

5 Caracterización estructural y estudios de estabilidad de los inhibidores

5.1 Caracterización estructural de los N-metilinhbidores

Durante el diseño de inhibidores, una de las hipótesis más importantes que se hace es que, puesto que la secuencia A β presenta una estructura de lámina β , el inhibidor interacciona con ella adoptando una conformación extendida o de tipo β . Esta hipótesis es importante ya que si la disposición del inhibidor no es extendida o de tipo β (ángulos diedros próximos a 180°), la afirmación de que el reconocimiento se realiza por una cara del péptido mientras que la otra bloquea el crecimiento de la lámina de A β no se ajustaría a la realidad (apartado 3.2.3). Además, si el péptido no adopta una conformación extendida, la equivalencia entre la secuencia original y la *retro-enantio* puede no ser aplicable (apartado 3.2.5.1).

Los N-metilaminoácidos no sólo actúan como disruptores de los puentes de H, sino que también favorecen la obtención de estructuras extendidas. Estudios previos demuestran que la introducción de este tipo de residuos promueve la disposición extendida, restringiendo enormemente las posibles estructuras¹⁵⁷.

Se utilizó la técnica de dicroísmo circular (CD) para determinar la estructura secundaria de los inhibidores más representativos, completando, en algunos casos, la información obtenida mediante esta técnica con los datos que se obtuvieron mediante espectroscopia de infrarrojo de transformada de Fourier (IR-FT). Por último se realizaron cálculos teóricos para determinar la estabilidad de algunas de las estructuras propuestas.

La microscopía electrónica de transmisión (TEM) fue utilizada para verificar si los inhibidores sintetizados rinden, en las condiciones de trabajo, fibras amiloides.

¹⁵⁷ Manavalan, P.; Momany, F. A. *Biopolymers* **1980**, *19*, 1943-1973.

5.1.1 Estudio de los inhibidores mediante dicroísmo circular

5.1.1.1 Consideraciones previas sobre el dicroísmo circular

El dicroísmo circular aplicado a péptidos y proteínas permite estimar el contenido de las diferentes estructuras secundarias canónicas (hélice α , lámina β paralela, *al azar*, etc.) que presentan en disolución¹⁵⁸. La estimación se realiza a partir de la deconvolución del espectro de nuestra proteína problema como suma de varios espectros canónicos y en este proceso se utilizan programas¹⁵⁹ que, a partir de los espectros de CD de las estructuras canónicas o bien de una serie de proteínas, permiten calcular la contribución específica de las estructuras básicas en la proteína incógnita (el espectro observado es la suma de las diferentes estructuras básicas multiplicadas por una constante). El programa LINCMB¹⁶⁰, por ejemplo, utiliza estructuras canónicas predeterminadas similares a las mostradas en la Figura 92 para realizar sus cálculos.

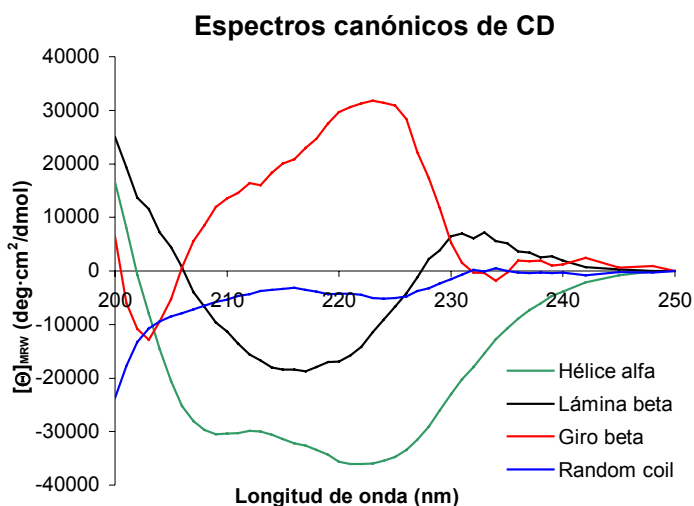


Figura 92. Espectros canónicos de dicroísmo circular de cuatro conformaciones básicas¹⁶¹. $[\Theta]_{MRW}$ indica elipticidad media por residuo (mean residue weight, MRW).

La mayoría de programas trabajan utilizando una serie de proteínas de estructura conocida para estimar el contenido de estructura secundaria de otra proteína problema. Este es el caso de programas como CDstr¹⁶², CCA¹⁶⁰ o SELCON¹⁶³. Este método de

¹⁵⁸ Kakanishi, K.; Berova, N.; Woody, R. *Circular Dichroism: principles and applications*, Ed. VCH Publishers, Inc., New York, **1994**.

¹⁵⁹ Greenfield, N. J. *Anal. Biochem.* **1996**, *235*, 1-10.

¹⁶⁰ Perczel, A.; Park, K.; Fasman, G. D. *Anal. Biochem.* **1992**, *203*, 83-93.

¹⁶¹ Yang, J. T.; Wu, C. C.; Martinez, H. M. *Methods Enzymol.* **1986**, *130*, 208-269.

¹⁶² Johnson, W. C. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **1999**, *35*, 307-312.

¹⁶³ Sreerama, N.; Woody, R. W. *Anal. Biochem.* **1993**, *209*, 32-44.

cálculo implica que, para obtener resultados satisfactorios, necesitamos que la estructura de nuestra proteína esté representada adecuadamente en las estructuras de referencia que utiliza el programa de deconvolución. Si la proteína problema presenta algún motivo estructural no considerado en el programa, la contribución de éste al espectro de dicroísmo no se interpretará correctamente.

Otro factor muy importante a tener en cuenta en el momento de escoger un programa para interpretar los resultados obtenidos es la naturaleza de la proteína que se está considerando. La mayoría de programas de deconvolución de CD están pensados para proteínas plegadas relativamente grandes. El término estructura al azar o *random coil* no tiene sentido en este tipo de programa, como se recalca en el archivo README.TXT del programa CDsstr¹⁶⁴, ya que esta estructura se observa en péptidos de tamaño pequeño.

Los péptidos pequeños normalmente adoptan una estructura secundaria en equilibrio con la forma *al azar*, haciendo innecesario el uso de un método flexible en el que se consideren un elevado número de conformaciones. Por este mismo motivo, el análisis estructural de péptidos no tiene sentido hacerlo mediante un programa como CDsstr, específico para proteínas. El programa más adecuado para péptidos pequeños es el CCA (Convex Constraint Analysis), desarrollado por Perczel y colaboradores¹⁶⁰. La ventaja que presenta este método es que puede aplicarse a cualquier tipo de espectro de CD, utilizando también para ello una serie de espectros de referencia. La diferencia fundamental con todos los demás métodos es la necesidad de introducir externamente el número de conformeros puros presentes en la mezcla. En el caso de un péptido pequeño podemos estimar de forma razonable que este valor será de 2 ó 3, aunque es necesario determinarlo para cada problema (es lógico pensar que el péptido, además de encontrarse en forma *al azar*, también podría adoptar una o incluso dos estructuras estables).

Un obstáculo que debemos considerar en el caso de estudiar péptidos con aminoácidos no naturales son las posibles alteraciones que pueden introducir estos residuos en el espectro de dicroísmo.

El fenómeno del dicroísmo circular se observa a aquellas longitudes de onda a las que absorbe la molécula estudiada y se debe a las diferencias de comportamiento que

¹⁶⁴ Programa CDsstr (Variable Selection). Parthasarathy, M.; Toumadje, A.; Johnson, W. C. version 1.8.2.

5 Caracterización estructural y estudios de estabilidad de los inhibidores

presentan los componentes de la luz linealmente polarizada en un medio anisótropo. Por este motivo, normalmente los péptidos y proteínas se estudian mediante CD en el rango de longitudes de onda comprendido entre 170 y 250 nm. El enlace peptídico, cuyos parámetros determinan la estructura secundaria que adopta el esqueleto peptídico, presenta un máximo de absorción a 210 nm, por lo que es alrededor de esta zona del espectro donde se produce el efecto de dicroísmo circular. La introducción de modificaciones en los átomos directamente implicados en este enlace, como es la presencia de grupos metilo en el nitrógeno de la amida, puede por tanto implicar algunos cambios en el espectro respecto a los valores descritos en las estructuras de referencia utilizadas (desplazamiento de los valores máximos/mínimos y variación de las intensidades).

Los espectros de CD de los N-metilpéptidos registrados en esta tesis presentan, como se muestra en el apartado 5.1.1.2, variaciones respecto a los espectros canónicos descritos para péptidos sin N-metilaminoácidos, observándose un espectro similar al obtenido con estructuras de lámina β pero con un desplazamiento batocrómico del mínimo del orden de unos 10-15 nm (pasa de estar a \sim 215 nm a unos 225-230 nm, dependiendo del péptido). Este tipo de espectro con mínimos a alrededor de 230 nm son asignados en la bibliografía^{165,166} a conformaciones de lámina β de péptidos con N-metilaminoácidos. Puesto que no se dispone del espectro de referencia de un N-metilpéptido en disposición de lámina β , la cuantificación de la contribución de esta estructura al espectro de CD no se puede realizar satisfactoriamente utilizando programas de deconvolución.

