



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

ENSAMBLAJE E INTERACCIÓN CON
METALES DEL PEPTIDO ABI-40:
ESTUDIOS POR FLUORESCENCIA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS

P R E S E N T A

WILLIAM GARZON RODRIGUEZ

ASESOR: DR. ANATOLY K. YATSIMIRSKY



MEXICO. D. F.

2000

275108



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado segun el tema:

Presidente:	Dr. Jacobo Gómez Lara	(Inst. de Química)
Primer Vocal:	Dra. Noráh Barba Behrens	(Fac. de Química)
Segundo Vocal:	Dra. Goar Gevorkian	(Inst. De Biomédicas)
Tercer vocal:	Dr. Luis Padilla Noriega	(Inst. De Biomédicas)
Secerretario:	Dr. Gullermo Mendoza Diaz	(U. de Guanajuato)
Primer Suplente:	Dra. Silvia Castillo Blum	(Fac. de Química)
Segundo suplente:	Dra. Laura Gasque Silva	(Fac. de Química)

Candidato al grado:

M. en C. William Garzón Rodríguez

Asesor:

Dr. Anatoly K. Yatsimirsky

Agradecimientos

Este trabajo de investigación fue posible gracias al apoyo incondicional del Dr. Anatoly K. Yatsimirsky. Su amor y dedicación a la ciencia siempre serán para mí un motivo de superación. A todos mis profesores y compañeros por haberme permitido realizar este trabajo en la Facultad de Química en colaboración con el grupo del Dr. Charles Glabe de la Universidad de California en Irvine.

Al Dr. Charles Glabe por la confianza depositada en mí, por su apoyo e interés mostrado en que terminara mis estudios de doctorado.

A mis Padres, Hermanos y a Marisa con todo mi amor.....

A Colombia!

“País verde y herido
Comarquita de veras
Patria pobre

País ya te armarás
Pedazo por pedazo
Pueblo mi pueblo.”

Mario Benedetti

RESUMEN

En esta tesis se presenta un estudio en el cual se utilizó la fluorescencia intrínseca del péptido A β 1-40, la transferencia de energía y la cromatografía de filtración en gel para conocer parte del proceso de la polimerización de A β . Se modificó al péptido amiloide A β 1-40 con dos sondas fluorescentes que presentan transferencia de energía entre sí, para ser utilizadas como pares donador-aceptor. Estos derivados fluorescentes mostraron propiedades de agregación comparables al péptido nativo. También se modificó otro péptido que contiene una sustitución de triptofano en la posición 10, y que se utilizó como aceptor para la fluorescencia intrínseca de la tirosina del péptido nativo.

Se llevaron a cabo estudios al equilibrio de la desnaturalización de A β 1-40 aumentando la concentración de DMSO, este estudio se monitoreó mediante fluorescencia y se obtuvo un punto medio entre 40 y 50 por ciento de DMSO para la transición del desplegamiento tanto del péptido nativo como de sus derivados fluorescentes. En todos los pares de los derivados fluorescentes se observó la transferencia de energía, lo que indicó la existencia de dímeros donador-aceptor en disolución acuosa en concentraciones fisiológicas, y esto se confirmó por cromatografía de filtración en gel.

También se utilizó la fluorescencia intrínseca del péptido dimérico A β 1-40 y de una mutante con triptofano en la posición 4 (A β F4W) como una manera más directa de estudiar la interacción con metales en disolución acuosa. Las gráficas de Job revelaron la formación de complejos 1:1 y 1:2 péptido-metal. Se determinaron las respectivas constantes de disociación a partir de los resultados obtenidos en los experimentos de titulación. Para los péptidos en el estado dimérico A β 1-40 y A β F4W la afinidad de los metales

por el péptido está en el orden de $Fe < Cu > Zn$, de acuerdo con la serie de Irving-Williams de estabilidad del complejo. Sin embargo para el péptido agregado A β 1-42 la afinidad con el Fe aumenta dramáticamente: la constante de disociación cambia 100 veces hasta alcanzar una K_d de 0.2 μ M. Los experimentos de titulación fluorométrica en presencia de ácido ascórbico, permitieron excluir la posible contribución de hierro oxidado (Fe^{3+}). En el caso del cinc, la constante de disociación para el péptido agregado A β 1-42 es más pequeña en comparación con el péptido dimérico A β 1-40, pero aún es un orden de magnitud más grande que la informada en los análisis con membranas. Esto está en común acuerdo cualitativo con la necesidad de altas concentraciones de cinc para inducir la precipitación del péptido amiloide. Las constantes de disociación del péptido amiloide en diferentes estados con el Cu^{2+} , obtenidas en el presente trabajo concuerdan con las reportadas previamente mediante otras técnicas; no se observó ninguna diferencia en la afinidad entre los estados diméricos y agregado del péptido amiloide con este metal.

En la tercera parte de la tesis se realizaron estudios de apagamiento de la fluorescencia para investigar la accesibilidad al disolvente del péptido amiloide en el estado dimérico y agregado, empleando apagadores aniónicos como el yoduro, catiónicos como el cesio y neutro como la acrilamida. Se sintetizaron péptidos amiloides con solo un residuo de triptofano en la cadena polipeptídica. En la región amino terminal se sustituyeron los aminoácidos aromáticos fenilalanina y tirosina en las posiciones 4 y 10, respectivamente. Mientras que en la región carboxilo los residuos 34 y 40 se reemplazaron por triptofano. Estudios por cromatografía de filtración en gel revelaron que estas mutantes tienen el mismo volumen de elución que el péptido nativo A β 1-40.

Así mismo mediante los análisis de sedimentación se comprobó que su comportamiento fue similar al péptido nativo.

Las constantes bimoleculares (k_q) para el apagamiento de la fluorescencia para los péptidos diméricos A β F4W, A β Y10W y ABL34W fueron $3.51 \text{ M}^{-1} \text{ ns}^{-1}$, $3.3 \text{ M}^{-1} \text{ ns}^{-1}$ y $2.36 \text{ M}^{-1} \text{ ns}^{-1}$ respectivamente, valores típicos para triptofanos altamente expuestos al disolvente. Estos resultados sugieren que los triptofanos en las posiciones 4, 10 y 34 se encuentran altamente expuestos. Mientras que para el péptido A β V40W la baja constante bimolecular del apagamiento ($0.62 \text{ M}^{-1} \text{ ns}^{-1}$) es representativa para triptofanos moderadamente expuestos.

En contraste, para los péptidos en el estado fibrilar se observó un grado bajo de exposición de los triptofanos en la región del amino terminal, en comparación con el estado dimérico. Sin embargo, los péptidos A β L34W y A β V40W presentaron unas constantes bimoleculares de apagamiento de 3.07 y $3.28 \text{ M}^{-1} \text{ ns}^{-1}$, respectivamente, sugiriendo que estos residuos se encuentran más expuestos en el estado fibrilar. Estos datos nos sugieren que en la transición de dímero a fibril ocurre un cambio conformacional en la terminal carboxilo que provoca una mayor exposición de los residuos 34 y 40 al disolvente.

ABSTRACT

The intrinsic fluorescence of wild type A β 1-40, fluorescence energy transfer and gel filtration chromatography were used to examine the process of aggregation of A β . The amyloid peptide was modified with two extrinsic fluorescence probes, which present energy transfer to be used as donor-acceptor pairs. These fluorescent derivatives exhibited aggregation properties comparable to wild type A β . Another peptide was modified containing a tryptophan substitution at position 10 to be used as an acceptor for the intrinsic tyrosine fluorescence of wild type A β 1-40.

Equilibrium studies of the denaturation of A β 1-40 using increasing concentrations of DMSO, were conducted by monitoring fluorescence with a mid-point value for the unfolding transition of both the substituted and wild type peptides at around 40 and 50% of DMSO. In all donor-acceptor pairs studied energy transfer was observed, which indicated the existence of dimers in aqueous solution at physiological concentrations. This was also confirmed by gel filtration chromatography.

Metal-induced changes in the fluorescence of the single tyrosine of A β 1-40 and A β 1-42 as well as a Trp substitution of A β 1-40 were used to monitor the metal binding ability in solution. Job plots and fitting of titration curves revealed the formation of 1:1 and 1:2 peptide-metal complexes. Respective dissociation constants were determined from these fluorescence titration experiments. For dimeric peptides A β 1-40 and A β F4W the order of metal to peptide affinities is Fe < Cu > Zn in agreement with the Irving-Williams series of complex stability. However, with aggregated A β 1-42 the peptide affinity to Fe increased dramatically: K_D changed from ca. 100 to ca

0.2 μM . The possible contribution of the oxidized Fe^{3+} form was excluded by performing titration experiments in the presence of ascorbic acid.

In case of Zn, the K_d for aggregated A β 1–42 is also smaller than for non-aggregated A β 1–40, but still is one order of magnitude larger than that reported using membrane assays. This is in qualitative agreement with the necessity for the rather high Zn concentration needed to induce precipitation. Dissociation constants of various peptide forms with Cu found in the present study are in good agreement with those reported previously; no difference in affinity between dimeric and aggregated forms of the peptide is observed for this metal.

Fluorescence quenching studies were performed to investigate the solvent accessibility on the surface of both the soluble amyloid dimer A β 1-40 and the fibril assembly. The exposure of the single tryptophan moiety in different conditions for each of the mutant A β 1-40 peptides was measured using neutral, anionic and cationic quenchers. Mutants of A β 1-40 were synthesized in which phenylalanine 4 and tyrosine 10 from the amino region and residues 34 and 40 from the C-terminal, were replaced with a single tryptophan residue each. The Trp mutants A β F4W, A β Y10W, A β L34W and A β V40W have the same dimeric elution volumes by gel-filtration as the wild type A β 1-40 and by sedimentation assay they behave similar to the wild type.

The bimolecular quenching constants for the dimeric A β F4W, A β Y10W and A β L34W were $3.51 \text{ M}^{-1} \text{ ns}^{-1}$, $3.3 \text{ M}^{-1} \text{ ns}^{-1}$ and $2.36 \text{ M}^{-1} \text{ ns}^{-1}$, respectively, typically seen for exposed Trp residues. These results suggest that the tryptophan residues at positions 4, 10 and 34 are highly exposed. However A β V40W has a the bimolecular quenching constant of $0.62 \text{ M}^{-1} \text{ ns}^{-1}$ typically seen with moderately exposed tryptophan residues.

In contrast, for fibrillar A β 1-40 tryptophan mutants in the amino terminal region, a low exposure to acrylamide quenching was observed compared with the dimeric peptides. While A β L34W and A β V40W appear to have a significant higher acrylamide quenching in the fibril, the bimolecular quenching constants (k_q) were 3.07 and 3.28 M⁻¹ ns⁻¹, indicating that these residues are highly exposed in the fibril assembly. This, in turn suggests that a conformational change occurs in this region during the transition from dimer to fibril.

Los principales resultados de esta tesis, algunos ya han sido publicados, otros se han enviado y otros más están en proceso de publicación:

1. Garzón-Rodríguez, W., Sepúlveda-Becerra M.A. and Glabe C.
Soluble amyloid A β exists as a stable dimer at low concentrations. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, Vol. 272 No. 34, 21037-21044.
2. Garzón-Rodríguez, W., Iatsimirky A.K. and Glabe C.
Binding of Zn (II), Cu(II) and Fe(II) Ions to Alzheimer's peptide studied by fluorescence. *Bioorganic & Medicinal Chemistry letters*, 1999, 9, 2243-2248.
3. Garzón-Rodríguez, W., Vega A., Sepúlveda-Becerra M.A. Iatsimirky A.K. and Glabe C. Alzheimer's A β 1-40 fibril assembly studies by fluorescence quenching analyzed by tryptophan substituted analogs and solute quenching. *Journal of Biological Chemistry*, 1999. (enviado).
4. Garzón-Rodríguez, W., Sepúlveda-Becerra M.A. Iatsimirky A.K. and Glabe C. A β Heterodimer assembly slows amyloid aggregation. *Journal of Biological Chemistry*, 1999. (en preparación).

Y presentados en los siguientes congresos:

1. Garzón-Rodríguez, W., Sepúlveda-Becerra M.A., Milton S. and Glabe C
Soluble A β forms Stable Dimers at Low Concentrations. Abstract to. *The Society for Neuroscience 26th Annual Meeting*, October/1996. Vol. 22. No. 191.2. Washington, D.C.

2. Garzón-Rodríguez, W., Vega, A., Sepúlveda-Becerra M.A., Iatsimirstki K.A. and Glabe C. Fluorescence quenching studies of A β 1-40 fibril assembly using single tryptophan mutants. Abstract to *The society for Neuroscience*, 27 Annual Meeting, October 1997, Vol 23, No. 209.2, New Orleans, LA.
3. Garzón-Rodríguez, W., Iatsimirky A.K. and Glabe C
Estructura dimérica del péptido amiloide A β -40: Estudios por fluorescencia XVII Simposio de Posgrado, programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas, UNAM Cuernavaca-Morelos, México. Diciembre 1997
4. Garzón-Rodríguez, W., Iatsimirky A.K. and Glabe C.
Metals induced changes in the fluorescence properties of intrinsic tyrosine and tryptophan mutants of Alzheimer's A β peptide. Abstract to *The society for Neuroscience*, 28 Annual Meeting, Nov /1998, Vol. 24, Los Angeles, CA.
5. Garzón-Rodríguez, W., Sepulveda-Becerra M.A. Iatsimirstki K and Glabe C. A β Heterodimer assembly slows amyloid aggregation. Abstract to *The Protein society twelfth symposium*, 7/1998, . Vol. 7, Suppl. 1. No. 560-M, San Diego, CA.
6. Garzón-Rodríguez, W., Iatsimirky A.K. and Glabe C.
Ensamblaje e interacción con metales del péptido amiloide: Estudios por fluorescencia (presentación oral). XVIII Simposio de Posgrado, programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas, UNAM Cuernavaca-Morelos, México. Enero 1999.
7. Garzón-Rodríguez, W., Iatsimirky A.K. and Glabe C.
Oxidative crosslinking of the Alzheimer's amyloid peptide A β 1-40 by dityrosine formation. Abstract to *The society for Neuroscience*, 29 Annual Meeting, Nov /1999, Vol. 25, Miami, Fl.

Como resultado de este proyecto en colaboración con otros grupos de investigación se publicaron los siguientes trabajos:

Choo-Smith, L., Garzón-Rodríguez W, Glabe, C and Surewicz K.

Acceleration of amyloid fibril formation by specific binding of AB-(1-40) peptide to ganglioside containing membrane vesicle. *Journal of Biological Chemistry*, 1997 Vol 272, No 37, 22987-22999.

Webster, D.S., Yang, A., Margol, L., Garzón-Rodríguez, W., Glabe, C., Tenner, A. J. Complement component C1q modulates the phagocytosis of A β by microglia. *Experimental Neurology*, 1999, 12, 1-13.

Indice

1. Introducción	1
2. Antecedentes	4
2.1 Biología molecular de la enfermedad de Alzheimer	4
2.1.1 Conformación del ensamblaje fibril-amiloide	8
2.2 Efecto de los metales en la agregación de A β	9
2.2.1 Iones Zn ²⁺ , Cu ²⁺ y Fe ²⁺ en sistemas biológicos	10
2.2.1.1 Sitios de unión de cinc en proteínas	12
2.2.1.2 Sitios de unión de cobre en proteínas	14
2.2.1.3 Sitios de unión de hierro en proteínas	15
2.3 Fluorescencia de proteínas	16
2.3.1 Transferencia de energía	17
2.3.2 Apagamiento de la fluorescencia	22
2.3.2.1 Teoría del apagamiento colisional	22
2.3.2.2 Apagadores de la fluorescencia	25
2.3.2.3 Efecto de las cargas en el apagamiento de la fluorescencia	27
2.3.2.4 Efecto de los metales en la fluorescencia intrínseca de las proteínas	28
3. Objetivos	32
3.1 Objetivos generales	32
3.2 Objetivos específicos	33
4. Metodología	35

4.1	Reactivos	
4.1.1	Características de 1,5-IAEDANS y fluoresceína maleimida	35
4.1.2	Diseño y síntesis de los péptidos A β y sus derivados fluorescentes	37
4.2	Cálculos y ajustes	38
4.3	Mediciones de Fluorescencia	39
4.3.1	Medición y cálculo de las vidas medias de fluorescencia	39
4.4	Condiciones de marcaje de los péptidos análogos A β con sondas fluorescentes	41
4.5	Cromatografía de filtración en gel	42
4.6	Mediciones de absorbancia	43
4.6.1	Estimación de la concentración de proteína	43
4.7	Mediciones de agregación	44
4.7.1	Método de sedimentación	44
4.7.2	Determinación del agregado fibrilar por el método fluorescente de Tioflavina T	45
4.7.3	Microscopía electrónica	45
4.8	Desnaturalización de A β en dimetil-sulfóxido y su reasociación	45
4.9	Mediciones para el cálculo de la transferencia de energía	46
4.10	Mediciones para los experimentos de apagamiento de la fluorescencia	48
5.	Resultados	49

5.1 Transferencia de energía para investigar la estructura y el ensamblaje del péptido amiloide	49
5.1.1 Diseño de los péptidos amiloide	49
5.1.2 Propiedades de agregación de los péptidos A β fluorescentes	50
5.1.3 Desnaturalización de A β en dimetil-sulfóxido y su reasociación	54
5.1.4 Asociación de los péptidos fluorescentes: transferencia de energía	57
5.1.5 Discusión sobre los estudios de estructura y ensamblaje del péptido amiloide	63
5.2 Interacción del péptido amiloide con metales	67
5.2.1 Determinación de las constantes de disociación del péptido amiloide A β y A β F4W con metales por espectroscopía de fluorescencia	67
5.2.2 Complejación del péptido A β con Zn ²⁺ y Cu ²⁺	73
5.2.3 Complejación del péptido A β con Fe ²⁺	77
5.2.4 Discusión de la interacción del péptido amiloide con metales	81
5.3 Estudios de apagamiento de la fluorescencia del péptido amiloide: En el estado dimérico y fibrilar	85
5.3.1 Diseño de los péptidos amiloide con triptofanos	85
5.3.2 Propiedades de agregación de los péptidos A β con triptofanos	85

5.3.3 Determinación del agregado fibrilar por el método fluorescente y la microscopía electrónica	90
5.3.4 Estudios de apagamiento de la fluorescencia de los mutantes con triptofano	92
5.3.5 Discusión de los estudios de apagamiento de la fluorescencia del péptido amiloide: en el estado dimérico y fibrilar	100
6. Conclusiones	104
6.1 Transferencia de energía para investigar la estructura y el ensamblaje del péptido amiloide	104
6.2 Interacción con metales del péptido amiloide: estudios por fluorescencia	105
6.3 Apagamiento de la fluorescencia en el estado dimérico y fibrilar del péptido amiloide	106
7. Perspectivas para trabajos futuros	107
8. Apéndices	109
8.1 Apéndice No.1. Ecuación para calcular la constante de asociación metal-ligante por fluorescencia	109
8.2 Apéndice No. 2. Ecuación para calcular la constante de asociación metal-ligante por fluorescencia considerando que las concentraciones totales de metal y ligantes son equivalentes	112

8.3 Apéndice No. 3. Ecuación para calcular la constante de asociación metal-ligante por fluorescencia considerando una estequiometría metal-ligante 1:2	116
9. Bibliografía	118

ABREVIATURAS

EA	Enfermedad de Alzheimer
PS	Placas seniles
CVA	Depósitos cerebrovasculares de amiloides
APP	Proteína precursora de amiloide
A β	Péptido amiloide
A β 1-40	Péptido amiloide de 40 aminoácidos
A β 1-42	Péptido amiloide de 42 aminoácidos
1,5-1,5-IAEDANS	5-(((2-iodoacetil)amino)etil)amino)naftaleno-1-ácido sulfónico
FM	Fluoresceína maleimida
A β C4FM	Mutante del péptido amiloide de 40 aminoácidos, con una cisteína en la posición 4 y modificada con el marcador fluorescente FM
A β C7FM	Mutante del péptido amiloide de 40 aminoácidos, con una cisteína en la posición 7 y modificada con el marcador fluorescente FM
A β C25AEDANS	Mutante del péptido amiloide de 40 aminoácidos, con una cisteína en la posición 25 y modificada con el marcador fluorescente 1,5-IAEDANS
A β C34 AEDANS	Mutante del péptido amiloide de 40 aminoácidos, con una cisteína en la posición 34 y modificada con el marcador fluorescente 1,5-IAEDANS
A β F4W, A β Y10W, A β L34W, A β V40W	Mutantes del péptido amiloide de 40 aminoácidos, con un triptofano en las posiciones 4, 10, 34 ó 40
DMSO	Dimetil sulfóxido
DMF	Dimetil formamida
THT	Tioflavina T
FRET	Eficiencia de la transferencia de energía
SDS	Dodecil sulfato de sodio
[³ H]A β -(1-40)	Péptido amiloide de 40 aminoácidos con tritio radioactivo en la posición 3 de la secuencia
[¹⁴ C]A β -(1-40)	Péptido amiloide de 40 aminoácidos con carbono 14 radioactivo en la posición 4 de la secuencia
NATA	N-acetilo triptofanoamida
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
Phe	Fenilalanina

Ile	Isoluecina
Gly	Glicina
Leu	Leucina
Val	Valina
Ala	Alanina
His	Histidina
Asp	Ácido aspártico
Glu	Ácido glutámico
Met	Metionina
Cys	Cisteína

1. Introducción

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la demencia más común y la causa más temida de la pérdida de la memoria, es un padecimiento neurodegenerativo llamado así en memoria del Dr. Alois Alzheimer, un psiquiatra alemán quien inicialmente describió algunos de los síntomas de la enfermedad. Actualmente 25 millones de personas en el mundo sufren de este padecimiento, incluyendo 4 millones de norteamericanos y representa la cuarta causa de muerte en los Estados Unidos. Las personas con la EA tienen dificultades en el lenguaje, en las capacidades espacio visuales, la personalidad y la manipulación de información o cifras. Esta pérdida de la memoria en las personas mayores de edad puede ser resultado de un deterioro de la memoria asociado con la edad, el cual progresa con el paso de los años y eventualmente conlleva a complicaciones que causan la demencia o la muerte.

Hasta el momento no existe ninguna manera de detener la progresión de la EA, los costos para los cuidados de los pacientes de EA en los Estados Unidos sobrepasan los 136,000 millones de dólares anualmente. En caso de no encontrarse ninguna manera de detener la progresión de esta enfermedad, se estima que para el año 2040 el número de pacientes con EA se va quintuplicar. México es un país donde predomina la gente joven; sin embargo ha aumentado la esperanza de vida y por consiguiente el porcentaje de personas mayores. Según el censo general de población realizado en 1990, el 10.92 por ciento correspondió a las personas de 45 a 64 años, y el 4.15 a los de 65 años en adelante, proporciones que se han incrementado con el paso de los años y con ello, el número de posibilidades de que se presente la enfermedad de Alzheimer [Shoulson, 1998].

Aunque en los últimos 10 años ya se han elucidado algunas de las causas genéticas de esta enfermedad neurodegenerativa, aún queda mucho por entender

acerca del mecanismo molecular de la enfermedad. Estas cifras demuestran la necesidad de encontrar terapias efectivas para la EA.

Una de las características de la EA es la acumulación de depósitos extracelulares del llamado “péptido amiloide” en ciertas regiones del cerebro. Análisis bioquímicos del péptido amiloide han demostrado que esta acumulación en forma de agregados fibrilares es sensible a la concentración de proteína, pH e interacción con metales. No obstante, aún se desconocen muchos aspectos del mecanismo del ensamblaje fibrilar del péptido amiloide.

La concentración del péptido amiloide (A β) en el fluido cerebroespinal está en el intervalo nanomolar, por lo que cualquier intento para estudiar el modelo de la EA *in vitro* tiene que tomar en consideración la relativamente baja concentración de A β en el cerebro. Se ha estudiado la agregación de A β *in vitro* a través de técnicas como difracción de rayos X, dicroísmo circular, dispersión de luz y resonancia magnética nuclear (RMN), sin embargo, estas técnicas requieren concentraciones mayores que la concentración fisiológica. Además, existen limitaciones debido a que el péptido A β tiende a agregarse. La utilización de la espectroscopía de fluorescencia pudiera ser una herramienta para elucidar el ensamblaje molecular del péptido y su interacción con metales, esto sería útil para la elaboración y el desarrollo efectivo de inhibidores de la formación fibrilar amiloide *in vivo*.

En esta tesis se utilizó la espectroscopía de fluorescencia para investigar el estado oligomérico del péptido amiloide en disolución acuosa, así como su interacción con varios metales que inducen su deposición.

