

Tesi doctoral presentada per En/Na

Montse CRUZ GATELL

amb el títol

**"Diseño, síntesis y evaluación de inhibidores de
la proteína β -amiloide.
Desarrollo de un modelo de fibrilogénesis"**

per a l'obtenció del títol de Doctor/a en

QUÍMICA

Barcelona, 20 de novembre del 2003

Facultat de Química
Departament de Química Orgànica



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Diseño, síntesis y evaluación de inhibidores de la proteína β -amiloide.

Desarrollo de un modelo de fibrilogénesis

Montse Cruz Gatell
20 Noviembre de 2003

1 Introducción y objetivos

- 1.1 Proteínas amiloides
- 1.2 La enfermedad de Alzheimer
- 1.3 La proteína β -amiloide
- 1.4 Objetivos

2 Elección, manipulación y síntesis de la proteína A β

- 2.1 Elección de una proteína A β
- 2.2 Disolución y fibrilogénesis de A β
- 2.3 Síntesis y caracterización de la proteína A β

3 Diseño y síntesis de inhibidores de la toxicidad de A β

- 3.1 Antecedentes de inhibidores de A β
- 3.2 Diseño de inhibidores
- 3.3 Inhibidores peptídicos aparecidos recientemente en la bibliografía
- 3.4 Síntesis de inhibidores

4 Evaluación de los N-metilinhbidores

- 4.1 Ensayos biológicos
- 4.2 Estudios de microscopía electrónica de transmisión de A β en presencia de los inhibidores

5 Caracterización estructural y estudios de estabilidad de los inhibidores

- 5.1 Caracterización estructural de los N-metilinhbidores
- 5.2 Modelización asistida por ordenador
- 5.3 Resumen estructural de los péptidos estudiados y comparación con los resultados descritos en la bibliografía
- 5.4 Estudio de estabilidad a proteasas de los inhibidores

6 Agentes de tinción específicos de estructura amiloide

- 6.1 Microscopía óptica en presencia de CR
- 6.2 Estudios espectrofotométricos en presencia de CR
- 6.3 Estudios de fluorescencia en presencia de ThT
- 6.4 Resumen y conclusiones sobre los estudios con agentes de tinción específicos

7 Conclusiones

8 Capítulo Experimental

- 8.1 Materiales y Métodos
- 8.2 Elección, manipulación y síntesis de la proteína A β
- 8.3 Diseño y síntesis de inhibidores de la toxicidad de A β
- 8.4 Evaluación de los N-metilinhbidores
- 8.5 Caracterización estructural y estudios de estabilidad de los inhibidores
- 8.6 Agentes de tinción específicos de estructura amiloide

1 Introducción y objetivos

1.1 Proteínas amiloides

El término *amiloide* fue utilizado por primera vez por el médico alemán Rudolph Virchow en 1854. Estudiando un tejido cerebral de *corpora amyloacea* de aspecto macroscópico anormal (similar al descrito previamente para otros tejidos como hígado, páncreas y riñón) observó que al teñirlo con yodo adquiría un color azul pálido, el cual se transformaba en violeta tras tratar el tejido con ácido sulfúrico. Este hecho le hizo llegar a la conclusión de que la sustancia que producía la anormalidad macroscópica era celulosa, por lo que la denominó “amiloide” (del latín *amylum* y del griego *amylon*)¹.

Más tarde, en 1859, Friedreich y Kekule demostraron que el componente mayoritario de la sustancia amiloide no era un carbohidrato, como había afirmado Virchow, sino que estaba constituido por proteína. En la actualidad se sabe que existen más de 20 proteínas amiloides², cada una de las cuales asociada a una patología concreta. Algunas de dichas proteínas se depositan únicamente en un órgano, como el páncreas en el caso de la diabetes o bien el cerebro en la enfermedad de Alzheimer, mientras que otras se depositan en varios órganos y tejidos, dando lugar a las denominadas *amiloidosis sistémicas*.

