



## **Agregats amorfs d'alt pes molecular: membranes, pH i toxicitat del pèptid amiloide en la malaltia d'Alzheimer**

Memòria presentada per Núria Benseny Cases per optar al grau de doctor.

Aquest treball ha estat realitzat a la Unitat de Biofísica i Centre d'estudis en Biofísica del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat Autònoma de Barcelona, sota la direcció del Dr. Josep Cladera Cerdà i la co-direcció del Dr. Manel Sabés Xamaní.

Vist-i-plau del director i del co-director,

Dr. Josep Cladera

Dr. Manel Sabés

Bellaterra, juliol de 2010



Als meus pares



# ÍNDIX

INTRODUCCIÓ .....	1
1. Impacte de la malaltia d'Alzheimer.....	3
2. Perspectiva històrica.....	4
3. Característiques neurològiques .....	6
4. Causes-efectes de la malaltia .....	9
4.1. Hipòtesi de la cascada amiloide .....	10
4.2. Hipòtesi de l'estrés oxidatiu i dels ions metàl·lics .....	12
4.3. Hipòtesi vascular: angiopatia cerebral amiloide.....	14
4.4. Proteïna tau .....	16
4.5. Hipòtesi inflamatòria .....	17
5. Agregats amiloides i plegament de proteïnes .....	18
6. Precursor del pèptid amiloide.....	22
7. Pèptids A $\beta$ i model d'agregació.....	24
8. Elements que afecten la cinètica d'agregació del pèptid .....	27
8.1. Glicosaminoglicans.....	27
8.2. Membranes lipídiques.....	28
8.3. Metalls .....	30
9. Prevenció i tractament.....	31
OBJECTIUS.....	35
MATERIALS I MÈTODES .....	39
1. Reactius .....	41
2. Pèptid.....	42
3. Preparació de les membranes model .....	43
3.1. Preparació de Liposomes Unil·lamelars Grans (LUVs) de 100nM .....	43
3.2. Preparació de membranes model per a l'estudi de permeabilitat de membrana amb ANTS/DPX .....	44
3.3. Marcatge de les membranes model per a l'estudi del potencial de membrana .....	44
4. Mesura del potencial Z de membrana .....	45

4.1. Fonaments teòrics .....	45
4.2. Mesura del potencial Z .....	46
5. Espectroscòpia de Fluorescència.....	47
5.1. Fonaments teòrics .....	47
5.2. Seguiment de les cinètiques de formació de fibres amiloides .	48
5.3. Experiments de permeabilitat de membrana .....	49
5.4. Mesura del potencial de superfície amb la sonda FPE .....	50
5.5. Anisotropia de fluorescència .....	51
6. Espectroscòpia d'infraroig amb transformada de Fourier.....	54
6.1. Fonaments teòrics .....	54
6.2. Estudi de la conformació de biomolècules .....	56
6.3. Funcionament de l'espectròmetre d'infraroig.....	57
6.4. Adquisició d'Espectres i tractament de les dades .....	60
7. Microscòpia Electrònica de Transmissió.....	61
7.1. Fonaments teòrics .....	61
7.2. Mesura.....	63
8. Microscòpia de força atòmica .....	64
8.1. Fonaments teòrics .....	64
8.2. Preparació de la mostra i mesura.....	65
9. Electroforesis natives de gradient.....	65
9.1 Fonaments teòrics .....	65
9.2. Realització de l'electroforesi .....	66
10. Cultius cel·lulars .....	66
10.1. Procés de Tripsinització .....	67
10.2. Comptatge de cèl·lules .....	67
10.3. Crioconservació de les cèl·lules .....	68
10.4. Assaig de viabilitat cel·lular .....	68
10.5. Citometria de flux.....	69
RESULTATS .....	73
CAPÍTOL 1: Morfologia i estructura secundària dels intermediaris presents en el procés d'agregació del pèptid A $\beta$ (1-40) .....	75
1. Mesura de la formació de fibres del pèptid A $\beta$ (1-40) .....	78
2. Espectres d'FTIR.....	79

3. Morfologia dels agregats formats durant el procés de formació de fibres.....	82
4. Discussió.....	85
CAPÍTOL 2: Interacció del pèptid A $\beta$ (1-40) amb membranes biològiques:	
Efecte de la càrrega superficial .....	89
1. Influència de les membranes en la cinètica d'agregació del pèptid A $\beta$ (1-40). Importància de l'estat d'oxidació dels lípids.....	92
2. Efecte de l'oxidació sobre les característiques fisicoquímiques de les membranes .....	93
3. Efecte de la càrrega de les membranes en el procés d'agregació...	95
4. Morfologia dels agregats formats a les membranes .....	97
5. Efecte del pèptid sobre les membranes .....	98
6. Toxicitat cel·lular .....	99
7. Discussió.....	102
CAPÍTOL 3: Influència del pH en el procés d'agregació i en la toxicitat del pèptid A $\beta$ (1-40) .....	
1. El pH a la superfície de la membrana .....	112
2. Espectres d'FTIR.....	114
3. Mesura de la fluorescència de la ThT .....	116
4. Morfologia dels agregats .....	116
5. Electroforesi nativa.....	118
6. Reversibilitat dels agregats a pH 5.5 .....	119
7. Efecte dels agregats a pH baix sobre les membranes .....	121
8. Toxicitat dels agregats d'A $\beta$ (1-40) a pH 5.5 .....	122
9. Discussió.....	123
DISCUSSIÓ GENERAL.....	
1. Les cinètiques d'agregació del pèptid amiloide A $\beta$ (1-40): importància del contraió; estructura beta, oligòmers d'alt pes molecular i fase de latència.....	131
2. Factors que influencien el procés de formació d'agregats amiloides: de les membranes al pH. ....	134
3. Alteracions vasculars, variacions locals del pH i Alzheimer .....	138

4. Els agregats amorfs: importància dels residus histidina i consideració en el context general del plegament de proteïnes.....	141
CONCLUSIONS.....	145
BIBLIOGRAFIA .....	151
PUBLICACIONS .....	167



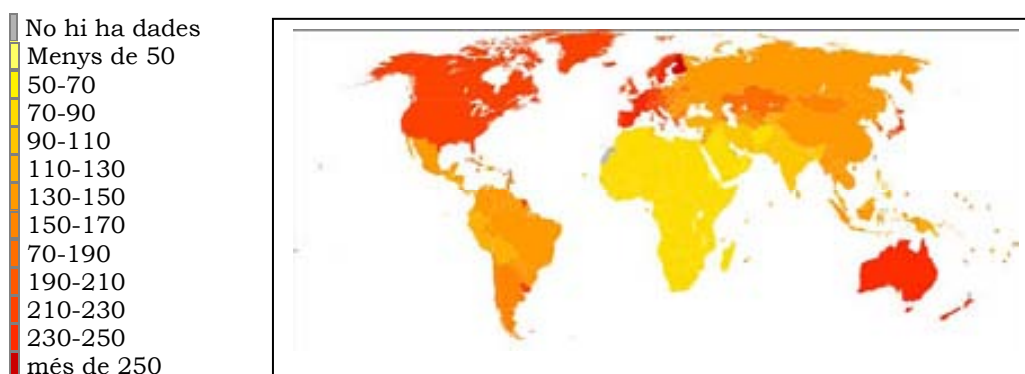
# **INTRODUCCIÓ**



## 1. Impacte de la malaltia d'Alzheimer

La malaltia d'Alzheimer és una de les més freqüents en les societats occidentals i es preveu un augment dels casos en els pròxims anys. El principal factor de risc és l'edat i, per tant, l'envelliment de la població agreuja el nombre de casos de la malaltia que, actualment, ja és una de les que té un impacte social més elevat en les societats occidentals.

Estudis estadístics mostren que el risc de patir la malaltia es duplica cada 5 anys a partir dels 65 anys creixent des de 3 casos nous l'any per cada mil persones en la població de 65 anys fins al 69 per mil en la població de 90 anys. La prevalença de la malaltia segons països es pot veure a la figura 1.



**Figura 1.** Prevalença (casos totals) de la malaltia per països. Les dades són per casos per cada 100.000 habitants l'any 2002.  
[http://www.who.int/healthinfo/global\\_burden\\_disease/estimates\\_country/en/index.html](http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates_country/en/index.html)

Tal com es pot observar en el mapa, als països industrialitzats, en què l'esperança de vida és més alta (Europa Occidental, Estats Units, Canadà i Austràlia), la incidència de la malaltia arriba a ser de més de 250 casos per cada 100.000 habitants (dades de l'any 2002).

L'any 2006, prop de 5,4 milions de ciutadans de la Unió Europea patien una malaltia degenerativa. Les malalties del cervell representen un 35% de les patologies que produeixen incapacitació (mesurant l'impacte de les patologies en termes d'anys totals d'inhabilitació). L'Alzheimer, en concret, en representa un 3%.

Actualment, un 10% de la població més gran de 65 anys i un 50% dels majors de 85 presenta algun tipus de demència. A mesura que la població envellaix, les xifres augmenten i es preveu que seran el doble de les actuals cap a l'any 2040 a l'Europa de l'Oest i el triple a l'Europa de l'Est.

Donat el nombre de pacients, la llargada de la malaltia i els elevats requeriments dels malalts, la malaltia d'Alzheimer resulta ser una de les més cares econòmicament a Europa i als Estats Units. Tot això posa en seriós perill els sistemes de sanitat pública i té importants conseqüències socials. L'assistència a persones afectades de demència implica unes despeses molt elevades. En un estudi recent a Europa, s'ha trobat que el 88% dels cuidadors declararen que havien de contribuir al finançament de l'assistència (residencial o a casa). Els costos actuals lligats a les demències s'estimen en 55 milers de milions d'euros per any a Europa. Aquestes dades i xifres demostren la necessitat de millorar els tractaments actuals per a la malaltia d'Alzheimer i sobretot la necessitat d'introduir tecnologies innovadores.

## **2. Perspectiva històrica**

Al segle XVIII, el terme demència ja tenia un ús clínic i legal per referir-se a estats d'incompetència psicosocial independentment de l'edat, la reversibilitat de la malaltia i els antecedents patològics. Aquest punt de vista es va anar acotant fins que, al segle XIX, ja només s'aplicava a desordres irreversibles (majoritàriament lligats a l'edat) que afectaven a funcions intel·lectuals, particularment a la memòria.

Al 1907, Alois Alzheimer (figura 2) va presentar els resultats de l'autòpsia del cervell d'una pacient seva amb demència, on havia observat plaques, feixos fibril·lars empaquetats, degeneració cel·lular i canvis arterioscleròtics, a més de la mort d'un terç de les cèl·lules corticals. Anteriorment, al 1887, Beljahow ja havia observat plaques en pacients amb demència.

Fou al 1910 que Krapelin va escriure al Handbook de Psiquiatria les observacions d'Alzheimer sobre els casos més greus de demència i es va introduir el terme Malaltia d'Alzheimer (Maurer 2006).



**Figura 2.** Fotografia del Dr. Alois Alzheimer.

Durant varies dècades, hi va haver pocs progressos en l'estudi de la malaltia. La situació no va començar a canviar fins al 1960, quan Michael Kidd (Anglaterra) i Robert Terry (USA) van descriure les dues lesions clàssiques lligades a la malaltia: les plaques senils o neurítiques i els garbuixos neurofibril·lars (Selkoe 2001b).

A mitjans del anys 70, es va observar que les neurones que sintetitzen acetilcolina es veien greument afectades en els casos de la malaltia. Com a conseqüència, la recerca es va centrar en inhibir la degradació de l'acetilcolina i augmentar-ne la síntesi. Així van sorgir dos medicaments específics per al tractament de l'Alzheimer, inhibidors de l'acetilcolinesterasa.

A partir dels anys 80, l'anàlisi immunohistoquímica per a conèixer la composició de les plaques neurítiques o senils i dels garbuixos fibril·lars juntament amb els avanços en genètica molecular van portar al descobriment de les proteïnes i pèptids relacionats amb la malaltia. En aquest punt, es va començar a estudiar el pèptid amiloide (A $\beta$ ) com a component principal de les plaques neurítiques i la proteïna tau com a component principal dels garbuixos neurofibril·lars. Al 1991, es va postular que eren aquests dipòsits d'A $\beta$  els possibles agents causants de la malaltia. Aquest postulat ha evolucionat fins a prendre la forma

del que es coneix actualment com a hipòtesi de la cascada amiloide, de la qual es parla amb detall més endavant.

Pel que fa el tractament, avui en dia, no només no existeix una cura per a la malaltia, sinó que tampoc existeix un mètode de diagnosi clar. Fins a l'actualitat, s'han utilitzat protocols de diagnosi clínica, acuradament dissenyats, que es basen en l'historial clínic familiar i en l'examen neurològic per a comprovar les funcions cognitives. Ara bé, la certesa en el diagnòstic només es pot confirmar mitjançant l'examen post-mortem dels cervells dels malalts (Mucke 2009).

### **3. Característiques neurològiques**

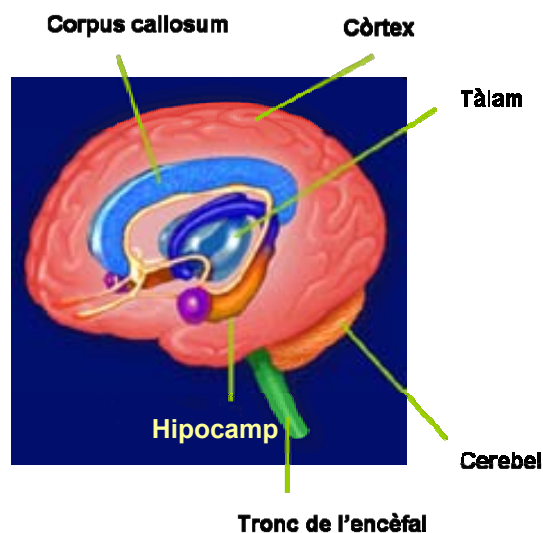
La malaltia d'Alzheimer porta a la mort neuronal i, per tant, a la pèrdua de part del teixit cerebral.

L'estudi histològic de les regions afectades ha portat a la descripció i l'estudi de les dues característiques principals dels cervells dels malalts d'Alzheimer: els garbuixos neurofibril·lars i les plaques neurítiques (Yamaguchi et al. 1991). Aquestes plaques es troben, especialment, en regions de l'hipocamp (que té un paper clau en la formació de nous records) i del còrtex frontal (àrea dedicada a pensar, planejar i recordar), acompanyades de pèrdua de sinapsi i mort neuronal (figura 3). Les neurones que utilitzen glutamat i acetilcolina com a neurotransmisors, són les més afectades per la pèrdua de sinapsi, tot i que també es poden veure afectades les que produeixen serotonina i norepinefrina (Honer 2003; Mattson 2004).

Els garbuixos neurofibril·lars són agregats intracel·lulars de la proteïna tau. Aquesta proteïna, normalment soluble, s'associa als microtúbuls i els estabilitza. Ara bé, en la malaltia d'Alzheimer, la proteïna tau es troba hiperfosforil·lada i agregada formant fibres.

Les plaques neurítiques són dipòsits de fibres i agregats amorfs del pèptid  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) de 10 a 120  $\mu\text{m}$  que presenten un centre més dens de pèptid  $A\beta$  rodejat de neurites.

El pèptid A $\beta$  acostuma a trobar-se associat a altres proteïnes, lípids, glucosaminoglicans i cèl·lules. Les cèl·lules que es troben envoltades pel pèptid presenten danys a l'axó i les dendrites, a més d'estar dilatades, poden tenir els lisosomes més grans, més mitocondris, i garbuixos de neurofilaments.



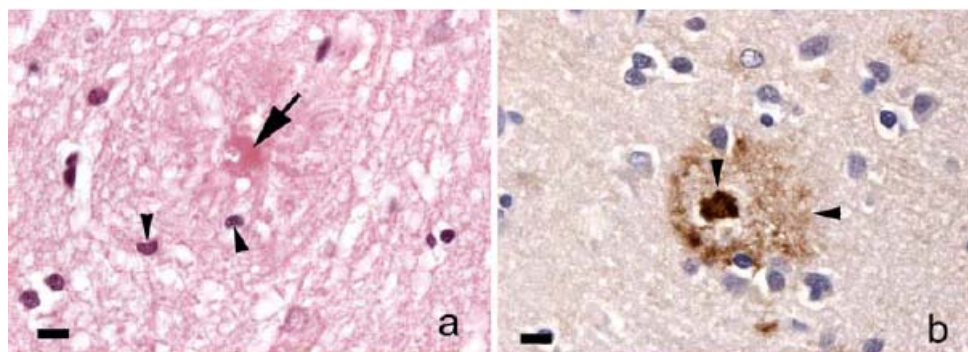
**Figura 3.** Representació esquemàtica del cervell humà en que es mostra la situació del còrtex cerebral i l'hipocamp, parts especialment afectades en la malaltia d'Alzheimer.

Les plaques observades en malalts (figura 4) s'han classificat segons la seva densitat i la seva localització. Les més compactes s'han anomenat plaques denses i el pèptid s'hi troba en forma fibril·lar. La densitat i el grau de compactació varia segons la placa (Duyckaerts et al. 2009). Les plaques amiloides denses són visibles al microscopi si es tenyeixen amb heatoxilina i eosina i el pèptid amiloide que les forma es detecta per tinció amb plata, tioflavina i congo red.

Altres plaques observades són les anomenades plaques difuses o preamiloides, que tenen un aspecte granular amb agregats d'aspecte amorf enlloc de fibres. Aquestes plaques s'han anomenat preamiloides perquè no estan associades a neurites danyades i es poden trobar en individus d'edat avançada sense símptomes de la malaltia. Una de les hipòtesis acceptades és que aquestes plaques podrien provocar els primers danys a les neurites i són precursoras de les plaques neurítiques denses (Selkoe 2001b). Aquest últim fet s'ha constatat

mitjançant un ratolí transgènic que presenta un mutant de la proteïna precursora amiloide humana (APP). En aquest ratolí, podien observar-se dipòsits difusos abans de desenvolupar plaques fibril·lars, positives a tioflavina S.

Les plaques denses s'han anomenat també plaques compactes i en alguns treballs s'han identificat plaques amb un cor fibril·lar i una corona amorfa que s'han anomenat "cored plaques" (Guntert et al. 2006). Altres autors (Duyckaerts et al. 2009) parlen de dipòsits focals (focal deposits), els quals poden ser amiloides (fibril·lars) o no. Aquests dipòsits es tenyeixen amb hemateïna i eosina mentre que les plaques difuses no ho fan. Alguns exemples es poden veure a la figura 4.

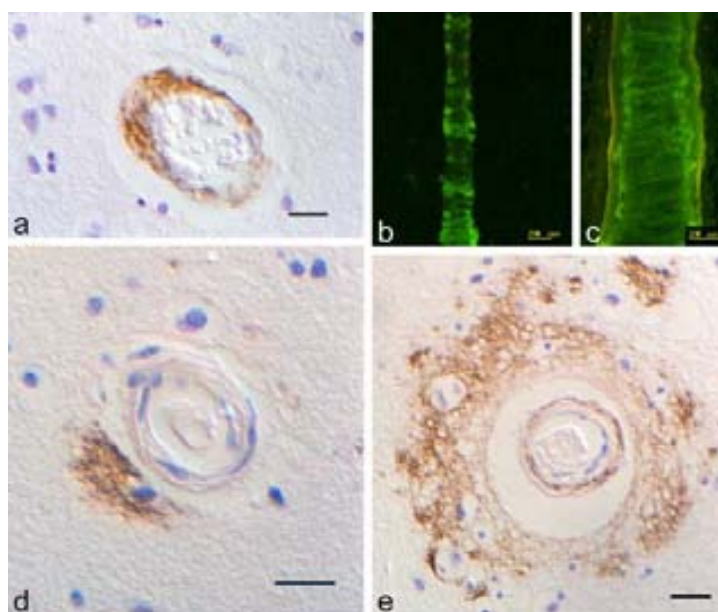


**Figura 4.** (Duyckaerts et al. 2009) (a) Aspecte d'una placa senil després de la tinció amb heamateïn-eosin. El cor amiloide de la placa està indicat amb una fletxa. Els nuclis de les cèl·lules de la microglia es troben indicats amb la punta de la fletxa; (b) dipòsit amiloide després de marcar amb un anticòs anti-A $\beta$  (Dako). Amb fletxes s'indica el dipòsit dens envoltat d'una corona de pèptid menys dens. Barra d'escala = 10  $\mu$ m.

A més de trobar-se en el parènquima cerebral, els cúmuls de pèptid es poden trobar associats als vasos sanguinis o capil·lars (figura 5). Aquests cúmuls s'anomenen dipòsits vasculars. La presència d'agregats amiloides a les parets dels vasos pot anar associada a l'existència de petits infarts corticals i hemorràgies i, per això, la patologia associada a l'existència d'aquests agregats s'ha anomenat angiopatia cerebral amiloide (Duyckaerts et al. 2009; Menon et al. 2009; Weller et al. 2009). L'estructura secundària del pèptid en els diferents tipus de plaques ha estat estudiada en talls de teixit afectat per Microespectroscòpia d'infraroig amb llum de sincrotró (Rak et al. 2007). En aquest treball,



les plaques denses i difuses del ratolí transgènic TgCRND8 s'han tenyit amb congo red (indicatiu de fibres) i se n'ha estudiat l'estructura secundària. Les plaques denses presents als vasos, al còrtex i a l'hipocamp són positives a congo red i l'espectre d'infraroig presenta un pic a  $1623\text{ cm}^{-1}$ , indicatiu d'estructura  $\beta$  agregada. D'altra banda, les plaques difuses no donen fluorescència amb congo red i presenten una banda d'infraroig típica d'hèlix  $\alpha$ . A més, en aquest estudi, s'ha observat un increment de fosfolípid al voltant de les plaques denses.



**Figura 5.** Imatges de les plaques presents en casos d'angiopatia cerebral amiloide (Weller et al. 2009). (a) Artèria cortical amb A $\beta$  a les parets però no a la glia dels voltants (immunohistoquímica de l'A $\beta$ ); (b) deposicions peptídiques en forma de bandes transversals; (c) bandes transversals del peptid amiloide associades a la base de les membranes de les cèl·lules del múscul llis (imatges de microscopia confocal, tinció amb thioflavina T); (d) Immunohistoquímica de l'A $\beta$  a les artèries corticals amb peptid només al voltant de la glia; (e) dipòsits d'A $\beta$  a la part de l'artèria i al voltant de la glia. Barra d'escala =20  $\mu\text{m}$

#### 4. Causes-efectes de la malaltia

La malaltia d'Alzheimer és una patologia complexa de la qual, avui en dia, encara no se n'ha determinat la causa o les causes. Fins al moment, han sorgit diverses hipòtesis de quins serien els factors desencadenants de la malaltia, les quals presenten molts punts en comú. A continuació es presenten, de manera resumida, les més rellevants.

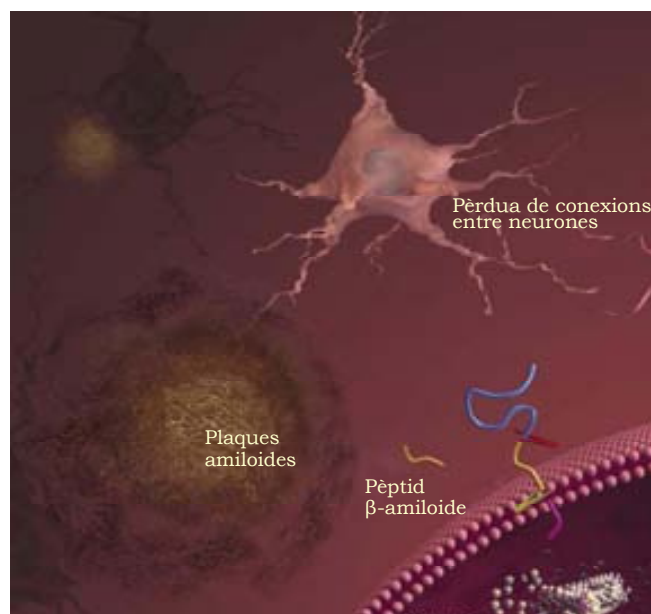
#### **4.1. Hipòtesi de la cascada amiloide**

Tot i que el debat al voltant de la causa de l'Alzheimer segueix ben viu, la hipòtesi amiloide és la més acceptada actualment (figura 6). Existeixen evidències que indiquen que els pèptids amiloides podrien ser la causa de la malaltia. Algunes d'aquestes evidències són:

- Les plaques amiloides típiques dels cervells afectats estan majoritàriament formades per pèptids amiloides de 40 i 42 residus (Selkoe 2001a).
- En els casos de malaltia familiar d'Alzheimer (una forma de la malaltia que es troba en pacients més joves) es troben mutacions en la proteïna precursora amiloide que, en ser processada per les secretases, dona lloc al pèptid amiloide. Aquestes secretases també poden tenir mutacions que donarien lloc a casos familiars de la malaltia.
- Una major incidència de la malaltia en individus amb síndrome de Down. La proteïna precursora amiloide (APP) es troba codificada al cromosoma 21, per la qual cosa un duplicat d'aquest gen implica un augment d'expressió de l'APP i, per tant, dels pèptids amiloides.
- Els estudis de toxicitat in vitro han demostrat que els pèptids amiloides són tòxics en cultius cel·lulars.

L'estudi de les plaques neurítiques en relació a la malaltia d'Alzheimer mostra com la presència d'aquestes es pot relacionar clarament amb l'avanç de la malaltia i que ja es troben presents en els primers estadis. En una primera instància es va apuntar a les fibres presents en moltes de les plaques com a agent tòxic en la malaltia. En el treball presentat per Tiraboschi et al. (Tiraboschi et al. 2004), es relaciona la presència de plaques neurítiques de pèptid amiloide (detectat per tioflavina S, indicativa de fibres) i els garbuixos de neurofilament amb la malaltia a partir d'autòpsies de pacients d'Alzheimer amb diferent grau de demència. El treball conclou que només les plaques neurítiques es troben presents en els primers estadis de la malaltia i que, al contrari

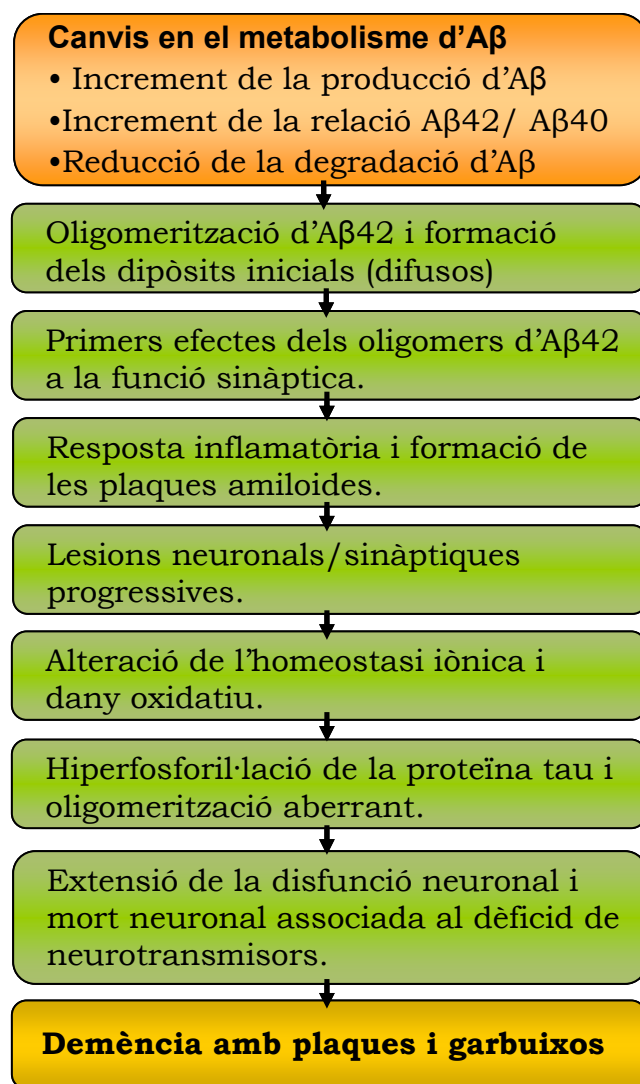
que els garbuixos neurofibril·lars, augmenten significativament en estadis més avançats.



**Figura 6.** Esquema de la formació de plaques amiloides a partir del pèptid A $\beta$ . [http://www.web-books.com/eLibrary/Medicine/Neurological/Alzheimer\\_Amyloid.htm](http://www.web-books.com/eLibrary/Medicine/Neurological/Alzheimer_Amyloid.htm)

Una variació de la hipòtesi de la cascada amiloide és la que assenyala que l'augment de la relació dels pèptids A $\beta$ (1-42)/A $\beta$ (1-40) podria augmentar el risc de malaltia (Chiang et al. 2008; Jan et al. 2008).

Ara bé, la variació amb més rellevància que s'ha produït en els últims anys en el marc de la hipòtesi amiloide és la que ha desplaçat el protagonisme de les fibres als oligòmers que es formen durant la fase de latència, com a possibles agents causants de la toxicitat del pèptid. Hi ha indicis experimentals de què els oligòmers dels pèptids amiloides A $\beta$ (1-40) i A $\beta$ (1-42) (precursors de les fibres amiloides) són tòxics in vitro i in vivo (Glabe 2005; Walsh i Selkoe 2007) i s'han pogut aïllar de cervells de ratolins model (Lesne et al. 2006) i d'humans afectats per la malaltia (Shankar et al. 2008). Un esquema de la formulació actual d'aquesta hipòtesi es mostra a la figura 7. En aquest esquema, s'anomena també la relació entre aquesta hipòtesi i algunes de les que s'expliquen a continuació.



**Figura 7.** Esquema actualitzat de la hipòtesi de la cascada amiloide, traduït de Haas i Selkoe (Haass i Selkoe 2007).

#### **4.2. Hipòtesi de l'estrés oxidatiu i dels ions metàl·lics**

Nombrosos estudis en models animals de la malaltia d'Alzheimer han permès observar l'existència de dany oxidatiu en el sistema nerviós central (Butterfield et al. 2009; Butterfield i Lange 2009), un excés de producció d'espècies reactives d'oxigen i de nitrogen, i una desregulació dels mecanismes antioxidants de defensa en estudis in vitro (Moreira et al. 2009; Reddy et al. 2009). En aquests estudis, s'observa oxidació de proteïnes, un excés de glicoxidació i de glicosilació complexa, peroxidació de lípid i dany a àcids nucleïds. Estudis in situ d'hibridació de DNA mitocondrial, d'immunohistoquímica i micrografies

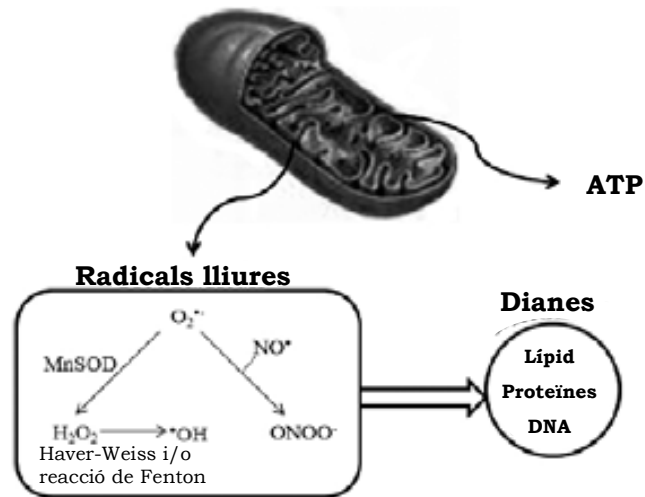
electròniques de biòpsies de cervells humans han mostrat un increment del dany oxidatiu en malalts d'Alzheimer (Hirai et al. 2001).

La causa de l'oxidació no està clara. Alguns autors apunten a l'acumulació de cations metàl·lics ( $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ) com a desencadenants de l'estrès oxidatiu. També s'ha apuntat la metionina 35 del pèptid amiloide com a causant donada l'elevada capacitat d'oxidació d'aquest residu en presència de cations de  $\text{Fe}^{3+}$  i  $\text{Cu}^{2+}$  (Boyd-Kimball et al. 2004). Estudis per espectroscòpia Raman han permès observar un augment de metionina oxidada en plaques senils (Dong et al. 2003).

Ara bé, alguns autors, com Swerdlow i Khan (Swerdlow i Khan 2004), proposen la "hipòtesi de la cascada mitocondrial" en què l'estrès oxidatiu causaria un augment de la producció dels pèptids amiloides, que, a la vegada, augmentarien l'estrès oxidatiu, desencadenant els mecanismes apoptòtics de la cèl·lula. Aquest fet implicaria la fosforilació de la proteïna tau i la producció de neurofilaments. Aquesta hipòtesi es pot veure esquematitzada a la figura 8.

Com ja s'ha dit, una possible causa d'oxidació s'ha deduït a partir de la presència de metalls en les plaques amiloides. La concentració de metalls amb funcions neurobiològiques, com el coure, el zinc i el ferro, es troben augmentades en malalties com l'Alzheimer o el Parkinson (Barnham i Bush 2008). Normalment, aquests metalls es troben en concentracions de traces, tenen funcions essencials i s'acostumen a trobar units a lligands, encara que també es poden trobar com a espècies lliures en l'espai sinàptic quan hi ha un alliberament de zinc i coure durant la sinapsi (Geula i Mesulam 1995).

A concentracions fisiològiques, el zinc extracel·lular és un modulador dels receptors glutaminèrgics. Quan es troba a l'interior cel·lular, el zinc intervé en la modulació de la cadena de transport d'electrons al mitocondri, inhibint-la en diferents punts a més de modular senyals apoptòtics. Ara bé, el zinc és un catió potencialment tòxic que es troba involucrat en lesions cerebrals en casos d'isquèmia, epilèpsia i traumes cerebrals. L'homeòstasi del zinc és sensible a canvis com l'acidosi, la inflamació i l'estrès oxidatiu, fets molt lligats a la malaltia d'Alzheimer.



**Figura 8.** Esquema del doble rol dels mitocondris: Producció d'ATP i d'espècies reactives d'oxigen (Moreira et al. 2009).

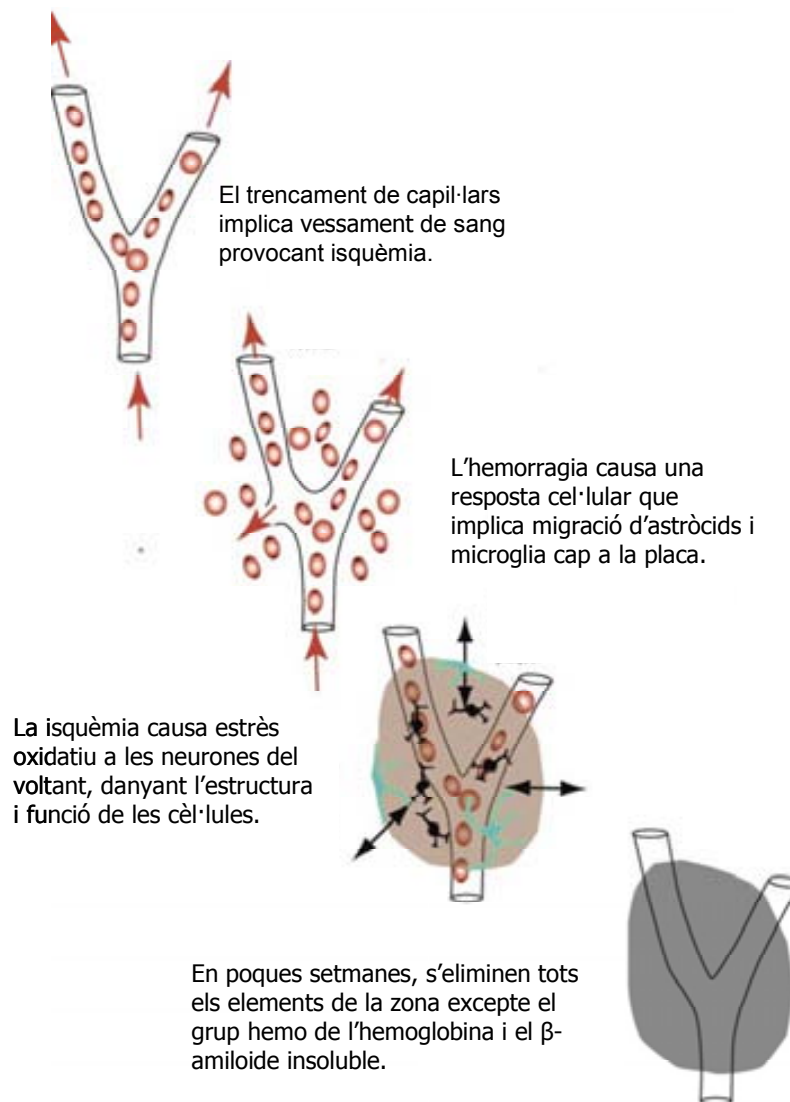
Sembla ser que els mecanismes pels quals el zinc indueix toxicitat és a través de la producció d'espècies reactives d'oxigen, així com per la interrupció d'activitats enzimàtiques i, finalment, per l'activació de processos apoptòtics i necròtics. A més, el zinc sembla induir l'agregació i la formació de plaques de pèptid A $\beta$ , el que porta a pensar que una alteració de l'homeòstasi d'aquest catió pot afavorir processos neurodegeneratius associats a l'edat (Capasso et al. 2005).

De la mateixa manera que el zinc, la forma reduïda del coure (Cu(II)) pot reaccionar amb l'oxigen generant espècies reactives d'oxigen, ions superòxid, peròxid d'hidrogen i radicals hidroxils capaços de causar estrès oxidatiu a la cèl·lula. A més, la interacció del coure amb els pèptids amiloides afavoreix la formació d'agregats i, per tant, de les plaques. L'estudi d'aquests agregats formats en presència de coure ha permès veure que són més tòxics que els que forma el pèptid sol a pH neutre (Smith et al. 2007).

#### **4.3. Hipòtesi vascular: angiopatia cerebral amiloide**

Tant les malalties cardiovasculars com la malaltia d'Alzheimer són malalties freqüents lligades a l'edat i que, de vegades, poden trobar-se al mateix pacient. Els mateixos factors de risc de les malalties

cardiovasculars, com ser fumador, tenir la pressió arterial alta o el colesterol alt, són aplicables a la malaltia d'Alzheimer.



**Figura 9.** Diagrama esquemàtic de la formació de plaques iniciada per una microhemorràgia. Figura traduïda del treball d'Stone (Stone 2008).

Diferents autors han observat que les plaques amiloides es troben majoritàriament associades a microvasos (Kawai et al. 1992; de la Torre 2000). Aquest últim autors presenten evidències experimentals que demostren que l'hipoperfusió (reducció del flux sanguini) dels capil·lars cerebrals pot causar pèrdues cognitives severes i, fins i tot, pèrdues de memòria característiques de la malaltia d'Alzheimer. Aquesta hipoperfusió pot portar a l'isquèmia, és a dir, a la disminució del reg

sanguini i de l'aportació d'oxigen al teixit, provocant estrès oxidatiu a les neurones del voltant del vas (Kumar-Singh et al. 2002).

Estudis immunohistoquímics (Cullen et al. 2006), en què s'ha utilitzat un anticòs específic per pèptids amiloides i marcadors específics de microhemorragies, han mostrat que les plaques amiloides i les microhemorragies es troben en les mateixes regions del còrtex superior frontal. Stone i col·laboradors (Stone 2008) assenyalen que la idea que petites hemorràgies causin la formació de plaques pot ser una indicació que el trencament dels vasos sigui la causa de la demència. En aquest mateix treball, Stone proposa que les plaques amiloides s'iniciarien a partir d'una microhemorràgia causant isquèmia, que implicaria una sobreproducció de pèptids A $\beta$ . Aquests autors proposen que alguns components de la sang, com l'hemoglobina, podrien interaccionar amb el pèptid amiloide afavorint la formació d'oligòmers, que serien els responsables del dany cel·lular. Finalment, l'associació d'aquests oligòmers portaria a la formació de la placa. Aquest procés es pot veure esquematitzat a la figura 9.

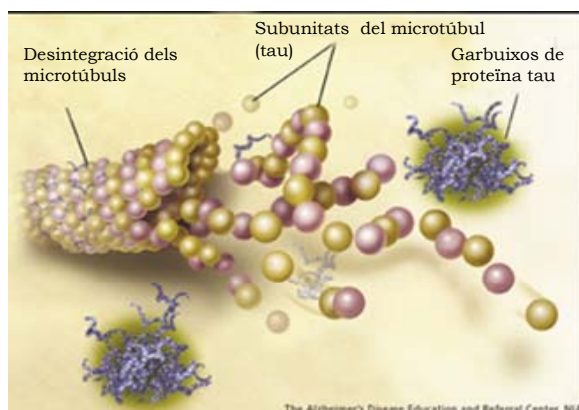
#### **4.4. Proteïna tau**

Com ja s'ha comentat a l'inici de la introducció, a més de les plaques neurítiques, l'altra característica típica dels estudis post-mortem de cervells de malalts d'Alzheimer és la presència de neurofil·laments de la proteïna tau fosforil·lada. La correlació dels estadis de la malaltia amb les característiques neurològiques han mostrat que la presència de garbuixos neurofibril·lars apareixen en estadis avançats de la malaltia, a diferència de les plaques neurítiques que es troben presents des dels primers símptomes de la malaltia (Tiraboschi et al. 2004).

En condicions fisiològiques, la proteïna tau es troba soluble i, a concentracions altes als axons de les neurones. La funció d'aquesta proteïna és l'estabilització dels microtúbuls i participa en el transport de vesícules. Tant en la malaltia d'Alzheimer com en altres desordres neurològics anomenats tautopaties, aquesta proteïna es troba



hiperfosforil·lada i agregada. A la figura 10, s'esquemmatitza aquest procés.



**Figura 10.** Gràfic de la desagregació dels microtúbuls i agregació de la proteïna tau degut a una hiperfosforil·lació d'aquesta.

Tal com passa amb el pèptid A $\beta$ , els intermediaris dels agregats de la proteïna tau són tòxics (Khlistunova et al. 2006). D'altra banda, els filaments insolubles de la forma fosforil·lada de la proteïna tau són inerts i s'ha trobat que la càrrega de garbuixos neurofibril·lars no és proporcional a la disminució del transport axonal ni a la mort neuronal. De fet, es creu que aquestes fibres podrien segrestar els intermediaris tòxics d'agregats de la proteïna tau, tenint així un efecte protector (Querfurth i LaFerla; Andorfer et al. 2003).

Alguns autors apunten que les vies de fosforil·lació es troben alterades en els cervells dels malalts d'Alzheimer, on es troben tant fosfatases com quinases anormalment fosforil·lades. Aquestes fosforil·lacions afecten tant la via de producció de pèptids A $\beta$  com la proteïna tau (Chung 2009).

#### **4.5. Hipòtesi inflamatòria**

Tot i que fa 20 anys que es van trobar els primers indicis que els processos inflamatoris podien estar relacionats amb la malaltia d'Alzheimer, moltes qüestions i detalls són encara desconeguts (Cameron i Landreth 2009). En els cervells dels malalts d'Alzheimer es pot veure com la deposició de pèptids amiloides provoca l'activació de la

microglia i la producció de molècules proinflamatòries. En un inici, la microglia i els astròcits degradarien el pèptid amiloide. Tanmateix, una activació crònica provoca un increment d'expressió del complex d'histocompatibilitat II a la superfície de la cèl·lula que desemboca en un augment de la secreció de citoquines proinflamatòries, de factors de necrosis tumorals  $\alpha$ , citoquines i la proteïna 1- $\alpha$  en macròfags (Akiyama et al. 2000). Juntament amb les cèl·lules vasculars, la microglia expressa receptors de productes finals de glicosilació avançada, que uneixen A $\beta$  i amplien la concentració de citoquines, glutamat i òxid nítric (Yan et al. 1996). Aquest últim pot implicar la producció de radicals lliures que podrien comprometre la integritat i la viabilitat cel·lular a partir de dany mitocondrial (Togo et al. 2004).

Cal comentar que també existeixen hipòtesis relacionades amb el colesterol i el seu metabolisme, amb processos de senyalització de la insulina, amb el cicle cel·lular, el calci o els neurotransmissors ja que tots aquests factors també es veuen afectats per la malaltia (Querfurth i LaFerla).

### **5. Agregats amiloides i plegament de proteïnes**

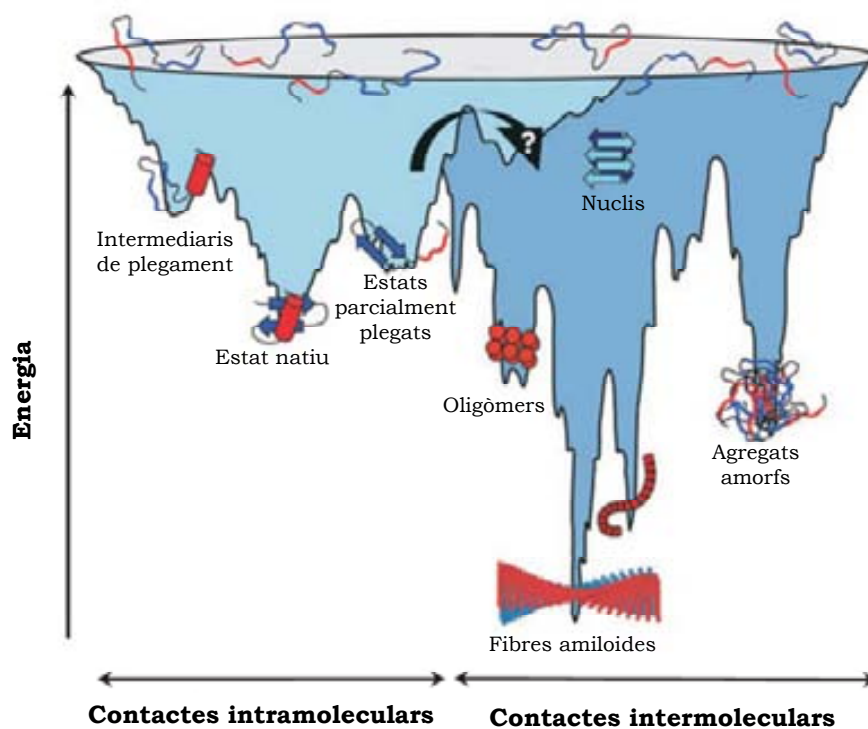
Actualment, existeixen nombroses evidències que indiquen que l'estructura nativa d'una proteïna correspon a la forma més estable en condicions fisiològiques. Tot i això, la manera com assoleix la seva conformació nativa tot just s'està començant a resoldre.

En el camp del plegament de proteïnes, existia l'anomenada *Paradoxa de Levinthal*, que explicava que si una proteïna mitjana explorés totes les possibles conformacions, trigaria més temps en assolir la seva conformació nativa que l'edat calculada de l'univers.