5.1.1.2 Experimentos de dicroísmo circular

Se escogieron algunos péptidos de la primera serie de inhibidores (derivados mono-, di- y trimetilados de la secuencia Lys-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala) para determinar cómo afecta la posición y el número de grupos metilo en el espectro de dicroísmo y, por tanto, en la estructura secundaria, del péptido. Además, se escogieron algunos péptidos de la segunda y tercera serie de inhibidores para observar el efecto que producen tanto el

¹⁶⁵ Kapurniotu, A.; Schmauder, A.; Tenidis, K. *J. Mol. Biol.* **2002**, *315*, 339-350.

¹⁶⁶ Gordon, D. J.; Sciarretta, K. L.; Meredith, S. C. *Biochemistry* **2001**, *40*, 8237-8245.

5 Caracterización estructural y estudios de estabilidad de los inhibidores

cambio de los aminoácidos L por D, como la variación del orden de la secuencia. Los péptidos elegidos para este estudio se detallan en la Tabla 13.

La preparación de la muestra para dicroísmo circular y los parámetros utilizados durante las medidas de CD se detallan en el apartado 8.5.1.1. La concentración óptima se estableció, de forma empírica, en 200 μ M. Esta concentración ofrece una intensidad adecuada y una buena relación señal/ruido en las condiciones de medida y, además, coincide con la concentración a la que los inhibidores se incuban en los ensayos biológicos.

Péptido	Secuencia peptídica	Nº de metilos
1	Lys-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-NMeA-NH ₂	1
2	Lys-Lys-Leu-Val-Phe-NMePhe-Ala-NH ₂	1
4	Lys-Lys-Leu-NMeVal-Phe-Phe-Ala-NH ₂	1
5	Lys-Lys-NMeLeu-Val-Phe-Phe-Ala-NH ₂	1
6	Lys-Lys-Leu-NMeVal-Phe-NMePhe-Ala-NH ₂	2
8	Lys-Lys-Leu-Val-NMePhe-Phe-NMeAla-NH ₂	2
9	Lys-Lys-NMeLeu-Val-NMePhe-Phe-NMeAla-NH ₂	3
10	Lys-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-NH ₂	0
12	D-Lys-D-Lys-D-Leu-D-Val-D-Phe-D-NMePhe-D-Ala-NH ₂	1
16	D-Lys-D-Lys-D-NMeLeu-D-Val-D-Phe-D-Phe-D-Ala-NH ₂	1
17	D-Ala-D-NMePhe-D-Phe-D-Val-D-Leu-D-Lys-D-Lys-NH ₂	1
22	Lys-Lys-Leu-Val-Pro-Phe-Ala-NH ₂	0

Tabla 13. Péptidos analizados mediante dicroísmo circular.

5.1.1.2.1 Espectros de dicroísmo circular a temperatura ambiente

Los espectros de CD de los péptidos escogidos (Tabla 13) se muestran en las siguientes figuras, donde se han agrupado en un mismo gráfico los espectros relacionados para facilitar la comparación. Por ello, en algunos casos el mismo espectro aparece en varias figuras.

La Figura 93 muestra una estructura tipo *al azar* para **10** (el péptido sin metilar), mientras que los péptidos monometilados parecen ser una mezcla de diferentes proporciones del espectro de **10** y el espectro de **4**. La comparación del espectro de **4** con los descritos para otros N-metilpéptidos^{165,166} permite afirmar que presenta un elevado

5 Caracterización estructural y estudios de estabilidad de los inhibidores

contenido de estructura β . Esta estructura β parece estar más favorecida cuanto más centrado está el N-metilaminoácido en la secuencia.

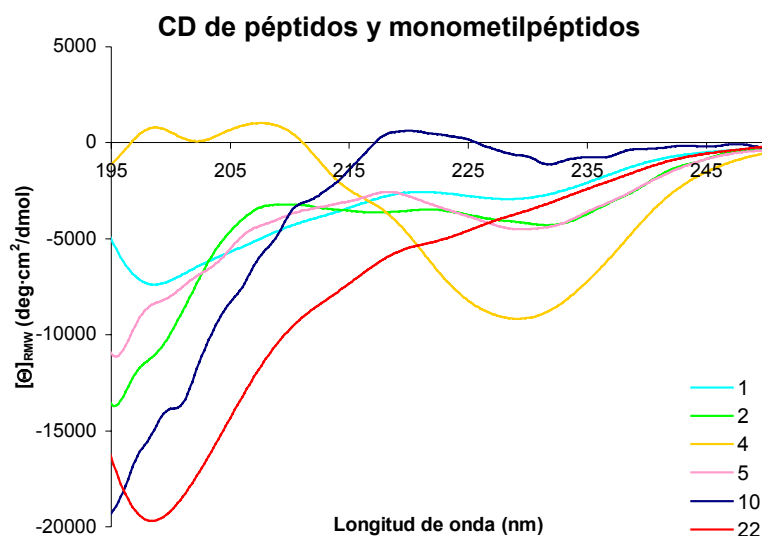


Figura 93. Comparación de diversos espectros de dicroísmo circular de péptidos monometilados (**1**, **2**, **4** y **5**) y no metilados (**10** y **22**) (200 μ M, pH 7,4 y a 20°C, apartado 8.5.1.1.1), basados en la secuencia Lys-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala.

El espectro de **4**, donde NMeV es el residuo central, presenta un mínimo muy acentuado a \sim 230 nm (indicativo de estructura β en N-metilpéptidos) y desaparece la banda a \sim 195 nm característica de **10** (la comparación del espectro de **10** con los espectros canónicos parece indicar que **10** se encuentra, mayoritariamente, en forma de estructura al azar). El mínimo a \sim 230 nm también aparece, aunque mucho menos intenso, en los espectros de **2** y **5**, mientras que en el espectro de **1** la contribución de la estructura β parece aún menor. Esto es lógico si pensamos que **1** tiene sólo una NMeA en el extremo C-terminal, por lo que su influencia sobre la estructura secundaria es menor que si se encontrara en la región central del péptido (los extremos presentan mayor flexibilidad).

La sustitución de una Phe por Pro (péptido **22**) da lugar a un espectro que no presenta una contribución importante de estructura β , al contrario de lo observado en el caso de los N-metilinhibidores.

La Figura 94 es un ejemplo del espectro que se obtiene al comparar un péptido con su forma enantiomérica. Debido a que **2** y **12** guardan una relación de enantiómeros, sus

espectros de dicroísmo guardan una relación de imagen especular. Lo mismo sucede con **16** y **17**, los cuales también son enantiómeros entre ellos.

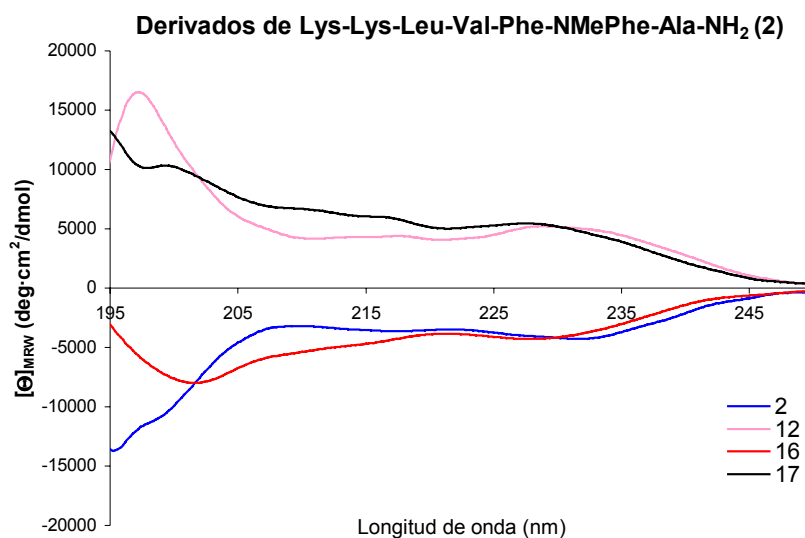


Figura 94. Espectros de dicroísmo circular de los cuatro péptidos basados en la secuencia KKLVFNMeFA (**2**, **12**, **16** y **17**) (200 μ M, pH 7,4 y a 20°C, apartado 8.5.1.1.1).

En este ejemplo se hacen notables los problemas técnicos que implica trabajar por debajo de 200 nm con determinadas muestras. A esta longitud de onda el desgaste de los monocromadores del aparato se hace evidente, lo que se refleja en una disminución de la señal en el UV lejano y una disminución de la relación señal/ruido. Esto produce una distorsión en la relación de imagen especular en la región por debajo de 200 nm (el gráfico mostrado se obtiene tras aplicar una función de suavizado, ver apartado 8.5.1.1.3).

