; Curran, G. L.; Kumar, A.; Frangione, B.; Soto, C. J. *Neurobiol.* **1999**, 39, 371-382.

⁵² Goldsbury, C. S.; Wirtz, S.; Müller, S. A.; Sunderji, S.; Wicki, P.; Aebi, U.; Frei, P. J. *Struct. Biol.* **2000**, 130, 217-231.

2.2 Disolución y fibrilogénesis de A β

La formación de fibras amiloides a partir de una forma soluble de una proteína amiloide no se produce de forma inmediata, sino que es un proceso más o menos lento (dependiendo de la capacidad amiloidogénica de la proteína en cuestión), que se ve afectado por diversos factores externos.

Además de la naturaleza de la proteína A β también intervienen parámetros tales como la temperatura^{53,54}, el pH^{55,56}, la fuerza iónica, la agitación, la presencia de metales di- y trivalentes, diversos contaminantes (por ejemplo plastificantes), etc^{34,57}. Algunos autores van un poco más lejos y apuntan a que el proceso de agregación de las proteínas amiloides *in vivo* es un proceso de nucleación gobernado por factores específicos de tejido, lo que podría explicar la deposición selectiva en determinados órganos⁵⁸. El efecto inhibitorio o promotor de la formación de fibras que presentan *in vivo* diversas proteínas, lípidos, chaperonas^{*} e iones metálicos es complejo, pero diversos autores apuntan sobre su elevada importancia en el organismo humano^{59,60}. También resulta interesante desde el punto de vista mecanístico el papel que parece jugar la composición del extremo C-terminal de la proteína β -amiloide no sólo en su solubilidad, sino también en su capacidad para anclarse a membranas lipídicas y favorecer así la formación de fibras amiloides⁶¹.

La cinética de este proceso de agregación *in vitro* tiene un comportamiento que presumiblemente es dependiente de nucleación, en el cual se postula que se parte de estructuras monoméricas que, tras dar lugar a intermedios oligoméricos, acaban rindiendo los agregados fibrilares, los cuales están constituidos por protofibras (ver el esquema mostrado en la Figura 4). Esto hace que el resultado final del proceso de fibrilogénesis dependa, además de todos los factores ya expuestos, del estado inicial de la muestra: si

⁵³ Gursky, O.; Aleshkov, S. *Biochim. Biophys. Acta.* **2000**, *1476*, 93-102.

⁵⁴ Horng-Lun, C.; Shan-Yang, L. *Biophys. Chem.* **2001**, *89*, 173-180.

⁵⁵ Wood, S. J.; Maleeff, B.; Hart, T.; Wetzel, R. *J. Mol. Biol.* **1996**, *256*, 870-877.

⁵⁶ Ma, K.; Clancy, E. L.; Zhang, Y.; Ray, D. G.; Wollenberg, K.; Zagoski, M. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 8698-8706.

⁵⁷ Stine, W. B.; Dahlgren, K. N.; Krafft, G. A.; LaDu, M. J. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 11612-11622.

⁵⁸ Kisilevsky, R. *J. Struct. Biol.* **2000**, *130*, 99-108.

* Las chaperonas son proteínas que catalizan y dirigen el plegamiento de otras proteínas (del inglés *chaperone*).

⁵⁹ McLaurin, J.; Yang, D. S.; Yip, C. M.; Fraser, P. E. *J. Struct. Biol.* **2000**, *130*, 259-270.

⁶⁰ Bohrmann, B.; Tjernberg, L.; Kuner, P.; Poli, S.; Levet-Trafit, B.; Näslund, J.; Richards, G.; Huber, W.; Döbeli, H.; Nordstedt, C. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 15990-15995.

⁶¹ Yip, C. M.; McLaurin, J. *Biophys. J.* **2001**, *80*, 1359-1371.

2 Elección, manipulación y síntesis de la proteína A β

sembramos una disolución de A β con fibras preformadas, se modifica la cinética de formación de fibras y éstas cambian su morfología (longitud, cantidad, grado de agrupamiento, etc.), e igual sucede si utilizamos una muestra de A β que contenga especies capaces de promover la agregación, como pueden ser los oligómeros y las protofibras.

La diferencia en el estado inicial de la proteína A β es uno de los motivos por los que se obtienen diferentes resultados al cambiar el lote de proteína: la formación de oligómeros e incluso de fibras se da de forma incontrolada durante la purificación (normalmente se lleva a cabo en disolventes acuosos, en los que A β puede fácilmente iniciar la formación de oligómeros aun en presencia de disolventes orgánicos), la manipulación o el almacenamiento de la proteína.

El elevado número de factores que afectan a la fibrillogénesis, unido a la observación realizada por diversos autores de que únicamente resultan citotóxicas las formas fibrilares de la proteína A β ^{62,63}, lleva a la afirmación de que para obtener un comportamiento de A β reproducible es necesario adoptar un tratamiento de homogeneización de las muestras y también es recomendable no utilizar lotes de A β diferentes durante la realización de una serie de experimentos.

En la presente tesis se consideró necesario utilizar un **protocolo disgregante** para homogeneizar las muestras de A β y asegurar el estado monomérico de la proteína al inicio de cualquier experimento. Además, es importante utilizar el mismo protocolo de preparación de muestras en todos los experimentos para obtener resultados comparables.

2.2.1 Tratamiento disgregante

La elección de un tratamiento disgregante, al igual que la elección de la secuencia de A β , tampoco es un proceso trivial. De forma ideal, los requisitos que debería cumplir cualquier tratamiento disgregante son los siguientes:

⁶² Lorenzo, A.; Yanker, B. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1994**, *91*, 12243-12247.

⁶³ Teplow, D. B. *Amyloid* **1998**, *5*, 121-142.

2 Elección, manipulación y síntesis de la proteína A β

- ◆ No tiene que alterar el proceso de agregación (no debe interferir ni en el tiempo de formación de fibras ni en la morfología de éstas).
- ◆ Debe convertir todo el péptido a su forma monomérica, evitando la presencia de oligómeros o fibras preformadas.
- ◆ Tiene que ser reproducible.
- ◆ Debe ser compatible tanto con los ensayos biológicos como con los estructurales.
- ◆ Tiene que proporcionar una disolución total del péptido a tiempo inicial.

En la bibliografía se describen varios protocolos para preparar disoluciones de A β , desde las más sencillas, consistentes en disolver el péptido directamente en agua o medio acuoso, hasta las más complejas. En la Tabla 2 se resumen algunos de estos protocolos.

La mayoría de estos métodos coinciden en la elección de tiempos de envejecimiento del orden de 3-7 días y del uso de un tampón con un valor de pH superior a 7. Este pH permite trabajar lejos de la zona de pH crítica para A β , es decir, lejos del intervalo de pH entre 4 y 7 (el punto isoeléctrico se calcula que es 5,5⁵⁵) y en el cual el péptido presenta un menor número de cargas netas, siendo por tanto menos soluble.

Péptido (concentración)	Protocolo de disolución utilizado
$\beta(1-42)$ 110 μM ⁶⁴	Producto de partida: liofilizado de ACN/H ₂ O, 0,1% TFA Disolución: directamente en Tris 0,1M Envejecimiento: 7 días a 37 °C
$\beta(1-40)$ 110 μM ⁶⁵	Producto de partida: liofilizado Disolución: disolución HFIP/DMSO añadida sobre Tris 100 mM, NaCl 150mM, pH 7,4 (< 2% dte. orgánico) Envejecimiento: 5-7 días a 37 °C
$\beta(1-40)$ 115 μM ⁶⁶	Producto de partida: liofilizado Disolución: 1-2 mM en 0,1% TFA seguido de dilución en PBS pH 7,4 con antibióticos Envejecimiento: 48 h a 37 °C
$\beta(1-40)$ 50 y 5 μM ⁶⁷	Producto de partida: disolución DMSO 20x Disolución: 10 mM fosfato de sodio, 100 mM NaCl, pH 7,4 Envejecimiento: 0-12 h, con agitación

⁶⁴ Soto, C.; Sigurdsson, E. M.; Morelli, L.; Kumar, R. A.; Castaño, E. M.; Frangione, B. *Nature Med.* **1998**, *4*, 822-826.

⁶⁵ Gordon, D. J.; Sxiarretta, L. K.; Meredith, S. C. *Biochemistry* **2001**, *40*, 8237-8245.

⁶⁶ Lowe, T. L.; Strzelec, A.; Kiessling, L. L.; Murphy, R. M. *Biochemistry* **2001**, *40*, 7882-7889.

⁶⁷ Findeis, M. A.; Musso, G. M.; Arico-Muendel, C. C.; Benjamín, H. W.; Hundal, A. M.; Lee, J. L.; Chin, J.; Kelly, M.; Wakefield, J.; Hayward, N. J.; Molineaux, S. M. *Biochemistry* **1999**, *38*, 6791-6800.

2 Elección, manipulación y síntesis de la proteína A β

Péptido (concentración)	Protocolo de disolución utilizado
$\beta(25-35)$ 500 μM ³⁸	Producto de partida: liofilizado (de H ₂ O ó 35% ACN, 0,1% TFA) Disolución: 20 mM MOPS, pH 7 Envejecimiento: 1 semana a 37 °C
$\beta(1-42)$ y $\beta(1-40)$ ³⁴	Producto de partida: liofilizado de H ₂ O Disolución: TFA (material de vidrio, aprox. 1 mg/mL), baño ultrasonidos, evaporar con N ₂ , 3 x (HFIP + baño ultrasonidos + evaporar con N ₂), desecar (> 2 h) y disolver en medio acuoso tamponado (pH \neq 4 – 7), [tampón] = 10 – 50 mM Envejecimiento: 1 semana a 37 °C
$\beta(1-40)$ 100 μM ⁵²	Producto de partida: liofilizado o DMSO Disolución: HFIP (1-2 h) 20 mg/mL, evaporar con N ₂ , 2 mM en DMSO (stock –20°C). Dilución en PBS pH 7,4 (10% DMSO) Envejecimiento: estudio cinético de horas/días con/sin agitación
$\beta(1-42)$ 350 μM amorfo ⁶²	Producto de partida: liofilizado Disolución: PBS, pH 7,3, centrifugación y resuspensión en PBS pH 7,3 Envejecimiento: uso inmediato
$\beta(1-42)$ 350 μM fibras ⁶²	Producto de partida: liofilizado Disolución: H ₂ O doblemente destilada Envejecimiento: 3 días a 37 °C
$\beta(1-40)$ 350 μM fibras ⁶²	Producto de partida: liofilizado Disolución: H ₂ O doblemente destilada (700 μM) y dilución a 350 μM con PBS pH 7,3 Envejecimiento: 5 días a 37 °C

Tabla 2. Tabla resumen con algunos de los protocolos de disolución de A β descritos en la bibliografía.

Sobre lo que no hay consenso es en la forma de disolver A β . Muchos de estos trabajos no dan mayor importancia a la disolución del péptido A β , obvian las diferencias que existen entre diferentes lotes y optan por disolver directamente el péptido en medio acuoso para la ejecución de sus experimentos.

Algunos autores describen la disolución del péptido en DMSO o HFIP a altas concentraciones para posteriormente diluirlo en el medio acuoso elegido (obteniendo concentraciones finales de disolvente orgánico inferiores al 2%). Este protocolo disgrega la proteína A β y, según diversos investigadores, no interfiere ni en la formación de fibras^{42,52,68,69}, ni en la toxicidad de los preparados, puesto que se utiliza una concentración de disolvente inferior a la tóxica (el DMSO no es tóxico a concentraciones

⁶⁸ Laskay, G.; Sarandi, M.; Varga, J.; Jost, K.; Fónagy, A.; Torday, Cs.; Latzkovits, L.; Penke, B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, 235, 479-481.

⁶⁹ Consejos de utilización de Peptide Institute, Inc.

2 Elección, manipulación y síntesis de la proteína A β

inferiores al 2%). Los detractores de este tipo de protocolo afirman que la presencia de cualquier disolvente orgánico es capaz de alterar el resultado final del proceso de envejecimiento³⁴. Por otro lado, algunos de los partidarios del uso de DMSO describen problemas de reproducibilidad asociados a dicho disolvente: las muestras disueltas en DMSO por un largo periodo de tiempo pierden la capacidad de formar fibras y de unir tanto CR como ThT⁵².