En el futuro, el desarrollo de fármacos tiene que estar inclinado hacia compuestos que inhiban la formación de amiloides en el cerebro o, a aliviar la actividad neurotóxica de los fragmentos anormales de la proteína precursora (APP)

de amiloide o, interferir con la secuencia de eventos relacionados a la deposición de amiloides. En este caso se podría aplicar una aproximación terapéutica en etapas tempranas de la enfermedad, antes de un daño significativo al sistema neuronal, entonces esto sería una buena razón que podría parar o disminuir la progresión de la enfermedad. Esta aproximación implica el inhibir la formación de agregados de alto peso molecular mediante la administración de fármacos y así detener la progresión de la enfermedad.

2. Antecedentes

2.1 Biología Molecular de la enfermedad de Alzheimer

La EA esta caracterizada por una serie de anormalidades estructurales en el cerebro:

- a) Las neuronas en múltiples regiones del sistema nervioso central pierden la función y mueren conduciendo a una alteración en las señales sinápticas.
- b) La acumulación de depósitos extracelulares de amiloides que incluyen las placas seniles (PS) y depósitos cerebrovasculares de amiloides (CVA) (Fig. 1).

En 1984 se aisló el mayor componente proteínico de los depósitos CVA, se determinó su secuencia de aminoácidos y se le denominó proteína- β . El subsecuente análisis y purificación del componente predominante de la proteína de las PS reveló que se trataba de la misma proteína de 4-4.5 Kda encontrada en los depósitos CVA y es un péptido de 42 aminoácidos conocido como péptido A β , A β 1-42 o péptido A4 [Estus *et al.*, 1992]. Análisis bioquímicos del cerebro de pacientes de EA indican que el péptido A β 1-42 es el principal componente asociado con las PS [Kang *et. al.*, 1987; Iwatsubo *et al.*, 1994; Roher *et al.*, 1993]. En tanto que, en los depósitos CVA se detectó con mayor abundancia un péptido de 40 aminoácidos, llamado A β 1-40 [Selkoe, 1994].

La acumulación del péptido A β , aparentemente es el resultado de un proceso proteolítico anormal de la proteína transmembranal APP (proteína precursora de amiloide) ya que el proceso normal de corte está entre los residuos 16 y 17 [Selkoe y Haass 1994; Schellenberg, 1995]. Se ha encontrado que en las personas predispuestas a la EA, el gene que codifica a la APP contiene dos mutaciones; en la figura 2 las flechas indican los sitios mutados donde ocurre el proceso proteolítico anormal. La región carboxilo del péptido A β se deriva del dominio hidrofóbico transmembranal de la APP, correspondiente a los aminoácidos 28-43; mientras que

la región correspondiente a los aminoácidos 1-28 se origina de la parte extracelular de la proteína APP (Fig. 2).

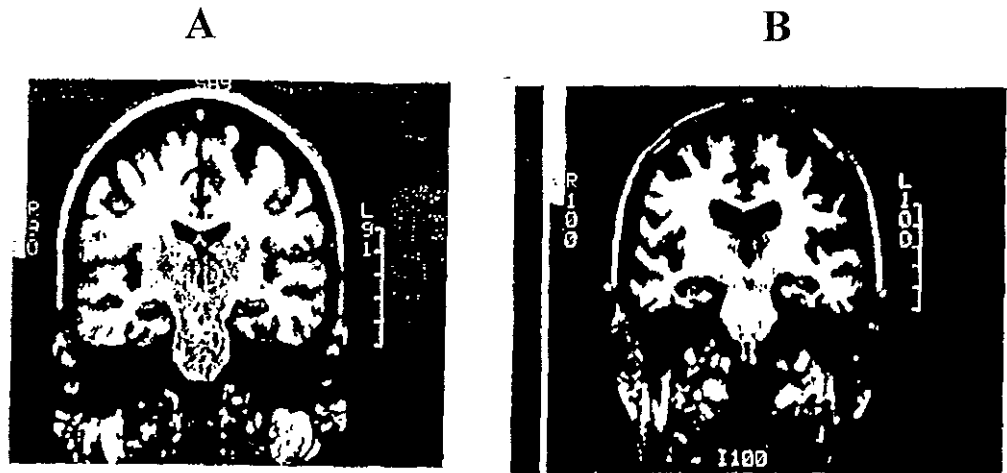


Figura 1. En la fotografía A se muestra el cerebro normal de una persona de edad avanzada; en B se observa la pérdida dramática de tejido del cerebro debido al daño celular causado por la EA.

Proceso proteolítico de la proteína precursora de amiloide (APP)

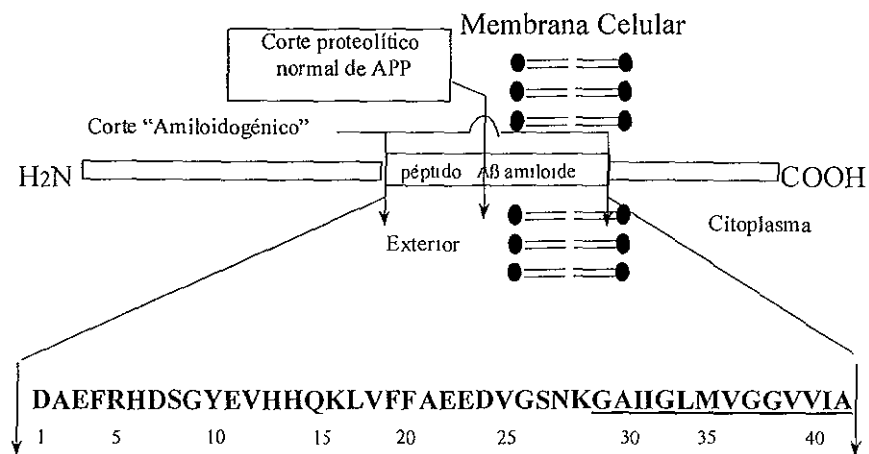


Figura 2. Proteína precursora amiloide APP. El corte amiloidogénico indicado corresponde a los sitios de corte anormal del gene que codifica a la APP en las personas que son genéticamente predispuestas a la EA y en consecuencia a la acumulación de amiloides. El efecto de la mutación consiste en alterar el proceso hacia la producción de péptidos A β . La parte inferior de la figura muestra la secuencia de aminoácidos del péptido amiloide.

La EA en algunos casos es de origen genético, el mismo tipo de patología observada en la EA ocurre en pacientes con el síndrome de Down causado por una mutación en el cromosoma 21, que controla la proteína precursora amiloide (APP). Sin embargo muchos pacientes con EA claramente familiar tienen un defecto en el cromosoma 14. Investigaciones recientes han propuesto una relación de la EA con la apolipoproteína E (ApoE), una proteína en el plasma que se une a las placas seniles y a los enredos neurofibrilares [Strittmatter *et al.*, 1993]. Aquellos pacientes homocigóticos por el gene de ApoE en el cromosoma 19 pueden tener un riesgo especial de EA esporádica [Strittmatter *et al.*, 1993; Tanzi *et al.*, 1994] ver tabla 1.

Cromosoma	Defecto genético	Edad en que se manifiesta	% de casos Genéticos	Total	Fenotipo de A β	Proteína producto
14	Mutaciones de Presenilin 1	30-60	70-80%	5-10%	Incremento en A β 1-42	S182 (proteína de membrana)
19	Factor de riesgo genético	60+	----- -	40-50%	Incremento de A β en las PS y CVA	ApoE4
21	Mutaciones de APP	45-65	2-3%	<1%	Incremento en A β total	Proteína precursora de amiloide APP
1	Mutaciones de Presenilin 2	40-70	aprox 20%	2-3%	Incremento en A β 1-42	PS-1, PS-2 proteína de membrana

Tabla 1. Los Genes Asociados a la Enfermedad de Alzheimer

Amiloide es un término dado a una variedad de precipitados de proteína los cuales presentan propiedades físicas y bioquímicas similares:

- a) Formaciones de fibriles, las cuales están constituidas por filamentos del péptido amiloide asociados unos con otros, de 6 a 10 nm de diámetro y de longitud variable.
- b) Alto contenido de estructura β -plegada en los que el esqueleto polipeptídico adopta una orientación antiparalela y corre perpendicularmente al eje más largo del fibril.
- c) Propiedades de tinción las cuales incluyen birefringencia verde bajo la luz polarizada después de haber sido teñidos con Congo rojo o fluorescencia amarilla-verde con tioflavina T o S.
- d) Un alto grado de insolubilidad bajo condiciones fisiológicas.

La deposición de amiloides no es una característica exclusiva de la EA, otras enfermedades también están caracterizadas por la amiloidosis. La mayoría de las amiloidosis se originan por mutaciones genéticas, aunque no todos estos depósitos son derivados de la misma proteína y sus secuencias no tienen ninguna homología. Las proteínas que se sabe que están relacionada con varias amiloidosis incluyen: B-2 microglobulina, prealbúmina, amiloide A de suero, inmunoglobulina de cadena ligera, cistatina C, proteína prion, y APP [Castaño y Frangione 1988].

La polimerización de los péptidos A β en formas fibrilares es una característica histopatológica de la EA. Los depósitos amiloides se han detectado con colorantes histológicos como el rojo de congo y la tioflavina T. Además de las características de tinción, los amiloides tienen una parte común en la conformación molecular, las proteínas están organizadas en hojas β plegadas. Los marcadores

histológicos reconocen algunos dominios comunes de estas conformaciones moleculares [Kirschner *et al.*, 1986; Castaño y Frangione 1988; LeVine, 1993].

Para investigar las propiedades bioquímicas inherentes de los péptidos A β , varios laboratorios han sintetizado análogos de éstos [Hilbich *et al.*, 1991; Burdick *et al.*, 1992]. Los péptidos A β sintéticos han mostrado las mismas características de ensamblaje del fibril en comparación con los extraídos de las placas seniles de tejidos del cerebro; por difracción de luz se ha detectado que poseen una estructura β cruzada [Kirschner *et al.*, 1987]. Sin embargo, los péptidos A β sintéticos son claramente solubles en geles de SDS-poliacrilamida, a diferencia de las placas seniles en el cerebro. Se ha demostrado que estos péptidos sintéticos tienden a agregarse cuando se incrementa la concentración, el tiempo de incubación y acidez. En condiciones ácidas se incrementa la formación del fibril entre pH 4.5 y 6. En general, los análogos de péptidos A β sintéticos presentan grandes similitudes con las formaciones fibrilares *in vivo* [Burdick *et al.*, 1992].

2.1.1 Conformación del ensamblaje del fibril amiloide

Debido a que A β presenta una gran tendencia a formar agregados fibrilares, no ha sido posible determinar la estructura del péptido soluble y del fibril amiloide, utilizando técnicas comunes tales como RMN y difracción de rayos X, lo que ha impedido conocer el mecanismo de formación del amiloide. Los agregados amiloides forman fibriles insolubles de aproximadamente 7-9 nm de diámetro. Los fibriles amiloides están formados de hojas beta antiparalelas y no forman una fase cristalina en estado sólido, por ello no ha sido posible utilizar la cristalografía de rayos X para determinar su estructura. Aunque mediante estudios por difracción de rayos X se conocen algunos detalles de la organización del péptido dentro del fibril. Estos estudios han mostrado que los fibriles amiloides forman cristales

ortogonales teniendo dimensiones unitarias de 9.4Å en la dirección de los puentes de hidrógeno, 7.4Å en la dirección del esqueleto peptídico y 10Å de espacio entre hoja y hoja β en un arreglo cilíndrico [Kirschner *et al.*, 1986]. El péptido está organizado con una estructura β cruzada donde el puente de hidrógeno está en la dirección del eje del fibril [Kirschner *et al.*, 1986].

2.2 Efecto de los metales a la agregación de A β

Se ha propuesto que la exposición a ciertos metales como el aluminio, el hierro y el cinc inducen la agregación del péptido amiloide [Mantyh *et al.*, 1993]. A partir de que se observó que el aluminio está presente como aluminosilicatos en la EA, la exposición a este metal se ha considerado un factor de riesgo en la enfermedad [Leslie *et al.* 1995 y referencias citadas allí]. Recientes análisis *in vitro* han demostrado que concentraciones sub-milimolares de Al³⁺ o aluminosilicatos causan la agregación del péptido A β , sugiriendo la importancia del Al³⁺ en la etiología de la EA. Sin embargo, no ha sido demostrado directamente de que manera el Al³⁺ o los aluminosilicatos cambian la estructura de A β provocando un incremento en su toxicidad. Landsberg [1992] y colaboradores no detectaron niveles altos de aluminio en tejidos de pacientes con EA, usando la microscopía nuclear, por lo que descartaron la importancia de este metal en la enfermedad. Kasa y colaboradores [1995] también encontraron que no hay una acumulación de Al³⁺ en diferentes regiones del cerebro de pacientes con EA. Vale la pena subrayar que no todas las personas expuestas a concentraciones elevadas de Al³⁺ llegan a padecer la enfermedad [Joshi *et al.*, 1994].

Además, se encontró que el Zn²⁺ se une al péptido A β e induce su agregación en concentraciones sub-micromolares [Bush *et al.*, 1994]. Recientemente Tanzi y colaboradores formularon la hipótesis de que el Zn²⁺ está presente en el hipocampo

en concentraciones extremadamente variables y que durante la EA los niveles de Zn^{2+} en el cerebro son anormales. Cambios ligeros en la concentración local de Zn^{2+} pueden ser un factor que induzca la agregación de A β [Bush *et al.*, 1994].

Se ha informado que el cinc induce la agregación del péptido A β 1-40 con una constante de afinidad alta de $K_d = 107$ nM y con otra de baja afinidad de $K_d = 3.2-5.2$ μ M [Bush *et al.*, 1994; Clements *et al.*, 1996]. Existe una controversia acerca de la concentración de cinc que se necesita para inducir su agregación. Otros grupos han informado que se requieren concentraciones de 10^{-4} M para inducir la agregación del péptido amiloide [Mantyh *et al.*, 1993]. Recientemente Brown y colaboradores estudiaron la habilidad que tiene el cinc de inducir la agregación de A β usando el líquido cerebroespinal de perro, ellos encontraron que el cinc induce la agregación de A β en una concentración media de 120-140 μ M [Brown *et al.*, 1997].

Bush y colaboradores encontraron que además del cinc, el cobre también se une al péptido amiloide con una constante de afinidad de 4 μ M para A β 1-40 y 0.3 μ M para A β 1-42 [Atwood *et al.*, 1998]. Estudios por cromatografía de filtración en gel revelaron la estabilización aparente del péptido A β 1-40 en forma dimérica en presencia de cobre (II) [Bush *et al.*, 1994].

2.2.1 Iones de Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} en sistemas biológicos

El cinc está más concentrado en el cerebro en el hipocampo y la neocorteza [Ehmann, W.D *et al.*, 1986]. La concentración de cinc en la neocorteza está entre 150-200 μ M [Ebadi, 1991; Frederickson *et al.*, 1989]. El cinc generalmente se une en un 98% a proteínas en el plasma como la albúmina, el restante se encuentra como cinc libre [Failla *et al.*, 1982]. El cinc y el cobre biológicamente son antagonistas, alteraciones de cinc y su metabolismo directamente afectan el metabolismo del cobre. De esta manera la toxicidad del cinc está mediada a través

del cobre; la competencia del cinc en proteínas de cobre puede inhibir funciones del metabolismo como efectos antioxidantes protectores en Zn/Cu-SOD (superóxido dismutasa) u otros tipos de proteínas de cobre conduciendo a un daño celular [Owen, 1982].

El cobre se requiere en numerosas enzimas en la célula, aquéllas como la citocromooxidasa, Cu/Zn-SOD, lisiloxidasa, dopamina- β -monooxigenasa [Linder, M.C 1991; Linder *et al.*, 1996]. El cobre también representa un papel importante en la asimilación de hierro en las células microbianas y de mamíferos [Askwith, C.C *et al.*, 1996; Kaplan *et al.*, 1996]. El cerebro contiene las concentraciones más altas de cobre en el organismo, seguido por el hígado. El cobre está más concentrado en la materia gris (60-110 μ M) que en la materia blanca (25-79 μ M). Estas concentraciones son aproximadamente un orden y medio de magnitud más grande que en la sangre (11-24 μ M) [Jacob, 1987] y cerca de un orden de magnitud más grande que en el fluido cerebroespinal (1-8 μ M) [Owen, 1982]. El locus ceruleus (110-400 μ M) y la sustancia negra (80-120 μ M) tienen las concentraciones de cobre más altas en el cerebro humano [Smith, 1983; Sato *et al.*, 1994].

La ceruloplasmina (65-70 %), la albúmina (18%), y la transcupreína (12%) contienen el mayor contenido de cobre en el plasma [Linder, 1991]. Un exceso o acumulación de cobre es altamente tóxico debido a su propensión a estar envuelto en reacciones red-ox las cuales resultan en la formación de radicales hidroxilos [Markesbery, 1997].

El no conservar la homeostasis de cobre da como resultado desórdenes genéticos como la enfermedad de Wilson y Menkes [Tanzi *et. al.*, 1993]. Así como el cobre y el cinc, el hierro no está distribuido igualmente en todo el cerebro. La mayor concentración de hierro no-hemo se encuentra en el globus pallidus,

sustancia-negra y rojo de nucleus, putamen, e intrapendulus nucleus (800-2000 μ M). Otras concentraciones se encuentran en el hipocampo y la corteza cerebral (400-600 μ M). Estas concentraciones de hierro son en el orden de magnitud de 1 a 2 veces mayores que las que se encuentran en la sangre (9-32 μ M) [Atwood, 1998 y referencias citadas allí].

El hierro es un factor importante en el cerebro, actúa como intercambiador de electrones y como cofactor para algunas enzimas. La ferritina es el mayor almacenamiento proteínico en el cerebro, ésta es una molécula compuesta de cadenas de 19 y 21 kilodaltones capaces de unir hasta 4500 átomos de hierro, pero también une aluminio y cinc. La proteína L- ferritina generalmente se localiza en las microglías y oligodendritas, con muy poco contenido en los astrocitos, neuronas y otros fluidos extracelulares. El transporte de hierro y almacenamiento de proteínas son elevadas en concentración en depósitos cercanos a las placas seniles en la enfermedad de Alzheimer. La concentración de ferritina es alta en pacientes con la enfermedad de Alzheimer [Atwood *et al.*, 1998 y referencias citadas allí]

2.2.1.1 Sitios de unión del cinc en proteínas

Hay 3 tipos de sitios de unión del Zn^{2+} a proteínas conocidos en la actualidad: catalítico, estructural y cocatalítico [Vallee, 1993]. La estructura de todos los sitios catalíticos del Zn^{2+} conocidos se representa en la figura 3. Tres aminoácidos y una molécula de agua son los ligantes del Zn^{2+} en el sitio catalítico. Como ejemplos podemos mencionar la unión del Zn^{2+} a tres His en la beta lactamasa, DD carboxipeptidasa y anhidrasa carbónica humana. El Zn^{2+} está unido a dos His y un Glu en la carboxipeptidasa A y B, y termolisina. El Zn^{2+} está unido a dos His y un Asp en la fosfatasa alcalina. En la deshidrogenasa alcohólica de *E. coli* está unido a una His así como también a dos Cys.

Sitios cocatalíticos: Las proteínas con un sitio cocatalítico presentan un sitio catalítico del cinc -Zn1, y un sitio coactivo separado -Zn2. En tales proteínas multi-Zn²⁺ ambos sitios actúan como una unidad para la actividad catalítica. Los sitios Zn²⁺ modulan pero no son esenciales para la catálisis. Estos dos átomos de Zn²⁺ pueden unir un aminoácido, generalmente Asp, compartiéndolo como un puente. Además uno de los ligantes del sitio Zn2 puede formar un puente adicional a un tercer metal, en este caso un átomo de magnesio. Estos puentes existen en las enzimas multi-Zn²⁺, por ejemplo en la nucleasa P1, también podemos citar a la fosfolipasa C, aminopeptidasa y superóxido-dismutasa. En estos sitios predomina Asp como ligante, también Ser, Thr, Lys y Trp parecen ser sitios de coordinación del Zn²⁺.

Sitio estructural: En este caso el metal se coordina tetrahédricamente a cuatro Cys que previenen el acceso de otros ligantes a la esfera de coordinación. Como ejemplo podemos citar a la deshidrogenasa alcohólica, transcarbamilasa-aspártica y proteína cinasa C.

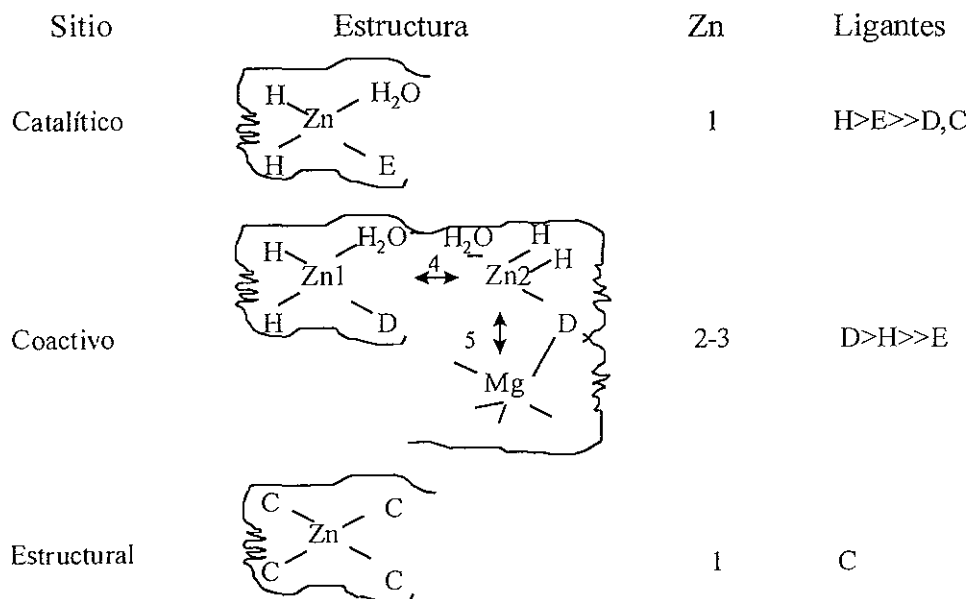


Figura 3. Sitios de unión del Zn a proteínas.

2.2.1.2 Sitios de unión de cobre en proteínas

En las proteínas, el cobre se presenta en tres formas diferentes. La primera es: un ion cobre aislado que se une a los ligantes, para el cual se obtienen parámetros espectrales que concuerdan con el intervalo de comportamiento normal de los modelos de complejos de cobre. En este tipo de centro, el cobre se enlaza con átomos que se ligan con el oxígeno y el nitrógeno. Como ejemplo podemos citar la aminooxidasa (figura 4).

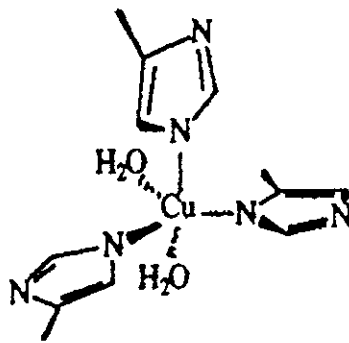


Figura 4. Sitio activo de la aminooxidasa

El segundo tipo: es el llamado “cobre azul”. Todas estas proteínas tienen una intensa banda de absorción (absorción molar ~ 4000) en los 600 nm aproximadamente. Como ejemplo podemos citar la azurina y la plastocianina. En la plastocianina (a), el cobre está unido a dos His, una Cys y una Met. En la azurina (b) el cobre está unido a dos His, una Met, a un Glu y una Cys (figura 5 a y b).

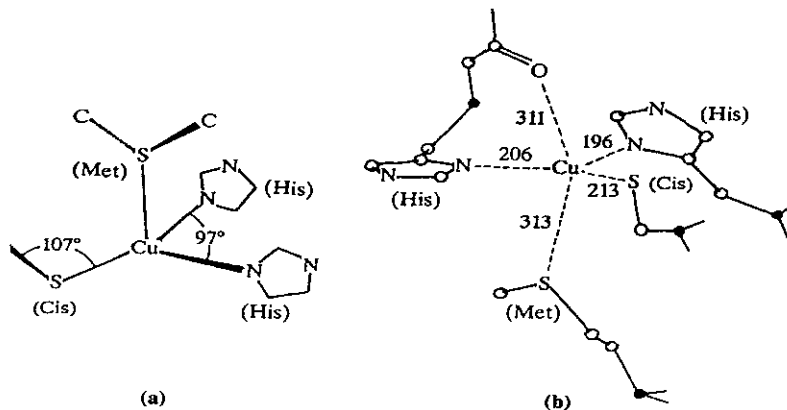


Figura 5. a) sitio activo de la plastocianina, b) sitio activo de la azurina

Al tercer tipo de cobre: suele llamársele “silencioso en RPE”. En este caso el centro activo contiene dos átomos de cobre muy próximos entre sí, de tal modo que ambos Cu(II) se acoplan en forma antiferromagnética. Como ejemplos podemos citar a la hemocianina y la tirosinasa.