Las investigaciones sobre la naturaleza de los depósitos amiloides han evolucionado junto con la aparición de nuevas técnicas. Así, la mejora de la microscopía óptica y el uso de agentes de tinción histopatológicos permitieron establecer el primer criterio para determinar la naturaleza amiloide de un depósito de proteína: la birrefringencia verde manzana. A pesar de lo que se creía inicialmente, los depósitos amiloides presentan un elevado grado de estructuración molecular, la cual se manifiesta al observarlos con luz polarizada: la anisotropía de los depósitos amiloides produce birrefringencia, que se acentúa si la muestra es teñida con Rojo Congo (CR). La unión de este colorante da lugar a la característica birrefringencia verde manzana, utilizada desde 1953 como criterio para determinar la naturaleza amiloide de un agregado.

¹ Sipe, J. D.; Cohen, A. S. *J. Struct. Biol.* **2000**, *130*, 88-98.

² Westermark, G. T. *Amyloid* **1997**, *4*, 216-218.

1 Introducción y objetivos

En 1959 se describieron por primera vez las fibras amiloides gracias el uso de la microscopía electrónica. Estas fibras son el resultado final del proceso de agregación de las proteínas amiloides y su presencia se utiliza también como criterio para afirmar que una proteína está formando una estructura de este tipo. El empleo de microscopía electrónica de transmisión (TEM) permitió a Shiraham y Cohen postular el primer modelo sobre la estructura de las fibras amiloides en 1967³. Este modelo, aún vigente, se basa en la observación de fibras de transtiretina T (TTR), y sostiene que cada fibra presenta un diámetro de 75-80 Å y se encuentran formadas por protofibras de 25-35 Å, tal y como se muestra en la Figura 1. Las protofibras se encuentran constituidas a su vez por subprotofibras de 10-15 Å.

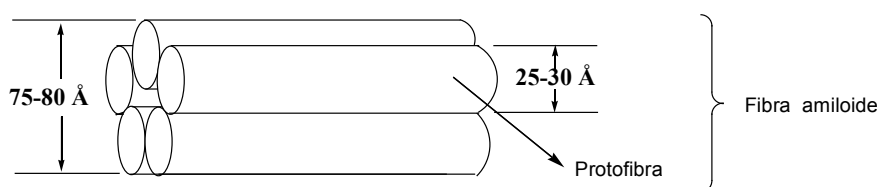


Figura 1. Representación del primer modelo de fibras amiloides de TTR propuesto por Shiraham y Cohen en 1967.

La utilización de difracción de rayos X en diversas estructuras amiloides permite ver un patrón de comportamiento común correspondiente, según el modelo de Pauling y Corey de 1951⁴, a la ordenación de la proteína en forma de lámina β -cruzada. Esta estructura presenta la cadena peptídica formando láminas β (ya sean paralelas o antiparalelas), las cuales se disponen de forma perpendicular al eje fibrilar, siendo éste paralelo a la dirección de los puentes de hidrógeno del esqueleto, como se esquematiza en la Figura 2.

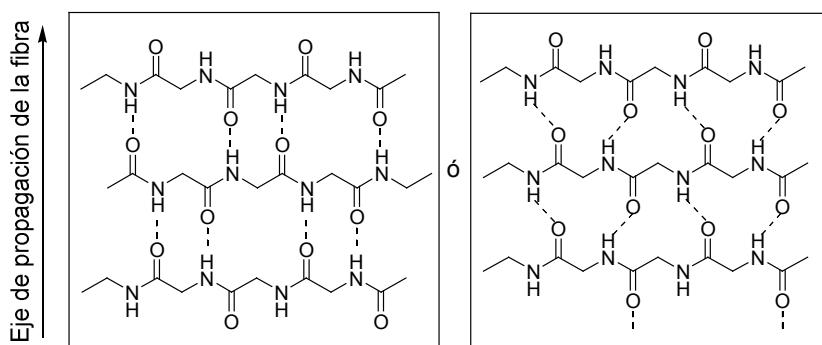


Figura 2. Modelo de proteína en forma de lámina β -cruzada: ordenación antiparalela (izquierda) y ordenación paralela (derecha).