Les idees més actuals superen, però, aquest problema plantejant el plegament de la seqüència polipeptídica com una cerca estocàstica de totes les possibles conformacions que podria adoptar la molècula. En aquesta cerca, els contactes correctes (aquells que es donen en l'estat

natiu) dirigeixen el plegament de la proteïna polipeptídica cap a la seva estructura nativa, a través d'intermediaris del plegament cada cop més semblants a l'estructura nativa (Dobson 2004).

Els mapes d'energia permeten representar els estats d'energia dels diferents intermediaris i possibles plegaments de la proteïna. Aquests mapes descriuen l'energia d'una cadena polipeptídica en funció de les seves propietats conformacionals. El mapa energètic corresponent al plegament d'una proteïna capaç de formar agregats es pot veure a la figura 11.



**Figura 11.** Mapa energètic del procés de plegament de proteïnes. L'esquema representa multitud de conformacions que porten a l'estat natiu mitjançant interaccions intramoleculares o a la formació de fibres o agregats amorfs mitjançant interaccions intermoleculares (Jahn i Radford 2005).

La part esquerra de la figura (blau clar) mostra com una cadena polipeptídica pot adoptar qualsevol conformació possible amb la mateixa energia. L'energia seria menor només en situacions en què les interaccions formades fossin correctes; és a dir, més estables. Així, el plegament avançaria per aquest mapa energètic en forma d'embut cap a conformacions més estables fins assolir l'estat natiu.

Seguint mecanismes encara poc coneguts, les fluctuacions conformacionals que experimenten els intermediaris del plegament en el procés que porta a l'estat natiu poden, en determinades condicions, generar agregats moleculars més estables que en l'estat natiu (part dreta de la figura 11, blau marí).

Aquests agregats, poden ser amorfs, o bé, adoptar una estructura fibril·lar molt ordenada i poden existir en equilibri termodinàmic amb l'estat natiu i desnaturalitzat. Algunes mutacions puntuals en la seqüència peptídica (amiloïdosi d'origen hereditari o esporàdic), l'aparició d'espècies que afavoreixin la formació de nuclis i que incloquin la seqüència nativa (malaltia d'Alzheimer i Encefalopaties Espongiformes) i canvis en el pH local poden afavorir la formació de les formes agregades. Aquests agregats són especialment importants degut a la relació directa que tenen amb algunes malalties, les quals s'han anomenat conformacionals degut al canvi d'estructura de la proteïna que implica la formació d'aquests agregats.

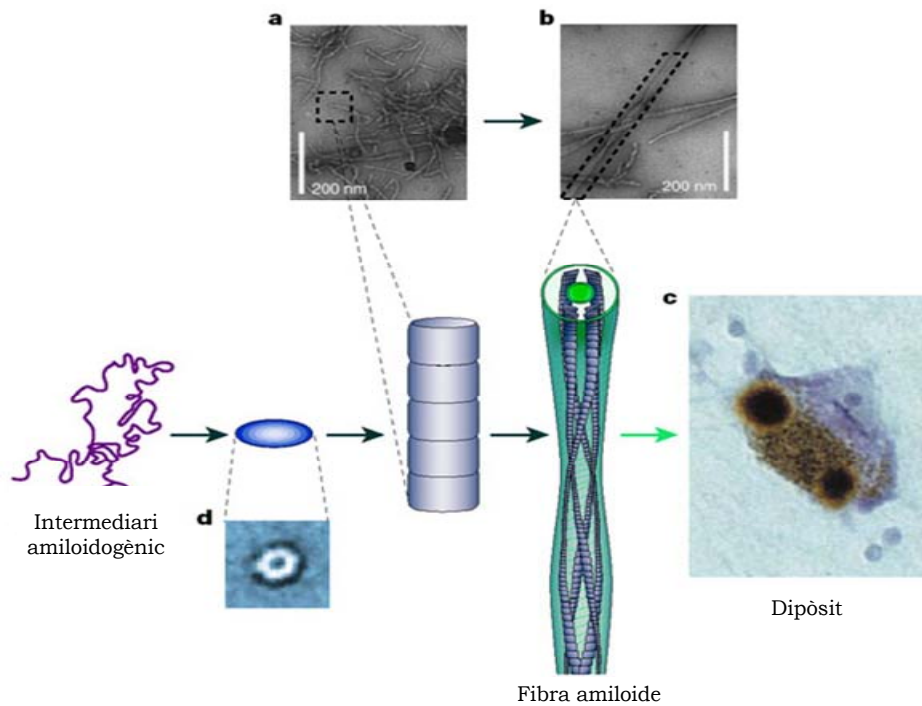
Actualment, es coneixen més de 20 pèptids i proteïnes que poden adoptar una estructura diferent a la nativa afavorint la formació d'agregats amb la possible formació de fibres.

<b>Malaltia</b>	<b>Proteïna</b>	<b>Lloc de Plegament</b>
Hipercolesterolèmia	Receptor de lipoptoteïna de baixa densitat	Reticle endoplasmàtic
Fibrosi quísitca	Regulador transmembranal de la fibrosi quísitca	Reticle endoplasmàtic
Fenilcetonúria	Fenilalanina hidroxilasa	Citosol
Malaltia de Huntingtton	Huntingtina	Citosol
Síndrome de Marfan	Fibril·lina	Reticle endoplasmàtic
Osteogènesi imperfecta	Procol·lagen	Reticle endoplasmàtic
Anèmia faciforme	Hemoglobina	Citosol
Deficiència de $\alpha$ -Antitripsina	$\alpha$ -Antitripsina	Reticle endoplasmàtic
Malaltia de Tay-Sachs	$\alpha$ -Hexosaminidasa	Reticle endoplasmàtic
Malaltia d'Alzheimer	Pèptid $\beta$ -amiloide/Proteïna tau	Reticle endoplasmàtic
Malaltia de Parkinson	$\alpha$ -sinucleïna	Citosol
Malaltia de Creutzfeldt-Jakob	Proteïna priònica	Reticle endoplasmàtic
Amiloïdosis familiar	Transtiretina/lisozim	Reticle endoplasmàtic
Retinitis pigmentosa	Rodopsina	Reticle endoplasmàtic
Cataractes	Cristalins	Citosol
Càncer	p53	Citosol

**Taula 1.** Malalties relacionades amb el plegament anòmal de proteïnes (Dobson 2004).

En la taula 1 es mostra alguns exemples de proteïnes i la malaltia que causa l'agregació d'aquestes. A més de les proteïnes i pèptids relacionats amb alguna malaltia, també existeixen proteïnes amb tendència a agregar-se no relacionades amb cap malaltia, com ara el mòdul SH3 de la proteïna quinasa P13 o homopolímers, com la politreonina o la polilisina (Laurine et al. 2003; Dobson 2004).

En la majoria de casos, sembla que el cor de la fibra es troba estabilitzat per ponts d'hidrogen que s'estableixen al llarg de la cadena polipeptídica (Sunde i Blake 1997). El fet que aquestes proteïnes i pèptids no tinguin seqüències polipeptídiques semblants ni comparteixin un origen comú, però tinguin capacitat de formar fibres, porta a pensar que podria existir un mecanisme general d'agregació. Aquest procés es pot veure a la figura 12.



**Figura 12.** Esquema de la formació de fibres (Dobson 2003). Pèptids o proteïnes desplegats o parcialment desplegats s'associen entre ells per formar agregats solubles, que a la vegada s'associen per a formar protofibril·les o protofibrils (a) i posteriorment fibres (b). Les fibres sovint s'acumulen en plaques o altres estructures com els cossos de Lewy associats a la malaltia de Parkinson (c). Micrografies electròniques de (Fandrich i Dobson 2002) Alguns dels intermediaris primerencs semblen ser amorfs i altres tenen forma rodona amb diàmetres d'aproximadament 10 nm (d) (Lashuel et al. 2002).

Les fibres amiloides formades pels diferents tipus de proteïnes presenten característiques comunes:

- Es tenyeixen amb congo red i donen lloc a birefringència de color verd si són observades sota llum polaritzada.
- Uneixen tioflavina T donant lloc a complexos fluorescents.
- Tenen una morfologia fibril·lar no ramificada de 6-10 nm de diàmetre quan s'observen per microscòpia electrònica. Són estructures fibril·lars helicoidals formades per dos o més filaments (Goldsbury et al. 1999; Serpell et al. 2000).
- Les cadenes polipeptídiques adopten una estructura de fulla  $\beta$  creuada, on les fulles  $\beta$  s'orienten perpendicularment a l'eix longitudinal de la fibra.
- Són resistents a l'acció de proteases.

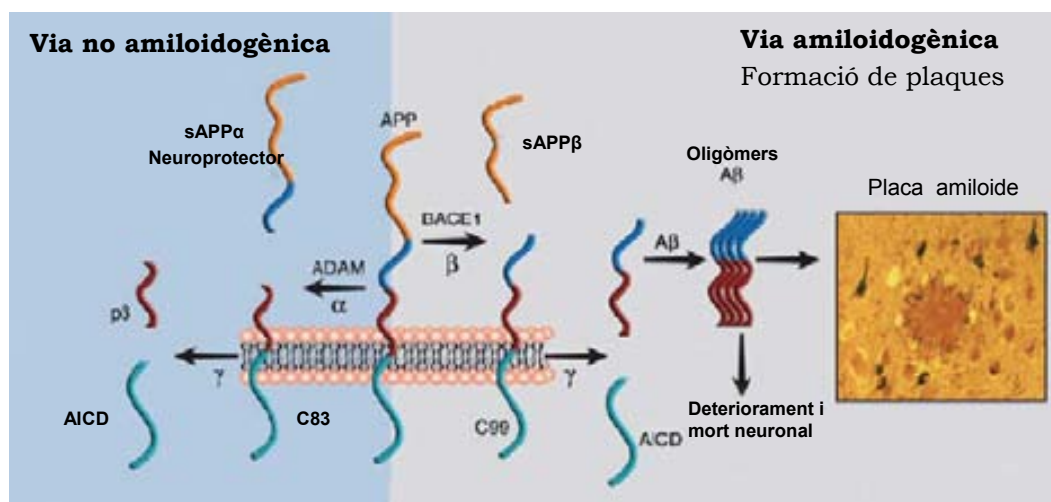
## **6. Precursor del pèptid amiloide.**

Els components majoritaris de les plaques neurítiques són els pèptids amiloides que tenen de 39 a 42 aminoàcids i són producte del processament de l'APP (de l'anglès amyloid precursor peptide).

L'APP és una proteïna que pot tenir de 695 a 770 aminoàcids amb un sol domini transmembrana, l'extrem N terminal glicosilat a l'espai extracel·lular i l'extrem C terminal, més curt i citoplasmàtic. Aquesta proteïna es presenta en diferents isoformes i diferents modificacions postraduccionals i és transportada al llarg de l'axó cap als terminals presinàptiques on s'acumula.

La funció de l'APP no està del tot clara, però sembla que regula la supervivència neuronal, el creixement de neurites, la plasticitat sinàptica i l'adhesió cel·lular (Mattson 1997). També s'han trobat evidències de la participació de l'APP en el tràfic de vesícules a través de l'axó (Kamal et al. 2000). Una altra possible funció de l'APP és la de receptor de superfície que transmet senyals com a resposta a un lligand extracel·lular. Ara bé, ni el lligand ni la cascada que es desencadenaria han estat dilucidats (Kimberly et al. 2001).

L'APP és processada específicament per enzims específics: les secretases. És sabut que l'acció conjunta de tres secretases ( $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ ) dóna lloc a diferents pèptids que varien en la seva longitud. Diferents estudis apunten que el processament de l'APP pot tenir lloc mitjançant dues vies, una que dóna lloc a pèptids amiloidogènics, que poden formar plaques amiloides, i una altra no amiloidogènica (Monsonigo et al. 2001; Lichtenthaler i Haass 2004) (figura 13).



**Figura 13.** Processament proteolític de la proteïna APP per la via amiloidogènica i via no amiloidogènica (Lichtenthaler i Haass 2004). En la via amiloidogènica, la proteasa  $\beta$ -secretasa (BACE1) talla la proteïna APP alliberant un fragment soluble (sAPP $\beta$ ) quedant un fragment de 99 residus (C99). Aquest fragment és processat per la  $\gamma$ -secretasa alliberant el pèptid A $\beta$  i generant un domini intracel·lular de l'APP (AICD). L'agregació d'aquest pèptid porta al deteriorament i mort neuronal. La via no amiloidogènica en què es genera el pèptid neuroprotector i neurotròfic sAPP $\alpha$  i es produeix per l'acció de l' $\alpha$ -secretasa de la família de metal·loproteases ADAM.

La via amiloidogènica es dóna quan la  $\beta$ -secretasa talla l'extrem N terminal alliberant un fragment N terminal soluble i un de C terminal de 99 residus que queda a la membrana. Aquest fragment experimenta un segon processament per la  $\beta$ -secretasa donant lloc a fragments anomenats  $\beta$ -amiloides (A $\beta$ ) que poden tenir de 39 a 43 residus i són capaços d'agregar per formar plaques.

La via freqüent, però, és la no amiloidogènica en què l' $\alpha$ -secretasa talla l'APP alliberant un fragment extracel·lular soluble (p3), probablement amb propietats neuroprotectores, quedant un fragment C terminal inserit a la membrana i que acaba essent degradat als lisosomes.

Aquesta via, a més a més, evita l'acció de la  $\beta$ -secretasa i, per tant, la posterior formació dels pèptids amiloides.

## 7. Pèptids A $\beta$ i model d'agregació

La naturalesa de les plaques neurítiques es va descobrir definitivament l'any 1984. El pèptid amiloide present a les plaques té de 39 a 43 residus però la població majoritària està formada per un fragment de 40 residus, l'A $\beta$ (1-40), i un de 42 residus, l'A $\beta$ (1-42). La seqüència de l'A $\beta$ (1-40), pèptid utilitzat en aquest treball, es mostra a continuació.



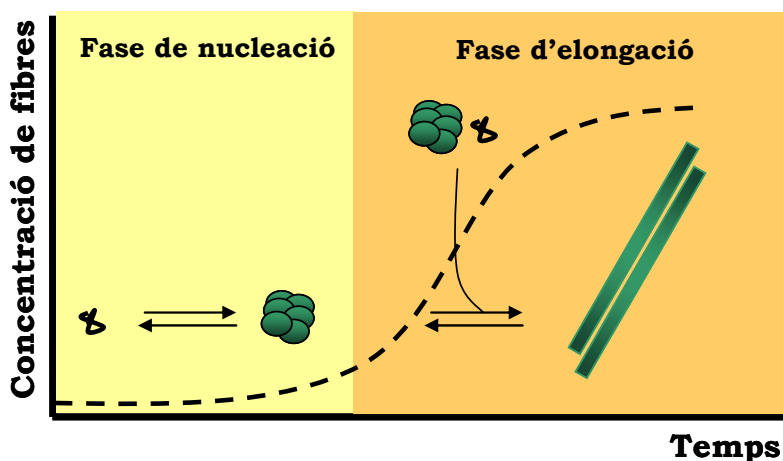
S'han assenyalat en blau els residus acídics carregats negativament a pH neutre; en vermell, els residus bàsics carregats positivament a pH neutre; en taronja, els residus histidines, que tenen un pK de 6 i, en verd, els dos fragments hidrofòbics de la seqüència.

El pèptid és secretat a l'espai extracel·lular en forma monomèrica on, mitjançant un procés de polimerització, forma les fibres típiques de les plaques senils. Aquest procés d'associació, a més, comporta canvis en l'estructura secundària del pèptid. Es coneix que el pèptid es troba en forma desordenada quan és monomèric i que adopta una estructura típica de fulla  $\beta$  quan es troba formant fibres (Makin i Serpell 2005). La bibliografia sobre l'estudi del procés d'agregació i dels canvis en l'estructura secundària del pèptid és extensa i sovint les condicions d'estudi i la manera de dissoldre el pèptid varia d'un estudi a un altre.

La cinètica de formació de les fibres in vitro es defineix a la bibliografia com a sigmoïdal, el que normalment s'interpreta com a un procés de polimerització nucleada. En aquest tipus de processos, es defineixen dues fases clarament. La primera fase, anomenada de latència o nucleació, és la més lenta i consisteix en l'associació de monòmers per a formar oligòmers de baix pes molecular, que també poden associar-se



formant oligòmers d'alt pes molecular. En una segona fase, aquests oligòmers serveixen de nucli per a la formació de fibres, tant per acoblament d'oligòmers com per addició de monòmers a aquests nuclis. Aquest procés es mostra de forma esquemàtica a la figura 14.

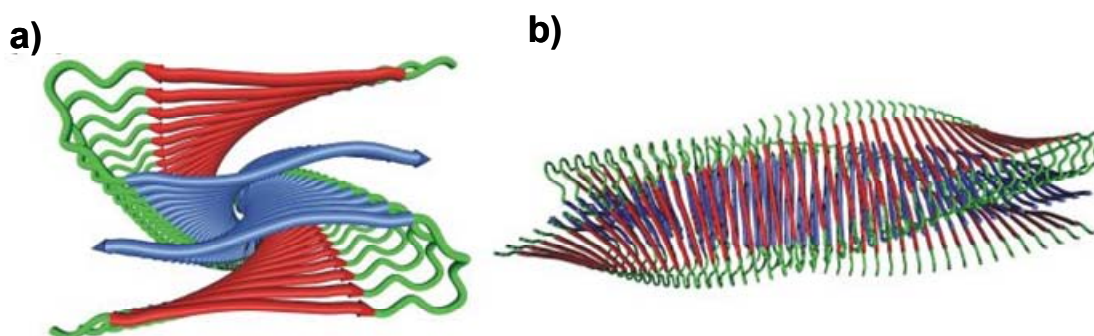


**Figura 14.** Model d'agregació del peptid A $\beta$ : Procés de polimerització nucleada.

El detall molecular que defineix aquestes dues fases està encara per aclarir i existeixen diferents interpretacions pel que fa el nombre i l'estructura dels intermediaris que portarien a la formació de nuclis i fibres.

Entre els monòmers i les fibres s'han definit a la literatura diferents intermediaris de baix pes molecular (2-8 monòmers) i de més alt pes molecular (20-40 monòmers) (Walsh et al. 1999; Kirkitadze et al. 2001; Caughey i Lansbury 2003). Bitan i col·laboradors han presentat mecanismes diferents de formació d'oligòmers pels peptids A $\beta$ (1-40) i A $\beta$ (1-42). El treball descriu una formació ràpida de pentàmers i hexàmers d'A $\beta$ (1-42) per a la posterior formació de protofibril·les. En canvi, descriu que l' A $\beta$ (1-40) es manté en un equilibri de monòmers, dímers, trímers i tetràmers (Bitan et al. 2003). Hi ha molts estudis dedicats a la caracterització morfològica dels oligòmers i sembla haver-hi consens en què presenten una morfològia esfèrica. Aquest fet ha estat descrit per microscòpia electrònica de transmissió i microscòpia de força atòmica (Antzutkin 2004). La importància de la caracterització

d'aquestes formes intermediàries rau en les evidències que la toxicitat el pèptid està lligada a la presència d'aquestes estructures oligomèriques. Durant la fase d'elongació, aquests nuclis formarien protofil·laments que s'unirien per a la formació de fibres. La interpretació dels patrons obtinguts per difracció de raigs X sembla indicar que les fibres estarien formades per 5 o 6 protofil·laments de 28Å d'amplada al voltant d'un eix central. Aquestes mesures són compatibles amb els resultats obtinguts per microscòpia (Malinchik et al. 1998; Petkova et al. 2002). Cada protofibril·lament estaria format per dues làmines de pèptids col·locades seguint un motiu de  $\beta$  creuada (figura 15). Estudis de difracció aplicats a fibres formades per altres pèptids amiloidogènics, com són fragments de la proteïna priònica, han permès veure que el monòmer també s'estructura en forma de  $\beta$  creuada (Gazit 2002; Marshall i Serpell 2009).



**Figura 15.** Representació gràfica de l'organització del monòmer en les fibres des d'una visió perpendicular (a) a l'eix de creixement de les fibres i una visió paral·lela (b). En blau es representa el fragment C-terminal del pèptid (hidrofòbic) i en vermell l'N-terminal (Petkova et al. 2006).

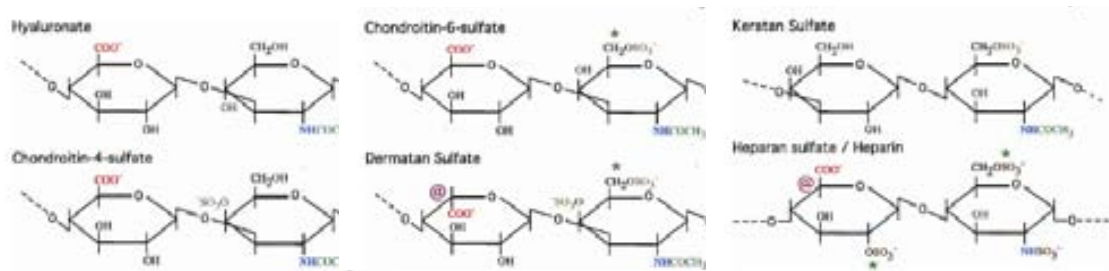
Pel que fa l'estabilitat de les fibres, l'aplicació combinada de l'espectroscòpia de masses per electrospray i de la ressonància magnètica nuclear a l'estudi de fibres formades per la subunitat  $\alpha$  de la proteïna quinasa de fosfatidilinositol d'origen boví, a pH baix, han mostrat que existeix la dissociació i reassociació de monòmers en les fibres (Carulla et al. 2005), per la qual cosa no es pot descartar que les fibres formades pels pèptids  $\beta$ -amiloides tinguin un cert reciclatge de monòmers.

## 8. Elements que afecten la cinètica d'agregació del pèptid

En les plaques amiloides, el pèptid es troba associat a altres elements com ara glucosaminoglicans, membranes cel·lulars i metalls. És per això que l'efecte que poden tenir aquests elements en el procés d'agregació del pèptid és un tema d'estudi rellevant actualment.

### 8.1. Glicosaminoglicans

Els glicosaminoglicans són polímers lineals i sense ramificar formats per la repetició d'un disacàrid. Es coneixen 6 tipus de glicosaminoglicans segons el tipus de disacàrid: condrotin sulfat, dermatan sulfat, heparan sulfat, heparina, keratan sulfat (format per una hezosamina i una galactosa) i àcid hialurònic. Excepte aquest últim, tots es troben sulfatats, el que els atorga càrrega negativa (figura 16).



**Figura 16.** Estructura dels glucosaminoglicans. Adaptat de (Alexandrescu 2005).

Els glicosaminoglicans es troben en la matriu extracel·lular de tots els teixits i poden estar lligats a la bicapa externa de la membrana plasmàtica units a proteïnes (proteoglicans). Tant els glicosaminoglicans com els proteoglicans semblen tenir una paper clau en processos cel·lulars com en la modulació de l'activitat de receptors, l'entrada de virus a les cèl·lules i processos d'angiogènesi en la proliferació cel·lular. En el cas de la malaltia d'Alzheimer, els agregats peptídics es troben en regions riques en glicosaminoglicans. (Snow et al. 1995). Les càrregues negatives dels glicosaminoglicans podrien interaccionar amb els residus bàsics del pèptid A $\beta$  facilitant la formació de fibres. Sembla ser que els

glicosaminoglicans podrien servir d'ancoratge per a les fibres i podrien estabilitzar-les.

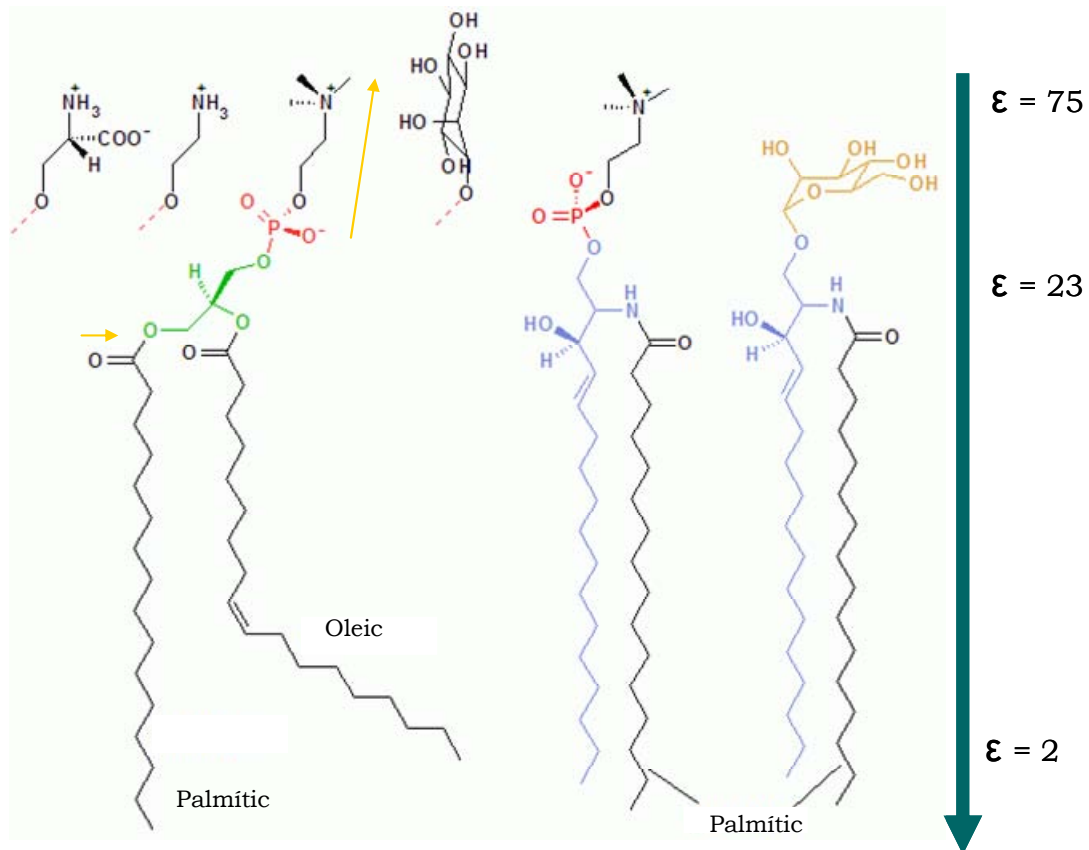
Existeixen nombrosos estudis sobre l'efecte dels glicosaminoglicans en les cinètiques d'agregació "in vitro" dels pèptids amiloides i l'efecte accelerador de la formació de fibres ha estat àmpliament descrit per als pèptids A $\beta$ (1-40), A $\beta$ (1-28) i per a alguns fragments priònics (McLaurin et al. 1999; Cortijo-Arellano et al. 2008). També ha estat descrit que la presència de glicosaminoglicans té un efecte protector pel que fa la toxicitat del pèptid (Diaz-Nido et al. 2002).

## **8.2. Membranes lipídiques**

La bicapa lipídica és la base estructural de les membranes biològiques i les propietats fisicoquímiques d'aquesta vénen determinades per la composició lipídica. Les insaturacions de les cadenes hidrocarbonades i l'estat de fase dels lípids determinen la fluïdesa i l'elasticitat de la membrana. La composició química del cap polar del fosfolípid determina la càrrega elèctrica de la superfície de la membrana i el seu grau d'hidratació. Aquestes propietats fisicoquímiques de la membrana acaben determinant el microambient de la superfície (Jensen i Mouritsen 2004). Així, lluny de constituir simples separadors entre compartiments, les membranes representen un espai de gran riquesa en propietats fisicoquímiques, al llarg del qual es dona un gradient de polaritat que va des de la del solvent (constant dielèctrica de l'aigua,  $\epsilon=75$ ) fins a la del centre de la bicapa ( $\epsilon= 2$ ) (figura 17).

Les membranes tenen un paper actiu en el transport entre l'espai intracel·lular i l'extracel·lular tant en presència com en absència de proteïnes amb aquesta funció. És per això que són molt importants en els mecanismes de transducció de senyal i transport intracel·lular. D'altra banda, el microambient que existeix en la superfície de la membrana té un paper important en la catàlisi enzimàtica, defensa antimicrobiana o control de fusió de membranes (Dowhan et al. 2004; Palsdottir i Hunte 2004). Aquest microambient i la interacció directa de

les membranes amb pèptids i proteïnes fan que les membranes afectin l'estructura i l'estat d'agregació de pèptids i proteïnes, a la vegada que els pèptids i les proteïnes poden afectar l'estructura i la integritat de les membranes.



**Figura 17.** La figura mostra la riquesa fisicoquímica de la membrana representant alguns dels possibles caps polars i cues dels fosfolípids. Amb fletxes grogues, s'han indicat els dipols existents en la interfase de la membrana. La fletxa blava indica el gradient de la constant dielèctrica del medi, indicativa de polaritat.

En els malalts d'Alzheimer, les plaques amiloides característiques es troben fortament associades a les membranes de les cèl·lules en el teixit afectat i representen un punt d'interacció amb el pèptid amiloide. Aquest punt d'interacció pot ser important a l'hora d'entendre el desencadenament de l'activitat citotòxica dels amiloides. És per això, que l'estudi de la interacció del pèptid amb les membranes biològiques pot ajudar a l'elucidació dels mecanismes moleculars pels quals el pèptid pot afectar la viabilitat cel·lular. Existeixen evidències experimentals que alguns amiloides, degut al seu caràcter amfipàtic,

tenen capacitat d'intercalar-se en les membranes augmentant-ne la permeabilització i comportant canvis bioquímics (pertorbació de l'homeòstasi dels ions, alteració de les vies de senyalització, etc.)

Diferents estudis han mostrat que algunes membranes lipídiques acceleren la formació d'oligòmers d'A $\beta$  (McLaurin i Chakrabartty 1996, 1997; Yip et al. 2002; Bokvist et al. 2004; Kakio et al. 2004). Diversos components de membrana, com els lípids aniònics, els gangliòsids o el colesterol, es veuen involucrats en l'agregació del pèptid i sembla que les membranes amb rafts tenen un rol important en la regulació de l'A $\beta$  i la producció d'agregats.

A part de la composició, donat que la malaltia d'Alzheimer es troba molt lligada a l'oxidació, un aspecte interessant és la influència que pot tenir la peroxidació dels lípids de les membranes en els processos d'agregació del pèptid. Se sap que el pèptid amiloide és capaç de causar peroxidació dels lípids. A més, s'ha observat que els fosfolípids oxidats estimulen la formació de plaques amiloides i que els lípids i gangliòsids tenen una clara influència en l'estructura secundària del pèptid (Koppaka i Axelsen 2000; Butterfield i Lauderback 2002).

### **8.3. Metalls**

A part de la relació existent entre els processos oxidatius i els metalls, existeix una relació directa entre els metalls i els pèptids amiloides. Tant l'APP com els pèptids  $\beta$  amiloides tenen llocs d'unió per coure, zinc i ferro en les seves formes reduïdes. Aquestes unions també impliquen reaccions redox que causen estrès oxidatiu. Sembla ser que el coure i el zinc podrien interaccionar amb les histidines 6, 13 i 14 del pèptid formant una esfera de coordinació (Streltsov 2008). La interacció de metalls amb el pèptid aporta càrregues positives a l'N terminal induint estructures agregades diferents a les formades a pH neutre en absència de cations (Klug et al. 2003).

## **9. Prevenció i tractament**

Actualment no es coneix cap tractament efectiu per a la malaltia ni una manera clara de prevenir-la però són molts els estudis que apunten que un estil de vida saludable hi pot ajudar.

Els factors de risc cardiovasculars com l'hipercolesterolèmia, la hipertensió, la diabetis i el tabaquisme s'associen a un major risc d'aparició de la malaltia d'Alzheimer. Per tant, sembla que medicaments per disminuir el colesterol i una dieta mediterrània podrien ajudar a millorar el curs de la malaltia (Szekely et al. 2007). En tractar-se d'una malaltia lligada a l'envelliment, atenent a la clara associació de l'envelliment amb l'oxidació, recentment han emergit els coneguts aliments funcionals, rics en antioxidants, com a retardadors de l'aparició i l'avanç de la malaltia (Valente et al. 2009). També s'ha apuntat que l'activitat intel·lectual pot ajudar a retardar els símptomes. Fins al moment no existeix cap medicament capaç d'aturar el curs de la malaltia però s'utilitzen fàrmacs que atenuen els seus símptomes i milloren l'estat del malalt.

Els fàrmacs més utilitzats, especialment en estats lleus i moderats de la malaltia, són els inhibidors de l'acetilcolinesterasa. Donat que una de les característiques de la malaltia és la reducció d'activitat de les neurones colinèrgiques, s'administren inhibidors de l'enzim que degrada el seu neurotransmissor. D'aquesta manera, es mantenen concentracions adequades d'acetilcolina frenant-ne la pèrdua per la mort de neurones colinèrgiques. Aquests fàrmacs, però, poden tenir efectes adversos degut a un excés de neurotransmissors. Els efectes més lleus són nàusees i vòmits però també poden aparèixer rampes musculars, disminució de la freqüència cardíaca, disminució de la gana, pèrdua de pes i increment de la secreció de sucus gàstrics (Geula i Mesulam 1995; Raschetti et al. 2007).

S'ha observat que, en malalties neurodegeneratives com la d'Alzheimer, la de Parkinson i l'esclerosi múltiple, hi ha un excés de l'estimulació glutaminèrgica. Aquest excés podria produir o induir una sèrie de reaccions intraneuronals de caràcter tòxic que produirien una

sobreestimulació dels receptors de glutamat causant la mort cel·lular. És per això que, al tractament de la malaltia, s'han incorporat nous fàrmacs antagonistes del receptors NMDA glutaminèrgics que intervenen en la regulació de la neurotransmissió glutaminèrgica. Amb aquest tractament, que s'aplica en fases moderades i avançades de la malaltia, s'observen millores lleugeres pel que fa a l'apatia, la iniciativa, la capacitat funcional i les al·lucinacions (Lipton 2004).

A la taula 2 es mostren els medicaments utilitzats actualment en el tractament de la malaltia.

<b>Genèric/ Companyia</b>	<b>Fases a les que s'aplica</b>	<b>Mecanisme molecular</b>	<b>Efectes secundaris</b>
Donepezil/ Aricept	Tots els estadis de la malaltia	Inhibidor de l'acetilcolinesterasa.	Nàusea, vòmits, pèrdua de la gana, increment de la freqüència dels moviments intestinals.
Galantamine/ Razadyne	Inicial a mitjà	Inhibidor de l'acetilcolinesterasa	Nàusea, vòmits, pèrdua de la gana, increment de la freqüència dels moviments intestinals.
Memantine/ Namenda	Mitjà i Avançat	Antagonista de receptors NMDA glutaminèrgics	Mal de cap, restrenyiment, confusió i marejos.
Rivastigmine/ Exelon	Inicial a Mitjà	Inhibidor de colinesterases (butirilcolinesterasa i acetilcolinesterasa)	Nàusea, vòmits, pèrdua de la gana, increment de la freqüència dels moviments intestinals.
Tacrine/ Cognex	Inicial a Mitjà	Inhibidor de l'acetilcolinesterasa	Possible dany al fetge, nàusea i vòmits.

**Taula 2.** Medicaments utilitzats actualment per al tractament de la malaltia d'Alzheimer. Adaptat de <http://www.alz.org>.

A més, també existeixen fàrmacs que milloren alguns dels símptomes que produeix la malaltia com ara ansiolítics, hipnòtics neuroleptics i antidepressius. En alguns casos, també es poden utilitzar antipsicòtics per tal de reduir l'agressivitat i la psicosis dels pacients amb problemes de conducta.

De vegades, també es prescriu vitamina E o altres antioxidants per al tractament de l'Alzheimer. L'estudi de l'efecte de la vitamina E en



malalts d'Alzheimer ha mostrat que el tractament retardava lleugerament la pèrdua d'habilitat per realitzar les activitats diàries. Aquest fet sembla explicar-se per la capacitat antioxidant d'aquesta vitamina. Ara bé, a concentracions molt elevades, la vitamina E pot interaccionar amb altres medicaments, com els anticoagulants per exemple, per la qual cosa cal un bona dosificació.



## **OBJECTIUS**



El pèptid amiloide A $\beta$ (1-40) és un dels principals components de les plaques dels cervells afectats per la malaltia d'Alzheimer, on normalment es troba associat als lípids de la membrana cel·lular. Les membranes poden tenir un rol important en la toxicitat del pèptid, tant com a possible diana com influenciant la formació d'agregats peptídics. Un punt particularment interessant de la influència de les membranes en el procés d'agregació, del que existeixen evidències experimentals, és la peroxidació lipídica com a factor important en la neurodegeneració.

L'objectiu general d'aquest treball ha estat la caracterització molecular de la interacció del pèptid amiloide amb les membranes biològiques. S'ha parat un esment especial en la influència de l'estat d'oxidació dels lípids.

Aquest objectiu general s'ha assolit a partir dels següents objectius específics:

- Caracterització molecular dels intermediaris formats durant el procés de formació de fibres.
- Determinació de l'efecte de l'estat d'oxidació de les membranes biològiques sobre la cinètica de formació de fibres.
- Determinació dels paràmetres fisicoquímics associats a les membranes relacionats amb els canvis observats.
- Determinació de l'efecte del pèptid sobre la membrana dependent de la composició d'aquesta.
- Determinació de la conformació i l'estat d'agregació del pèptid associats als efectes observats.
- Determinació de la influència de les característiques fisicoquímiques de la membrana cel·lular en la capacitat tòxica del pèptid en cultius cel·lulars.



## **MATERIALS I MÈTODES**





**1. Reactius**

<b>Reactius</b>	
Hepes	Sigma&Aldrich
D <sub>2</sub> O	Merck
NaOD	Sigma & Aldrich
DCl	Sigma & Aldrich
HCl	Merck
NaOH	Sigma & Aldrich
Metanol	Merck
Etanol	Merck
Cloroform	Scharlau
NaCl	Sigma & Aldrich
KCl	Sigma & Aldrich
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Sigma & Aldrich
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma & Aldrich
<b>Lípids</b>	
L- $\alpha$ -Fosfatidilcolina	Avanti
L- $\alpha$ -Fosfatidilserina	Avanti
Extracte lípidic de cervell	Avanti
<b>Sondes Fluorescents</b>	
Tioflavina T (ThT)	Sigma & Aldrich
8-aminonaftalè-1,3,6-trisulfònic (ANTS)	Molecular Probes
Bromat $\rho$ -xilè-bis-piridina (DPX)	Molecular Probes
1, 6-difenil-1,3,5-hexatriè (DPH)	Molecular Probes
Fluoresceinfosfatidiletanolamina (FPE)	Molecular Probes
<b>Cultius cel·lulars</b>	
Cèl·lules PC12: Línia cel·lular derivada d'un feocromacitoma (tumor neuroendocrí)	
Cèl·lules SH-SY5Y: Línia cel·lular de neuroblastoma	
Dulbecco modified Eagle's medium Biological Industries (DMEM)	

Dulbecco modified Eagle's medium (DMEM) + Ham's F12	Sigma
L-Glutamina	Gibco
Solució de penicil·lina/estreptomicina	Gibco
Aminoàcids no essencials	Sigma & Aldrich
Sèrum fetal boví	Gibco
Sèrum fetal de cavall	Gibco
Bromur de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT)	Sigma & Aldrich
Dimetilsulfòxid (DMSO)	Sigma & Aldrich

**Taula 3.** Reactius utilitzats en aquest treball

## 2. Pèptid

El pèptid utilitzat en aquesta tesi ha estat la seqüència sintètica de 40 residus corresponent a l'A $\beta$ (1-40) que, juntament amb l'A $\beta$ (1-42), són els components principals de les fibres amiloides que formen les plaques típiques dels cervells afectats per la malaltia d'Alzheimer. El pèptid s'ha adquirit de la companyia Jerini Peptide Technologies amb una puresa superior al 90%, determinada per espectrometria de masses. Al final del procés es procedí a rentar el pèptid amb àcid clorhídric per tal de bescanviar el contraió trifluoroacetat per clorur i evitar així la banda d'absorció del primer (1674 cm<sup>-1</sup>) en la regió de l'infraroig. La seqüència del pèptid és la que es detalla a continuació:

**DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV**

Com es pot veure en la seqüència, el fragment N terminal del pèptid és hidrofílic i té dues regions hidrofòbiques: el C terminal i el segment central LVFFA.

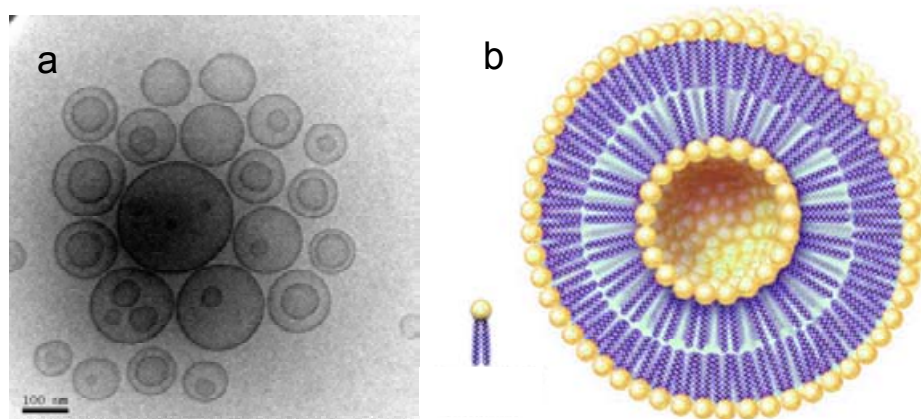
Per tal d'obtenir el pèptid monomèric es va dissoldre en una solució d'hepes 10mM i 0.04% d'NH<sub>3</sub> a pH 11. Per espectroscòpia d'infraroig es

va comprovar que en aquestes condicions el pèptid té una estructura desordenada i no està agregat (veure la secció de resultats figura 34a).

### 3. Preparació de les membranes model

#### 3.1. Preparació de Liposomes Unil·lamelars Grans (LUVs) de 100nm

Com a model de membrana per a estudiar la influència les membranes biològiques en l'agregació del pèptid i la influència d'aquest en les membranes es van utilitzar liposomes (figura 18). Els tipus de liposomes utilitzats van ser els unil·lamelars grans de 100 nm de diàmetre i es van preparar seguint el protocol d'L.D. Mayer (Mayer et al. 1986).



**Figura 18.** (a) Fotografia de crio microscòpia electrònica d'una població de liposomes de 100 nm. (b) Esquema d'un liposoma on es pot veure la disposició del fosfolípid en la bicapa (imatge de l'enciclopèdia britànica 2007).

Breument, els diferents lípids es van dissoldre en cloroform i es van conservar a  $-20^{\circ}\text{C}$ . En un baló es va afegir el volum necessari del lípid desitjat i es va evaporar el cloroform al rotavapor. La pel·lícula lipídica que queda adherida a la superfície del baló va ser resuspensa en una solució amortidora de hepes 60 mM a pH 7.4 agitant vigorosament. A continuació es van realitzar 5 cicles de congelació i descongelació per evitar la presència de liposomes petits a la suspensió. Finalment la

suspensió va ser extrusionada 10 vegades a través de dues membranes de policarbonat (Armatiss) amb un diàmetre de porus de 100 nm amb un extrusionador (Liposfast, Avestin). Durant el procés d'extrusió, la suspensió de liposomes perd el seu aspecte opac degut a la disminució del grandària de les partícules. Els liposomes van ser guardats sota una atmosfera de N<sub>2</sub> i tapats de la llum a 4°C per tal d'evitar l'oxidació per oxigen i per radiació UV.

La mida dels liposomes va ser comprovada amb un analitzador de partícules Microtrack UPA 150. Una suspensió de liposomes 3 mM en hepes 60 mM i pH 7.4 mostrà una distribució de grandària centrada a 100 nm de diàmetre i baixa polidispersitat.

### ***3.2. Preparació de membranes model per a l'estudi de permeabilitat de membrana amb ANTS/DPX***

Per tal de caracteritzar l'efecte del pèptid amiloide sobre a permeabilitat de les membranes model, es va mesurar l'alliberament de continguts intraliposomals seguint el mètode d'Ellens i col·laboradors (Ellens et al. 1985) amb algunes modificacions. En aquest cas, la resuspensió del film lipídic es va fer en una barreja de la sonda fluorescent ANTS (12.5mM) i el seu desactivador catiònic DPX (45 mM) dissolts en hepes 10 mM. Els liposomes van passar 5 cicles de congelació i descongelació i van ser extrusionats normalment. Finalment, els liposomes es van fer passar per una columna PD10 Sephadex G-25 prèviament equilibrada amb hepes 60 mM a pH 7.4 per a separar-los de la sonda i el desactivador no encapsulats.

### ***3.3. Marcatge de les membranes model per a l'estudi del potencial de membrana***

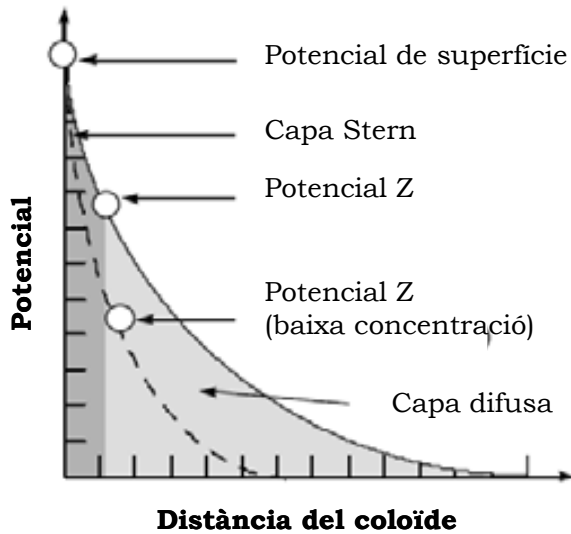
Per a la mesura relativa del potencial de membrana, es va utilitzar la sonda FPE (Fluoresceïna Fosfatidiletanolamina). El marcatge amb aquesta sonda es va realitzar seguint el protocol descrit per Wall i

col·laboradors (Wall et al. 1995a; Wall et al. 1995b). El volum necessari de la sonda FPE, dissolta en Cloroform/Metanol (2:1) per a tenir una relació FPE/lípid de 0.25 mol %, es va afegir en un tub de vidre i es va evaporar sota un corrent suau de  $N_2(g)$  per tal d'evitar el contacte del cloroform amb els liposomes. La sonda es va resuspendre en 15  $\mu$ l d'etanol i es va afegir 1 mL dels liposomes prèviament preparats. La barreja es va incubar durant 1h a 37°C a les fosques. La sonda no incorporada es va eliminar fent passar la barreja de liposomes i FPE per una columna PD10 Sephadex G-25 prèviament equilibrada amb la solució amortidora hepes 60 mM a pH 7.4 i recollint la fracció corresponent als liposomes (color groc tènue). Els liposomes es van guardar a 4°C en amb una atmosfera lliure d'oxigen com a màxim 2 dies.