El trabajo descrito por Zagorski y colaboradores³⁴ es una de las pocas excepciones en lo que se refiere al cuidado puesto en la etapa de disolución de muestra. Su protocolo (ver Figura 6) incluye el tratamiento con agentes disgregantes efectivos tanto con la secuencia $\beta(1-40)$ como con la secuencia $\beta(1-42)$. Una primera etapa con TFA permite obtener la proteína en estado monomérico, incluso $\beta(1-42)$, de forma reproducible, mientras que el posterior tratamiento con HFIP elimina los restos de ácido sin que se inicie la formación de oligómeros. Las trazas de disolventes orgánicos se eliminan al vacío en un desecador, y la disolución se realiza en medios acuosos tamponados (utilizando valores de pH lejanos al punto isoelectrico). Algunos detractores de los tratamientos disgregantes con TFA afirman que este ácido interfiere en la agregación⁷⁰, pero si tenemos en cuenta que los péptidos normalmente se suministran como sales de trifluoracetato y que en el protocolo disgregante mostrado en la Figura 6 se eliminan las trazas de TFA, esta afirmación no parece ser aplicable en este caso.

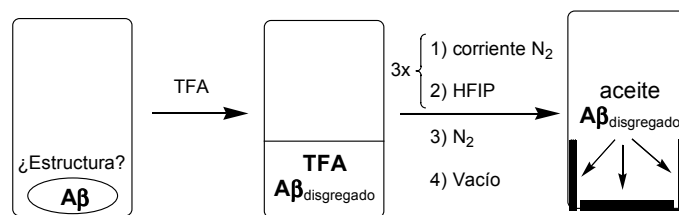


Figura 6. Esquema de las etapas básicas del protocolo disgregante utilizando TFA/HFIP²⁶.

Las ventajas que ofrece el método descrito por Zagorski y colaboradores³⁴ frente a los restantes protocolos de preparación de muestra encontrados hicieron que se adoptara dicho método para preparar las muestras de A β .

No obstante, el trabajo publicado por Zagorski y colaboradores no define un medio acuoso idóneo, lo que hizo necesaria la realización de diversas pruebas para establecer un protocolo apropiado para disolver el péptido disgregado (apartado 2.2.2).

⁷⁰ Snen, C. L.; Fitzgerald, M. C.; Murphy, R. M. *Biophys. J.* **1994**, 67, 1238-1246.

2.2.1.1 Consideraciones adicionales en la manipulación de A β durante el tratamiento disgregante

Los disolventes orgánicos utilizados en el tratamiento disgregante (TFA y HFIP), al ser manipulados con material de plástico, son capaces de disolver pequeñas cantidades de distintos materiales presentes en aquél. Por este motivo, en la preparación de muestras de A β en esta tesis se utiliza material de vidrio.

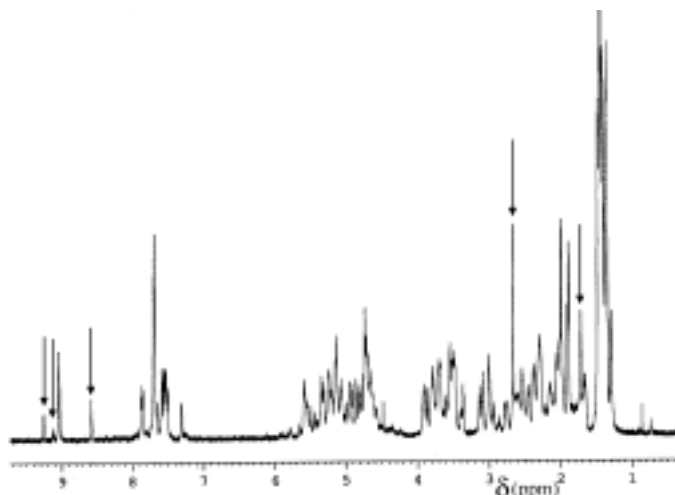


Figura 7. Espectro ^1H -RMN (800 MHz) de $\beta(1-42)$ disuelto en TFA deuterado. Las flechas indican señales atribuibles a contaminantes provenientes de la manipulación (comparación con el espectro de referencia descrito por Zagorski y colaboradores³⁴).

La importancia de esta precaución se corroboró al realizar un espectro de ^1H -RMN de una disolución de A β en TFA deuterado. Tal y como describen Zagorski y colaboradores³⁴, se pudo comprobar la presencia de diversos contaminantes en una muestra de $\beta(1-42)$ disuelta en TFA utilizando material de plástico durante su manipulación (Figura 7).

2.2.2 Disolución de A β en medios acuosos

2.2.2.1 Disolución de A β en agua

En algunos de los trabajos consultados se describe la disolución de A β en H_2O a concentraciones relativamente elevadas. Por ello se intentó determinar inicialmente si la

proteína $\beta(1-42)$ de la que se disponía era soluble en H₂O milliQ[♦] sin ningún tratamiento previo.

La adición de 4,3 mL de H₂O sobre 0,5 mg de $\beta(1-42)$ dio lugar a una suspensión fina aun después de tratar la muestra en el baño de ultrasonidos durante más de 10 min ($[\beta(1-42)]_{\text{nominal}} = 25 \mu\text{M}$).

La disgregación previa de la muestra con TFA/HFIP (apartado 8.2.1.1.4) no permitió tampoco la disolución total de $\beta(1-42)$, rindiendo nuevamente una suspensión de péptido ($[\beta(1-42)]_{\text{nominal}} = 25 \mu\text{M}$).

La insolubilidad cinética^{♦♦} de $\beta(1-42)$ en medio acuoso, aún a bajas concentraciones, es un hecho esperado si nos basamos en la baja solubilidad termodinámica descrita para este péptido⁴⁷. El pH de la suspensión se encuentra cerca del punto crítico, pH 4 – 7 (el péptido utilizado es suministrado en forma de sal de trifluoroacetato, lo que produce una ligera disminución del pH del agua, que se sitúa en torno a pH 6). Además, la concentración 25 μM de $\beta(1-42)$ es más del doble del valor de solubilidad termodinámica descrito a pH 7,4⁴⁷.

2.2.2.2 Disolución de A β en medios acuosos básicos

Las pruebas realizadas con crudos de $\beta(1-42)$ sintetizado en nuestro laboratorio (apartado 2.3.3) permitieron establecer una mejor solubilidad de $\beta(1-42)$ en NH₃(aq) al 0,1% que en H₂O ($\geq 220 \mu\text{M}$ frente a $< 25 \mu\text{M}$), debido, básicamente, al elevado valor de pH (alrededor de 10), el cual favorece la disolución de A β en medio acuoso. Por este motivo se decidió probar la disolución de muestras de A β utilizando un medio básico.

La bibliografía describe que algunas proteínas amiloides no rinden fibras a valores de pH elevados⁷¹ (pH > 8-10, dependiendo de la secuencia). Por ello, se decidió realizar dos

♦ El pH del H₂O utilizada se verificó que se encontraba en valores $\sim 6-7$.

♦♦ En el trabajo presentado por Jarrett y colaboradores⁴⁷ utilizan el término solubilidad cinética para denotar una solución sobresaturada metaestable, la cual se consigue antes de iniciarse el proceso de nucleación. Para el caso de $\beta(1-42)$ estiman que se encuentra en torno a 4-15 μM y calculan que partiendo de una disolución cuatro veces por encima de la solubilidad termodinámica la agregación es inmediata, a diferencia de lo que sucede en el caso de $\beta(1-40)$ o $\beta(1-39)$, que son estables durante días. El término solubilidad termodinámica se define como la solubilidad en condiciones de equilibrio.

⁷¹ Freser, P. E.; Nguyen, J. T.; Surewicz, W. K.; Kirschner, D. A. *Biophys. J.* **1991**, *60*, 1190-2001.

2 Elección, manipulación y síntesis de la proteína A β

ensayos en paralelo. En el primero de ellos, se mantuvo el pH básico final de la disolución, mientras que en el segundo se disolvió inicialmente el péptido a pH básico y posteriormente se procedió a ajustarlo a un pH fisiológico.

2.2.2.2.1 Método A: disolución de A β en NH₃ (aq)

El primer método de disolución de A β evaluado se basa en la utilización de NH₃(aq) para disolver el péptido. Se escogió esta base debido a la capacidad que mostró para disolver crudos de β (1-42) (apartado 2.3.3.1.2). Debido a que el amoníaco es una base débil, se decidió no añadir tampón al medio (la especie tamponadora es, en estas condiciones, el par NH₃/NH₄⁺).

La utilización de NH₃(aq) diluido es compatible con la realización de experimentos biológicos (pequeñas concentraciones de amoníaco no interfieren en la viabilidad de las células, puesto que es un subproducto endógeno derivado de la degradación de aminoácidos⁷²).

Aun así, este método de disolución presenta dos inconvenientes importantes: el pH al que se produce el envejecimiento (pH~10) se encuentra lejos del fisiológico (lo que puede modificar tanto la cinética, como el resultado final de la agregación de la proteína A β) y la presencia de NH₃ imposibilita la cuantificación directa de las muestras mediante análisis de aminoácidos.

Se decidió disolver la proteína en dos etapas: en un primer paso se añade la base concentrada y posteriormente se diluye con agua (apartado 8.2.1.2.1). De esta forma se pretende facilitar la disolución del péptido utilizando un medio muy básico y después se ajusta la concentración y se reduce el pH. Este método de disolución dio lugar a una solución transparente a simple vista.

2.2.2.2.2 Método B: disolución de A β en NaOH 10 mM

La mayor solubilidad de β A a pH básico hizo pensar en la utilización de una base fuerte y la posterior dilución y tamponamiento de la muestra a pH fisiológico. Se decidió utilizar NaOH para obtener un pH elevado (~12), diluir en agua y finalmente ajustar el pH

⁷² Voet, D.; Voet, J. G. *Bioquímica*, Ed. Ediciones Omega S.A., Barcelona **1992**.

2 Elección, manipulación y síntesis de la proteína A β

utilizando un tampón fosfato. El uso de tampón permite fijar el pH a valores fisiológicos y evita que se produzcan fluctuaciones en éste.

El hidróxido sódico ofrece un pH elevado sin producir un incremento excesivo de la fuerza iónica del medio. Además, los iones Na⁺ son muy abundantes tanto en las condiciones de cultivo celular como en el medio fisiológico, por lo que no interfieren en el ensayo biológico si se utiliza a concentraciones relativamente bajas.

El tampón fosfato es muy utilizado en la preparación de muestras biológicas, ya que permite ajustar fácilmente el pH a valores similares al fisiológico y, al igual que el Na⁺, no presenta ningún tipo de incompatibilidad con los ensayos biológicos.

La disolución de A β según el método B se realiza de forma equivalente al método A, es decir, primero se añade la base (NaOH 10 mM (pH12)), se diluye con H₂O y por último se ajusta el pH añadiendo tampón fosfato 0,2 M (la concentración de tampón fosfato final es sólo de 20 mM para no tener una fuerza iónica demasiado elevada^{*}).

En este caso se escogió una concentración final de $\beta(1-42) \sim 50 \mu\text{M}$ para minimizar los problemas de insolubilidad en medio acuoso y obtener una disolución madre adecuada para la realización de ensayos biológicos^{**}. La solubilidad termodinámica de $\beta(1-42)$ está descrita, en condiciones similares, como $\sim 4-15 \mu\text{M}^{47}$ y se sabe que las disoluciones sobresaturadas de $\beta(1-42)$ presentan una estabilidad cinética muy reducida. A pesar de ello, la disolución inicial en medio básico es de esperar que incremente la solubilidad cinética de A β , permitiendo así obtener una preparación sobresaturada. Además, en la mayoría de trabajos publicados se trabaja con concentraciones iguales o superiores a 50 μM de A β .

Se determinó el volumen de NaOH adecuado de forma empírica, fijando previamente la condición de no añadir más de un 20% del volumen final de NaOH 10 mM. De esta forma no se llega a salir de la zona de eficacia del tampón.

* El proceso de fibrilogénesis está influenciado por la fuerza iónica del medio. Una concentración de sales elevada puede interferir de forma no deseada en el proceso de fibrilogénesis.