2.2.1.3 Sitios de unión de hierro en proteínas

De todas las metalo-proteínas, las que se han estudiado con más profundidad son las proteínas hemo. Como ejemplo podemos citar la hemoglobina y la mioglobina. Todas las proteínas hemo contienen hierro coordinado con una protoporfirina IX. La tetracoordinación proporcionada por el anillo de porfirina no es suficiente para satisfacer los requisitos de coordinación del hierro, y éste tiene una fuerte tendencia a aumentar su número de coordinación. En las mioglobinas y las hemoglobinas, el grupo hemo se une a la proteína coordinándose con el grupo imidazol de un residuo de histidina.

Puede verse entonces, que hay una amplia diversidad de sitios de coordinación de metales con proteínas. Considerando la composición del péptido

Aß podemos pensar en una coordinación de cinc, cobre y el hierro con residuos de histidina, ácido glutámico, ácido aspártico o tirosina como posibles ligantes, por analogía con sitios de coordinación conocidos.

2.3 Fluorescencia de proteínas

El método que emplea la fluorescencia está siendo usado ampliamente en investigaciones bioquímicas, médicas y clínicas, debido a la alta sensibilidad de esta técnica. La emisión de la fluorescencia ocurre alrededor de 10^{-8} s. (10 ns) después de la absorción de luz. La fluorescencia es la emisión de fotones del estado excitado al estado basal. Las moléculas que generalmente muestran fluorescencia poseen electrones deslocalizados formalmente presentes en enlaces dobles conjugados. La fluorescencia es una técnica espectroscópica muy útil en el estudio de las propiedades dinámicas de las macromoléculas biológicas. Las mediciones requieren llevarse a cabo en disoluciones ópticamente transparentes y sólo se necesitan pequeñas cantidades de material para el análisis, con la ventaja de la recuperación de las muestras después de los experimentos.

La mayoría de las proteínas absorben luz y emiten en el intervalo ultravioleta (UV) del espectro ($\lambda_{exc}=280$). La absorbancia se debe a los aminoácidos aromáticos tirosina, triptofano y fenilalanina, y en un pequeño porcentaje a los enlaces disulfuros. La emisión de la tirosina en agua se observa en 303 nm y es relativamente insensible a la polaridad del disolvente. El máximo de emisión del triptofano en agua es 348 nm y depende altamente de la polaridad del disolvente [Lakowicz, 1983]. La tirosina transfiere energía al triptofano, debido a que el espectro de absorción del triptofano se superpone con el espectro de emisión de la tirosina; es por eso que el 90% de la fluorescencia de la mayoría de las proteínas se

debe al triptofano cuyo espectro de emisión responde a la polaridad del medio circundante (Fig. 6).

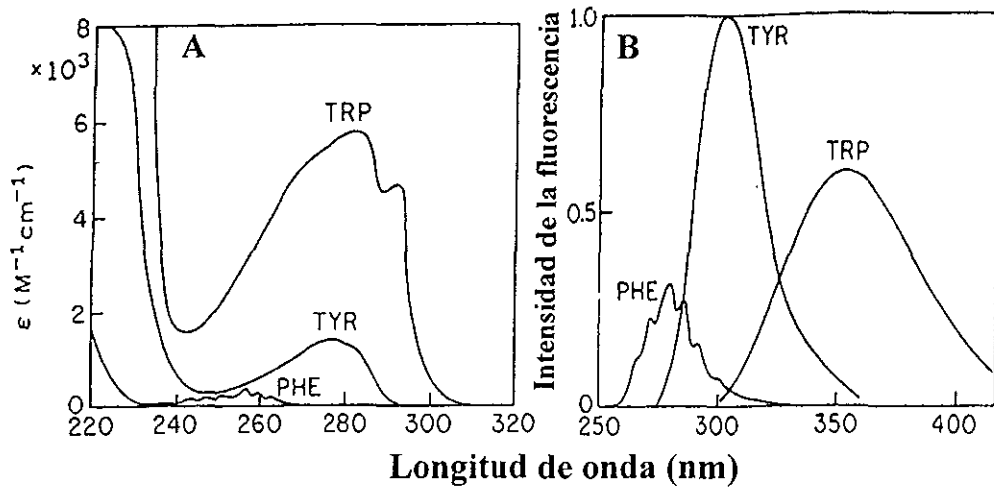


Figura 6. La gráfica **A** muestra los espectros de absorción de los aminoácidos aromáticos y **B** los espectros de emisión.

Se observan cambios espectrales como resultado de varios fenómenos tales como unión de ligantes, asociación proteína-proteína, desnaturalización y otros. Las propiedades espectrales de las sondas fluorescentes pueden ser utilizadas para obtener información acerca del medio que las rodea así como para ver los cambios en la agregación y ensamblaje [Lakowicz, 1983]. Para muchos fluoróforos los cambios en el espectro de emisión hacia longitudes de ondas cortas (corrimiento hacia el azul), significan una disminución en la polaridad del medio que los rodea. En cambio, el corrimiento hacia longitudes de ondas mayores (corrimiento hacia el rojo) es indicativo de la exposición del fluoróforo a un medio más polar.

2.3.1 Transferencia de energía

Es posible marcar a una proteína con una sonda fluorescente unida covalentemente a ella lo que permite observar la (o las) señal (es) del fluoróforo. La transferencia de energía del estado excitado de un donador (d) a un aceptor (a) es el

resultado de las interacciones dipolo-dipolo entre “d” y “a” (Fig. 7). Bajo condiciones favorables la energía de excitación se puede transferir de un fluoróforo a otro, los requerimientos son:

- a. La posibilidad de la interacción dipolo-dipolo entre los fluoróforos, para lo cual se requiere que la distancia entre ellos sea entre 10 y 80 Å.
- b. Una sobreposición apreciable del espectro de emisión del donador, con el espectro de absorción del aceptor (Fig. 9).

El hecho de que la transferencia de energía opere por un mecanismo de interacción dipolar explica la fuerte dependencia de la transferencia con respecto a la distancia (R) entre los grupos que participan. La interacción varía con el inverso de la sexta potencia de la separación, la eficiencia (E) de la transferencia de energía está dada por:

$$E = 1 / (1 + (R/R_0)^6) \quad \text{Ecuación 1}$$

R₀ se puede obtener por la ecuación:

$$R_0 = 9786 (J k^2 n^{-4} Q_D)^{1/6} \text{ \AA} \quad \text{Ecuación 2}$$

n = índice de refracción del medio, que para el agua es 1.4

k = factor de orientación considerado 2/3 para proteínas globulares. Este factor está relacionado con las orientaciones de los dipolos de los fluoróforos.

Q_D = rendimiento cuántico del donador en ausencia del aceptor

J = integral de la sobreposición de los espectros de emisión del donador *F_D(λ)* y de absorción del aceptor *ε_A(λ)* y está dada por la ecuación:

$$J = (\int F_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda) / (\int F_D(\lambda) d\lambda) \quad \text{Ecuación 3}$$

donde R_0 es una distancia característica del par donador aceptor llamada la distancia crítica de Forster, a la cual la eficiencia de la transferencia de energía es del 50%.

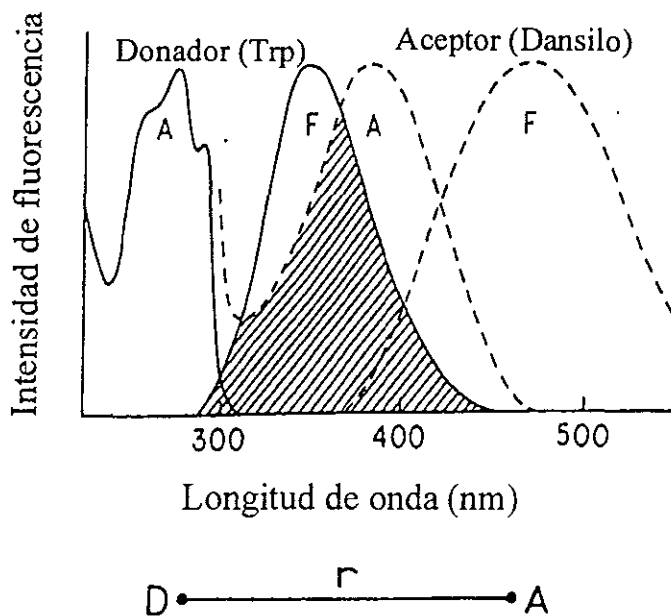


Figura 7. La gráfica muestra los requerimientos para que ocurra la transferencia de energía: la superposición del espectro de emisión del donador (Trp) con el espectro de absorción del aceptor (dansilo) y la distancia (r) entre el donador (D) y el aceptor (A) debe ser entre 10 y 80 Å. A- absorción, F-fluorescencia.

Un parámetro que se mide frecuentemente es la eficiencia de la transferencia de energía E , la cual representa la proporción de los fotones emitidos por el donador que son absorbidos por el aceptor. La eficiencia de la transferencia normalmente se calcula del rendimiento de la fluorescencia relativa en presencia (F_{DA}) y en ausencia (F_D) del aceptor o en función de las vidas medias (τ_{DA} , τ_D) bajo estas mismas condiciones [Lakowicz, 1983].

$$E = 1 - (F_{DA}) / (F_D) \quad \text{Ecuación 4}$$

$$E = 1 - (\tau_{DA}) / (\tau_D) \quad \text{Ecuación 5}$$

El estudio de la dependencia del grado de la transferencia con respecto a la distancia en proteínas marcadas ha dado como resultado una valiosa información estructural. El intervalo de distancia de este fenómeno es de 10 a 80 Å, que es comparable al diámetro de muchas proteínas y al grosor de las membranas biológicas. Cualquier fenómeno que afecte la distancia entre el donador y el aceptor va a afectar el grado de la transferencia de energía permitiendo así que el fenómeno sea cuantificado [Lakowicz, 1983; Wu y Brand 1994].

En muchas ocasiones se puede obtener información acerca de la asociación de las macromoléculas mediante mediciones de transferencia de energía, aún si estos datos no se utilizan para determinar las distancias entre las moléculas de donador y aceptor. Vanderkoi [1977] utilizó la transferencia de energía para determinar que en las membranas la Mg^{+2} - Ca^{+2} ATPasa existe en un estado agregado (Fig. 10).

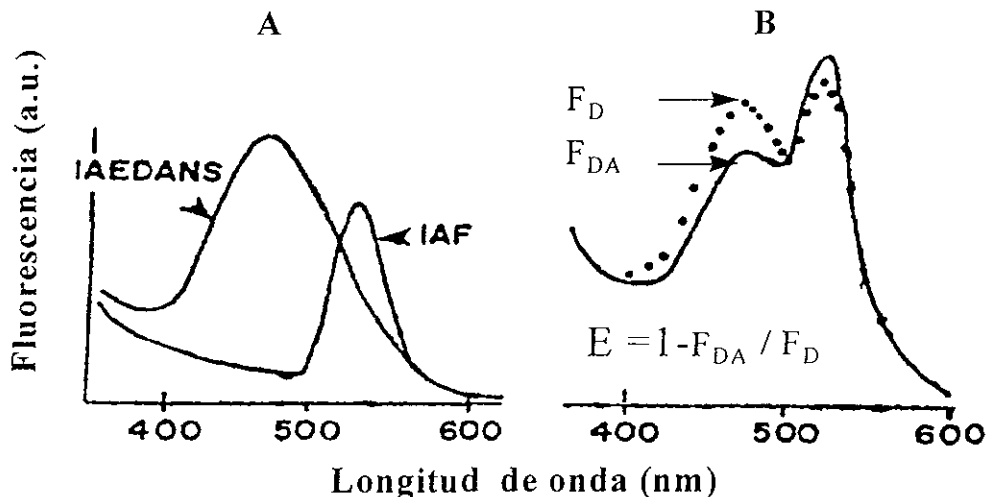


Figura 8. Transferencia de energía entre las moléculas de ATPasa marcadas con 1,5-IAEDANS (donador) y IAF (aceptor). La gráfica A muestra los espectros de emisión de los complejos ATPasa-lípido reconstituidos individualmente. En B se puede observar el espectro de emisión de la mezcla de donador-aceptor (la línea sólida). La línea punteada corresponde a la suma matemática del donador y el aceptor reconstituidos por separados.

La ATPasa se marcó por separado con 1,5-IAEDANS (donador) y con iodoacetamida fluoresceína (IAF) (aceptor). Las moléculas de la ATPasa individualmente marcadas se reconstituyeron en las mismas vesículas de fosfolípido. Se observó que la fluorescencia del 1,5-1,5-IAEDANS se apagó parcialmente y la del IAF se incrementó. Lo anterior indicó que hubo transferencia de energía entre el donador y el aceptor. Por otro lado el grupo de Hamaguchi [1991] utilizó la transferencia de energía para caracterizar la compactabilidad de un fragmento de la cadena ligera de una inmunoglobulina en la etapa temprana del plegamiento. El fragmento C_L de la cadena ligera de la inmunoglobulina tipo-K contiene una cisteína en la terminal carboxilo, la cual se modificó con 1,5-IAEDANS. Este fragmento contiene un único triptofano en la posición 148. El fragmento contiene un puente bisulfuro el cual se redujo con el fin de eliminar el apagamiento que este provoca de la fluorescencia del triptofano. El fragmento reducido y marcado con 1,5-IAEDANS se estudió en las etapas primarias del replegamiento a partir del desplegamiento en presencia de GdnHCl, mediante la transferencia de energía del triptofano al 1,5-IAEDANS. Para el fragmento reducido C_L-1,5-IAEDANS la emisión del triptofano se sobrepone con la absorción de 1,5-IAEDANS y se observó la transferencia de energía entre el triptofano 148 y el grupo 1,5-IAEDANS en ausencia de GdnHCl. En solución de GdnHCl 4M la distancia entre el donador y el aceptor fue muy grande y la eficiencia de la transferencia de energía resultó muy baja. La distancia entre el triptofano 148 y el grupo 1,5-IAEDANS en la proteína intacta se calculó mediante los datos de la transferencia de energía, la cual concordó bien con la distancia obtenida mediante la cristalografía de rayos X.

2.3.2 Apagamiento de la Fluorescencia

El apagamiento de la fluorescencia se refiere a cualquier proceso que decrezca la intensidad de la fluorescencia de una sustancia determinada (Fig. 9). Estos procesos incluyen reacciones del estado excitado, transferencia de energía, formación de un complejo y apagamiento colisional. El apagamiento que resulta de encuentros colisionales entre el fluoróforo y el apagador se conoce como apagamiento colisional o dinámico, mientras que el apagamiento estático se debe a la formación de un complejo en estado basal. Adicionalmente a los procesos descritos arriba un apagamiento aparente puede ocurrir debido a las propiedades ópticas de la muestra. Por ejemplo las densidades ópticas muy altas o la turbidez pueden ocasionar una disminución en la intensidad de la fluorescencia. Los apagamientos dinámico y estático requieren de un contacto molecular entre el fluoróforo y el apagador. En el caso del apagamiento colisional el apagador debe tener una difusión hacia el fluoróforo durante la vida media del estado excitado, bajo este contacto el fluoróforo regresa al estado basal sin emitir un fotón. En el caso del apagamiento estático se forma un complejo entre el fluoróforo y el apagador y este complejo no es fluorescente. Las mediciones de apagamiento pueden revelar el grado de accesibilidad de los fluoróforos por los apagadores [Lakowicz, 1983].

2.3.2.1 Teoría del apagamiento colisional

La ecuación de Stern-Volmer describe el apagamiento colisional de la fluorescencia:

$$F_0/F - 1 = k_q \tau_0 [Q] - 1 = K_{SV} [Q] - 1 \quad \text{Ecuación 6}$$

donde F_0 y F son las intensidades de la fluorescencia en ausencia y en presencia

del apagador, respectivamente

k_q es la constante bimolecular del apagamiento

τ_0 es la vida media del fluoróforo en ausencia del apagador

$[Q]$ es la concentración del apagador

$K_{SV} = k_q \tau_0$ es la constante de apagamiento de Stern-Volmer

$k_q = K_{SV} / \tau_0$ es la constante bimolecular de apagamiento Ecuación 7

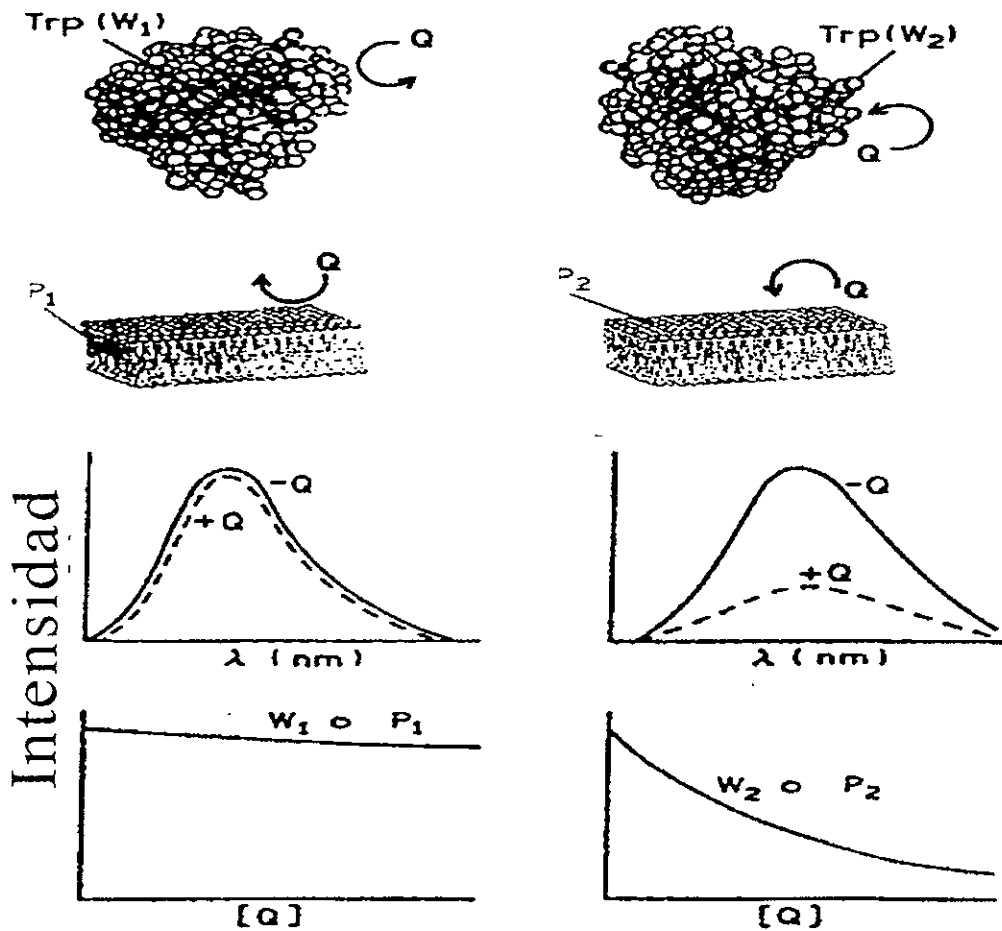


Figura 9. En la parte superior de la figura se muestra hipotéticamente el efecto de un apagador $[Q]$ en dos tipos de triptofanos (uno localizado en el interior y otro expuesto en la superficie) en una proteína globular; en la parte inferior de la figura se observa el apagamiento de la fluorescencia del triptofano dependiendo del grado de exposición de estos residuos así como también de la concentración del apagador.

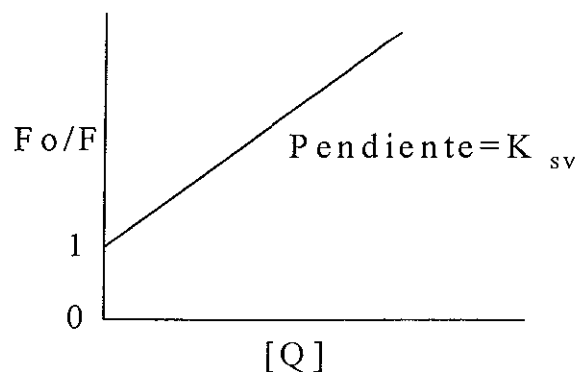


Figura 10. Gráfica típica de Stern-Volmer para el apagamiento colisional de la fluorescencia, donde F_0 y F es la fluorescencia en ausencia y en presencia del apagador respectivamente; y $[Q]$ es la concentración del apagador.

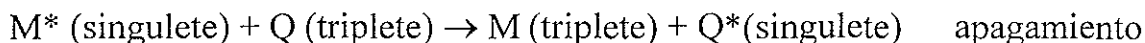
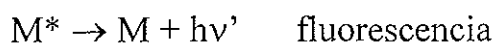
Los datos del apagamiento generalmente se representan como una gráfica de F_0/F versus $[Q]$ (Fig. 10) debido a que se espera que F_0/F dependa linealmente de la concentración del apagador. La gráfica de F_0/F versus $[Q]$ presenta un intercepto de 1 en el eje Y y una pendiente igual a K_{SV} , entre mayor la inclinación de la pendiente, mayor la accesibilidad del apagador (ver fig. 11).

Intuitivamente se puede observar que K_{SV} es la concentración del apagador a la cual $F_0/F = 2$ es decir 50 % de la intensidad se apaga. Una gráfica lineal de Stern-Volmer generalmente indica la existencia de una única clase de fluoróforos igualmente accesibles al apagador. En el caso en que estén presentes 2 poblaciones de fluoróforos, y uno de ellos no esté accesible al apagador, entonces la gráfica de Stern-Volmer se desvía de la linealidad hacia el eje X. Este resultado generalmente se observa en el apagamiento de la fluorescencia de proteínas por apagadores polares o cargados, los cuales no penetran totalmente al interior hidrofóbico de las proteínas y por consiguiente solamente aquellos residuos triptofanos de la superficie de la proteína son apagados. Pero debido a que el cálculo de los valores de la constante de Stern-Volmer puede ser en algunos casos difícil de interpretar, una estimación de la constante de apagamiento bimolecular ($k_q = K_{SV}/\tau_0$) a partir de

los valores de las vidas medias nos da una descripción más detallada de que tan accesibles se encuentran los triptofanos en una proteína [Eftnik y Ghiron, 1981; Lakowicz, 1983].

2.3.2.2 Apagadores de la fluorescencia

Los apagadores colisionales incluyen acrilamida, yoduro, cesio, bromato, peróxido de hidrógeno, xenón, nitrometano, etc. La mayoría de los fluoróforos (F) emiten desde un estado singulete (electrones apareados) y el apagador (Q) disminuye la fluorescencia según:



Cuando se usa yoduro como apagador es necesario disolverlo en una disolución que contenga KCl y $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. KCl y que se usa para mantener la fuerza iónica en un valor constante y $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ es necesario para evitar la oxidación del yoduro, ya que se puede formar I_2 el cual es muy reactivo y puede acomodarse en las regiones no polares de las proteínas y membranas [Eftnik y Ghiron, 1981; Lakowicz, 1983]. La acrilamida es un apagador polar pero no iónico, que tiene la capacidad de penetrar en el interior de las proteínas y su habilidad de apagamiento nos da una estimación de que tan expuestos están los triptofanos. Se ha informado que los triptofanos con una constante de Stern-Volmer mayores de 7 son considerados expuestos, entre 7 y 4 ligeramente expuestos y menores de 4 muy escondidos [Barry y Matthews, 1997].

El yoduro generalmente apaga aquellos triptofanos que se encuentran expuestos en la superficie de las proteínas debido a su gran tamaño y carga negativa. Utilizando el yoduro como apagador, se ha informado que los triptofanos que se encuentran expuestos presentan valores de la constante de Stern-Volmer mayores a 1, aquéllos con una constante menor a 1 son considerados menos expuestos [Barry y Matthews, 1997]. Algunos investigadores han tomado como referencia al N-acetilo triptofano-amida (NATA) cuya constante de apagamiento de Stern-Volmer con acrilamida es $K_{SV} = 21.4 \text{ M}^{-1}$ y una constante bimolecular de apagamiento en disolución $k_q = 8-8.5 \text{ M}^{-1} \text{ ns}^{-1}$ [Merril *et al.*, 1993]. El grado de exposición de los triptofanos se puede clasificar utilizando la constante bimolecular de apagamiento k_q (tabla 2) [Merril *et al.*, 1993]. En la figura 11 se muestra un ejemplo de proteínas con diferente grado de exposición de sus triptofanos.