## **4. Mesura del potencial Z de membrana**

### **4.1. Fonaments teòrics**

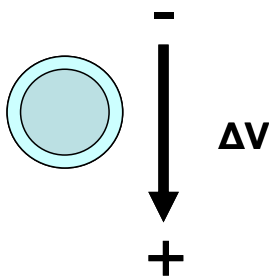
Una partícula carregada té la propietat d'alterar la distribució dels ions que la rodegen (Cevc 1990). Una partícula carregada negativament genera una capa de cations al seu voltant, que es coneix com a doble capa elèctrica i que acompanya a la partícula en els seus moviments. Com es pot veure a la figura 1, aquesta doble capa està formada per una regió interna, coneguda com capa de Stern, en què els ions es troben units fortament a la membrana i d'una altra d'externa, capa difusa, en què hi ha un intercanvi d'ions amb el medi. Les molècules d'aigua que es troben a la regió interna es desplacen juntament amb la vesícula. El potencial Z és el potencial que existeix aproximadament entre la capa de Stern i la difusa (figura 19). Aquest potencial Z és una bona aproximació al potencial de superfície que depèn de la densitat de càrrega superficial.



**Figura 19.** Potencial Z i de superfície. Adaptat de Estelrich

#### 4.2. Mesura del potencial Z

El potencial Z de les membranes model utilitzades en aquest treball va ser mesurat amb un Z-sizer device (Malvern) basat en la microelectroforesi laser-Doppler. Aquest mètode consisteix en mesurar la mobilitat de les partícules en aplicar un camp elèctric. El moviment depèn del potencial Z de la partícula i del medi en què es troba tal com indica l'equació de Smoluchowski corregida per Henry (Roy et al. 1998) (figura 20):



$$\mu = \frac{2 \cdot \epsilon \cdot \zeta}{3 \cdot \eta} \cdot f(\kappa a)$$

Equació 1

**Figura 20.** Esquema del moviment del liposomes al aplicar una diferència de potencial ( $\Delta V$ ). Equació que determina la mobilitat electroforètica segons la càrrega, on  $\mu$  és la mobilitat electroforètica,  $\zeta$  el potencial z,  $\epsilon$  la constant dielèctrica, i  $\eta$  la viscositat del medi i  $f(\kappa a)$  el coeficient de Henry que depèn del radi de la partícula.

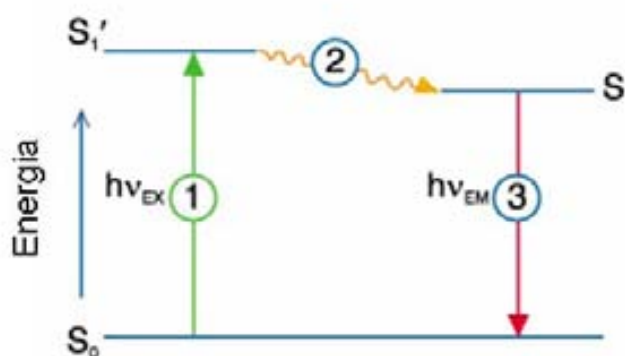
En les mesures del potencial Z, la concentració de lípid va ser 800  $\mu\text{M}$  i la temperatura de mesura de 37°C.

## 5. Espectroscòpia de Fluorescència

### 5.1. Fonaments teòrics

L'espectroscòpia de fluorescència es basa en la capacitat d'algunes molècules (fluoròfors) d'emetre radiació electromagnètica després d'haver estat excites.

Així doncs, el procés de fluorescència consta de tres etapes que es mostren en la figura 21. En una primera etapa, la molècula absorbeix radiació electromagnètica d'una determinada longitud d'ona. Aquesta energia permet que els electrons de la molècula es promocionin a estats energètics superiors, d'un estat basal  $S_0$  a un estat excitat de singlet  $S_1'$ . Aquest estat excitat singlet del fluoròfor té una vida mitjana d'entre 1 i 10 nanosegons.



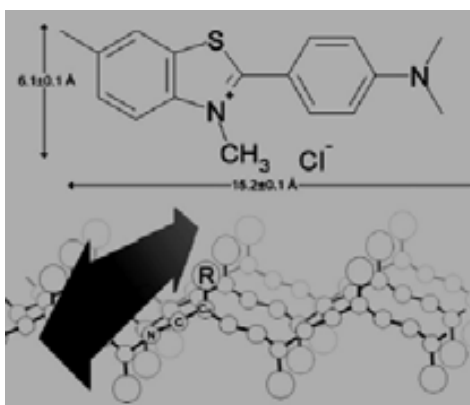
**Figura 21.** Diagrama de Jablonskic que il·lustra els processos implicats en la fluorescència. 1) Absorció de radiació electromagnètica promocionant els electrons de la molècula a estats energètics superiors. 2) Dissipació d'energia en forma de calor donant lloc a un estat excitat de singlet  $S_1$ . 3) Retorn a l'estat basal d'energia emetent un fluorescència.

En una segona etapa i com a conseqüència de les interaccions amb l'entorn, part de l'energia de l'estat excitat es dissipa en forma de calor, donant lloc a un estat electrònic de singlet relaxat  $S_1$ . En l'última etapa del procés, el fluoròfor torna al seu estat basal emetent un fotó d'una determinada energia. Degut a la dissipació d'energia per calor, l'energia emesa és menor que l'absorbida, produint-se un desplaçament cap a longituds d'ona majors. Aquest desplaçament es coneix com a

desplaçament d'Stokes (Lakowicz, 2001). La relació entre els fotons emesos i els absorbits es coneix com a rendiment quàntic.

## 5.2. Seguiment de les cinètiques de formació de fibres amiloides

Per tal de seguir la formació de fibres amiloides, es va utilitzar la sonda fluorescent Tioflavina T (ThT). Aquesta sonda té la característica de ser només fluorescent en intercalar-se entre les fulles  $\beta$  de les fibres (LeVine 1993). En presència de fibres, la ThT es col·loca a l'eix longitudinal perpendicular a l'eix de creixement de la fibra (figura 22). Aquesta conformació impedeix la rotació dels anells de la sonda establint l'estat excitat i permetent un elevat rendiment quàntic.



**Figura 22.** Estructura de la Tioflavina T i esquema de la col·locació en les estructures fibril·lars.

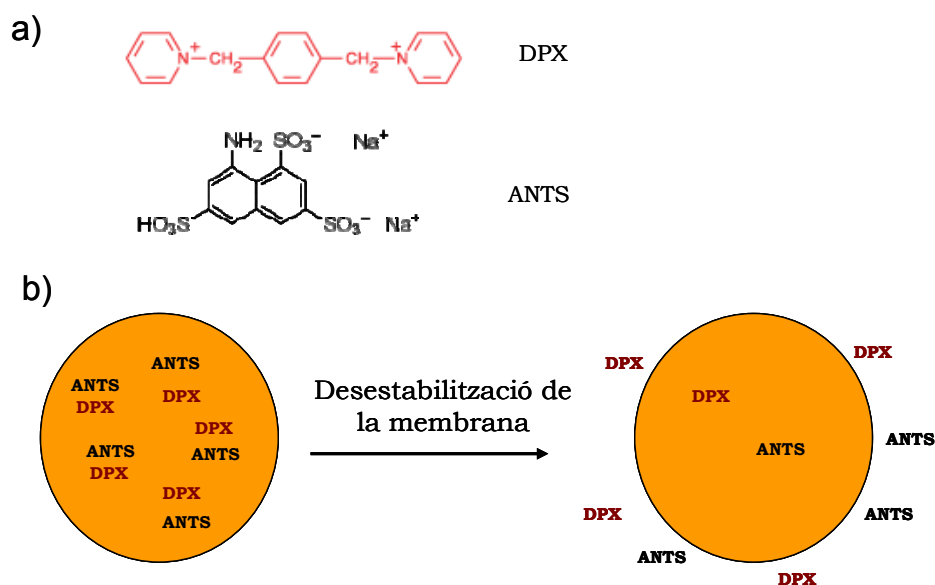
Així doncs, la formació de fibres s'ha mesurat seguint la variació de la fluorescència de la sonda ThT d'una suspensió de pèptid amiloide. Les mesures de fluorescència es van realitzar amb un fluorímetre QuantaMaster™ UV Vis i les dades es van processar amb el software Felix 32 (Photon technology International Lawrenceville, NJ). Les longituds es van fixar als màxims d'excitació i d'emissió de la sonda quan interacciona amb les fibres amiloides. Aquests màxims són 450 i 490 nm respectivament.



La mostra es va mesurar en cubetes de quars d'1 cm de pas òptic, a 37°C i en constant agitació suau. La concentració de ThT a la cubeta va ser 35  $\mu\text{M}$ , la de liposomes i de pèptid s'indica en cada experiment.

### 5.3. Experiments de permeabilitat de membrana

Per a l'estudi de l'efecte del pèptid A $\beta$ (1-40) sobre la permeabilitat de membrana, s'utilitzaren liposomes que incorporaven la sonda polianiònica ANTS i el seu desactivador catiònic DPX. En aquest sistema, la fluorescència de la sonda ANTS es troba desactivada degut a l'elevada concentració del seu desactivador. Quan la membrana dels liposomes es desestabilitza, el contingut dels liposomes s'allibera al medi extern diluint-se l'ANTS i el DPX i produint-se un augment de la fluorescència de l'ANTS. D'aquesta manera, seguint la fluorescència de la sonda ANTS es pot seguir la desestabilització de la membrana (figura 23).



**Figura 23.** a) Representació molecular de la sonda fluorescent ANTS i els seu "quencher" DPX. b) Esquema de l'experiment d'alliberament amb ANTS/DPX descrit en el text.

Les mesures de fluorescència es van realitzar en cubetes de quars d'1mL, en agitació constant i a 37°C. Les longituds d'ona d'excitació i

emissió van ser les corresponents als màxims d'excitació i emissió de la sonda ANTS (353 i 520nm respectivament). La concentració de liposomes a la cubeta va ser de 30  $\mu\text{M}$  a 300  $\mu\text{M}$  i el pèptid es va afegir a diferents concentracions. La fluorescència inicial de la barreja (liposomes en solució amortidora) correspon al 0% del grau de permeabilitat de la membrana. El 100% del grau de permeabilitat es va determinar addicionant el detergent Triton X100 reduït (TX100) a una concentració final de 0.1% (v/v), que provoca la solubilització total dels liposomes.

El percentatge de permeabilitat es va calcular segons la fórmula

$$\text{Grau de permeabilitat} = \frac{F_t - F_0}{F_{\text{max}} - F_0}$$

(equació 2)

on  $F_t$  és la fluorescència en un temps determinat,  $F_{\text{max}}$ , la fluorescència màxima (després de l'addició de TX100), i  $F_0$ , la fluorescència inicial.

#### **5.4. Mesura del potencial de superfície amb la sonda FPE**

La sonda FPE consta d'una molècula de fluoresceïna (molècula fluorescent) unida covalentment a una molècula de fosfatidiletanolamina (figura 24). Quan es barreja amb els liposomes, aquesta molècula s'insereix a la bicapa quedant la cua de la fosfatidiletanolamina entre les cues del fosfolípid i el cap polar i la fluoresceïna a la superfície de la membrana. Quan es troba incorporada en liposomes, la sonda presenta un màxim d'excitació al voltant de 490 nm i un màxim d'emissió al voltant de 520 nm.

La fluorescència de la sonda FPE varia segons el potencial electrostàtic degut a què la fluorescència de la fluoresceïna depèn del pH. El pK d'un grup acídic situat a la superfície de la membrana es pot relacionar amb el pK del grup en el si de la solució a través del potencial de superfície

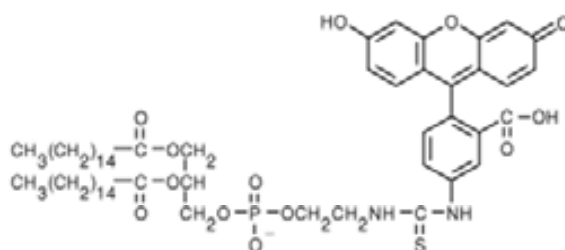
mitjançant una combinació de l'equació de Hendersson Hasselbalch i l'equació de Boltzman (equació 3).

$$pK_s = pK_b + \alpha \cdot \varphi$$

(equació 3)

on  $pK_s$  és el  $pK$  del grup acídic a la superfície de la membrana, el  $pK_b$  ho és en el si de la solució,  $\alpha$  és un factor de correcció i  $\varphi$  és el potencial de superfície.

Per tant, diferències en el potencial de superfície impliquen un canvi en el  $pK$  del grup situat a la mateixa i, per tant, un canvi en la fluorescència de la sonda. D'aquesta manera, la sonda FPE incorporada en membranes permet detectar, d'una banda, canvis del potencial de superfície, ja que aquests provocaran canvis en el  $pK$  de la sonda i, de l'altra, canvis o diferències de pH (per exemple, entre membranes de diferent composició lipídica) a la superfície de la membrana.

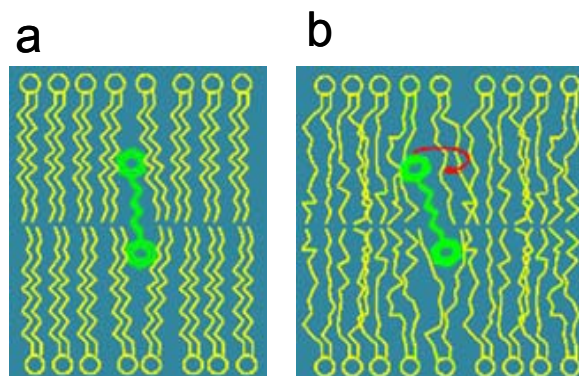


**Figura 24.** Representació molecular de la sonda FPE.

### 5.5. Anisotropia de fluorescència

En el procés d'absorció de radiació per part d'una molècula, la transició d'un estat electrònic a un altre implica la modificació del repartiment de càrregues elèctriques dins de la molècula. Els fluoròfors absorbeixen preferentment els fotons que tenen vectors elèctrics paral·lels al moment dipolar molecular de la transició i emeten en aquesta mateixa direcció. És per això que s'espera que, si s'excita una molècula amb llum polaritzada, la fluorescència emesa també sigui polaritzada.

Aquest principi és molt utilitzat per a estudiar l'anisotropia de l'entorn on es troba el fluoròfor. En aquest treball, s'ha utilitzat la sonda DPH per tal de mesurar la fluïdesa de les membranes. Aquesta característica física es pot relacionar amb l'anisotropia de la fluorescència del fluoròfor (figura 25).



**Figura 25.** Sonda DPH inserida en una membrana lipídica en fase gel (a), en què la sonda es troba immòbil i emetrà fluorescència en la mateixa direcció que l'ona incident, i en fase fluida (b) en què aquesta té capacitat de moviment i emetrà fluorescència en totes direccions.

La tècnica per a mesurar l'anisotropia consisteix en l'ús de polaritzadors per a la mesura de la fluorescència. La fluorescència emesa té una component d'intensitat  $I_{||}$  paral·lela a la direcció de polaritat de l'ona incident i dues components perpendiculars  $I_{\perp}$ , corresponents a les direccions ortogonals. Per tant, s'expressa com:

$$I = I_{||} + 2I_{\perp}$$

(Equació 4)

Si un fluoròfor es troba immòbil, emetrà fluorescència en la mateixa direcció en què ha absorbit la radiació. Ara bé, si té una gran llibertat de moviment, emetrà en totes direccions. Així doncs, calculant la diferència d'emissió de fluorescència en la mateixa direcció d'excitació i en les direccions perpendiculars es pot conèixer la llibertat de moviment del fluoròfor i, per tant, el grau d'anisotropia del medi en què es troba. L'equació 5 mostra el càlcul de l'anisotropia.

$$r = \frac{I_{||} - I_{\perp}}{I_{||} + 2I_{\perp}}$$

(Equació 5)

on  $r$  és l'anisotropia;  $I_{||}$ , la intensitat en l'eix de polarització i  $I_{\perp}$ , la intensitat en les direccions ortogonals.

Per a dur a terme la mesura, es col·loca el polaritzador d'excitació vertical i es mesura la fluorescència amb el polaritzador d'emissió vertical i horitzontal. Per tant, donant el subíndex  $V$  a vertical i  $H$  a horitzontal, tenim

$$r = \frac{I_{VV} - I_{VH}}{I_{VV} + 2I_{VH}}$$

(Equació 6)

Ara bé, cal aplicar un factor per a corregir l'eficiència relativa per a la detecció de la radiació emesa segons si és polaritzada horitzontalment o verticalment. Aquesta correcció és necessària a fi que els elements de l'òptica del fluorímetre reflecteixen preferentment la llum polaritzada paral·lelament.

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}}$$

(Equació 7)

Així, l'anisotropia corregida és

$$r = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}}$$

(Equació 8)

### **5.5.1. Mesures d'anisotropia de fluorescència.**

Per als estudis de fluïdesa de membrana, s'ha utilitzat la sonda DPH. Aquesta sonda és soluble en dissolvents orgànics i és capaç d'incorporar-se a l'entorn hidrofòbic de la bicapa. L'anisotropia de la sonda dependrà de la microviscositat aparent del medi on es troba el fluoròfor, en aquest cas, la membrana lipídica. La microviscositat es

defineix com la resistència que oposa un fluid a ser desplaçat i és inversament proporcional a la fluïdesa:

$$\phi = \left( \frac{r_0}{r} - 1 \right)^{-1} = \frac{1}{\eta}$$

(Equació 9)

on  $\Phi$  és la microviscositat aparent;  $r_0$ , el valor de l'anisotropia quan el fluoròfor està immobilitzat (0.362 per la DPH (Shinitzky i Barenholz 1978)) i  $\eta$ , la fluïdesa.

Els liposomes de diferent composició van ser marcats amb la sonda DPH afegint 2  $\mu$ l d'1mM a 300  $\mu$ M de liposomes ja formats durant 1 hora a 37°C, protegint-los de la llum. Els experiments de fluorescència es van realitzar en un espectrofluorímetre SLM-aminco 800, utilitzant els màxims d'excitació i emissió de la sonda DPH (360 i 430 nm respectivament).

## **6. Espectroscòpia d'infraroig amb transformada de Fourier**

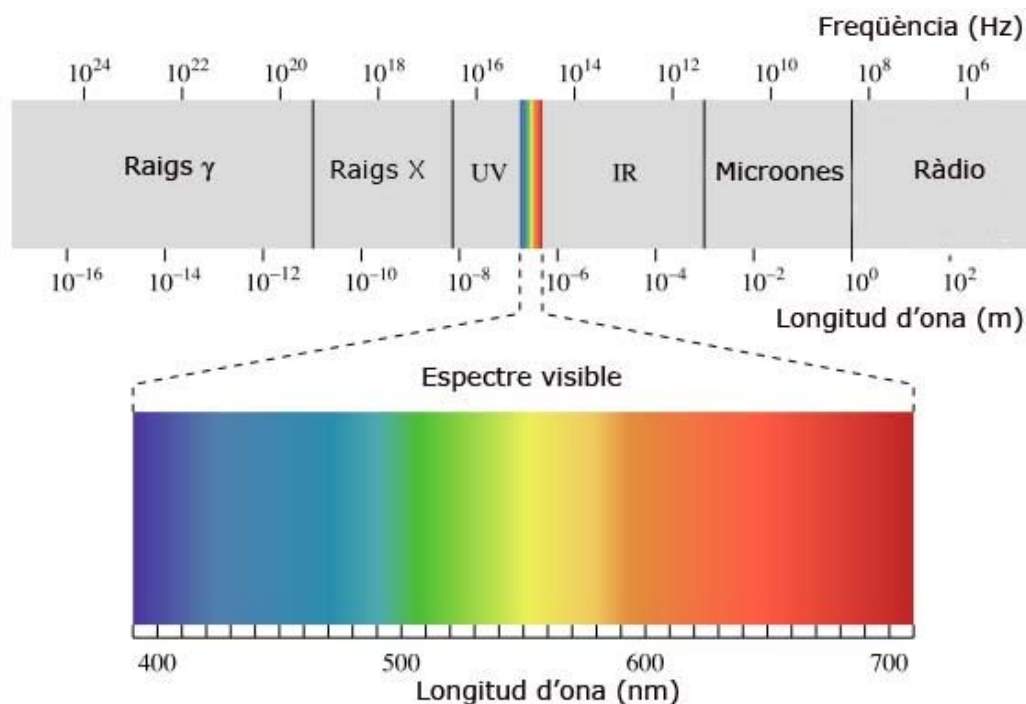
### **6.1. Fonaments teòrics**

L'espectroscòpia d'infraroig és una de les tècniques clàssiques per a l'estudi de la composició química i l'estructura de molècules. En el cas de pèptids i proteïnes, resulta una tècnica molt útil per a la determinació de la seva estructura secundària.

La radiació d'infraroig es troba compresa entre 14000 i 200  $\text{cm}^{-1}$  de l'espectre electromagnètic (figura 26) però, per a l'estudi de compostos biològics, s'utilitzen longituds d'ona entre 4000 i 1000  $\text{cm}^{-1}$ , corresponents a la regió de l'espectre on absorbeixen.

L'absorció de llum infraroja origina transicions energètiques entre nivells vibracionals dels enllaços covalents de les molècules. Perquè tingui lloc aquesta absorció, cal que l'energia de la radiació incident

correspongui a la diferència d'energia entre dos nivells vibracionals adjacents. L'absorció de llum infraroja implica un canvi en el moment dipolar de l'enllaç que ha absorbit la radiació.



**Figura 26.** Espectre electromagnètic

El comportament dels àtoms units per enllaços covalents es pot aproximar al d'un oscil·lador harmònic; per tant, la freqüència de vibració de l'enllaç ve donada per l'expressió

$$\nu = \frac{h}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$$

(equació 10)

on  $h$  és la constant de Planck;  $k$ , la constant de força de l'enllaç i  $\mu$ , la massa reduïda dels àtoms implicats en l'enllaç. Així, la freqüència de vibració dependrà de la força de l'enllaç i de la massa dels àtoms implicats.

En els espectres d'infraroig, es representa l'absorbància en funció de la freqüència d'absorció expressada normalment com a número d'ona. El número d'ona es relaciona amb la freqüència per l'expressió:

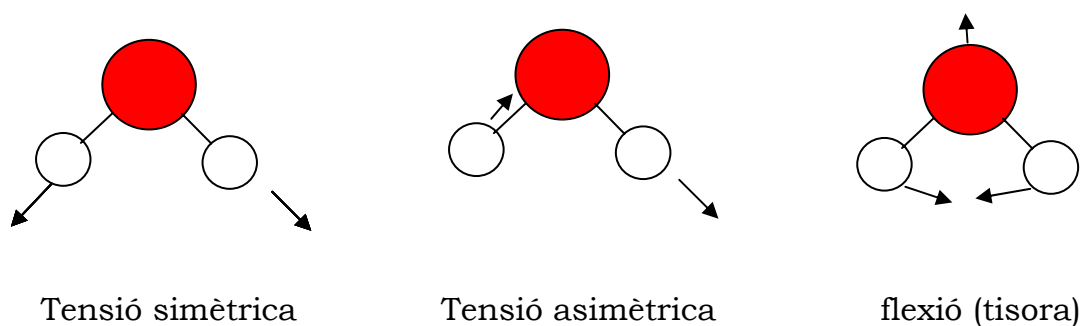
$$v = c \cdot \bar{\nu}$$

(equació 11)

on  $v$  és la freqüència;  $\bar{\nu}$ , el número d'ona i  $c$ , la velocitat de la llum.

Els grups químics presenten diferents modes de vibració que es poden combinar en un mateix enllaç (figura 27). Els modes de vibració que es donen es classifiquen en:

- Els de tensió: els enllaços vibren en la mateixa direcció de l'enllaç
- Els de flexió: la vibració implica canvis en l'angle entre els dos àtoms, que es pot donar en el pla de l'enllaç o fora d'aquest.



**Figura 27.** Modes vibracionals d'una molècula d'H<sub>2</sub>O.

La freqüència de vibració pot variar amb la interacció del grup amb l'entorn o per l'acoblament dels modes de vibració d'altres enllaços. Aquestes interaccions implicarien un desplaçament de les bandes en l'espectre d'infraroig.

## 6.2. Estudi de la conformació de biomolècules

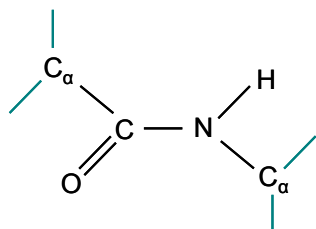
L'espectre d'infraroig característic de pèptids i proteïnes presenta 4 bandes rellevants corresponents a la vibració de l'enllaç més abundant: l'enllaç peptídic, que és un enllaç amida (Goormaghtigh et al. 1994c, b, a) (figura 28).

Els seus modes de vibració més importants són:

- Amida-I: correspon en un 80% a la vibració de tensió de l'enllaç C=O i en un 20% a la vibració de l'enllaç N-H i dona una banda entre 1700 i 1600 cm<sup>-1</sup> en l'espectre d'infraroig.



- Amida-II: correspon en un 60% a la vibració de flexió de l'enllaç N-H i en un 40%, a la de tensió de l'enllaç C-H donant una banda entre 1500 i 1600  $\text{cm}^{-1}$ .
- Amida A: correspon a la vibració d'estirament de l'enllaç N-H i dóna una banda intensa al voltant de 3300  $\text{cm}^{-1}$ .



**Figura 28.** Grup Amida

Tal com s'ha dit anteriorment, la posició exacta d'aquestes bandes depèn de l'entorn i de l'acoblament amb modes de vibració d'altres enllaços. Per tant, en funció del tipus d'estructura secundària, la posició d'aquestes bandes variarà com es mostra en la taula 4.

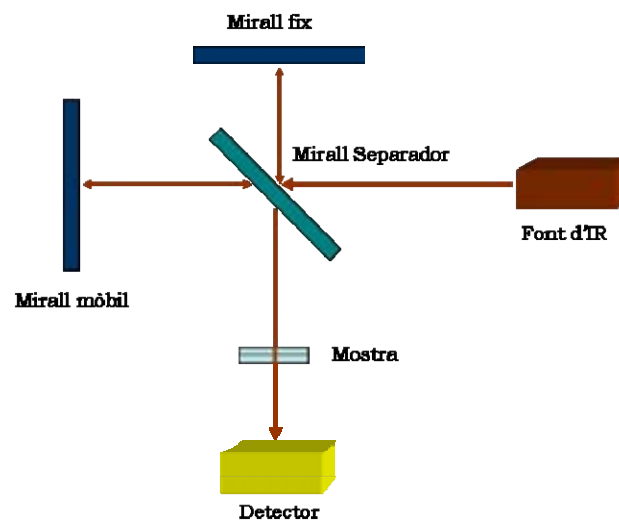
Estructura secundària	Amida-A	Amida-I	Amida-II
Estructura no regular	3250	1645-1650	1520-1545
Hèlix $\alpha$	3290	1650-1660	1545-1550
Estructures $\beta$	3290-3260	1620-1640 i 1680-1690	1520-1530

**Taula 4.** Assignació de bandes per a les diferents vibracions de l'enllaç amida en D<sub>2</sub>O. Les unitats són  $\text{cm}^{-1}$ .

D'altra banda, els fosfolípids també poden ser estudiats per espectroscòpia d'infraroig. A la regió 3000-2800  $\text{cm}^{-1}$ , es produeix l'absorció de la vibració d'estirament dels enllaços C-H de les cadenes de l'àcid gras dels fosfolípids i, entre 1750 i 1700  $\text{cm}^{-1}$ , la de la vibració del grup C=O de l'enllaç éster entre el glicerol i l'àcid gras.

### 6.3. Funcionament de l'espectròmetre d'infraroig

Els espectròmetres d'infraroig actuals es basen en l'interferòmetre de Michelson. La llum policromàtica de la font d'infraroig es dirigeix a un mirall divisor que reflecteix la meitat de la radiació incident cap a un mirall fix i en deixa passar l'altra meitat cap a un mirall mòbil. Aquests dos feixos tornen a ser reflectits cap al mirall divisor on es recombinen donant un senyal al detector que dependrà de la interferència d'aquestes ones. Donat que el mirall mòbil es mou a una velocitat constant, la interferència entre les ones dependrà de la posició d'aquest mirall i variarà al llarg del temps (figura 29).



**Figura 29.** Esquema de l'interferòmetre de Michelson

En el cas d'una radiació monocromàtica la recombinació de dues ones donaria una interferència constructiva quan el mirall mòbil s'hagués desplaçat un nombre sencer de longitud d'ona (ones en fase) i a una interferència destructiva si les dues ones es troben en oposició de fase. La variació de la intensitat en funció del desplaçament del mirall mòbil es coneix com a interferograma (figura 30):

$$I(x) = 0.5I(\bar{\nu})(1 + \cos(2\pi \bar{\nu}x))$$

(equació 12)

on  $I'$  és la intensitat que arriba al detector;  $I$ , la intensitat inicial;  $\bar{\nu}$ , el número d'ona i  $x$ , el desplaçament del mirall.

Quan es tracta de radiacions policromàtiques com en l'espectròmetre de Michelson, aquesta interferència tindrà lloc per a totes les freqüències simultàniament. L'interferograma final serà la suma de les ones cosinoidals resultants de la recombinació a cada posició del mirall. Aquest ve donat per

$$I'(x) = 0.5 \int_{-\infty}^{\infty} I(\bar{\nu}) \cos(2\pi \bar{\nu}x) d\bar{\nu}$$

(equació 13)

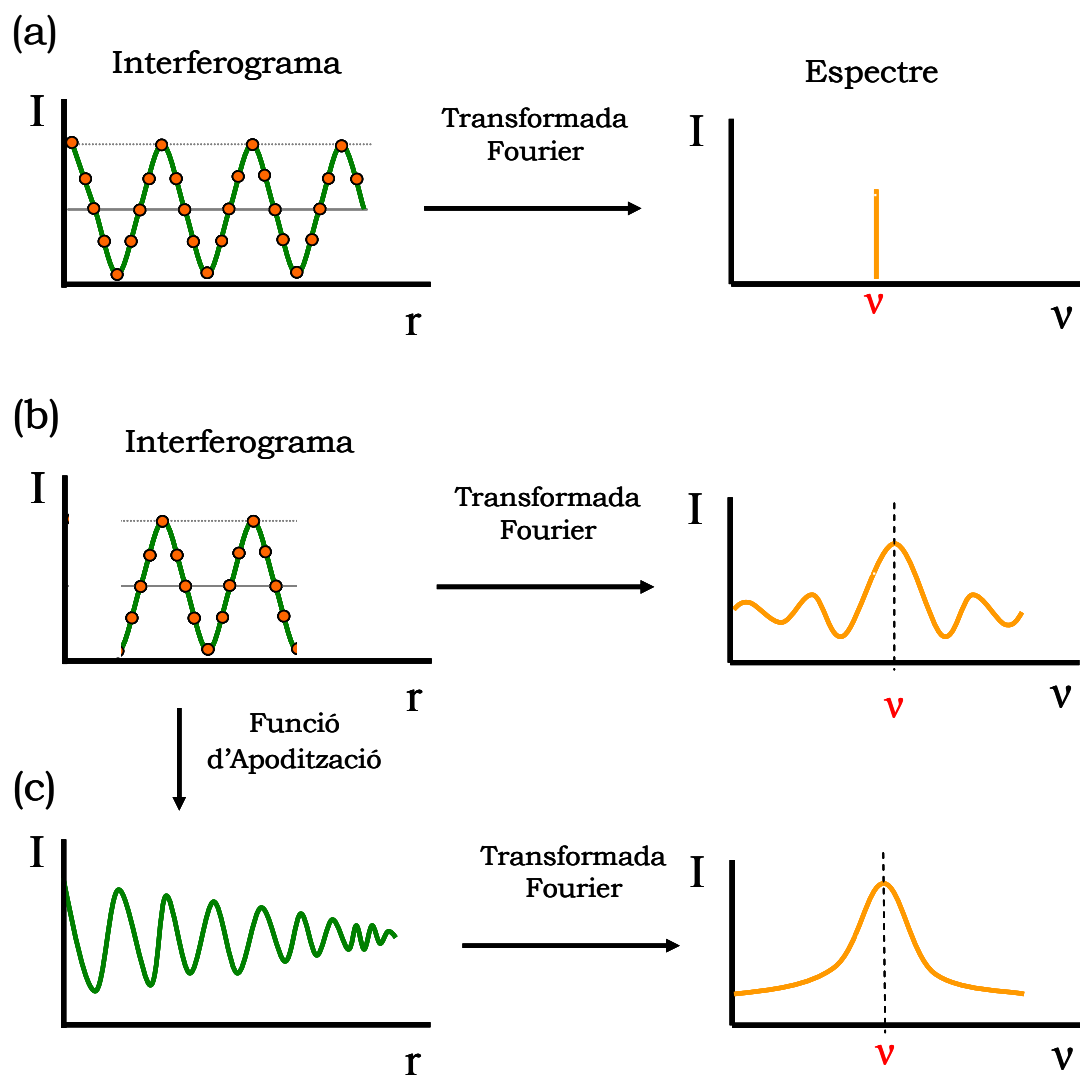
Per tal d'obtenir un espectre a partir de l'interferograma, s'ha d'aplicar el procediment matemàtic conegut com a transformada de Fourier (equació 14). L'espectre es pot expressar com una suma de funcions cosinoidals. Tindríem tants termes (sumands) com freqüències  $i$ , per a cada freqüència, la intensitat vindrà determinada per la suma d'intensitats a cadascuna de les posicions del mirall mòbil.

$$I(\bar{\nu}) = 0.5 \int_{-\infty}^{\infty} I(x) \cos(-2\pi \bar{\nu}x) dx$$

(equació 14)

La transformada de Fourier permet passar del domini del temps (interferograma) al domini de la freqüència (espectre) (figura 30a).

Si el mirall mòbil es pogués desplaçar una distància infinita, a cada freqüència tindríem una suma infinita de termes (un nombre infinit de distàncies,  $x$ ) i s'obtindria un espectre de freqüències en què cada freqüència estaria perfectament definida. Ara bé, el mirall només pot desplaçar-se una distància finita, el que fa que l'espectre resultant sigui com es mostra a la figura 30b. Aquest fet equivaldria a aplicar una funció boxcar a l'interferograma infinit. Per tal de corregir els lòbuls laterals que produeix el tractament, s'aplica una funció d'apodització a l'interferograma (figura 30c).



**Figura 30.** Espectres d'FTIR. (a) Aplicació de la transformada de Fourier a l'interferograma per a l'obtenció de l'espectre quan el recorregut del mirall és infinit. (b) Aplicació de la transformada de Fourier a l'interferograma per a l'obtenció de l'espectre en el cas d'un mirall amb recorregut finit. (c) Aplicació de la funció d'apodització (funció triangle) sobre l'interferograma per a minimitzar els lòbuls laterals de l'espectre.

#### 6.4. Adquisició d'Espectres i tractament de les dades

Els espectres d'infraroig es van adquirir amb un espectròmetre Mattson Polaris equipat amb un detector MCT (mercuri-cadmi-tel·luri) a una resolució nominal de  $2 \text{ cm}^{-1}$ , un sistema de purga contínua d'aire sec (punt de condensació inferior a  $-60^\circ\text{C}$ ), una llançadora que permet l'adquisició alternativa d'un espectre de la mostra i un de la referència, i un portamostres termostatitzat per un bany Julabo Fp 50.

Per a la preparació de la mostra, es van utilitzar solucions amortidores deuterades per evitar l'absorció de l'aigua a la regió de l'amida. L'enllaç O-H de l'aigua absorbeix a  $3400\text{ cm}^{-1}$  i a  $1650\text{ cm}^{-1}$  emmascarant la zona d'absorció del pèptid. Com s'ha dit anteriorment, la freqüència de vibració d'un enllaç depèn de la massa reduïda dels àtoms que el formen (equació 10). Per tant, canviant l'hidrogen de l'aigua per un deuteri (isòtop més pesat), la freqüència de l'enllaç disminuirà desplaçant les bandes d'absorció a  $2500\text{ cm}^{-1}$  i a  $1200\text{ cm}^{-1}$ .

Les diferents mostres es van dipositar entre 2 finestres de  $\text{CaF}_2$  utilitzant un espaiador de tefló de  $50\text{ }\mu\text{m}$ . En la majoria de casos, es van acumular 400 escombrats (mostra i referència alternativament) per compensar les bandes de vapor d'aigua residual que pot quedar en l'espectròmetre. En la majoria de mostres, la concentració de pèptid va ser  $250\text{ }\mu\text{M}$  i  $2.5\text{ mM}$ , la de lípid. Per tal de restar la contribució de la solució amortidora a la mostra, es va recollir un espectre de la solució amortidora sense pèptid i es va restar al del pèptid. Els espectres van ser adquirits amb el programa WinFirst i els espectres es van tractar amb el programa Grams 32 Spectral Notebook.

Un cop realitzada la resta de l'espectre de la solució amortidora, s'analitzà la regió corresponent a l'amida I, que depèn de l'estructura secundària del pèptid: les estructures en hèlix  $\alpha$  i les no regulars absorbeixen a  $1647\text{ cm}^{-1}$  i l'estructura  $\beta$  intermolecular prop de  $1625\text{ cm}^{-1}$  (Goormaghtigh et al. 1994c, b, a). D'aquesta manera es va estudiar l'estructura secundària del pèptid en diferents condicions i el grau d'agregació d'aquest.

## **7. Microscòpia Electrònica de Transmissió**

### **7.1. Fonaments teòrics**

La microscòpia electrònica de transmissió (TEM) permet l'observació de mostres ultrafines amb una resolució de nanòmetres. La diferència bàsica amb la microscòpia òptica rau en què utilitza un feix d'electrons

en lloc de llum visible, que limita la potència amplificadora a mides de la longitud d'ona del visible. Com que els electrons tenen una longitud d'ona menor a la llum visible, es poden visualitzar estructures més petites.

El microscopi electrònic (figura 31) consta d'un canó d'electrons que està format per un filament de tungstè incandescent que emet els electrons i un ànode que crea una diferència de potencial que permet accelerar-los. L'ànode té un orifici pel qual passa una part dels electrons de més velocitat i, juntament amb una petita obertura que es troba a continuació, col·lima els electrons en un feix. Aquest feix és lleugerament divergent degut al potencial positiu de l'ànode i es fa convergir sobre la mostra amb una lent condensadora electromagnètica. El feix d'electrons no pot ser de molta intensitat ja que podria destruir la mostra.

La imatge es forma gràcies a la difracció dels electrons pels àtoms de la mostra. La lent objecte torna a enfocar el feix per a produir la imatge. A continuació es troben tres lents electromagnètiques que porten a un procés d'amplificació i formació de la imatge. Aquest sistema requereix que la columna per la qual viatja el feix d'electrons es trobi en condicions de buit.

La resolució màxima de la tècnica ve determinada per la longitud d'ona dels electrons amb què s'irradia la mostra, que ve donada per la relació de de Broglie

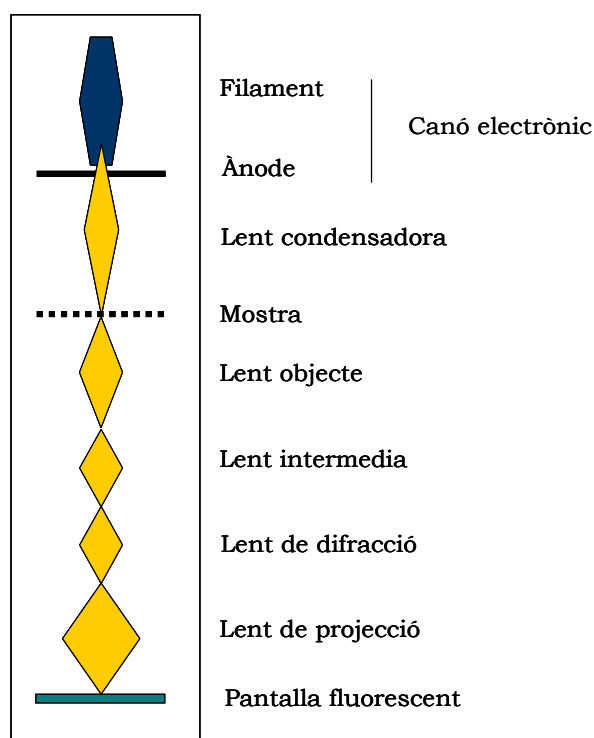
$$E = mc^2 = h\nu = h \cdot \frac{c}{\lambda}$$

(equació 15)

on E és l'energia; m, la massa de l'electró; c, la velocitat de la llum; h, la constant de Planck;  $\nu$ , la freqüència i  $\lambda$ , la longitud d'ona. Per tant, la resolució ( $\lambda$ ) dependrà del voltatge utilitzat.

El suport en el qual es diposita la mostra consisteix en una malla fina de coure coberta per una pel·lícula de carboni. La mostra cal que sigui prima per tal de permetre la transició dels electrons. Com que la

capacitat de dispersió del material biològic és baixa, les mostres es tenyeixen amb metalls pesants. Aquests metalls es dipositen al voltant de la mostra biològica; per tant, el contrast observat en la imatge és la distribució d'aquests metalls. Aquest mètode de tinció es coneix com a tinció negativa.



**Figura 31.** Esquema del microscopi electrònic de transmissió. Adaptat de *Técnicas de bioquímica y biología molecular* de David Freidelder.

## 7.2. Mesura

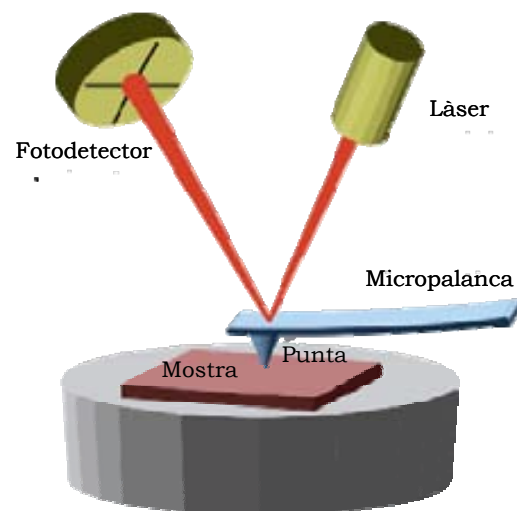
Les mostres per microscòpia electrònica es prepararen dipositant 10 µl de mostra sobre la reixeta de coure recoberta amb una pel·lícula de carboni durant 2 minuts. L'excés de mostra es va eliminar per capil·laritat amb un paper de filtre. La mostra es va tenyir afegint 10 µl d'acetat d'uranil al 2 % durant 1 minut sobre la mostra i eliminant l'excés amb paper de filtre.

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

## 8. Microscòpia de força atòmica

### 8.1. Fonaments teòrics

La microscòpia de força atòmica (AFM) és una de les eines més importants per a l'obtenció, la mesura i la manipulació de la matèria en escales de nanòmetres. El funcionament es basa en la detecció de les forces atòmiques o moleculars, de l'ordre de piconewtons, de la interacció entre la punta i la superfície del material a estudiar.



**Figura 32.** Esquema d'un microscopi de força atòmica. Es pot observar com la punta de la micropalanca escaneja la mostra i les desviacions causades per la mostra es tradueixen en una desviació del làser, captada en el fotodetector.

L'AFM es compon d'una micropalanca, de silici o nitrat de silici, amb una punta afilada (sonda) que s'utilitza per explorar la superfície de la mostra (figura 32). El radi de curvatura d'aquesta punta és de l'ordre de nanòmetres. Quan la punta es troba molt pròxima a la superfície de la mostra, les forces entre aquesta i la mostra indueixen una desviació de la punta d'acord amb la llei de Hooke. Les forces mesurables per AFM poden ser de contacte mecànic, de van der Waals, de capil·laritat, d'enllaç químic, electrostàtiques, magnètiques, etc. La desviació de la punta es mesura mitjançant la reflexió d'un làser sobre la superfície de la micropalanca a un detector. La llei de la palanca permet que petits canvis en l'angle de flexió de la micropalanca es tradueixin en una



desviació mesurable del làser, convertint-la en un senyal elèctric per a la producció de la imatge.

### **8.2. Preparació de la mostra i mesura**

La mostra es va preparar dipositant 10-50 µl de pèptid Aβ (1-40) resuspès en hepes a diferents pH sobre un suport de mica i dexant-lo incubar a temperatura ambient 5 minuts.

La mostra es va rentar amb aigua desionitzada ultrapura i s'hi va bufar nitrogen sec gas.

Les imatges es van adquirir amb un microscopi de força atòmica INTEGRA VITA NT-MDT equipat amb una càmera Canon Powe Shot S50. Per a l'adquisició, es van utilitzar freqüències d'escombratge entre 1 i 2 Hz i la força de contacte es va mantenir al mínim.

## **9. Electroforesis natives de gradient**

### **9.1 Fonaments teòrics**

L'electroforesi de proteïnes en gels en una matriu de poliacrilamida (PAGE) és una de les tècniques més utilitzades per a la caracterització de mesclades de proteïnes. Els gels estan constituïts per polímers d'acrilamida entrecreuat amb bisacrilamida. Un cop carregades les mostres sobre el gel, s'aplica un corrent elèctric controlat que permet la migració de les proteïnes o agregats segons la seva mida i càrrega.

Les electroforesis natives permeten la separació de proteïnes i agregats proteics segons la seva mida, la càrrega i la mida hidrodinàmica en condicions natives. A diferència de les electroforesis desnaturalitzants, en què s'utilitza SDS per a desnaturalitzar les proteïnes o agregats i atorgar-los-hi càrrega, en les electroforesis natives s'utilitza blau de Comassie, que envolta les proteïna o els agregats ajudant a mantenir l'estructura nativa i donant la càrrega necessària per a la mobilitat d'aquestes en l'electroforesi.

Per a agregats o mescles de proteïnes de mida molt diferent, s'utilitza un gradient decreixent en la mida del porus. En aquests gels, la proteïna o agregat avança fins arribar a la zona on la mida del porus impedeix que continuï avançant. En aquest treball es van fer servir gels de 3-12% d'acrilamida que permeten separar proteïnes i agregats entre 15 i 1000 kDa.

## 9.2. Realització de l'electroforesi

Els gels NativePAGE™Novex®Bis-Tris Gel d'Invitrogen es col·locaren en el cubeta d'electroforesi corresponent i s'hi carregaren les mostres diluïdes en solució amortidora amb blau de Comassie® G-250. A continuació, es va omplir la cubeta amb les solucions amortidores de l'ànode i del càtode (amb blau de Comassie® G-250 al 0.04%). Es va aplicar un voltatge de 150 V durant 2 hores. Seguidament, el gel es va fixar durant 30 minuts, tenyir durant el mateix temps i finalment destenyir. Les diferents solucions es mostren a la taula 5.