** Como se describe en el apartado 8.4.1.3, las muestras para ensayos biológicos se han de diluir como máximo en una relación 1:10 muestra/medio de cultivo. Por este motivo, a partir de una disolución 50 μM la muestra más concentrada que se puede preparar es de 5 μM .

2 Elección, manipulación y síntesis de la proteína A β

En el apartado 8.2.1.2.2 se detalla el protocolo utilizado para determinar la cantidad de NaOH óptima. Brevemente, tras realizar el tratamiento disgregante con TFA/HFIP (apartado 8.2.1.1.4) a una alícuota de 0,10 mg de $\beta(1-42)$ se añaden porciones de 20 μL de NaOH 10mM hasta un volumen total de 80 μL (17,8% del volumen final), tras lo que se observa la práctica disolución de la muestra. La suspensión se diluye con H_2O milliQ (72,2% del volumen final) y finalmente se añade el tampón fosfato 0,2 M pH 7,4 (10% del volumen final). La observación macroscópica de la preparación muestra la presencia de turbidez tanto antes como después de añadir el tampón fosfato. La centrifugación y posterior AAA permite comprobar que la concentración de $\beta(1-42)$ en la fracción soluble es 41 μM y el precipitado está constituido por $\sim 0,02$ mg de $\beta(1-42)$ insoluble ($\sim 20\%$ del total).

El método B, al contrario de lo que sucede con el método A, no permite la total disolución de la muestra. Por ello, debe realizarse un paso adicional de separación de la materia insoluble. Esto lo convierte, *a priori*, en menos adecuado que el método A. Por otro lado, aparentemente la solubilidad cinética del péptido en las condiciones del método B es ~ 40 μM , valor aceptable para la preparación de muestras para ensayos biológicos.

2.2.2.2.3 Evaluación del método A y del método B

Las disoluciones de A β preparadas en paralelo según ambos métodos (A y B) se mantienen durante 90 h a 37 °C. Transcurrido este tiempo, y una vez envejecida la disolución, la presencia de fibras amiloides se verificó mediante el uso de microscopía electrónica de transmisión o TEM (en el apartado 4.2 se realiza una introducción a esta técnica). En ambas muestras se pudo observar la presencia tanto de fibras individuales como de haces de fibras, tal y como se muestra en la Figura 8 y en la Figura 9.

Las medidas de TEM muestran un comportamiento similar para ambas preparaciones, lo que no permite descartar ninguno de los dos métodos de obtención de disoluciones de A β .

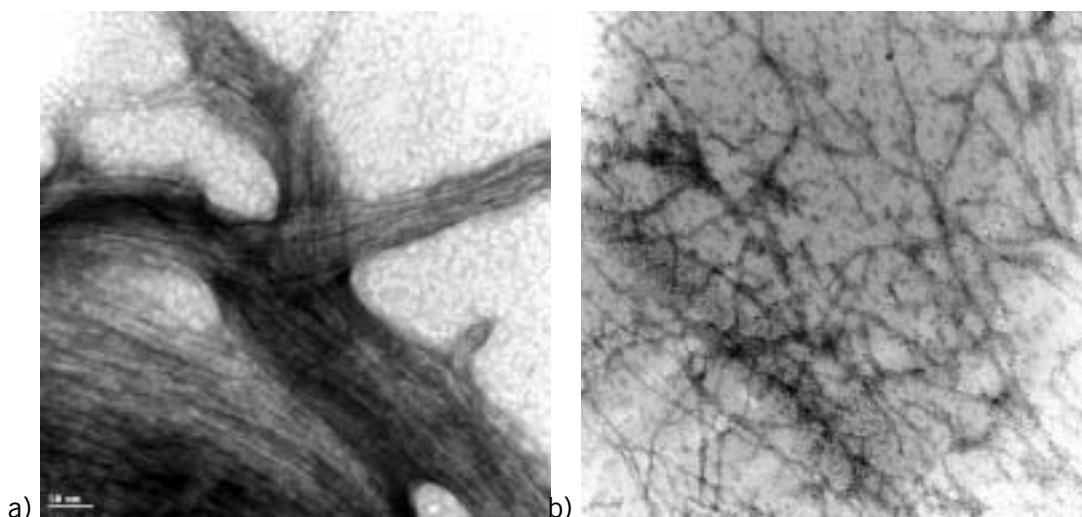


Figura 8. Micrografías, obtenidas mediante TEM con tinción negativa, de la muestra A. La barra en a) corresponde a 50 nm, mientras que en b) representa 0,1 μ M. a) muestra un haz de fibras, en el cual se pueden discernir las fibras que lo constituyen, mientras que en b) se observan fibras aisladas.

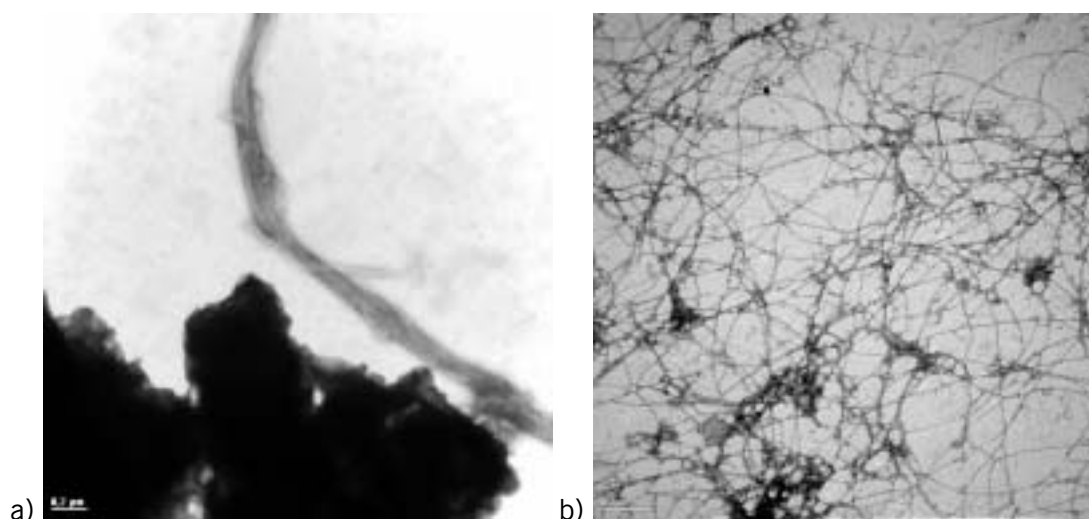


Figura 9. Micrografías, obtenidas mediante TEM con tinción negativa, de la muestra B. La barra corresponde a 0,2 μ m en ambos casos. a) muestra un haz de fibras, mientras que en b) se observan fibras aisladas.

Ambas preparaciones fueron evaluadas, de forma paralela, mediante un ensayo biológico de viabilidad celular con células PC12 utilizando concentraciones variables de β (1-42) (apartado 4.1.2.2), obteniendo así una curva dosis-respuesta para ambas preparaciones.

A pesar de la similitud de ambas muestras a nivel microscópico y del mejor comportamiento durante el proceso de solubilización de la muestra A, los resultados biológicos obtenidos en el apartado 4.1.2.2.1 muestran que β (1-42) preparado según el método B presenta un comportamiento de citotoxicidad más coherente y reproducible que

2 Elección, manipulación y síntesis de la proteína A β

la muestra obtenida según el método A. Por este motivo se adoptó el método B, con las modificaciones que se detallan en el apartado 2.2.2.2.4, para la preparación de todas las muestras utilizadas en ensayos biológicos a partir de este punto.

2.2.2.2.4 Método de disolución de $\beta(1-42)$ estándar (*método B modificado*)

Para facilitar la disolución del péptido se redujo la concentración final de $\beta(1-42)$ a 40 μM (solubilidad cinética encontrada en el apartado 2.2.2.2.2). Además, se decidió no centrifugar las muestras aunque presentaron un aspecto turbio en la mayoría de los casos. A pesar de que de forma ideal es preferible partir de una disolución, los precipitados observados son, muy probablemente, estructuras amorfas[♦], que pueden por tanto redisolverse y participar en el equilibrio de formación de fibras amiloides.

Otro punto a favor de no eliminar el precipitado es que este proceso puede conducir a diferencias en la concentración de A β de las distintas muestras. En el caso de las mezclas de A β e inhibidores la variabilidad puede ser aún mayor debido a los posibles cambios en la solubilidad de A β , obligando a la cuantificación de todas las muestras.

El uso de TEM permitió comprobar que el *método B modificado* proporciona fibras amiloides típicas (ver Figura 10), similares a las observadas en la muestra preparada utilizando el método B.

La verificación de la validez del *método B modificado* se realizó comparando la curva dosis-respuesta obtenida con el péptido preparado según el protocolo del apartado 8.2.1.2.3 con la curva obtenida con el *método B* (apartado 8.2.1.2.2). De esta forma se puede comprobar que los resultados en ambos casos son muy similares.

[♦] El tratamiento disgregante asegura la ausencia de estructuras amiloides previamente a la disolución.

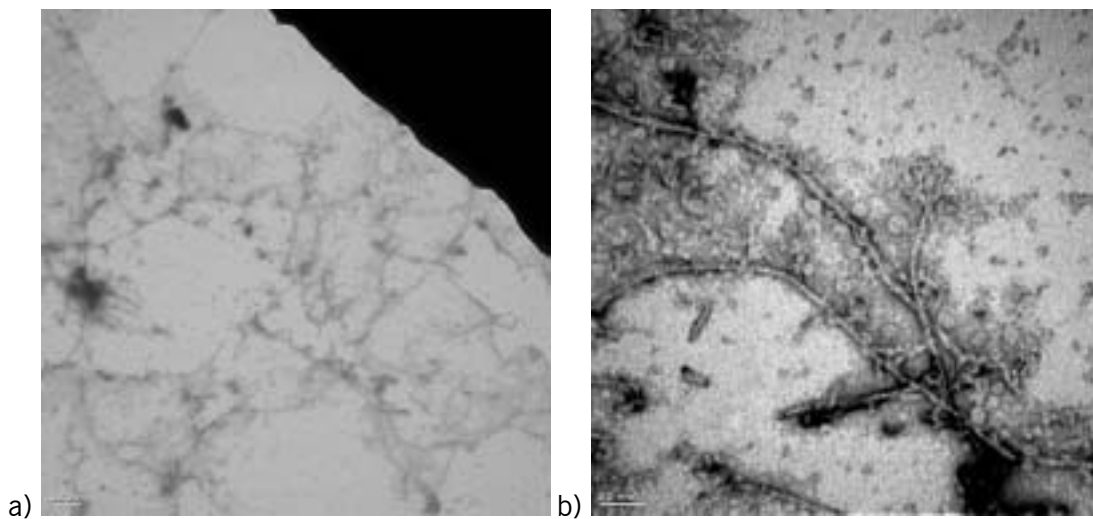


Figura 10. Micrografías obtenidas por TEM de una muestra preparada utilizando el *método B modificado*. En a) la barra corresponde a 0,1 μ M, mientras que en b) representa 50 nm.

2.2.3 Preparación de mezclas A β + inhibidor

Tras establecer un método de disolución y envejecimiento de $\beta(1-42)$ *in vitro*, es necesario diseñar el experimento de fibrillogénesis en presencia de los potenciales inhibidores.

Considerando el elevado número de variables que afectan al proceso de agregación, se puede entender la elevada importancia que tiene minimizar las variaciones entre los experimentos de referencia (aquellos que se realizan únicamente con A β) y los experimentos realizados en presencia de A β e inhibidores. Es fundamental para la comparación de resultados que la única diferencia entre las preparaciones de A β y las preparaciones de A β con inhibidores sea la presencia de éstos.

Un inhibidor de la agregación de la proteína amiloide puede actuar de tres formas: previniendo la agregación de la proteína amiloide, impidiendo el crecimiento de ésta o bien disgregando las estructuras previamente formadas.

Teniendo en cuenta este hecho, el experimento que, *a priori*, es más sensible al efecto de cualquier inhibidor de la agregación de A β es aquél que introduce el compuesto antes de que la proteína A β tenga tiempo para formar fibras, de forma que puede actuar en cualquier estadio de la fibrillogénesis.