Tipo de Triptofano	$k_q (\text{M}^{-1} \text{ ns}^{-1})$
Expuestos al disolvente	$1.5 < k_q < 5$
Moderadamente expuestos	$0.6 < k_q < 1.5$
Moderadamente escondidos	$0.2 < k_q < 0.6$
Escondidos	$k_q < 0.2$

Tabla 2. Clasificación de los triptofanos según k_q

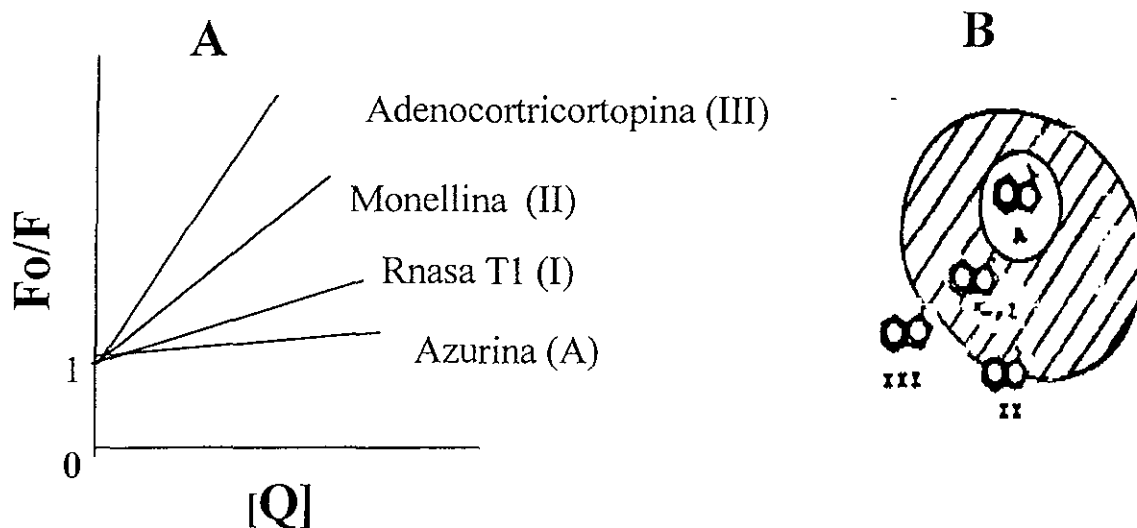


Figura 11. La gráfica A muestra las pendientes de Stern-Volmer para varias proteínas cuyos triptofanos presentan diferentes grados de exposición. Entre más grande la pendiente, mayor el grado de exposición del triptofano. En B se pueden observar los diferentes tipos de triptofanos que pueden estar localizados en una proteína dependiendo de su exposición al disolvente.

2.3.2.3 Efecto de las cargas en el apagamiento de la fluorescencia

El acercamiento entre el fluoróforo y el apagador se puede prevenir por efectos de carga así como también por factores estéricos. Por ejemplo el I^- es un apagador con carga negativa, el cual se esperaría que fuese repelido por las cargas negativas que rodean al fluoróforo. Similarmente, el yoduro puede ser atraído hacia un fluoróforo en un medio cargado positivamente. Tal atracción y repulsión va a depender de la fuerza iónica del disolvente, por lo que se espera que la atracción decrezca en soluciones de alta fuerza iónica. En contraste al yoduro, los apagadores neutros como la acrilamida no son sensibles a las cargas que rodean al fluoróforo [Eftnik y Ghiron, 1981; Lakowicz, 1983].

El Cs^+ es un apagador catiónico el cual puede ser usado para evaluar si hay inconsistencias entre el yoduro o la acrilamida como resultado de la presencia de aminoácidos con cargas positivas o negativas en ciertas regiones o lugares en proteínas. La única desventaja que presenta este apagador es que no es un buen apagador de triptofanos y su eficiencia es muy baja [Lakowicz, 1983].

2.3.2.4 Efecto de los metales en la fluorescencia intrínseca de las proteínas

La fluorescencia de proteínas es sensible a muchos factores incluyendo el microambiente de los grupos tirosilos y triptofanilos. Esto subraya la importancia del uso de la fluorescencia intrínseca como un parámetro para estudiar los cambios conformacionales y las interacciones proteína-ligantes [Lakowicz, 1983]. De los metales alcalinos como Li, Na, K, Rb, y Cs, este último es el único que tiene un efecto (disminución) en la fluorescencia libre del triptofano en disolución acuosa. Sin embargo, el cesio presenta una eficiencia de apagamiento de la fluorescencia de 0.2.

Se sabe que algunas enzimas requieren cationes monovalentes para su máxima actividad enzimática. Suelter [1970] ha revisado las propiedades de algunas de estas proteínas y ha postulado que los cationes monovalentes como Na^+ , K^+ o NH_4^+ se unen al sitio activo produciendo cambios conformacionales. El mostró que el potasio (K^+) y el manganeso (Mn^{++}), los cuales son activadores en la piruvato kinasa de músculo, causaron un ligero apagamiento en la fluorescencia intrínseca del triptofano en la proteína [Chen, 1976 y referencias citadas allí]. Con respecto a los metales alcalinotérreos como el Be, Mg, Ca, Sr, y el Ba se puede decir que debido a la ausencia de un efecto específico en el triptofano, cualquier efecto en la fluorescencia de la proteína con estos metales se debe probablemente a cambios conformacionales. Podemos citar algunos ejemplos como cuando Brewer y

Weber [1966] encontraron que el Mg^{2+} , el cual se requiere para la actividad de la enolasa de levadura, aumenta el rendimiento cuántico de la fluorescencia del triptofano cerca de un 13%, mientras que la fluorescencia de la tirosina decrece [Chen, 1976 y referencias citadas allí]. Se observaron cambios más fuertes en la fluorescencia con el calcio o el magnesio en proteínas extraídas del retículo sarcoplásmico de músculo. Se observó un incremento del 90% y un corrimiento del máximo de emisión de 345 a 332 nm con Ca^{2+} . También se encontró que el Mg^{2+} compite por el mismo sitio de unión y produce los mismos cambios de fluorescencia [Chen, 1976 y referencias citadas allí].

La fluorescencia de la tirosina puede también ser afectada por los cationes alcalinos. Normalmente la fluorescencia de la tirosina es difícil de detectar ya que la mayoría de las proteínas contienen triptofanos a quienes la tirosina transfiere energía. Cuatrecasas [1967] estudió la fluorescencia de la tirosina en la nucleasa de estafilococo, la cual sólo tiene un triptofano y varias tirosinas. El Trp está localizado lejos del sitio activo, mientras que en esta región varias tirosinas están unidas con el Ca^{2+} , sirviendo de puente con los sustratos o inhibidores. La unión de calcio o de algunos inhibidores causó el apagamiento de la tirosina, pero no la fluorescencia del triptofano [Chen, 1976 y referencias citadas allí].

El apagamiento de la fluorescencia del triptofano con los metales de transición como el Cu^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} y el Ni^{2+} se debe a la transferencia de energía, ya que estos cationes metálicos absorben luz en la región de la emisión del triptofano. Las proteínas que se unen al cinc como la anhidrasa carbónica y la glutamato-dehidrogenasa han sido estudiadas por fluorescencia, pero hay muy poca información respecto a si este ion produce un efecto en la fluorescencia intrínseca de proteínas. Se ha reportado que el Zn^{2+} no produce ningún apagamiento en el

triptofano libre [Chen, 1976 y referencias citadas allí]. Lehrer [1968] mostró que la fluorescencia del triptofano fue cuantitativamente apagada por el Cu^{2+} . Además, se observó un apagamiento marcado cuando se añadió Cu^{2+} a la albúmina de suero de bovino, chimotripsinógeno y actina. Se encontró la distancia entre el triptofano y el cobre unido y fue calculada asumiendo que el apagamiento se debió a un mecanismo de transferencia de energía, y que el grado de la transferencia de energía fue proporcional al grado de apagamiento.

Algunas proteínas de cobre, como la azurina han sido estudiadas ampliamente por espectroscopía de fluorescencia. Esta proteína con un peso molecular de 15,000 tiene un Cu^{2+} y una banda de absorción característica en 600 nm. La fluorescencia de la azurina se apaga un 60% en presencia de cobre. Algunos investigadores mostraron que la azurina y la estelacianina contienen grupos sulfhidrilos como uno de los ligantes a la proteína.

La transferrina, una proteína que transporta hierro, fue estudiada midiendo su fluorescencia en ausencia y en presencia de Cu^{2+} y Fe^{3+} [Chen, 1976 y referencias citadas allí]. Ha sido mostrado que el hierro es la causa del apagamiento de la fluorescencia de proteínas que contienen grupos hemo. Este efecto fue originalmente estudiado por Weber y Teale [Chen, 1976 y referencias citadas allí] quienes sugirieron que este apagamiento se debe a la transferencia de energía.

Con respecto a los lantánidos o metales raros, cuyo número de oxidación más común es 3+, se ha informado que Gd^{3+} , Eu^{3+} y Tb^{3+} en disolución acuosa tienen una alta emisión. El apagamiento del triptofano en disolución acuosa con estos iones ha sido estudiado por Ricci y Kilichowski. Utilizando la constante bimolecular de apagamiento $-k_q$, ellos concluyeron que la eficiencia del apagamiento fue en el siguiente orden $\text{Eu} > \text{Yb} > \text{Sm} > \text{Tb} > \text{Gd} > \text{Ho}$. El mecanismo de

apagamiento interno para estos iones puede involucrar transferencia de electrones, probablemente la habilidad de algunos de estos metales de apagar la fluorescencia en proteínas puede involucrar la unión del metal a algunos sitios en las proteínas [Chen, 1976 y referencias citadas allí]

3. Objetivos

3.1 Objetivos generales

1. Determinar la conformación y la naturaleza de las interacciones intermoleculares del péptido A β amiloide en condiciones donde este péptido se encuentra en estado dimérico. Esto permitirá conocer parte del proceso de la agregación del péptido amiloide.
2. Caracterizar la interacción del péptido amiloide en estado dimérico (A β 1-40) y agregado (A β 1-42) con diferentes metales (cinc, cobre, hierro) con el fin de entender el efecto de estos iones metálicos en la enfermedad de Alzheimer.
3. Utilizar las técnicas de apagamiento de la fluorescencia para el estudio del péptido A β amiloide, en el estado dimérico y agregado con el fin de discernir qué regiones del péptido amiloide se encuentran más expuestas al microambiente. Para ello se sintetizarán varias mutantes del péptido amiloide, las cuales tienen una sola sustitución de triptofano en la secuencia del péptido amiloide.

3.2 Objetivos específicos

1. Marcar los mutantes del péptido amiloide que contengan cisteínas, con sondas fluorescentes que presenten transferencia de energía entre sí.
2. Determinar por cromatografía de filtración en gel si los péptidos fluorescentes, presentan tiempos de elución comparables con el péptido nativo A β 1-40.
3. Caracterizar las propiedades de agregación y de formación del fibril de los péptidos fluorescentes mediante ensayos de sedimentación y microscopía electrónica.
4. Caracterizar la transición del péptido amiloide del estado nativo al estado desnaturalizado en DMSO, mediante la fluorescencia intrínseca del péptido nativo, así como también de uno de sus derivados fluorescentes.
5. Realizar experimentos de transferencia de energía con diferentes pares donador-aceptor de los péptidos amiloides fluorescentes para estudiar y caracterizar la formación del dímero.
6. Utilizar la fluorescencia intrínseca de la tirosina del péptido amiloide para estudiar la interacción con metales (cinc, cobre y hierro) por medio de la fluorescencia.
7. Determinar la estequiometría metal-ligante de cada uno de los metales (cinc, cobre y hierro) con el péptido amiloide por el método de Job o de variación continua.
8. Determinar las constantes de disociación del péptido A β 1-40 en estado dimérico y el péptido A β 1-42 en estado agregado al interaccionar con metales (cinc, cobre y hierro).
9. Diseñar y sintetizar mutantes con triptofano del péptido amiloide para ser usadas en estudios de apagamiento de la fluorescencia.

10. Comparar la estabilidad y las propiedades de agregación de los mutantes con triptofanos con el péptido nativo mediante ensayos de sedimentación, microscopía electrónica y cromatografía de filtración en gel.
11. Emplear apagadores de fluorescencia, aniónicos (yoduro), catiónicos (cesio) y neutros (acrilamida) para estudiar el apagamiento de la fluorescencia de varios mutantes del péptido amiloide con triptofano en el estado dimérico y fibrilar.
12. Calcular las constantes de apagamiento de la fluorescencia Stern-Volmer (K_{SV}) y las constantes bimoleculares del apagamiento Stern-Volmer (k_q), que nos permitan caracterizar el grado de exposición de los triptofanos en el estado dimérico y fibrilar.

4. METODOLOGIA

Se empleó la espectroscopía de fluorescencia ya que reúne las condiciones necesarias para alcanzar los objetivos planteados. A continuación se presenta la lista de reactivos y aparatos empleados y las ventajas del empleo de cada uno de los métodos. También se presentan algunos comentarios y consideraciones hechas para el ajuste de los datos experimentales, el cálculo de los datos experimentales y sus errores asociados.

4.1 Reactivos

En el presente trabajo se emplearon las siguientes sales inorgánicas y otros reactivos: cloruro de cinc (Sigma), cloruro de cobre (Sigma), cloruro de hierro (II) (Sigma), cloruro de sodio (Sigma), cloruro de potasio, yoduro de potasio, cloruro de cesio, acrilamida, dimetil sulfóxido, dimetil formamida, ácido acético glacial 99.7 % (Baker), Tris-HCl, N-acetil tirosinamida y N-acetil triptofanamida (Sigma), 1,5-IAEDANS (5 - (((2-iodoacetil) amino) etil) amino) naftaleno-1-ácido sulfónico) y FM (fluoresceína maleimida) de Molecular Probes (Eugene OR). Todos los demás reactivos utilizados fueron de grado comercial analítico o espectroscópico.

Todos los reactivos fueron empleados sin purificación posterior. Las disoluciones fueron preparadas momentos antes de iniciar los experimentos con agua bidestilada con el equipo Milli-Q Water Reagents Systems.

4.1.1 Características de 1,5-IAEDANS y fluoresceína maleimida (FM): El 5-(((2-iodoacetil)amino)etil)amino)naftaleno-1-ácido sulfónico (1,5-IAEDANS) (Fig. 12) se une covalentemente a las cisteínas de las proteínas:

1,5-IAEDANS presenta un máximo de absorción en 336 nm. Su fluorescencia depende de la polaridad del medio, en agua el máximo de emisión se observa en 482 nm, en soluciones apolares el máximo se desplaza a longitudes de onda menores, es decir, hacia el azul y la intensidad de la fluorescencia aumenta. El tiempo de vida media de la fluorescencia del 1,5-IAEDANS es de 20 ns. La emisión del 1,5-IAEDANS se sobrepone con la absorbancia de la fluoresceína maleimida (FM), lo que lo hace un reactivo excelente como donador en la transferencia de energía a la FM [Lackowicz, J.R., 1983]. La FM (Fig.12) se une covalentemente a cisteínas y tiene un máximo de absorción de a 490 nm, su máximo de emisión está a 515 nm.

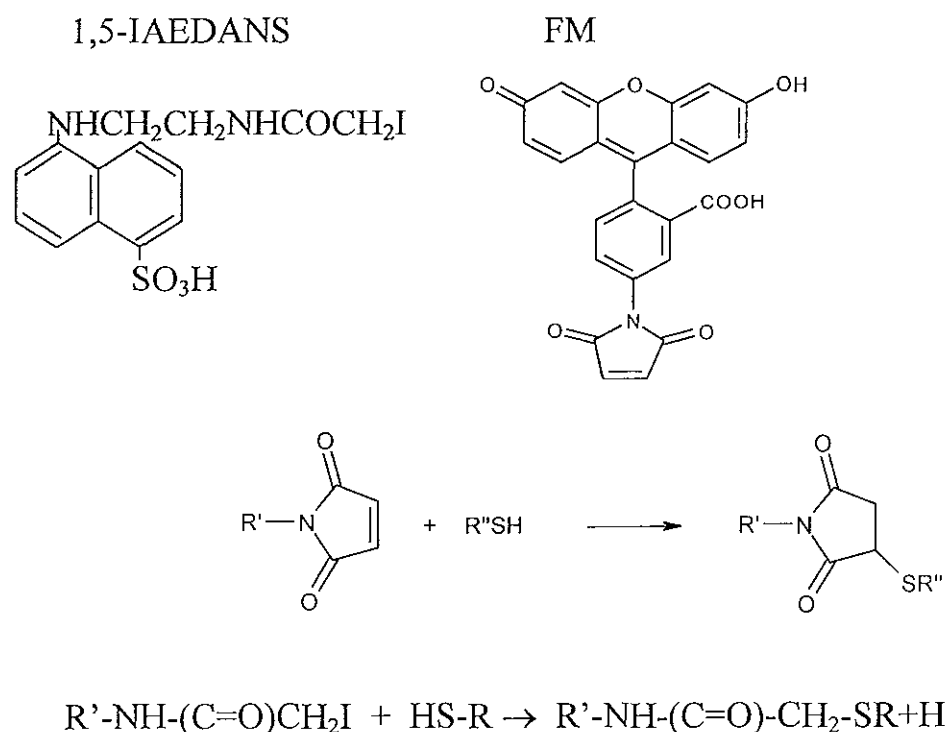


Figura 12. Estructura de los fluoróforos 1,5-IAEDANS y FM, y su correspondiente reacción con cisteínas.

4.1.2 Diseño y síntesis de los péptidos A β y sus derivados fluorescentes

Los péptidos fueron proporcionados por el laboratorio del Dr. Charles Glabe de la Universidad de California en Irvine, donde se cuenta con la unidad de síntesis en que se obtienen los péptidos. La estructura se verificó por secuenciación y espectrometría de masas según se ha descrito previamente [Burdick *et al.*, 1992]. Se utilizó el péptido de longitud de 40 aminoácidos, ya que por sus características este péptido se obtiene con un 95% de pureza. Se sintetizaron varios análogos de A β 1-40 conteniendo una sola sustitución de un aminoácido (cisteína) en la secuencia del péptido. La cisteína se escogió por su capacidad química reactiva única, ya que este aminoácido no está presente en la secuencia del péptido nativo. Los péptidos sintetizados conteniendo una cisteína se denominaron de la siguiente manera: por ejemplo la cisteína en la posición 4 es A β C4 y la sustitución de la cisteína en la posición 34 es A β C34. Para la realización de este trabajo se sintetizaron:

A β C4

A β C7

A β C25

A β C34

Los péptidos radioactivos [^3H]A β -(1-40) y [^{14}C]A β -(1-40) se sintetizaron por la incorporación de Fmoc- ^3H]Phe o Fmoc- ^{14}C]Ala en las posiciones 4 y 2 respectivamente, obteniéndose actividades específicas de 200 mCi/mmol para [^3H]A β -(1-40) y 36 mCi/mmol para [^{14}C]A β -(1-40).

Como en la secuencia original no está presente el triptofano se pensó en sustituir algunos aminoácidos en la secuencia del péptido por este residuo, esto nos permitió usar este monitor fluorescente como donador para experimentos de transferencia de energía. Se sustituyó por triptofano a la fenilalanina en la posición

4, y a la tirosina en la posición 10. Además, se sintetizaron dos mutantes del péptido amiloide donde se sustituyó por el triptofano a la lisina en la posición 34 y a la valina en la posición 40. Los péptidos se liofilizaron y se disolvieron en agua o dimetilsulfóxido (DMSO) en una concentración de 230 μM (1 mg/ml) con el fin de tener disoluciones concentradas para ser usadas en los experimentos. Los péptidos sintetizados conteniendo un triptofano para el desarrollo de este proyecto fueron los siguientes:

A β F4W

A β Y10W

A β L34W

A β V40W

4.2 Cálculos y ajustes

Todos los cálculos y ajustes de regresión lineal y no lineal requeridos se llevaron a cabo con el programa Microcal Origin versión 3.5, tomando como criterio el mejor ajuste que reproduzca parámetros físicamente congruentes con las observaciones experimentales y modelos empleados.

El programa Origin emplea el algoritmo Levenberg-Marquardt [Press *et al.*, 1988] y el método simplex [Nelder y Mead, 1965] para el ajuste no lineal de mínimos cuadrados. Este método está entre los más empleados en la estimación de parámetros. Encuentra los parámetros de un modelo especificado por minimización de los valores de chi χ [MicroCal Software, 1993]. Para hacer el proceso de ajustes más estables incluyen restricciones lineales basadas en un método de programación cuadrático [Shrange, 1972].

4.3 Mediciones de Fluorescencia

Los espectros de emisión se obtuvieron en los fluorómetros SLM-AMINCO 48000 y SPEX-FLUOROLOG equipados con un baño de circulación de agua ($T=25^{\circ}$ C), apertura de excitación 2 nm, apertura de emisión de 8 nm. La fluorescencia intrínseca del péptido amiloide se midió de 285 a 400 nm bajo una excitación a 275 nm. En el caso de A β C25AEDANS o en los experimentos de transferencia de energía la excitación fue a 330 nm y los espectros se obtuvieron de 340 a 620 nm. En todos los casos se restaron los espectros de emisión de los blancos.

4.3.1 Medición y cálculo de las vidas medias de fluorescencia

La vida media de la fluorescencia de una molécula representa el promedio o la cantidad de tiempo que la molécula está en el estado excitado antes de que ésta regrese a su estado basal. Los cálculos de las vidas medias son muy útiles en la espectroscopía de fluorescencia. El cálculo de la vida media resulta un poco complicado debido a que este valor generalmente es cercano a 10 nanosegundos. Existen dos métodos para el cálculo de las vidas medias de fluorescencia. El método de conteo unitario de fotón y el método de modulación y fase. En el método de conteo unitario de fotón (Fig.15) la muestra se excita con un breve pulso de luz, posteriormente se mide el tiempo del decaimiento de la fluorescencia, como fuente de excitación se utiliza una lámpara de flash o de destello [Lakowicz, 1983]. El tiempo que se mide es el intervalo entre el pulso breve de luz y la llegada de este pulso al ánodo del fotomultiplicador. La intensidad se ajusta de tal manera que sólo un fotón unitario se observe por cada 20 pulsos. Si sólo arriba un fotón entonces el tiempo de llegada refleja el decaimiento dependiente del tiempo. Si muchos fotones arriban el total de éstos refleja el decaimiento dependiente del tiempo.

La distribución de los tiempos de arribo representa la curva del decaimiento. El objetivo de estas mediciones es cuantificar el decaimiento de la fluorescencia dependiente del tiempo $[F(t)]$. Para un solo fluoróforo el cual decae exponencialmente se tiene:

$$F(t) = F_0 e^{-t/\tau}$$

Donde F_0 es la intensidad de fluorescencia en el tiempo inicial. Generalmente los decaimientos no se ajustan a una sola exponencial. En estos casos el decaimiento observado generalmente se ajusta a una suma de exponenciales:

$$F(t) = \sum a_i e^{-t/\tau_i}$$

Donde a_i es un factor preexponencial que representa la fracción de la contribución del componente con una vida media τ_i al decaimiento dependiente del tiempo.

En el presente trabajo utilizamos el método de conteo de fotón unitario para el cálculo de las vidas medias de fluorescencia de los mutantes en el estado dimérico y fibrilar. La vida media se calculó según la siguiente ecuación

$$\langle \tau \rangle = \frac{\sum a_i \tau_i}{\sum a_i} \quad \text{Ecuación 8}$$

En donde τ es la vida media de la fluorescencia y a el valor pre-exponencial, las muestras fueron excitadas a 295 nm

En el método de fase-modulación la muestra se excita con luz modulada sinusoidalmente. El corrimiento de la fase y desmodulación de la emisión relacionado con la incidencia de luz, se utiliza para el cálculo de la vida media. Como fuente de excitación generalmente se utiliza un láser [Lakowicz, 1983.]

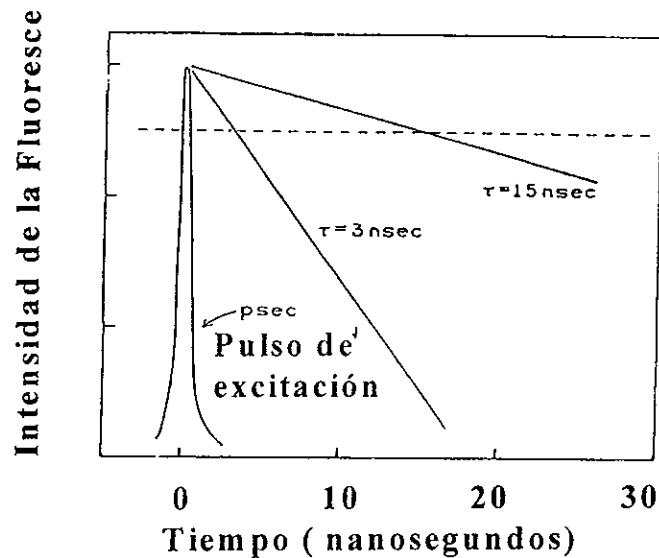


Figura 13. Descripción esquemática de las mediciones de la vida media de la fluorescencia por el método de conteo unitario.