Solució	Composició
Mostres 4x	50mM BisTris, 6M HCl, 50mM NaCl, 10pes/v Glicerol, 0.001% Ponceau S, pH 7.2
Ànode 20x	50 mM BisTris, 50 mM Tricine, pH 6.8
Càtode 20x	Solució de l'ànode i amb 0.04% de Comassie® G-250
Fixadora	40% Metanol, 10% àcid acètic
Tinció	0.02% Comassie® R-250 en 30% Metanol i 10 % d'àcid acètic
Destenyidora	8% d'àcid acètic

**Taula 5.** Solucions amortidores utilitzades en l'electroforesi.

## 10. Cultius cel·lulars

Per als estudis de toxicitat cel·lular del pèptid en diferents condicions, s'ha utilitzat la línia cel·lular de neuroblastoma SH-5YSY i cèl·lules PC12, derivades de feocromocitoma. Les cèl·lules PC12 es van fer créixer en medi DMEM, amb un 6% de sèrum fetal boví, un 6% de sèrum fetal de cavall, 2 mM de glutamina, 100 U/ml de penicil·lina, 100 µg/ml d'estreptomicina en un incubador a 37 °C, atmosfera humida

amb un 5% de CO<sub>2</sub>. Per a les cèl·lules SH-5YSY, es va fer servir el mateix antibiòtic i glutamina amb la diferència respecte a les PC 12 que el medi utilitzat va ser DMEM-Ham's F12 i es va utilitzar 10% de sèrum fetal boví. Es canviava el medi de les cèl·lules cada 2 dies i es tripsinitzaven quan arribaven a la confluència.

### ***10.1. Procés de Tripsinització***

Per a fer un subcultiu a partir d'una placa confluent o per a sembrar-les en plaques de pouets, a l'hora de fer un experiment, cal desenganxar les cèl·lules de la placa. Aquest procés es coneix com a tripsinització.

Amb aquesta finalitat, s'elimina el medi de la placa i es fa un rentat amb PBS per eliminar-ne les restes. A continuació, s'afegeix 2 ml de tripsina-EDTA i es deixa incubar 3 minuts a 37°C. La tripsina és un enzim capaç de trencar les unions de la cèl·lula amb la placa. Transcorregut aquest temps, s'atura l'acció de la tripsina amb 3 ml de medi prèviament temperat i es recull tot el volum en un tub (falcon) estèril que es centrifuga a 1000 rpm durant 5 minuts. Les cèl·lules queden al fons del tub i, per tant, pot eliminar-se amb facilitat el medi amb tripsina i resuspendre les cèl·lules en un medi nou.

### ***10.2. Comptatge de cèl·lules***

Per tal de conèixer el nombre de cèl·lules i poder sembrar-ne un nombre adequat, es va realitzar el comptatge de cèl·lules amb la cambra de Neubauer. Per al comptatge, es va barrejar 10 µl de la suspensió de cèl·lules amb 10 µl de blau de tripà. El blau de tripà permet distingir les cèl·lules amb la membrana trencada (ja que el seu citoplasma queda blau per l'entrada del colorant) de les que són viables i no queden tenyides. 10 µl de la mescla s'introdueixen per capil·laritat a la cambra de Neubauer i es fa una mitjana del nombre de cèl·lules per quadrat de la cambra. L'àrea de cada quadrat és d'1 mm<sup>2</sup> i l'alçada de la cambra de 0.1 mm; per tant, el volum de cada quadrat és de 0.1 µl. Si volem

conèixer el nombre de cèl·lules de la suspensió per mil·lilitre, caldrà multiplicar la mitjana de cèl·lules per quadrat per  $10^4$  i per la dilució que s'ha fet al afegir el colorant.

### **10.3. Crioconservació de les cèl·lules**

Les línies cel·lulars cal conservar-les a temperatures molt baixes i cal utilitzar agents crioprotectors a fi de garantir la seva integritat.

Per al procés de congelació, es van resuspendre les cèl·lules a una concentració de  $4 \cdot 10^6$  cèl·lules/ml en medi nou. D'altra banda, es van col·locar els criotubs amb 100  $\mu$ l de DMSO en gel. Quan el DMSO es va congelar, es va afegir 900  $\mu$ l de la suspensió de cèl·lules a cada criotub assegurant que quedés ben mesclat i tornant-lo ràpidament al gel. El DMSO és un agent protector però que, a temperatura ambient, resulta tòxic per a les cèl·lules; és per això que cal evitar que la barreja estigui a temperatura ambient.

Finalment, els criotubs es van deixar al congelador de  $-80^{\circ}\text{C}$  en presència d'isopropanol que permet una disminució gradual de temperatura d'1 a  $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . Al cap de 24 h, els criotubs es van desar al tanc amb nitrogen líquid.

Per a la descongelació de les cèl·lules, el tub es va descongelar parcialment al bany a  $37^{\circ}\text{C}$ . Abans que el tub estigués totalment descongelat, el contingut del criotub es va abocar a un tub de centrifuga estèril amb 6 ml de medi per tal de diluir el DMSO i evitar el seu efecte tòxic. La barreja es va centrifugar 5 minuts a 1000 rpm i es va eliminar el sobrenedant. Les cèl·lules es van resuspendre en medi nou i es sembraren en 2 flascons.

### **10.4. Assaig de viabilitat cel·lular**

Per als estudis de toxicitat cel·lular, es va utilitzar el mètode de l'MTT (Bromur de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazol) descrit per Hansen et al (Hansen et al. 1989) i que permet mesurar el metabolisme

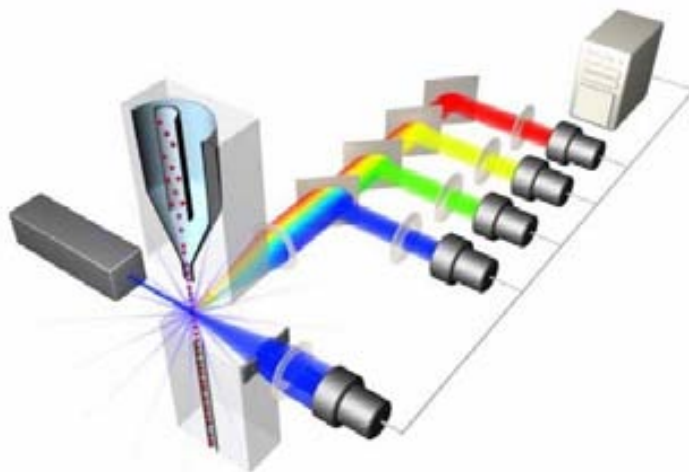
cel·lular. Aquest assaig es basa en la conversió de l'MTT en sals de formazà per l'acció de les deshidrogenases presents en els mitocondris. Aquestes sals donen un precipitat insoluble i de color lila que absorbeix a 595 nm. Per a realitzar l'assaig, es varen utilitzar plaques d'ELISA estèrils de 96 pous on es van sembrar 20000 cèl·lules a cada pou en medi complet. Al cap de 24 hores, es va retirar el medi i es va afegir medi nou al 2% de sèrum amb el tractament corresponent i es deixà 24 hores. Transcorregut aquest temps es va eliminar el medi i es va afegir medi que contenia 0.5 mg/ml d'MTT i es va deixar 2 hores. L'MTT es va preparar dissolent-lo 5 mg/ml en aigua destil·lada i diluint-lo en medi en el moment d'afegir-lo a les cèl·lules.

A les 2 hores es va retirar el medi i es va dissoldre el precipitat format amb 50 µl de DMSO i es va mesurar l'absorbància a 595 nm. El valor de l'absorbància és proporcional al metabolisme de les cèl·lules i, per tant, al nombre de cèl·lules metabòlicament actives.

### **10.5. Citometria de flux**

La citometria de flux és una tècnica que permet analitzar estadísticament un gran nombre de cèl·lules mesurades individualment. La tècnica consisteix en fer passar milers de cèl·lules per diferents làsers i recollir la llum emesa en diferents detectors per cadascuna de les cèl·lules. L'instrument consta dels elements següents (figura 33) (Robinson 1993):

- Compartiment de flux: transporta i alinea les cèl·lules per tal que passin una per una a través de làser.
- Làser: passa pel focus hidrodinàmic del corrent de fluid interaccionant amb les cèl·lules.
- Detectors en la mateixa direcció que el làser i en perpendicular: recullen la llum emesa o dispersada per les cèl·lules
- Amplificadors de senyal
- Ordinador



**Figura 33.** Esquema del citòmetre de flux. Es pot observar el flux cel·lular on s'alineen les cèl·lules per tal que el làser hi interaccioni. La llum dispersada i la fluorescència és dirigida a diferents detectors per tal de conèixer la mida, la complexitat i la fluorescència dels fluoròfors units a la cèl·lula. [http://flow.csc.mrc.ac.uk/page\\_id=302](http://flow.csc.mrc.ac.uk/page_id=302)

Les cèl·lules passen a través dels làsers i els detectors recullen la llum dispersada i la fluorescència emesa gràcies al sistema òptic. Quan la cèl·lula passa a través del làser, tendirà a dispersar la llum en totes direccions. La llum dispersada recollida en el detector que es troba davant del làser és proporcional a la mida de la cèl·lula. La llum dispersada en altres direccions és causada per la granularitat i la complexitat de l'interior de la cèl·lula i es recollida en un detector col·locat perpendicularment. La citometria, a més, permet la mesura de la fluorescència de fluoròfors units a la cèl·lula. La fluorescència emesa va en la mateixa direcció que la dispersió de llum perpendicular i passa a través de diferents filtres i miralls de manera que la llum és dirigida als detectors apropiats. Un cop la llum arriba al detector, es genera un corrent elèctric, proporcional als protons detectats. Aquest senyal quan s'amplifica dona un pols de voltatge en funció del temps.

En aquesta tesi, s'ha utilitzat la citometria de flux a fi de detectar l'exposició de fosfatidilserina a la membrana externa de la cèl·lula. Per això, s'ha utilitzat la proteïna annexina V, específica de lípids negatius com la fosfatidilserina, unida al fluoròfor fluorescència isotiocianat (FITC). D'aquesta manera, la fluorescència emesa per les cèl·lules serà proporcional a la fosfatidilserina exposada a la membrana externa i, per

tant, a la càrrega negativa de la membrana. Aquest mètode és utilitzat per a detectar apoptosi, ja que l'orientació de fosfatidilserina a la membrana externa és un procés típic de l'apoptosi.

L'annexina V s'utilitza conjuntament amb el iodur de propidi que és un agent intercalant de DNA i RNA fluorescent. El Iodur de Propidi (IP) és impermeable a cèl·lules viables per la qual cosa només podrà unir-se al DNA o RNA de cèl·lules amb dany mortes. Per tant, la combinació de l'annexina V amb l'IP permet diferenciar cèl·lules viables (cap fluorescència), de les necròtiques (només donen fluorescència d'IP), les preapoptòtiques (només fluorescència d'annexina) i les apoptòtiques (fluorescència dels 2 fluoròfors).





## **RESULTATS**



**CAPÍTOL 1: Morfologia i estructura secundària dels intermediaris presents en el procés d'agregació del pèptid A $\beta$ (1-40)**



Actualment, la hipòtesi de la cascada amiloide és una de les més acceptades per tal d'explicar les causes de la malaltia d'Alzheimer. Aquesta hipòtesi ha anat evolucionant des de que es va plantejar per primera vegada l'any 1991. El primer plantejament, realitzat a partir de l'observació de plaques amiloides, riques en fibres als cervells dels afectats per la malaltia d'Alzheimer, fou que podien ser les fibres les causants de la malaltia. Ara bé, recentment sembla prendre rellevància el paper dels intermediaris que es formen durant la fase de latència del procés de polimerització en la toxicitat del pèptid. La població d'intermediaris en el procés d'agregació és heterogènia, formant-se des d'agregats dimèrics a protofibres, i l'estudi d'aquests és difícil donada la seva tendència a formar fibres.

En aquest sentit, és important conèixer el detall molecular de les espècies que es formen durant la fase de latència, el seu estat d'agregació i la seva estructura.

En aquesta primera part del treball es va plantejar portar a terme l'estudi de l'evolució conformacional del pèptid A $\beta$ (1-40) al llarg del procés d'agregació, amb la intenció d'aportar informació estructural sobre l'estat del pèptid a la fase de latència, un aspecte encara poc caracteritzat.

Amb aquest objectiu es van utilitzar 3 tècniques complementàries sobre una mateixa mostra. Mentre se seguia la formació de fibres per fluorescència utilitzant la sonda ThT, es van extreure alíquotes a diferents temps i es van mesurar per FTIR per a l'estudi de l'estructura secundària, microscòpia electrònica de transmissió (TEM) i microscòpia de força molecular (AFM), a fi d'analitzar-ne la morfologia.

Els resultats obtinguts han mostrat com els oligòmers d'estructura  $\beta$  no fibril·lar i morfologia circular es formen ràpidament en ajustar el pH a 7.4. De fet, la major part d'estructura  $\beta$  es forma durant la fase de latència. Per tant, durant la fase d'elongació, els oligòmers s'associen entre ells per a la formació de fibres implicant una conversió d'estructura  $\beta$  no fibril·lar a fibril·lar.

## **1. Mesura de la formació de fibres del pèptid A $\beta$ (1-40)**

Les mostres per a la mesura de la cinètica d'agregació, seguint els canvis de fluorescència de la sonda ThT, es prepararen en medi deuterat per tal de poder utilitzar-ne alíquotes per a les mesures d'FTIR. La concentració de pèptid a la cubeta va ser de 90  $\mu$ M. En aquest experiment, la concentració va ser més alta que en la resta d'experiments de fluorescència d'aquest treball, donat que calia una concentració suficientment alta per a detectar el pèptid per espectroscòpia d'infraroig a partir de les alíquotes corresponents. Aquesta concentració va permetre una bona reproduïbilitat en les cinètiques de formació de fibres i una bona relació senyal/soroll en els espectres d'infraroig.

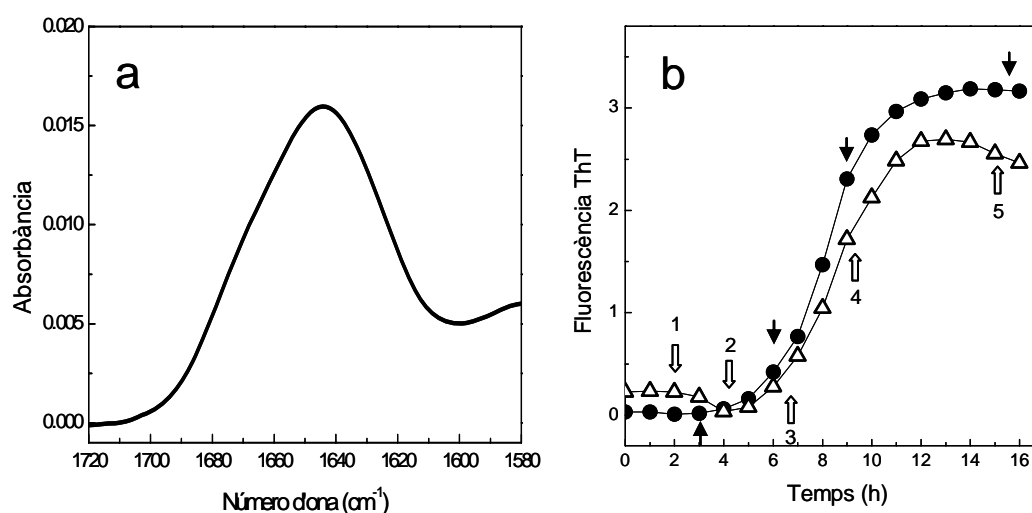
El pèptid utilitzat es va dissoldre a pH 11 per tal d'assegurar que aquest no s'agregués. L'estat no agregat del pèptid es va comprovar per espectroscòpia d'infraroig. A la figura 34a, es pot veure que l'espectre d'infraroig presenta una banda centrada a 1650  $\text{cm}^{-1}$  indicativa d'estructures desordenades.

En el moment de començar l'experiment, el pD de la mostra (90  $\mu$ M d'A $\beta$ (1-40) i 35  $\mu$ M de ThT en solució amortidora hepes 60 mM) es va ajustar a 7.4. El volum de la cubeta era de 2.2 mL i es van extreure alíquotes a diferents temps per a fer espectres d'infraroig i micrografies electròniques. La cinètica es va mesurar a 37 °C i amb agitació suau. L'experiment es va fer per duplicat.

A la figura 34b, es mostren les cinètiques de fluorescència de la ThT corresponents a dues suspensions d'A $\beta$ (1-40) a pD 7.4. La fluorescència d'aquesta sonda és indicativa de la formació de fibres amiloides ja que és molt fluorescent en intercalar-se en l'estructura  $\beta$  d'aquestes.

Les dades experimentals s'ajusten a la típica cinètica sigmoïdal de formació de fibres amiloides, normalment interpretada com un procés de polimerització nucleada. En el procés es distingeixen tres fases. Una primera fase, anomenada de latència o nucleació, en la qual no hi ha variació de fluorescència indicant l'absència de fibres. Aquesta fase ve seguida per la fase d'elongació en la qual es formen les fibres i es pot

observar un ràpid augment de la fluorescència. Finalment, en la fase de fluorescència s'estabilitza arribant a un "plateau" en què ja no es formen més fibres. Com que el fluorímetre utilitzat permet visualitzar la cinètica en pantalla, es van prendre alíquotes a les diferents fases. Els temps en què es van prendre les alíquotes s'indica amb fletxes sobre la Figura 34b. La durada de la fase de latència és semblant a la d'altres treballs com, per exemple, els de Hortschansky (Hortschansky et al. 2005) per a una concentració de pèptid semblant. D'altra banda, Kirkitadze (Kirkitadze et al. 2001) mostren temps d'agregació més llargs.



**Figura 34.** (a) Espectre d'FTIR del pèptid A $\beta$ (1-40) a pH12 abans de començar l'experiment. (b) Formació de fibres de l'A $\beta$ (1-40). Variació de la fluorescència de la ThT de les dues suspensions analitzades. Amb les fletxes s'indica els temps en què s'han tret alíquotes per a FTIR i TEM. Els nombres indiquen l'espectre d'infraroig de la figura 35 que els correspon.

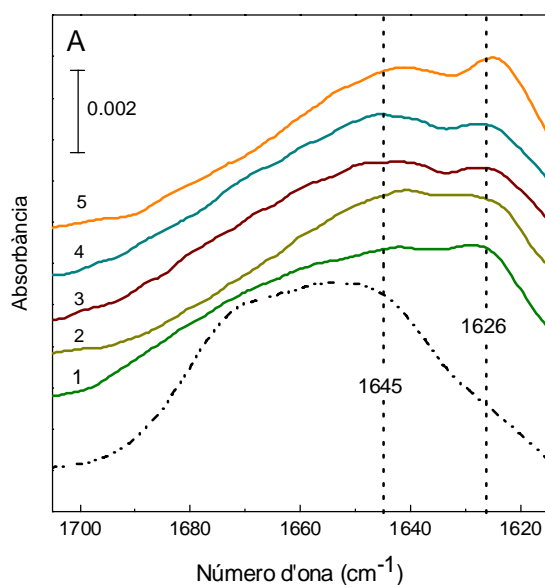
L'anàlisi de la bibliografia mostra que la velocitat d'agregació del pèptid depèn clarament del tipus de contraió del pèptid (TFA, Cl<sup>-</sup>), de la concentració de pèptid i del protocol de preparació; és a dir, de la utilització de dissolvents orgànics per a dissoldre el pèptid i de la filtració d'aquest per a l'eliminació d'espècies agregades entre altres.

## 2. Espectres d'FTIR

A diferents temps, indicats amb fletxes i nombres a la figura 34, es van analitzar per espectroscòpia d'infraroig 40  $\mu$ l de la cubeta del

fluorímetre. L'espectre de la solució amortidora hepes es va restar de l'espectre del pèptid (figura 35).

L'espectre d'infraroig a la zona de l'amida I mostra dos màxims: un a  $1645\text{ cm}^{-1}$ , assignable a estructures desordenades i hèlix  $\alpha$  i un altre a  $1626\text{ cm}^{-1}$ , corresponent a estructures  $\beta$  intermoleculares (figura 35) (Fraser et al. 1991; Otvos et al. 1993). El primer espectre (línia discontinua) correspon al pèptid a pD 11 abans d'iniciar l'experiment. Com ja s'ha comentat anteriorment, aquest espectre, amb un màxim centrat al voltant de  $1650\text{ cm}^{-1}$ , és indicatiu d'estructures desordenades i no hi ha cap indicatiu d'agregació. Això permet concloure que el pèptid es troba en estat monomèric en el moment de baixar el pD a 7,4 per a iniciar la cinètica d'agregació.



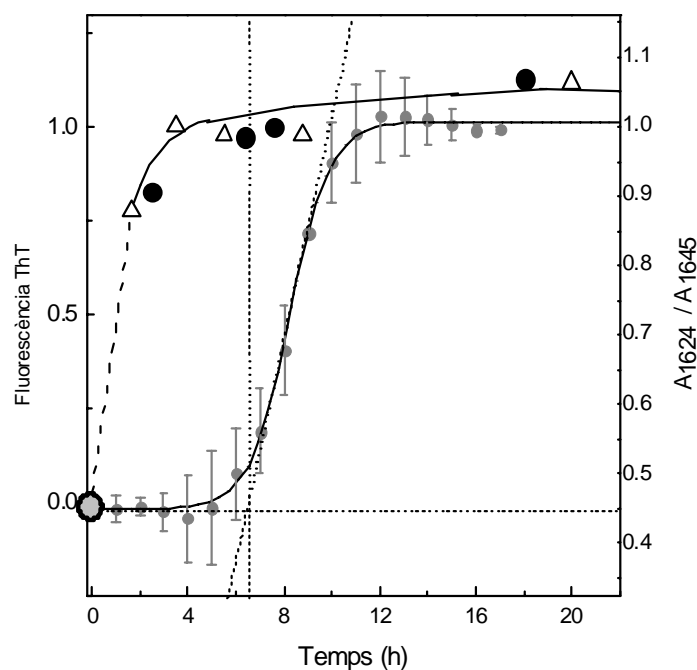
**Figura 35.** Espectres d'infraroig i segona derivada de l'absorbància respecte la freqüència de les alíquotes preses de la cubeta de fluorescència.

Quan es posa el pèptid a pD 7.4, es pot observar que, ràpidament, apareix una component d'estructura  $\beta$  intermolecular a l'espectre i aquesta augmenta durant el procés d'agregació.

Per tal de facilitar la visualització dels canvis conformationals en relació al procés de formació de fibres, l'augment d'estructura  $\beta$  intermolecular a expenses d'estructures desordenades o hèlix  $\alpha$ , es representen la



relació d'absorbàncies corresponents a aquestes estructures:  $A_{1626}/A_{1645}$ . Com a relació inicial es va prendre la de l'espectre a pD 11. Les relacions s'han normalitzat pel valor de la relació  $A_{1626}/A_{1645}$  al final del procés d'agregació. Aquesta variació d'absorbàncies s'ha representat juntament amb la variació de fluorescència de ThT (normalitzada entre 0 i 1) en la figura 36.



**Figura 36.** Comparació de la formació de fibres (fluorescència de ThT) i de l'augment d'estructura  $\beta$  mesurada per infraroig. La cinètica de fluorescència de ThT (rodones grises) és una mitjana dels dos experiments realitzats normalitzada entre 0 i 1. La relació  $A_{1624}/A_{1645}$  representada amb triangles blancs correspon als espectres de les alíquotes representades amb fletxes blanques a la figura 34b i les rodones negres a les fletxes negres. La corba ajustada a la relació  $A_{1624}/A_{1645}$  considera tots els punts.

La figura 36 mostra que, durant la fase de latència en la qual encara no s'han format fibres, es detecta ja gran part de l'estructura  $\beta$  que es forma durant el procés d'agregació. Aquesta fulla  $\beta$  correspon a estructures agregades (es tracta d'estructura  $\beta$  intermolecular) i no fibril·lars (absència de fluorescència de ThT). Per tant, si els oligòmers es formen durant la fase de latència i ja tenen estructura  $\beta$ , el procés que té lloc durant la fase exponencial ha d'implicar un acoblament d'aquests oligòmers per a la formació de fibres.

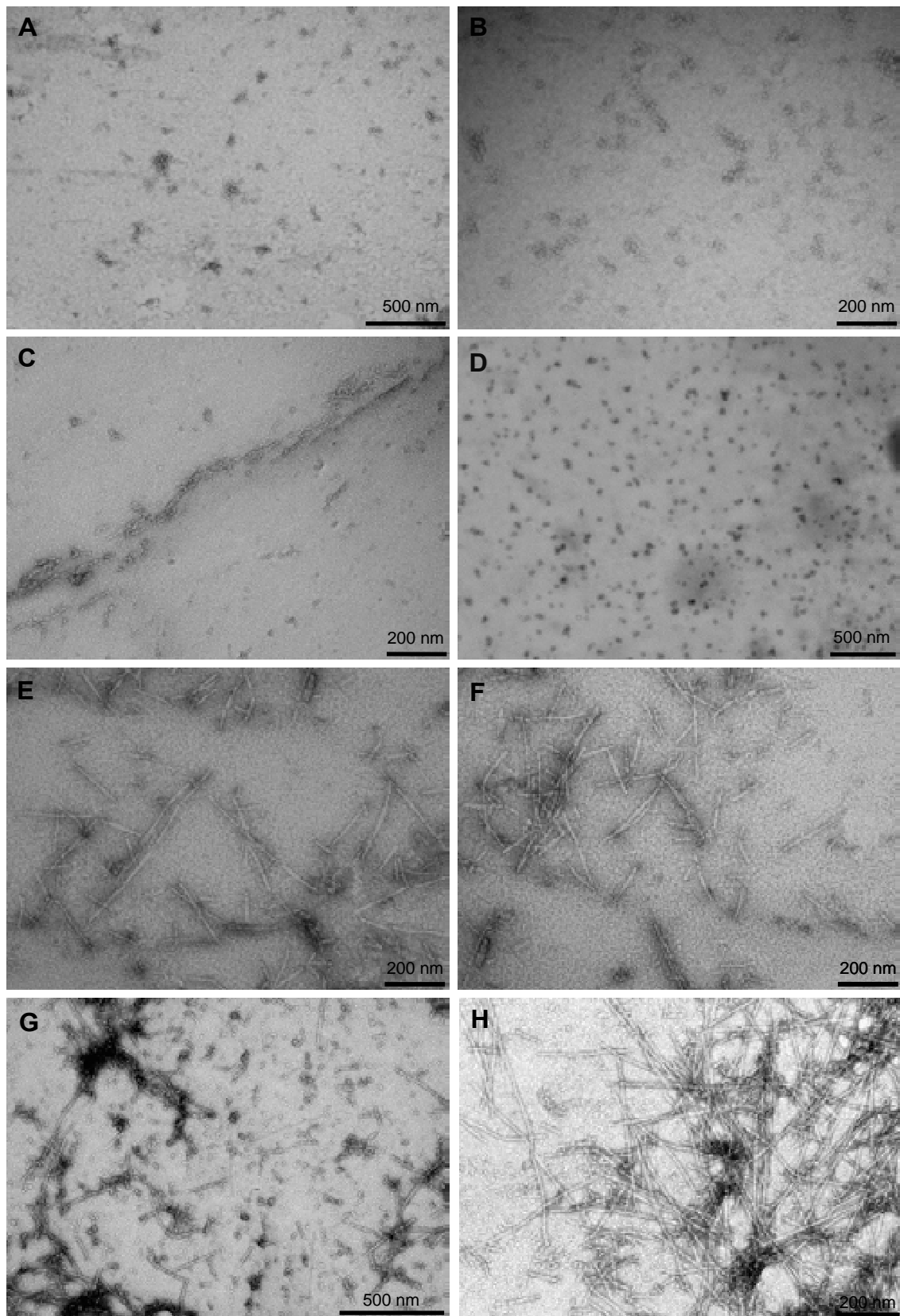
### **3. Morfologia dels agregats formats durant el procés de formació de fibres**

La morfologia de les espècies es va determinar per microscòpia electrònica preparant reixetes de coure amb les alíquotes extretes en els temps que s'indiquen a la figura 34b.

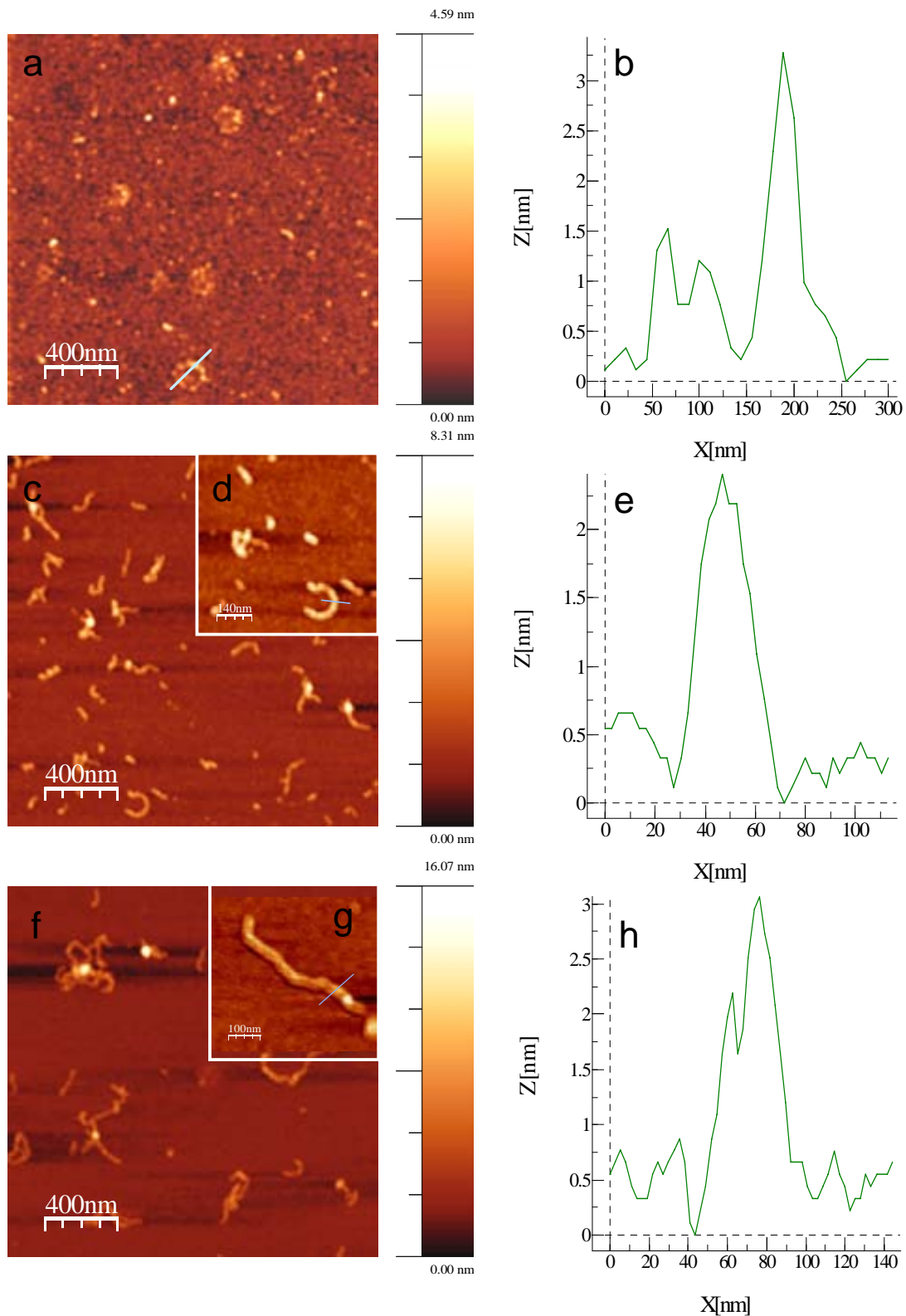
En les micrografies electròniques, es poden observar ja en la fase de latència (2.5 h, figura 37A i 37B) estructures circulars d'un diàmetre de 20 nm aproximadament. Aquestes estructures ja han estat detectades anteriorment per TEM i AFM (Goldsbury et al. 2000; Lashuel et al. 2003; Mastrangelo et al. 2006) i correspondrien a oligòmers d'alt pes molecular. Al final de la fase de nucleació (6 h, figura 37C i 37D) es pot observar un gran nombre d'oligòmers i algunes agrupacions en forma de "collaret de perles", identificades anteriorment com a protofibril·les (Walsh et al. 1999; Caughey i Lansbury 2003).

Durant la fase d'elongació (9 h, figura 37E i 37F), es detecten les típiques fibres amiloides. Aquestes fibres esdevenen més llargues al final de la fase d'elongació quan la fluorescència de la ThT és màxima (15.5h, figura 37G i 37H). En aquest punt, es poden observar oligòmers juntament amb les fibres.

Per a completar l'estudi morfològic dels intermediaris del procés d'agregació, es va fer un estudi per microscòpia de força atòmica. Els resultats obtinguts, consistents amb els obtinguts per TEM, mostren com, durant la fase de latència, es formen agregats rodons de 20 nm a 50 nm de diàmetre (figura 38a) (mesurat com l'amplada a la meitat del pic, figura 38b). L'alçada d'aquests agregats és entre 1 i 3 nm, coincidint amb les mesurades en altres estudis d'AFM per aquest pèptid (Dunstan et al. 2009). En l'alíquota extreta durant la fase d'elongació s'observen oligòmers, protofibres i fibres. En les protofibres, es pot veure com, semblant a l'observat per TEM, es formen els anomenats collarets de perles (figura 38c). L'anàlisi de la mida d'una protofibra mostra que té una amplada d'aproximadament 20 nm i una alçada de 2.5 nm (figura 38e).



**Figura 37.** Micrografies electròniques obtingudes de les alíquotes extretes en els temps indicats amb fletxes a la figura 34b. (A, B) corresponen a les 2.5h; (C, D) 6h; (E, F) 9h i (G, H) 15.5h.



**Figura 38.** Fotografies d'AFM d'aliquotes extretes durant la fase de nucleació i elongació. (a) Inici de la fase d'elongació; (b) anàlisi de la mida dels agregats formats; (c) Inici de la fase de latència; (d) ampliació d'una protofibril·la; (e) anàlisi de la mida de la protofibril·la de l'ampliació (d); (f) final de la fase de latència; (g) ampliació d'una fibra; (h) anàlisi de la mida de la fibra de l'ampliació (g).

Finalment, en la micrografia de l'alíquota extreta al final de la fase d'elongació, es pot observar com ja s'han format algunes fibres (figura 38f, 38f) (Petkova et al. 2002).

#### **4. Discussió**

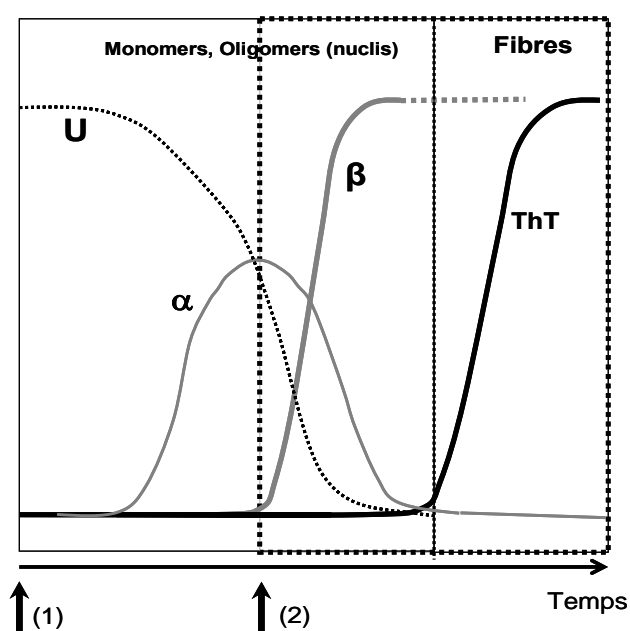
El fet que, en aquest treball, s'hagin aplicat tres tècniques simultàniament a una sola mostra ha permès obtenir informació directa sobre l'estructura i la morfologia dels intermediaris presents en les diferents fases d'agregació a una mateixa concentració de pèptid.

L'agregació del pèptid en les condicions estudiades té lloc en un temps de 16 hores. Aquest temps és més curt que en altres treballs publicats en els quals s'ha treballat a concentracions més baixes (Kirkitadze et al. 2001), s'ha utilitzat pèptid amb TFA enlloc de clor com a contraió o s'ha dissolt el pèptid utilitzant altres mètodes. També en els estudis en què s'han aïllat les espècies monomèriques i dimèriques del pèptid a pH 7 per filtració, centrifugació o cromatografia d'exclusió, el procés d'agregació és més lent. En el present estudi, l'estat monomèric del pèptid abans de començar el procés d'agregació s'ha comprovat per espectroscòpia d'infraroig (Figura 34a) i, el fet que les cinètiques d'agregació siguin més ràpides és degut a que, d'una banda, el contraió del pèptid utilitzat és el clorur i, de l'altra, la concentració del pèptid és alta (vegeu una discussió més àmplia d'aquest aspecte a la discussió general d'aquesta memòria de tesi).

En els primers estadis del procés d'agregació, s'ha observat la presència d'oligòmers com ja s'havia descrit anteriorment (Arimon et al. 2005). Tal com mostren els espectres d'infraroig, el percentatge d'estructura  $\beta$  en aquests estadis és ja de més del 75% de la final i, en acabar la fase de latència, gairebé del 100%. Això vol dir que els oligòmers es formen ràpidament en baixar el pH a 7.4 i que aquests són rics en estructura  $\beta$ . L'estructura  $\beta$  en oligòmers ja s'ha descrit anteriorment (Mastrangelo et al. 2006) i alguns treballs de simulació de dinàmica molecular (Xu et al. 2005) mostren que el canvi estructural de conformacions d'hèlix  $\alpha$  a

fulla  $\beta$  pot tenir lloc en 100 ns quan el pèptid es troba en un entorn aquós. Segons el nostre treball, el fet que en la fase de latència no hi hagi fluorescència de la ThT indica que la fulla  $\beta$  d'aquests agregats no és fibril·lar.

Altres treballs (Kirkitaдзе et al. 2001) parteixen de concentracions més baixes en què s'utilitza el TFA com a contraió i, per tant, de fases de latència més llargues. Aquests treballs presenten la formació d'un intermediari d'estructura hèlix  $\alpha$  abans de la formació d'estructures  $\beta$ . Estudis que han combinat la simulació computacional amb estudis experimentals han proposat també que, en els monòmers d'estructura desordenada, es formaria una hèlix  $\alpha$  en l'extrem C terminal del pèptid per tal de formar oligòmers de 5 o 6 unitats (Baumketner et al. 2006). Aquests treballs, però, no permeten correlacionar els canvis en l'estructura secundària amb la formació de fibres o la morfologia dels d'intermediaris.



**Figura 39.** Resum dels canvis en l'estructura secundària durant el procés de formació de fibres. La figura combina les dades estructurals publicades per Kirkitaдзе et al. ?? (Kirkitaдзе et al. 2001) on s'indica la variació d'estructures desordenades i hèlix  $\alpha$  cap a fulla  $\beta$  detectada per CD. La fletxa amb el (1) detecta l'inici dels experiments de Kirkitaдзе. La fletxa (2) indica el punt d'inici dels experiments d'aquest treball.

Les dades d'aquest treball (figura 36) mostren que, al final de la fase de latència, la fulla  $\beta$  present en la mostra és pràcticament la mateixa que

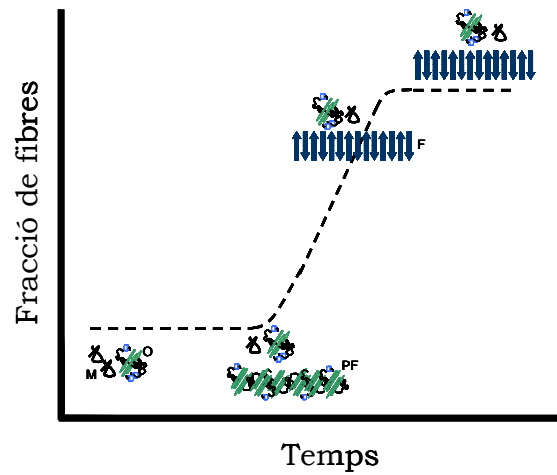
en el final del procés d'agregació. Per tant, durant la fase d'elongació, no hi ha un increment de fulla  $\beta$  sinó una transformació de la fulla  $\beta$  no fibril·lar en fibril·lar. Aquest fet només pot explicar-se si la formació de fibres té lloc per acoblament d'oligòmers d'acord amb el que hauria estat suggerit en treballs anteriors de Blackey, Bitan i Losic (Blackley et al. 2000; Bitan et al. 2003; Losic et al. 2006).

Al final del procés, on s'ha arribat al màxim de fluorescència, es poden observar les típiques fibres amiloides d'estructura  $\beta$  que coexisteixen amb els oligòmers.

Els resultats són compatibles amb les dades que es presenten en el treball de Kirkitadze (Kirkitadze et al. 2001). A la figura 39 s'integren els resultats amb els de la bibliografia.

En la figura 40, es pot veure el punt d'inici dels experiment de Kirkitadze, indicat amb (1) i en què la mostra ha estat filtrada i es treballa a concentracions més baixes i amb TFA com a contraió: les estructures desordenades són majoritàries i es passa per un intermediari  $\alpha$  abans de la formació d'estructures  $\beta$ . Els experiments presentats en aquest capítol partirien en el punt (2), donada l'alta concentració de la mostra i la presència de clorur, en què segurament els oligòmers d'alt pes molecular es formarien ràpidament. Per això, la variació d'estructura observada començaria amb el final de la desaparició d'estructures  $\alpha$  desordenades i el començament d'aparició d'estructura  $\beta$ . En el cas dels nostres experiments, el fet d'haver realitzat les mesures sobre una mateixa mostra permet correlacionar els canvis d'estructura secundària amb la formació de fibres i la morfologia de les espècies presents.

En resum, en aquest treball s'aporten les novetats següents pel que fa al procés d'agregació del pèptid  $A\beta(1-40)$ : (1) durant la fase de latència, es forma pràcticament tota l'estructura  $\beta$ ; (2) durant aquesta fase, aquestes estructures  $\beta$  són no fibril·lars; (3) durant la fase d'elongació es formen estructures fibril·lars a partir de les estructures  $\beta$  no fibril·lars per combinació d'oligòmers (figura 40).



**Figura 40.** Esquema del procés d'agregació segons les dades obtingudes. Els monòmers s'indiquen amb una M, els oligòmers amb una O, les protofibril·les amb PF i les fibres amb una F. L'estructura secundària està indicada en colors: verd, fulla  $\beta$  no fibril·lar; blau, fulla  $\beta$  fibril·lar; negre, desordenat.



**CAPÍTOL 2: Interacció del pèptid A $\beta$ (1-40)  
amb membranes biològiques: Efecte de la  
càrrega superficial**



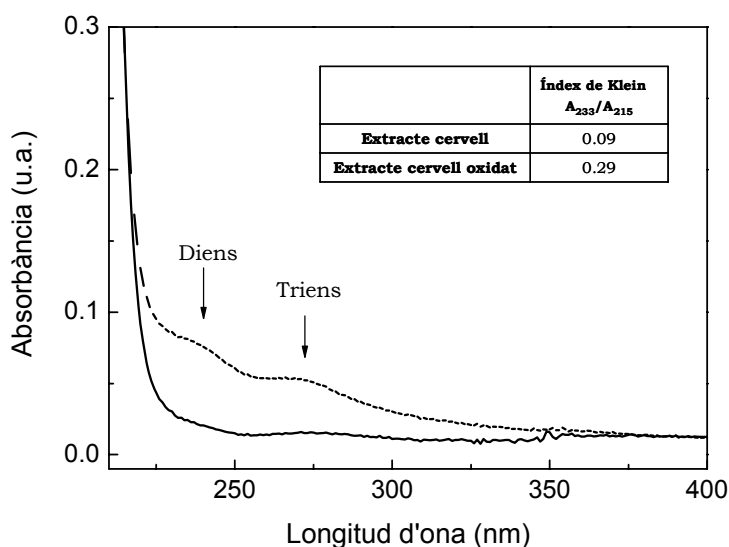
Són molts els estudis que es poden trobar sobre la influència de les membranes en el procés d'agregació dels pèptids amiloides. El fet que les plaques amiloides dels cervells dels malalts d'Alzheimer es trobin associades a les membranes cel·lulars porta a pensar que aquestes poden afectar al procés d'agregació. Un aspecte especialment interessant de la influència de les bicapes lipídiques en l'agregació amiloidogènica és la possible relació entre la peroxidació lipídica i la neurodegeneració. És àmpliament conegut l'efecte dels pèptids amiloides en la peroxidació de lípids de les membranes cel·lulars. D'altra banda, també existeixen evidències experimentals que suggereixen que l'oxidació lipídica estimula la formació de plaques amiloides (Koppaka i Axelsen 2000; Butterfield i Lauderback 2002).

Els mecanismes tòxics que desencadena el pèptid  $\beta$ -amiloide poden estar relacionats amb la interacció directa del pèptid amb la membrana. De fet, existeixen evidències que pèptids i proteïnes amiloidogènics es poden intercalar o penetrar les membranes biològiques portant a la permeabilització d'aquesta, comportant una sèrie de canvis bioquímics (alteració de l'homeostasi dels ions, alteració de les vies de senyalització, etc.). És per això que és actualment un camp de recerca important l'estudi dels agregats amiloides amb membranes biològiques per tal d'elucidar els mecanismes pels quals els pèptids amiloides són tòxics.

Per tot això, en aquest capítol del treball, es mostren els resultats de l'estudi de l'efecte de les membranes de diferent composició i estat d'oxidació sobre l'agregació del pèptid amiloide. A la vegada, es presenta l'estudi de la influència del pèptid sobre les membranes biològiques. Els resultats posen de manifest el paper que juga la densitat de càrrega superficial de les membranes biològiques en la determinació de la conformació del pèptid quan aquest hi interacciona i els efectes d'aquesta interacció en la desestabilització de l'estructura de la membrana.

## 1. Influència de les membranes en la cinètica d'agregació del pèptid A $\beta$ (1-40). Importància de l'estat d'oxidació dels lípids

Per tal d'avaluar la influència de les membranes en la cinètica d'agregació del pèptid A $\beta$ (1-40), s'estudiaren aquestes en presència de membranes model fetes a partir d'extracte lipídic de cervell. El procés d'oxidació del lípid es va realitzar il·luminant el lípid amb llum UV i es va seguir mitjançant el càlcul de l'índex de Klein, seguint l'aparició de diens i triens en l'espectre UV de la mostra. A la taula de la figura 42 es mostra l'índex de Klein dels liposomes no oxidats i dels oxidats.