2 Elección, manipulación y síntesis de la proteína A β

Un segundo experimento, *a priori* menos sensible, consiste en añadir el potencial inhibidor cuando A β ya ha formado fibras. De esta forma, sólo aquellos inhibidores con capacidad disruptora de las estructuras amiloides pueden reducir el contenido de fibras, mostrando por tanto capacidad para disminuir la toxicidad de la proteína A β .

El experimento más sensible permite la identificación de aquellos compuestos que, mediante cualquier mecanismo, sean capaces de interferir en el proceso de formación de fibras amiloides de A β . Por lo tanto, este método nos permitirá detectar un mayor número de moléculas con actividad biológica. La realización del segundo experimento puede ser útil para perfilar tanto el mecanismo de acción de los inhibidores ensayados como para darnos una idea de su potencia.

2.2.3.1 Experimento de alteración del proceso de fibrilogénesis

La mezcla de proteína A β con el inhibidor antes de que ésta inicie el proceso de agregación requiere la preparación de una mezcla íntima de A β e inhibidor antes de la disolución. Esto se puede realizar mezclando ambos sólidos y disolviéndolos posteriormente, o bien disolviendo A β en una disolución del inhibidor.

Ninguna de estas dos opciones parece totalmente adecuada, ya que tanto la manipulación directa del sólido (trabajamos con cantidades del orden de microgramos) como la disolución del inhibidor en el medio acuoso inicial (un volumen muy reducido de NaOH 10 mM) presentan diversos problemas técnicos. Por este motivo se decidió preparar la mezcla a partir de una disolución concentrada de inhibidor en agua, añadirla a una alícuota de A β y liofilizar la mezcla resultante en un periodo de tiempo breve. Previamente a su uso, la preparación se somete a un tratamiento disgregante con lo que se consigue, además de homogeneizar la proteína A β , asegurar una mezcla íntima de ambos compuestos (ver apartado 8.2.1.1.4). Así se consigue que, al disolver la muestra en NaOH 10 mM, ya exista una mezcla homogénea de A β y el compuesto deseado, evitando que A β inicie el proceso de agregación en ausencia de inhibidor.

2.2.3.2 Experimento de disgregación de fibras de A β preformadas

La mezcla de fibras preformadas con el inhibidor puede realizarse en cualquier etapa de la formación de fibras, pero en esta tesis decidimos llevarla a cabo tras el proceso de envejecimiento habitual de la proteína A β , sin permitir que la mezcla inhibidor + fibras de A β interaccionasen durante un periodo de tiempo. Este experimento da una idea sobre si la disminución de la toxicidad en presencia de inhibidores se debe a la interferencia en el proceso de agregación de A β o bien si las moléculas ensayadas poseen capacidad disgregante[♦].

Este experimento se realiza con fibras amiloides obtenidas de forma habitual y a las que se añade posteriormente el inhibidor disuelto en agua a una concentración entre 1 y 4 mM. Una vez obtenida la mezcla, se diluye la preparación en medio de cultivo (ver apartado 8.4.2.6) y se utiliza en la realización de los ensayos biológicos (apartado 4.1.3.2.3.1).

[♦] También podrían identificarse como inhibidores aquellos compuestos con actividad protectora frente a la acción de A β y/o sus fibras, independientemente de que interfieran o no en el proceso de agregación.

2.3 Síntesis y caracterización de la proteína A β

Aunque se empezó a trabajar con péptido comercial, el elevado coste de la proteína A β (desde ~ 200 €/mg hasta más de 600 €/mg, según la procedencia comercial y la pureza deseada) hizo que nos planteáramos la síntesis en nuestro laboratorio.

2.3.1 Síntesis peptídica

La síntesis peptídica se lleva a cabo normalmente en fase sólida, lo que significa que el péptido se haya unido a un soporte polimérico sobre el que se le hace crecer. La ventaja de la fase sólida es la posibilidad de utilizar mayores excesos de reactivo sin necesidad de realizar engorrosas purificaciones en cada ciclo sintético, permitiendo tener reacciones con un mayor rendimiento⁷³.

Dentro de la síntesis de péptidos en fase sólida, podemos utilizar dos métodos sintéticos diferentes: el lineal o el convergente. La síntesis lineal se realiza elongando el péptido en un aminoácido por ciclo (Figura 12), mientras que en la síntesis convergente se acoplan fragmentos peptídicos convenientemente protegidos (Figura 11).

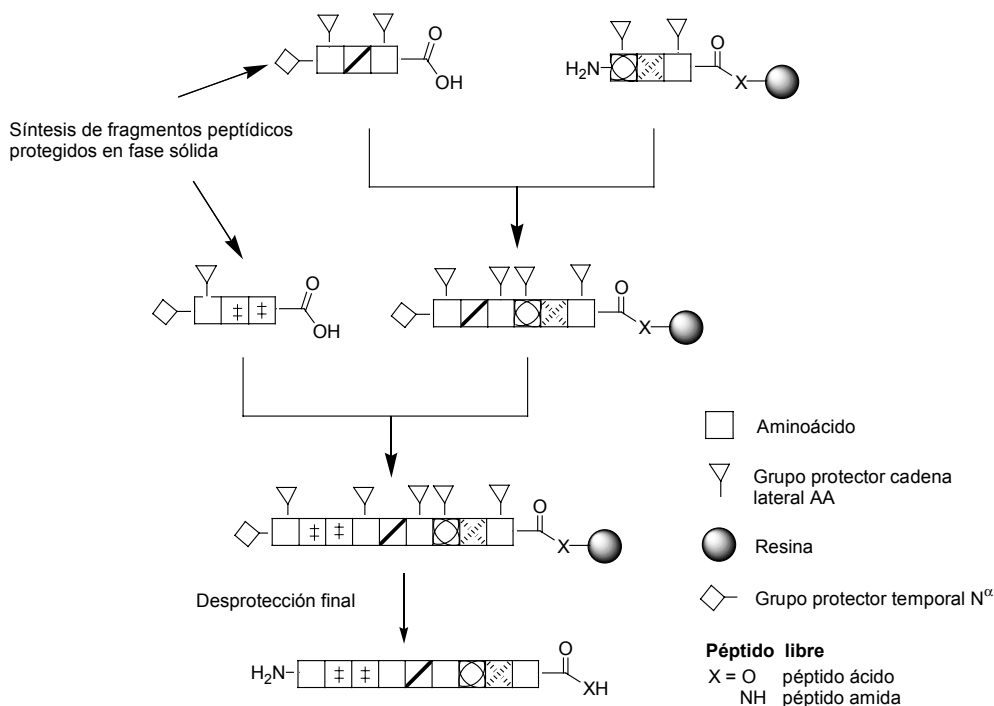


Figura 11. Etapas básicas en la estrategia de síntesis convergente de péptidos en fase sólida.

⁷³ Albericio, F.; Lloyd-Williams, P.; Giralt, E. *Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins*, Ed. CRC Press LLC, Florida 1997.

2 Elección, manipulación y síntesis de la proteína Aβ

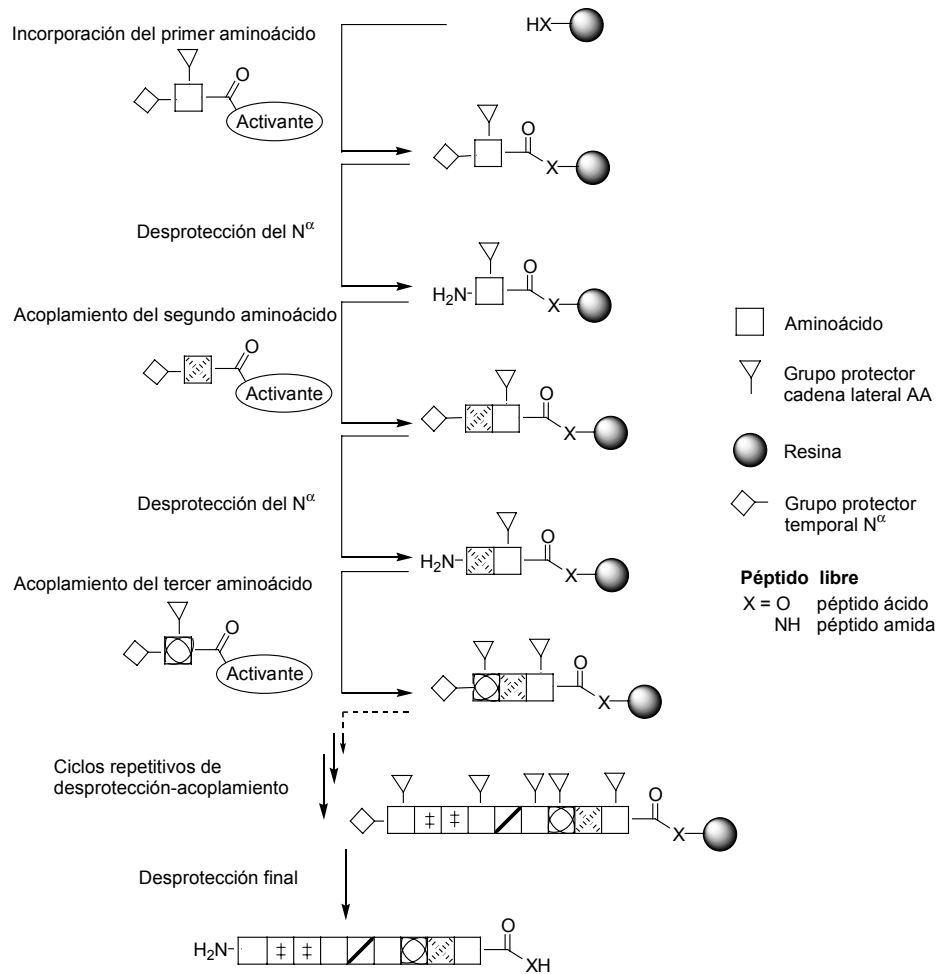


Figura 12. Etapas básicas en la estrategia de síntesis lineal de péptidos en fase sólida.

La síntesis lineal se utiliza de forma rutinaria con péptidos de tamaño medio (hasta ~50 aminoácidos) que no presentan complicaciones adicionales, mientras que la convergente se reserva para péptidos mayores o de secuencia repetitiva y péptidos que presentan dificultades sintéticas durante la elongación de la cadena (ver apartado 2.3.5.2). La elección viene determinada fundamentalmente por la necesidad de minimizar la presencia de péptidos de deleción* y, por tanto, facilitar la purificación final. Con la estrategia convergente el control de la reacción es mayor y los péptidos de deleción son más fáciles de separar (en cada ciclo se condensan fragmentos en lugar de aminoácidos). La importancia de los péptidos de deleción es mayor en péptidos de talla grande (es más probable que se generen) y en poliaminoácidos y, debido a la similitud entre el producto y dichos péptidos en estos casos, la purificación es muy difícil, siendo, por tanto, interesante utilizar la síntesis convergente.

* Los péptidos de deleción se forman durante la síntesis de un péptido debido a la no incorporación de uno o más aminoácidos en alguno de los ciclos.

2 Elección, manipulación y síntesis de la proteína Aβ

De forma ideal, la síntesis de péptidos en fase sólida se basa en la utilización de protectores ortogonales, es decir, protectores cuya escisión se realiza de forma selectiva, tal y como se muestra en la Figura 13.

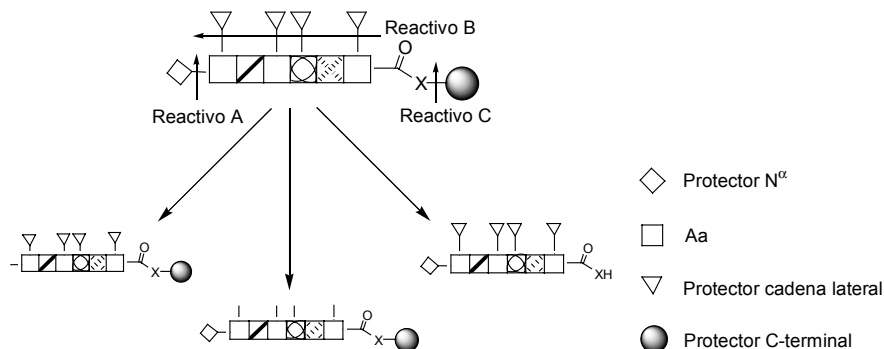


Figura 13. Ejemplo de protectores ortogonales.