4.4 Condiciones de Marcaje de los péptidos análogos A β con sondas fluorescentes

La reacción de marcaje de los péptidos análogos A β que contienen una sola cisteína se llevó a cabo con los reactivos fluorescentes específicos para cisteína y se realizó a pH 8.5 en amortiguador MOPS 10 mM. La concentración de proteína fue de 25 μM con un exceso 3 veces molar de fluoróforo, 1:3 (péptido:fluoróforo) para 1,5-IAEDANS (disuelto en dimetil-sulfóxido DMSO) y 1:12 para la FM (disuelta en dimetil-formamida, DMF) y un período de incubación de 15 horas en la oscuridad. Como generalmente la reacción de marcaje de una proteína o péptido con un fluoróforo se lleva a cabo a altas concentraciones del fluoróforo, es necesario eliminar el fluoróforo libre. Esto se puede hacer al filtrar la muestra con proteína marcada a través de una columna de sephadex G-25 equilibrada con MOPS 10 mM, pH 7.4, que retenga al fluoróforo libre. Mediante una cromatografía de capa fina y por espectrometría de masas, fue posible confirmar que el producto

final de la reacción fue solamente el péptido marcado, es decir, se eliminó el fluoróforo libre.

4.5 Cromatografía de filtración en Gel

La cromatografía de filtración en gel es también llamada cromatografía de exclusión y consiste en la separación de la muestra en base a su peso molecular. Los geles son típicamente soportes de acrilamida o agarosa con diversos tamaños de poros. Estos poros tienen la función de restringir la elución de las especies moleculares que presentan un tamaño menor como para atravesar los poros. Las moléculas más grandes se excluyen de los poros y pasan a través de la columna rápidamente. Este método se usa ampliamente para la separación y determinación de los pesos moleculares de proteínas, para la separación de complejos proteicos entre otras cosas. Los experimentos de filtración en gel se realizaron usando una columna Superdex 75 HR 10/30 de Pharmacia-Biotec. Los péptidos nativos se detectaron en 280 nm en un detector UV (Water System) y los péptidos fluorescentes en 482 (1,5-IAEDANS) ó 520 nm (FM) en un detector para fluorescencia HP3250. El amortiguador de elución utilizado fue Tris-HCl 50 mM / NaCl 0.1 M pH 7.4 en presencia de 2 ó 10 % de DMSO. El flujo se mantuvo a 0.4 mL/min. La columna se calibró con los siguientes estándares cuyas masas moleculares se expresan en KDa: tiroglobulina (670), albúmina de suero bovino (68), ovalbúmina (43), inhibidor de tripsina (23), ubiquitina (8.5) y aprotinina (6.5). Se obtuvo una curva de calibración del peso molecular en función del coeficiente de distribución (K_{av}) de la proteína entre las fases estacionaria y mobil según la siguiente ecuación:

$$K_{av} = (V_R - V_o) / (V_R - V_o)$$

Donde V_o es el volumen vacío de la columna, V_R es el volumen de elución de la proteína y V_c es el volumen geométrico de la resina en ml.

4.6 Mediciones de Absorbancia

Las mediciones de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro UV-Vis Perkin Elmer 3B. Para el cálculo de la estequiometría del marcaje de ABIAEDANS y AβFM la concentración de proteína se midió por el método de Lowry [1951] y la concentración de los fluoróforos se determinó al medir la absorbancia de 1,5-IAEDANS a 336 nm o de FM a 490 nm, utilizando los coeficientes de extinción molar respectivos (ϵ):

$$[\text{Concentración del fluoróforo}] = A/\epsilon \cdot l$$

$$[1,5\text{-}1,5\text{-IAEDANS}] = A_{336}/5.7 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$[\text{FM}] = A_{490}/83 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

4.6.1 Estimación de la concentración de proteína

El contenido en proteína de los péptidos nativo y fluorescentes se determinó siguiendo el método descrito por Lowry [1951] basado en la utilización del colorante azul de Coomasie. Este colorante existe en dos formas de diferente color, azul y rojo. La forma roja, G-250, se convierte en azul cuando el colorante se une a proteína, produciéndose un aumento en el máximo de absorción desde 465 a 595 nm. La medición de la absorbancia en 595 nm proporciona una estimación directa del contenido de proteína en la muestra, una vez trazada una recta patrón con concentraciones de proteína conocidas, ya que la cantidad de colorante rojo que pasa a azul es proporcional a la concentración de proteína presente y proporcional también a la absorbancia en 595 nm.

En el presente trabajo se utilizó el reactivo comercial azul de Coomassie “Bio-Rad protein assay” (Bio-Rad). Como amortiguador de dilución se utilizó Tris-HCl 20 mM / pH 7.4 y como solución concentrada de proteína para el trazado de la

recta patrón 0, 2.5, 5, 10, 15 μg de seroalbúmina bovina (Sigma) en un volumen total solución de proteína + amortiguador de 1ml para el ensayo normal.

4.7 Mediciones de Agregación

4.7.1 Método de sedimentación

La agregación se determinó usando el método de sedimentación descrito previamente [Burdick *et al.*, 1992]. Este análisis consiste en separar el péptido agregado del soluble mediante centrifugación y subsecuentemente cuantificar la cantidad de péptido en el precipitado y en el sobrenadante mediante radiactividad y fluorescencia. Para este tipo de experimento se utilizó un péptido amiloide conteniendo una marca radioactiva en la posición 3 de la secuencia. El péptido radioactivo se añadió con el propósito de cuantificar por radiactividad la cantidad de péptido soluble y péptido agregado. [^3H]A β -(1-40) 75 μM se mezclaron con el péptido amiloide fluorescente 5 μM en tres condiciones que promueven la fibrilización: ácido acético 0.1M pH 5.0, NaCl 0.1 M / Tris-HCl 20 mM pH 7.4 y NaCl 0.1 M / Tris-HCl 20 mM pH 7.4 en presencia de ZnCl_2 70 μM . Los péptidos se incubaron por 48 h a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron por 10 min. a 15 000 rpm. Posteriormente se determinó el porcentaje de péptido fluorescente y radioactivo en el sobrenadante y en el precipitado por fluorescencia y por el conteo de radioactividad. El porcentaje de sedimentación se calculó por el cociente del péptido precipitado entre la suma total del péptido soluble más el precipitado. Como control para estos experimentos se utilizó el péptido nativo A β 1-40 en una concentración de 5 μM mezclado también con [^3H]A β -(1-40) 75 μM .

4.7.2 Determinación del agregado fibrilar por el método fluorescente de Tioflavina T

Para observar la formación del agregado fibrilar se empleó el método fluorescente de unión a la Tioflavina T (THT) [Levine, 1993]. Éste es un marcador fluorescente que tiene la propiedad de incrementar su fluorescencia en proteínas oligoméricas que poseen un alto contenido de hojas beta. Los péptidos se incubaron por 24 horas a 37^o C en amortiguador Tris HCl 10mM /NaCl 0.1M pH 7.4 en una concentración de proteína de 230 μ M, bajo agitación constante. Después de 24 horas, 10 μ l de la muestra (230 μ M) se disolvieron en 2 ml de una disolución de THT 3 μ M a pH 7.4. Se midió la emisión de la fluorescencia en 482 nm, $\lambda_{exc} = 450$ nm usando un espectrofluorímetro Spex-Fluorolog.

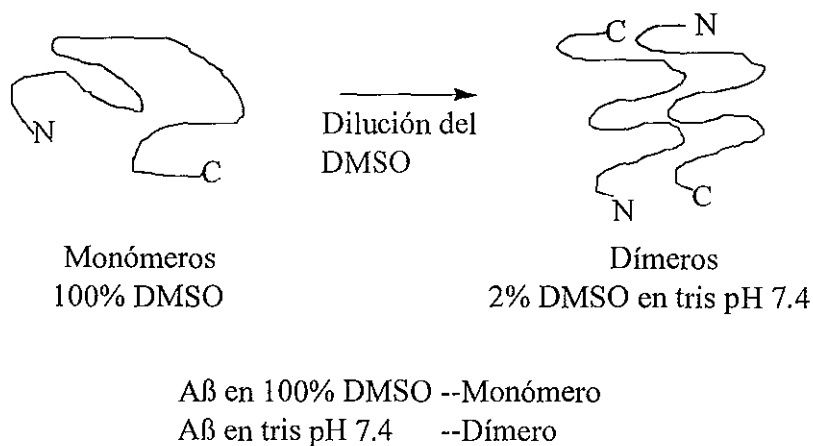
4.7.3 Microscopía electrónica

Para los experimentos de microscopía electrónica los péptidos se incubaron por 24 horas con agitación constante. Posteriormente 5 μ L de la muestra se depositaron en un disco para microscopía y después se tiñeron con una solución de acetato de uranilo al 2%. Los discos se visualizaron usando un microscopio electrónico Zeiss 10 CR microscopio (80 kV).

4.8 Desnaturalización de A β en dimetil-sulfóxido y su reasociación

El péptido amiloide nativo o fluorescente en una concentración de 11 μ M se incubó con diferentes concentraciones de dimetilsulfóxido a temperatura ambiente. Los espectros de emisión se obtuvieron después de 30 min. de incubación de 290 a 400 nm, $\lambda_{exc} = 280$ nm (o para A β C25AEDANS de 346 a 600 nm a $\lambda_{exc} = 336$ nm). Para los experimentos de replegamiento las muestras en 100% de DMSO se incubaron por 30 min. a temperatura ambiente y el replegamiento se inició después

de diluir 10 ó 50 veces el disolvente en solución amortiguadora Tris-HCl (esquema 1). El intervalo de concentración del péptido fue entre 3 y 10 μM .

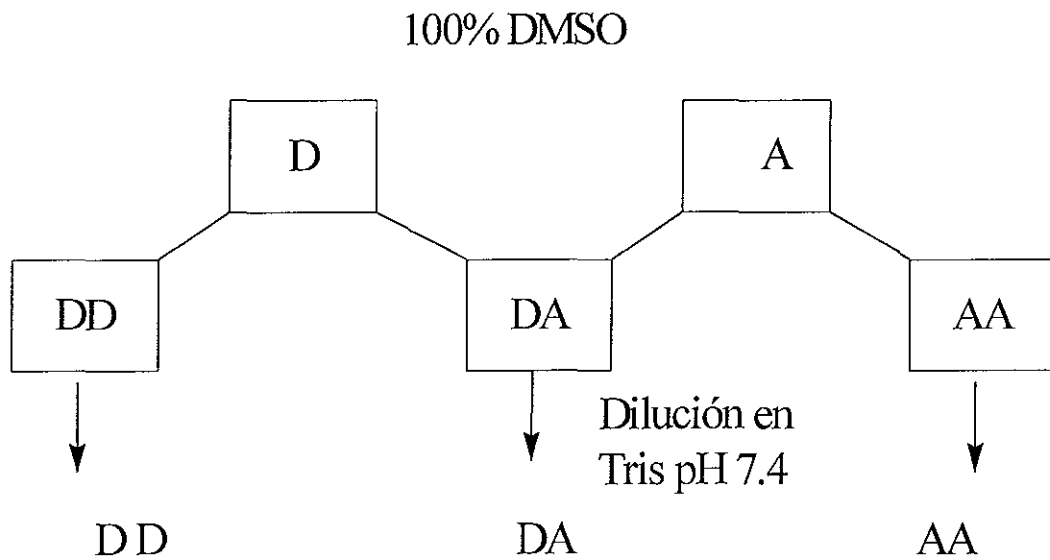


Esquema 1. Protocolo para los experimentos de reasociación del péptido amiloide.

4.9 Mediciones para el cálculo de la transferencia de energía

La eficiencia E de la transferencia de energía entre las marcas fluorogénicas se determinó midiendo la intensidad de fluorescencia del donador A β C-1,5-IAEDANS o A β 1-40 en ausencia y en presencia del aceptor A β C-FM o A β Y10W según la ecuación 4. La eficiencia de la transferencia de energía depende del inverso de la sexta potencia de la distancia entre el donador y el aceptor [Lakowicz, 1983; Wu. y Brand, 1994]. Esto permite usar las mediciones de transferencia de energía con una alta sensibilidad para monitorear la asociación de las monómeros fluorescentes de A β 1-40 durante el replegamiento del péptido en solución acuosa. Las soluciones concentradas del péptido en DMSO se mezclaron en una relación equimolar y se diluyeron 10 ó 50 veces (con objeto de diluir el DMSO a concentraciones subdesnaturalizantes) en Tris-HCl 50 mM / NaCl 0.1 M, pH 7.4, y

los espectros de emisión se midieron a varios tiempos después de la dilución. Los controles consistieron en diluir los péptidos donador y aceptor por separado o el donador o el aceptor en DMSO mezclado con una cantidad igual de Aβ1-40 no marcado y posteriormente diluir el DMSO con el fin de iniciar el replegamiento (Esquema 2).



- $D+A=DA+DD+AA$
- DA detectado por FRET ($E=1-F_{da}/F_d$)
- Filtración en Gel

Esquema 2. Protocolo para los experimentos de transferencia de energía (FRET) con los péptidos amiloides fluorescentes. D = donador monómero, A = aceptor monómero, DA=heterodímero, DD= donador homodímero, AA= aceptor homodímero. El heterodímero se detectó por transferencia de energía del donador hacia el aceptor y posteriormente la muestra se analizó por cromatografía de filtración en gel.

4.10 Mediciones para los experimentos de apagamiento de la fluorescencia

Los datos de apagamiento se expresaron en forma de gráficas de Stern-Volmer en las cuales se graficó el cociente de la intensidad de fluorescencia en ausencia del apagador (F_0) entre la intensidad en presencia del apagador (F) en función de la concentración del apagador (Q).

Los experimentos de apagamiento de la fluorescencia se realizaron en 2 condiciones diferentes, es decir, con los péptidos en estado dimérico y fibrilar. Para los péptidos en el estado dimérico se prepararon soluciones concentradas de los apagadores (5 M), y se añadieron alícuotas de éstas a una celda que contiene la proteína del péptido amiloide en una concentración de 10 μ M preparada en el amortiguador Tris HCl 10mM /NaCl 0.1M, pH 7.4. Para los experimentos con los péptidos en estado fibrilar, los péptidos amiloides se incubaron en una concentración de 230 μ M en el amortiguador Tris-HCl 10mM /NaCl 0.1M, pH 7.4 por 24 horas, en agitación constante. Posteriormente se tomaron alícuotas de las soluciones concentradas de apagador y se añadieron al péptido amiloide cuya concentración final fue de 10 μ M. Los experimentos de apagamiento de la fluorescencia se realizaron a $\lambda_{exc} = 280$ nm y midiendo su emisión a 310 nm para los péptidos A β 1-40 y A β 1-42. En el caso del péptido A β F4W la excitación fue en 295 nm y su emisión en 350 nm. Los datos obtenidos en los experimentos de apagamiento se analizaron según las ecuaciones 6 y 7, mediante ellas se calcularon la constante de apagamiento de Stern-Volmer (K_{SV}) y la constante bimolecular de apagamiento (k_q).

5. RESULTADOS

5.1 Transferencia de energía para investigar la estructura y el ensamblaje del péptido amiloide

5.1.1 Diseño de los péptidos amiloides

Para la realización de este proyecto se sintetizaron una serie de análogos A β -fluorescentes para ser usados como monitores de los procesos de dimerización, agregación e interacción con metales. Para demostrar la validez del método fluorescente, se sintetizaron varios análogos de A β 1-40 con una sola sustitución de un aminoácido (cisteína). La cisteína se escogió por su capacidad química reactiva única, ya que este aminoácido no está presente en la secuencia del péptido nativo.

Los péptidos sintetizados se marcaron covalentemente con una variedad de sondas fluorescentes extrínsecas. La nomenclatura para denominar a los péptidos fluorescentes es la siguiente: la cisteína en la posición 4 es A β C4 y la sustitución de la cisteína en la posición 34 es A β C34. La modificación del péptido A β con derivados fluorescentes puede alterar la estructura y las propiedades de A β . Nosotros escogimos estas diferentes sustituciones, además, con el propósito de conocer la probabilidad y el grado en que esta modificación pueden alterar la estructura.

Se escogió a los marcadores fluorescentes 1,5-IAEDANS y fluoresceína maleimida FM, ya que éstos han sido ampliamente utilizados en estudios de fluorescencia de proteínas. Además, el solapamiento del espectro de emisión de 1,5-IAEDANS como donador, con el espectro de absorción de la fluoresceína

maleimida (FM) como aceptor nos indica que estas sondas fluorescentes pueden ser utilizadas para experimentos de transferencia de energía. Este par ha sido utilizado en otros estudios de transferencia de energía [Sepúlveda-Becerra *et al.*, 1996]. Para los experimentos de transferencia de energía, se utilizaron los mutantes del A β 1-40 marcadas con 1,5-IAEDANS en las posiciones 25 y 34 y las marcadas con FM en las posiciones 4 y 7. Mediante la espectrometría de masas se confirmó el peso molecular esperado del producto final, además de que la ausencia del péptido precursor indicó que el marcaje fue total. También se sintetizó un péptido conteniendo Trp en lugar de Tyr en la posición 10 con el fin de usarlo como donador para la tirosina del péptido nativo.

5.1.2 Propiedades de agregación de los péptidos A β fluorescentes

Una posible complicación en la modificación del péptido con sondas fluorescentes, es la alteración de la estructura y las propiedades del péptido amiloide. Por esta razón, se comparó la agregación de los derivados fluorescentes con el péptido nativo A β en condiciones fisiológicas donde es totalmente soluble, es decir, a pH 7.4. Las condiciones en que se promueve la fibrilización son a pH=5.0 [Burdick *et al.*, 1992] y en presencia de Zn²⁺, donde se ha informado que el péptido tiende también a agregarse [Bush *et al.*, 1994] (Fig. 14).

Se diseñaron y estudiaron aquellos derivados fluorescentes que presentaron más similitud con el péptido nativo. A pH 7.4 y pH 5.0 los péptidos fluorescentes se comportaron de manera muy similar al péptido nativo A β 1-40. En presencia de Zn²⁺ 70 μ M los péptidos marcados con fluoresceína y 1,5-IAEDANS se agregaron aproximadamente 50-75% con respecto al péptido nativo A β 1-40.

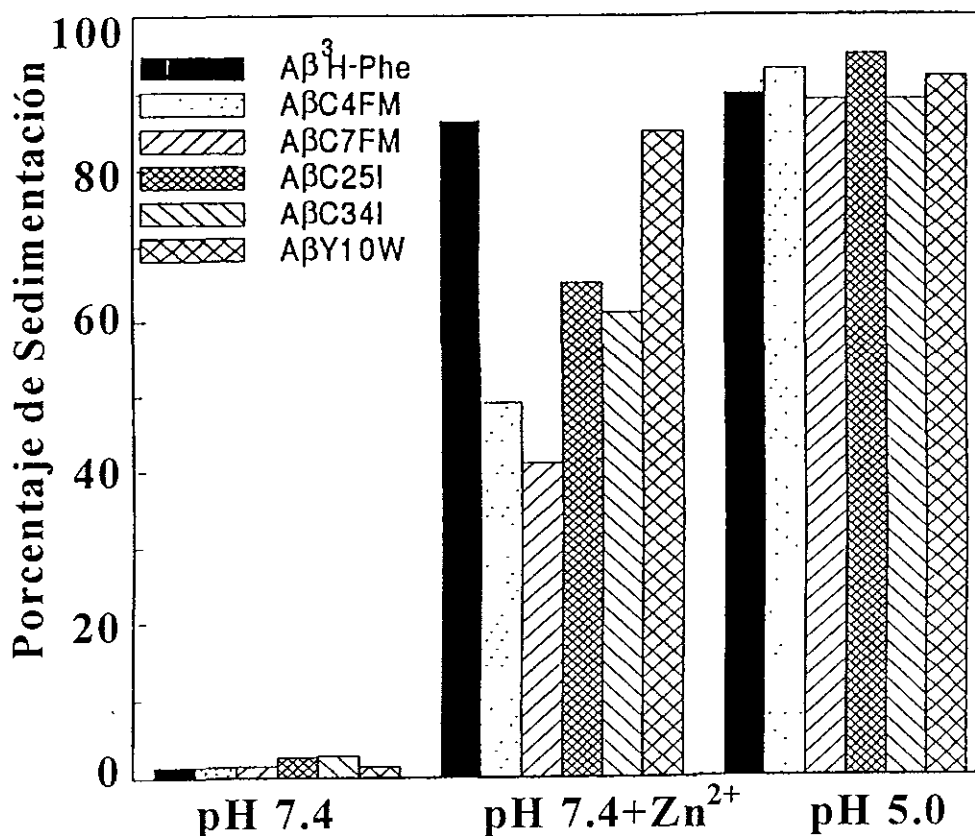


Figura 14. Propiedades de agregación de los derivados fluorescentes del péptido amiloide Aβ1-40. La gráfica muestra la comparación de las propiedades de agregación de los péptidos con marcas fluorescentes y el péptido nativo Aβ1-40, en condiciones fisiológicas (Tris.HCl 10 mM, pH 7.4) en donde el péptido es soluble y bajo las dos condiciones que promueven la fibrilización: a pH 7.4 en presencia de Zn²⁺ y a pH 5.0.

La sustitución de la tirosina por triptofano no alteró el grado de agregación en presencia de Zn²⁺. El estado oligomérico de los péptidos fluorescentes se caracterizó por cromatografía de filtración en gel y se encontró que los péptidos marcados con fluoresceína y 1,5-IAEDANS (AβC25AEDANS y AβC7FM) tienen el mismo tiempo de elución que el péptido Aβ1-40 (Fig. 15A).

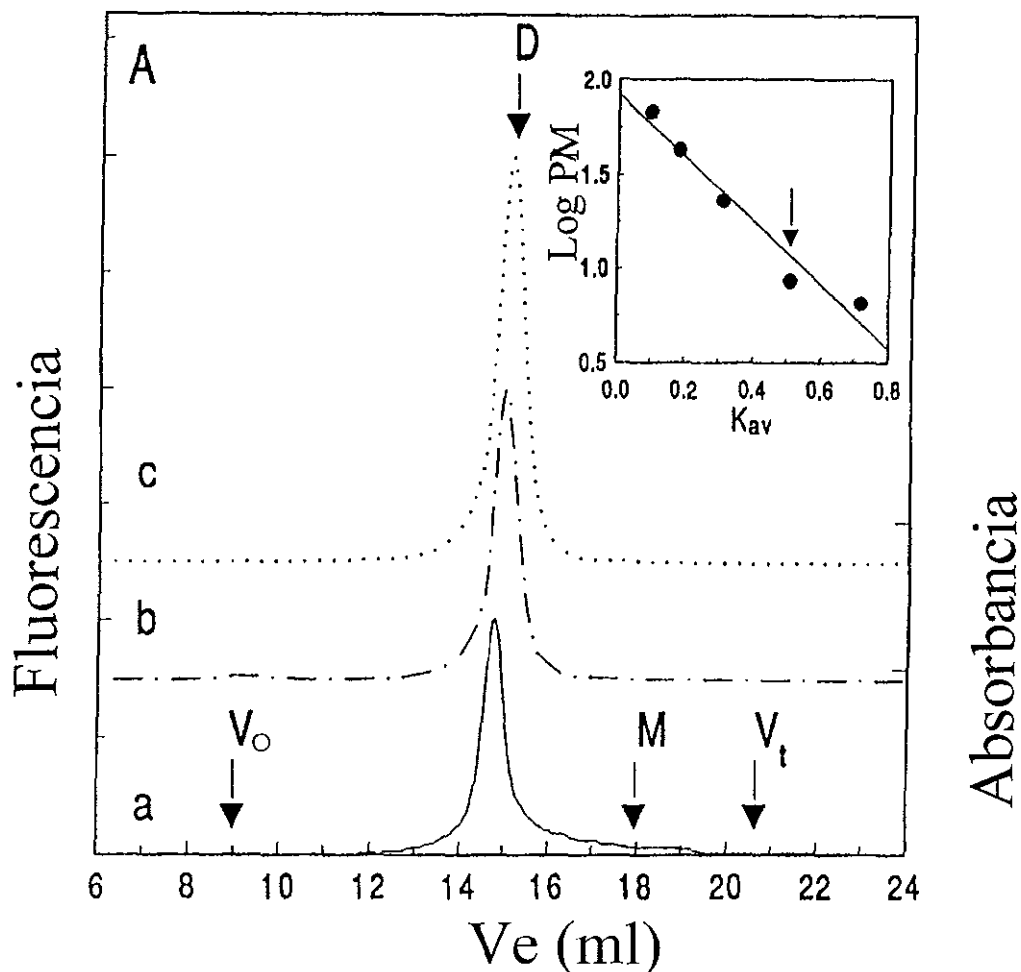


Figura 15 A. Cromatografía de filtración en gel de los derivados fluorescentes de A β 1-40. El cromatograma **a** muestra el perfil de elución del péptido nativo A β 1-40 detectado por absorbancia a 280 nm y los cromatogramas **b** y **c** corresponden a la elución de ABC25AEDANS y ABC7FM detectados por fluorescencia en 482 y 520 nm respectivamente. Las letras en la figura corresponden a: D dímero, M monómero, V_o volumen vacío, V_t volumen total de elución. La esquina superior derecha muestra la curva de calibración para la columna usando una serie de péptidos y estándares de proteínas como se describe en métodos.