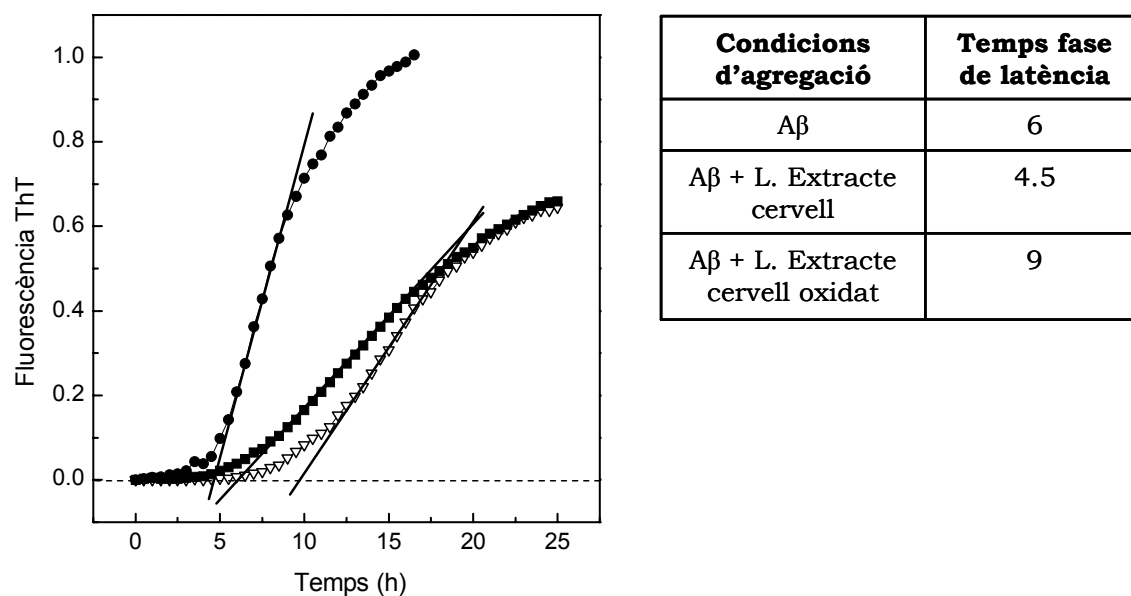
**figura 42.** Mesura del grau d'oxidació dels liposomes de lípid d'extracte de cervell. Absorbància dels liposomes d'extracte de cervell (línia contínua), absorbància dels liposomes oxidats (línia discontinua). Els valors de l'índex de Klein es troben calculats a la taula.

Es considera que un lípid està oxidat quan l'índex de Klein és superior a 0.15; per tant, es pot considerar que els lípids que han estat il·luminats es troben oxidats.

Les cinètiques d'agregació del pèptid en presència de membranes oxidades i no oxidades es mostren a la figura 43.

En presència de liposomes no oxidats es pot veure com la formació de fibres és més ràpida que quan el pèptid agrega en absència de membranes. La quantitat de fibres final també és major en presència de membranes no oxidades que en absència d'aquestes. Aquests fets

indicarien que aquestes membranes podrien actuar com a punt de nucleació pel pèptid afavorint i accelerant la formació de fibres (reduint la fase de latència de 6 a 4.5 hores). D'altra banda, la presència de liposomes oxidats implica un alentiment de les fases de latència i d'elongació i, al final del procés, es formarien menys fibres que en presència de membranes no oxidades.



**Figura 43.** Efecte de l'oxidació dels liposomes en el procés de formació de fibres. Liposomes no oxidats (cercles negres), liposomes oxidats (triangles blancs) i Aβ(1-40) sol (quadrats negres). La relació lípid/pèptid fou 10/1. La taula mostra els temps de duració de la fase de latència.

## 2. Efecte de l'oxidació sobre les característiques fisicoquímiques de les membranes

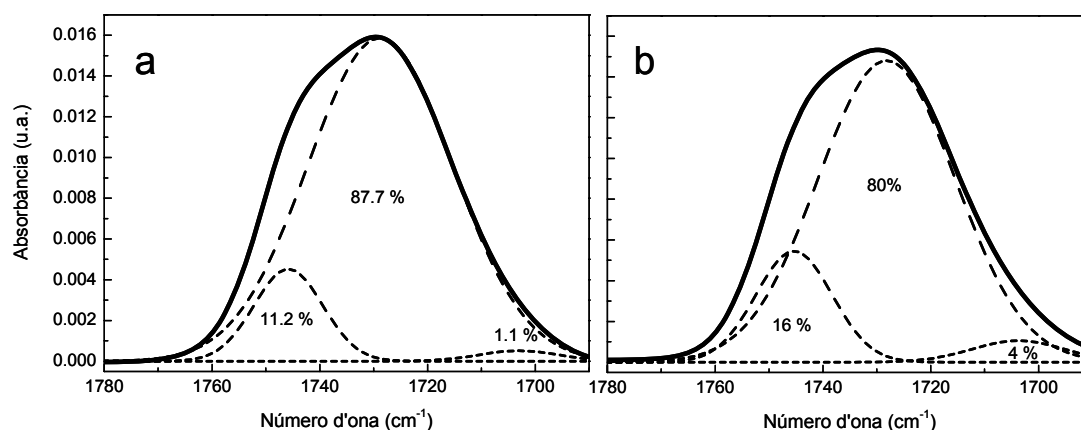
Per tal d'investigar quins paràmetres fisicoquímics associats a les membranes es veuen afectats per l'oxidació dels lípids i es poden relacionar amb la influència d'aquestes sobre la formació de fibres amiloides, es va analitzar la fluïdesa, la hidratació i la densitat de càrrega superficial dels liposomes (no oxidats i oxidats). Els resultats es mostren a la taula 6.

L'anisotropia de les membranes es va mesurar utilitzant la sonda DPH donant resultats semblants en els liposomes oxidats i no oxidats (taula 6).

	<b>Anisotropia</b>	<b>Hidratació (%)</b>	<b>Potencial Z (mV)</b>
<b>Extracte de cervell</b>	$0.185 \pm 0.005$	$88.4 \pm 0.4$	$0 \pm 10$
<b>Extracte de cervell oxidat</b>	$0.202 \pm 0.022$	$85.5 \pm 1.5$	$-48 \pm 10$

**Taula 6.** Efecte de l'oxidació en l'anisotropia, la hidratació i el potencial Z de les membranes de lípid d'extracte de cervell i extracte de cervell oxidat.

La hidratació dels lípids es va estudiar per infraroig analitzant l'absorbància del carbonil de l'enllaç èster dels lípids. L'absorbància d'aquest grup depèn de la formació dels ponts d'hidrogen entre aquest carbonil i les molècules d'aigua presents a la superfície de la membrana. Els carbonils poden estar deshidratats (absorbeixen a  $1744 \text{ cm}^{-1}$ ), hidratats (absorbeixen a  $1729 \text{ cm}^{-1}$ ) i dihidrats (absorbeixen a  $1711 \text{ cm}^{-1}$ ) tal com es descriu a la literatura (Mantsch i McElhaney 1991; Nir i Nieva 2000; Aranda et al. 2003). El percentatge d'hidratació s'ha calculat a partir de l'àrea corresponent a la banda assignada a cada grau d'hidratació respecte l'àrea total del carbonil (figura 44).



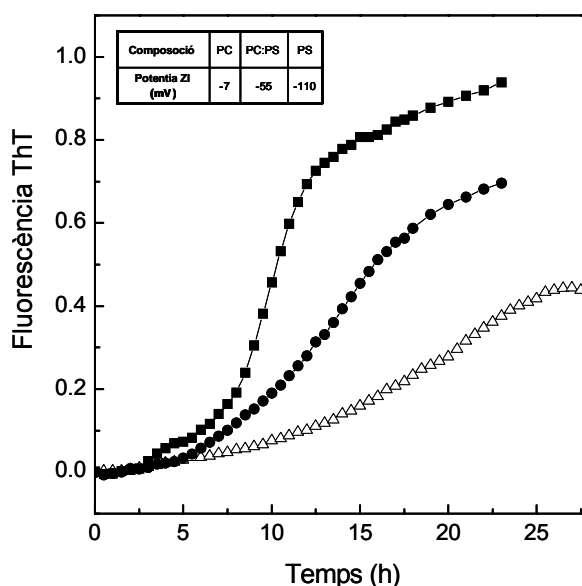
**Figura 44.** Espectres d'infraroig del carbonil de l'enllaç èster del lípid d'extracte de cervell (a) i del lípid d'extracte de cervell oxidat (b).

Finalment, es va mesurar el potencial Z dels liposomes oxidats i no oxidats utilitzant un instrument Z-sizer. El resum de les dades es mostra en la taula 6. En aquest cas, sí que s'observa un efecte clar de l'oxidació lipídica. Mentre que les membranes d'extracte lipídic de cervell no oxidades tenen una superfície electroneutra, l'oxidació dels lípids genera una càrrega superficial negativa.

### 3. Efecte de la càrrega de les membranes en el procés d'agregació

Per tal de corroborar el possible efecte de la càrrega superficial de membrana sobre la fase de latència, es va estudiar l'agregació del pèptid en presència de membranes model de PC amb diferents percentatges de PS, lípid que té el cap polar negatiu.

Es va mesurar el potencial Z a fi de comparar-lo amb els liposomes de lípid d'extracte de cervell. La figura 45 mostra les cinètiques d'agregació del pèptid A $\beta$ (1-40) en presència de les membranes model. El potencial Z corresponent a les membranes amb contingut creixent de PS es mostra a la taula inserida en la figura.



**Figura 45.** Cinètiques d'agregació del pèptid  $\beta$  amiloide amb membranes amb diferent càrrega negativa: PC (quadrats negres), PC:PS (9:1) (rombes negres) i PS (triangles blancs).

A la figura 45, es pot observar que com més carregades negativament estan les membranes més lenta és la formació de fibres, tant pel que fa a la fase de latència com a la d'elongació. També es pot veure que com més carregades estan les membranes menys fibres es formen al final del procés d'agregació. Aquest resultat corrobora que la interacció del pèptid amb les membranes carregades negativament té com a conseqüència l'alentiment del procés d'agregació i una disminució de la quantitat de fibres final. Aquest alentiment és més pronunciat com més negativa és la superfície de la membrana.

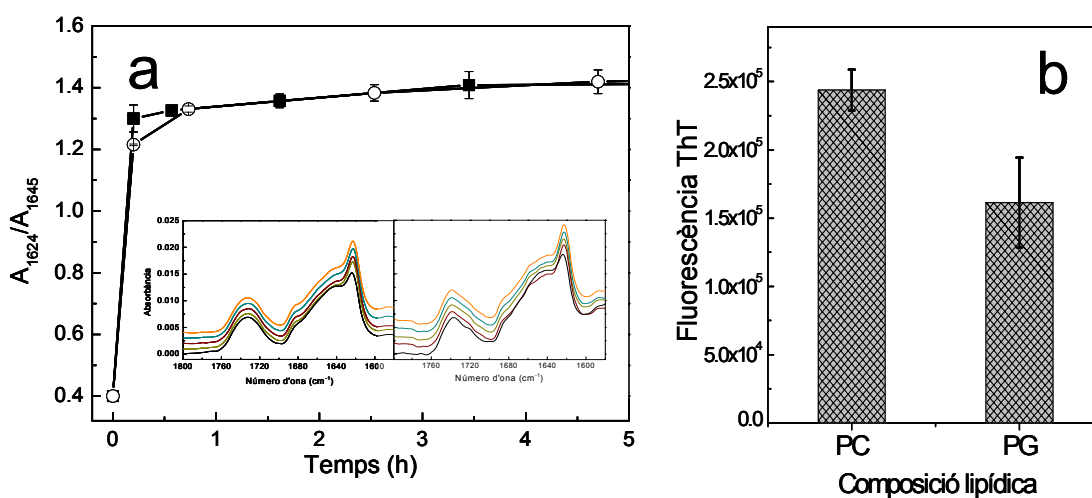
També es va estudiar l'efecte de les càrregues negatives sobre l'estructura secundària del pèptid seguint l'agregació per espectroscòpia d'infraroig a una concentració de 300  $\mu\text{M}$  i en presència de 3 mM de lípid. Com que les concentracions per a la tècnica d'infraroig han de ser més altes que per fluorescència, s'ha mantingut la relació lípid/pèptid. En la gràfica 46A es mostra la variació de la relació: absorbància 1623/absorbància 1643, indicativa de la formació d'estructures  $\beta$  d'agregació a expenses d'estructures desordenades o helicoïdals. A més, la fosfatidilserina té un grup serina que absorbeix a la regió de l'amida, per la qual cosa s'ha hagut d'utilitzar fosfatidilglicerol com a lípid amb càrrega negativa.

Donades les diferències entre les dues tècniques (requeriment de concentracions diferents, lípid de càrrega negativa diferent i absència d'agitació en l'infraroig) i per assegurar que la formació de fibres és similar a la que s'observa als experiments amb PS, es va reservar part de la mostra d'infraroig i es va incubar a 37°C. Al finalitzar la cinètica d'infraroig, es va afegir ThT i se'n va mesurar la fluorescència en un lector de plaques. Els resultats de la fluorescència es mostren a la figura 46B.

La figura 46 mostra que la formació d'estructures  $\beta$  és molt ràpida i independent de la composició de les membranes. Tant en presència de membranes carregades com neutres, la relació  $A_{1623}/A_{1643}$  és semblant. L'espectroscòpia d'infraroig detecta la formació d'agregats peptídics però no pot distingir els agregats no fibril·lars de les fibres: les dues formes



d'agregació absorbeixen al voltant de  $1620\text{ cm}^{-1}$ . D'altra banda, es pot veure en els resultats de ThT que al final del procés d'agregació la fluorescència és significativament més alta en el cas de les membranes de PC (no carregades). Aquesta diferència de fluorescència de la ThT concorda amb la diferència observada a la figura 46, on és més alta en presència de membranes de PC que en presència de membranes de PS, al final del procés d'agregació.



**Figura 46.** a) Cinètica de formació d'estructures  $\beta$  agregades a expenses d'estructures desordenades en presència de membranes calculant la relació de les absorbàncies a 1623 i 1643 PC (quadrat negre) i PG (rodona buida). Els espectres d'infraroig es troben inserits al gràfic. b) Mesura de ThT al final de la cinètica.

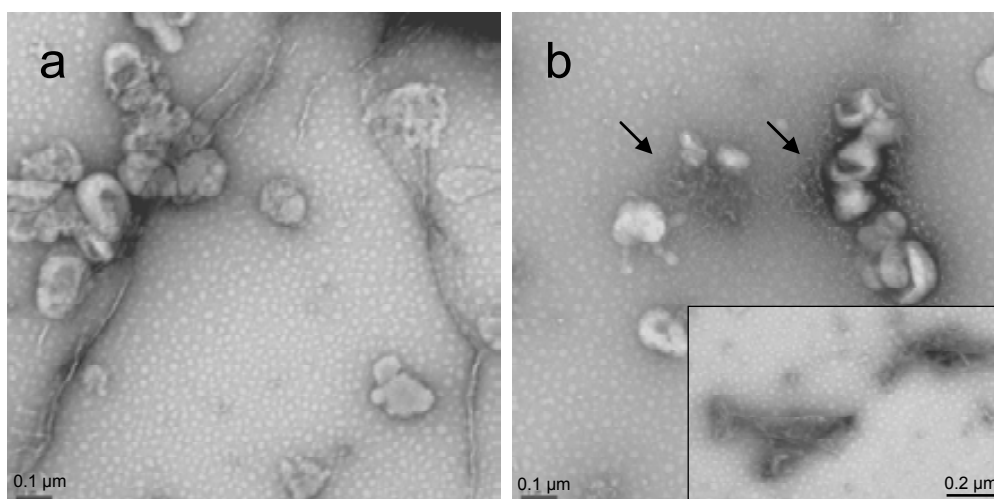
Per tant, com que la quantitat de fibres (fluorescència de ThT) és major en el cas de membranes neutres i la quantitat total d'estructura  $\beta$  és equivalent en els dos casos es pot concloure que, en interaccionar amb membranes negatives, el pèptid forma agregats  $\beta$  no fibril·lars.

#### 4. Morfologia dels agregats formats a les membranes

Per microscòpia electrònica de transmissió, es varen observar els agregats formats sobre les membranes de PC i PS tal com es mostra a la figura 47.

En presència de membranes de PC, es pot observar que es formen fibres al cap de poques hores (figura 47a). D'altra banda, quan les membranes estan altament carregades negativament, membranes de PS, es poden

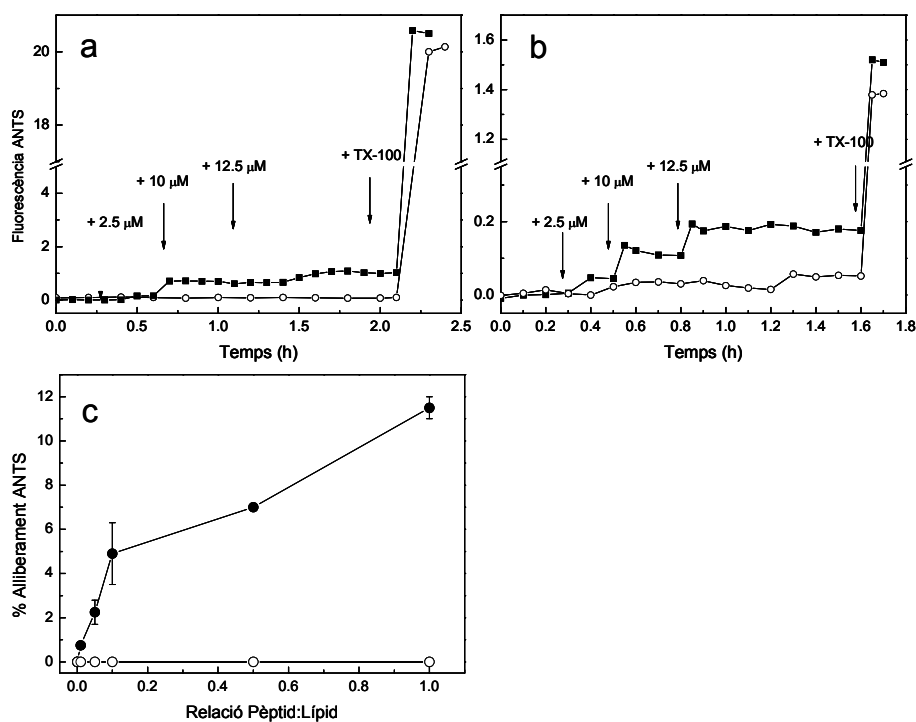
observar agregats grans amorfs, majoritàriament associats a membranes. Aquests agregats es formen ràpidament quan es mescla el pèptid amb les membranes. Als 30 minuts, no s'observen fibres associades a les membranes tot i que aquestes sí que estan presents en la solució durant la fase d'elongació i al final del procés, tal i com mostra l'inset de la figura 47.



**Figura 47.** Micrografies electròniques del pèptid en presència de membranes de PC (a); i de PS (b). El pH de les suspensions abans de preparar les reixetes era 7.4. Els agregats amorfs s'han senyalat amb fletxes. L'inset de la figura b mostra les fibres que també s'acaben formant en presència de membranes de PS.

## 5. Efecte del pèptid sobre les membranes

L'efecte del pèptid sobre les membranes va estudiar-se seguint l'alliberament de la sonda ANTS encapsulada en liposomes. Aquesta sonda es va encapsular juntament amb el seu desactivador (quencher) en liposomes de PC, PC:PS (9:1) i PS. Si la membrana es desestabilitza i s'allibera el contingut de la vesícula, la sonda deixa d'estar desactivada per efecte de la dilució i, per tant, emet fluorescència. Seguint la fluorescència de la sonda a mesura que s'afegeix pèptid a la mostra, es pot mesurar la capacitat del pèptid A $\beta$  per desestabilitzar la membrana. En liposomes neutres, de PC, o lleugerament carregats, 10% PS, no s'observa alliberament de sonda. Sí que se n'observa quan les membranes són de PS.



**Figura 48.** Alliberament de la sonda ANTS per acció del pèptid Aβ(1-40) a concentracions creixents. L'alliberament de sonda en membranes de PC s'ha representat en rodones blanques i el corresponent als liposomes de PS amb quadrats negres. La concentració de lípid fou 250 μM (a) i 25 μM (b). En els dos casos el pèptid va afegir-se en estat monomèric a pH12. El percentatge d'alliberament en funció a la relació pèptid:lípid es mostra en (c), les rodones blanques corresponen als experiments realitzats en presència de liposomes de PC i els quadrats negres dels liposomes de PS.

La figura 48 mostra els resultats per a les membranes de PS al 100% i PC. Els resultats obtinguts per a les membranes de PC són semblants als obtinguts per a les membranes de PC:PS (9:1) (no representats) en què tampoc no s'ha observat alliberament de sonda. Per tant, es pot dir que el pèptid, en aquestes condicions, només és capaç de desestabilitzar les membranes carregades amb una alta densitat de càrrega negativa. En el cas de les membranes de PS al 100%, s'observa un augment de l'alliberament de la sonda en incrementar la relació pèptid:lípid.

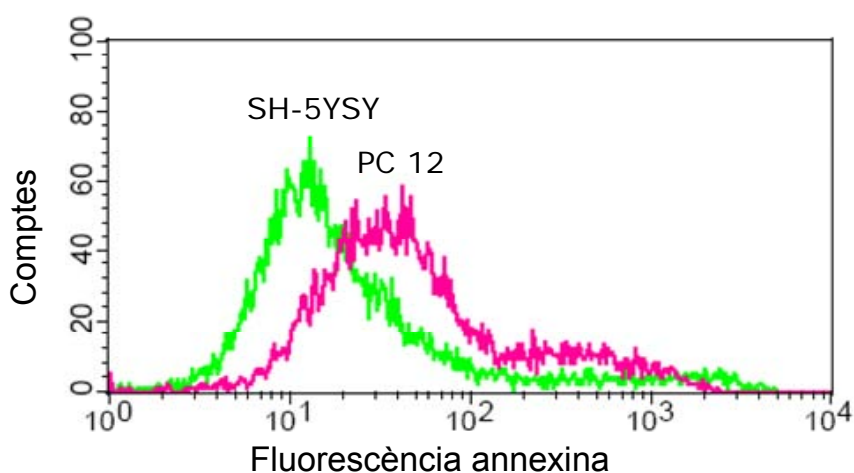
## 6. Toxicitat cel·lular

Els resultats anteriors posen de manifest la relació entre la densitat de càrrega superficial negativa i la capacitat del pèptid de desestabilitzar

l'estructura de la membrana. Aquest fet podria tenir la seva correlació en la membrana de la cèl·lula. Per tal d'estudiar la possible relació entre les càrregues negatives i la toxicitat del pèptid en cultiu cel·lular, es van realitzar experiments de citotoxicitat amb dues línies cel·lulars amb característiques diferents:

1. Cèl·lules PC12: Línia cel·lular derivada d'un feocromacitoma (tumor neuroendocrí) de la medul·la de rata. Aquesta línia té caràcter apoptòtic en el sentit que presenta crònicament fosfatidilserina a la part extracel·lular de la membrana (Arispe et al. 2004).
2. Cèl·lules SH-SY5Y: Línia cel·lular de tercera generació de neuroblastomes, clonada a partir d'altres línies provinents d'una línia cel·lular original de feocromacitoma.

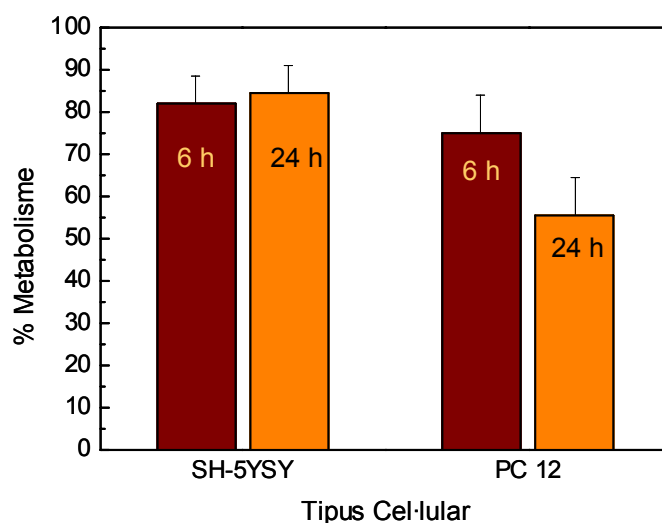
El grup d'Arispe ja havia descrit anteriorment que les cèl·lules PC12 exposen crònicament PS a la superfície de la membrana (Lee et al. 2002; Simakova i Arispe 2007). Per tal de comparar la PS exposada a la membrana de les PC12 i les SH-SY5Y, es va utilitzar el test d'annexina V. L'annexina és una proteïna que s'uneix específicament a la PS i el marcador FITC permet mesurar la fluorescència de la que s'ha unit a les cèl·lules per citometria de flux. En els estudis de citometria també es va utilitzar iodur de propidi com a marcador de viabilitat cel·lular.



**Figura 49.** La figura mostra la fluorescència del fluoròfor de l'annexina unida a la superfícies de les cèl·lules SH-SY5Y i PC12.

A la figura 49 es pot veure com la fluorescència de l'annexina és més alta en les cèl·lules PC12 que en les SH-SY5Y, indicant un nivell més alt de PS externa i, per tant, una major càrrega negativa a la membrana.

La toxicitat del pèptid en els dos tipus cel·lulars es va mesurar utilitzant el reactiu MTT, indicatiu del metabolisme cel·lular, utilitzant una concentració de pèptid 25  $\mu$ M afegit a pH 7.4. La mesura del metabolisme cel·lular es va fer al cap de 6 i de 24 hores d'haver afegit el pèptid a les cèl·lules (figura 50).



**Figura 50.** Percentatge del metabolisme cel·lular respecte al control afegint A $\beta$  a pH 7.4 incubat 6h amb les cèl·lules (barres color vermell) i 24h (barres color taronja).

La figura 50 mostra el percentatge de metabolisme respecte a les cèl·lules control, a les quals s'ha afegit la mateixa quantitat de solució amortidora.

Es pot observar que el pèptid redueix en un 20 % el metabolisme de les cèl·lules SH-SY5Y independentment del temps d'incubació. En canvi, en cèl·lules PC12, el pèptid redueix el metabolisme en un 25 % a les 6 hores i un 40 % a les 24 hores. Aquest resultat mostra que, en les cèl·lules amb més càrrega negativa a la superfície de la membrana, el pèptid causa una disminució del metabolisme més elevada que les cèl·lules amb menys càrregues negatives.

## 7. Discussió

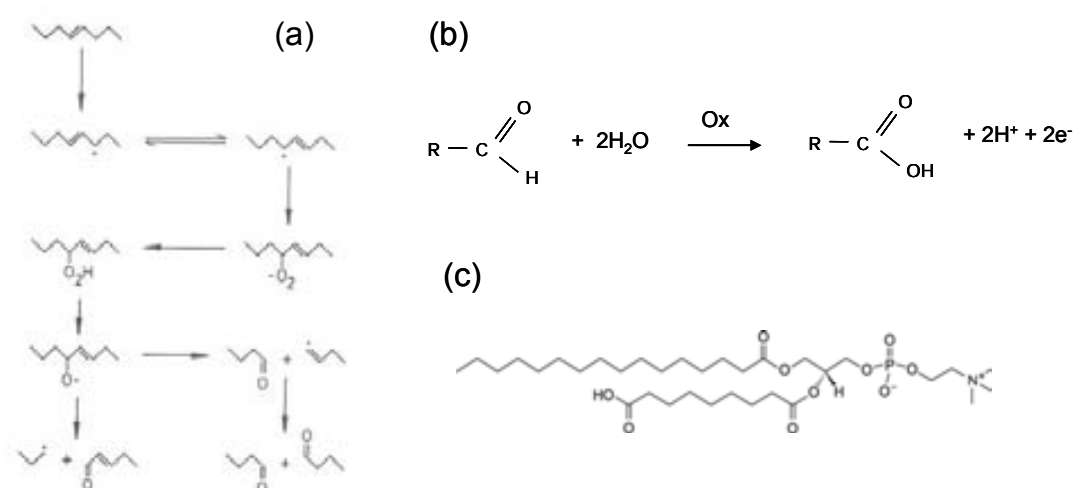
En els últims anys, s'han realitzat diferents estudis sobre la influència de les propietats fisicoquímiques de les membranes en la polimerització del pèptid amiloide. Propietats com la composició lipídica, la fluïdesa de membrana i la càrrega electrostàtica han estat estudiades (Gorbenko i Kinnunen 2006).

A més, les propietats tòxiques dels pèptids poden tenir relació amb els seus efectes directes sobre les membranes ja que el dany a les membranes és una característica clara de les cèl·lules que envolten les plaques neurítiques del cervell.

Un aspecte particularment interessant, del que cada cop hi ha més evidències experimentals, és l'efecte que pot tenir la peroxidació lipídica en processos de neurodegeneració. L'estrès oxidatiu és un dels trets característics en la malaltia. Ha estat descrit que els pèptids amiloides poden oxidar els lípids de la membrana cel·lular al cervell (Butterfield 2002) i que aquesta oxidació és inhibida per antioxidants. Segons Koppaka i Axelsen (Koppaka i Axelsen 2000), les membranes amb lípids oxidats poden accelerar l'acumulació de pèptids amiloides.

Els resultats presentats en aquest treball demostren que, en presència de membranes model d'extracte de lípid no oxidat, es produeix una acceleració de la cinètica d'agregació del pèptid A $\beta$ (1-40). En canvi, quan el lípid ha estat oxidat, es produeix un alentiment del procés d'agregació del pèptid, amb un clar allargament de la fase de latència.

L'estudi dels canvis en les propietats fisicoquímiques de la membrana en el procés d'oxidació dels lípids d'extracte de cervell ha mostrat que el grau d'hidratació i la fluïdesa no depenen del seu estat d'oxidació. Entre les membranes no oxidades i les oxidades hi ha però una diferència molt clara: el valor del potencial Z és proper a 0 en les membranes no oxidades i negatiu (-48 mV) en el cas de membranes oxidades. Per tant, el procés d'oxidació provoca l'aparició de càrregues negatives a la superfície de les membranes model. L'aparició d'aquestes càrregues pot ser deguda a l'oxidació de les cadenes alcalines dels fosfolípids tal com es descriu a la figura 51.

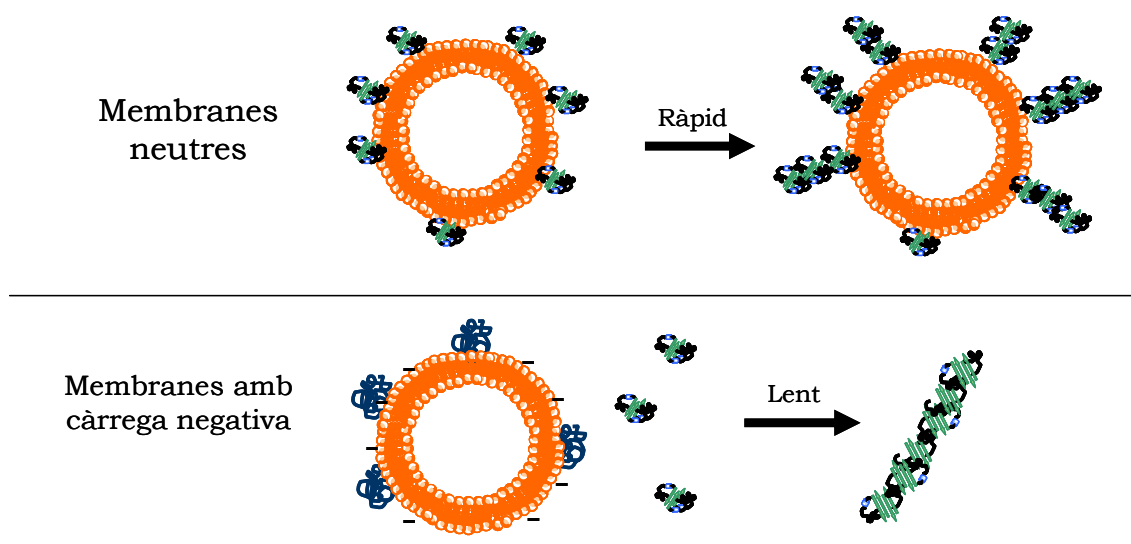


**Figura 51.** Procés d'oxidació de les cadenes hidrocarbonades del lípid (New 1990). (a) Oxidació de la cadena degut a la presència de radicals lliures. (b) Oxidació de l'aldehid a àcid. (c) Producte final de la reacció. A pH neutre, el grup OH es troba desprotonat generant una càrrega negativa.

El procés d'oxidació implica la formació de radicals lliures que reaccionen amb la cadena hidrofòbica de la membrana formant aldehids. La rotació dels enllaços C-C permeten als grups polars emergir a la superfície de la membrana on són oxidats a àcid. D'altra banda, l'oxidació de les membranes pot provocar la hidròlisi de l'enllaç èster donant lloc a un àcid gras, que tendirà a quedar-se a la bicapa, lleugerament desplaçat en la part del carboxil cap a la superfície (New 1990; Fruhwirth et al. 2007).

Els experiments realitzats amb membranes model que contenen PS, demostren que, efectivament, un augment de la densitat de càrrega negativa a la superfície de la membrana causa un allargament de la fase de latència del procés d'agregació del pèptid (figura 45).

A diferència de les membranes carregades negativament, les membranes sense càrrega superficial, com són les membranes d'extracte de cervell no oxidat, acceleren i afavoreixen la formació de fibres. Això indica que les membranes neutres podrien actuar com a punts de nucleació del pèptid per a la formació de fibres (figura 52).



**Figura 52.** Hipòtesi de la interacció del pèptid amb membranes neutres, on les membranes actuarien com a punts de nucleació per a la formació de fibres, i amb membranes carregades negativament, on el pèptid formaria agregats amorfs amb capacitat de desestabilitzar la membrana.

Els experiments en què s'ha combinat l'espectroscòpia d'infraroig i de fluorescència de ThT han mostrat que la proporció de fibres és major en presència de membranes neutres que de membranes carregades negativament, mentre que la proporció d'estructures  $\beta$  és igual en ambdós casos. Per tant, es pot deduir que, en presència de membranes negatives, existeix una població major d'agregats peptídics amorfs d'estructura  $\beta$  no fibril·lar, els quals estan interaccionant amb la membrana (figura 52). Aquests agregats, a més, són capaços de desestabilitzar la bicapa (experiments d'alliberament de la sonda ANTS, figura 48). Aquests estudis són consistents i ofereixen una base estructural a l'article prèviament publicat per McLaurin i Chakrabartty (McLaurin i Chakrabartty 1996) en què descriuen que l'A $\beta$ (1-40) és capaç de desestabilitzar membranes riques en fosfatidilglicerol (lípid carregat negativament), constatant així la importància de la càrrega negativa de les membranes en la capacitat del pèptid de pertorbar la bicapa lipídica.

És important que els resultats obtinguts en sistemes model, com els que acabem de mencionar, amb liposomes, serveixin per a dissenyar altres experiments que ens acostin més al sistema fisiològic. Per aquest

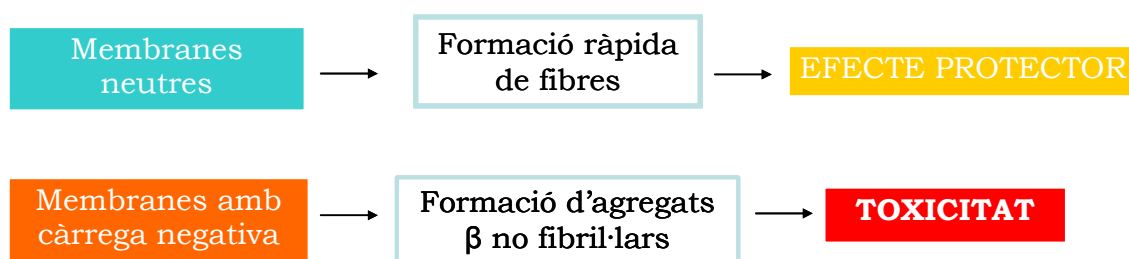


motiu, hem buscat un sistema cel·lular que ens permetés avaluar la possible influència de la càrrega superficial de la membrana cel·lular amb la citotoxicitat del pèptid A $\beta$ (1-40). En aquest sentit, els estudis de toxicitat cel·lular en línies de neuroblastoma i feocromacitoma han donat una toxicitat més elevada del pèptid en cèl·lules PC12 que en cèl·lules SH-SY5Y. Una de les característiques de les cèl·lules PC12 és l'expressió crònica de PS a la superfície de la membrana i, per tant, una càrrega negativa més elevada que les SH-SY5Y.

Aquests resultats posen de manifest la rellevància de la càrrega superficial de la membrana cel·lular en relació a la toxicitat del pèptid amiloide i, considerats juntament amb els resultats obtinguts amb el sistema model, obren la porta a un possible paper rellevant dels agregats peptídics amorfs en el sistema fisiològic. Els nostres resultats amb el sistema cel·lular es complementen amb el treball d'Arisepe i col·laboradors ((Lee et al. 2002; Simakova i Arisepe 2007). Aquests autors, descriueren que la citotoxicitat del pèptid amiloide pot ser bloquejada pre-tractant les cèl·lules amb annexina. Aquest fet ja posava de manifest la importància de les càrregues negatives a la superfície de la membrana.

Dels resultats del nostre treball, però, en sorgeix un esquema d'interacció del pèptid amiloide amb les membranes més general (figura 52). Quan el pèptid interacciona amb membranes electroneutres, aquestes actuen com a element catalitzador de la formació de fibres amiloides. En aquestes condicions, sembla que la interacció amb les membranes augmenta els punts de nucleació. Sobre les membranes s'hi formarien nuclis en major nombre però no diferents als que es formen en dissolució (descrits en la primera part d'aquesta tesi), donant lloc a una formació de fibres més ràpida. En canvi, amb membranes carregades negativament, la interacció comporta la formació d'unes espècies agregades diferents, no fibril·lars, que tenen la capacitat de desestabilitzar la membrana. Aquest fet pot ser rellevant en relació la capacitat citotòxica del pèptid. L'efecte d'alentiment observat en la cinètica seria degut a què quedaria una concentració de pèptid

disminuïda en solució, la qual evolucionaria cap a fibres. En aquest treball s'ha vist com les càrregues negatives de les membranes poden provenir de l'oxidació del lípid. Aquest fet és especialment rellevant si es té en compte la clara relació que existeix entre la malaltia d'Alzheimer i l'estrès oxidatiu. De fet, l'estudi dels efectes dels processos d'oxidació cel·lular en la malaltia d'Alzheimer és, avui en dia, un àrea de recerca en la qual es treballa intensament. En relació als efectes relacionats amb l'oxidació de fosfolípids de les membranes, l'atenció s'ha centrat habitualment en l'aparició d'espècies específiques, com el 4-hidroxinonenal (HNE), que pot afectar també el procés amiloidogènic (Murray et al. 2007). Malgrat això, segons els resultats del present treball, s'hauria de considerar també la possibilitat que els processos d'oxidació condueixin a la formació de càrregues negatives a la superfície de les membranes. Aquest fet contribueix a enriquir el ventall d'explicacions moleculars per a elucidar la relació entre el metabolisme oxidatiu i l'Alzheimer. A més dels processos oxidatius, hi ha altres processos cel·lulars que condueixen a l'aparició de càrregues negatives a la superfície com és, per exemple, l'aflorament de PS a la superfície cel·lular com a conseqüència de processos preapoptòtics tal com assenyalen els nostres estudis i els d'Arispe et al. amb cèl·lules PC12.



**Figura 53.** Esquema de la interacció del peptid A $\beta$  amb membranes neutres i carregades negativament i els efectes sobre la toxicitat.

Aquest fet també pot ser rellevant a l'hora d'explicar els efectes de citotoxicitat del peptid amiloide. El significat dels resultats en relació a la toxicitat del peptid s'esquemmatitzen a la figura 53. La interacció amb les membranes electroneutres - membranes que no han patit processos

d'oxidació o que no són conseqüència de processos preapoptòtics (aflorament de PS) - portaria a la formació ràpida de fibres, o sigui d'estructures no tòxiques. La interacció amb membranes negatives, en canvi, es traduiria en la formació d'agregats no fibril·lars amb poder citotòxic.

Arribats en aquest punt, cal preguntar-se què provoca la formació d'agregats moleculars no fibril·lars d'estructura  $\beta$  a la superfície de membranes carregades negativament. El capítol següent es dedica a intentar respondre aquesta pregunta.



**CAPÍTOL 3: Influència del pH en el  
procés d'agregació i en la toxicitat del  
pèptid A $\beta$ (1-40)**



En el capítol anterior d'aquesta tesi es mostra com, a pH neutre, el pèptid desestabilitza únicament membranes de fosfatidilserina, altament carregades negativament. El seguiment de la formació de fibres amb aquesta composició de membrana ha permès veure un alentiment de la cinètica d'agregació del pèptid i una menor formació de fibres. Aquest fet és degut a què sobre la superfície de les membranes carregades negativament es formen agregats no fibril·lars. És, per tant, important la caracterització molecular d'aquests agregats, així com l'elucidació de les causes fisicoquímiques que porten a la seva formació, ja que, segurament, són els responsables de l'augment de permeabilitat de la membrana.

El model clàssic de Gouy-Chapman-Stern descriu que les membranes carregades negativament atreuen ions carregats positivament creant una capa difusa a la superfície. En condicions de baixa força iònica, les càrregues negatives de la superfície de la membrana atreuen protons, creant-se així un micro-pH més baix que el de la suspensió. En aquest capítol, es calcula el pH a la superfície de la membrana a partir del potencial  $Z$  mesurat i es fa un estudi dels agregats que es formen a diferents pH. Els resultats mostren que el micropH de la superfície de la membrana, originat per la densitat de càrrega negativa, juga un paper determinant en la formació dels agregats no-fibril·lars. Cal tenir en compte que una disminució del pH local pot donar-se en diferents situacions fisiològiques com en casos d'isquèmia i/o hipòxia provocades per hemorràgies o un reg sanguini insuficient. La manca d'oxigen al cervell que es produeixi en aquestes situacions implica el metabolisme anaeròbic de les cèl·lules que pot acabar amb acidosi degut a l'acumulació d'àcid làctic i  $\text{CO}_2$ .

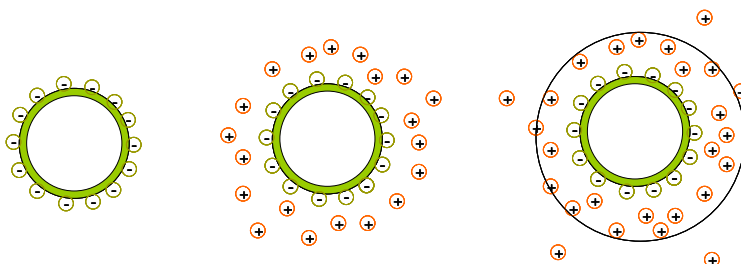
## 1. El pH a la superfície de la membrana

El fet que el pèptid desestabilitzi les membranes quan aquestes estan carregades negativament ens porta a preguntar-nos si no hi ha altres aspectes fisicoquímics que resultin importants per a explicar la formació i els efectes d'aquests agregats a més de les interaccions electrostàtiques òbvies entre les càrregues de la superfície de la membrana i els residus carregats dels agregats peptídics. En aquest sentit, les càrregues de la superfície de la membrana tenen la capacitat d'atreure contraions del medi aquós, incrementant la concentració d'aquests a la superfície creant una capa difusa (figura 54). Aquesta situació és descrita pel model clàssic de Gouy-Chapman-Stern (Cevc, 1990), que permet relacionar el potencial electrostàtic de superfície ( $\varphi_0$ ) amb la de densitat de càrrega ( $\sigma$ ) (Equació 15).

$$\varphi_0 = \sqrt{\frac{2\pi RT\sigma}{F^2 \epsilon_b z}}$$

(Equació 15)

on R és la constant dels gasos; T, la temperatura; F, la constant de Faraday;  $\epsilon$ , la constant dielèctrica del medi;  $c_B$ , la concentració d'ions en el medi aquós;  $\sigma$ , la densitat de càrrega a la superfície i z, la valència del ió.



**Figura 54.** Esquema de la capa difusa de protons que es forma a la superfície de les membranes carregades negativament creant un microentorn de pH més baix.

La concentració de ions a la superfície de la membrana depèn del potencial de superfície tal i com ho descriu l'equació de Boltzman



$$c_S = c_B e^{-ze\phi/k_B T}$$

(Equació 16)

on  $C_S$  és la concentració de ions a la superfície de la membrana;  $C_B$ , la concentració en el medi aquós;  $z$  la valència del ió;  $e$ , la càrrega fonamental;  $k_B$ , la constant de Boltzman i  $T$ , la temperatura absoluta.

Utilitzant l'equació de Boltzman, s'ha calculat la concentració teòrica de protons (cations majoritaris en el sistema estudiat) en funció de la densitat de càrrega superficial per a les membranes model utilitzades en aquest treball. S'ha agafat, com a aproximació del potencial de superfície, el valor del potencial  $Z$  mesurat experimentalment amb un Z-sizer.

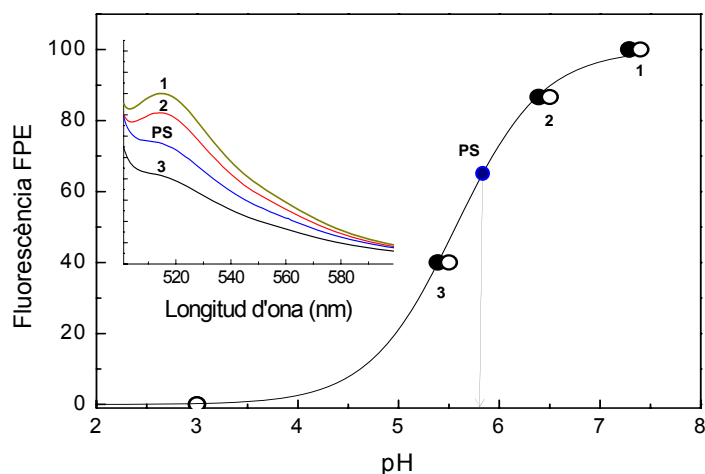
<b>Composició membrana</b>	<b>Potencial Z (mV)</b>	<b>Concentració H<sup>+</sup> (M)</b>	<b>pH</b>
<b>PC</b>	- 7	$5.2 \cdot 10^{-8}$	7.3
<b>PC:PS (9:1)</b>	- 55	$3.1 \cdot 10^{-7}$	6.5
<b>PS</b>	-110	$2.4 \cdot 10^{-6}$	5.6

**Taula 7.** Càlcul de la concentració de protons i pH a la superfície de la membrana.

Els resultats, resumits la taula 7, mostren que com més carregada està la membrana més baix és el pH a la superfície, arribant a un pH de 5.6 en els liposomes de PS al 100% quan el pH de la solució és 7.4.

Aquest canvi de pH es pot comprovar si es disposa d'un sensor fluorescent que es pugui incorporar a la superfície de la membrana. Un d'aquests sensors és la sonda Fluoresceinfosfatidiletanolamina (FPE), la fluorescència de la qual depèn del pH. En estar incorporada a una bicapa lipídica, amb la molècula de fluoresceïna a la superfície de la membrana, el canvi de pH depèn del valor del potencial de superfície (equació 3, secció 5.4 de materials i mètodes). A la figura 55 es mostra la valoració de la fluorescència de la sonda FPE incorporada en membranes de PC en funció del pH (suspensions de membranes de PC a diferents pH). La interpolació del valor de la fluorescència obtinguda

per una suspensió de membranes de PS a pH 7.4, marcades amb FPE dona un pH de 5.8. Aquest pH seria el pH a la superfície d'aquestes membranes. Aquest valor és comparable al del càlcul teòric de la taula 7.