Normalmente se utilizan dos estrategias diferentes en la síntesis peptídica, según los protectores temporales (protectores del extremo N-terminal) y permanentes (protectores de las cadenas laterales y el extremo C-terminal) en los que se basa: la **estrategia Boc/Bencilo** (Boc/Bzl) protege el grupo α -amino de forma temporal con el grupo *tert*-butoxicarbonilo (Boc), el cual se elimina en cada ciclo mediante una acidólisis (por ejemplo con 33% TFA en DCM), mientras que las cadenas laterales se protegen con grupos tipo bencilo (Bzl) de carácter permanente, que se liberan en presencia de HF_{anh} (Figura 14). La estrategia Boc/Bzl clásica no cumple los requisitos para ser ortogonal, ya que la desprotección de los grupos laterales tipo bencilo se realiza normalmente de forma simultánea junto con la escisión de la peptidilresina, e implica la desprotección del grupo α -amino (para escindir la peptidilresina de forma selectiva es necesario el uso de resinas o espaciadores estables en condiciones ácidas).

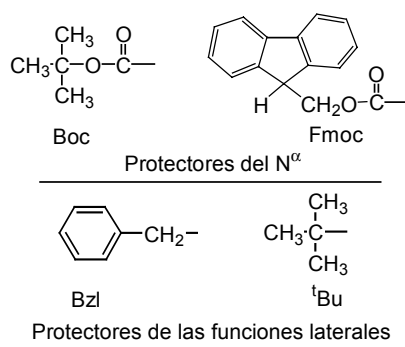


Figura 14. Grupos protectores habituales en la síntesis de péptidos.

En la **estrategia Fmoc/^tBu** el grupo α -amino se encuentra protegido con el grupo 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc), que se elimina en presencia de bases (por ejemplo con 20% piperidina en DMF) siguiendo un mecanismo de β -eliminación, mientras que las cadenas laterales se protegen de forma permanente con grupos tipo *tert*-butilo (^tBu), que puede eliminarse en presencia de ácidos como el TFA (Figura 14).

2.3.2 Síntesis de la proteína $\beta(1-42)$

La primera variable que se consideró para la obtención de $\beta(1-42)$ fue la posibilidad de realizar una síntesis peptídica lineal (introduciendo los 42 aminoácidos de forma secuencial), frente a la opción de llevar a cabo una síntesis convergente.

La ventaja que ofrece la síntesis lineal es que se puede realizar, de forma totalmente automatizada, en nuestro laboratorio, realizando reacoplamiento en los puntos más críticos^{74,75,76} y en un periodo de tiempo breve. La síntesis convergente, en cambio, exige la síntesis y purificación de fragmentos peptídicos, lo que puede ser largo y tedioso: la secuencia A β no presenta residuos Gly o Pro^{*} convenientemente situados para delimitar fragmentos peptídicos protegidos de tamaño razonable (~10 residuos)⁷⁷ solubles en condiciones habituales de química convergente. Además, en el caso concreto de $\beta(1-42)$, la bibliografía describe problemas de solubilidad de los fragmentos y reacciones secundarias diversas que aún no se han solventado completamente⁷⁸. La utilización de métodos clásicos de síntesis convergente rinde, según Sidorova y colaboradores⁷⁹, crudos poco satisfactorios.

⁷⁴ Penke, B. Comunicación personal. El laboratorio del Dr. Penke lleva años sintetizando proteína A β , tanto $\beta(1-40)$ como $\beta(1-42)$ y sus fragmentos, mediante el uso de síntesis lineal^{75,76}. Durante una visita a su laboratorio en el departamento de Química Médica de la Universidad de Szeged (Hungría) nos comunicó el protocolo que utilizan en su laboratorio de forma habitual para la síntesis de A β , además de proporcionarnos algunos consejos prácticos sobre la manipulación, tanto del crudo como del péptido purificado.

⁷⁵ Szabo, Z.; Jost, K.; Soos, K.; Zarándi, M.; Kiss, J.T.; Penke, D. *J. Mol. Struct.* **1999**, 480-481, 481-487.

⁷⁶ Fulop, L.; Penke, B.; Zarandi, M. *J. Pept. Sci.* **2001**, 7, 397-401.

* Gly y Pro son los únicos aminoácidos naturales que situados en el fragmento C-terminal no experimentan racemización parcial al ser activados durante la condensación de fragmentos en la síntesis convergente.

⁷⁷ Sakakibara, S. *Biopolymers* **1999**, 51, 279-296.

⁷⁸ Inui, T.; Nishio, H.; Bódi, J.; Nishiuchi, Y.; Kimura, T. *Pept. New Millennium, Proc. Am. Pept. Sym., 16th, Minneapolis*, **1999**, 715-716.

⁷⁹ Sidorova, M. V.; Molokoedov, A.S.; Ovchinnikov, M. V.; Bespalova, Z. D.; Kudryavtseva, E. V.; Rubina, A. Y.; Bushuev, V. N.; Schmidt, M.; Klose, A. *Mendeleev Commun.* **1996**, 232-235.

2 Elección, manipulación y síntesis de la proteína A β

Por otro lado, la ventaja de la síntesis convergente se pone de manifiesto en la etapa de purificación. Las secuencias obtenidas mediante síntesis lineal acumulan un elevado número de impurezas peptídicas por delección, a concentraciones más o menos bajas. En cambio, la síntesis convergente se basa en la obtención de fragmentos pequeños, que pueden ser purificados de manera más sencilla como paso previo al acoplamiento de fragmentos. El producto final, obtenido por condensación de fragmentos, contiene como impurezas péptidos que difieren en 5-10 aminoácidos del producto deseado, facilitando la purificación de éste.

El límite de la síntesis lineal depende tanto del rendimiento de las reacciones de elongación de la cadena peptídica como de la capacidad de purificar el péptido deseado en el crudo resultante, situándose dicho límite en torno a los 60 residuos⁷⁷. En el caso de las secuencias problemáticas (secuencias β -ramificadas, hidrofóbicas, con tendencia a agregar, baja solubilidad, equilibrios estructurales, etc.) este valor se ve reducido. La caracterización cromatográfica de la proteína A β , y por consiguiente su purificación, resultan muy complejas debido a la tendencia a agregar que presenta, lo que se traduce en una elevada dificultad sintética.

Las purificaciones más o menos efectivas de A β descritas requieren condiciones poco habituales en un laboratorio de síntesis de péptidos (temperaturas muy elevadas, ≥ 60 °C, o columnas de poliestirenodivinilbenceno (PLRP) a pH básico, utilizando tampon Tris⁴⁴, fosfato o amonio⁷⁹, o columnas de polihidroxietilo con HFIP como aditivo⁸⁰). Además, los resultados de dichas purificaciones dependen de la calidad del crudo utilizado, por lo que no existe un consenso sobre la metodología más adecuada. Un ejemplo: $\beta(1-40)$ se puede eluir satisfactoriamente en ACN/H₂O con TFA utilizando una columna C₄ a T_{amb}, pero la presencia de $\beta(1-42)$ hace imposible la separación cromatográfica de ambos⁴⁴. Todo esto hace necesario optimizar un método analítico antes de poder plantearnos la purificación de crudos de A β utilizando columnas preparativas.

En primer lugar se decidió abordar una síntesis lineal. El objetivo de esta síntesis era determinar la posibilidad de sintetizar y purificar A β de forma satisfactoria.

⁸⁰ Catálogo Western Analytical Products, Inc., 1999.

2.3.2.1 Protocolo básico de síntesis de β (1-42)

La resina *p*-metilbenzhidrilamina (*p*-MBHA) es uno de los múltiples soportes utilizados para el crecimiento de A β , con resultados aceptables⁸¹. La utilización directa de este polímero (sin el uso de espaciadores) rinde el extremo C-terminal del péptido en forma de carboxiamida, como se muestra en la Figura 15.

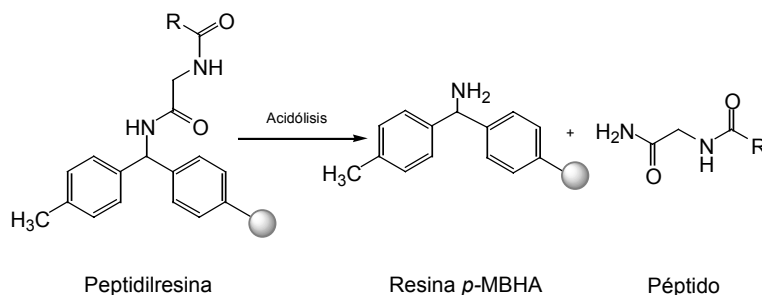


Figura 15. Reacción de escisión mediante acidólisis de un péptido anclado a la resina *p*-MBHA (peptidilresina) para dar el péptido, en forma de carboxiamida, y la resina *p*-MBHA.

La resina *p*-MBHA comercial se presenta habitualmente con una funcionalización de $\sim 0,7$ mmol/g. Por ello, y debido a la elevada tendencia a formar agregados mostrada por las proteínas amiloides, es preferible reducir dicha funcionalidad a valores comprendidos entre 0,1 y 0,3 mmol/g.

Los grupos protectores de las cadenas laterales utilizados habitualmente en la síntesis de A β son los convencionales en la estrategia de protección Boc/Bzl (el grupo Bzl para Glu y Ser, el grupo 2-clorobenzoxycarbonilo, ClZ, para Lys, el grupo ciclohexilo, cHex, para Asp y el grupo 2-bromobenzoxycarbonilo, BrZ, para Tyr, ver Figura 16) y la elongación de la peptidilresina se realiza preferiblemente utilizando un sintetizador automático para minimizar el tiempo de síntesis. La región transmembranal (desde Ala³⁰ hasta Ile⁴¹) es doblemente acilada de forma sistemática para minimizar las posibles deleciones.

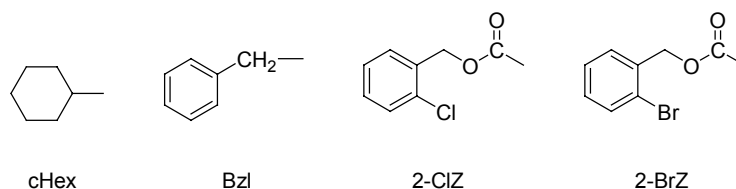


Figura 16. Estructura de los grupos protectores de la cadena lateral utilizados en la estrategia Boc/Bzl empleada en la síntesis de β (1-42).

⁸¹ Penke, B. Comunicación personal.

2 Elección, manipulación y síntesis de la proteína A β

La escisión de la peptidilresina se realiza de forma convencional, utilizando HF y anisol, mientras que la purificación se lleva a cabo en una columna C₈, utilizando como eluyentes ACN/H₂O con un 0,1% TFA. El crudo recién obtenido se disuelve en DMSO y se purifica en un periodo de tiempo breve (horas) para prevenir complicaciones cromatográficas⁸¹.

2.3.2.2 Síntesis 01-BA del péptido $\beta(1-42)$

La síntesis de $\beta(1-42)$, en el caso de la peptidilresina 01-BA, se realiza sobre resina *p*-MBHA (funcionalización 0,16 mmol Boc-Ala/g resina), utilizando un sintetizador automático, esquema de protección Boc/Bzl y activación del grupo ácido carboxílico como anhídrido simétrico, como se muestra en la Figura 17 (apartado 8.2.3).

La peptidilresina obtenida se escinde en pequeñas porciones para su caracterización, asignando números consecutivos a las diferentes fracciones obtenidas en cada escisión (01-BA-01, 01-BA-02, etc.).