La columna se calibró con diferentes estándares de peso molecular y se encontró que la posición de elución de ABC25AEDANS y ABC7FM corresponde a una estructura dimérica de 9000 daltones, los otros péptidos fluorescentes que se usaron en el presente trabajo también eluyeron a mismo tiempo. La curva de calibración también nos indicó que no se detectó el péptido monomérico A β 1-40. También utilizamos en el presente trabajo un péptido con una marca radioactiva de carbono ^{14}C en la posición 3 en la secuencia del péptido amiloide (Fig. 15B), con el

fin de observar si este péptido radiactivo presenta el mismo tiempo de elución en concentraciones fisiológicas nanomolares. El péptido ^{14}C -A β 1-40 mostró el mismo tiempo de elución para una concentración de 2 nM.

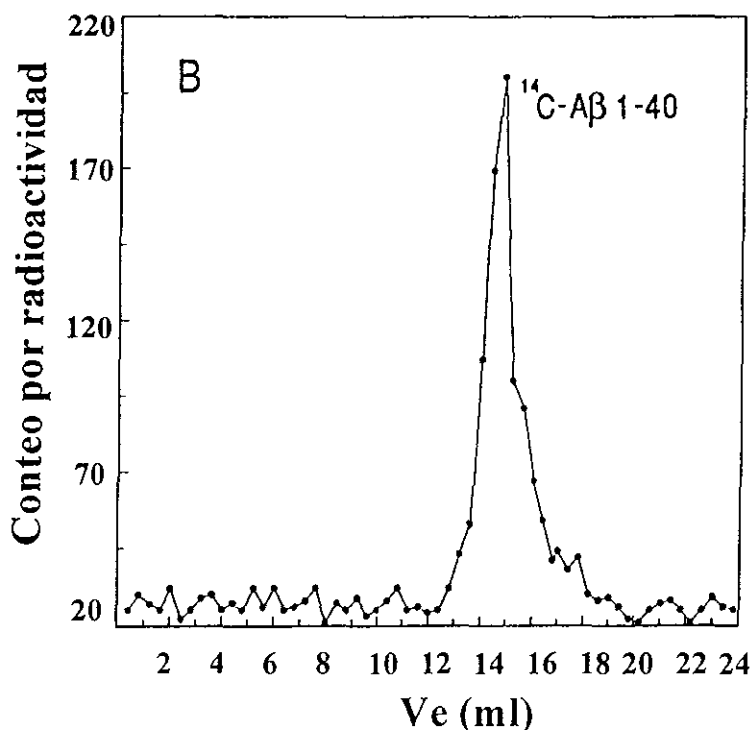


Figura 15 B. La gráfica muestra el perfil de elución de una concentración fisiológica de 2 nM del péptido radiactivo ^{14}C -A β 1-40 detectado por conteo de radioactividad.

Debido a que la cromatografía de filtración en gel solamente mide la relación hidrodinámica de Stokes, este parámetro de elución no es definitivamente una evidencia de que el pico represente una estructura dimérica. Por esta razón se empleó la transferencia de energía para obtener una demostración más de la existencia del dímero en disolución acuosa.

5.1.3 Desnaturalización de A β en dimetil-sulfóxido y su reasociación

Para determinar la estructura de A β 1-40 por medio de la transferencia de energía, se establecieron las condiciones para la desnaturalización y reasociación de A β 1-40. Usando la espectroscopía de infrarrojo (transformada de Fourier) y la espectroscopía dinámica de dispersión de la luz, algunos investigadores encontraron que el péptido amiloide A β en de dimetilsulfóxido (DMSO) se encuentra en estado monomérico [Snyder *et al.*, 1994]. En el presente trabajo nosotros usamos la fluorescencia de la tirosina del péptido amiloide para estudiar la desnaturalización de A β en dimetilsulfóxido y su reasociación.

La fluorescencia intrínseca de las proteínas nos da una idea de los cambios conformacionales y desnaturalización [Lakowicz, 1983]. La emisión de la tirosina para la mayoría de las proteínas y péptidos generalmente es pequeña debido a la presencia de residuos de triptofanos los cuales son aceptores de la fluorescencia de la tirosina y sensibles a la polaridad del medio [Lakowicz, 1983], pero el triptofano está ausente en la secuencia del péptido amiloide.

En la curva de desnaturalización de A β 1-40 (Fig. 16), al incrementar la concentración de dimetilsulfóxido se observa un incremento en la intensidad de fluorescencia de A β 1-40, indicando que la exposición del residuo de tirosina aumenta en forma significativa en el estado desnaturalizado (100% DMSO), el punto medio de la transición ocurre a una concentración de 40 % de DMSO. El máximo de emisión de la fluorescencia de la tirosina no cambió en presencia de DMSO permaneciendo el mismo en todas las concentraciones (308 nm), esto se

debe a que la fluorescencia de la tirosina no es sensible a la polaridad del disolvente [Lakowicz, 1983].

Para asegurar que la curva representa la desnaturalización de A β 1-40, todos los puntos se corrigieron por cualquier efecto que pudiera presentar el dimetilsulfóxido en presencia de tirosina libre. También se estudió la desnaturalización de los péptidos fluorescentes; el 1,5-IAEDANS es una sonda fluorescente que es sensible a la polaridad del medio [Lakowicz, 1983]. Para el péptido fluorescente A β C25AEDANS se observó un corrimiento (42 nm) de la emisión al desnaturalizar al péptido en presencia de DMSO (Fig. 16), sugiriendo que al incrementar la concentración de DMSO, el 1,5-IAEDANS está más expuesto al medio. Al igual que con la fluorescencia de la tirosina, el punto medio de la transición ocurre a una concentración aproximada de 50% DMSO. La curva mostró que a concentraciones menores de 10% de DMSO existen muy pocos cambios en la fluorescencia de la tirosina o del péptido fluorescente A β C25AEDANS (Fig.16).

Estos resultados indicaron que estos péptidos tienen la misma estabilidad y sugieren que a concentraciones menores de 10% de DMSO ocurren muy pocos cambios en la estructura del péptido amiloide. También se estudió el replegamiento de A β 1-40, después de diluir el DMSO. Posterior a la incubación de los péptidos en 100% de DMSO, éstos se diluyeron 10 veces en un amortiguador a pH 7.4. Se observó que el espectro de emisión de A β 1-40 y A β C25AEDANS presentaron el mismo máximo de emisión en 308 nm y 494 nm, respectivamente que los péptidos disueltos directamente en un amortiguador a pH 7.4. Este experimento mostró que después de diluir al disolvente, la fluorescencia intrínseca de la tirosina y del

péptido fluorescente se recupera casi totalmente (Fig. 17 A y B) y, por consiguiente, se recupera la conformación del péptido.

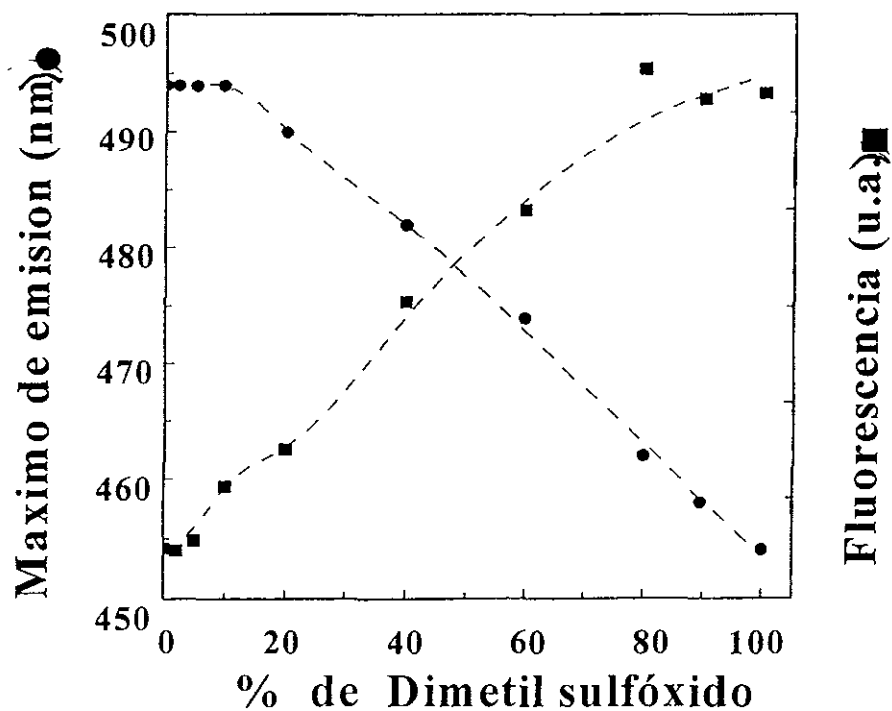


Figura 16. Desnaturalización de Aβ1-40 medido por la fluorescencia de la tirosina y del 1,5-1,5-IAEDANS. Las curvas del desplegamiento en el equilibrio se monitorearon al medir la fluorescencia intrínseca de tirosina en 308 nm (■) (280 nm de excitación), y la fluorescencia de ABC25AEDANS en 482 nm (●) (336 nm de excitación).

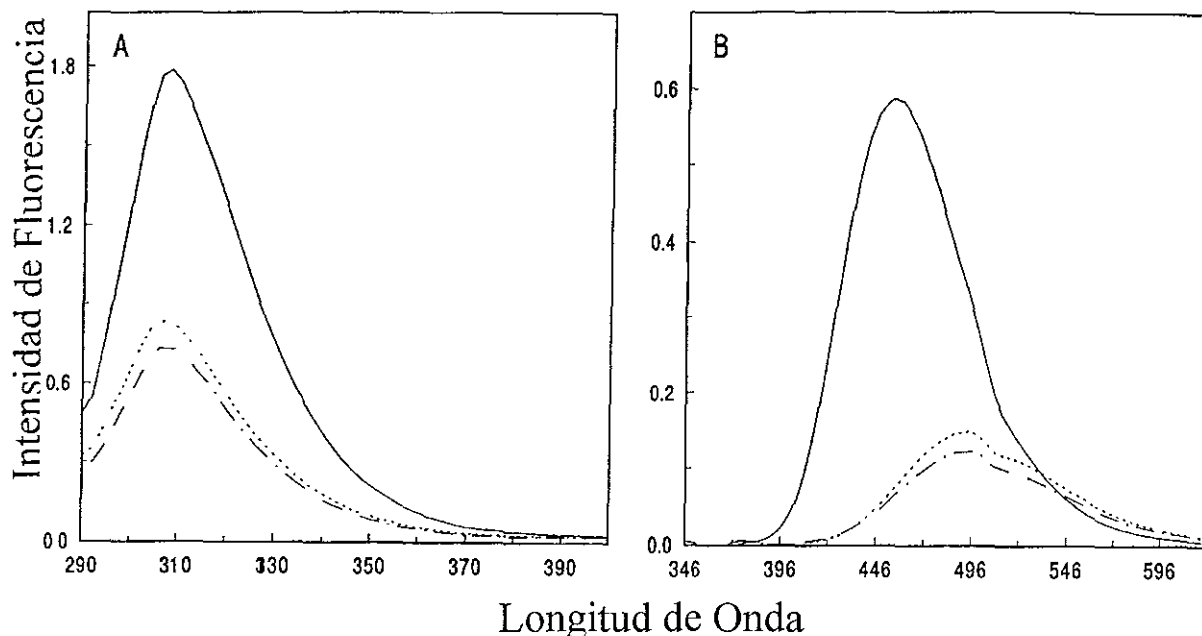


Figura 17. Renaturalización de A β 1-40 medido por la fluorescencia de tirosina (A) y de 1,5-IAEDANS (B). Se muestran los espectros de emisión del péptido en amortiguador A (---), el péptido en 100% de dimetilsulfóxido (—), y el péptido disuelto en dimetilsulfóxido (100%) y después diluido 10 veces en el amortiguador A (.....).

5.1.4 Asociación de los péptidos fluorescentes: transferencia de energía

El estudio de la reasociación de los péptidos, con sondas fluorescentes distintas que presentan transferencia de energía, brindó alternativas para caracterizar los cambios estructurales globales durante la desnaturalización y renaturalización. Lo anterior se realizó utilizando la estrategia más usual para estudiar la reasociación, que consiste en: desnaturalizar la proteína con un agente caotrópico o disolvente orgánico y después diluir el desnaturalizante para permitir el repliegamiento (ver esquema 1 en métodos).

Para investigar la dinámica de los derivados fluorescentes A β se realizaron experimentos de transferencia de energía para estudiar la dimerización. Mediante la fluorescencia se observó la eficiencia de la transferencia de energía lo que permitió

estudiar cómo ocurre la formación del estado dimérico al disolver al péptido en dimetilsulfóxido y posteriormente diluirlo en un amortiguador a pH 7.4, en concentraciones donde se ha informado que no ocurre la polimerización. Los resultados mostraron que al mezclar el péptido A β marcado con 1,5-IAEDANS (donador A β C25AEDANS) y el péptido A β marcado con la fluoresceína (aceptor A β C7FM) en dimetilsulfóxido no hubo transferencia de energía. Sin embargo, inmediatamente después de diluir 10 veces la muestra con una disolución acuosa a pH=7.4 hay un cambio en la eficiencia de la transferencia de energía lo que se observa como el apagamiento de la emisión del donador (A β C25AEDANS) en 474 nm y el incremento de la emisión del aceptor (A β C7FM) en 520 nm. Esto indica la formación del heterodímero A β 1-40 en la mezcla que contiene al donador y al aceptor una relación (1:1) (donador : aceptor), (Fig. 18).

En la figura 18 A y B se muestra la suma matemática (línea sólida) de cada uno de los péptidos fluorescente (es decir, en ausencia de transferencia de energía). También se observó la eficiencia de la transferencia de energía con otro par de péptidos fluorescentes (tabla 3). La figura 18 B muestra el espectro que indica transferencia de energía en donde se utilizó el par A β C34AEDANS- A β C4FM. La eficiencia de la transferencia de energía no cambió significativamente durante 24 horas. La concentración final del péptido fue de 3 μ M.

Se realizaron otros experimentos para demostrar que la transferencia de energía que se observó fue debida a la interacción de los péptidos fluorescentes. Después de cada experimento de transferencia de energía, se confirmó, que la mezcla de donador-aceptor tiene el mismo tiempo de elución por cromatografía de filtración en gel que el péptido nativo (dímero).

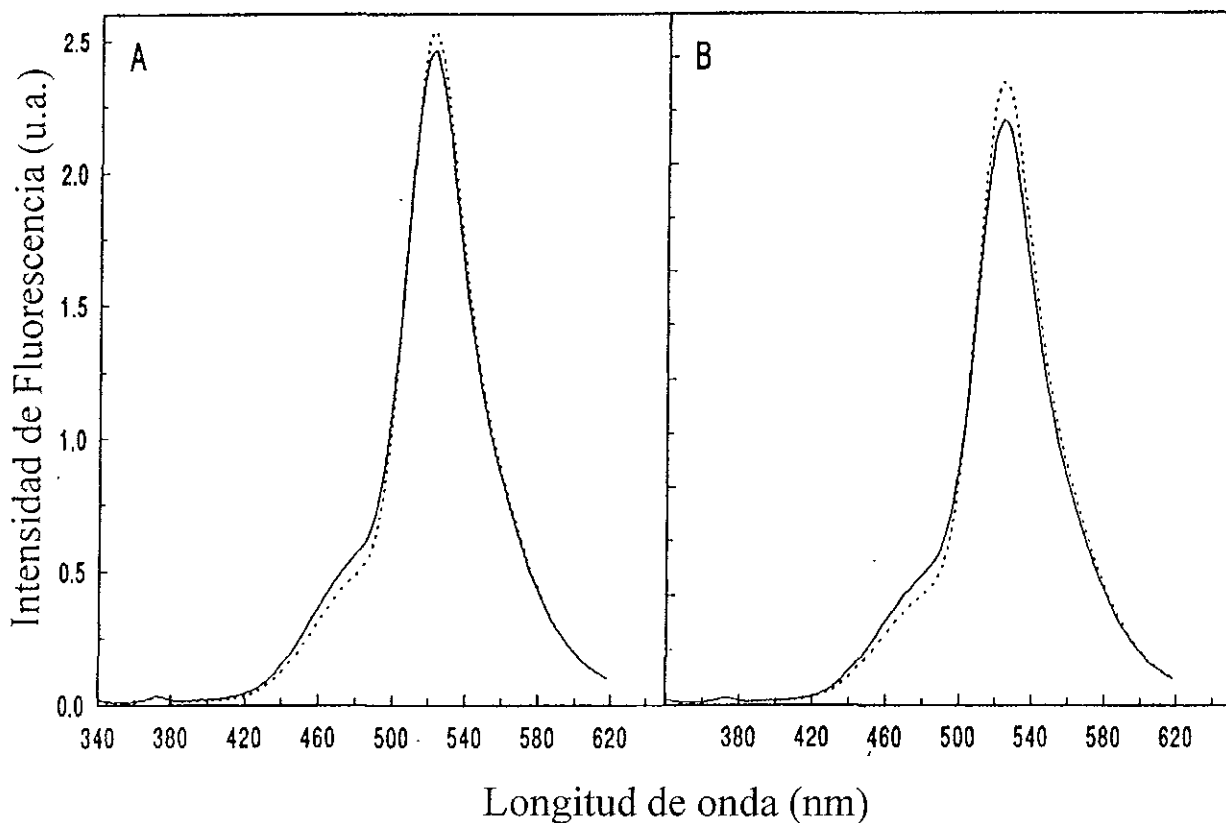


Figura 18. Asociación de los péptidos A β 1-40 marcados con 1,5-IAEDANS (donador) y FM (aceptor) en disolución acuosa monitoreada por transferencia de energía. La figura **A** muestra el espectro de emisión de la mezcla equimolar de ABC25AEDANS (donador) y ABC7FM (aceptor) en dimetilsulfóxido y posteriormente diluida 10 veces en el amortiguador A (.....). La línea sólida corresponde a la suma matemática de los siguientes controles: una mezcla equimolar de ABC25AEDANS y A β 1-40 y una mezcla equimolar de ABC7FM y A β 1-40. Es evidente la transferencia de energía por el apagamiento del donador y el incremento de la emisión del acepto. En la figura **B** se muestran los espectros de emisión para el otro par donador-aceptor ABC34AEDANS y ABC4FM.

Par donador-aceptor	E (eficiencia de la transferencia de energía)	DMSO %
ABC25AEDANS-AβC7FM	0.14	10
ABC34AEDANS-AβC4FM	0.20	10
Aβ1-40-ABY10W	0.21	10
Aβ1-40-ABY10W	0.46	2

Tabla 3. Eficiencias de la transferencia de energía para los diferentes pares donador-aceptor.

También se observó que la transferencia de energía desaparece cuando agregamos un exceso de 10 veces de péptido nativo Aβ1-40 a la mezcla donador-aceptor en DMSO y luego se diluye el disolvente. Esto indica que el péptido nativo puede competir con el péptido fluorescente y forma un heterodímero con este último que no presenta transferencia de energía (Fig. 19).

Por último se utilizó la fluorescencia de la tirosina del péptido nativo como donador para Aβ1-40 en el que se sustituyó la tirosina por triptofano en la posición 10: AβY10W. La eficiencia de la transferencia de energía se observó entre el par Aβ1-40 (donador)-AβY10W (aceptor) (Fig. 20).

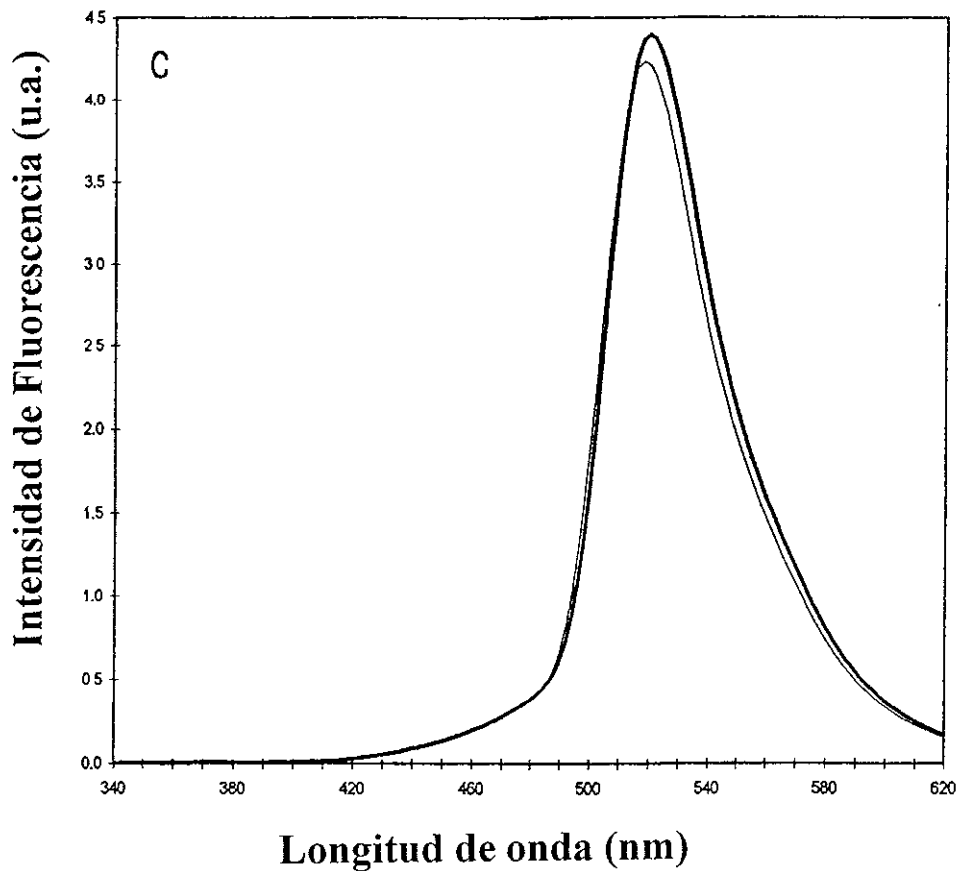


Figura 19. Espectro de emisión de la mezcla de A β C25AEDANS, A β C7FM y un exceso de 10 veces molar del péptido nativo A β 1-40 (...). La línea sólida corresponde a la suma aritmética de los controles del donador y aceptor solos en y presencia de un exceso de 10 veces molar del péptido nativo. La adición del exceso del péptido sin marca abolió la transferencia de energía entre A β C25AEDANS y A β C7FM.