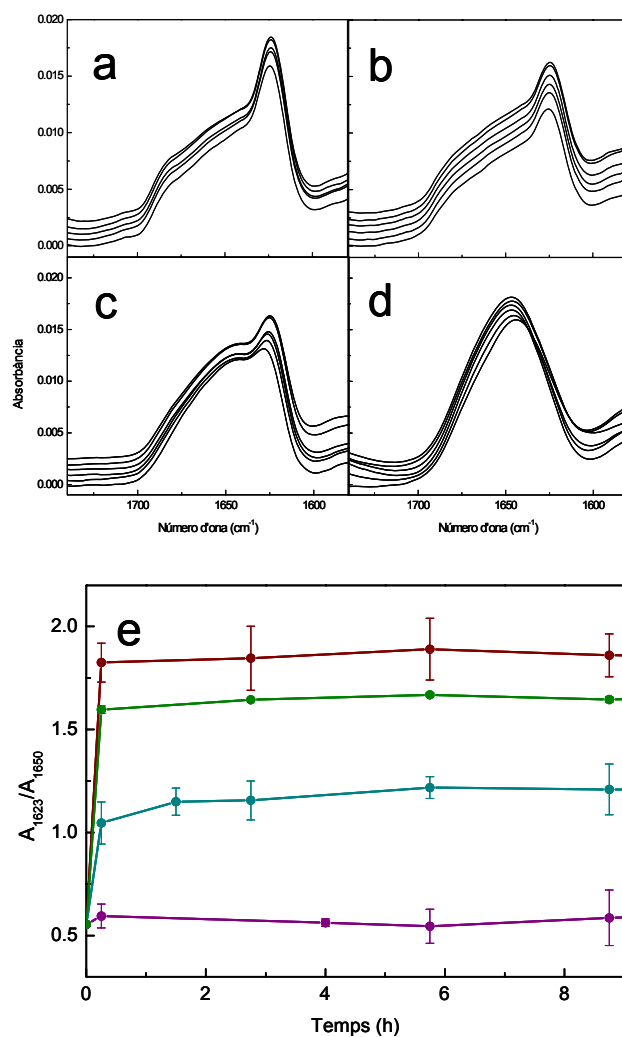
**Figura 55.** Valoració de la fluorescència de la sonda FPE incorporada en membranes de PC en funció del pH. Els cercles buits corresponen als valors experimentals de fluorescència als diferents pH; els cercles negres corresponen als valors de pH corregits per l'existència d'un potencial Z lleugerament negatiu en les membranes de PC (-7 mV), segons indiquen les mesures recollides a la taula inserida a la figura 45. La correcció s'ha fet utilitzant l'equació de Boltzman (equació 16). El cercle blau correspon a la interpolació del valor de fluorescència de la suspensió de les membranes de PS a pH 7.4. A l'inset es poden veure els espectres en els quals s'ha mesurat la fluorescència.

## 2. Espectres d'FTIR

Dels càlculs presentats en l'apartat anterior es desprèn que, en determinades condicions, quan les membranes estan carregades negativament, el pH a la seva superfície pot ser clarament inferior al pH en punts allunyats de la superfície. Per tant, el pH és un paràmetre a considerar com a possible causa de les particularitats estructurals del pèptid associat a les membranes. És per això que, en una primera aproximació, es va plantejar l'estudi de l'estructura secundària del pèptid i del seu estat d'agregació i a diferents pH mitjançant FTIR.

La figura 56 mostra els espectres d'FTIR corresponents al pèptid A $\beta$ (1-40) a diferents pD (56 a, b, c i d) i la variació de la relació d'absorbàncies a 1623 cm<sup>-1</sup> (corresponents a estructures  $\beta$  agregades) i

1650  $\text{cm}^{-1}$  (estructures desordenades). En els espectres d'FTIR, es pot veure que com més baix és el pD menys intensa és la banda a 1650  $\text{cm}^{-1}$  i més intensa la banda a 1623  $\text{cm}^{-1}$ . Això es tradueix en una relació  $A_{1623}/A_{1650}$  més alta com més baix és el pD. A pD 10, s'observa només una banda centrada a 1650 indicant l'absència d'estructures agregades. A pD 7.4, la formació d'estructures  $\beta$  és ràpida però es manté part de la banda centrada a 1650 (estructures desordenades). En canvi, la banda d'estructures desordenades o hèlix  $\alpha$  a pD 5.5 i 6 és menor que en els altres pD i la banda corresponent a estructures  $\beta$  més intensa, per la qual cosa es pot considerar que l'agregació és més elevada en aquests pD. L'aparició d'estructures  $\beta$  agregades (relació d'absorbàncies 1623  $\text{cm}^{-1}/1650 \text{ cm}^{-1}$ ) és ràpida, com es pot apreciar a la figura 56e.

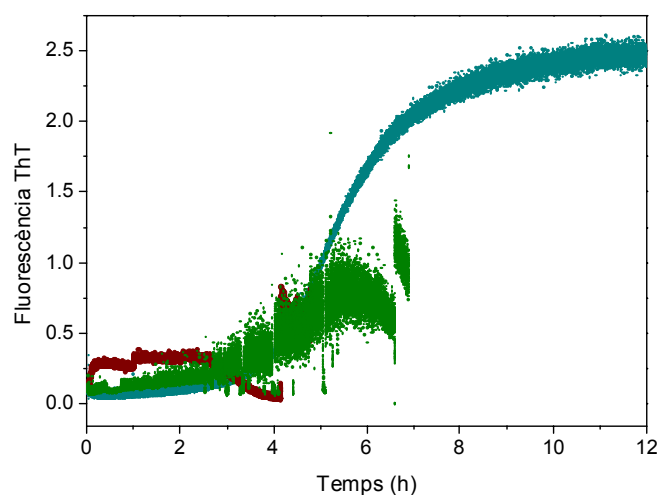


**Figura 56.** Espectres d'infraroig en funció del temps de l'A $\beta$ (1-40) a diferents pD. (a) A $\beta$ (1-40) (a) pD5.5, (b) pD6, (c) pD7.4, (d) pD10. (e) Cinètiques de variació de la relació  $A_{1623}/A_{1650}$ . (Vi) pD5.5; (Verd) pD6.4; (Cian) pD7.4; (Violeta) pD10.

### 3. Mesura de la fluorescència de la ThT

La capacitat de formació de fibres del pèptid en funció del pH es va seguir mesurant la fluorescència de la ThT.

En els experiments que es mostren en la figura 57, la concentració de pèptid va ser  $25\mu\text{M}$  i es van realitzar en agitació constant.



**Figura 57.** Cinètiques de la fluorescència de ThT: (Vi) pD5.5; (Verd) pD6; (Cian) pD7.4.

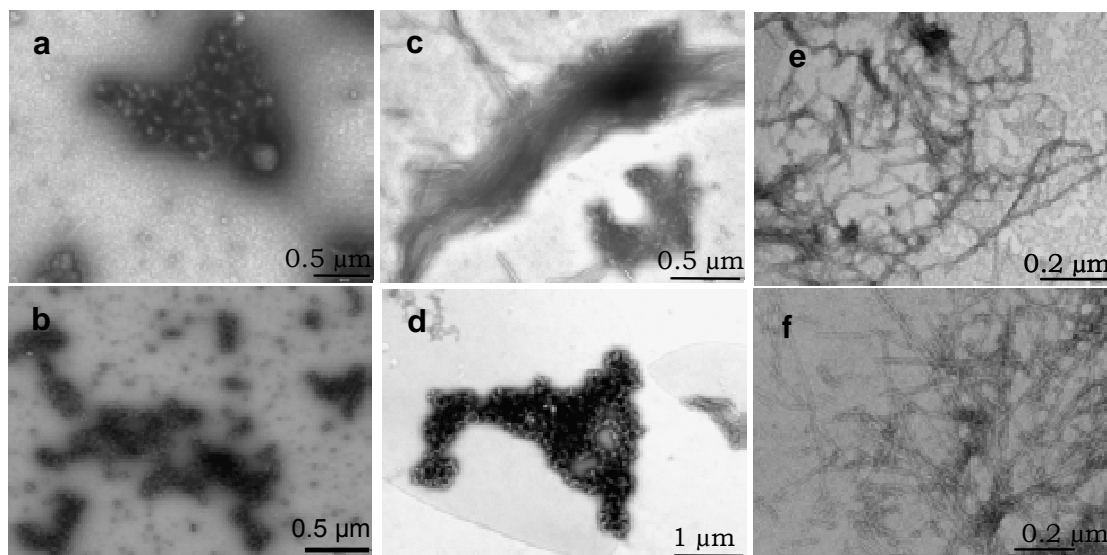
Es pot veure com només hi ha una clara formació de fibres a pH 7.4. A pH 5 i 6.4, s'observa un soroll molt intens, fet que ha de ser degut a la presència d'estructures agregades grosses. Aquestes estructures en alguns casos precipiten implicant una disminució de la fluorescència. Si s'observa la cubeta a simple vista aquesta té un aspecte tèrbol degut a la mida d'aquests agregats.

### 4. Morfologia dels agregats

La morfologia dels agregats formats al final de la cinètica d'agregació per fluorescència es va observar per microscòpia electrònica.

Es pot veure que, a pH 5.5 i 6, es formen uns agregats grossos i clarament no fibril·lars. A pH 6, a més, s'observa que aquests agregats coexisteixen amb fibres, semblants a les que es formen a pH 7.4.

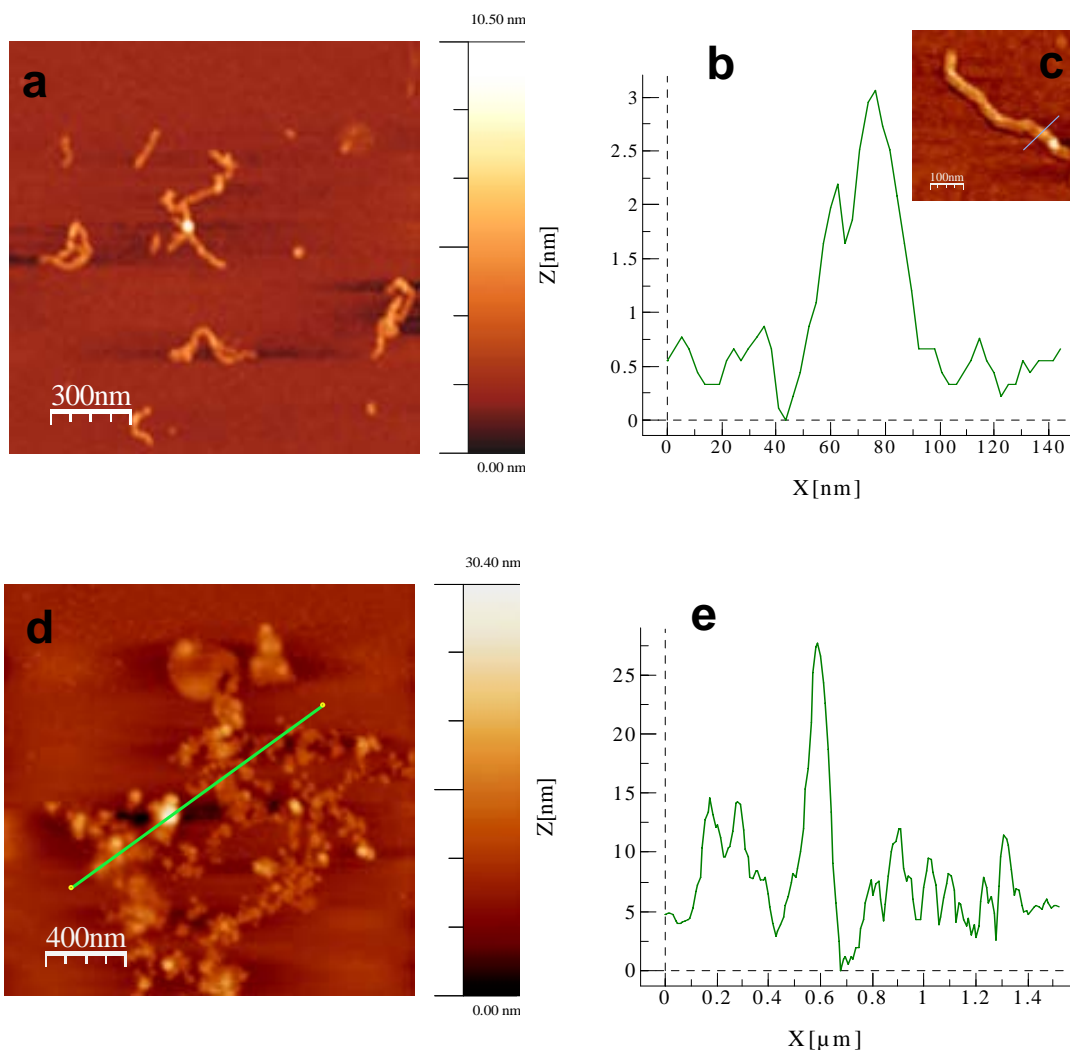
Els agregats que s'observen a pH 5.5 són morfològicament equivalents als que s'han observat a pH 7.4 associats a la presència de membranes altament carregades negativament (liposomes de PS) (figura 48b).



**Figura 58.** Imatges de microscòpia electrònica de transmissió dels agregats formats a diferents pH. (a) i (b) pH 5.5; (c) i (d) pH 6; (e) i (f) pH 7.4;

La morfologia de les formes agregades a pH 7.4 i 5.5 es va estudiar també mitjançant microscòpia de força atòmica, AFM. Els resultats es mostren a la figura 59. Les mostres es van preparar sobre un suport de mica. Aquests suports estan carregats negativament i tenen un potencial  $Z$  d'uns  $-25$  mV, que pràcticament no fa variar el pH de superfície respecte al del medi (Aramberri i Bismarck 2007).

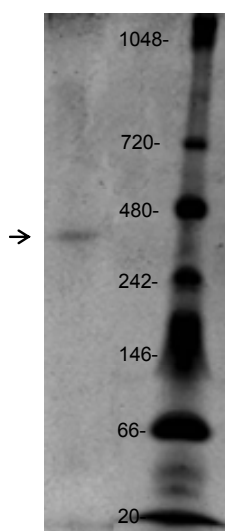
L'anàlisi de les micrografies mostra com les fibres tenen una alçada de l'ordre de  $3$  nm i una amplada al voltant de  $40$  nm, segurament constituïdes per més d'una protofibril·la. D'altra banda, els agregats observats a pH 5.5 no tenen caràcter fibril·lar sinó que mostren una morfologia amorfa tal com s'ha observat per microscòpia electrònica de transmissió. En aquests agregats amorfs, d'aspecte granulat, els grànuls tenen un alçada d'entre  $5$  i  $25$  nm.



**Figura 59.** Imatges de microscòpia de força atòmica. (a) Imatge del pèptid A $\beta$ (1-40) a pH 7.4; (b) perfil de la fibra de la fotografia de l'inset (c). (d) Imatge del pèptid a pH 5.5; (e) perfil dels agregats sobre la línia verda de la figura d.

## 5. Electroforesi nativa

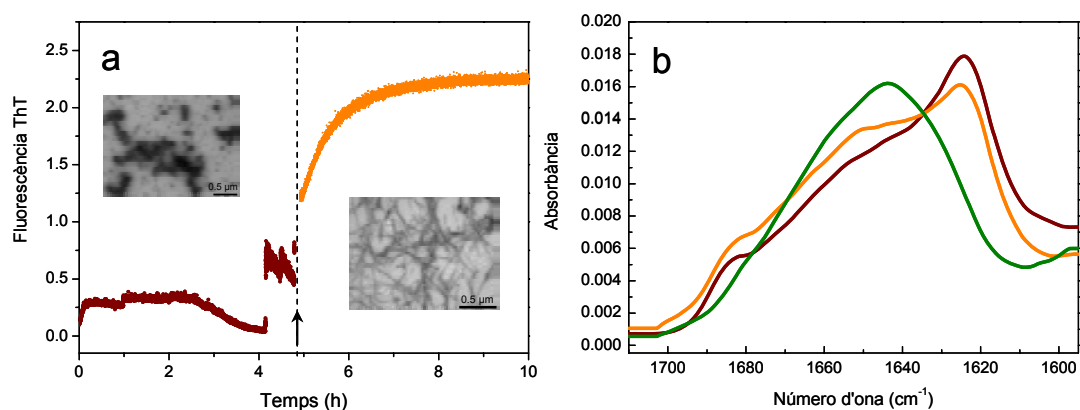
Per tal de conèixer el pes molecular dels agregats que es formen a pH baix, es va realitzar una electroforesi nativa de gradient. En aquesta electroforesi (figura 60), es pot observar com apareix una banda clara entre 242 i 480 kDa. Això indicaria que la major part del pèptid formaria agregats d'aproximadament 400 kDa; és a dir, formats per uns 100 monòmers.



**Figura 60.** Electroforesi nativa de gradient dels agregats formats a pH 5.5.

## 6. Reversibilitat dels agregats a pH 5.5

Per tal d'esbrinar si els agregats amorfs formats a pH 5.5 es podien transformar en fibres en canviar el pH a 7.4, es va mesurar la fluorescència de la ThT en fer el canvi de pH tal com s'indica a la figura 61a. La caracterització de la transició es va completar amb l'adquisició d'espectres d'infraroig i de micrografies electròniques de transmissió.

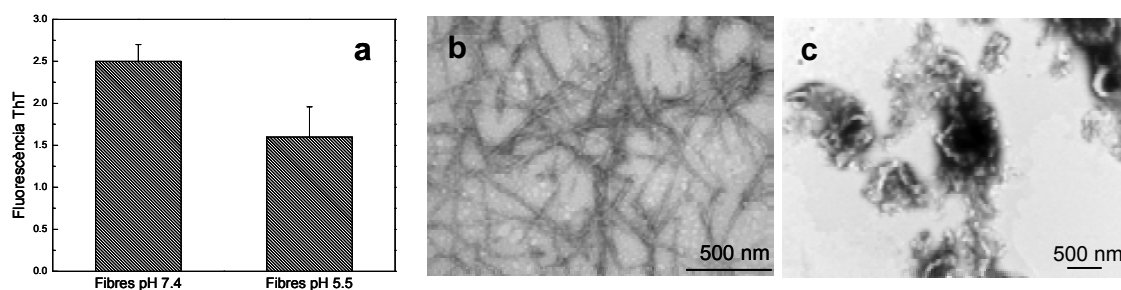


**Figura 61.** (a) Cinètica de fluorescència: (Vi) formació dels agregats a pH 5.5 i (taronja) formació de fibres després d'ajustar el pH a 7.4. El punt en què es va ajustar el pH a 7.4 es veu indicat amb una fletxa. La morfologia de les espècies presents en els dos casos es pot observar en les fotografies de microscòpia. (b) Espectres d'infraroig dels agregats a pH 5.5 (Vi), pH 7.4 (taronja) i pH 12 (verd).

S'observa clarament que, en pujar el pH, la relació senyal/soroll passa a ser molt més alta, semblant a la de les cinètiques mesurades

habitualment a aquest pH. Segons l'article publicat per Harry Levine (LeVine 1997), la fluorescència de la ThT en presència de fibres és molt semblant a pH 7.4 i 5.5. A més, tot i que la ThT en absència de pèptid, o sigui, en tampó, és poc fluorescent, si que presenta un espectre mesurable amb una forma i un màxim equivalents als de l'espectre en presència de fibres. Aquest espectre de la ThT en tampó aquós és el mateix a pH 7.4 i a pH 5.5, tant pel que fa al màxim d'emissió com pel que fa la forma de l'espectre. Dit això, la baixa fluorescència a pH 5.5 es pot atorgar a la disminució de la concentració o a la desaparició de les fibres. Per microscòpia electrònica de transmissió, com també s'indica a la figura, es va comprovar que, efectivament, no es troben fibres a la mostra a pH 5.5 i que es van formar fibres amiloides característiques al final de la cinètica. En els espectres d'infraroig realitzats a 37°C i a una concentració de 250 µM, es pot observar que, a pH 5.5, l'espectre té una forma semblant a les mostrades per a pH 5.5 i 6 en l'apartat anterior. En ajustar el pH d'aquests agregats a 7.4, després de 6 hores a pH 5.5, es pot veure que l'espectre té una estructura igual a la de pH 7.4. Si el pH s'ajusta a pH 12, es pot veure com aquests agregats passen a tenir estructura desordenada.

D'altra banda, les fibres també poden revertir a agregats amorfs si el pH es canvia a pH 5.5 tal com mostra la figura 62. Si es baixa el pH de les fibres a 5.5 i es mesura la fluorescència d'aquest, es pot veure com la fluorescència disminueix notablement. Els experiments de fluorescència es van completar amb micrografies electròniques.



**Figura 62.** Formació d'agregats amorfs a pH 5.5 a partir de fibres al canviar el pH. (a) Intensitat de la fluorescència de la sonda ThT de les fibres i de les fibres després de baixar el pH a 5.5 (b) Micrografia electrònica de les fibres i (c) micrografia electrònica de les fibres després de canviar el pH a 5.5.

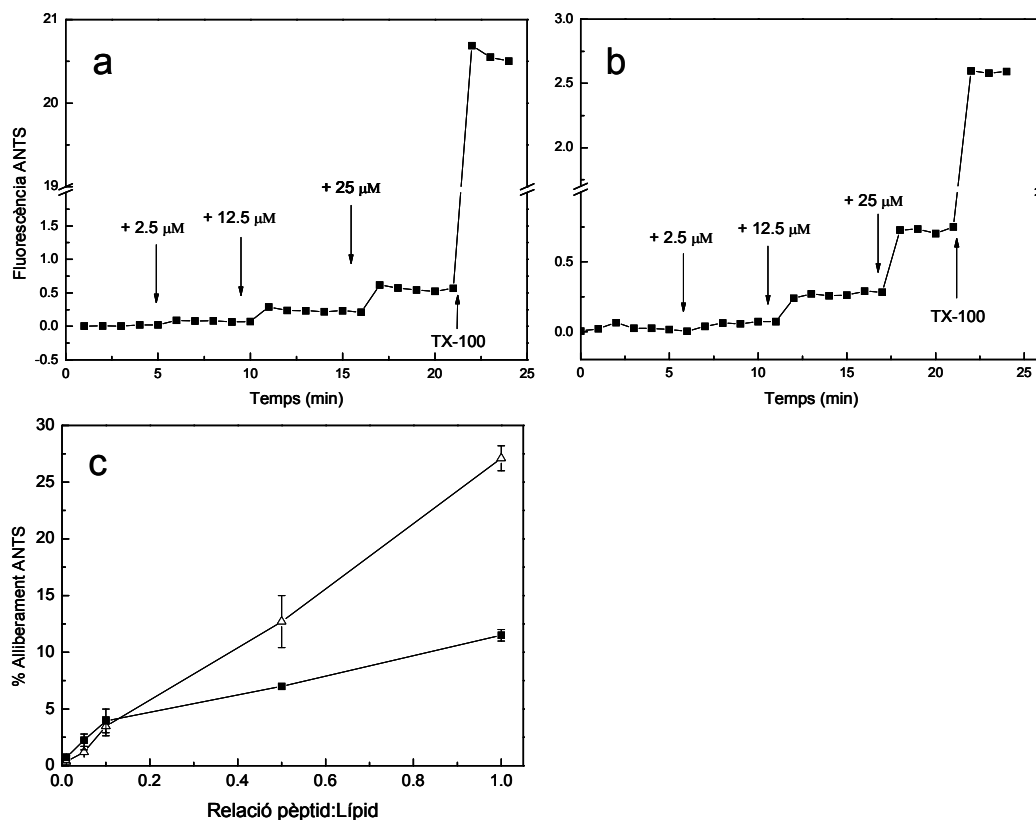


La figura 62 mostra la disminució de la fluorescència en posar les fibres a pH 5.5 i les micrografies mostren que no s'observen fibres a la mostra al cap de 90 minuts sinó agregats amorfs tals com els observats en posar el pèptid a pH 5.5 a partir del pèptid monomèric.

## **7. Efecte dels agregats a pH baix sobre les membranes**

En els apartats anteriors, s'ha demostrat que el pèptid A $\beta$ (1-40) forma, a pH 5.5, agregats amorfs (no fibril·lars). Aquestes característiques coincideixen amb les de les estructures peptídiques que es formen a la superfície de les membranes de càrrega negativa tal com ha estat descrit en el capítol anterior. Per tant, resulta plausible plantejar-se la possibilitat que aquest tipus d'agregats puguin tenir algun efecte sobre l'estructura de la bicapa lipídica. Per tal d'explorar aquesta possibilitat, es portaren a terme experiments a fi de detectar la possible desestabilització de la membrana en presència d'aquests agregats. Per això, es va mesurar l'alliberament de la sonda ANTS encapsulada juntament amb el seu desactivador com es va fer en el segon capítol de resultats a pH neutre. En aquest cas, l'experiment es va dur a terme a pH 5.5 i les membranes model utilitzades van ser de fosfatidilcolina, composició en la qual no s'observa alliberament de sonda a pH 7.4.

La figura 63 mostra com, clarament, els agregats formats a pH 5.5 tenen capacitat de desestabilitzar la membrana. En liposomes de PC a pH neutre no s'observa alliberament de la sonda; en canvi, a pH 5.5 en què es formen agregats no fibril·lars, sí que s'observa un alliberament de la sonda, que arriba a ser del 25% quan la relació lípid:pèptid és 1:1. Si es compara el percentatge de l'alliberament de la sonda ANTS en les condicions en què hi ha desestabilització de la membrana (membranes de PS a pH 7.4 i membranes de PC a pH 5.5), es pot veure que, a pH 5.5, on tots els agregats que es formen són no fibril·lars, l'alliberament és clarament superior als experiments realitzats amb membranes de PS a pH neutre on només un 40% dels agregats serien  $\beta$  no fibril·lars.



**Figura 63.** Alliberament de la sonda ANTS de liposomes de PC en presència d'Aβ(1-40). La concentració de lípid va ser de (a) 250 μM i (b) 25 μM. Les addicions de pèptid s'indiquen amb fletxes a la figura. Comparació del percentatge d'alliberament de sonda en funció de la relació lípid pèptid en liposomes de PC a pH 5.5 (triangles blancs) i en liposomes de PS a pH 7.4 (quadrats negres).

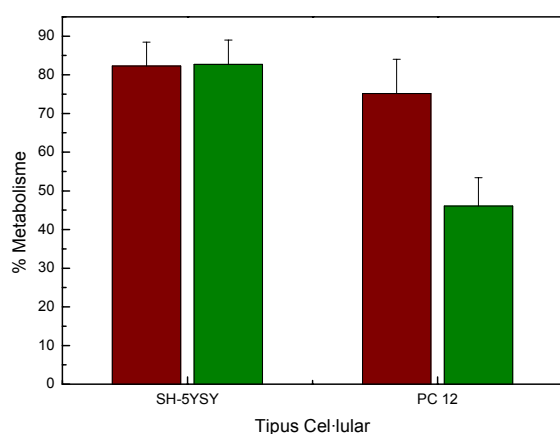
## 8. Toxicitat dels agregats d'Aβ(1-40) a pH 5.5

El possible paper dels agregats amorfs formats a pH 5.5 en la toxicitat del pèptid β-amiloide es va estudiar amb cèl·lules PC12 i SH-5YSY. El pèptid es va incubar durant 2 hores a pH 5.5 o es va ajustar el pH a 7.4 abans d'afegir-lo a les cèl·lules. Els agregats es van deixar 6 hores al cultiu cel·lular

La figura 64 mostra que l'addició d'agregats formats a pH 5.5 als cultius cel·lulars redueix un 20% el metabolisme de les cèl·lules SH-5YSY, igual que ho fa el pèptid quan s'ha afegit a pH 7.4. D'altra banda, la reducció del metabolisme provocada pels agregats a pH 5.5 en cèl·lules PC12 (55%) és molt més elevada que la provocada pel pèptid a pH 7.4 (25%).

El medi cel·lular es troba a un pH aproximadament neutre. Si els agregats formats a pH 5.5 no troben, en ser afegits al cultiu, un entorn

amb un pH més baix, aquests agregats revertiran a fibres, com s'ha vist en els experiments *in vitro*. Aquest seria el cas de les cèl·lules SH-5YSY. En el cas de les cèl·lules PC12 crònicament preapoptòtiques amb un cert nivell permanent de PS a la superfície externa, es podria formar un microentorn de pH més baix a la superfície. En aquest cas, els agregats de pH 5.5 podrien quedar ràpidament estabilitzats com a agregats amorfs en interaccionar amb la superfície de la membrana, cosa que explicaria el major efecte tòxic del pèptid en cèl·lules PC12 en aquestes condicions (figura 64).



**Figura 64.** Percentatge del metabolisme en què s'ha afegit  $A\beta(1-40)$  a pH 7.4 (en vermell) i a pH 5.5 (en verd) respecte a les cèl·lules en què no s'ha canviat el medi.

## 9. Discussió

El procés de formació de les fibres amiloides, típiques de les plaques que es troben en els cervells dels malalts d'Alzheimer, és sensible a diversos factors fisicoquímics: la concentració, la temperatura i el pH entre d'altres.

En relació al pH, hi ha dos fets especialment destacables. D'una banda, es poden produir en el cervell fenòmens patològics com les microhemorràgies o la hipoperfusió, que han estat relacionats també amb la malaltia d'Alzheimer i que poden conduir a una alteració del pH local a través de processos com la hipòxia. D'altra banda, el procés de formació d'amiloides depèn de la presència d'elements com les

membranes biològiques, a la superfície de les quals es pot generar, a partir de l'aparició de càrregues negatives, un microentorn de pH àcid.

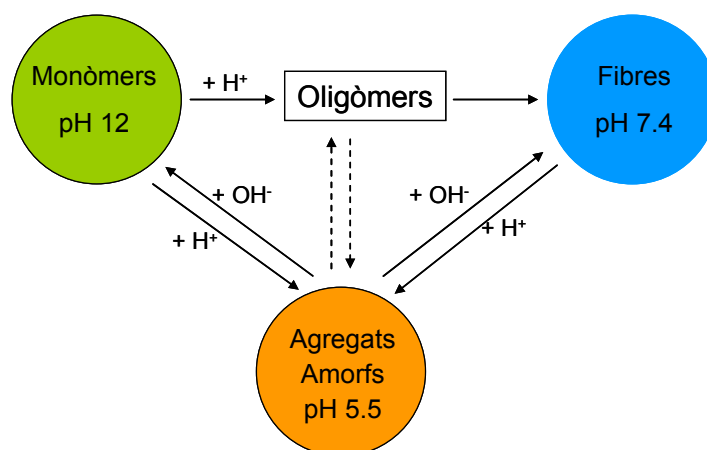
Tampoc no s'ha de deixar de banda el fet que s'han trobat agregats insolubles de pèptids amiloides en endosomes i lisosomes que generen espècies reactives de l'oxigen (ROS), peroxidació de lípid i trencament de la membrana. Aquests agregats, doncs, es generen a l'interior de l'òrganul on el pH és de 5.5 en endosomes i de 3.5 en lisosomes.

Les dades presentades en aquest treball mostren que els agregats formats a pH 5.5 no són fibril·lars però sí que causen una elevada dispersió de la llum i són rics en estructura  $\beta$  tal com s'ha vist per espectroscòpia d'infraroig. Comparant els espectres d'infraroig a pH 5.5 amb els espectres a pH 7.4, es pot veure com la banda  $\beta$  és més intensa a pH 5.5, a la vegada que la banda corresponent a estructures desordenades ho és menys. En les imatges de microscòpia electrònica de transmissió es poden veure agregats d'aspecte amorf, que donen una elevada turbidesa en suspensió. En augmentar el pH a 7.4, aquests agregats formen fibres ràpidament.

Si considerem la formació d'aquests agregats en relació a la composició aminoacídica del pèptid A $\beta$ (1-40), es veu que les histidines tenen un pK al voltant de 6, per això es troben protonades a pH 5.5 i desprotonades a pH 7.4. Per tant, sembla que les histidines serien un element diferencial a l'hora d'explicar perquè es formen agregats amorfs a pH 5.5 i es formen fibres a pH 7.4. Dit d'una altra manera, la formació de fibres requereix la desprotonació de les histidines, o sigui, cal que aquestes no estiguin carregades. Si les histidines estan carregades positivament (pH 5.5), es formen agregats amorfs.

Les característiques morfològiques dels agregats, a pH 5.5, descrits en aquesta memòria de tesi presenten alguna similitud amb els agregats descrits per Wood et. al (Wood et al. 1996). Aquests autors troben que, a pH 5.8, el pèptid A $\beta$ (1-40) forma solucions molt tèrboles (no es fa cap caracterització estructural més detallada) i que no es formen fibres en aquestes condicions. En canvi i contràriament al que s'ha observat a partir de les dades del present treball, els autors observen que no hi ha

interconversió entre agregats no fibril·lars i fibres en canviar el pH. Els resultats observats en aquest capítol mostren clarament que els agregats amorfs a pH 5.5 es transformen en fibres típiques en pujar el pH a 7.4 i que les fibres formades a pH 7.4 es converteixen en agregats amorfs quan es baixa el pH a 5.5. L'esquema corresponent a la reversibilitat d'aquests agregats es pot veure a la figura 65.



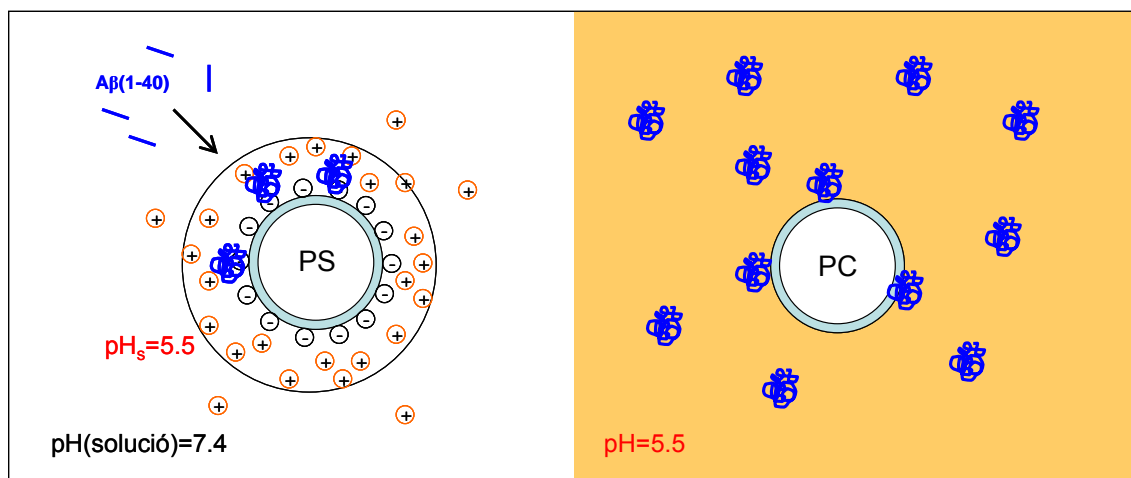
**Figura 65.** Esquema cinètic de l'agregació del pèptid amiloide a diferents pH. M<sub>12</sub> fa referència a monòmers a pH12, F<sub>7</sub> fibres a pH 7.4 i A<sub>5</sub> agregats amorfs a pH 5.5.

Pel que fa els efectes desestabilitzadors sobre la membrana dels agregats amorfs, s'ha observat que aquests són més accentuats quan el pH és de 5.5. En els experiments de desestabilització de la membrana, el pèptid només pot causar alliberament de la sonda ANTS quan les membranes estan carregades negativament i aquest és d'un 11% quan la relació lípid pèptid és 1:1. En membranes neutres, en canvi, no s'observen variacions en la fluorescència de la sonda a l'afegir el pèptid. Contràriament, a pH 5.5, l'alliberament de la sonda és del 25% en membranes de fosfatidilcolina.

Estudis semblants mostren que el pèptid causa alliberament de sonda a pH 6 i, per a una mateixa relació lípid pèptid, aquest alliberament disminueix a mesura que augmenta el pH, fins que l'alliberament és nul a pH neutre (McLaurin i Chakrabartty 1997).

Per tant, el fet que només es produeixi desestabilització de membrana quan es poden formar els agregats amorfs de pH baix dóna consistència a la hipòtesi que la interacció d'aquests agregats amb la membrana

cel·lular pugui estar relacionada amb la seva toxicitat. Aquest fet s'il·lustra a la figura 66.



**Figura 66.** Esquema de la formació d'agregats no fibril·lars en membranes carregades negativament i a pH 5.5. L'esquema mostra que, a pH neutre, al voltant de les membranes carregades negativament, es forma una capa on la concentració de protons és més alta. En aquesta capa, on el pH és més baix que en el si de la solució es formen els agregats amorfs. El pèptid que no interacciona amb la membrana pot donar lloc a fibres. Els agregats amorfs també es formen en el si de la solució quan el pH d'aquesta és 5.5. Aquests agregats, ja són capaços de desestabilitzar la membrana encara que no estiguin carregades, com en les de PC.

Els estudis de toxicitat indiquen que els agregats formats a pH àcid resulten més tòxics que el pèptid afegit a pH neutre en cèl·lules PC12, però no en cèl·lules SH-SY5Y. Els agregats àcids afegits en el medi cel·lular que es troba a pH 7.8, quan és fresc, poden convertir-se en fibres o oligòmers si no troben un microambient de pH àcid. En les cèl·lules PC12 - que expressen PS a la membrana i, per tant, poden generar un micropH àcidic a la superfície - els agregats poden romandre com a agregats amorfs en interaccionar amb la superfície de les membranes cel·lulars. En canvi, en les cèl·lules SH-SY5Y, el pH és més uniforme en tot el cultiu i aproximadament neutre i, segurament per això, aquests agregats es converteixen en fibres o oligòmers.

Aquests resultats posen de manifest la importància de les càrregues negatives en la toxicitat del pèptid in vitro, estretament lligades a la qüestió del pH. Tant els experiments mostrats en aquesta memòria de tesi com els mostrats pel grup d'Arispe (Lee et al. 2002; Arispe et al. 2004) mostren que, en presència de càrregues negatives, el pèptid és

més tòxic. Tot i que aquestes dades no permeten assegurar de manera definitiva que són els agregats formats a 5.5 els responsables de la citotoxicitat del pèptid, sí que semblen indicar que el pèptid presenta una toxicitat més elevada només en les condicions en què aquests es poden formar.

Huang i col·laboradors (Huang et al. 2000), que han publicat estudis relacionats amb la possible importància dels agregats amorfs en la malaltia d'Alzheimer comenten: "En la recerca per identificar les espècies neurotòxiques formades pel pèptids amiloïdes, els agregats amorfs han estat ignorats perquè les plaques difoses no es troben associades a neurodegeneració. De tota manera, està clar que els agregats amorfs de pèptid amiloide conformen un component important del total de càrrega amiloide en cervells dels malalts d'Alzheimer...". És per això que no es pot subestimar el rol d'aquests agregats en el desenvolupament de la malaltia.





## **DISCUSSIÓ GENERAL**



En aquesta discussió general, es proposa fer una consideració dels resultats i de les discussions presentats en els tres capítols de la tesi, que els posi en relació amb aspectes generals de la malaltia d'Alzheimer i que contribueixi a explicar la rellevància que aquests resultats tenen en relació al coneixement actual de la patologia i al progrés del mateix.

### **1. Les cinètiques d'agregació del pèptid amiloide A $\beta$ (1-40): importància del contraió; estructura beta, oligòmers d'alt pes molecular i fase de latència**

En primer lloc, és important considerar les cinètiques d'agregació del pèptid A $\beta$ (1-40) que es presenten en els diferents capítols del treball en relació a les característiques de les cinètiques que es descriuen a la literatura. Aquesta comparació, porta a considerar un aspecte molt concret del pèptid utilitzat; això és, la naturalesa del seu contraió. La consideració d'aquest fet s'ha deixat per a aquesta discussió general, ja que les seves conseqüències no afecten un capítol específic sinó tot el treball i perquè s'ha considerat més rellevant i aclaridor fer-ho a partir de la ponderació del conjunt de resultats.

Les cinètiques d'agregació del pèptid A $\beta$ (1-40) a pH neutre que es mostren en al llarg d'aquesta memòria s'ajusten, en el seu resultat, a la forma esperada en aquest casos; és a dir, la que permet descriure el procés de formació de fibres amiloides com una polimerització depenent de nucleació. En aquest sentit, es distingeixen clarament les fases de latència i d'elongació. La fase de latència, però, és clarament més curta que la que podem veure descrita en molts altres treballs (Kirkitadze et al. 2001; Bitan et al. 2003). En aquests treballs, les fases de latència poden durar dies, en les que s'han presentat aquí duren unes poques hores. Es podria pensar que, en el nostre cas, es parteix de solucions de pèptids que contenen material ja agregat, fibril·lar, que podria actuar com a llavor ('seed') del procés. Hi ha dos fets però, que permeten rebutjar aquesta possibilitat. El primer és que, en els treballs en què

s'ha descrit l'efecte de sembrar les mostres amb partícules pre-agregades, aquestes solen tenir l'efecte de fer començar la fase d'elongació immediatament, no donen lloc a fases de latència escurçades. El segon, i més important, és que, tal com s'ha demostrat utilitzant espectroscòpia d'infraroig, en els estocs de pèptid preparats a pH 12 no hi ha cap indicatiu d'agregació, ni en forma d'agregats amorfs ni fibril·lars. És per això que es pot considerar que, en aquestes condicions, es té el pèptid no agregat sense necessitat de recórrer a processos de filtració molecular com els que es descriuen en alguns treballs (Kirkitaдзе et al. 2001; Bitan et al. 2003) i que suposen un dels mètodes més establerts per a la preparació d'estocs dels pèptids amiloides. En desencadenar les cinètiques que es mostren en aquesta tesi, baixant el pH de 12 a 7.4, partim, per tant, de mostres que no contenen cap element agregat. Les raons de les diferències que s'observen amb d'altres treballs sobre la duració de la fase de latència s'ha de buscar, per tant, en d'altres factors, principalment la concentració i el contraïó del pèptid amiloide. En alguns dels treballs esmentats, com els de Bittan i col·laboradors, la concentració de pèptid és clarament més baixa, al voltant de 10  $\mu\text{M}$ , que les utilitzades aquí, entre 25 i 90  $\mu\text{M}$ . Una concentració més alta ha de donar lloc a una velocitat de reacció més elevada en aquest tipus de processos, que inclouen reaccions bimoleculares. Es dona però, una altra gran diferència entre els treballs als que ens hem referit i els presentats aquí: el contraïó del pèptid amiloide. El més usual és que el contraïó del pèptid resultant d'una síntesi química sigui l'àcid trifluoroacètic (TFA). Quan s'utilitzen aquests pèptids, les cinètiques d'agregació són lentes (dies). El TFA, però, interfereix en la zona de l'infraroig on absorbeixen les cadenes polipeptídiques, dificultant així l'anàlisi de l'estructura del pèptid, fet que es pot solucionar bescanviant el TFA per clorur, rentant el pèptid al final del procés de síntesi amb àcid clorhídric. Aleshores, les cinètiques són més ràpides. És sabut que la naturalesa dels contraïons afecta la formació d'agregats amiloides i l'efecte accelerador de les cinètiques dels ions clorur havia estat ja descrit anteriorment. En una

discussió mantinguda al Journal of Neurochemistry l'any 1997 entre O.M.A. El-Agnaf i I. Kaneko (el-Agnaf et al. 1997), aquest últim, a més d'assenyalar que el clorur és un contraíó més fisiològic, demostra que el pèptid amb clorur forma estructures beta en condicions en què el pèptid en TFA encara està desordenat i potser amb algun fragment helicoïdal. En el present treball, hem posat aquest fet estructural en relació precisa amb la cinètica d'agregació (capítol 1). Quina és la diferència entre la fase de latència quan el contraíó es TFA i quan és clorur? Els resultats del capítol 1, en el qual s'ha analitzat el procés d'agregació aplicant les diferents tècniques sobre una mateixa mostra, han permès concloure que en presència d'ions clorur, es formen, de manera molt ràpida, agregats oligomèrics d'alt pes molecular, d'uns 20 nm de diàmetre vistos al microscopi electrònic i formant, de manera majoritària, estructures  $\beta$  no fibril·lars. De tal manera que, durant la fase de latència es forma la totalitat de l'estructura  $\beta$  que es formarà al llarg del procés d'agregació, només que durant la fase de latència aquesta estructura  $\beta$  no és fibril·lar (Benseny-Cases et al. 2007). Precisament, la fase d'elongació consisteix, aleshores, en la combinació d'aquests oligòmers  $\beta$  per formar fibres. En presència de TFA i a concentracions de pèptids més baixes, la formació d'aquests oligòmers seria molt més lenta, d'aquí que alguns autors detectin, fins i tot, la formació d'estructures helicoïdals transitòries. Totes aquestes observacions són compatibles i, de fet, es poden unificar tal com s'ha fet a la figura 39.

A més de donar informació estructural sobre les espècies que es formen durant la fase de latència, de l'evolució del contingut i la qualitat de l'estructura beta al llarg del procés d'agregació, la caracterització de les cinètiques ha representat una eina per a estudiar, tot seguit, el procés d'agregació en presència de membranes biològiques, objectiu principal d'aquest treball.

## **2. Factors que influencien el procés de formació d'agregats amiloides: de les membranes al pH.**

Un efecte important de les membranes biològiques sobre les macromolècules que interaccionen amb elles és la reducció de dimensionalitat (de tres dimensions a dues) que implica la interacció amb la superfície. Aquesta reducció té conseqüències importants pel que fa a la concentració efectiva de la macromolècula i la influència d'aquest paràmetre en la seva funció. És així, a través de la reducció de dimensions i el possible augment de concentració, que les membranes biològiques són un dels principals elements generadors del fenomen conegut com a 'molecular crowding', d'aglomeració molecular, que té conseqüències per al comportament termodinàmic i cinètic de les reaccions en què estan implicades les molècules (Bokvist i Grobner 2007). La qüestió de la concentració i, en especial, la consideració de les concentracions a les quals s'observen certs efectes *in vitro* respecte a determinacions de la concentració en condicions fisiològiques en un o altre teixit és un tema recurrent en la bibliografia dedicada a l'estudi dels agregats amiloides. És habitual, en aquest sentit i en relació als estudis amb pèptids amiloides associats a la malaltia d'Alzheimer, haver d'afrontar la crítica de que les concentracions utilitzades en els estudis, en el rang de les desenes de micromolar, no tenen 'significat biològic', donades les baixíssimes concentracions, en el rang nanomolar, dels pèptids amiloides en fluids com el líquid encefaloraquidi. Directament relacionada amb aquest tipus d'argumentació, no és infreqüent l'opinió que considera que les relacions molars lípid-pèptid de 10, en parlar d'interacció dels pèptids amb membranes, són excessivament baixes, resultant molt més raonables les relacions molars de l'ordre de 100. Al nostre entendre, aquestes opinions obvien que, tal com assenyalen Bokvist i Göbner (Bokvist and Gröbner, 2007), el destí de les cadenes polipeptídiques en els sistemes vius, està controlat pel seu entorn immediat, i aquest entorn, *in vivo*, es troba freqüentment congestionat per la presència d'altres macromolècules o estructures macromoleculares (molecular crowding). En el cas dels pèptids amiloides, basta recordar

que en les plaques característiques dels cervells afectats, els pèptids es troben associats a diversos tipus de macromolècules diferents. La formació dels agregats amiloides té lloc, per tant, en un ambient carregat d'altres estructures, com poden ser els glucosaminoglicans o les membranes. La presència d'aquestes estructures pot implicar un confinament de les molècules de pèptid, una reducció de l'espai disponible, que té una traducció directa en forma d'augment de concentració. Aquestes consideracions fan que, des del nostre punt de vista, els resultats obtinguts a partir de concentracions peptídiques 'elevades' puguin ser considerats com fisiològicament plausibles.