³ Shiraham, T.; Cohen, A. *J. Cell Biol.* **1967**, *33*, 679-708.

⁴ Pauling, L.; Corey, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1951**, *37*, 729-739.

A pesar del esfuerzo realizado, la estructura tridimensional de las fibras amiloides no se ha determinado aún con exactitud. Ni los datos de resonancia magnética nuclear de estado sólido ni la difracción de rayos X permiten establecer una estructura de alta resolución, por lo que existen numerosos modelos teóricos que intentan ajustar los datos experimentales de los que se dispone a una estructura plausible. El modelo de Sunde y Blake basado en TTR⁵, utiliza datos de difracción de rayos X y propone que cada lámina β se encuentra empaquetada según un giro de 15° respecto a su vecina más próxima, formando así una hélice de láminas β . Esta hipótesis concuerda con algunos resultados de RMN en estado sólido⁶. En este modelo, cada protofibrila está constituida por cuatro láminas β paralelas.

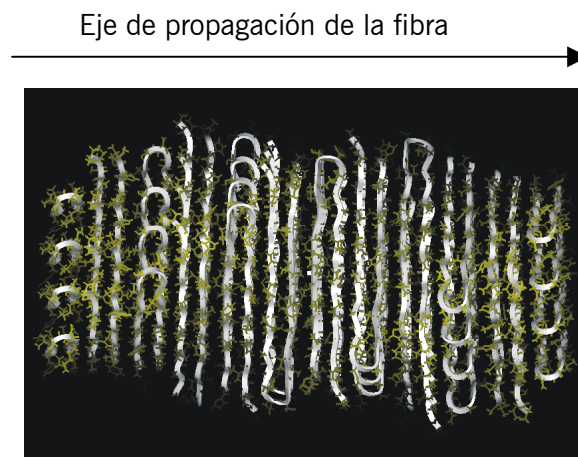


Figura 3. Modelo de proteína A β propuesto por Li y colaboradores en 1999 utilizando datos experimentales y modelaje molecular⁸.

Datos de difracción de rayos X similares a los utilizados por Sunde y Blake llevaron a Inouye y colaboradores⁷ a postular un modelo de fibra amiloide formado por monómeros de TTR apilados axialmente para dar lugar a las protofibrilas. En este modelo el monómero no sufre ningún cambio de conformación y es la interacción lateral de las protofibrilas la que da lugar a las fibras. Otros modelos más complejos combinan datos experimentales con cálculos teóricos para obtener estructuras que expliquen los resultados observados⁸.

A pesar de la falta de acuerdo sobre la organización molecular que presentan las fibras amiloides, un punto en el que coinciden la mayoría de estudios es la elevada similitud en la estructura microscópica de las fibras a las que dan lugar las proteínas

⁵ Sunde, M.; Blake, C. *Advan. Protein Chem.* **1997**, *50*, 123-159.

⁶ Lansbury, P. T.; Costa, P. R.; Griffiths, J. M.; Simon, E. J.; Auger, M.; Halverson, K. J.; Kocisko, D. A.; Hendsch, Z. S.; Ashburn, T. T.; Spencer, R. G. S. *Nat. Struct. Biol.* **1995**, *2*, 990-998.

⁷ Inouye, H.; Domingues, F. S.; Dumas, A. M.; Saraiva, M. J.; Lundgren, E.; Sandgen, E.; Kirschner, D. A. *Amyloid* **1998**, *5*, 163-174.

⁸ Li, L.; Darden, T. A.; Bartolotti, L.; Kominos, D.; Pedersen, L.G. *Biophys. J.* **1999**, *76*, 2871-2878.