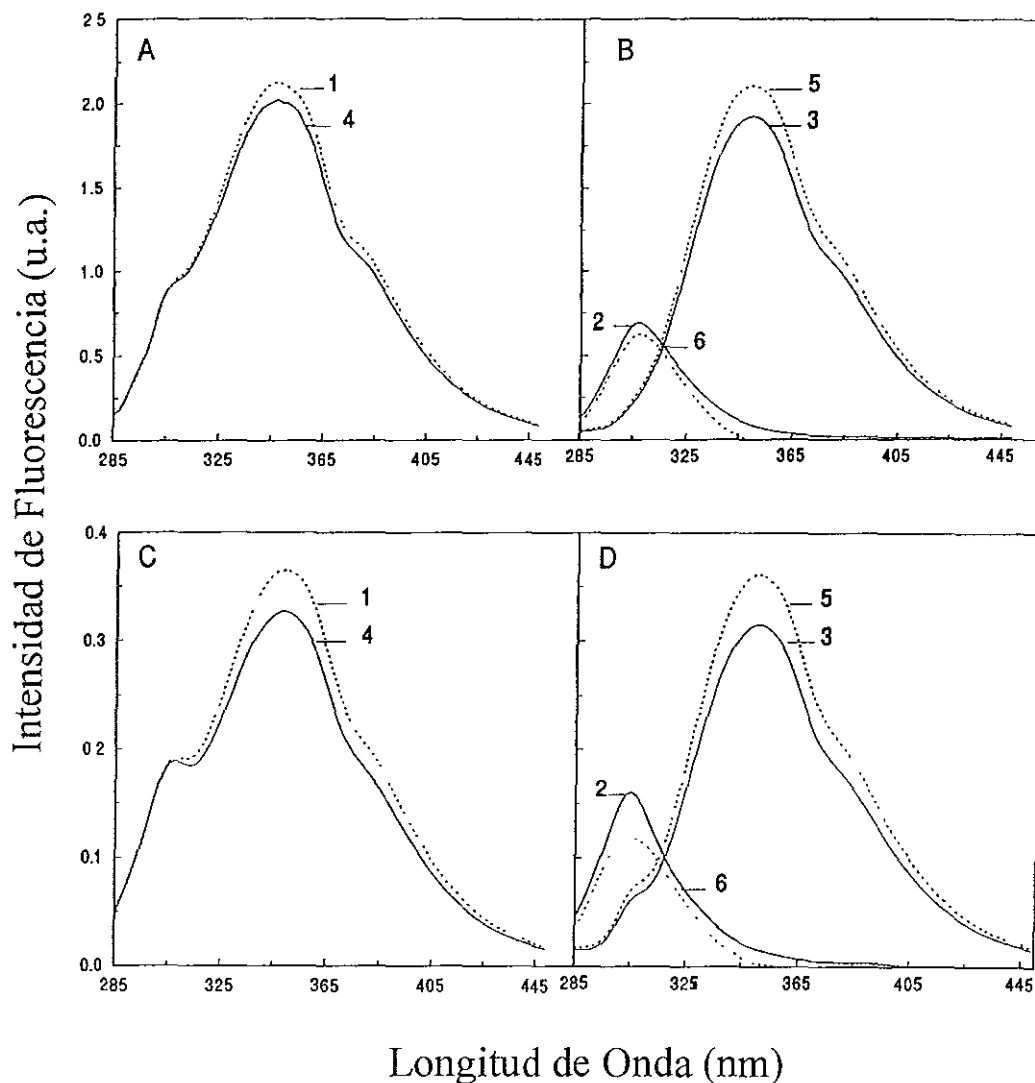


Figura 20. Transferencia de energía entre la tirosina del péptido nativo ABY10 y el triptofano del péptido mutante ABY10W en solución acuosa. La asociación de AB1-40 y ABY10W en 10% de dimetilsulfóxido se muestran en las gráficas A y B; y en dimetilsulfóxido al 2 % en las gráficas C y D. Se muestra el espectro de emisión de la mezcla de reasociación de ABY10 y ABW10 (mezcla DA) (1), y los siguientes controles: mezcla de reasociación de ABY10 (donador) (2) y la mezcla de reasociación de ABW10 (aceptor) (3). El espectro 4 corresponde a la suma matemática de los espectros 2 y 3. El espectro 5 representa la emisión del aceptor en DA y se obtiene al multiplicar el espectro 3 por el factor F_{DA}/F_A , donde F_{DA} es la emisión del aceptor en la mezcla y F_A es la emisión del aceptor solo. El espectro 6 corresponde a la emisión del donador en DA y se obtiene al sustraer el espectro 5 del 1. La comparación de los espectros 2 y 3 con los espectros 5 y 6 indica que en DA hay transferencia de energía de ABY10 (disminución de la emisión del donador) a ABW10 (incremento de la emisión del aceptor).

Estos experimentos con 3 diferentes pares donador-aceptor indicaron que cuando los péptidos se mezclaron en DMSO y posteriormente se diluyeron con una disolución acuosa, los pares se reasociaron para formar dímeros, como lo indicó su eficiencia de transferencia de energía y el tiempo de elución por cromatografía de filtración en gel.

5.1.5 Discusión sobre los estudios de estructura y ensamblaje del péptido amiloide

El propósito del presente estudio fue caracterizar el estado oligomérico del péptido A β 1-40 en disolución acuosa. Los datos informados en la literatura sobre este tema son controversiales debido a la diferente distribución de monómeros, dímeros, trímeros, tetrameros y grandes agregados oligoméricos que han sido reportados [Hilbich *et al.*, 1991, Barrow *et al.*, 1992; Bush *et al.*, 1994; Soreghan *et al.*, 1994; Roher *et al.*, 1996]. Algunas de las discrepancias se pueden atribuir a diferencias estructurales de amiloides extraídos de tejidos del cerebro [Roher *et al.*, 1996], en comparación con péptidos sintéticos de A β [Hilbich *et al.*, 1991; Levine, 1993; Soreghan *et al.*, 1994]. Los agregados observados en amiloides extraídos del tejido cerebral pueden presentar enlaces covalentes dado que son estables en condiciones desnaturizantes y reflejan interacciones péptido-péptido las cuales ocurren *in vivo* [Roher *et al.*, 1996].

No obstante muchas de las diferencias en el estado oligomérico con péptidos sintéticos de A β se pueden explicar debido a las diferencias en las concentraciones y condiciones empleadas, aún existe una controversia acerca de si el monómero o el dímero son la estructura más pequeña en condiciones fisiológicas [Hilbich *et al.*, 1991; Zagorski y Barrow, 1992; Roher *et al.* 1996; Soreghan *et al.*, 1994, Esler *et*

al., 1996]. Si bien, la solución a esta controversia puede no ser esencial para la búsqueda de compuestos que inhiban la formación del fibril amiloide, esto puede ser trascendental para el entendimiento del mecanismo del ensamblaje del amiloide. Y es por esta razón, que en el presente trabajo usamos la espectroscopía de la fluorescencia y la transferencia de energía en conjunto con la cromatografía de filtración en gel con el fin de discernir y caracterizar el estado del péptido A β 1-40 en disolución acuosa.

Se utilizó el péptido de longitud de 40 aminoácidos ya que por sus características este péptido se obtiene con un 95% de pureza además de que a pH fisiológico se encuentra en estado dimérico, como se demostró por cromatografía de filtración en gel [Hilbich *et al.*, 1991; Soreghan *et al.*, 1997; Garzón-Rodríguez *et al.*, 1997; Walsh *et al.*, 1997]; y también porque éste péptido es estable durante el intervalo de tiempo requerido para estos experimentos. Por otra parte, el péptido de 42 aminoácidos rápidamente forma oligómeros los cuales podrían complicar la interpretación de los datos de fluorescencia.

Para llevar a cabo el marcaje con sondas fluorescentes del péptido amiloide A β 1-40 en el presente estudio, se requirió alterar la estructura de A β 1-40. Es posible considerar que tanto la mutación de un aminoácido por cisteína como la modificación fluorescente cambien las propiedades del péptido amiloide. Sin embargo, los estudios realizados con los derivados fluorescentes de A β 1-40 en comparación con el péptido nativo, demuestran que el marcaje individual de estos péptidos no alteró sus propiedades. Esto se pudo observar por cromatografía de filtración en gel en donde los derivados fluorescentes tuvieron el mismo comportamiento de elución que el péptido nativo (molécula dimérica), indicando

que éstos presentan el mismo radio hidrodinámico en disolución acuosa. Adicionalmente, los experimentos de agregación, desnaturalización y renaturalización también indicaron que el comportamiento de los derivados fluorescentes fue indistinguible del péptido nativo A β 1-40.

El marcaje individual con sondas fluorescentes que presenten transferencia de energía entre sí, permitió estudiar la reasociación del péptido amiloide en disolución acuosa. Se utilizaron diferentes combinaciones de donadores y aceptores en diferentes posiciones en el péptido amiloide; los derivados fluorescentes de A β presentaron eficiencia en la transferencia de energía indicando que se formó el complejo dimérico entre el donador y el aceptor. En uno de los pares donador-aceptor la tirosina del péptido nativo A β 1-40 se usó como donador y el triptofano como aceptor en un péptido donde se sustituyó la tirosina por triptofano en la posición 10 de la secuencia original del péptido nativo A β 1-40. El hecho de que se observó la eficiencia de la transferencia de energía con el par tirosina-triptofano confirma que el péptido nativo A β 1-40 forma dímeros con el péptido que tiene la sustitución con triptofano.

Usando la cromatografía de filtración en gel en conjunto con la espectroscopía de dispersión de la luz, Walsh y colaboradores en 1997, confirmaron nuestros resultados acerca de que el péptido amiloide forma dímeros en concentraciones fisiológicas. Informaron que el tamaño de partícula del péptido amiloide A β 1-40 corresponde a una molécula con un radio hidrodinámico de 1.8 ± 0.2 nm, consistente con el tamaño de un dímero de A β [Walsh D *et al.*, 1997]. Posteriormente, se informó la existencia del dímero A β 1-40, en las fracciones

solubles del cerebro de pacientes con EA mediante el uso de anticuerpos específicos de A β . [Permanne, E *et al.*, 1997].

En estudios recientes con tejidos del cerebro de pacientes con EA, fue posible aislar por cromatografía de filtración en gel e histoquímicamente detectar al dímero del péptido amiloide A β 1-42 [Enya, M *et al.*, 1999]. Recientemente Tjernberg y colaboradores en 1999, informaron un modelo molecular para la formación del fibril amiloide. Ellos sugieren que la polimerización comienza con la formación de dímeros, los cuales a su vez son capaces de formar tetrámeros y que estos dímeros o tetrámeros se adicionan para formar oligómeros.

Los resultados del presente trabajo son relevantes en el sentido de que sugieren que el péptido A β 1-40 es capaz de formar dímeros en disolución acuosa y además, sugieren que la dimerización es el evento inicial en el proceso de agregación del amiloide.

5.2 Interacción del péptido amiloide con metales

5.2.1 Determinación de las constantes de disociación del péptido amiloide A β y A β F4W con metales por espectroscopía de fluorescencia

En el presente trabajo utilizamos la fluorescencia intrínseca del péptido amiloide y la fluorescencia del triptofano de un mutante del péptido A β 1-40 para

estudiar la interacción con metales. Los péptidos amiloides A β 1-40 y A β 1-42 presentan un máximo de emisión de la fluorescencia en 310 nm, típica de la fluorescencia de tirosina [Garzón-Rodríguez *et al.*, 1997]. Se utilizó la fluorescencia del triptofano cuando en la secuencia original del péptido se reemplazó a la fenilalanina en la posición 4 por Trp. Se escogió este mutante ya que sus propiedades de agregación son muy similares a las del péptido nativo, además de que la fluorescencia del triptofano es más sensible al microambiente que lo rodea.

En general la técnica consiste en preparar disoluciones metal-ligante en disolución amortiguadora Tris-HCl 10 mM /NaCl 0.1M a pH 7.4 con una concentración fija de ligante o especie fluorescente de 3 μ M y diferentes concentraciones de metal o especie no fluorescente. Posteriormente se obtienen los espectros de la especie fluorescente y de cada disolución metal-ligante. Los datos experimentales se ajustaron con un modelo en el que se considera la formación de un complejo ML, donde L es péptido y M es metal, de acuerdo a:



La relación y/x está dada por:

$$y/x = f_p^{\max}/(1-f_p^{\max})$$

Donde f_P es la fracción molar del péptido y f_P^{\max} se determinó por el método de Job o variación continua, que a continuación se describe.

Las ecuaciones para el análisis de las interacciones ML se derivaron por el método de Job o de variaciones continuas [Job, 1928; Ward, 1985; Musier y Hammes, 1988]. Este método proporciona la relación x/y donde “x” e “y” corresponden al número de moléculas del metal y del péptido, respectivamente en el complejo. El procedimiento experimental consiste en preparar una serie de disoluciones del péptido y del metal con la condición de que la suma de las concentraciones totales de ambas especies sea constante y se mide alguna propiedad física, en este caso la fluorescencia. El análisis de los resultados experimentales consiste en graficar la diferencia de esa propiedad observada en la mezcla menos la observada en ausencia de complejación vs fracción molar del ligante (péptido). Así se determina de la gráfica máximo o mínimo de la fracción molar. Si ese valor está alrededor de 0.5 se tiene un complejo 1:1. La agudeza del máximo o mínimo y la exactitud con la cual puede determinarse el valor de la fracción molar depende de la magnitud de la constante de enlace [Connor, 1987].

La constante de equilibrio, K para la formación del complejo ML es:

$$K = \frac{[M_x L_y]}{[M]^x [L]^y} \quad \text{Ecuación 10}$$

Se expresa la concentración en equilibrio de L en función de las concentraciones totales de L y M, bajo la condición $[M] \gg [L]$ empleada en este estudio, en el cual $[M]$ es variable y la fluorescencia del ligante L es el parámetro de medida.

Debido a que se analiza la intensidad de fluorescencia del ligante I_0 , y a que siempre se utilizó un exceso grande de metal, se obtuvo la siguiente ecuación para el ajuste de los datos experimentales (ver ecuación A 1.13 en apéndice A. No.1):

$$I = (I_0 + I_B K[M]) / (1 + K[M]) \quad \text{Ecuación 11}$$

Donde I_0 y I_B son las intensidades de fluorescencia libre, y del péptido complejado, K es la constante de asociación, donde $K = 1 / K_d$.

Para la complejación consecutiva 1: 1 y 1:2 con constantes de asociación K_1 y K_2 (ver ecuación A 2.31 en apéndice A. No. 2) :

$$I = (I_0 + I_{B1} K_1 [M] + I_{B2} K_1 K_2 [M]^2) / (1 + K_1 [M] + K_1 K_2 [M]^2) \quad \text{Ecuación 12}$$

La tabla 4 presenta las condiciones experimentales empleadas para la determinación de la estequiometría de los complejos por el método de Job. Vale la pena mencionar que en el experimento en el que se empleó el método de Job la concentración total de electrolito es constante y la desviación de aditividad observada no puede atribuirse al cambio de la fuerza iónica

[Metal] Zn ²⁺ μM	[Ligante] ^a μM	f _{ligante} ^b
50	0.0	0.0
40	10	0.2
30	20	0.4
20	30	0.6
10	40	0.8
0.0	50	1.0

Tabla 4. Condiciones experimentales para la determinación fluorométrica de la estequiometría de los complejos Zn-péptido

^a los ligantes estudiados fueron Aβ1-40 y AβF4W. ^b fracción molar de ligante = $[L]_T / ([M]_T + [L]_T)$

En las figuras 21 y 22 se muestran las gráficas del método de Job correspondientes para la interacción A β 1-40 y A β F4W con Zn²⁺ respectivamente.

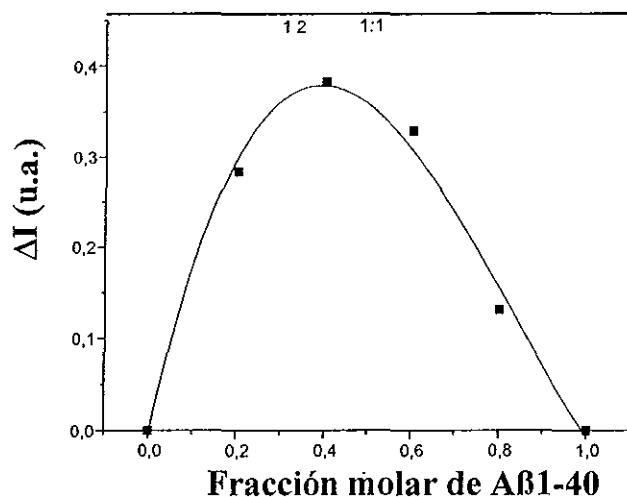


Figura 21. Gráfica de Job para la interacción del péptido A β 1-40 con el Zn²⁺. [L]+[M]=50 μ M, donde ΔI es la diferencia entre las fluorescencia observada y calculada por interpolación lineal de la fluorescencia de la mezcla.

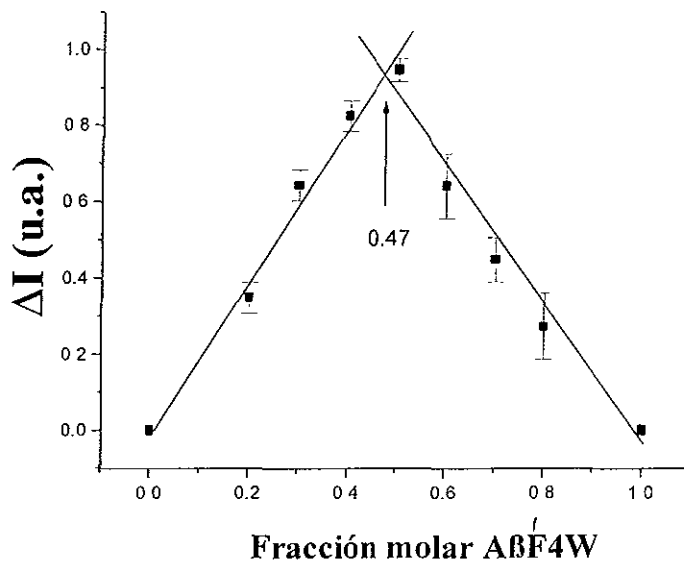


Figura 22. Gráfica de Job para la interacción del péptido A β F4W con el Zn²⁺. [L]+[M]=50 μ M, donde ΔI es la diferencia entre los valores de la fluorescencia observada y calculada por interpolación lineal de la fluorescencia de la mezcla.

En las figuras 23 y 24 se muestran las gráficas del método de Job correspondientes para la interacción A β 1-40 y A β F4W con Cu²⁺ respectivamente.

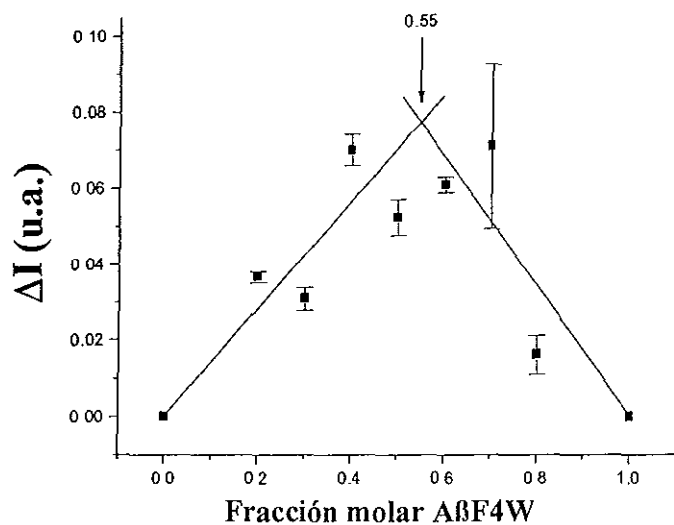


Figura 23. Gráfica de Job para la interacción del péptido A β 1-40 con el Cu²⁺. [L]+[M]=10 μ M, donde ΔI es la diferencia entre las fluorescencia observada y calculada por interpolación lineal de la fluorescencia de la mezcla.

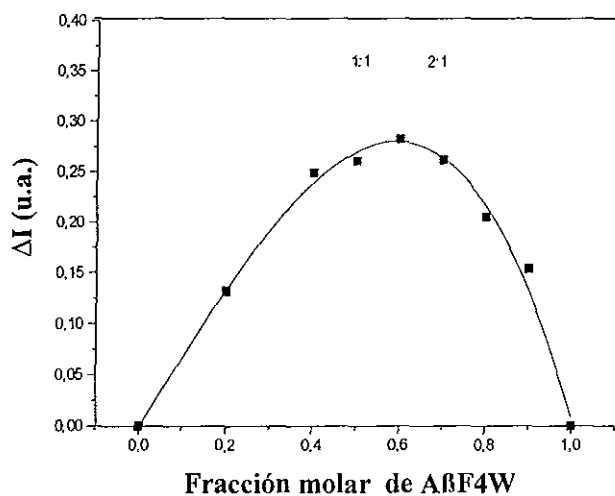


Figura 24. Gráfica de Job para la interacción del péptido A β F4W con el Cu²⁺. [L]+[M]=10 μ M, donde ΔI es la diferencia entre las fluorescencia observada y calculada por interpolación lineal de la fluorescencia de la mezcla.

La Figura 25 A y B muestran el efecto del Zn^{2+} en el espectro de fluorescencia del péptido A β 1-40 y A β F4W. Evidentemente, la adición de Zn^{2+} aumenta la emisión en el máximo de fluorescencia de la tirosina, sin desplazarlo. Esto es debido a que la fluorescencia de la tirosina no es sensible al microambiente que la rodea [Lakowicz, 1983]. Mientras que en la figura 25B observamos como el Zn^{2+} aumenta y desplaza el máximo de emisión del triptofano a longitudes de onda más corta. La adición de Cu^{2+} apaga la fluorescencia tanto de la tirosina como del triptofano. Esto es debido a que algunos metales de transición tienen la propiedad de ser apagadores de la fluorescencia de proteínas (ver pagina 30) [Chen, 1976; Eftnik, 1981].

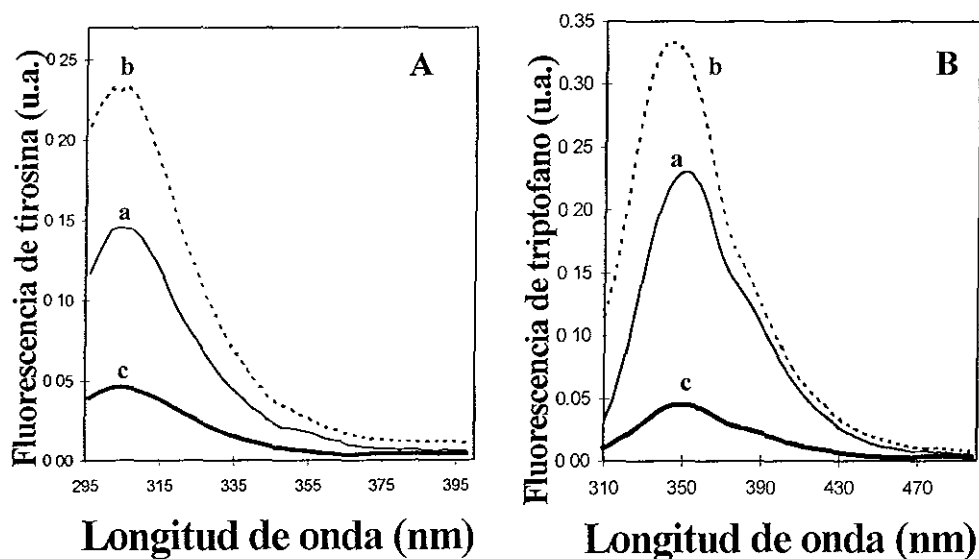


Figura 25. En la figura A se muestran los espectros de emisión A β 1-40 3 μ M (espectro a) (λ_{exc} =290 nm, emisión a 310 nm) a pH 7.4 en presencia de 100 μ M de Zn^{2+} (espectro b), 10 μ M Cu^{2+} (espectro c). En la figura B se muestran los espectros de emisión de A β F4W 3 μ M (espectro a) (λ_{exc} =295 nm, emisión a 35nm) pH 7.4 en presencia de 100 μ M de Zn^{2+} (espectro b), 10 μ M Cu^{2+} (espectro c).

Las constantes de disociación determinadas en este estudio se muestran en la tabla 5.

5.2.2 Complejación del péptido A β con Zn²⁺ y Cu²⁺

Las gráficas de Job para la interacción de los péptidos A β 1-40 y A β F4W con Zn²⁺ (Fig. 21 y 22 respectivamente) muestran una estequiometría cerca de 1:1 y 1:2. Evidentemente se tiene una situación intermedia donde $y/x = 1/1.55$ esto puede reflejar la formación de 2 complejos de estabilidad similar con 1 y 2 cationes Zn²⁺. Las gráficas de Job con el sistema A β F4W:Zn²⁺ indicaron una estequiometría cercana a 1:1 (Fig. 22).

Las figuras 26 A y B, muestran los cálculos de la intensidad de fluorescencia en función de Zn²⁺. La figura 26 A muestra los resultados para A β 1-40. En este caso la curva es un perfil teórico calculado con la ecuación 11 para el modelo 1:1 (línea punteada) $K_d=303 \mu\text{M}$, para el modelo 1:2. (la línea sólida) usando la ecuación 12 con una constante de disociación $K_{d1} = 111 \mu\text{M}$ y $K_{d2} = 65 \mu\text{M}$. La figura 26 B muestra los resultados de la interacción del Zn²⁺ con el péptido A β F4W para el sistema 1:1 usando la ecuación 11, con una constante de disociación $K_d = 91 \mu\text{M}$.