Una observación interesante es que los péptidos con secuencia inversa (retropéptidos) presentan un espectro muy similar al de las secuencias originales, lo que indica una estructura secundaria parecida (el espectro de **2** es muy similar al de **16**, y el de **12** al de **17**).

En la Figura 95 se puede ver claramente el efecto de un número variable de N-metilaminoácidos sobre la estructura secundaria. **9** y **10** son los puntos extremos del gráfico: sin N-metilaminoácidos el espectro de **10** corresponde a una estructura *al azar*, mientras que **9**, con tres N-metilaminoácidos, presenta un marcado carácter de estructura β . Igual que se ha observado en la Figura 93, en la Figura 95 también se aprecia que

5 Caracterización estructural y estudios de estabilidad de los inhibidores

cuanto más centrados están los N-metilaminoácidos en la secuencia, mayor contenido en estructura β (se produce un aumento notable de la intensidad del mínimo a ~ 225 nm).

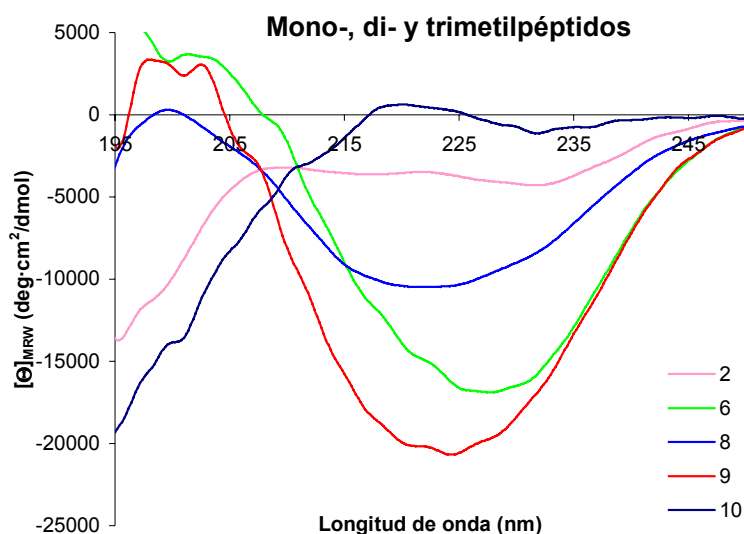


Figura 95. Comparación entre los espectros de dicroísmo circular del péptido sin N-metilos (**10**), un péptido monometilado (**2**), dos péptidos dimetilados (**6** y **8**) y el péptido trimetilado (**9**) (200 μM , pH 7,4 y a 20°C, apartado 8.5.1.1.1).

Estos resultados muestran la importancia de los N-metilaminoácidos en la estabilización de la estructura β . Cuantos más N-metilaminoácidos, más rígida resulta la estructura final.

5.1.1.2.2 Espectros de CD a temperatura variable

La estructura de un péptido o proteína se ve influida por múltiples factores externos, tales como la temperatura, la fuerza iónica, el pH, la concentración, etc. Debido a ello, y puesto que el espectro de dicroísmo circular de una sustancia revela precisamente la estructura secundaria de ésta, la elipticidad de un péptido en disolución se ve afectada por todos estos parámetros.

El aumento de la temperatura de una disolución de proteína lleva normalmente a lo que se denomina desnaturalización térmica de la proteína. Este proceso implica normalmente la transición de una estructura nativa ordenada, a temperaturas bajas, a una forma colapsada en la que los residuos hidrofóbicos quedan expuestos al disolvente, una vez superada la temperatura de fusión de la proteína. Por tanto, la observación de un proceso de desnaturalización es un indicio de la existencia de interacciones entre grupos

hidrofóbicos que estabilizan el plegamiento¹⁶⁷, bien sea debido a interacciones intermoleculares (formación de una hélice, apilamiento de estructuras β , etc.) o intramoleculares (formación de dímeros, etc.).

En el caso de una cadena peptídica corta que adopta una estructura extendida, como sucede con los péptidos de la presente tesis, el hecho de observar un proceso de desnaturalización no puede achacarse al desplegamiento de la cadena peptídica (en una disposición extendida todos los residuos se encuentran expuestos al disolvente), por lo que puede ser indicio de la existencia de interacciones hidrofóbicas entre diferentes unidades peptídicas.

Con el fin de determinar la existencia de este tipo de interacciones se escogieron tres péptidos (**2**, **9** y **10**) y se realizaron medidas de CD a varias temperaturas entre 4 y 87°C (ver apartado 8.5.1.1.2). Los gráficos obtenidos se muestran en las siguientes figuras.

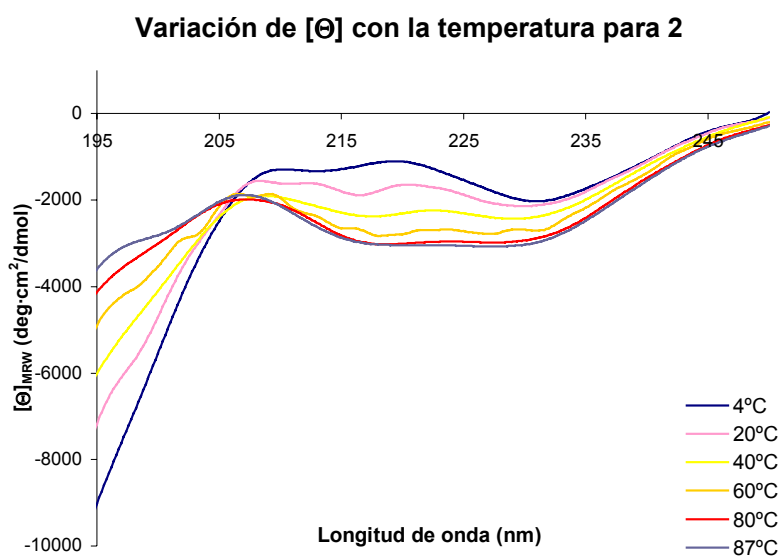


Figura 96. Espectros de dicroísmo circular obtenidos para el péptido **2**, disuelto a una concentración 200 μM en tampón fosfato 20 mM pH 7,4, en función de la temperatura.

¹⁶⁷ Pain, R. H. *Protein Folding*, Ed. Oxford University Press Inc., New York **1996**.

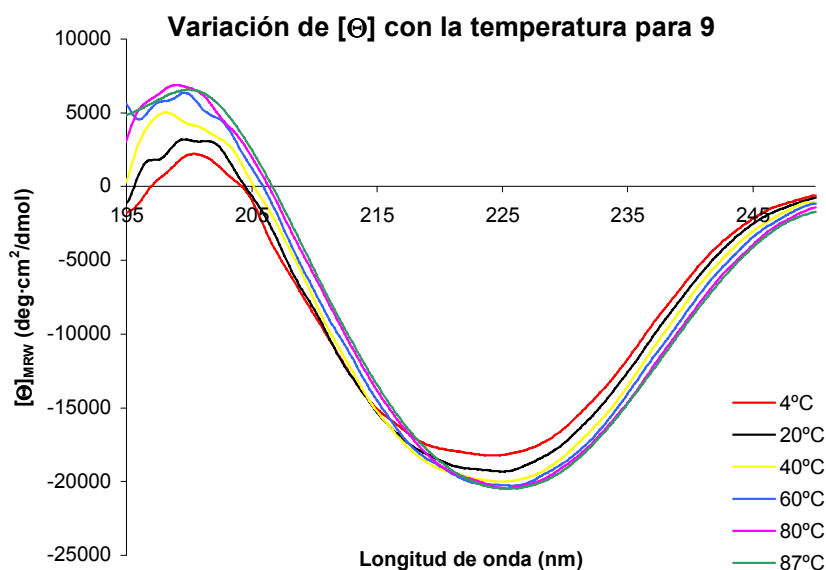


Figura 97. Espectros de dicroísmo circular obtenidos para el péptido **9**, disuelto a una concentración 200 μ M en tampón fosfato 20 mM pH 7,4, en función de la temperatura.

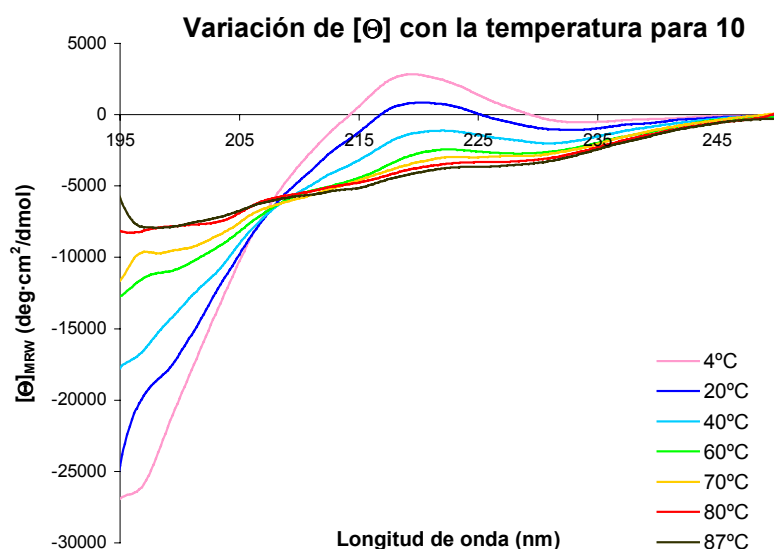


Figura 98. Espectros de dicroísmo circular obtenidos para el péptido **10**, disuelto a una concentración 200 μ M en tampón fosfato 20 mM pH 7,4, en función de la temperatura.