1 Introducción y objetivos

amiloides, pese a estar constituidas por péptidos y proteínas de longitudes y secuencias muy variadas. Este hecho es una ventaja que se intenta aprovechar al máximo en el estudio de las proteínas amiloides ya que lleva a pensar en la posibilidad de encontrarnos frente a un mecanismo de agregación general, el conocimiento del cual facilitaría el estudio de cualquier proteína amiloide^{1,9,10}.

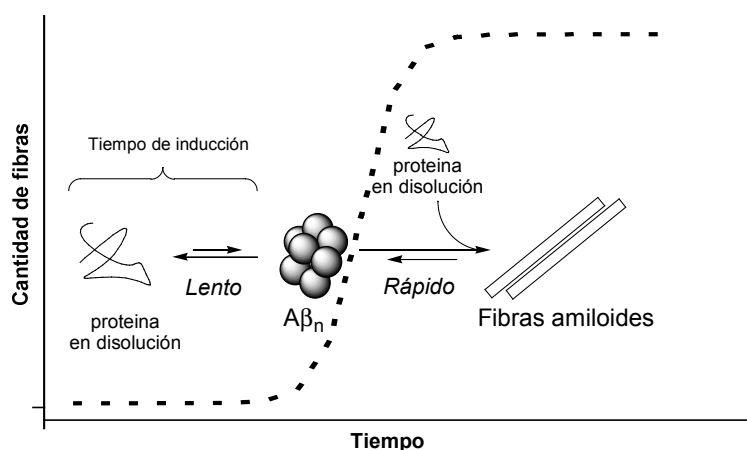


Figura 4. Mecanismo de agregación dependiente de nucleación que tiene lugar durante el proceso de envejecimiento¹¹.

El proceso de formación de las fibras amiloides, también denominado envejecimiento (*aging*) de la proteína o proceso de fibrillogénesis, tiene lugar siguiendo un mecanismo que aún no ha sido esclarecido completamente. Actualmente se acepta que dicho mecanismo es dependiente de nucleación, ya que diversos estudios han puesto de manifiesto que presenta una cinética de agregación sigmoide como la que se muestra en la Figura 4. Además, el proceso de sembrado con fibras preformadas provoca una desaparición del tiempo de inducción^{11,12}.

El mecanismo de agregación dependiente de nucleación que se muestra en la Figura 4 implica que la proteína en estado monomérico establece un equilibrio lento con estructuras oligoméricas (tiempo de inducción), las cuales, una vez formadas, dan lugar rápidamente a las fibras amiloides, ya sea mediante asociación de unidades de monómero o bien por fusión de oligómeros.

⁹ Kisilevsky, R. J. *Struct. Biol.* **2000**, *130*, 99-108.

¹⁰ Taylor, J. P.; Hardy, J.; Fischbeck, K. H. *Science* **2002**, *296*, 1991-1995.

¹¹ Jarret, J. T.; Berger, E. P.; Lansbury, P. T. *Biochemistry* **1993**, *32*, 4693-4697.

¹² Goldsbury, C. S.; Wirtz, S.; Müller, S. A.; Suderji, S.; Wicki, P.; Aebi, U.; Frey, P. J. *Struct. Biol.* **2000**, *130*, 217-231.

1.2 La enfermedad de Alzheimer

En 1907 el neurólogo alemán Alois Alzheimer describió por primera vez un nuevo tipo de demencia senil, la enfermedad de Alzheimer¹³ (AD). Este tipo de demencia senil es la más frecuente en la actualidad (entre el 50 y el 70% del total de demencias seniles diagnosticadas¹⁴), y se calcula que el número de enfermos sólo en Estados Unidos alcanza los 4 millones de personas¹⁵.