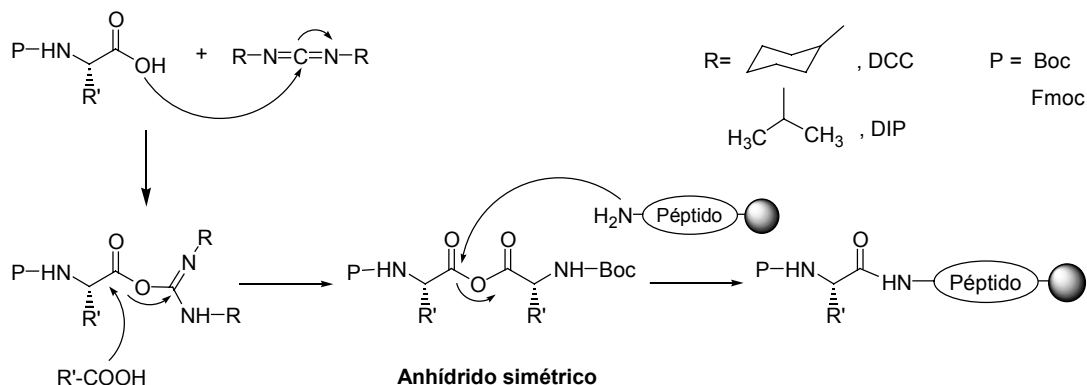


Figura 17. Mecanismo de formación de un enlace peptídico. Activación mediante la formación de un anhídrido simétrico.

La caracterización del péptido se realiza por espectrometría de masas MALDI-TOF (apartado 8.1.3.5), la cual muestra una señal poco intensa (similar a la que se observa en el caso de A β comercial) cuya masa concuerda con la del péptido deseado protonado ($[M+H]=4514$ uma), acompañada de dos señales minoritarias (correspondientes al péptido oxidado, 4530 uma, y a una pérdida de 17 unidades de masa).

Debido a la naturaleza de A β , tanto la caracterización del péptido mediante cromatografía en fase reversa en diferentes condiciones (ver apartado 2.3.3.2), como la

caracterización utilizando análisis de aminoácidos, no se pudieron realizar de forma satisfactoria (apartado 8.2.3.1).

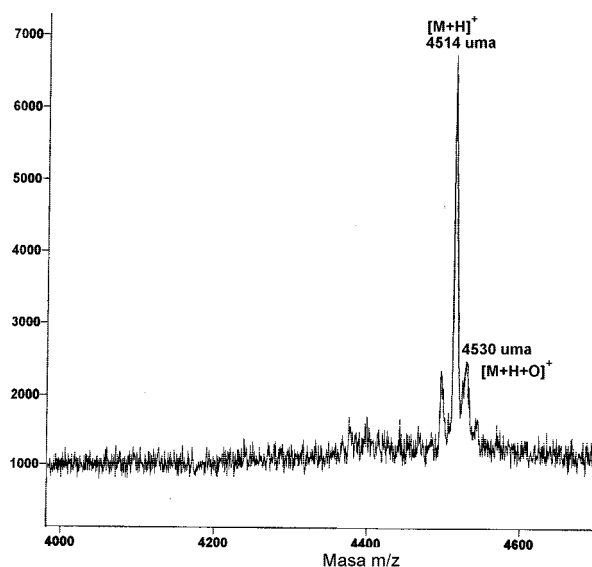


Figura 18. Espectro de masas MALDI-TOF de 01-BA-05.

Las características de A β hacen que la hidrólisis y posterior análisis de aminoácidos no se ajusten, incluso en los péptidos comerciales, al comportamiento ideal, dando valores dispares para algunos aminoácidos³⁴. Por este motivo los AAA de crudos de A β se han utilizado únicamente, en la presente tesis, como herramienta para cuantificar, de forma aproximada, el contenido peptídico de las diferentes muestras de A β . La caracterización mediante AAA no ha sido posible en ningún caso, a pesar de introducir variaciones en las condiciones de hidrólisis tales como aumentar/disminuir el tiempo, variar la temperatura (hidrólisis a 110° durante 2 días), utilizar TFA para aumentar la solubilidad de A β , etc.

2.3.2.3 Síntesis 02-BA del péptido $\beta(1-42)$

La segunda síntesis de A β en nuestro laboratorio se realizó también de forma automática, utilizando la estrategia de protección Boc/Bzl, pero usando como agente activante una sal de uronio (TBTU) y neutralización *in-situ*[♦], como se muestra en la Figura 19.

[♦] En la estrategia Boc/Bzl, tras la desprotección del N^α, se lleva a cabo una etapa de neutralización para obtener el grupo amino libre. En la neutralización *in-situ* el proceso de neutralización de la peptidilresina se realiza simultáneamente al acoplamiento, de forma que el grupo amino libre reacciona, a medida que se va formando, con el siguiente aminoácido, evitando posibles reacciones secundarias.

2 Elección, manipulación y síntesis de la proteína A β

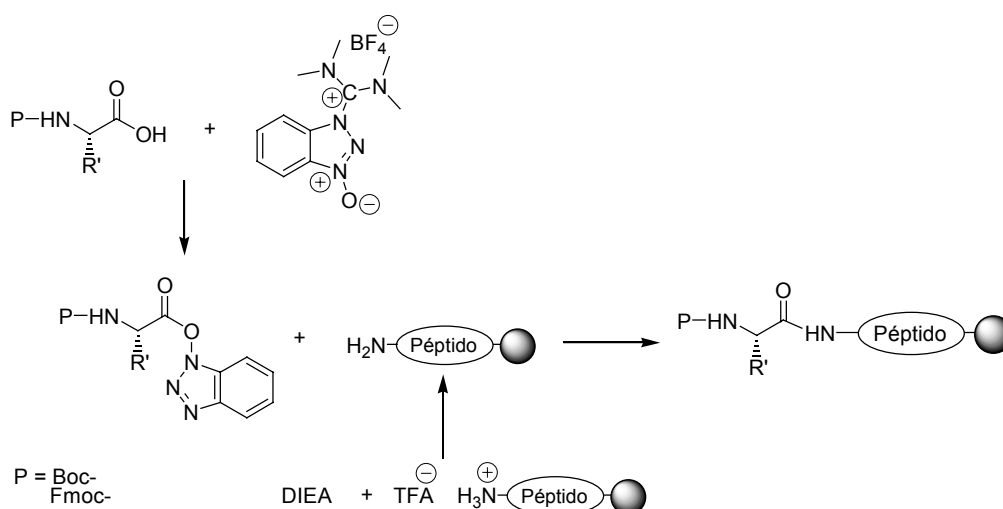


Figura 19. Mecanismo de formación de un enlace peptídico utilizando como agente de acoplamiento TBTU y neutralización *in-situ*.

El péptido se elonga sobre resina *p*-MBHA (funcionalización 0,28 mmol Boc-Ala/g resina) para obtener la peptidilresina O2-BA. Pequeñas porciones de O2-BA se someten a acidólisis para su caracterización.

Nuevamente, e igual que en el caso de O1-BA, la caracterización del péptido se realiza por espectrometría de masas MALDI-TOF (apartado 8.1.3.5), la cual muestra una única señal cuya masa concuerda con la del péptido deseado (4514 uma). La caracterización también se intentó mediante cromatografía en fase reversa utilizando diversas condiciones (ver apartado 2.3.3.2) y análisis de aminoácidos, obteniendo resultados equiparables a los observados para O1-BA (8.2.3.2).

2.3.3 Caracterización cromatográfica de A β

Tanto el DMSO como el TFA y el HFIP se encuentran descritos como disolventes eficaces de A β , pero el TFA no resulta un disolvente adecuado para la disolución y manipulación rutinaria de muestras cromatográficas debido a su carácter corrosivo. También se conoce la mayor solubilidad de A β en medios básicos (NH₃(aq), tampón

fosfato, etc.) que en disolventes acuosos neutros o ácidos⁸², pero la elución a valores de pH básicos requiere la utilización de columnas diferentes a las habituales[♦].

Los primeros análisis cromatográficos se realizaron disolviendo el crudo en DMSO, utilizando TFA únicamente para disgregar la muestra (el disgregante se elimina por evaporación bajo corriente de N₂).

Esta forma de disolver los crudos de $\beta(1-42)$, a pesar de rendir inicialmente cromatogramas aceptables (ver Figura 20), mostró no ser reproducible y condujo a problemas de precipitación de A β en el sistema cromatográfico.

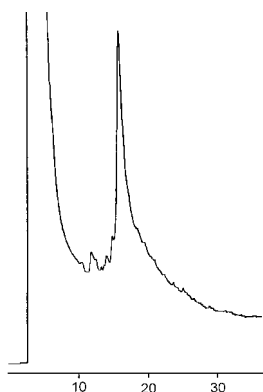


Figura 20. Cromatograma de 01-BA-05. 0,8 mg de crudo recién obtenido[♦] y disgregado con TFA fueron disueltos en 150 μ L de DMSO y se analizaron, utilizando un inyector automático, 45 μ L de disolución en una columna Nucleosil C₄. El gradiente se inicia con un isocrático a 30% de B durante 5 min, y posteriormente de 30% a 65% de B en 30 min, en 1 min a 100% de B e isocrático 10 min. A = H₂O con 0,045% TFA, B = ACN con 0,036% TFA. Detección a 220 nm.

Teniendo en cuenta que 01-BA-05 es un crudo de un péptido con elevada tendencia a agregar, como es A β , podemos afirmar que la Figura 20 muestra un cromatograma aceptable para un péptido de 42 aminoácidos. Desafortunadamente, durante la realización de ésta y otras pruebas en condiciones similares, se pudieron observar problemas de precipitación de producto en el sistema cromatográfico (apartado 2.3.3.1), acompañados además de falta de reproducibilidad en el análisis (la repetición del análisis de 01-BA-05 en condiciones similares varias semanas después de su escisión de la peptidilresina dio lugar a cromatogramas más complejos, con señales no consistentes durante el tiempo,

⁸² Fukuda, H.; Shimizu, T.; Nakajima, M.; Mori, H.; Shirasawa, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, 9, 953-956.

[♦] Las columnas más utilizadas en la cromatografía de fase reversa están constituidas por un relleno de sílica derivatizado con cadenas hidrocarbonadas, por lo que se degradan a valores de pH básicos.
[♦] El hecho de que el crudo esté recién sintetizado parece un factor importante, ya que posteriores análisis del mismo crudo en condiciones equivalentes muestran cromatogramas con señales más amplias.

2 Elección, manipulación y síntesis de la proteína A β

como muestra la Figura 21). Debido a este comportamiento no reproducible y a los problemas de precipitación de A β en el sistema cromatográfico se exploraron nuevas opciones en busca de mejores condiciones, tanto a escala analítica como preparativa.

La utilización de HFIP en lugar de DMSO resultó aún más infructuosa si cabe, rindiendo, además de los problemas mencionados, cromatogramas totalmente irreproducibles con señales múltiples (no se muestran).

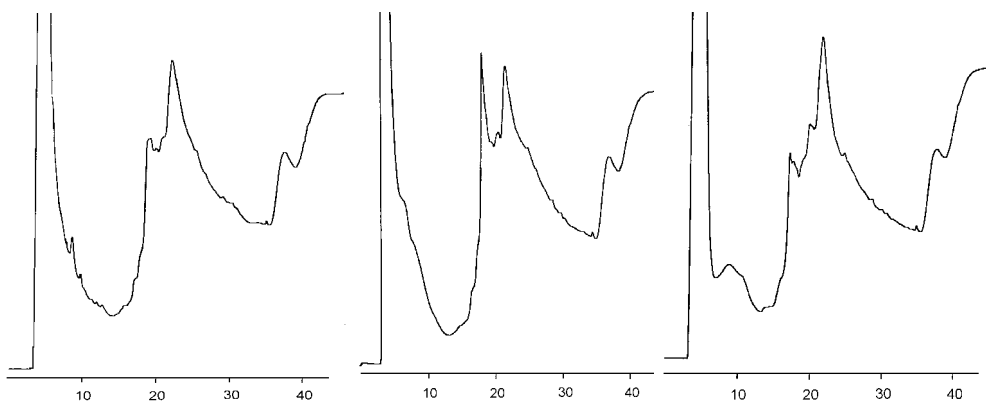


Figura 21. Cromatogramas consecutivos de 01-BA-05. 2 mg de crudo, 2 meses después de su síntesis, fueron disueltos en 200 μ L de DMSO (previamente se trató con TFA y se eliminó éste bajo corriente de N₂ con el fin de disgregar el péptido). Los tres cromatogramas corresponden a análisis consecutivos de la misma preparación realizados en un periodo de 3 h. Inyector manual utilizando una columna Nucleosil-C₄. El gradiente usado es de 20% a 50% de B en 30 min, en 5 min a 100% de B e isocrático 10 min. A = H₂O con 0,1% TFA, B = ACN con 0,1% TFA. Detección a 220 nm.