La comparación de los tres péptidos permite observar, de forma general, una disminución en el peso relativo de la banda negativa a \sim 225 nm conforme se reduce la temperatura, lo que podría indicar una reducción del grado de estructuración. Este tipo de comportamiento se da durante el fenómeno de “cold denaturation”^{167,168}: en algunos casos, a temperaturas bajas se ve más favorecida la exposición de residuos apolares al agua que a temperaturas altas, debido a una contribución dominante del término

¹⁶⁸ Wishart, D. S. *Techniques in Protein Chemistry VI*, Ed. Academic Press, San Diego 1995.

entrópico¹⁶⁹. Esto motiva que la proteína, a temperaturas bajas, se despliegue. En el caso de un péptido pequeño esta explicación no tiene sentido a no ser que se considere la existencia de una estructura agregada, como puede ser un dímero, el cual, a temperaturas bajas, podría disociarse (las diferencias entre el espectro de CD de la especie monomérica y la agregada provoca la variación del espectro de CD con la temperatura¹⁷⁰).

La existencia de un punto isobéptico, tanto en la serie de espectros de **10** como en la de **2**, nos indica que el equilibrio observado tiene lugar, muy probablemente, entre dos especies¹⁷¹.

5.1.1.2.3 Espectros de CD a concentración variable

La obtención de espectros de CD de una misma especie a diferentes concentraciones puede indicar también la existencia de especies diméricas¹⁶⁶. La elipticidad, Θ , al igual que la absorbancia, es proporcional a la concentración, como se muestra en la Ecuación 1. Por este motivo, y si no se produce ningún cambio estructural, el valor de la elipticidad molar, $[\Theta]$, tiene que ser constante con la concentración.

$$\Theta = 33(A_L - A_R) = \frac{[\Theta] \cdot c \cdot \ell}{100}$$

Ecuación 1. Relación entre la elipticidad, Θ (*degrees*), y la elipticidad molar, $[\Theta]$ (*deg·cm²·dmol⁻¹*). A_L y A_R representan respectivamente la absorbancia de la luz polarizada a la izquierda y a la derecha.

La formación de dímeros o agregados depende de una constante de equilibrio. Por este motivo, si se diluye suficientemente se pueden llegar a obtener las formas monoméricas, las cuales presentan un espectro de dicroísmo circular diferente al observado para los agregados.

Los resultados de Meredith indican que los di- y trimetilinhbidores son estructuras extremadamente rígidas, estables en forma monomérica¹⁶⁶. Estas afirmaciones son respaldadas con la observación mediante CD de una estructura estable en un amplio intervalo de concentración, pH, en presencia de agentes desnaturizantes y a diferentes temperaturas.

¹⁶⁹ Tsai, C.; Maizel, J. V.; Nussinov, R. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2002**, 37, 55-69.

¹⁷⁰ Jayawickrama, D.; Zink, S.; Velde, D. V.; Effiong, R. I.; Larive, C. K. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1995**, 13, 229-144.

¹⁷¹ Tamura, A.; Kimura, K.; Takahara, H.; Akasaka, K. *Biochemistry* **1991**, 30, 11307-11313.

5 Caracterización estructural y estudios de estabilidad de los inhibidores

Sí tenemos en cuenta que la secuencia central de A β es capaz de interactuar con la proteína nativa, A β , como indican los resultados de Tjernberg con el péptido Lys-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala¹⁷², no sería de extrañar que, tanto este péptido como sus derivados metilados en posiciones alternas, fuesen capaces de autoreconocerse, formando agregados de tipo dimérico. Este comportamiento, por otro lado, es típico de estructuras β , las cuales tienen tendencia a asociarse para aumentar su estabilidad y, además, explicaría el comportamiento de estos péptidos con la temperatura¹⁶⁸.

Se realizaron medidas de CD a temperatura constante, variando la concentración de péptido, para intentar esclarecer el estado de agregación de estos péptidos. El experimento se realizó únicamente con **9**, el cual, según los resultados a temperatura variable, es el que presenta mayor rigidez. En la Figura 99 pueden verse los espectros de dicroísmo de **9** a concentraciones desde 3 hasta 200 μ M.

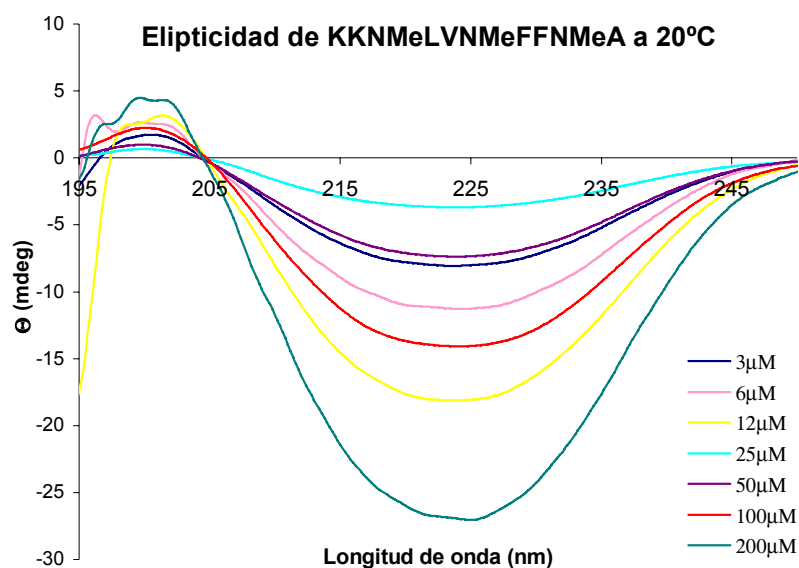


Figura 99. Elipticidad del péptido **9** a diversas concentraciones en tampón fosfato 20 mM a 20°C. (las medidas a 3, 6 y 12 μ M están realizadas en una cubeta de 1 cm de paso de luz, mientras que las restantes medidas se tomaron en una cubeta de 0,1 cm).

La representación gráfica que se muestra en la Figura 99 permite ver cómo aumenta Θ en función de la concentración, pero no resulta fácil determinar a simple vista cómo varía $[\Theta]$. Para hacer independiente el valor de Θ de la cubeta y de la concentración

¹⁷² Tjernberg, L. O.; Lilliehöök, C.; Callaway, D. J. E.; Näslund, J.; Hahne, S.; Thyberg, J.; Terenius, L.; Nordstedt, C. J. *Biol. Chem.* **1997**, 272, 12601-12605.

5 Caracterización estructural y estudios de estabilidad de los inhibidores

utilizada, se utiliza la representación de la Figura 100, con la elipticidad molar por residuo, $[\Theta]_{MRW}$.

En la Figura 100 se aprecian claramente valores de $[\Theta]$ constantes entre 12 y 200 μM . Por debajo de 10 μM se produce un importante aumento de $[\Theta]$, que llega a doblarse, respecto a los valores observados a concentraciones altas, a concentraciones de 3 μM . La representación de $[\Theta]$ a 220 nm en función de la concentración de **9**, como se muestra en la Figura 101, permite apreciar mejor este comportamiento.

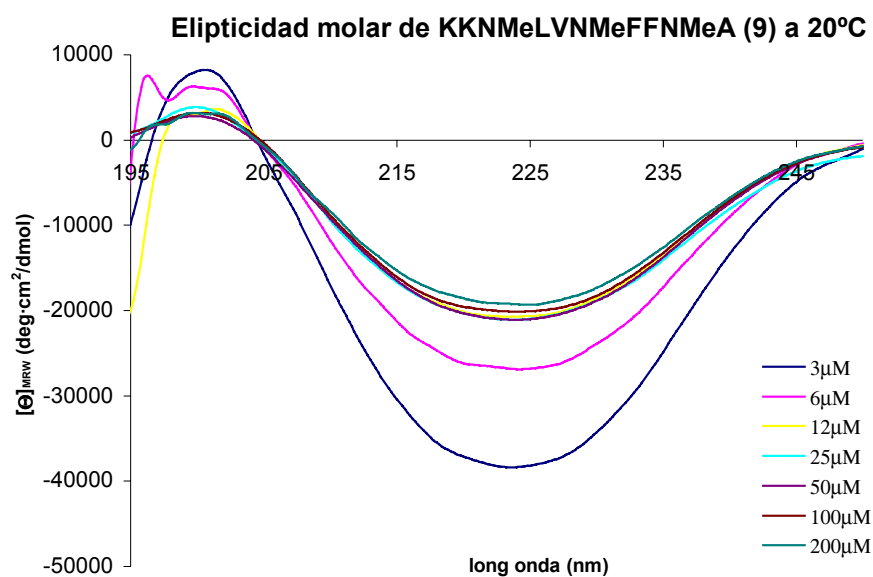


Figura 100. Elipticidad molar por residuo del péptido **9** a diversas concentraciones en tampón fosfato 20 mM a 20°C.