Els estudis aplegats en el present treball sobre la importància de les membranes biològiques per al procés de formació d'agregats amiloides han contribuït, d'una banda, a consolidar i a detallar a nivell molecular, la importància de les càrregues elèctriques negatives a la superfície de les membranes, un fet que ja havia estat apuntat amb anterioritat (McLaurin i Chakrabartty 1996, 1997; Arispe et al. 2004). D'altra banda, han contribuït a posar de manifest, en aquest cas, de manera del tot nova, el paper de les càrregues negatives com a conseqüència de processos d'oxidació lipídica en el procés d'agregació del pèptid A $\beta$ (1-40). En aquest sentit, s'ha identificat clarament l'aparició de càrregues negatives a la superfície de les membranes com a causa de l'alentiment de les cinètiques de formació de fibres amiloides. En aquest punt, és necessari dir que, en relació a la oxidació de lípids, existeix una abundantíssima literatura dedicada a la identificació de compostos lipídics típics dels processos d'oxidació. També està descrita la formació de compostos amb càrrega negativa (New 1990). En relació a la influència dels productes d'oxidació lipídica, però, l'atenció fins ara s'havia centrat més aviat en l'estudi dels efectes de productes químics específics. Resulten en aquest cas destacables els treballs dels grups d'Axelsen i de Kelly sobre els efectes del 4-hidroxinonenal (4-HNE), un producte que es forma com a conseqüència de l'estrès oxidatiu i que es troba en concentracions elevades en pacients d'Alzheimer (Bieschke et al. 2006; Murray et al. 2007; Liu et al. 2008). Kelly i col·laboradors,

troben que el 4-HNE estimula la formació de protofibril·les, encara que els estudis no estan fets en presència de membranes. Quan estudien l'efecte de membranes que contenen 4-HNE, detecten un increment de la formació de fibres. Axelsen i col·laboradors observen uns efectes de les membranes oxidades sobre la formació d'agregats amiloides, d'una banda sense identificar quins elements producte de l'oxidació en serien els causants i de l'altra, identificant les estructures que es formen sobre les membranes com a fibril·lars. Els autors no porten a terme cap altre tipus de caracterització fisicoquímica de les membranes i tampoc de l'afectació de l'estructura i estabilitat d'aquestes. En tot cas, cal mencionar que, d'acord amb la visió actual sobre quines són les estructures amiloides agregades amb capacitat citotòxica (oligomers formats durant la fase de nucleació), les substàncies afavoridores de la formació de fibres es veurien més aviat com a potenciadores del pas del pèptid a un estat no tòxic.

L'anàlisi química dels productes d'oxidació en els extractes de lípid de cervell que han estat utilitzats no forma part del conjunt d'estudis que es presenten en aquesta memòria. Això constitueix part del que considerem feina de continuació. De tota manera, i tot i la importància que evidentment poden tenir els productes específics de l'oxidació lipídica en el processos de formació d'agregats amiloides, els nostres resultats resulten clars pel que fa a les causes dels efectes de l'oxidació en la velocitat del procés de formació de fibres: l'aparició de càrregues negatives a la superfície de la membrana. La nostra anàlisi dels resultats ens ha portat, a més, a la conclusió que el pèptid interacciona tant amb membranes carregades com amb membranes no carregades (membranes no oxidades d'extracte de lípid de cervell, o membranes amb molt poca càrrega com les de PC). Ja s'ha dit que la importància de la interacció amb membranes carregades negativament havia estat identificada anteriorment. En canvi, no quedava gaire clara la definició de la interacció amb membranes electroneutres o més aviat es pensava que la interacció no es donava. El nostre model, esquematitzat a la figura 52, implica que el pèptid interacciona tant amb membranes



electroneutres com amb membranes carregades negativament. La interacció amb membranes electroneutres escurça la fase de nucleació, accelerant la formació de fibres respecte al procés en absència de membranes. Això, *in vivo*, podria significar un efecte neuroprotector. En canvi, la interacció amb membranes negatives donaria lloc a la formació d'agregats amorfs tòxics. En suspensions de membranes carregades negativament, el pèptid que no interacciona amb les membranes quedaria en dissolució seguint el procés normal de formació de fibres, però a una concentració més baixa, donant, per tant, una quantitat menor de fibres en comparació a les que es formen en presència de membranes no carregades.

En el present treball, però, s'ha abordat un aspecte de la interacció amb membranes que fins ara no s'havia tingut en compte. És ben sabut que els potencials electrostàtics associats a la superfície de les membranes afecten la distribució de contraions (McLaughlin 1989; Cevc 1990). Això ens porta a considerar el valor del pH a la superfície de les membranes: un potencial de superfície negatiu implica un micropH a la superfície més baix que en la solució. A partir d'aquí, no es pot obviar el fet que la formació d'agregats amiloides depèn del pH (Fraser et al. 1991). Això ens va portar a estudiar l'efecte del pH i a la identificació dels agregats amorfs com les estructures capaces de desestabilitzar les membranes. No és la primera vegada que s'havia identificat la formació d'estructures amorfes en relació a un pH al voltant de 5, però en cap cas se'ls havia atorgat cap protagonisme com possible agents tòxics o amb possible significat fisiològic. Com a conseqüència dels estudis presentats en aquesta memòria, pensem que els agregats amorfs poden, clarament, jugar un paper important quan el pèptid interacciona amb membranes que han adquirit una densitat superficial de càrrega negativa, com a conseqüència de processos d'oxidació o com a conseqüència d'altres processos cel·lulars que impliquin l'aflorament de càrregues negatives a la superfície externa de la membrana (per exemple processos preapoptòtics amb aflorament de PS). La formació d'agregats amorfs per sota de pH fisiològic, però, té implicacions més àmplies que les tot just

esmentades. Aquestes, que impliquen aspectes de la malaltia d'Alzheimer relacionats amb certs processos vasculars en el cervell, s'expliquen en l'apartat següent d'aquesta discussió.

### **3. Alteracions vasculars, variacions locals del pH i Alzheimer**

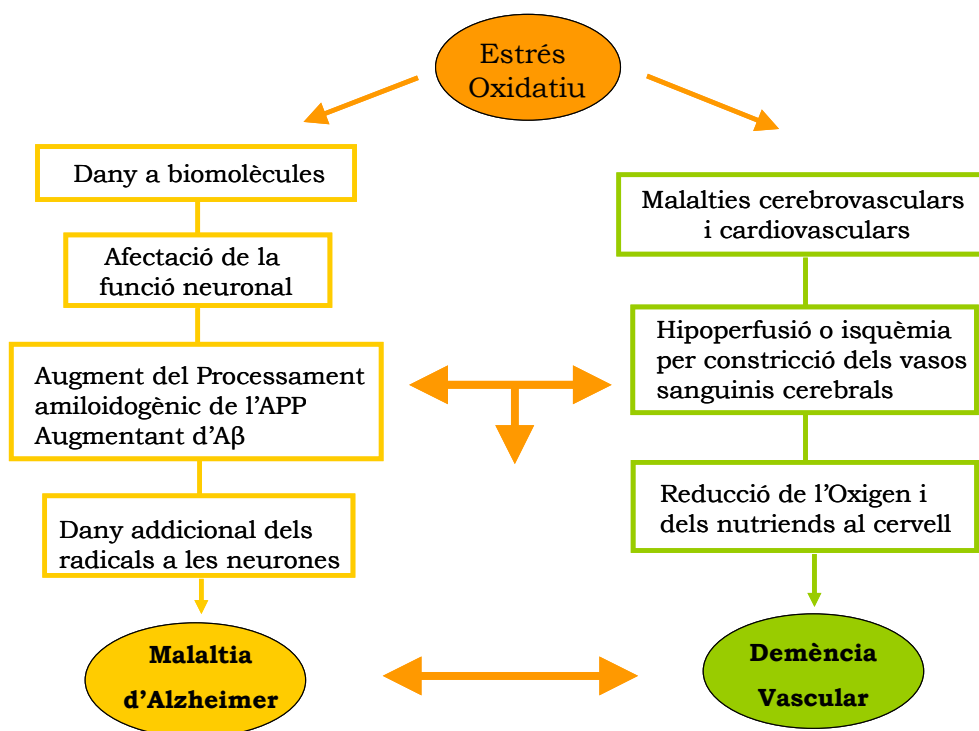
Existeixen, en el sistema nerviós central, situacions patològiques que ponen donar lloc a una disminució local del pH, com és el cas de la isquèmia (disminució del flux sanguini per una disminució de la pressió o una obstrucció dels vasos) o de les microhemorràgies (vessaments sanguinis degut al trencament dels vasos).

Les hemorràgies i la isquèmia són fenòmens relacionats amb les malalties vasculars cerebrals. Entre aquestes malalties es troba la demència vascular que és la segona causa de demència després de la malaltia d'Alzheimer. Les dues patologies presenten una simptomatologia semblant (Moreira et al. 2005). A més, cal tenir en compte que, en algunes autòpsies de malalts d'Alzheimer, s'ha observat que els pacients havien patit microhemorràgies. D'altra banda, els trencaments de capil·lars són difícilment detectables, el que fa que no es pugui descartar que hi hagi microvessaments en el cas de la malaltia d'Alzheimer (de la Torre 2004).

Quan es dona una isquèmia es diferencien dues zones importants: el nucli de la isquèmia i la penombra isquèmica. En el nucli és produeix una mort ràpida de les cèl·lules. En la zona de penombra, en canvi, els processos tenen lloc d'una manera més lenta, produint-se apoptosi i edema.

Un punt en comú en hemorràgies i isquèmia és el flux de sang insuficient, que es tradueix en una manca d'oxigen i de nutrients a la cèl·lula i una disminució de l'eliminació de metabòlits (CO<sub>2</sub>, àcid làctic). La manca d'oxigen a les cèl·lules implica l'ús del metabolisme anaeròbic per a l'obtenció d'energia, produint-se un excés d'àcid làctic. L'augment d'àcid làctic juntament amb l'acumulació de CO<sub>2</sub> té com a conseqüència l'acidosi al teixit .

La disminució del flux sanguini, a més, indueix la producció de pèptids A $\beta$  que es poden dipositar a les parets dels vasos contribuint a la seva constricció i per tant, a la disminució del reg sanguini. La presència de pèptids amiloides a les parets dels vasos és una característica coneguda d'alguns casos de la malaltia anomenada angiopatia cerebral amiloide. Sembla, doncs, que va prenent cada com més força la relació entre les demències vasculares i la malaltia d'Alzheimer (figura 67), fins al punt que alguns investigadors les consideren una mateixa malaltia (de la Torre 2004; Bennett et al. 2009). Tant un excés de pèptids amiloides com una davallada del flux sanguini indueixen l'estrès oxidatiu, que a la vegada, indueix el processament amiloidogènic de l'APP, afavoreix les malalties cerebrovasculares i implica un dany oxidatiu a les biomolècules. Les variacions locals de pH que es poden donar en diferents parts d'aquests processos poden contribuir a la formació d'agregats amorfs, possiblement lligats a la citotoxicitat del pèptid.



**Figura 67.** Esquema de la relació entre la malaltia d'Alzheimer i les demències Vasculares. Esquema traduït de (Bennett et al. 2009).

Un fet curiós i il·lustratiu és l'elevada incidència de demències en persones que han patit traumatismes cranials. La relació entre les

contusions al cap i la demència rau en les hemorràgies que provoquen les contusions, igual que les demències vasculares també basen les causes de la malaltia en microhemorràgies al cervell. Aquesta relació, la recollia el passat 4 de febrer Deborah Blum en un article al New York Times en que citava l'avís de la Revista de l'Associació Mèdica Americana (The Journal of the American Medical Association): “Es genera un dany molt definit al cervell a causa d'un cop o cops repetits al cap o a la mandíbula que provoquen múltiples hemorràgies degut a commocions.... Aquest fet ja no pot ser ignorat per la professió mèdica ni pel públic”. L'informe en qüestió concerneix atletes professionals i la preocupació pel dany a llarg termini ocasionat per les contusions relacionades amb el futbol americà, detallant els problemes ja coneguts: pèrdua de coordinació, dèficits cognitius i ràbies incontrolades.

El més curiós d'aquest avís és que fou publicat el 13 d'octubre de 1928 i l'autora de l'article es pregunta per què la relació entre les contusions i la demència es considera nova i continua sent un fet discutible, 82 anys més tard.

Els mecanismes moleculars que relacionen els vessaments cerebrals amb la malaltia d'Alzheimer no han estat descrits encara. Alguns autors apunten que la interacció del pèptid amiloide amb components de la sang podria incrementar la toxicitat del pèptid. Ara bé, la importància de la baixada de pH en aquests casos sembla haver estat menystinguda fins al moment. Donada la major toxicitat dels agregats formats a pH baix i l'estreta relació existent entre la baixada de pH, la hipòxia, els microvessaments i la malaltia d'Alzheimer, no es pot descartar aquests agregats com a agents citotòxics. És per això que pensem que l'estudi en profunditat per a la caracterització d'aquests agregats és important, ja que podrien ser una nova diana terapèutica per a la malaltia d'Alzheimer.

#### **4. Els agregats amorfs: importància dels residus histidina i consideració en el context general del plegament de proteïnes**

Actualment es coneixen diverses malalties de les anomenades conformacionals, causades pel plegament incorrecte i l'agregació de pèptids i proteïnes que es troben normalment a l'organisme. El fenomen d'agregació és especialment rellevant quan es tracta de pèptids ja que els intermediaris parcialment plegats són més abundants que en proteïnes (Dobson 2004; Jahn i Radford 2005).

Sovint i independentment de la proteïna o pèptid implicat, l'agregació és en forma de fibres molt similars en aparença i estructura secundària (estructura  $\beta$  perpendicular a l'eix fibril·lar). Les bases del plegament de proteïnes mostren com estats parcialment plegats poden afavorir, en determinades circumstàncies, contactes intermoleculars favorables a l'associació, causant la formació que poden ser fibril·lars o amorfs (veure figura 8). De fet, es coneixen seqüències peptídiques i residus que afavoreixen l'agregació del pèptid. Com ja s'ha dit, una de les anomenades malalties conformacionals és la malaltia d'Alzheimer en la qual és el pèptid  $\beta$ -amiloide el que agrega formant fibres. Ara bé, aquest procés de formació de fibres és altament depenent de factors físicoquímics com la temperatura o el pH (Sunde i Blake 1997; Dobson 1999).

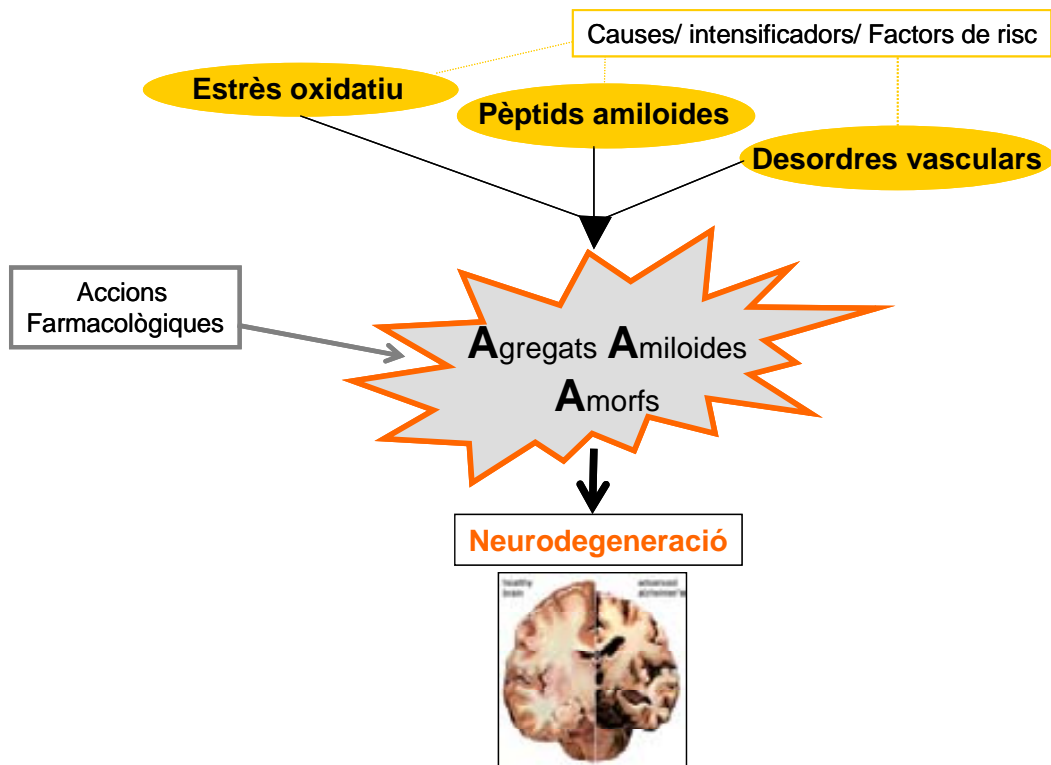
El pèptid amiloide  $A\beta(1-40)$  té 3 histidines en les posicions 6, 13 i 14 en la seva seqüència. La protonació d'aquestes histidines és necessària per a la formació de fibres d'un fragment més curt del pèptid, els primers 28 residus, l' $A\beta(1-28)$ , que únicament forma fibres de forma ràpida a pH baix. En canvi, el pèptid  $A\beta(1-40)$  forma fibres a pH neutre quan les histidines es troben desprotonades, o quan no estan carregades positivament. A pH 5.5, però, amb les histidines protonades i, tal com s'ha demostrat en aquesta tesi, forma agregats d'estructura  $\beta$  i morfologia amorfa. L'estat de protonació de les histidines és, per tant, rellevant en relació al tipus d'agregats que es formin, però depèn, a més, de si el fragment peptídic capaç de formar fibres amiloides conté el segment de residus hidrofòbics del segment C-terminal o no. Quan les

histidines estan protonades (pH baix) i, per tant, carregades positivament en el pèptid A $\beta$ (1-40), es formen agregats amorfs, o sigui, de naturalesa no fibril·lar, contràriament a la necessitat de la desprotonació d'aquests residus per a la correcta formació de fibres. Aquest fet fa pensar, per comparació amb el fragment A $\beta$ (1-28) (absència del segment C-terminal), que en el cas de l'A $\beta$ (1-40), que l'inici del procés d'agregació vindria marcat per alguna mena de col·lapse hidrofòbic (del segment C terminal) seguit de l'establiment de interaccions electrostàtiques, entre cadenes laterals de residus àcids (Asp, Glu) i bàsics (Arg, Lys), però que requeriria la desprotonació (la neutralitat elèctrica) de les histidines. La protonació d'aquestes, implicaria l'existència d'interaccions elèctriques repulsives, que impediria la correcta ordenació dels monòmers en forma de fibres i portarien a la formació d'agregats amorfs. En el cas del fragment hidrofílic, l'A $\beta$ (1-28), la formació de fibres implicaria únicament l'establiment d'interaccions electrostàtiques atractives, les quals inclourien i requeririen les interaccions de les histidines protonades amb residus àcids. Ens trobem, per tant, amb dos fragments peptídics, l'A $\beta$ (1-28) i l'A $\beta$ (1-40), que poden formar estructures fibril·lars morfològicament equivalents, però que impliquen unes interaccions moleculars diferents pel que fa als residus implicats.

Els resultats presentats en aquesta memòria, situen, tal com s'esquematitza a la figura 68, els agregats amorfs formats pel pèptid l'A $\beta$ (1-40) com a possibles protagonistes de la citotoxicitat del pèptid, si més no, en un nivell semblant al que es dona actualment a les estructures oligomèriques que es formen durant la fase de latència a pH neutre, com possibles agents citotòxics.

La caracterització de la interacció del pèptid amiloide A $\beta$ (1-40) amb membranes biològiques s'ha portat a terme a partir d'estudis biofísics realitzats amb sistemes model (pèptids sintètics, membranes model), fent però alhora un esforç per intentar estendre el sentit dels resultats obtinguts en els sistemes model al sistema cel·lular. Els resultats, en aquest sentit, obtinguts a partir de la utilització de dues línies cel·lulars

i que presenten una diferència clara quant a la densitat de càrrega negativa de la superfície externa de la membrana cel·lular, permeten plantejar la possibilitat de que els agregats amorfs juguin un paper important per a la citotoxicitat del pèptid amiloide. Aquesta possibilitat es presenta d'una manera esquemàtica a la figura 68.



**Figura 68.** Esquema del possible rol del agregats amiloides amorfs en el context dels diferents factors implicats en l'origen i el desenvolupament de la malaltia.





## **CONCLUSIONS**



1. En el procés de polimerització nucleada els oligòmers que es formen durant la fase de latència (la seva formació és ràpida en presència de  $\text{Cl}^-$  com a contraió) són rics en estructura  $\beta$  intermolecular. De fet, gairebé la totalitat d'estructura  $\beta$  agregada es forma durant la fase de latència. La formació de fibres té lloc per acoblament d'oligòmers, en un procés en que la fulla  $\beta$  dels oligòmers es transforma en fulla  $\beta$  fibril·lar durant la fase d'elongació.
2. L'oxidació de membranes model de lípid de cervell causa un alentiment de la cinètica d'agregació del pèptid  $\text{A}\beta(1-40)$ . Aquest alentiment comporta una fase de nucleació més llarga, una fase d'elongació més lenta i la formació de menys fibres al final del procés, en comparació al mateix procés en presència de membranes no oxidades. D'altra banda, les membranes no oxidades actuen com a punts de nucleació accelerant la formació de fibres.
3. L'alentiment de la cinètica d'agregació del pèptid és degut a l'aparició de càrregues negatives a la superfície de la membrana i la disminució del pH associada a aquest fenomen (el pH a la superfície pot ser entre 5.5 i 6 quan el pH de la solució és 7.4).
4. Les càrregues negatives i el micropH (acídic) a la superfície de la membrana promouen la formació d'agregats d'estructura  $\beta$  no fibril·lar.
5. L'estudi de l'agregació del pèptid a pH 5.5 demostra que, en aquest pH, es formen agregats grossos, amorfs (no fibril·lars). Aquests agregats tenen un pes molecular d'aproximadament 400 kDa.

6. Els agregats amorfs d'alt pes molecular tenen la capacitat de desestabilitzar les membranes model, fent-les permeables al pas de molècules orgàniques.
7. En cèl·lules crònicament pre-apoptòtiques (cèl·lules PC12), i per tant, amb una expressió de permanent de PS a la superfície externa de la membrana cel·lular, el pèptid a pH neutre és més tòxic que en cèl·lules sense càrrega negativa a la superfície (cèl·lules SH-SY5Y). Si el pèptid es incubat a pH 5.5 la toxicitat en cèl·lules PC12 és encara més elevada. Aquestes observacions, juntament amb el que s'ha descrit en aquest treball sobre la interacció del pèptid amb membranes model, permet formular les següents hipòtesis sobre la seva citotoxicitat:

HIPÒTESI 1: En condicions fisiològiques que provoquen l'aparició de càrregues negatives a la superfície de les cèl·lules, com poden ser, processos pre-apoptòtics o el producte directe de la peroxidació lipídica, l'aparició d'aquestes càrregues pot generar una acidificació local. Aquesta acidificació pot possibilitar la formació d'agregats amorfs grossos del pèptid A $\beta$ (1-40), ja sigui a partir del pèptid monomèric o a partir del pèptid en forma fibril·lar. La formació d'aquests agregats sobre la superfície de les membranes podria alterar la seva integritat i desencadenar processos que portin a la mort cel·lular (permeabilització de la membrana; alteració de l'homeostasi iònica; desencadenament de senyals inductors d'apoptosi).

HIPÒTESI 2: Condicions patològiques relacionades amb episodis neurovasculars com les microhemorràgies o la hipoperfusió condueixen a la isquèmia i a la hipòxia. La manca d'oxigen i d'aliment a la cèl·lula implica la posada en marxa del metabolisme anaeròbic amb la consegüent formació d'àcid làctic i l'acumulació de CO<sub>2</sub>. Aquest fet implica una acidificació de l'espai extracel·lular. S'ha descrit també que

aquests processos vasculars estan relacionats amb una acidificació de l'interior cel·lular. En qualsevol cas, l'acidificació del medi pot donar lloc a la formació dels agregats amorfs grossos d'A $\beta$ (1-40). Aquest fet donaria una explicació molecular plausible a la relació entre les demències vasculars i la malaltia d'Alzheimer.



## **BIBLIOGRAFIA**





Akiyama, H., S. Barger, S. Barnum, B. Bradt, J. Bauer, G. M. Cole, N. R. Cooper, P. Eikelenboom, M. Emmerling, B. L. Fiebich, C. E. Finch, S. Frautschy, W. S. Griffin, H. Hampel, M. Hull, G. Landreth, L. Lue, R. Mrak, I. R. Mackenzie, P. L. McGeer, M. K. O'Banion, J. Pachter, G. Pasinetti, C. Plata-Salaman, J. Rogers, R. Rydel, Y. Shen, W. Streit, R. Strohmeier, I. Tooyoma, F. L. Van Muiswinkel, R. Veerhuis, D. Walker, S. Webster, B. Wegrzyniak, G. Wenk, i T. Wyss-Coray. 2000. **Inflammation and Alzheimer's disease**. *Neurobiol Aging* 21:383-421.

Alexandrescu, A. T. 2005. **Amyloid accomplices and enforcers**. *Protein Sci* 14:1-12.

Andorfer, C., Y. Kress, M. Espinoza, R. de Silva, K. L. Tucker, Y. A. Barde, K. Duff, i P. Davies. 2003. **Hyperphosphorylation and aggregation of tau in mice expressing normal human tau isoforms**. *J Neurochem* 86:582-590.

Aranberi, I. i Bismarck, A. 2007. **Caracterización superficial de minerales arcillosos persentes en los depositos de crudo**. *An. Quim*, 103(2):23-27.

Antzutkin, O. N. 2004. **Amyloidosis of Alzheimer's Abeta peptides: solid-state nuclear magnetic resonance, electron paramagnetic resonance, transmission electron microscopy, scanning transmission electron microscopy and atomic force microscopy studies**. *Magn Reson Chem* 42:231-246.

Aranda, F. J., J. A. Teruel, i A. Ortiz. 2003. **Interaction of a synthetic peptide corresponding to the N-terminus of canine distemper virus fusion protein with phospholipid vesicles: a biophysical study**. *Biochim Biophys Acta* 1618:51-58.

Arimon, M., I. Diez-Perez, M. J. Kogan, N. Durany, E. Giralt, F. Sanz, i X. Fernandez-Busquets. 2005. **Fine structure study of Abeta1-42 fibrillogenesis with atomic force microscopy**. *Faseb J* 19:1344-1346.

Arispe, N., M. Doh, O. Simakova, B. Kurganov, i A. De Maio. 2004. **Hsc70 and Hsp70 interact with phosphatidylserine on the surface of PC12 cells resulting in a decrease of viability**. *Faseb J* 18:1636-1645.

Barnham, K. J., i A. I. Bush. 2008. **Metals in Alzheimer's and Parkinson's diseases**. *Curr Opin Chem Biol* 12:222-228.

Baumketner, A., S. L. Bernstein, T. Wyttenbach, G. Bitan, D. B. Teplow, M. T. Bowers, i J. E. Shea. 2006. **Amyloid beta-protein monomer structure: a computational and experimental study**. *Protein Sci* 15:420-428.

Bennett, S., M. M. Grant, i S. Aldred. 2009. **Oxidative Stress in Vascular Dementia and Alzheimer's Disease: A Common Pathology.** J Alzheimers Dis.

Benseny-Cases, N., M. Cocera, i J. Cladera. 2007. **Conversion of non-fibrillar beta-sheet oligomers into amyloid fibrils in Alzheimer's disease amyloid peptide aggregation.** Biochem Biophys Res Commun 361:916-921.

Bieschke, J., Q. Zhang, D. A. Bosco, R. A. Lerner, E. T. Powers, P. Wentworth, Jr., i J. W. Kelly. 2006. **Small molecule oxidation products trigger disease-associated protein misfolding.** Acc Chem Res 39:611-619.

Bitan, G., M. D. Kirkitadze, A. Lomakin, S. S. Vollers, G. B. Benedek, i D. B. Teplow. 2003. **Amyloid beta -protein (Abeta) assembly: Abeta 40 and Abeta 42 oligomerize through distinct pathways.** Proc Natl Acad Sci U S A 100:330-335.

Blackley, H. K., G. H. Sanders, M. C. Davies, C. J. Roberts, S. J. Tendler, i M. J. Wilkinson. 2000. **In-situ atomic force microscopy study of beta-amyloid fibrillization.** J Mol Biol 298:833-840.

Bokvist, M., i G. Grobner. 2007. **Misfolding of amyloidogenic proteins at membrane surfaces: the impact of macromolecular crowding.** J Am Chem Soc 129:14848-14849.

Bokvist, M., F. Lindstrom, A. Watts, i G. Grobner. 2004. **Two types of Alzheimer's beta-amyloid (1-40) peptide membrane interactions: aggregation preventing transmembrane anchoring versus accelerated surface fibril formation.** J Mol Biol 335:1039-1049.

Boyd-Kimball, D., H. Mohmmad Abdul, T. Reed, R. Sultana, i D. A. Butterfield. 2004. **Role of phenylalanine 20 in Alzheimer's amyloid beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity.** Chem Res Toxicol 17:1743-1749.

Butterfield, D. A. 2002. **Amyloid beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain. A review.** Free Radic Res 36:1307-1313.

Butterfield, D. A., V. Galvan, M. B. Lange, H. Tang, R. A. Sowell, P. Spilman, J. Fombonne, O. Gorostiza, J. Zhang, R. Sultana, i D. E. Bredesen. 2009. **In vivo oxidative stress in brain of Alzheimer disease transgenic mice: Requirement for methionine 35 in amyloid beta-peptide of APP.** Free Radic Biol Med.

- Butterfield, D. A., i M. L. Lange. 2009. **Multifunctional roles of enolase in Alzheimer's disease brain: beyond altered glucose metabolism.** J Neurochem 111:915-933.
- Butterfield, D. A., i C. M. Lauderback. 2002. **Lipid peroxidation and protein oxidation in Alzheimer's disease brain: potential causes and consequences involving amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress.** Free Radic Biol Med 32:1050-1060.
- Cameron, B., i G. E. Landreth. 2009. **Inflammation, microglia, and alzheimer's disease.** Neurobiol Dis.
- Capasso, M., J. M. Jeng, M. Malavolta, E. Mocchegiani, i S. L. Sensi. 2005. **Zinc dyshomeostasis: a key modulator of neuronal injury.** J Alzheimers Dis 8:93-108; discussion 209-115.
- Carulla, N., G. L. Caddy, D. R. Hall, J. Zurdo, M. Gairi, M. Feliz, E. Giralt, C. V. Robinson, i C. M. Dobson. 2005. **Molecular recycling within amyloid fibrils.** Nature 436:554-558.
- Caughey, B., i P. T. Lansbury. 2003. **Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders.** Annu Rev Neurosci 26:267-298.
- Cevc, G. 1990. **Membrane electrostatics.** Biochim Biophys Acta 1031:311-382.
- Chiang, P. K., M. A. Lam, i Y. Luo. 2008. **The many faces of amyloid beta in Alzheimer's disease.** Curr Mol Med 8:580-584.
- Chung, S. H. 2009. **Aberrant phosphorylation in the pathogenesis of Alzheimer's disease.** BMB Rep 42:467-474.
- Cortijo-Arellano, M., J. Ponce, N. Durany, i J. Cladera. 2008. **Amyloidogenic properties of the prion protein fragment PrP(185-208): comparison with Alzheimer's peptide Abeta(1-28), influence of heparin and cell toxicity.** Biochem Biophys Res Commun 368:238-242.
- Cullen, K. M., Z. Kocsi, i J. Stone. 2006. **Microvascular pathology in the aging human brain: evidence that senile plaques are sites of microhaemorrhages.** Neurobiol Aging 27:1786-1796.
- de la Torre, J. C. 2000. **Impaired cerebrovascular perfusion. Summary of evidence in support of its causality in Alzheimer's disease.** Ann N Y Acad Sci 924:136-152.

de la Torre, J. C. 2004. **Is Alzheimer's disease a neurodegenerative or a vascular disorder? Data, dogma, and dialectics.** *Lancet Neurol* 3:184-190.

Diaz-Nido, J., F. Wandosell, i J. Avila. 2002. **Glycosaminoglycans and beta-amyloid, prion and tau peptides in neurodegenerative diseases.** *Peptides* 23:1323-1332.

Dobson, C. M. 2004. **Principles of protein folding, misfolding and aggregation.** *Semin Cell Dev Biol* 15:3-16.

Dobson, C. M. 2003. **Protein folding and misfolding.** *Nature* 426:884-890.

Dobson, C. M. 1999. **Protein misfolding, evolution and disease.** *Trends Biochem Sci* 24:329-332.

Dong, J., C. S. Atwood, V. E. Anderson, S. L. Siedlak, M. A. Smith, G. Perry, i P. R. Carey. 2003. **Metal binding and oxidation of amyloid-beta within isolated senile plaque cores: Raman microscopic evidence.** *Biochemistry* 42:2768-2773.

Dowhan, W., E. Mileykovskaya, i M. Bogdanov. 2004. **Diversity and versatility of lipid-protein interactions revealed by molecular genetic approaches.** *Biochim Biophys Acta* 1666:19-39.

Dunstan, D. E., P. Hamilton-Brown, P. Asimakis, W. Ducker, i J. Bertolini. 2009. **Shear flow promotes amyloid- $\beta$  fibrilization.** *Protein Eng Des Sel* 22:741-746.

Duyckaerts, C., B. Delatour, i M. C. Potier. 2009. **Classification and basic pathology of Alzheimer disease.** *Acta Neuropathol* 118:5-36.

el-Agnaf, O. M., G. B. Irvine, i D. J. Guthrie. 1997. **Conformations of beta-amyloid in solution.** *J Neurochem* 68:437-439.

Ellens, H., J. Bentz, i F. C. Szoka. 1985. **H<sup>+</sup>- and Ca<sup>2+</sup>-induced fusion and destabilization of liposomes.** *Biochemistry* 24:3099-3106.

Fandrich, M., i C. M. Dobson. 2002. **The behaviour of polyamino acids reveals an inverse side chain effect in amyloid structure formation.** *Embo J* 21:5682-5690.

Fraser, P. E., J. T. Nguyen, W. K. Surewicz, i D. A. Kirschner. 1991. **pH-dependent structural transitions of Alzheimer amyloid peptides.** *Biophys J* 60:1190-1201.

- Fruhworth, G. O., A. Loidl, i A. Hermetter. 2007. **Oxidized phospholipids: from molecular properties to disease**. *Biochim Biophys Acta* 1772:718-736.
- Gazit, E. 2002. **A possible role for pi-stacking in the self-assembly of amyloid fibrils**. *Faseb J* 16:77-83.
- Geula, C., i M. M. Mesulam. 1995. **Cholinesterases and the pathology of Alzheimer disease**. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 9 Suppl 2:23-28.
- Glabe, C. C. 2005. **Amyloid accumulation and pathogenesis of Alzheimer's disease: significance of monomeric, oligomeric and fibrillar Abeta**. *Subcell Biochem* 38:167-177.
- Goldsbury, C., J. Kistler, U. Aebi, T. Arvinte, i G. J. Cooper. 1999. **Watching amyloid fibrils grow by time-lapse atomic force microscopy**. *J Mol Biol* 285:33-39.
- Goldsbury, C. S., S. Wirtz, S. A. Muller, S. Sunderji, P. Wicki, U. Aebi, i P. Frey. 2000. **Studies on the in vitro assembly of a beta 1-40: implications for the search for a beta fibril formation inhibitors**. *J Struct Biol* 130:217-231.
- Goormaghtigh, E., V. Cabiaux, i J. M. Ruysschaert. 1994. **Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. I. Assignments and model compounds**. *Subcell Biochem* 23:329-362.
- Goormaghtigh, E., V. Cabiaux, i J. M. Ruysschaert. 1994. **Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. II. Experimental aspects, side chain structure, and H/D exchange**. *Subcell Biochem* 23:363-403.
- Goormaghtigh, E., V. Cabiaux, i J. M. Ruysschaert. 1994. **Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. III. Secondary structures**. *Subcell Biochem* 23:405-450.
- Gorbenko, G. P., i P. K. Kinnunen. 2006. **The role of lipid-protein interactions in amyloid-type protein fibril formation**. *Chem Phys Lipids* 141:72-82.
- Guntert, A., H. Dobeli, i B. Bohrmann. 2006. **High sensitivity analysis of amyloid-beta peptide composition in amyloid deposits from human and PS2APP mouse brain**. *Neuroscience* 143:461-475.

- Haass, C., i D. J. Selkoe. 2007. **Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide.** Nat Rev Mol Cell Biol 8:101-112.
- Hansen, M. B., S. E. Nielsen, i K. Berg. 1989. **Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill.** J Immunol Methods 119:203-210.
- Hirai, K., G. Aliev, A. Nunomura, H. Fujioka, R. L. Russell, C. S. Atwood, A. B. Johnson, Y. Kress, H. V. Vinters, M. Tabaton, S. Shimohama, A. D. Cash, S. L. Siedlak, P. L. Harris, P. K. Jones, R. B. Petersen, G. Perry, i M. A. Smith. 2001. **Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease.** J Neurosci 21:3017-3023.
- Honer, W. G. 2003. **Pathology of presynaptic proteins in Alzheimer's disease: more than simple loss of terminals.** Neurobiol Aging 24:1047-1062.
- Hortschansky, P., T. Christopeit, V. Schroeckh, i M. Fandrich. 2005. **Thermodynamic analysis of the aggregation propensity of oxidized Alzheimer's beta-amyloid variants.** Protein Sci 14:2915-2918.
- Huang, T. H., D. S. Yang, P. E. Fraser, i A. Chakrabartty. 2000. **Alternate aggregation pathways of the Alzheimer beta-amyloid peptide. An in vitro model of preamyloid.** J Biol Chem 275:36436-36440.
- Jahn, T. R., i S. E. Radford. 2005. **The Yin and Yang of protein folding.** Febs J 272:5962-5970.
- Jan, A., O. Gokce, R. Luthi-Carter, i H. A. Lashuel. 2008. **The ratio of monomeric to aggregated forms of Abeta40 and Abeta42 is an important determinant of amyloid-beta aggregation, fibrillogenesis, and toxicity.** J Biol Chem 283:28176-28189.
- Jensen, M. O., i O. G. Mouritsen. 2004. **Lipids do influence protein function-the hydrophobic matching hypothesis revisited.** Biochim Biophys Acta 1666:205-226.
- Kakio, A., Y. Yano, D. Takai, Y. Kuroda, O. Matsumoto, Y. Kozutsumi, i K. Matsuzaki. 2004. **Interaction between amyloid beta-protein aggregates and membranes.** J Pept Sci 10:612-621.
- Kamal, A., G. B. Stokin, Z. Yang, C. H. Xia, i L. S. Goldstein. 2000. **Axonal transport of amyloid precursor protein is mediated by direct binding to the kinesin light chain subunit of kinesin-I.** Neuron 28:449-459.

Kawai, M., P. Cras, i G. Perry. 1992. **Serial reconstruction of beta-protein amyloid plaques: relationship to microvessels and size distribution.** Brain Res 592:278-282.

Khlistunova, I., J. Biernat, Y. Wang, M. Pickhardt, M. von Bergen, Z. Gazova, E. Mandelkow, i E. M. Mandelkow. 2006. **Inducible expression of Tau repeat domain in cell models of tauopathy: aggregation is toxic to cells but can be reversed by inhibitor drugs.** J Biol Chem 281:1205-1214.

Kimberly, W. T., J. B. Zheng, S. Y. Guenette, i D. J. Selkoe. 2001. **The intracellular domain of the beta-amyloid precursor protein is stabilized by Fe65 and translocates to the nucleus in a notch-like manner.** J Biol Chem 276:40288-40292.

Kirkitadze, M. D., M. M. Condrón, i D. B. Teplow. 2001. **Identification and characterization of key kinetic intermediates in amyloid beta-protein fibrillogenesis.** J Mol Biol 312:1103-1119.

Klug, G. M., D. Losic, S. S. Subasinghe, M. I. Aguilar, L. L. Martin, i D. H. Small. 2003. **Beta-amyloid protein oligomers induced by metal ions and acid pH are distinct from those generated by slow spontaneous ageing at neutral pH.** Eur J Biochem 270:4282-4293.

Koppaka, V., i P. H. Axelsen. 2000. **Accelerated accumulation of amyloid beta proteins on oxidatively damaged lipid membranes.** Biochemistry 39:10011-10016.

Kumar-Singh, S., P. Cras, R. Wang, J. M. Kros, J. van Swieten, U. Lubke, C. Ceuterick, S. Serneels, K. Vennekens, J. P. Timmermans, E. Van Marck, J. J. Martin, C. M. van Duijn, i C. Van Broeckhoven. 2002. **Dense-core senile plaques in the Flemish variant of Alzheimer's disease are vasocentric.** Am J Pathol 161:507-520.

Lashuel, H. A., D. Hartley, B. M. Petre, T. Walz, i P. T. Lansbury, Jr. 2002. **Neurodegenerative disease: amyloid pores from pathogenic mutations.** Nature 418:291.

Lashuel, H. A., D. M. Hartley, B. M. Petre, J. S. Wall, M. N. Simon, T. Walz, i P. T. Lansbury, Jr. 2003. **Mixtures of wild-type and a pathogenic (E22G) form of Abeta40 in vitro accumulate protofibrils, including amyloid pores.** J Mol Biol 332:795-808.

Laurine, E., C. Gregoire, M. Fandrich, S. Engemann, S. Marchal, L. Thion, M. Mohr, B. Monsarrat, B. Michel, C. M. Dobson, E. Wanker, M. Erard, i J. M. Verdier. 2003. **Lithostathine quadruple-helical filaments form proteinase K-resistant deposits in Creutzfeldt-Jakob disease.** J Biol Chem 278:51770-51778.

Lee, G., H. B. Pollard, i N. Arispe. 2002. **Annexin 5 and apolipoprotein E2 protect against Alzheimer's amyloid-beta-peptide cytotoxicity by competitive inhibition at a common phosphatidylserine interaction site.** Peptides 23:1249-1263.

Lesne, S., M. T. Koh, L. Kotilinek, R. Kaye, C. G. Glabe, A. Yang, M. Gallagher, i K. H. Ashe. 2006. **A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory.** Nature 440:352-357.

LeVine, H., 3rd. 1997. **Stopped-flow kinetics reveal multiple phases of thioflavin T binding to Alzheimer beta (1-40) amyloid fibrils.** Arch Biochem Biophys 342:306-316.

LeVine, H., 3rd. 1993. **Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution.** Protein Sci 2:404-410.

Lichtenthaler, S. F., i C. Haass. 2004. **Amyloid at the cutting edge: activation of alpha-secretase prevents amyloidogenesis in an Alzheimer disease mouse model.** J Clin Invest 113:1384-1387.

Lipton, S. A. 2004. **Paradigm shift in NMDA receptor antagonist drug development: molecular mechanism of uncompetitive inhibition by memantine in the treatment of Alzheimer's disease and other neurologic disorders.** J Alzheimers Dis 6:S61-74.

Liu, L., H. Komatsu, I. V. Murray, i P. H. Axelsen. 2008. **Promotion of amyloid beta protein misfolding and fibrillogenesis by a lipid oxidation product.** J Mol Biol 377:1236-1250.

Losic, D., L. L. Martin, A. Mechler, M. I. Aguilar, i D. H. Small. 2006. **High resolution scanning tunnelling microscopy of the beta-amyloid protein (Abeta1-40) of Alzheimer's disease suggests a novel mechanism of oligomer assembly.** J Struct Biol 155:104-110.

Makin, O. S., i L. C. Serpell. 2005. **X-ray diffraction studies of amyloid structure.** Methods Mol Biol 299:67-80.

Malinchik, S. B., H. Inouye, K. E. Szumowski, i D. A. Kirschner. 1998. **Structural analysis of Alzheimer's beta(1-40) amyloid: protofilament assembly of tubular fibrils.** Biophys J 74:537-545.

Mantsch, H. H., i R. N. McElhaney. 1991. **Phospholipid phase transitions in model and biological membranes as studied by infrared spectroscopy.** Chem Phys Lipids 57:213-226.

Marshall, K. E., i L. C. Serpell. 2009. **Structural integrity of beta-sheet assembly.** Biochem Soc Trans 37:671-676.



Mastrangelo, I. A., M. Ahmed, T. Sato, W. Liu, C. Wang, P. Hough, i S. O. Smith. 2006. **High-resolution atomic force microscopy of soluble Abeta42 oligomers.** J Mol Biol 358:106-119.

Mattson, M. P. 1997. **Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives.** Physiol Rev 77:1081-1132.

Mattson, M. P. 2004. **Pathways towards and away from Alzheimer's disease.** Nature 430:631-639.

Maurer, K. a. M., U. 2006. Alzheimer. La vida de un médico y la historia de una enfermedad. Ed. Díaz de los Santos, Leganés.

Mayer, L. D., M. J. Hope, i P. R. Cullis. 1986. **Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure.** Biochim Biophys Acta 858:161-168.

McLaughlin, S. 1989. **The electrostatic properties of membranes.** Annu Rev Biophys Chem 18:113-136.

McLaurin, J., i A. Chakrabartty. 1997. **Characterization of the interactions of Alzheimer beta-amyloid peptides with phospholipid membranes.** Eur J Biochem 245:355-363.

McLaurin, J., i A. Chakrabartty. 1996. **Membrane disruption by Alzheimer beta-amyloid peptides mediated through specific binding to either phospholipids or gangliosides. Implications for neurotoxicity.** J Biol Chem 271:26482-26489.