El diagnóstico inequívoco de la enfermedad de Alzheimer sólo es posible actualmente mediante el análisis *postmortem* del cerebro¹⁶: la presencia de depósitos extracelulares en forma de placas seniles de proteína β -amiloide y las acumulaciones intracelulares de estructuras filamentosas, denominadas *enredos neurofibrilares (neurofibrillary tangles)*, son las principales evidencias de este tipo de demencia, aunque únicamente los depósitos de proteína β -amiloide aparecen de forma exclusiva en los enfermos de Alzheimer. Esta observación es uno de los pilares básicos de la teoría amiloide de la enfermedad de Alzheimer, la cual afirma que la formación de placas amiloides es el detonante de los procesos bioquímicos que desembocan en la muerte neuronal y el deterioro de las capacidades cognitivas de las personas que sufren esta enfermedad^{17,18}. Esta afirmación está relacionada con la observación hecha por diversos investigadores de que únicamente las formas fibrilares de la proteína A β resultan neurotóxicas¹⁹, observándose una toxicidad inherente a los agregados amiloides, independientemente de la proteína que los constituya²⁰.

Los detractores de la hipótesis amiloide, en cambio, defienden que la aparición de placas seniles es simplemente una consecuencia de un proceso bioquímico más complejo, aunque casi toda la bibliografía coincide en las propiedades neurotóxicas de la proteína β -amiloide²¹. En la actualidad, tras los primeros ensayos fallidos con una vacuna basada en

¹³ Alzheimer, A. *Neurol. Centr.* **1906**, 23, 1129-1236.

¹⁴ Alzheimer Europe, <http://www.alzheimer-europe.org/>

¹⁵ ADEAR, Alzheimer's Disease Education and Referral Center, <http://www.alzheimers.org/>

¹⁶ Klunk, W. E. *Neurobiol. Aging* **1998**, 2, 145-147.

¹⁷ Teplow, D. B. *Amyloid* **1998**, 5, 121-142.

¹⁸ Cordell, B. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1994**, 34, 69-89.

¹⁹ Lorenzo, A.; Yankner, B. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1994**, 91, 12243-12247.

²⁰ Bucciantini, M.; Giannoni, W.; Chiti, F.; Baroni, F.; Formigli, L.; Zurdo, J.; Taddei, N.; Ramponi, G.; Dobson, C. M.; Stefani, M. *Nature* **2002**, 416, 507-511.

²¹ Iversen, L. L.; Mortishire-Smith, R. J.; Pollack, S. J.; Searman, M. S. *Biochem. J.* **1995**, 311, 1-16.

1 Introducción y objetivos

la administración de $\beta(1-42)^{22}$, los detractores vuelven a recordar el hecho de que la proteína β -amiloide parece tener un papel importante en nuestro organismo, aunque éste se desconozca con exactitud²³.

²² Furlan, R.; Brambilla, E.; Sanvito, F.; Roccatagliata, L.; Olivieri, S.; Bergami, A.; Pluchino, S.; Uccelli, A.; Comi, G.; Martino, G. *Brain* **2003**, *126*, 285-291.

²³ Koudinov, A. Electronic letters, *BMJ* **2002**, <http://bmj.com/cgi/eletters/316/7129/446>

1.3 La proteína β -amiloide

El nombre de proteína β -amiloide, frecuentemente abreviada como $A\beta$, engloba a una familia de proteínas de entre 39 y 43 residuos que son secretadas de la membrana celular tras el procesamiento de una proteína de mayor tamaño, la proteína precursora amiloide (APP). La liberación de la proteína $A\beta$ se produce por la acción secuencial de las β - y γ -secretasas sobre la proteína APP anclada a la membrana celular, como se indica en la Figura 5. Una tercera secretasa, la α -secretasa, es capaz de actuar sobre APP y dar lugar a dos fragmentos solubles²⁴. Aunque aún no se ha descubierto cuál es la función fisiológica concreta de la proteína $A\beta$, se ha visto que se encuentra a concentraciones que oscilan entre 10 y 500 pM en el líquido cerebroespinal y en el torrente sanguíneo de personas sanas, no apreciándose diferencias significativas respecto a las concentraciones observadas en los enfermos de Alzheimer. Además, se sabe que las mutaciones que comportan tanto la sobreproducción de APP como el aumento de la actividad de alguna de las secretasas implicadas en el proceso de formación de $A\beta$ pueden dar lugar al inicio prematuro o a casos agudos de la enfermedad de Alzheimer, como sucede con las personas afectadas por el síndrome de Down (el cromosoma 21 codifica la proteína APP, por lo que la trisomía de éste tiene como consecuencia la sobreexpresión de APP)^{24,25}.