2.3.3.1 Pruebas de solubilidad de A β para su análisis cromatográfico

La intratabilidad del crudo obtenido en los intentos de síntesis de β (1-42) hizo necesaria la realización de pruebas de solubilidad con el fin de determinar el medio más adecuado tanto para la disolución inicial del péptido, como para el análisis cromatográfico en sí (eluyentes y líquido de limpieza del sistema de inyección[♦]).

Durante la realización de estos experimentos se observó un aumento de la presión del sistema cromatográfico y la aparición de *picos fantasma* (señales no atribuibles a la muestra que analizada). Una de las posibles causas de este comportamiento anómalo es la precipitación del péptido durante el análisis, bien sea en el sistema de inyección o en la columna, debido a la baja solubilidad de A β .

[♦] En los inyectores automáticos utilizados se hace servir un disolvente para limpiar el sistema de inyección tras introducir la muestra en el sistema cromatográfico.

El estudio de la estabilidad de la disolución de A β en DMSO en varios disolventes permitió determinar el más apropiado para limpiar el sistema de inyección tras el análisis de A β , como se detalla en el siguiente apartado.

2.3.3.1.1 Ensayos de dilución

Una fracción del crudo 01-BA-05 se disuelve en DMSO (0,41 mg en 200 μ L). Para ello se disgregó la muestra utilizando TFA (200 μ L), se evaporó el TFA bajo corriente de N₂ y por último se añadió DMSO (200 μ L). La fracción de péptido insoluble se eliminó por centrifugación. Esta disolución se diluyó en una proporción 1:3 en diferentes disolventes y se evaluó visualmente la aparición de turbidez y/o fibras. Tanto en H₂O como en 10% AcOH y en MeOH se observó la aparición de turbidez de forma inmediata. En iPrOH la aparición de turbidez a simple vista se observó transcurridos 5-10 min después de la adición de A β . Los mejores resultados se obtuvieron utilizando AcOH, con el cual se obtuvo una disolución estable a simple vista ($t > 1$ h).

La solubilidad de A β en AcOH y en H₂O se estimó a partir de una disolución saturada de 01-BA-05 en cada uno de los disolventes. Tras centrifugar ambas muestras se analizó la composición aminoacídica del sobrenadante. La solubilidad de 01-BA-05 obtenida en AcOH es \sim 200 μ M (0,9 mg/mL), mientras que en H₂O es \sim 40 μ M (0,18 mg/mL), en concordancia con los valores de solubilidad encontrados para β (1-42) comercial (apartado 2.2.2.2.2).

La utilización de AcOH como líquido de limpieza del sistema de inyección en lugar de MeOH o 10% AcOH, no consiguió eliminar los problemas cromatográficos observados (baja reproducibilidad, presión elevada, línea base con *picos fantasma*, etc.). Por este motivo se decidió utilizar sistemas de inyección manuales, los cuales permiten un mejor control del sistema de inyección tras el análisis.

2.3.3.1.2 Uso de agentes disgregantes acuosos

Debido a la tendencia a precipitar que presentan las preparaciones de A β en DMSO al ser diluidas en medios acuosos, se decidió también buscar un agente disgregante capaz de

2 Elección, manipulación y síntesis de la proteína A β

disolver la muestra y que fuese compatible con los eluyentes utilizados en la cromatografía de A β .

Los agentes digregantes peptídicos más enérgicos en medios acuosos son la urea y las sales de guanidinio (ver Figura 22). Por ello se intentó la disolución del crudo 01-BA-05 tanto en urea como en hidrocloreuro de guanidinio, obteniendo la disolución total del sólido en hidrocloreuro de guanidinio 6 M con un 10% de ácido acético tras calentar la mezcla unos minutos entre 40 y 60°C (~1 mg/mL). Esta disolución resulta estable al diluirla en medios acuosos ácidos utilizando una proporción 1/10, por lo que es compatible con el análisis cromatográfico en medio ácido utilizando inyectores manuales[♦].

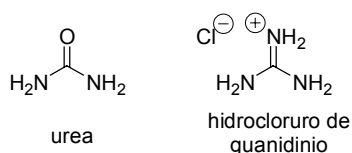


Figura 22. Estructura de algunos de los disgregantes peptídicos más efectivos.

La elevada solubilidad y la lenta cinética de agregación de A β descrita en condiciones básicas^{79,44,80} hicieron que también se intentase disolver el crudo peptídico en NH₃(aq) para su análisis. Tras disgregar 01-BA-05 en TFA, el aceite obtenido por evaporación bajo corriente de N₂ resulta soluble tanto en NH₃(aq) al 1% (pH~11) como al 0,1% (pH~10) a concentraciones sorprendentemente elevadas teniendo en cuenta la baja solubilidad de A β (> 1 mg crudo/mL en ambos casos).

2.3.3.2 Otras modificaciones en las condiciones de elución de β (1-42)

La utilización de sistemas de inyección manual e hidrocloreuro de guanidinio en ácido acético 10% como disolvente del crudo de A β no dieron resultados satisfactorios, por lo que se decidió modificar otros parámetros del sistema cromatográfico.

Las columnas de base sílica convencionales permiten generalmente utilizar un rango de pH entre 3 y 7. Fuera de este intervalo la columna se degrada, perdiendo resolución y eficacia. Por este motivo, y a pesar de la elevada solubilidad mostrada por A β en medio básico, se decidió inicialmente probar eluyentes que permitieran el uso de columnas de

[♦] El hidrocloreuro de guanidinio al ser una sal y, puesto que la concentración utilizada es muy elevada, puede dar problemas de precipitación en los sistemas de inyección automáticos.

base sílica convencionales, lo que permite realizar el proceso de escalado en nuestro laboratorio.

En una primera etapa se aumentó tanto el porcentaje de TFA como la temperatura de trabajo*. La bibliografía^{78,81,83} muestra separaciones de A β aceptables al aumentar el contenido de TFA hasta el 0,1%, y utilizar temperaturas del orden de 60°C-70°C. En nuestro caso, los experimentos realizados en estas condiciones dieron cromatogramas con señales anchas, como la mostrada en la Figura 23 (el t_R del péptido está entorno a los 20 min en estas condiciones).

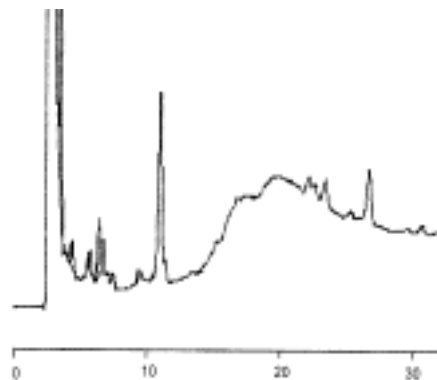


Figura 23. Cromatograma de 01-BA-05. Una muestra de crudo (más de tres meses desde su síntesis) se disuelve en una preparación de hidrocloreto de guanidinio 6 M en 10% ácido acético y se analiza utilizando un inyector manual en una columna Nucleosil-C₄ acondicionada a 60°C. El gradiente usado es de 20% a 50% de B en 30 min, en 1 min a 100% de B e isocrático 10 min. A = H₂O con 0,1% TFA, B = ACN con 0,1% TFA. Detección a 220 nm.

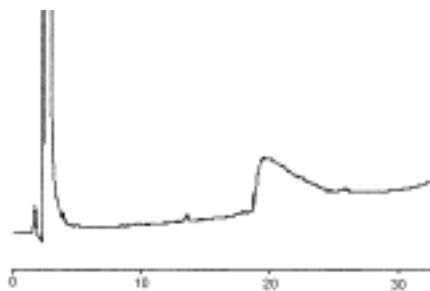


Figura 24. Cromatograma de $\beta(1-42)$ obtenido en el laboratorio del Dr. Penke. El péptido se disuelve en una preparación de hidrocloreto de guanidinio 6 M en 10% ácido acético y se inyecta en una columna Nucleosil-C₄ acondicionada a 60°C utilizando un inyector manual. El gradiente usado es de 20% a 50% de B en 30 min, en 1 min a 100% de B e isocrático 10 min. A = H₂O con 0,1% TFA, B = ACN con 0,1% TFA. Detección a 220 nm.

* El incremento en el contenido de ácido de la fase móvil puede dar lugar a una cadena peptídica con más cargas y, por tanto, más fácil de purificar. La temperatura elevada se utiliza frecuentemente con el fin de obtener perfiles cromatográficos más estrechos en el caso de péptidos con tendencia a agregar o con equilibrios conformacionales.

⁸³ Milton, S. C. F.; Milton, R. C. L.; Kates, S. A.; Glabe, C. *Letts. Pept. Sci.* **1999**, 6, 151-156.

2 Elección, manipulación y síntesis de la proteína A β

Estos resultados (disolución en hidrocloreuro de guanidinio, columna base sílica, 0,1%TFA en la fase móvil y temperaturas elevadas), aunque dan cromatogramas reproducibles, no son totalmente satisfactorios, ya que proporcionan señales de gran amplitud, muy diferentes a los obtenidos con muestras recién sintetizadas (Figura 20).

El análisis de un patrón de $\beta(1-42)$ en las mismas condiciones (Figura 24) muestra que el péptido $\beta(1-42)$ eluye al tiempo de retención observado para el crudo 01-BA-05, dando también una señal anchas (no obstante, el patrón muestra una señal más estrecha que el crudo analizado).

Para comprobar que no estábamos observando artefactos debidos a la pérdida de resolución del sistema, se analizó un patrón de $\beta(1-40)$ utilizando las mismas condiciones (ver la Figura 25).

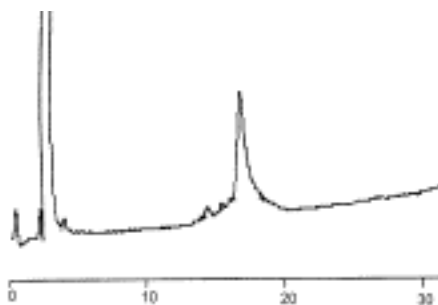


Figura 25. Cromatograma de $\beta(1-40)$ lote nº K.Soos/36/1999 eluido en las condiciones del cromatograma mostrado en la Figura 24. El péptido se disuelve en una preparación de hidrocloreuro de guanidinio 6 M en 10% ácido acético y se analiza utilizando un inyector manual en una columna Nucleosil-C₄ acondicionada a 60°C. El gradiente usado es de 20% a 50% de B en 30 min, en 1 min a 100% de B e isocrático 10 min. A = H₂O con 0,1% TFA, B = ACN con 0,1% TFA. Detección a 220 nm.

La comparación entre el perfil obtenido para $\beta(1-40)$ y el de $\beta(1-42)$ muestra que el péptido menos amiloidogénico eluye a tiempos de retención sensiblemente menores (unos 2-3 minutos antes) y rinde señales de amplitud razonable.

La baja resolución obtenida en condiciones ácidas y la mayor solubilidad del péptido $\beta(1-42)$ en medio básico (por ejemplo, NH₃(aq) diluido), impulsaron a realizar pruebas para explorar la posibilidad de disolver las muestras de análisis a pH básico.

Las columnas Nucleosil se pueden utilizar a pH neutro utilizando un tampón adecuado. En el caso de A β , la elevada solubilidad en NH₃(aq) hizo que se escogiera una

2 Elección, manipulación y síntesis de la proteína A β

disolución acuosa de acetato de amonio (pH 7,5, fase móvil A= AcONH₄ 0,01M, fase móvil B= 80% ACN y 20% de A).

Los resultados obtenidos en estas condiciones tampoco fueron satisfactorios, por lo que se decidió probar columnas compatibles un pH básico. En estas condiciones se han descrito una separaciones más eficaces de A β debido a la menor tendencia de éste a agregar a pH elevado^{44, 79,82}.

Inicialmente se probó una columna de polivinilbenceno (POLY RP-CO). Esta columna se puede utilizar en condiciones alcalinas, ya que el relleno polimérico que contiene no se degrada a valores de pH básicos. Utilizando NH₃ en los eluyentes como aditivo se logró obtener cromatogramas como el mostrado en la Figura 26, el cual recuerda al obtenido en la Figura 20.