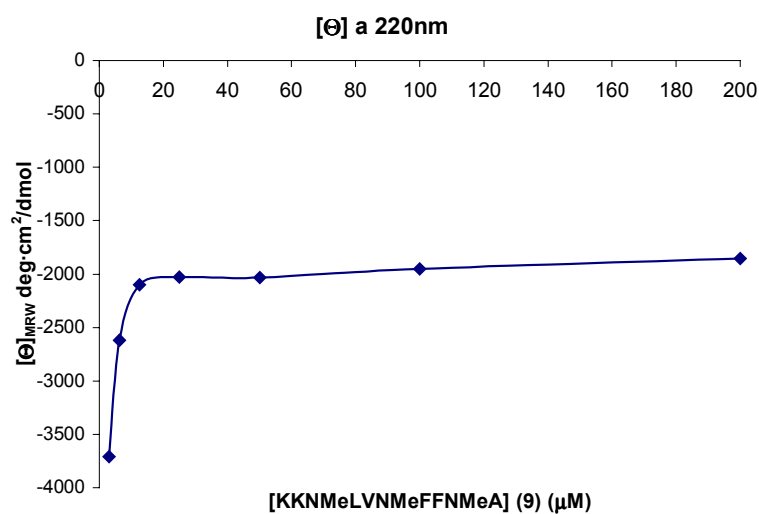


Figura 101. Variación de la elipticidad molar a 220 nm en función de la concentración de **9**.

5 Caracterización estructural y estudios de estabilidad de los inhibidores

Además, e igual que sucede con los experimentos a temperatura variable, se observa un punto isobéptico, indicativo de un equilibrio entre dos especies (por ejemplo, un dímero y un monómero).

Estos resultados de dicroísmo circular permiten postular la existencia de un dímero o agregado de **9** en disolución, el cual se disocia a concentraciones por debajo de $\sim 10 \mu\text{M}$. Este dímero podría estar implicado en el fenómeno de desnaturalización en frío observado en el apartado 5.1.1.2.2.

Además, el comportamiento de **9** con la concentración no contradice las observaciones de Meredith y colaboradores para sus N-metilpéptidos, ya que aunque afirman que no existe variación de $[\Theta]$ con la concentración, los valores que exploran están comprendidos entre 10 y 1100 μM (por encima de los valores en los que se observó la dependencia de $[\Theta]$ con la concentración).

La posibilidad de que tanto **9** como los restantes N-metilinhibidores se encuentren en forma de dímeros en disolución podría estar relacionada con la tendencia de $\beta(1-40)$ a formar dímeros estables en medio acuoso¹⁷³ y a la capacidad que presenta la secuencia Lys-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala para unirse, de forma específica, a $A\beta$ ¹⁷².

5.1.1.2.4 Espectros de CD de mezclas

El valor de Θ es el resultado de la contribución de cada conformación que coexiste en la disolución. Por consiguiente, si mezclamos dos moléculas que no interactúan entre ellas, el espectro de dicroísmo que se obtiene es la suma aritmética del espectro de cada una por separado. Sin embargo, si las especies interactúan y adoptan una estructura diferente a la que tenían por separado, el espectro de la mezcla debe diferir de la suma aritmética.

Puede ser interesante ver si la secuencia sin N-metilaminoácidos, Lys-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala, es capaz de interactuar con uno de los N-metilpéptidos. Debido a que nuestro mejor inhibidor en el momento de realizar el estudio era la molécula **2**, se escogió este péptido para llevar a cabo el ensayo. Para favorecer la posible interacción entre

¹⁷³ Garzón-Rodríguez, W.; Sepúlveda-Becerra, M.; Milton, S.; Glabe, C. G. *J. Biol. Chem.* **1997**, *34*, 21037-21044.

ambos péptidos se preparó una disolución concentrada de ambos en agua con una relación 1:1 y se dejó envejecer 2 días a 37°C. La medida se realizó igual que en el caso los péptidos solos (apartado 8.5.1.1.1).

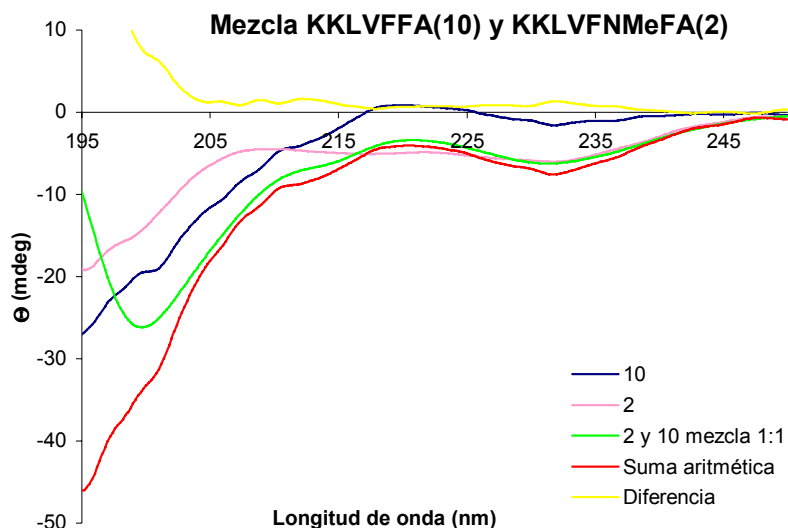


Figura 102. Espectro de dicroísmo circular de **2**, **10** y una mezcla equimolar de **2** y **10**. Todos están registrados a 20°C, utilizando una concentración de péptido 200 μM en tampón fosfato 20 mM pH 7,4. En rojo se representa el espectro teórico obtenido mediante la suma matemática del espectro de **10** y el de **2**, mientras que en amarillo se muestra el espectro diferencia (valor obtenido al restar los espectros de **2** y de **10** al espectro de la mezcla **10** y **2**).

La comparación de los espectros representados en la Figura 102 muestra una variación en la región alrededor de 200 nm que podría indicar un cambio en la estructura que adoptan los péptidos en la mezcla respecto a la observada en las preparaciones “puras”. No obstante, la variación de la señal no es muy significativa si consideramos que nos encontramos en una región con una relación señal/ruido muy baja.

5.1.2 Estudio de los inhibidores mediante IR-FT

5.1.2.1 Consideraciones previas sobre el IR-FT

La espectroscopía infrarroja empezó a utilizarse en la determinación de la estructura secundaria de péptidos en 1950, permitiendo desde entonces complementar los datos estructurales obtenidos mediante dicroísmo circular con esta técnica¹⁷⁴. Una ventaja que

¹⁷⁴ Elliott, A.; Ambrose, E. J. *Nature* **1950**, 4206, 921-922.

5 Caracterización estructural y estudios de estabilidad de los inhibidores

presenta la espectroscopía de infrarrojo respecto al dicroísmo circular es que permite trabajar tanto en disolución como en estado sólido o gel[♦].

Al estudiar péptidos mediante IR-FT se pueden observar nueve bandas de absorción características de este tipo de esqueleto carbonado, algunas de las cuales son útiles para el estudio conformacional de péptidos. La banda más utilizada en este sentido es la denominada *banda amida I*, situada entre 1600 y 1700 cm^{-1} , que se debe mayoritariamente a los stretchings C=O (80%) y C-N (20%) del grupo amida¹⁷⁵.

Un problema que conlleva el uso de la banda amida I es la vibración tipo *bending* de la molécula de agua, que da una señal intensa cerca de 1640 cm^{-1} . Por este motivo, frecuentemente se utiliza agua deuterada, lo que conlleva un ligero desplazamiento de la banda amida I, dando lugar a la denominada *banda amida I'*. La deconvolución de la señal de IR de la banda amida I en forma de la suma de sus componentes permite, al igual que en el caso del dicroísmo circular, estimar la proporción de cada una de las conformaciones, dando en muchos casos una buena aproximación a la estructura real¹⁷⁶.

La deconvolución que se utiliza en el caso del IR-FT es más sencilla que la utilizada en el dicroísmo circular, ya que las bandas de IR puras pueden aproximarse a curvas estándar de tipo Lorentziano o Gaussiano (o a una mezcla de ellas)¹⁷⁶. El análisis de la estructura secundaria presente en una proteína mediante IR-FT se basa en dos parámetros. Por un lado la frecuencia máxima de la banda nos indica qué tipo de estructura tenemos, mientras que el área se puede relacionar con el contenido en dicha estructura. En la Tabla 14¹⁷⁷ se muestra un resumen del rango de frecuencias observado para diferentes tipos de estructuras secundarias.