La forma más abundante de la proteína $A\beta$ en el cerebro humano es la $\beta(1-40)$ ^{*}, aunque muchos autores postulan que es en realidad la forma $\beta(1-42)$ la desencadenante del proceso de formación de fibras amiloides *in vivo*, ya que esta especie presenta una mayor capacidad amiloidogénica¹¹ y es capaz de actuar como centro de nucleación de la secuencia más corta. Algunos estudios *in vitro* apuntan a que únicamente las formas agregadas de $A\beta$ son neurotóxicas^{26,27}, mientras que otros afirman que la capacidad neurotóxica de $A\beta$ es independiente del estado de agregación en que se encuentre^{28,29} y

²⁴ Sinha, S.; Lieberburg, I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, 96, 11049-11053.

²⁵ Dumery, L.; Bourdel, F.; Soussan, Y.; Fialkowsy, A.; Viale, S.; Nicolas, P.; Reboud-Ravaux, M. *Pathol. Biol.* **2001**, 49, 72-85.

^{*} La nomenclatura $\beta(1-40)$ indica entre paréntesis el primer y último residuo que constituyen la proteína (de entre los 43 posibles), siendo considerado siempre el número 1 el aspártico 672 de la proteína APP. La letra β hace referencia a la proteína $A\beta$.

²⁶ Zagorski, M. G.; Yang, J.; Shao, H.; Ma, K.; Zeng, H.; Hong, A. *Methods Enzymol.* **1999**, 309, 189-235.

²⁷ Hirakura, Y.; Satoh, Y.; Hirashima, N.; Suzuki, T.; Kagan, B. L.; Kirino, Y. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **1998**, 46, 787-794.

²⁸ Tseng, B. P.; Esler, W. P.; Clish, C. B.; Stimson, E. R.; Ghilardi, J. R.; Vinters, H. V.; Mantyh, P. W.; Lee, J. P.; Maggio, J. E. *Biochemistry* **1999**, 38, 10424-10431.

²⁹ Forloni, G.; Lucca, E.; Angeretti, N.; Torre, P. D.; Salmona, M. *J. Neurochem.* **1997**, 69, 2048-2054.

1 Introducción y objetivos

resultados aparecidos recientemente aseguran que las especies más citotóxicas son los oligómeros que se forman durante el proceso de agregación^{30,31}. Un hecho constatado es la mayor capacidad amiloidogénica que presentan algunas proteínas A β mutantes asociadas a enfermedades amiloides severas, como es el caso de la mutación en el glutámico 22 por glutamina. Éste único cambio lleva a la aparición de la denominada Hemorragia Cerebral Hereditaria con Amiloidosis, *Dutch Type* (HCHWA-D), la cual conlleva consecuencias fatales a edades relativamente tempranas (50-60 años).

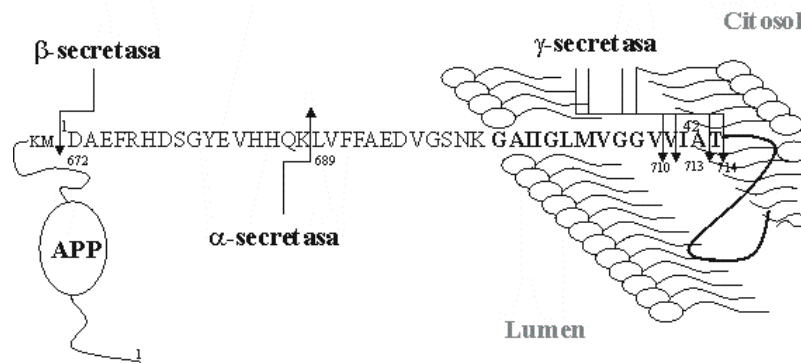


Figura 5. Esquema de las diferentes secretasas que actúan sobre APP.