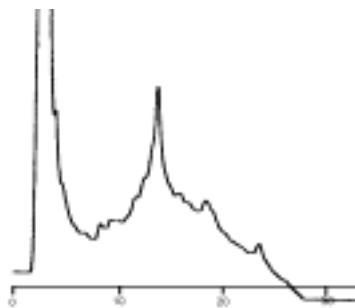


Figura 26. Cromatograma de O1-BA-07. El péptido se disuelve en el eluyente A y se analiza utilizando un inyector manual en una columna POLY RP-CO acondicionada a 60°C. El gradiente usado es de 20% a 40% de B en 30 min, en 10 min a 100% de B e isocrático 10 min. A = H₂O con 0,1% NH₃, B = ACN con 0,1% NH₃. Detección a 220 nm, flujo 0,7 mL/min.

Sin embargo, aunque los resultados obtenidos utilizando una columna POLY RP-CO y condiciones básicas parecen prometedores, la imposibilidad de escalar las condiciones de análisis hizo abandonar los intentos de purificación de β (1-42) siguiendo esta línea.

La segunda columna ensayada fue una Ultrabase. Esta columna base sílica presenta los grupos hidroxilo libres bloqueados para aumentar su estabilidad, aunque no permite condiciones tan drásticas como la POLY RP-CO. Los resultados obtenidos con la columna Ultrabase fueron menos satisfactorios, como se aprecia en la Figura 27.

2 Elección, manipulación y síntesis de la proteína A β

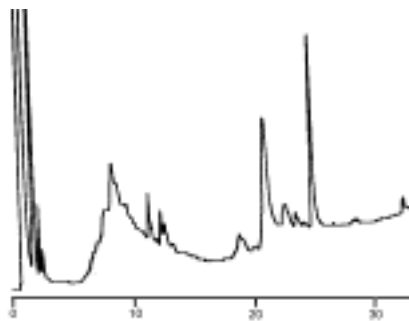


Figura 27. Cromatograma de 01-BA-07. El péptido se disuelve en el eluyente A y se analiza utilizando un inyector manual en una columna Ultrabase. El gradiente usado es de 10% a 100% de B en 30 min, en 10 min a 100% de B e isocrático 10 min. A = H₂O con 0,01% NH₃, B = ACN con 0,01% NH₃. Detección a 220 nm, flujo 1 mL/min.

2.3.4 Conclusiones de los intentos de síntesis de $\beta(1-42)$

Los intentos de síntesis de $\beta(1-42)$ realizados muestran que se pueden obtener crudos aceptables, aunque la caracterización cromatográfica y/o purificación del mismo resulta muy compleja.

Las dificultades en la etapa de purificación se deben básicamente a la elevada tendencia de $\beta(1-42)$ a eluir dando señales anchas. Los resultados obtenidos durante las pruebas cromatográficas a pH ácido parecen indicar que el tiempo que transcurre entre la síntesis de A β y su purificación es determinante en la elución del crudo de $\beta(1-42)$.

Basándonos en estos resultados se decidió abordar la síntesis y purificación de $\beta(1-40)$. En el caso de obtener un crudo de calidad similar al obtenido durante la síntesis de $\beta(1-42)$, la purificación de $\beta(1-40)$, más soluble en medios acuosos, debería ser más sencilla que la de $\beta(1-42)$, como indican los resultados cromatográficos obtenidos con los patrones de $\beta(1-40)$ y $\beta(1-42)$ analizados (apartado 2.3.3.1.2).

2.3.5 Síntesis de la proteína $\beta(1-40)$

2.3.5.1 Síntesis 03-BA del péptido $\beta(1-40)$

La única diferencia entre $\beta(1-40)$ y $\beta(1-42)$ son los dos aminoácidos del extremo C-terminal (Ile y Ala) presentes en la secuencia de éste último. Por ello, y debido a los resultados aceptables obtenidos en la síntesis de 01-BA, se decidió utilizar el mismo protocolo de síntesis que en ésta. Se optó también por intentar la obtención del extremo C-

terminal de $\beta(1-40)$ en forma de ácido carboxílico, ya que ésta es la forma natural del péptido.

El primer intento de síntesis de $\beta(1-40)$ (apartado 8.2.3.3) se realizó de forma automática utilizando la estrategia de protección Boc/Bzl (activación por anhídrido simétrico, Figura 17) sobre resina *p*-MBHA derivatizada con el espaciador bifuncional PAM (ácido 4-(hidroximetil)fenilacético) y el primer aminoácido (Boc-Val-PAM-MBHA) 0,50 mmol/g.

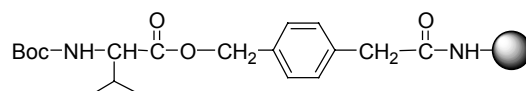


Figura 28. Estructura del espaciador Boc-Val-PAM unido a resina MBHA.

La acidólisis con HF en presencia de anisol de una alícuota de la peptidilresina da como producto un crudo soluble en mezclas ACN/H₂O. El análisis cromatográfico muestra diversas señales, como se observa en la Figura 29, ninguna de las cuales se pudo asignar, mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, al producto deseado (sólo se detectaron señales correspondientes a pesos moleculares inferiores a 2000 uma, no asignables a productos de deleción). El análisis de aminoácidos realizado a la peptidilresina 03-BA muestra que los aminoácidos mayoritarios son aquellos presentes en el extremo C-terminal (apartado 8.2.3.3).

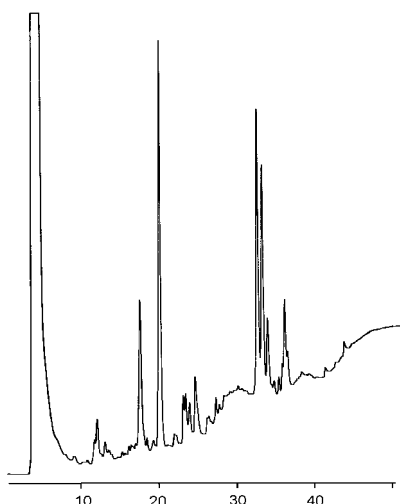


Figura 29. Cromatograma de 03-BA-02. El péptido recién sintetizado se disuelve en DMSO y se analiza utilizando un inyector manual en una columna Nucleosil-C₄ acondicionada a 60°C. El gradiente usado es de 0% a 50% de B en 30 min, en 10 min a 100% de B e isocrático 5 min. A = H₂O con 0,1% TFA, B = ACN con 0,1% TFA. Detección a 220 nm.

2 Elección, manipulación y síntesis de la proteína A β

La combinación de estos resultados parece indicar el colapso del péptido sobre la resina durante la síntesis. Este hecho, no observado previamente en la síntesis de $\beta(1-42)$ realizada en nuestro laboratorio, se describe en la bibliografía como un problema frecuente en la síntesis de la secuencia A β ⁸⁴.

2.3.5.2 Síntesis 04-BA del péptido $\beta(1-40)$

En general, el colapso del péptido durante la síntesis se produce debido a la existencia de reacciones difíciles (aminoácidos con cadenas laterales voluminosas) o bien a la agregación de la cadena peptídica sobre la resina durante el proceso de elongación, frecuente en las secuencias denominadas “difíciles”⁸⁴. La agregación se produce normalmente debido a la formación de estructuras tipo beta durante la síntesis, y da lugar a bajos rendimientos de desprotección y/o de acoplamiento en los ciclos sucesivos. En el caso de la proteína A β se puede pensar que el colapso es debido a la hidrofobicidad que presenta el extremo C-terminal (favorece el colapso hidrofóbico), junto con la elevada tendencia de esta secuencia a dar estructuras β .

Se han descrito diversas aproximaciones para prevenir el colapso intrínseco a las secuencias difíciles, como la proteína A β , algunas de las cuales pasan por el uso de diferentes soportes poliméricos⁸⁵, temperaturas elevadas⁸⁶, disolventes con mayor poder de solvatación⁸⁷, modificadores del esqueleto peptídico⁸⁴, grupos protectores de las cadenas laterales con capacidad solubilizadora⁸⁸, etc.

La segunda síntesis de $\beta(1-40)$, 04-BA (apartado 8.2.3.4) se decidió realizarla utilizando el mismo protocolo utilizado en la obtención de 03-BA (apartado 2.3.5.1) pero usando como soporte una resina hidroximetil-poliestireno de funcionalización 0,68 mmol/g (la funcionalización se redujo a 0,11 mmol/g para la síntesis).

⁸⁴ Quibell, M.; Johnson, T.; Turnell, W. G. *Innovation Perspect. Solid-Phase Synth. Peptides. Peptides, Proteins and Nucleic Acids. Biological Biomedical Applications*. **1994**, 3rd Int. Symp. Ed. Mayflower Worldwide, 653-656.

⁸⁵ Aruan, C.; Rajasekharan, V. N. *Tetrahedron*, **2000**, 56, 3005-3011.

⁸⁶ Ravinovich, A. K.; Rivier, J. E. *Peptides Chemistry, Structure and Biology. Proc. Am. Pept. Sym.*, 13th, 71-73.

⁸⁷ Zhang, L.; Goldammer, C.; Henkel, B.; Zühl, F.; Panhaus, G.; Jung, G.; Bayer, E. *Innovation Perspect. Solid-Phase Synth. Peptides. Peptides, Proteins and Nucleic Acids. Biological Biomedical Applications*. **1994**, 3rd Int. Symp. Ed. Mayflower Worldwide, 711-716.

⁸⁸ Mutter, M.; Opplieger, H.; Zier, A. *Makromol. Chem. Rapid Commun.* **1992**, 13, 151-157.

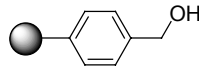


Figura 30. Estructura de la resina hidroximetil-poliestireno.

El análisis de aminoácidos de la peptidilresina 04-BA muestra una composición muy similar a la obtenida tras el acoplamiento de Ile³²♦, lo que junto con la imposibilidad de detectar el producto deseado mediante el análisis de masas MALDI-TOF parece indicar que, al igual que en 03-BA, la elongación del péptido sobre la resina se ha interrumpido, probablemente por colapso de la secuencia en crecimiento.

2.3.5.3 Síntesis 05-BA del péptido $\beta(1-40)$

La tercera síntesis de $\beta(1-40)$, 05-BA, se realizó utilizando las mismas condiciones de síntesis de 04-BA (apartado 8.2.3.5).

Nuevamente se obtuvo un crudo cuyo análisis de aminoácidos no se correspondía con el esperado, además de detectarse únicamente masas de menos de 1500 uma mediante espectrometría de masas MALDI-TOF y mostrar perfiles cromatográficos complejos.

2.3.6 Conclusiones de los intentos de síntesis de $\beta(1-40)$

La síntesis de $\beta(1-40)$, al contrario de lo que esperábamos, resulta más compleja que la de $\beta(1-42)$. En las condiciones ensayadas, las cuales son adecuadas para la síntesis de la secuencia más amiloidogénica, no es posible obtener $\beta(1-40)$, debido probablemente al colapso del péptido sobre la resina. Por este motivo, no es posible obtener $\beta(1-40)$.

Debido a la dificultad intrínseca a la síntesis y purificación de las dos secuencias de A β estudiadas, se decidió abandonar los intentos de síntesis de ambos péptidos. El esfuerzo y tiempo que requiere su obtención y purificación hacen más razonable la adquisición de A β de fuentes comerciales capaces de suministrar un único lote en cantidad y pureza adecuadas (5 mg o más)♦.

♦ Se realizó un AAA de la peptidilresina tras el acoplamiento de Ile³².

♦ La utilización de péptido comercial es una opción razonable si tenemos en cuenta que durante la presente tesis (4 años) se utilizaron en total unos 5 mg de péptido de un mismo lote para la realización de todos los experimentos descritos, a excepción de algunos ensayos preliminares.

2 Elección, manipulación y síntesis de la proteína A β

La adquisición de péptido comercializado por Peptide Institute, Inc. presenta la ventaja de ofrecer la posibilidad de adquirir lotes mayores a 10 mg de péptido, que además presenta el atractivo de provenir de una aproximación convergente.