♦ En dicroísmo circular, la presencia de partículas en suspensión interfiere en la medida debido a la dispersión de luz, no así en las medidas de infrarrojo.

¹⁷⁵ Seshadri, S.; Khurana, R.; Fink, A. L. *Methods Enzymol.* **1999**, 309, 559-576.

¹⁷⁶ Susi, H.; Byler, D. M. *Methods Enzymol.* **1986**, 130, 290-311.

¹⁷⁷ Vass, E.; Kurz, M.; Konat, R. K.; Hóllösi, *Spectrochim. Acta Part A* **1998**, 54, 773-786.

5 Caracterización estructural y estudios de estabilidad de los inhibidores

Estructura secundaria	Banda amida I'
Estructura extendida, lámina β	1640-1615 cm^{-1} (banda secundaria a 1680-1670 cm^{-1})
Estructura amiloide ¹⁷⁸ , β antiparalelo	$\sim 1630 \text{ cm}^{-1}$ (banda secundaria menos intensa a $\sim 1695 \text{ cm}^{-1}$)
Desordenado	1649-1641 cm^{-1}
Hélice α	1660-1650 cm^{-1}
Giros	$> 1660 \text{ cm}^{-1}$

Tabla 14. Correlación entre las señales de IR observadas y el tipo de estructura al que son asignados normalmente¹⁷⁷.

En general, la frecuencia a la que se observa una banda tipo amida I depende de la clase de puente de hidrógeno en el que se encuentre involucrado el grupo carbonilo de la amida. Cuanto más fuerte es el puente de hidrógeno que forma, menor densidad electrónica presenta el carbonilo y, por tanto, aparece a frecuencias más bajas¹⁷⁹. Esto explica la gradación que se muestra en la Tabla 14, donde las estructuras β , con enlaces inter e intramoleculares, presentan los valores de frecuencia más bajos.

En el caso del IR-FT, y al contrario que en el dicróismo, los valores de frecuencia observados, ν , no están tan acotados para cada estructura secundaria, sino que el valor de ν varía dentro de un rango para cada estructura. Por esta razón es recomendable saber, antes de realizar el proceso de deconvolución, en qué región del espectro están situadas, aproximadamente, las bandas de la señal amida I. Con este fin se pueden utilizar diversos métodos, siendo muy frecuente el estudio de la segunda y/o cuarta derivada de la función.

En la segunda derivada, los mínimos de ésta coinciden con los valores de los máximos de las bandas que componen la curva de IR-FT (estos máximos quedan ocultos debido al solapamiento de bandas). En la cuarta derivada, los máximos son los que indican la localización de las componentes del espectro de IR-FT.

5.1.2.2 Experimentos de IR-FT

Los péptidos **2**, **9** y **10** fueron estudiados utilizando IR-FT. Para ello, se eliminaron los restos de trifluoroacetato[♦] mediante tratamientos repetidos con HCl diluído (ver

¹⁷⁸ Ashburn, T. T.; Auger, M.; Lansbury, T. J. J. *Am. Chem Soc.* **1992**, *114*, 790-791.

¹⁷⁹ Jackson, M.; Mantsch, H. H. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1995**, *30*,95-120.

♦ El carbonilo del trifluoroacetato aparece en la región amida I ($\sim 1675 \text{ cm}^{-1}$).

5 Caracterización estructural y estudios de estabilidad de los inhibidores

apartado 8.5.1.2.1). Las medidas se llevaron a cabo en film, utilizando como disolvente D_2O para evitar interferencias debidas a la presencia de agua. Por este motivo, se estudió en realidad la banda amida I' (apartado 5.1.2.1).

5.1.2.2.1 Péptido 10

En la Figura 103 se muestra el espectro de IR-FT en la región amida I' para el péptido **10** (el péptido sin N-metilaminoácidos). En este espectro pueden distinguirse, a simple vista, cuatro señales correspondientes a otras tantas bandas, situadas, aproximadamente, a 1626, 1649, 1662 y 1691 cm^{-1} .

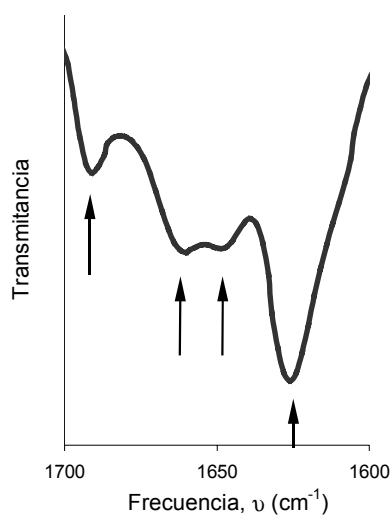


Figura 103. Espectro de IR-FT de la región amida I' del péptido **10** tras aplicar una función de suavizado tipo Savitzky-Golay y sustraer la línea base. Las flechas indican la localización de cuatro máximos de absorción evidentes a simple vista y correspondientes a otras tantas componentes. La muestra se preparó en forma de film sobre BaF_2 .

Antes de proceder a la deconvolución del espectro, se estudiaron las bandas existentes mediante el análisis de la segunda derivada (Figura 104). Al comparar los valores que indica con los que se aprecian a simple vista, tenemos que “aparecen” dos componentes adicionales, una a 1680 y otra a 1608 cm^{-1} . Son los *máximos ocultos* que se muestran gracias al uso de la segunda derivada. Al deconvolucionar la señal de IR utilizando estos valores como restricción inicial (apartado 8.5.1.2.3), se obtienen las bandas mostradas en la Figura 105.

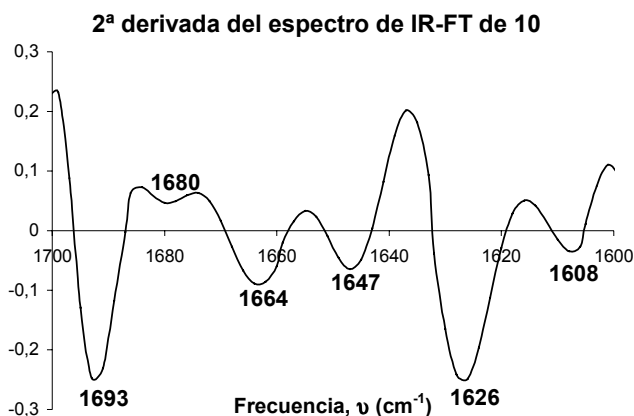


Figura 104. Representación de la segunda derivada del espectro de IR-FT mostrado en la Figura 103. En negrita se muestran los valores de ν correspondientes a cada mínimo local (indicativo de una banda en el espectro de IR).

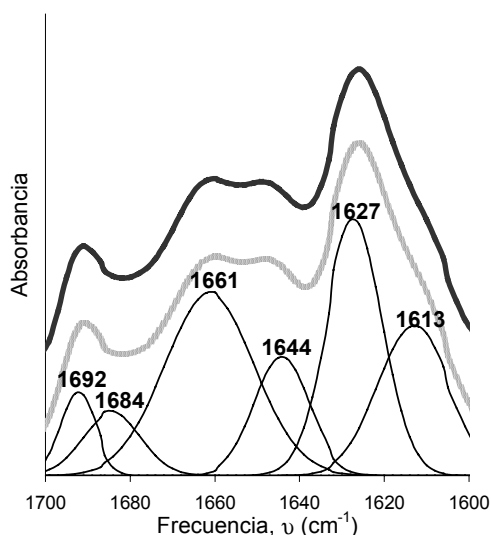


Figura 105. La línea negra gruesa muestra el espectro de IR de **10**, mientras que las líneas finas son las distintas componentes que constituyen la banda amida I' de **10**. La suma de todos los componentes da lugar al espectro que se muestra en color gris (espectro calculado).

Si utilizamos los valores de la Tabla 14 para determinar el tipo de estructura presente en la preparación de **10** podemos ver que aparecen diversas bandas que pueden asignarse a estructuras extendidas tipo β (1627, 1613 cm^{-1} , pudiendo atribuirse la señal a 1692 cm^{-1} , junto con 1627 cm^{-1} , a una estructura amiloide típica^{178,180}), y a una estructura desordenada (1644 cm^{-1}). Estas bandas se corresponden con las mostradas por Penke y colaboradores para la proteína A β nativa¹⁸¹. Los restantes componentes pueden atribuirse a giros o estructuras con un número de puentes de hidrógeno reducido (1661 y

¹⁸⁰ 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.

¹⁸¹ Szabo, Z.; Jost, K.; Soos, K.; Zarándi, M.; Kiss, J.T.; Penke, D. *J. Mol. Struct.* **1999**, 480-481, 481-487.

5 Caracterización estructural y estudios de estabilidad de los inhibidores

1684 cm^{-1}). En definitiva, **10** parece encontrarse, en estado sólido, formando una mezcla de estructura β extendida y/o giros, como muestran los datos obtenidos mediante IR-FT.

5.1.2.2.2 Péptido 2

El espectro de IR-FT de **2** en la región entre 1700-1600 cm^{-1} , se muestra en la Figura 106. La comparación de este espectro con el observado para **10** permite ver, a simple vista, un perfil bastante diferente.