McLaurin, J., T. Franklin, W. J. Kuhns, i P. E. Fraser. 1999. **A sulfated proteoglycan aggregation factor mediates amyloid-beta peptide fibril formation and neurotoxicity.** Amyloid 6:233-243.

Menon, P. M., J. P. Vonsattel, i P. R. Jolles. 2009. **Brain Imaging and Neuropathologic Mechanisms in Alzheimer's Disease: Vascular Versus Neurodegenerative and Amyloid-beta Versus Tau.** J Alzheimers Dis.

Monsonogo, A., R. Maron, V. Zota, D. J. Selkoe, i H. L. Weiner. 2001. **Immune hyporesponsiveness to amyloid beta-peptide in amyloid precursor protein transgenic mice: implications for the pathogenesis and treatment of Alzheimer's disease.** Proc Natl Acad Sci U S A 98:10273-10278.

Moreira, P. I., A. I. Duarte, M. S. Santos, A. C. Rego, i C. R. Oliveira. 2009. **An integrative view of the role of oxidative stress, mitochondria and insulin in Alzheimer's disease.** J Alzheimers Dis 16:741-761.

- Moreira, P. I., S. L. Siedlak, G. Aliev, X. Zhu, A. D. Cash, M. A. Smith, i G. Perry. 2005. **Oxidative stress mechanisms and potential therapeutics in Alzheimer disease.** J Neural Transm 112:921-932.
- Mucke, L. 2009. **Neuroscience: Alzheimer's disease.** Nature 461:895-897.
- Murray, I. V., L. Liu, H. Komatsu, K. Uryu, G. Xiao, J. A. Lawson, i P. H. Axelsen. 2007. **Membrane-mediated amyloidogenesis and the promotion of oxidative lipid damage by amyloid beta proteins.** J Biol Chem 282:9335-9345.
- New, R. [ed.]. 1990. Liposomes a practical approach. IRL Press, Oxford.
- Nir, S., i J. L. Nieva. 2000. **Interactions of peptides with liposomes: pore formation and fusion.** Prog Lipid Res 39:181-206.
- Otvos, L., Jr., G. I. Szendrei, V. M. Lee, i H. H. Mantsch. 1993. **Human and rodent Alzheimer beta-amyloid peptides acquire distinct conformations in membrane-mimicking solvents.** Eur J Biochem 211:249-257.
- Palsdottir, H., i C. Hunte. 2004. **Lipids in membrane protein structures.** Biochim Biophys Acta 1666:2-18.
- Petkova, A. T., Y. Ishii, J. J. Balbach, O. N. Antzutkin, R. D. Leapman, F. Delaglio, i R. Tycko. 2002. **A structural model for Alzheimer's beta-amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR.** Proc Natl Acad Sci U S A 99:16742-16747.
- Petkova, A. T., W. M. Yau, i R. Tycko. 2006. **Experimental constraints on quaternary structure in Alzheimer's beta-amyloid fibrils.** Biochemistry 45:498-512.
- Querfurth, H. W., i F. M. LaFerla. **Alzheimer's disease.** N Engl J Med 362:329-344.
- Rak, M., M. R. Del Bigio, S. Mai, D. Westaway, i K. Gough. 2007. **Dense-core and diffuse A $\beta$  plaques in TgCRND8 mice studied with synchrotron FTIR microspectroscopy.** Biopolymers 87:207-217.
- Raschetti, R., E. Albanese, N. Vanacore, i M. Maggini. 2007. **Cholinesterase inhibitors in mild cognitive impairment: a systematic review of randomised trials.** PLoS Med 4:e338.
- Reddy, V. P., X. Zhu, G. Perry, i M. A. Smith. 2009. **Oxidative stress in diabetes and Alzheimer's disease.** J Alzheimers Dis 16:763-774.

- Robinson, J. P. [ed.]. 1993. *Handbook of Flow Cytometry Methods*. Wiley-Liss, New York.
- Roy, M. T., M. Gallardo, i J. Estelrich. 1998. **Influence of Size on Electrokinetic Behavior of Phosphatidylserine and Phosphatidylethanolamine Lipid Vesicles**. *J Colloid Interface Sci* 206:512-517.
- Selkoe, D. J. 2001. **Alzheimer's disease results from the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein**. *J Alzheimers Dis* 3:75-80.
- Selkoe, D. J. 2001. **Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy**. *Physiol Rev* 81:741-766.
- Serpell, L. C., M. Sunde, M. D. Benson, G. A. Tennent, M. B. Pepys, i P. E. Fraser. 2000. **The protofilament substructure of amyloid fibrils**. *J Mol Biol* 300:1033-1039.
- Shankar, G. M., S. Li, T. H. Mehta, A. Garcia-Munoz, N. E. Shepardson, I. Smith, F. M. Brett, M. A. Farrell, M. J. Rowan, C. A. Lemere, C. M. Regan, D. M. Walsh, B. L. Sabatini, i D. J. Selkoe. 2008. **Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory**. *Nat Med* 14:837-842.
- Shinitzky, M., i Y. Barenholz. 1978. **Fluidity parameters of lipid regions determined by fluorescence polarization**. *Biochim Biophys Acta* 515:367-394.
- Simakova, O., i N. J. Arispe. 2007. **The cell-selective neurotoxicity of the Alzheimer's A $\beta$  peptide is determined by surface phosphatidylserine and cytosolic ATP levels. Membrane binding is required for A $\beta$  toxicity**. *J Neurosci* 27:13719-13729.
- Smith, D. P., G. D. Ciccotosto, D. J. Tew, M. T. Fodero-Tavoletti, T. Johanssen, C. L. Masters, K. J. Barnham, i R. Cappai. 2007. **Concentration dependent Cu $^{2+}$  induced aggregation and dityrosine formation of the Alzheimer's disease amyloid-beta peptide**. *Biochemistry* 46:2881-2891.
- Snow, A. D., M. G. Kinsella, E. Parks, R. T. Sekiguchi, J. D. Miller, K. Kimata, i T. N. Wight. 1995. **Differential binding of vascular cell-derived proteoglycans (perlecan, biglycan, decorin, and versican) to the beta-amyloid protein of Alzheimer's disease**. *Arch Biochem Biophys* 320:84-95.
- Stone, J. 2008. **What initiates the formation of senile plaques? The origin of Alzheimer-like dementias in capillary haemorrhages**. *Med Hypotheses* 71:347-359.

- Streltsov, V. 2008. **X-ray absorption and diffraction studies of the metal binding sites in amyloid beta-peptide**. Eur Biophys J 37:257-263.
- Sunde, M., i C. Blake. 1997. **The structure of amyloid fibrils by electron microscopy and X-ray diffraction**. Adv Protein Chem 50:123-159.
- Swerdlow, R. H., i S. M. Khan. 2004. **A "mitochondrial cascade hypothesis" for sporadic Alzheimer's disease**. Med Hypotheses 63:8-20.
- Szekely, C. A., J. C. Breitner, i P. P. Zandi. 2007. **Prevention of Alzheimer's disease**. Int Rev Psychiatry 19:693-706.
- Tiraboschi, P., L. A. Hansen, L. J. Thal, i J. Corey-Bloom. 2004. **The importance of neuritic plaques and tangles to the development and evolution of AD**. Neurology 62:1984-1989.
- Togo, T., O. Katsuse, i E. Iseki. 2004. **Nitric oxide pathways in Alzheimer's disease and other neurodegenerative dementias**. Neurol Res 26:563-566.
- Valente, T., J. Hidalgo, I. Bolea, B. Ramirez, N. Angles, J. Reguant, J. R. Morello, C. Gutierrez, M. Boada, i M. Unzeta. 2009. **A Diet Enriched in Polyphenols and Polyunsaturated Fatty Acids, LMN Diet, Induces Neurogenesis in the Subventricular Zone and Hippocampus of Adult Mouse Brain**. J Alzheimers Dis.
- Wall, J., F. Ayoub, i P. O'Shea. 1995. **Interactions of macromolecules with the mammalian cell surface**. J Cell Sci 108 ( Pt 7):2673-2682.
- Wall, J., C. A. Golding, M. Van Veen, i P. O'Shea. 1995. **The use of fluoresceinphosphatidylethanolamine (FPE) as a real-time probe for peptide-membrane interactions**. Mol Membr Biol 12:183-192.
- Walsh, D. M., D. M. Hartley, Y. Kusumoto, Y. Fezoui, M. M. Condron, A. Lomakin, G. B. Benedek, D. J. Selkoe, i D. B. Teplow. 1999. **Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Structure and biological activity of protofibrillar intermediates**. J Biol Chem 274:25945-25952.
- Walsh, D. M., i D. J. Selkoe. 2007. **A beta oligomers - a decade of discovery**. J Neurochem 101:1172-1184.
- Weller, R. O., S. D. Preston, M. Subash, i R. O. Carare. 2009. **Cerebral amyloid angiopathy in the aetiology and immunotherapy of Alzheimer disease**. Alzheimers Res Ther 1:6.

- Wood, S. J., B. Maleeff, T. Hart, i R. Wetzel. 1996. **Physical, morphological and functional differences between ph 5.8 and 7.4 aggregates of the Alzheimer's amyloid peptide Abeta.** J Mol Biol 256:870-877.
- Xu, Y., J. Shen, X. Luo, W. Zhu, K. Chen, J. Ma, i H. Jiang. 2005. **Conformational transition of amyloid beta-peptide.** Proc Natl Acad Sci U S A 102:5403-5407.
- Yamaguchi, H., Y. Nakazato, M. Shoji, M. Takatama, i S. Hirai. 1991. **Ultrastructure of diffuse plaques in senile dementia of the Alzheimer type: comparison with primitive plaques.** Acta Neuropathol 82:13-20.
- Yan, S. D., X. Chen, J. Fu, M. Chen, H. Zhu, A. Roher, T. Slattery, L. Zhao, M. Nagashima, J. Morser, A. Migheli, P. Nawroth, D. Stern, i A. M. Schmidt. 1996. **RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease.** Nature 382:685-691.
- Yip, C. M., A. A. Darabie, i J. McLaurin. 2002. **Abeta42-peptide assembly on lipid bilayers.** J Mol Biol 318:97-107.



## **PUBLICACIONES**





## Conversion of non-fibrillar $\beta$ -sheet oligomers into amyloid fibrils in Alzheimer's disease amyloid peptide aggregation <sup>☆</sup>

Núria Benseny-Cases, Mercedes Cócera, Josep Cladera \*

*Unitat de Biofísica, Departament de Bioquímica i de Biologia Molecular, i Centre d'Estudis Biofísics, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain*

Received 16 July 2007

Available online 24 July 2007

### Abstract

A $\beta$ (1–40) is one of the main components of the fibrils found in amyloid plaques, a hallmark of brains affected by Alzheimer's disease. It is known that prior to the formation of amyloid fibrils in which the peptide adopts a well-ordered intermolecular  $\beta$ -sheet structure, peptide monomers associate forming low and high molecular weight oligomers. These oligomers have been previously described in electron microscopy, AFM, and exclusion chromatography studies. Their specific secondary structures however, have not yet been well established. A major problem when comparing aggregation and secondary structure determinations in concentration-dependent processes such as amyloid aggregation is the different concentration range required in each type of experiment. In the present study we used the dye Thioflavin T (ThT), Fourier-transform infrared spectroscopy, and electron microscopy in order to structurally characterize the different aggregated species which form during the A $\beta$ (1–40) fibril formation process. A unique sample containing 90  $\mu$ M peptide was used. The results show that oligomeric species which form during the lag phase of the aggregation kinetics are a mixture of unordered, helical, and intermolecular non-fibrillar  $\beta$ -structures. The number of oligomers and the amount of non-fibrillar  $\beta$ -structures grows throughout the lag phase and during the elongation phase these non-fibrillar  $\beta$ -structures are transformed into fibrillar (amyloid)  $\beta$ -structures, formed by association of high molecular weight intermediates.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Amyloid; Oligomer; Fibril; Fluorescence; Infrared

Amyloid peptides A $\beta$ (1–40) and A $\beta$ (1–42) are the main components of the proteinaceous deposits found in central nervous systems affected by Alzheimer's disease [1–3]. Numerous 'in vitro' studies with these peptides have shown their capacity to form the so called amyloid fibrils, rich in  $\beta$ -structure [4]. Monitoring of the aggregation process that leads to the formation of fibrils has revealed sigmoid-shaped kinetics, usually interpreted as a consequence of a nucleation-dependent polymerization process. In such a process two distinct phases can be defined: a first, slow nucleation phase (formation of nuclei from peptide mono-

mers) followed by a fast elongation phase during which fibrils are formed [5]. A detailed description of the molecular mechanisms that define each one of these phases is at present still lacking and different interpretations are at hand on the nature and the number of intermediates which would lead to the formation of nuclei and fibrils. Besides the existence of peptide monomers and fibrils, low (2–8 monomers) and high (20–40 monomers) molecular weight oligomers and protofibrils have been defined in the literature [6–8]. In the last few years evidence has accumulated indicating that A $\beta$  toxicity is linked to the presence of oligomeric species rather than to mature fibrils [9,10]. This means that for a complete understanding of the cytotoxic mechanisms a full characterization of the processes by which monomers fold and oligomerize is necessary. Different studies have addressed the secondary structure characterization of oligomeric species [8,11]. Although in some

<sup>☆</sup> This work was funded by Grants ETT2002-05139 and BIO2003-02848 from the Spanish Ministry of Science and Education to J.C. M.C. has a postdoctoral fellowship funded by the program 'Juan de la Cierva'.

\* Corresponding author. Fax: +34 935811907.

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

cases structural measurements have been carried out as a function of time [8], it is not possible from the literature to establish a clear correlation between these structural kinetics and the aggregation kinetics measured using amyloid specific dyes such as Thioflavin T (ThT) or scattering techniques. Such a comparison would allow to clearly place the different aggregated species and their secondary structures on the corresponding phase (lag phase, elongation phase, plateau) of the aggregation sigmoid.

In the present paper, we have undertaken a study directed to the structural and morphological characterization of the different aggregated species that form along the process by which A $\beta$ (1–40) aggregates into amyloid fibrils. In order to achieve this goal the aggregation kinetics have been monitored in real time using the fluorescent dye ThT. At different times corresponding to the different phases of the detected sigmoid, aliquots have been taken in order to carry out Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) measurements (secondary structure determination) and electron microscopy (morphology studies). The results show that during the lag (nucleation) phase oligomers form which already contain a significant amount of aggregated non-fibrillar  $\beta$ -structure. Interestingly, the total amount of  $\beta$ -structure remains almost unchanged from half of the nucleation phase up to the end of the aggregation process. Being the main difference between these two time points a change in the fluorescence of the ThT dye (which reflects the formation of amyloid fibrils) we conclude that during the elongation phase, a transition from non-fibrillar aggregated  $\beta$ -structures into fibrillar  $\beta$ -structures by combination of globular oligomers is the main conformational change.

## Materials and methods

Synthetic A $\beta$ (1–40) [Cl<sup>-</sup> · DAEFRHDSGYEVHHQKLV FFAEDVGSNKG AIIGLMVGGVV] was purchased from JPT (Germany). Stock solutions were prepared by dissolving the peptide (250  $\mu$ M) in 10 mM deuterated HEPES buffer, pD 8, containing 0.02% NH<sub>3</sub> (the peptide shows no tendency to aggregation at alkaline pH [12]). After sonication the peptide was diluted to 90  $\mu$ M (the concentration at which the aggregation experiments were carried out), and the solution was stored at –20 °C until needed. Thioflavin T (ThT) was purchased from Sigma Chemical Company and dissolved (8 mM) in 10 mM deuterated HEPES pD 7.4.

**Fluorescence measurements.** A $\beta$ (1–40) aggregation kinetics were monitored using the dye ThT, which fluorescence is dependent on the formation of amyloid aggregates. Fluorescence measurements were carried out in a SLM-Aminco 800 spectrofluorometer. Excitation and emission wavelengths were set at 450 and 490 nm, respectively. Fluorescence measurements were performed at 37 °C upon continuous and gentle stirring. Peptide concentration was 90  $\mu$ M. ThT concentration was 35  $\mu$ M. At different time aliquots (40  $\mu$ l) were taken from the 2.2 ml fluorescence cuvette for infrared spectroscopy and electron microscopy measurements.

**Infrared spectroscopy.** Fourier-transform infrared spectra were recorded at 37 °C on a FTIR Mattson Polaris spectrometer equipped with a liquid nitrogen cooled mercury–cadmium–telluride (MCT) detector, at a nominal resolution of 2 cm<sup>-1</sup>. The spectrometer was continuously purged with dry air (dew point lower than –60 °C). The sample (30  $\mu$ l) was deposited between two CaF<sub>2</sub> windows separated by a 50  $\mu$ m teflon spacer. One-thousand scans were averaged for each infrared spectrum. In order to

obtain the infrared spectrum of the peptide, a spectrum of the solvent was subtracted from that of the sample (peptide + solvent).

**Transmission electronic microscopy.** Ten microliters of sample from the fluorimeter cuvette were placed for 10 min on a copper grid with a carbon surface and dried with Watman paper. The sample was stained with 2% (w/v) Uranyl acetate for 2 min and dried. Transmission electron micrographs were obtained using a Hitachi H-7000 (75 kV) microscope.

## Results

### ThT fluorescence measurements

The ThT fluorescence variation of two independent suspensions of A $\beta$ (1–40) in Hepes buffer at pD 7.4 as a function of time is shown in Fig. 1A. The experimental data points reveal the typical amyloid aggregation curves with a lag phase in which no fluorescence variation is detected (nucleation phase), followed by the so called elongation phase, in which the ThT fluorescence increase denotes the formation of amyloid fibrils. The clear existence of a lag phase denotes the absence of amyloid fibrils in our initial preparations. As shown by Hortschansky et al. [13], the reproducibility of the fluorescence curves and the duration of the lag phase are dependent on the peptide concentration. In the present study a peptide concentration of 90  $\mu$ M has been used in order to ensure a good reproducibility. Moreover such a peptide concentration has made possible the acquisition of infrared (FTIR) spectra and electron micrographs using aliquots taken from the fluorimeter cuvette at different times (indicated with arrows in Fig. 1A). The observed lag times do compare well with those reported by Hortschansky et al. [13] for a similar peptide concentration. However, other studies [8] report much slower aggregation processes. The analysis of the bibliography clearly shows that the duration of the aggregation process is highly dependent on whether or not filtration or other equivalent methods are used in order to eliminate already aggregated species in the sample. In the present study no such methods have been used as part of the protocol followed for sample preparation (see Materials and methods).

### Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) measurements

The amide I region of the infrared spectra corresponding to the different aliquots taken from one of the kinetics measured in Fig. 1A is shown in Fig. 1B. The amide I is dominated by two main features. A band centered at around 1626 cm<sup>-1</sup>, indicative of the existence of intermolecular, aggregated  $\beta$ -structures, and a broader band centered around 1645 cm<sup>-1</sup>, which can be assigned to a mixture of unordered and helical structures [14–16]. Both bands are detected very early into the aggregation process (~2 h) and its relative intensity, although it seems to vary a bit, does not greatly change with time. Together with the spectra corresponding to the different times along the aggregation process, the A $\beta$ (1–40) spectrum at pD 8.0 is

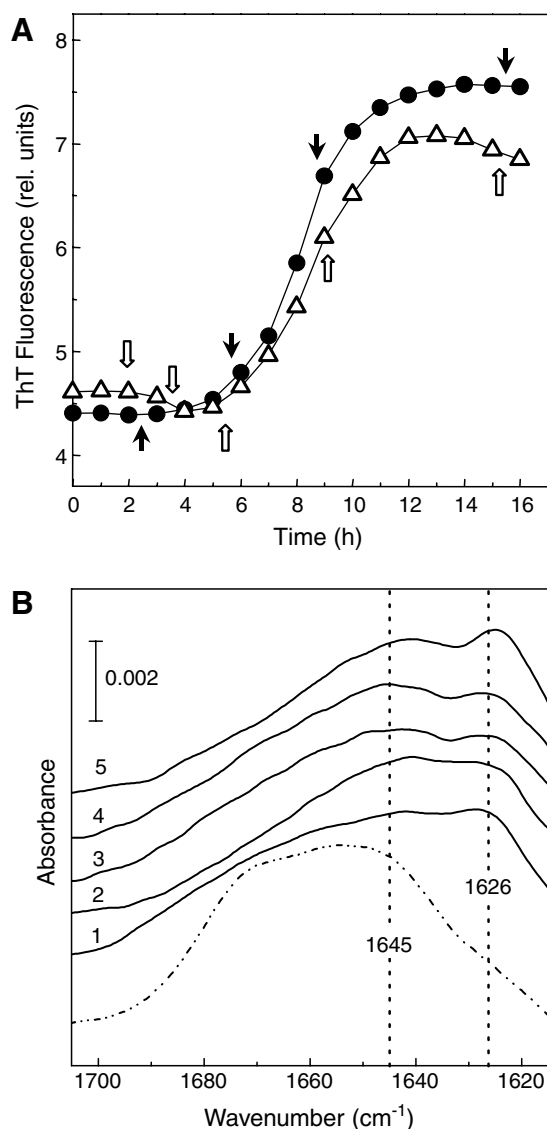


Fig. 1. (A) Thioflavin T (ThT) fluorescence variation as a function of time of two (triangles and circles) A $\beta$ (1–40) suspensions in 10 mM Hepes buffer, pD 7.4. Peptide concentration was 90  $\mu$ M. Temperature was 37  $^{\circ}$ C. The arrows indicate the times at which aliquots were taken for infrared and electron microscopy measurements. (B) Amide I region of the infrared spectrum of A $\beta$ (1–40). Spectra corresponding to the times marked with white arrows are shown: (1) 1.7 h, (2) 3.5 h, (3) 5.5 h, (4) 9 h, (5) 15 h. The spectra of a peptide suspension at pD 8 is shown as a dotted line as a reference spectra corresponding to the absence of aggregated  $\beta$ -structures.

shown. Since at this pD no spectral changes were observed over the measured time interval (and no variation of the ThT fluorescence was observed, data not shown), the spectrum serves as a reference for the intensities at 1626 and 1645  $\text{cm}^{-1}$  in the absence of aggregated  $\beta$ -structures. In order to facilitate the visualization of the conformational changes along time, the evolution of the ratio  $A_{1626}/A_{1645}$  (indicative of the formation of aggregated  $\beta$ -structures from helical and unordered ones) calculated from the spectra in Fig. 1B is represented in Fig. 2 together with an average ThT curve calculated from the two ThT curves shown in Fig. 1A. Taking as a reference the  $A_{1626}/A_{1645}$  value at

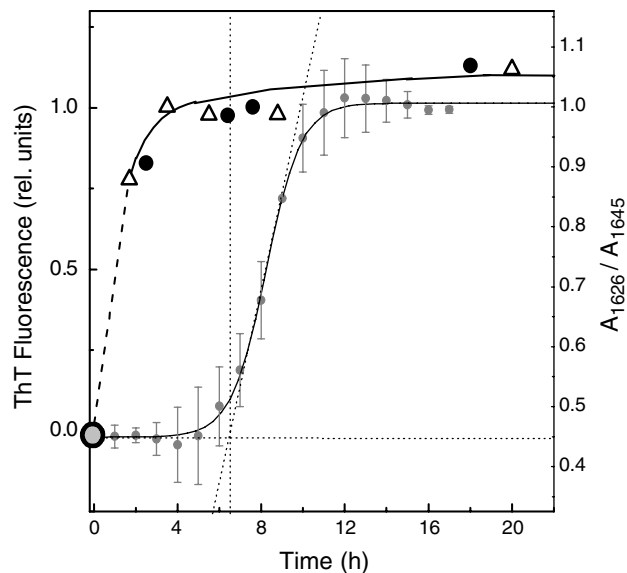


Fig. 2. Comparison of the kinetics of formation of aggregated  $\beta$ -structures with the formation of amyloid fibrils monitored using the ThT dye. The variation of the amount of  $\beta$ -structure with time has been expressed as the ratio  $A_{1626}/A_{1645}$ . Data points corresponding to two independent set of measurements are shown. Full circles: ratio calculated from the IR spectra corresponding to the times indicated on the ThT trace shown as full circles in Fig. 1. Empty triangles: ratio calculated from the IR spectra corresponding to the indicated times on the ThT trace shown as empty triangles in Fig. 1. The ThT curve shown is the average of the two traces shown in Fig. 1 normalized between 0 and 1. The error bars correspond to the range of mean. The vertical dotted line indicates the end of the lag phase, estimated as in Hortschansky et al. [13]. The symbol shown as a full gray circle at time zero, marks the  $A_{1626}/A_{1645}$  value for the spectrum reflecting the absence of aggregated  $\beta$ -structures (spectrum at pD 8.0 in Fig. 1B).

pD 8 (ratio corresponding to the absence of aggregated  $\beta$ -structures), the comparison of the curves reveals that most of the aggregated  $\beta$ -structure detected at 1626  $\text{cm}^{-1}$  throughout the aggregation process has formed well before the end of the lag phase of the ThT curve.

#### Transmission electron microscopy (TEM) measurement

The electron micrographs obtained from the aliquots taken at different times along the A $\beta$ (1–40) aggregation process are shown in Fig. 3. In the early stages of the nucleation phase (2.5 h, Fig. 3A and B) circular bodies with a diameter of around 20 nm are detected. According to previous electron microscopy and AFM works [17–19] such structures would correspond to high molecular weight (HMW) oligomers. By the end of the nucleation phase (6 h, Fig. 3C and D) HMW oligomers are detected in greater numbers and some of them can be seen organized as beads on a string (Fig. 3C). These strings of HMW oligomers have been previously identified as protofibrils [7]. Well advanced the elongation phase (9 h, Fig. 3E and F) typical amyloid fibrils are clearly detected. Such fibrils become longer and more entangled by the time the ThT fluorescence has reached the plateau (15.5 h, Fig. 3G and

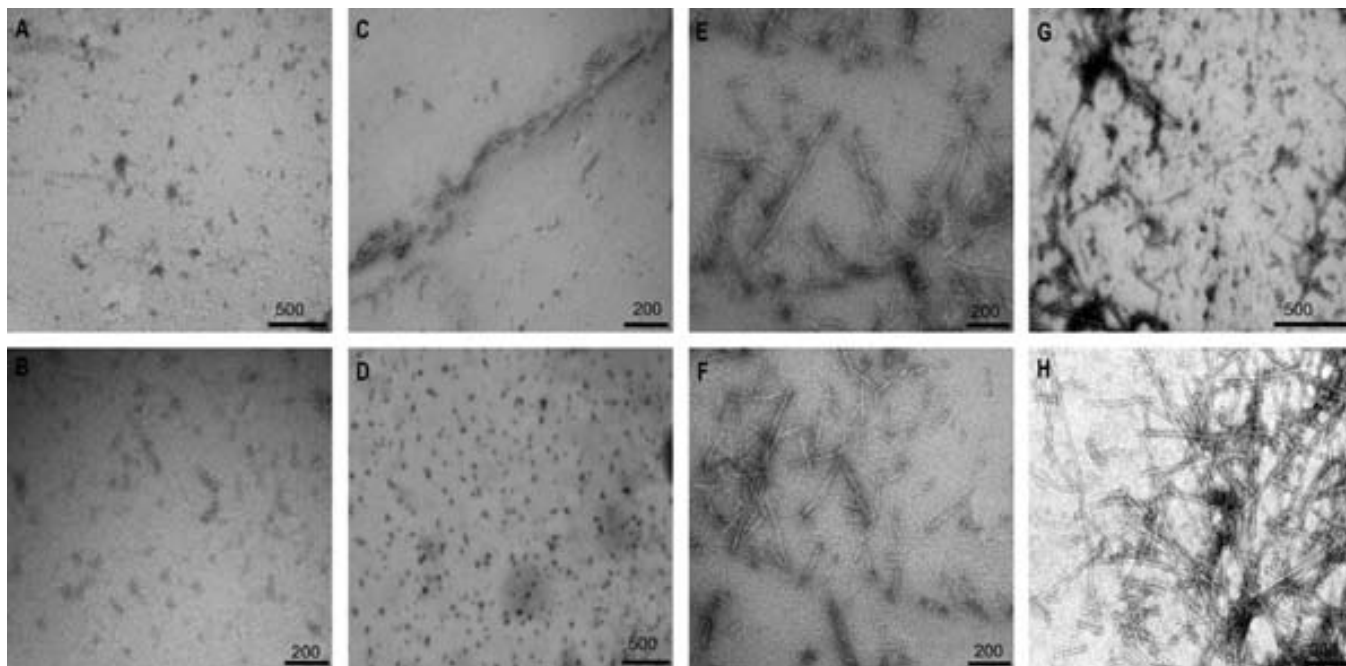


Fig. 3. Electron micrographs obtained using the aliquots taken at the times indicated by the black arrows in Fig. 1: (A,B) 2.5 h; (C,D) 6 h; (E,F) 9 h; (G,H) 15.5 h. A series of micrographs was also acquired using the aliquots indicated with white arrows and showed equivalent results. Numbers on the bars indicate nm.

H). It is worth noting that in all cases fibrils are detected together with HMW oligomers.

## Discussion

Monitoring of the A $\beta$ (1–40) aggregation process using the fluorescent dye ThT has been complemented in the present study with structural and morphological data obtained at the same peptide concentration by taking small aliquots from the sample in the ThT experiments. Such an approach has permitted to directly relate the structural and morphological information to the corresponding times on the aggregation sigmoid. As recently shown by Hortschansky et al. [13] even under carefully kept constant experimental conditions the reproducibility of A $\beta$ (1–40) kinetics is highly dependent on peptide concentration. Using A $\beta$ (1–40) at 90  $\mu$ M we have ensured an acceptable degree of reproducibility (Fig. 1A) and moreover, it has been possible to obtain infrared spectra with an acceptable signal to noise ratio. A remarkable difference between the aggregation sigmoids reported in the present work and previous studies is that the whole aggregation process takes place in a matter of hours, compared to the aggregation processes lasting for days, often reported in the literature [8]. Slow aggregation kinetics have usually been measured at lower concentrations (10–30  $\mu$ M) and under initial treatments of the stock peptide solutions involving the elimination of aggregated (fibrillar and soluble) species, such as filtration, centrifugation, and the use of size exclusion chromatography. Since no such procedures have been used in our study, the faster aggregation kinetics, especially the fas-

ter lag (nucleation) phase may be due to the faster formation of large oligomeric structures. The lack of ThT fluorescence variation during the lag phase of the aggregation sigmoid reported in Fig. 1A together with the electron micrographs taken at 2.5 and 6 h (Fig. 3A–D) prove the absence of amyloid fibrils during that period. Moreover, the infrared spectra at pD 8.0 (Fig. 1B) proves the absence of fibrillar material in the peptide stock solutions, which have been prepared at alkaline pH. The round structures detected in the electron micrographs can be interpreted as corresponding to HMW oligomers [17]. Such oligomers would already be rich in aggregated  $\beta$ -structures, as revealed by the infrared bands around 1626  $\text{cm}^{-1}$  in Fig. 1B. As a matter of fact, most of the total amount of aggregated  $\beta$ -structure formed during the aggregation process is formed before the end of the lag phase, as illustrated in Fig. 2. According to the data reported, during the elongation phase, a transformation of non-fibrillar  $\beta$ -structures present in HMW oligomers and protofibrils into fibrillar  $\beta$ -structures would therefore take place. The latter would correspond to the structure of mature amyloid fibrils (Fig. 3E–H).

Oligomers containing  $\beta$ -structure have been previously proposed for Alzheimer's amyloid peptides [17] although in these works no distinction was made between non-fibrillar and fibrillar  $\beta$ -structures. Our results clearly show that such  $\beta$ -structures in the identified oligomers are non-fibrillar (low ThT fluorescence and absence of fibrils in the electron micrographs). The importance of establishing such a distinction between  $\beta$ -structures may be relevant in relation to the determination of the molecular mechanisms

underlying the cytotoxic action of amyloid peptides. Non-fibrillar  $\beta$ -structures could play a specific role in cytotoxicity.

The identification of the non-fibrillar oligomers and the oligomer clumps and protofibrils (oligomer strings) detected in the electron micrographs, together with the fact that the total amount of aggregated  $\beta$ -structures does not significantly change between the beginning and the end of the elongation phase, point toward a fibrillization mechanism based on the association of the oligomeric intermediates, in the way proposed by Bitan et al. [20] and Blackley et al. [21]. At this respect, it is worth noting that the width of the fibrils detected in Fig. 3E–H is very similar to the diameter of the globular oligomers detected in Fig. 3A–D.

Finally, we have summarized in Fig. 4 a comparison of our results with the comprehensive study on the characterization of kinetic intermediates in amyloid fibrillogenesis by Kirkitadze et al. [8]. The authors describe the formation

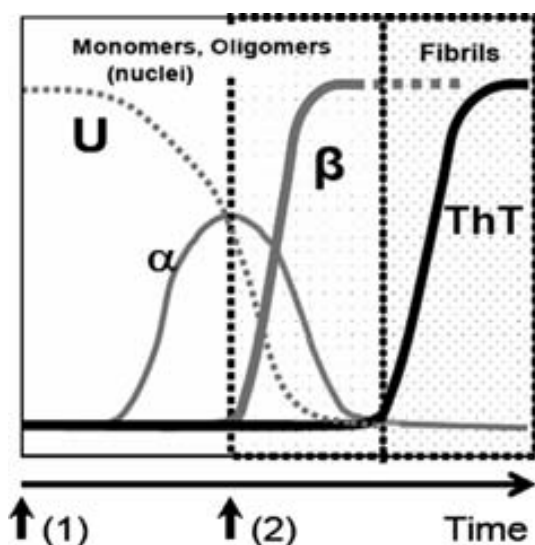


Fig. 4. Summary of the secondary structural changes during the process leading to the formation of amyloid fibrils, compared to the kinetics of the process measured using ThT. The figure combines the structural data reported by Kirkitadze et al. (U,  $\alpha$  and  $\beta$  variation detected using CD spectroscopy, see Fig. 1 in Ref. [8]) with the ThT and FTIR data reported in the present study (the dotted background bit in the figure). The arrow labeled (1) denotes the starting point in Kirkitadze's experiments, whereas the arrow labeled (2) denotes the starting point in our experiments. Since in Kirkitadze's work samples had been filtered and they work at a lower peptide concentration, monomers and low molecular weight oligomers must be the dominant species at the beginning of the experiment. Due to the different experimental conditions (no filtration of the initial peptide suspensions) in our case, we quickly get to the point where high molecular weight oligomers are formed, catching just the end of the unordered and helical structures disappearance, together with the beginning of the formation of  $\beta$ -structures. In our case, because the aliquots used for the structural and fluorescence experiments come from the same sample (same peptide concentration), it is possible to compare the formation of  $\beta$ -structures with the ThT curve (fibril formation). Such a comparison is not possible with Kirkitadze's data, and it is the key point to show that most of the total amount of  $\beta$ -structures that form during the aggregation process are already present by the end of the nucleation phase, that is, high molecular weight oligomers' structure is already  $\beta$  but non-fibrillar. During the elongation phase, such non-fibrillar  $\beta$ -structures (they do not bind ThT) transform into fibrillar  $\beta$ -structures (they bind ThT).

of a transient helical intermediate and identify the formation of  $\beta$ -structures as a process with a long lag phase (sigmoidally shaped). In their study however, it is not possible to establish an accurate comparison of such conformational changes with the aggregation kinetics. Such a comparison is possible in our case and reveals that non-fibrillar  $\beta$ -structures do form during the nucleation phase and transform into fibrils during the elongation phase. The identification of the  $\beta$ -structures in the oligomers as non-fibrillar is not possible either from Kirkitadze's circular dichroism data and, as far as we know, is presented for the first time in the present work. As the electron micrographs show (Fig. 3), under our experimental conditions, a rapid formation of globular, high molecular weight intermediates takes place. This would imply as well the acceleration of the formation of  $\beta$ -structures, explaining the absence of a lag phase (although a very clear lag phase is still observed when monitoring the ThT fluorescence) when we measure the formation of such  $\beta$ -structures along time (Fig. 2). It is very important to underline the fact that the peptide preparation procedure we have followed does not preclude in any event the sigmoidal kinetics, typical of a nucleation-dependent polymerization (such sigmoidality is very clear in Fig. 1). Our experimental conditions only shorten the duration of the lag phase by the rapid formation of HMW globular oligomers, as the electron micrographs prove. We do not detect at any stage the presence of spurious aggregates that could be due to the lack of filtration of the stock samples, prepared at alkaline pH.

In conclusion, we have shown that in the process by which A $\beta$ (1–40) forms amyloid aggregates, the formation of non-fibrillar aggregated  $\beta$ -structures takes place during the nucleation phase, a period of time in which large globular oligomers are detected. During the elongation phase non-fibrillar  $\beta$ -structures are transformed into amyloid fibrils, as a consequence of oligomer's assembly.

## References

- [1] D.J. Selkoe, The molecular pathology of Alzheimer's disease, *Neuron* 6 (1991) 487–498.
- [2] E. Bossy-Wetzler, R. Schwarzenbacher, S.A. Lipton, Molecular pathways to neurodegeneration, *Nat. Med.* 10 (Suppl) (2004) S2–S9.
- [3] D.J. Selkoe, Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy, *Physiol. Rev.* 81 (2001) 741–766.
- [4] O.S. Makin, E. Atkins, P. Sikorski, J. Johansson, L.C. Serpell, Molecular basis for amyloid fibril formation and stability, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102 (2005) 315–320.
- [5] J.D. Harper, P.T. Lansbury Jr., Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins, *Annu. Rev. Biochem.* 66 (1997) 385–407.
- [6] B. Caughey, P.T. Lansbury, Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders, *Annu. Rev. Neurosci.* 26 (2003) 267–298.
- [7] D.M. Walsh, D.M. Hartley, Y. Kusumoto, Y. Fezoui, M.M. Condron, A. Lomakin, G.B. Benedek, D.J. Selkoe, D.B. Teplow, Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Structure and biological activity of protofibrillar intermediates, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 25945–25952.

- [8] M.D. Kirkitadze, M.M. Condrón, D.B. Teplow, Identification and characterization of key kinetic intermediates in amyloid beta-protein fibrillogenesis, *J. Mol. Biol.* 312 (2001) 1103–1119.
- [9] K.N. Dahlgren, A.M. Manelli, W.B. Stine Jr., L.K. Baker, G.A. Krafft, M.J. LaDu, Oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptides differentially affect neuronal viability, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 32046–32053.
- [10] B.A. Chromy, R.J. Nowak, M.P. Lambert, K.L. Viola, L. Chang, P.T. Velasco, B.W. Jones, S.J. Fernandez, P.N. Lacor, P. Horowitz, C.E. Finch, G.A. Krafft, W.L. Klein, Self-assembly of Abeta(1–42) into globular neurotoxins, *Biochemistry* 42 (2003) 12749–12760.
- [11] T.H. Huang, D.S. Yang, N.P. Plaskos, S. Go, C.M. Yip, P.E. Fraser, A. Chakrabartty, Structural studies of soluble oligomers of the Alzheimer beta-amyloid peptide, *J. Mol. Biol.* 297 (2000) 73–87.
- [12] S.J. Wood, B. Maleeff, T. Hart, R. Wetzel, Physical, morphological and functional differences between pH 5.8 and 7.4 aggregates of the Alzheimer's amyloid peptide Abeta, *J. Mol. Biol.* 256 (1996) 870–877.
- [13] P. Hortschansky, V. Schroeckh, T. Christopeit, G. Zandomenighi, M. Fandrich, The aggregation kinetics of Alzheimer's beta-amyloid peptide is controlled by stochastic nucleation, *Protein Sci.* 14 (2005) 1753–1759.
- [14] L. Otvos Jr., G.I. Szendrei, V.M. Lee, H.H. Mantsch, Human and rodent Alzheimer beta-amyloid peptides acquire distinct conformations in membrane-mimicking solvents, *Eur. J. Biochem.* 211 (1993) 249–257.
- [15] P.E. Fraser, J.T. Nguyen, W.K. Surewicz, D.A. Kirschner, pH-dependent structural transitions of Alzheimer amyloid peptides, *Biophys. J.* 60 (1991) 1190–1201.
- [16] V. Buzon, E. Padros, J. Cladera, Interaction of fusion peptides from HIV gp41 with membranes: a time-resolved membrane binding, lipid mixing, and structural study, *Biochemistry* 44 (2005) 13354–13364.
- [17] I.A. Mastrangelo, M. Ahmed, T. Sato, W. Liu, C. Wang, P. Hough, S.O. Smith, High-resolution atomic force microscopy of soluble Abeta42 oligomers, *J. Mol. Biol.* 358 (2006) 106–119.
- [18] C.S. Goldsbury, S. Wirtz, S.A. Muller, S. Sunderji, P. Wicki, U. Aebi, P. Frey, Studies on the in vitro assembly of a beta 1–40: implications for the search for a beta fibril formation inhibitors, *J. Struct. Biol.* 130 (2000) 217–231.
- [19] H.A. Lashuel, D.M. Hartley, B.M. Petre, J.S. Wall, M.N. Simon, T. Walz, P.T. Lansbury Jr., Mixtures of wild-type and a pathogenic (E22G) form of Abeta40 in vitro accumulate protofibrils, including amyloid pores, *J. Mol. Biol.* 332 (2003) 795–808.
- [20] G. Bitan, M.D. Kirkitadze, A. Lomakin, S.S. Vollers, G.B. Benedek, D.B. Teplow, Amyloid beta -protein (Abeta) assembly: Abeta 40 and Abeta 42 oligomerize through distinct pathways, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (2003) 330–335.
- [21] H.K. Blackley, G.H. Sanders, M.C. Davies, C.J. Roberts, S.J. Tendler, M.J. Wilkinson, In-situ atomic force microscopy study of beta-amyloid fibrillization, *J. Mol. Biol.* 298 (2000) 833–840.

Els treballs presentats en aquesta tesi han estat finançats pel ministeri de Ciència i Innovació (ref. EET2002-05139 i BFU2007-64142).

Núria Benseny Cases ha gaudit d'una beca de Personal Investigador en Formació de la Universitat Autònoma de Barcelona.





És difícil començar uns agraïments, la llista es preveu llarga, i les paraules no són prou per agrair l'ajuda, el suport i la companyia dels que m'heu fet costat durant aquesta etapa, la de fer una tesi.

Primer de tot, agrair al Pep el suport, els ànims, els consells i les mil i una explicacions sobre proteïnes, pèptids, sondes, espectroscòpies i membranes ben barrejades amb d'altres de caire menys científic.

També al Manel, això no hagués estat el mateix sense les visites al sincrotró! Hagués estat impossible conèixer el món que s'amaga dins d'aquests anells i les delicioses fondues de la perifèria!

A l'Elodia, que m'ha facilitat la vida al laboratori i en les pràctiques inimaginablement. A més, hem compartit ciutats i viatges, gairebé sempre, en espai-temps diferents, però hem coincidit en molt bones converses al laboratori.

A la Mercè, especialment a la Mercè, perquè si no hagués estat per aquella trobada, una tarda de juliol, en una placeta de Cerdanyola, potser mai hagués aterrat a Biofísica. Doncs, a més de la coincidència, he d'agrair-li tantes comandes, bons dies i somriures. I a la resta de secretaris/es que han anat passant per aquí, la Silvia, el Mateu, l'Alba..... Gràcies per resoldre els dubtes i comandes, i per la simpatia que ho fa tot més fàcil.

I com no, als companys de grup, començant pel Víctor i la Marta, qui només arribar em van ensenyar els secrets del laboratori. A la Mercè, postdoc del grup durant uns anys memorables, i persona positiva on n'hi hagi. Espero haver enganxat una miqueta d'aquesta actitud realment envejable. I a l'Oksana, per ser tant generosa i deixar-me fotografies i xocolata.

Continuant amb la Txell i la Rosana, les companyes de viatge indiscutibles. I quan dic de viatge ho dic en tots els sentits de la paraula, hem viatjat juntes pel creuer, no sempre plàcid, de fer una tesi....i per algun país europeu. I és que sense vosaltres hagués estat una altra cosa! Gràcies Rosana pels consells savis, per saber-hi ser quan calia i, per totes les rialles que ens has arrencat durant aquests anys. I a la Txell, per fer-me adonar quan em complicava la vida soleta i les mil ajudes pràctiques amb ordinadors, electroforesis i per no allargar-me, resumirem: amb qualsevol aparell elèctric que podia tenir a prop.

I al Víctor, amb qui hem compartit moltes hores de dinar i converses curioses. I al Ramon, agrair-li els consells científics i de perruqueria sempre amb una broma preparada. I a l'Tzvetana, sempre tant amable i atenta.

I com no a la Meritxell Costa i la Silvia Gil, amb qui hem compartit cis-Pt i bones estones. A la Cilaine, per les cançons de viatge a Grenoble i les historietes d'arreu del món.

I als veïns de davant: l'Arash, l'Oliver i el Ybin, qui, tot i treballar moltíssim, sempre troben un moment per un "good morning! How are you" i tot el que comporta...

I als veïns del costat, els "Cateninos", grup que ha anat canviant però sempre han mantingut una gran capacitat de treball en grup i una gran alegria. I no seria just, no agrair-los, especialment a la Neus, totes les vegades que m'han donat un cop de mà.... quants experiments frustrats hi hauria de més en aquesta tesi sense vosaltres? I del grup de Cell cicle i del grup dels Rodopsinos, que tot i no haver compartit el laboratori en espai l'hem compartit amb algun que altre dinar i sopar, i fins i tot, alguna cerveseta a la Vila, de tots és fàcil recordar-ne bons moments

I els companys que ja han marxat, com el Xavi, amb la seva manera tan realista però amb tant sentit de l'humor de veure la vida. I a l'Àlex, sobretot, agrair-li l'acollida a Estocolm, van ser unes setmanes boníssimes d' EPR i passejades!

I com no, a tots els professors de la Unitat, especialment en aquesta última etapa com a *professoreta*. Ha estat una sort tenir una colla de bons professors tant a prop i tant disposats a ajudar-me. Gràcies Esteve, David, Toni, Joan i Mireia.

A l'Astrid Graslünd per permetre'm treballar al seu laboratori a la Universitat d'Estocolm.

Al Marek Maly i al Jan Maly de la Universitat de Purkinge per facilitar l'adquisició de les imatges d'AFM.

I a la colla! Quan ha estat necessari desconnectar, sempre a punt per un soparet divendres, una cerveseta el dissabte i un cafetonet diumenge. Moltes gràcies pel vostre suport, m'heu ajudat molt a desemboirar-me més d'un dia gris.

I tot i que van al final, als qui tinc més coses a agrair, és impossible dir-les totes, i fins i tot, impossible fer-ne un resum. Però aproximant.... Moltes gràcies a la meva família! Als padrins, per ser una referència tant bona, als meus pares, perquè són un gran exemple i a qui ara, donar-los-hi un gràcies per tot inclou un món sencer i, als meus germans per tenir tantes qualitats "dignes d'admirar".

**Moltíssimes gràcies!**