El proceso de agregación y el estudio de esta enfermedad es tan complejo que algunos resultados parecen indicar incluso que la sensibilidad que presenta el cerebro *in vivo* a la proteína A β no depende únicamente de ésta, sino también depende de la edad del sujeto en el que se estudia y de la especie utilizada como modelo. Un ejemplo son los monos *rhesus* estudiados por Geula y colaboradores³². En este trabajo se muestra cómo los animales de mayor edad son mucho más sensibles a A β que sus congéneres jóvenes, mientras que también presentan resultados que parecen indicar que las ratas presentan una respuesta tóxica a A β casi nula.

³⁰ Walsh, D. M.; Klubin, I.; Fadeeva, J. V.; Rowan, M. J. Selkoe, D. J. *Biochem. Soc. Trans.* **2002**, 30, 552-557.

³¹ Stine, W. B.; Dahlgren, K. N.; Krafft, G. A.; LaDu, M. J. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 11612-11622.

³² Geula, C.; Wu, C.; Saroff, D.; Lorenzo, A.; Yuan, M.; Yanker, B. A. *Nature Med.*, **1998**, 7, 827-828.

1.4 Objetivos

La hipótesis amiloide de la enfermedad de Alzheimer fue la base, hace algunos años, para el desarrollo de una línea de investigación cuyo objetivo principal es la **obtención de pequeñas moléculas peptídicas** capaces de interferir en la formación de fibras amiloides de la proteína A β . Se pretende **reducir** de esta forma la **toxicidad de A β** . Así mismo, se quiere verificar la existencia de una **correlación** entre la presencia de **fibras** amiloides y la **neurotoxicidad** de la proteína A β .

Como pequeñas moléculas peptídicas nos planteamos inicialmente el diseño y síntesis de una serie de N-metilpéptidos con capacidad inhibitoria de la toxicidad de A β . Esta colección de compuestos, además, se enfocó de forma que permitiese identificar los factores que favorecen la interacción A β -inhibidor y el carácter de dicha interacción, estudiando entre otros aspectos el papel que juega la estereoquímica de los aminoácidos de estos inhibidores (L o D) en el reconocimiento molecular.

Se planteó correlacionar la inhibición de la toxicidad con la formación/ausencia de fibras amiloides. Para ello se decidió evaluar y utilizar algunos de los métodos descritos en la bibliografía para la detección y cuantificación de fibras amiloides.

Para la evaluación de los inhibidores, se decidió obtener un modelo simplificado del proceso de fibrillogénesis de A β que tiene lugar durante la enfermedad de Alzheimer. Dicho modelo ha de estar formado por un método de obtención de fibras amiloides y un ensayo biológico que permita evaluar los inhibidores obtenidos en nuestro laboratorio. La puesta a punto de este modelo ha de permitir ensayar, de forma paralela, la capacidad de diversos compuestos para inhibir la toxicidad de la proteína A β *in vitro*.

Para determinar los factores que realmente influyen en la inhibición se planteó llevar a cabo un estudio estructural de algunos inhibidores claves. Este estudio tiene como objetivo elucidar los rasgos básicos que conducen a la inhibición de la toxicidad de A β .

Debido al elevado coste del péptido A β y las limitaciones que comporta la adquisición comercial de A β , se decidió intentar la síntesis y purificación del péptido A β utilizando los medios disponibles en nuestro laboratorio.

1 Introducción y objetivos

Por último se planteó la puesta a punto de ensayos de estabilidad de los péptidos sintetizados frente a la acción de proteasas. Este tipo de experimentos permite predecir, de forma aproximada, la biodisponibilidad relativa de diferentes péptidos en medios biológicos, pudiéndose así extrapolar su comportamiento en condiciones *in vivo*.