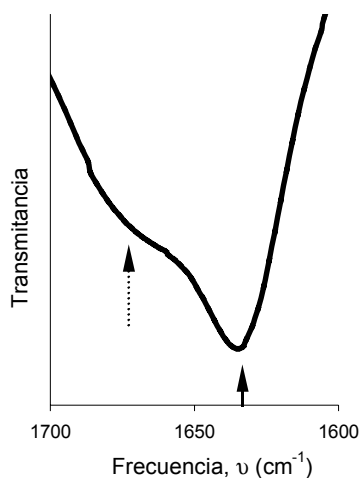


Figura 106. Espectro de IR-FT de la región amida I' del péptido **2** tras aplicar una función de suavizado tipo Savitzky-Golay y sustraer la línea base. La flecha continua indica el emplazamiento de un máximo de absorbancia, mientras que la discontinua muestra un hombro, indicador de una segunda componente. La muestra fue preparada en forma de film sobre BaF_2 .

La deconvolución del espectro de infrarrojo del péptido **2** resulta mucho más simple que la de **10**, como se observa en la Figura 107. En este caso, se determinó únicamente la existencia de tres componentes a 1682, 1665 y 1633 cm^{-1} mediante el análisis de la segunda derivada.

En el caso de **2** la asignación de las diferentes bandas es más sencilla que en el caso de **10**, debido a la simplicidad del espectro. Utilizando nuevamente los valores dados en la Tabla 14 podemos decir que la estructura mayoritaria que presenta **2** es la forma extendida o de lámina β (banda a 1633 cm^{-1} , acompañada de la señal a 1688 cm^{-1} , atribuible a la banda secundaria de una lámina β antiparalela, frecuente en estructuras amiloides). La señal a 1665 cm^{-1} podría formar parte de una conformación en forma de giro o no solvatada, similar a la observada en el caso de **10**.

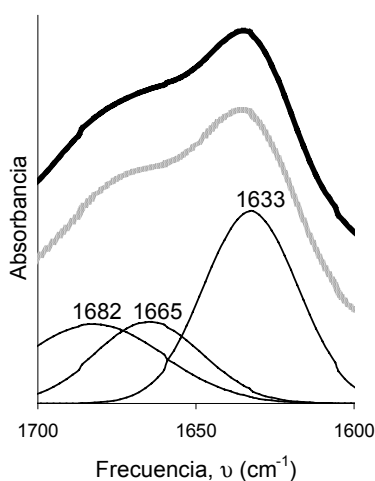


Figura 107. La línea negra gruesa muestra el espectro de IR de **2** en la región amida I', mientras que las líneas finas son las distintas componentes que constituyen dicha banda. La suma de todas las componentes da lugar al espectro que se muestra en color gris (espectro calculado).

Estos datos apoyarían las observaciones de CD sobre la existencia de una estructura extendida, mayoritariamente de tipo β . Además, los resultados obtenidos mediante IR-FT parecen indicar que la disposición de la estructura es característica de una estructura amiloide.

5.1.2.2.3 Péptido 9

El espectro de IR-FT del péptido **9** en la región amida I' es más complejo que el observado para **2**, como puede verse en la Figura 108. Este hecho sorprende teniendo en cuenta los resultados de dicroísmo circular.

La deconvolución de la región amida I' da lugar a las bandas que se muestran en la Figura 109, los valores máximos de las cuales recuerdan mucho a los obtenidos para el péptido **10**, aunque no coinciden en las intensidades relativas.

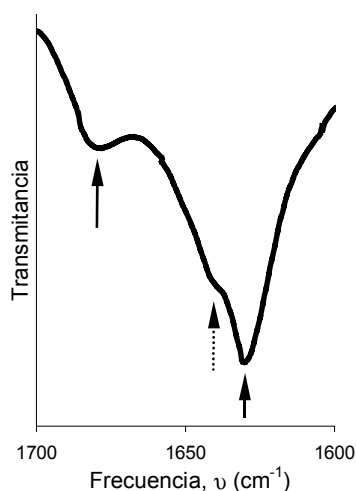


Figura 108. Espectro de IR-FT de la región amida I' del péptido **9** tras aplicar una función de suavizado tipo Savitzky-Golay y sustraer la línea base. Las flechas continuas indican el emplazamiento de un máximo de absorbancia, mientras que la discontinua muestra un hombro, indicio de una componente adicional. La muestra fue preparada en forma de film sobre BaF₂.

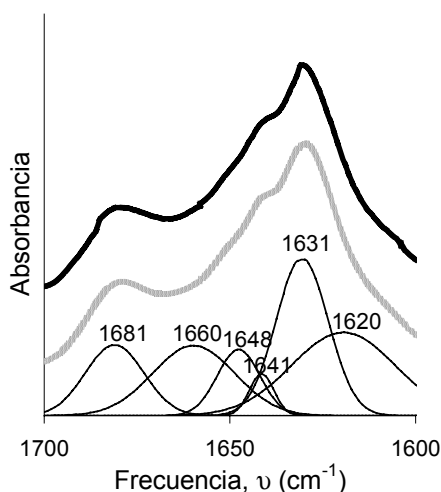


Figura 109. La línea negra gruesa muestra el espectro de IR de **9** en la región amida I', mientras que las líneas finas son las distintas componentes que constituyen dicha banda. La suma de todas las componentes da lugar al espectro que se muestra en color gris (espectro calculado).

Nuevamente, se pueden asignar varias bandas a estructuras extendidas tipo β (1631, 1620 cm⁻¹, con la señal complementaria a 1681 cm⁻¹ típica en estructuras amiloides). En este caso aparecen dos bandas atribuibles a una estructura desordenada (1641 y 1648 cm⁻¹), mientras que el espectro de **10** sólo mostraba una, situada en un valor intermedio, y **2** no presentaba señales atribuibles a este tipo de ordenación. El componente a 1660 cm⁻¹ es el único que coincide totalmente en los tres péptidos, y puede ser asignado a algún tipo de giro o a estructuras con pocos puentes de hidrógeno.

La comparación entre los espectros de **2**, **9** y **10** nos permite ver las diferencias y similitudes entre los tres compuestos, como se muestra en la Figura 110.



Figura 110. Superposición de los espectros de IR-FT de la región amida I' de los péptidos **2**, **9** y **10**.

Un rasgo característico de esta serie de compuestos es la existencia, entre otras conformaciones, de una estructura extendida, asignable, según Lansbury y colaboradores¹⁷⁸, a una estructura amiloide (banda a $\sim 1630\text{ cm}^{-1}$, acompañada de una banda secundaria menos intensa a $\sim 1695\text{ cm}^{-1}$). Esta observación se correlaciona con los datos de dicroísmo tanto para **2** como para **9**. En el caso de **10**, la estructura mayoritaria en disolución (CD) es la forma desestructurada, mientras que en estado sólido, aunque presenta un mayor peso que en **2** y en **9** de este tipo de estructura, ésta es minoritaria.

5.1.3 Estudio de los inhibidores mediante microscopía electrónica de transmisión

La hipótesis amiloide implica que las especies tóxicas son los agregados amiloides o los intermedios que se forman durante la agregación. Por este motivo es interesante ver si las moléculas sintetizadas, igual que sucede con otros derivados de A β , presentan capacidad amiloidogénica en las condiciones de trabajo utilizadas (los resultados obtenidos mediante IR-FT de muestras en estado sólido indican la existencia de una estructura amiloide en estas preparaciones).

La microscopía electrónica de transmisión (TEM) permite observar directamente las estructuras fibrilares formadas por proteínas con capacidad amiloidogénica (apartado 4.2).

5 Caracterización estructural y estudios de estabilidad de los inhibidores

Es, por tanto, una forma de determinar la capacidad de formación de fibras amiloides que presentan sin tener que recurrir a técnicas de tinción, que a veces pueden ofrecer resultados contradictorios^{182,183}. Por ello, tras la realización de los ensayos de toxicidad de cada inhibidor, se analizó la preparación de péptido restante mediante TEM. En ningún caso se observaron fibras amiloides típicas, aunque en algunos casos (como el péptido **7**) se pudo observar, de forma aislada, la presencia de asociaciones de péptido. En la Figura 111 se muestran micrografías de **7** donde se aprecian tanto formas amorfas como una estructura agregada no amiloide. En la Figura 112 y en la Figura 113 se pueden ver más ejemplos de estructuras amorfas diversas. En las preparaciones de los restantes inhibidores se observaron estructuras amorfas similares a éstas.

Este experimento muestra que los péptidos sintetizados no poseen propiedades amiloidogénicas, al menos en las condiciones de ensayo utilizadas (algunas proteínas necesitan el uso de temperaturas elevadas, cambios de pH o bien agitación para rendir estructuras amiloides¹⁸⁴).

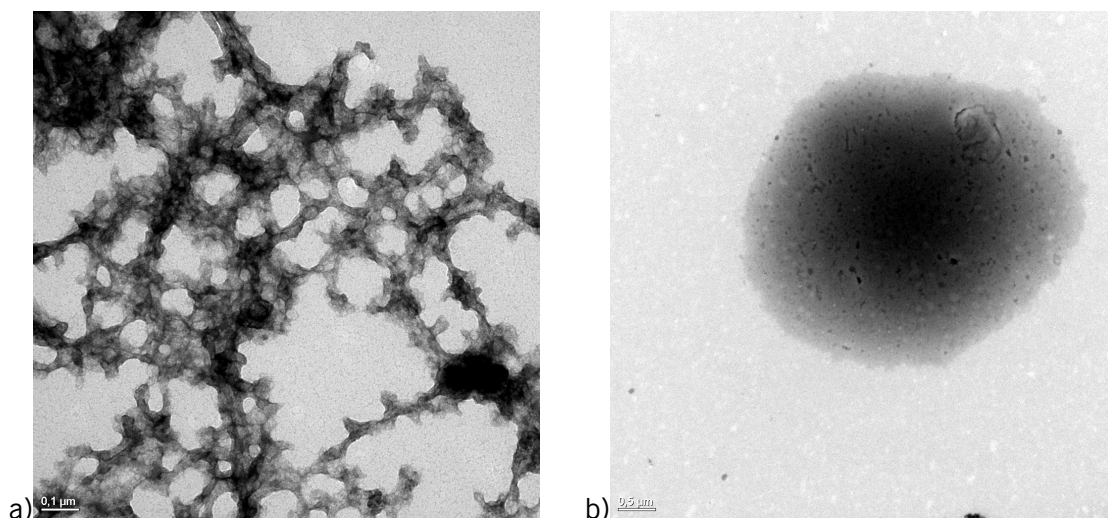


Figura 111. Micrografías del péptido **7** obtenidas utilizando TEM con tinción negativa. La barra de a) corresponde a 0,1 μm, mientras que de b) representa 0,5 μm. a) muestra un agregado tipo mosaico (ver apartado 4.2.3), mientras que en b) se observa una deposición amorfa de péptido.

¹⁸² Goldsbury, C. S.; Wirtz, S.; Müller, S. A.; Sunderji, S.; Wicki, P.; Aebi, U.; Frei, P. *J. Struct. Biol.* **2000**, *130*, 217-231.

¹⁸³ Howlett, D. R.; Jennings, K. H.; Lee, D. C.; Clark, M. S. G.; Brown, F.; Wetzel, R.; Wood, S. J.; Camilleri, P.; Roberts, G. W. *Neurodegeneration*, **1995**, *4*, 23-32.

¹⁸⁴ Caussette, M. M. Planche, H.; Delepine, S.; Monsan, P.; Gaunand, A.; Lindet, B. *Protein Eng.* **1997**, *10*, 1235-1240.

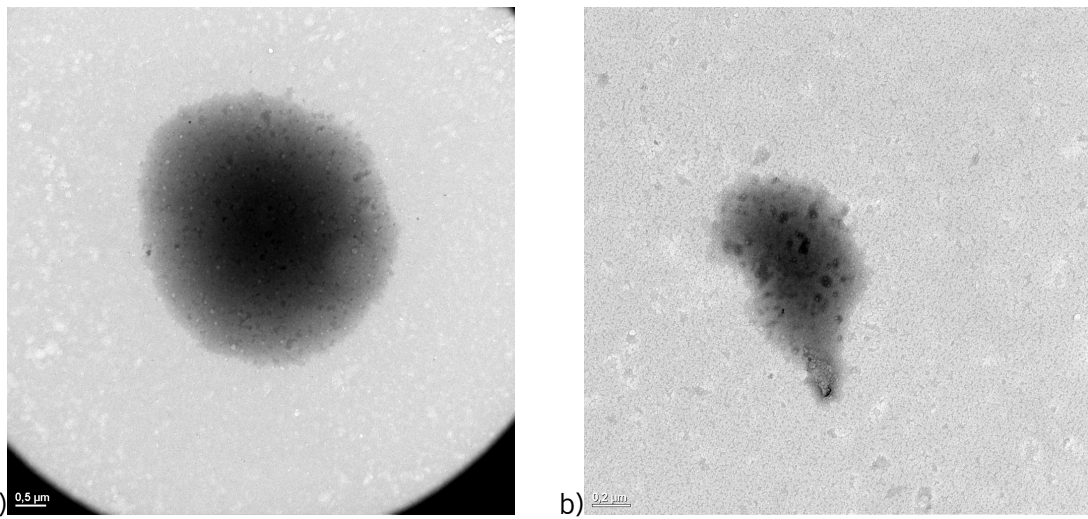


Figura 112. Micrografías del péptido a) **4** y el péptido b) **2**, obtenidas utilizando TEM con tinción negativa. La barra de a) corresponde a 0,5 µm, mientras que en b) representa 0,2 µm. Ambas micrografías muestran deposiciones amorfas de péptido.

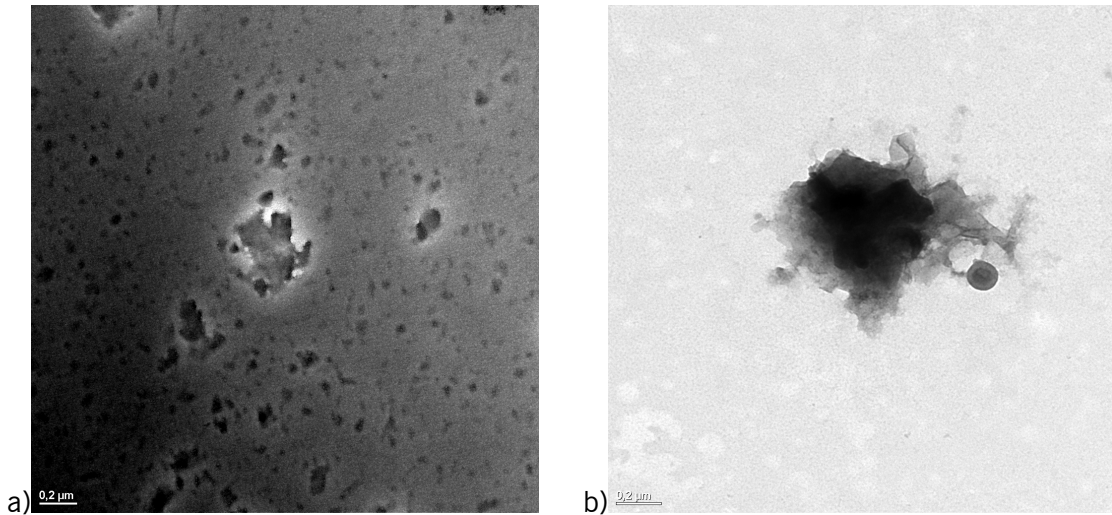


Figura 113. Micrografías del péptido a) **5** y el péptido b) **10**, obtenidas utilizando TEM con tinción negativa. La barra tanto en a) como en b) corresponde a 0,2 µm. Ambas micrografías muestran deposiciones amorfas de péptido ligeramente diferentes a las observadas en la Figura 112 para los péptidos **2** y **4**.

5.2 Modelización asistida por ordenador

Los resultados obtenidos de los estudios de dicroísmo circular e IR-FT hacen pensar que los inhibidores estudiados presentan una estructura extendida, probablemente dimérica si tenemos en cuenta los resultados de CD a diferentes temperaturas y concentraciones. Por este motivo se planteó la utilización del modelaje molecular para ver si dicha hipótesis es factible y, en tal caso, qué conformación relativa (paralela o antiparalela) es más favorable desde un punto de vista energético.

5.2.1 Minimización de las estructuras monoméricas

Los resultados de dicroísmo muestran que un mayor número de metilos induce un grado de estructuración más elevado, es decir, mayor rigidez, en la cadena peptídica, la cual se dispone, preferentemente, en forma de estructura β .

Con el objetivo de determinar si la conformación extendida, es decir, con todos los enlaces en disposición *trans*, que los inhibidores muestran en los estudios de dicroísmo circular e IR-FT corresponde a un mínimo energético, se escogieron cuatro péptidos representativos para realizar un proceso de minimización. El cálculo se realizó en una celda de agua a pH 7,4 utilizando el programa InsightII Discover 3.0 en condiciones de contorno periódico (PBC) (ver los detalles experimentales en el apartado 8.5.1.4).

Se escogió el péptido **2** como referencia, ya que en el momento de llevar a cabo los cálculos era el inhibidor que mostraba una mayor capacidad inhibidora de la toxicidad de A β . Por otro lado, y basándonos en la estructura de **2**, también se escogió **10** (la secuencia sin N-metilaminoácidos), **6** (péptido dimetilado, en la misma Phe que **2**, y en la Val) y **9** (el péptido trimetilado, en este caso el único posible).

En la Figura 114 se superponen las estructuras de partida con las estructuras minimizadas resultantes para mostrar la variación que se produce durante el proceso de minimización.