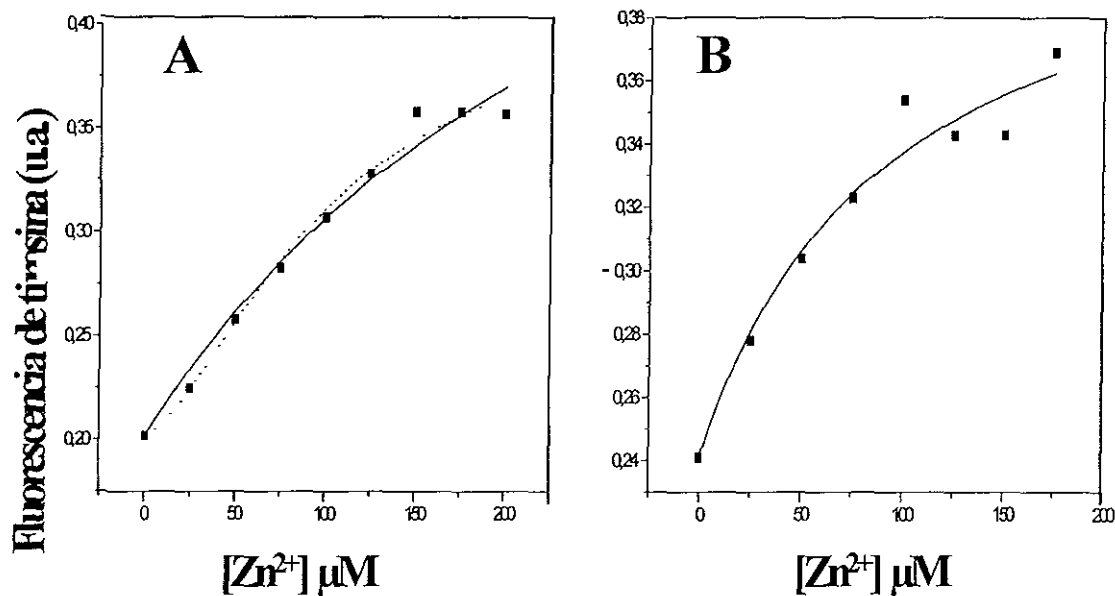


Figura 26. En la figura A se graficó la Intensidad de fluorescencia de Aβ1-40 3 μM ($\lambda_{exc}=280$ nm y emisión a 310 nm) como función de la concentración de Zn²⁺ a pH 7.4. La curva es un perfil teórico calculado con la ecuación 11 para el modelo 1:1 (línea punteada), la línea sólida para el modelo 1:2. Usando la ecuación 12. En la figura B se graficó la Intensidad de fluorescencia de ABF4W 3 μM ($\lambda_{exc}=295$ nm y emisión a 350 nm) como función de la concentración de Zn²⁺ a pH 7.4.

Para la interacción del péptido Aβ1-42 con Zn²⁺ se obtuvo una relación 1:1 con una $K_d = 55 \mu\text{M}$ (figura 27A). Debido a que la adición de Zn²⁺ y Cu²⁺ producen un incremento y apagamiento de la fluorescencia de la tirosina y el triptofano, se realizó un experimento de competencia para saber si estos metales compiten por el mismo sitio de unión o se unen independientemente. En la figura 27 B se muestra la intensidad de fluorescencia de Aβ1-40 en presencia de Cu²⁺ 2 μM en función de la concentración de Zn²⁺. Los datos se ajustaron al sistema 1:1 con una $K_d = 26 \mu\text{M}$. Los resultados con Zn²⁺ en presencia de Cu²⁺ mostraron que no existe una competencia entre estos metales: la intensidad de fluorescencia

aumentó, pero ésta se satura en un nivel mucho más bajo que el péptido libre además de que K_d es más pequeña que con el péptido libre (Ver tabla 5). Mientras que si existiera una competencia la K_d debería tener un valor más alto. El valor de K_d con Zn^{2+} para el péptido agregado $A\beta 1-42$ es mucho más pequeño que para el péptido dimérico $A\beta 1-40$. Esto confirma cualitativamente el efecto de este metal en la agregación de $A\beta$.

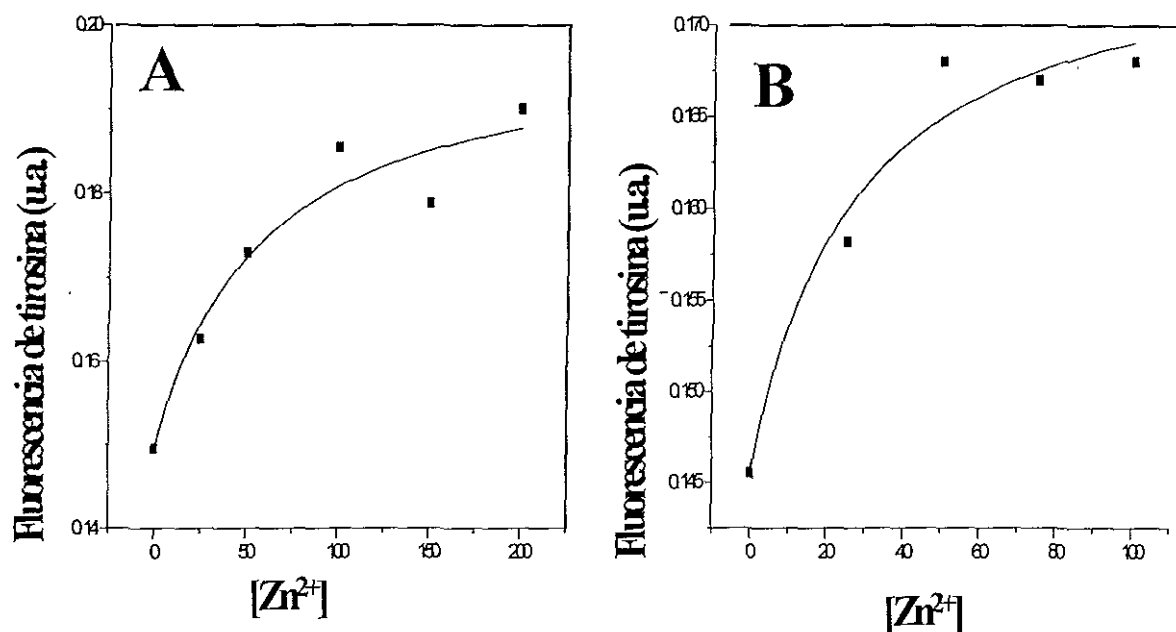


Figura 27. En la figura A se graficó la intensidad de fluorescencia de $A\beta 1-42$ 3 μM (λ_{exc} = a 280 nm y emisión a 310 nm) en función de la concentración de Zn^{2+} a pH 7.4. En la figura B se graficó la intensidad de fluorescencia de $A\beta 1-40$ 3 μM en presencia de 2 μM Cu^{2+} (λ_{exc} = a 280 nm y emisión a 350 nm) en función de la concentración de Zn^{2+} a pH 7.4. Las gráficas son un perfil teórico calculado con la ecuación 11

Mediante los datos de fluorescencia de tirosina y triptofano se encontró que la unión del Cu^{2+} al péptido $A\beta 1-40$ y $A\beta F4W$ llegó a la saturación. El péptido se incubó con Cu^{2+} en diferentes concentraciones y se obtuvieron los espectros de emisión de la fluorescencia para cada muestra. El máximo de unión que se obtuvo

para Cu^{2+} fue a $2 \mu\text{M}$. Las gráficas de Job para la interacción de los péptidos A β 1-40 y A β F4W con Cu^{2+} muestran una estequiometría cercana a 1:1 y quizás más de 1 mol de péptido se une con el ion Cu^{2+} . Las curvas de titulación deben calcularse con otra ecuación ya que la concentración de péptido y metal fueron similares en estos experimentos. La ecuación para la complejación 1:1 es (ver ecuación A 3.14 en el apéndice A No. 3):

$$I = I_0 + 0.5(\Delta I/[L]) \times ([L] + [M] + K_d - (([L] + [M] + K_d)^2 - 4[L][M])^{1/2}) \quad \text{Ecuación 13}$$

Donde [L] y [M] son las concentraciones totales de péptido y metal, ΔI es la diferencia de las intensidades de fluorescencia del péptido libre y acomplexado. Las figuras 28 A y B muestran los resultados con una $K_d = 1.6 \mu\text{M}$ para A β 1-40 y $K_d = 0.6 \mu\text{M}$ para A β F4W. El péptido A β 1-42 con Cu se comportó de acuerdo con un modelo 1:1, con una $K_d = 2 \mu\text{M}$ (Fig. 29).

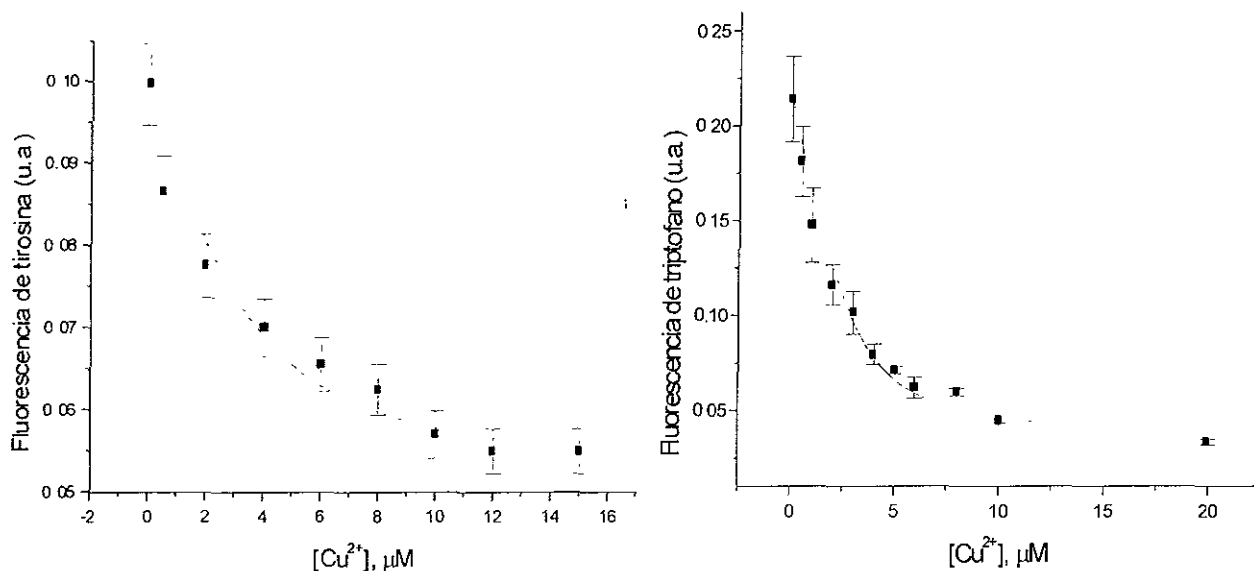


Figura 28. En la figura A se graficó la intensidad de fluorescencia de A β 1-40 $3.0 \mu\text{M}$ ($\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ y emisión a 310 nm) como función de la concentración de Cu^{2+} a pH 7.4. En la figura B se graficó la intensidad de fluorescencia de A β F4W $3.0 \mu\text{M}$ ($\lambda_{\text{exc}} = 295 \text{ nm}$ y emisión a 350 nm) como función de la concentración de Cu^{2+} a pH 7.4. Las gráficas son un perfil teórico calculado con la ecuación 13.

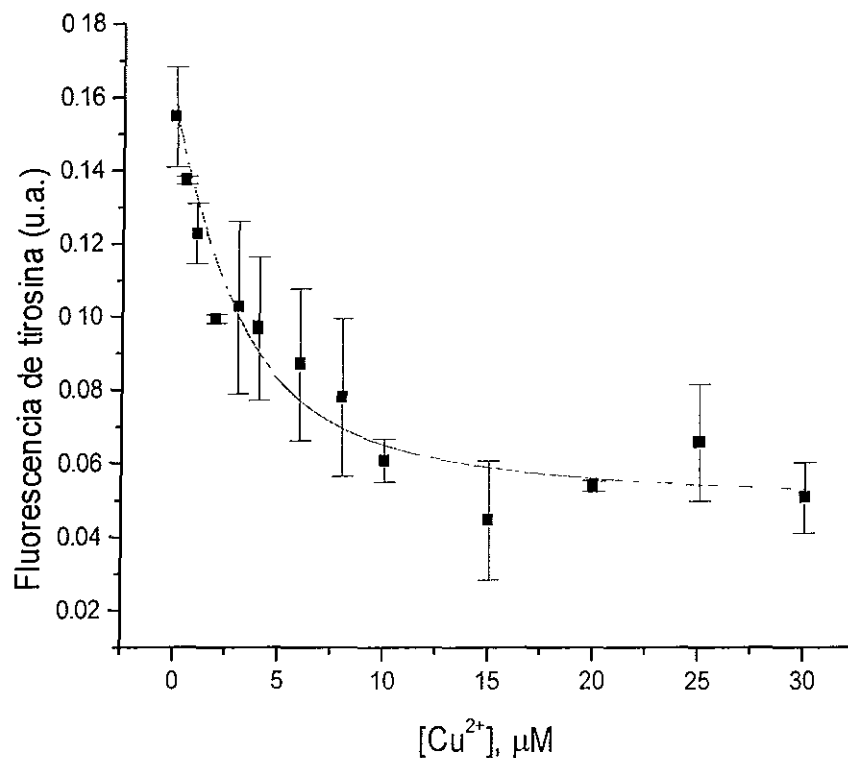


Figura 29. Intensidad de fluorescencia de Aβ1-42 3 μM ($\lambda_{exc}= 280$ nm y emisión a 310 nm) como función de la concentración de Cu²⁺ a pH 7.4. Las gráficas son un perfil teórico calculado con la ecuación 13.

5.2.3 Complejación del péptido Aβ con Fe²⁺

En la mayoría de las gráficas de Job o de variación continua se encontró el máximo igual para Zn²⁺ y Cu²⁺, entre 1:1 y 1:2. En las figuras 30 A y B se graficó la intensidad de fluorescencia de Aβ1-40 y AβF4W en función de la concentración de Fe²⁺. La gráfica para Aβ1-40, es un perfil teórico calculado con la ecuación 11 para el modelo 1:1 con una $K_d=76$ μM, para AβF4W se ajustó a un modelo 1:2 (la línea sólida) usando la ecuación 12 con una $K_{d1}=130$ μM y $K_{d2} = 19$ μM.

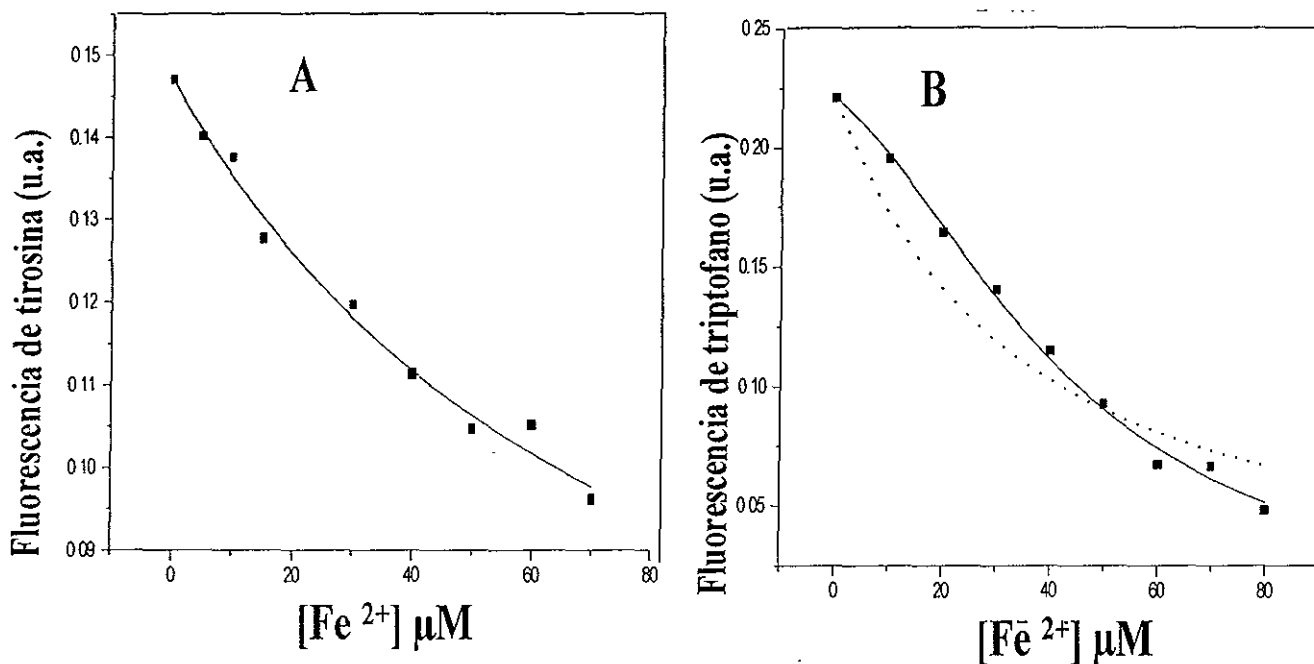


Figura 30. En la figura A se graficó la intensidad de fluorescencia de Aβ1-40 3.0 μM ($\lambda_{exc}= 280$ nm y emisión a 310 nm) como función de la concentración de Fe^{2+} a pH 7.4. En la figura B se graficó la Intensidad de fluorescencia de AβF4W 3 μM ($\lambda_{exc}= a 280$ nm y emisión a 350 nm) como función de la concentración de Fe^{2+} a pH 7.4. La curva es un perfil teórico calculado con la ecuación 11 para el modelo 1:1 (línea punteada), la línea sólida para el modelo 1:2. usando la ecuación 12.

La figura 31 muestra las gráficas del efecto de Fe^{2+} en la intensidad de la fluorescencia del péptido Aβ1-42, para el sistema 1:1 (línea punteada), $K_d = 7.2$ μM, para el sistema 1:2 (línea sólida), $K_{d1}=0.2$ μM y $K_{d2}=36$ μM

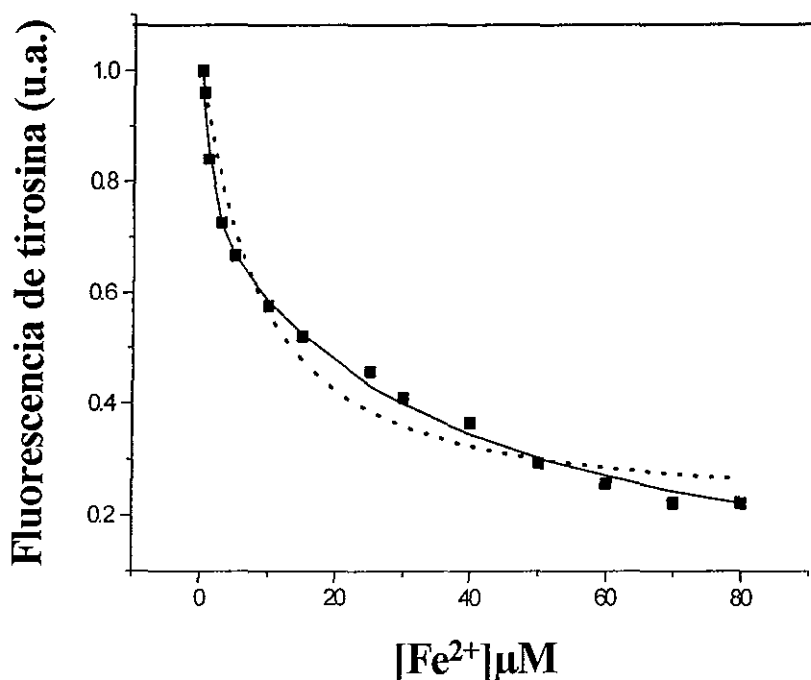


Figura 31. Intensidad de fluorescencia de Aβ1-42 3 μM (λ_{exc} a 280 nm y emisión a 310 nm) en función de la concentración de Fe²⁺ a pH 7.4. La curva es un perfil teórico calculado con la ecuación 11 para el modelo 1:1 (línea punteada), la línea sólida para el modelo 1:2. usando la ecuación 12.

Para excluir cualquier posibilidad de formación de Fe³⁺, los experimentos de titulación con Fe²⁺ se realizaron en presencia y en ausencia de ácido ascórbico, el cual es un fuerte reductor. En las figuras 32 A y B se graficó la intensidad de fluorescencia en función de Fe²⁺ en presencia de ácido ascórbico 100 μM, para Aβ1-40 se obtuvo $K_d=13 \mu\text{M}$ y para Aβ1-42 $K_d=0.33 \mu\text{M}$

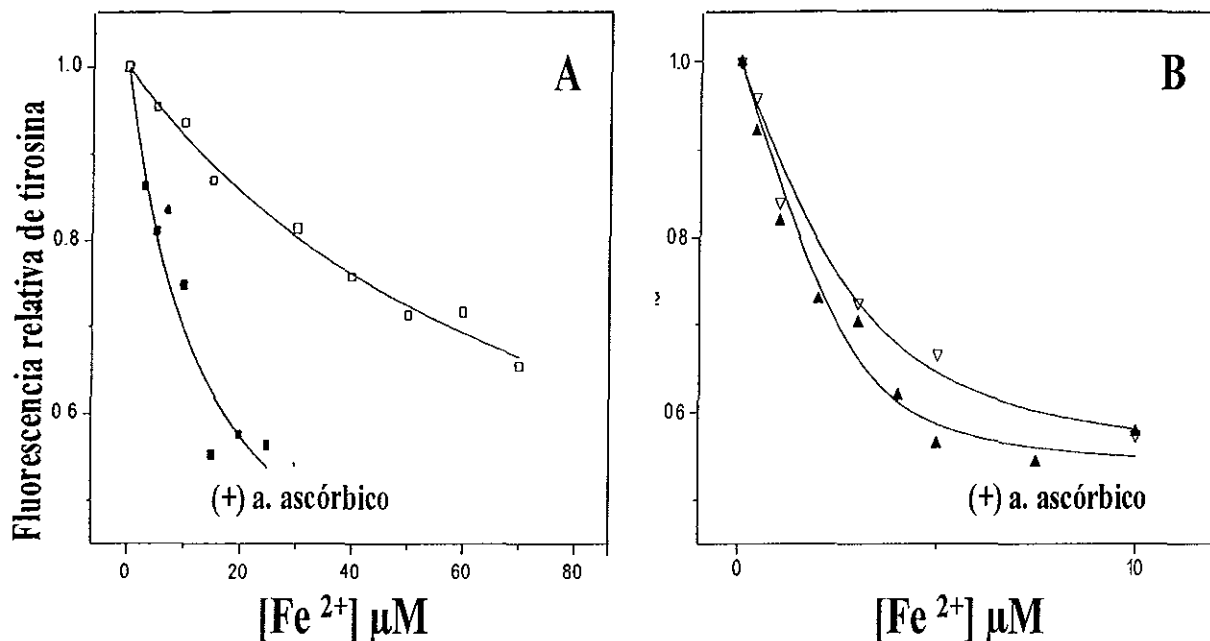


Figura 32. A. Intensidad de fluorescencia de Aβ1-40 3 μM (λ_{exc} = a 280 nm y emisión a 310 nm) en función de la concentración de Fe²⁺ en presencia y en ausencia de ácido ascórbico a pH 7.4. En la figura B se graficó la Intensidad de fluorescencia de Aβ1-42 3 μM (excitación a 280 nm y emisión a 310 nm) en función de la concentración de Fe²⁺ en presencia y en ausencia de ácido ascórbico a pH 7.4.

Metal	Péptido	K _d , μM	K _{d1} , μM	K _{d2} , μM	I _c /I ₀
Zn ²⁺	AβF4W	90±30			1.77
	Aβ1-40	300±100			2.16
	Aβ1-42	57±28			1.34
	Aβ1-40(+Cu)	26±14			
Cu ²⁺	AβF4W	0.61±0.17			0.185
	Aβ1-40	1.6±0.9			0.53
	Aβ1-42	2.0±0.8			0.26
Fe ²⁺	AβF4W		130±28	19±6	0
	Aβ1-40	76±20			0.28
	Aβ1-42		0.2	36±10	0

Tabla 5. Constantes de disociación del péptido amiloide con diferentes metales

5.2.4 Discusión de la interacción del péptido amiloide con metales

El objetivo del presente estudio consistió en monitorear la interacción de los metales con el péptido amiloide por medio de la espectroscopía de fluorescencia como una manera más directa de calcular las constantes de disociación en disolución acuosa.

Hasta la fecha las constantes de disociación informadas en la literatura para el Zn^{2+} y Cu^{2+} fueron obtenidas en condiciones heterogéneas, donde el péptido se absorbió sobre una membrana [Bush *et al.*, 1994; Clements *et al.*, 1996]. Esto puede afectar considerablemente los resultados, debido al microambiente en la membrana y también a posibles cambios en la conformación del péptido, o por las mediciones indirectas del efecto del metal en la precipitación.

La concentración total de Zn^{2+} en el fluido cerebroespinal es aproximadamente $0.15 \mu M$ [Frederickson, 1989], esto es 100 veces menor que los niveles encontrados en el plasma de $20 \mu M$ [Davies *et al.*, 1968]. En el presente estudio se encontró que el Zn^{2+} se une al péptido amiloide con una constante de afinidad alrededor de $100 \mu M$, en concordancia con los datos publicados por el grupo de Maggio [1996] y Brown [1997] quienes informaron que se requieren concentraciones mayores a $100 \mu M$ para promover la agregación de A β . En estos experimentos se empleó la agregación del péptido como medida indirecta para ver la interacción del metal con el péptido. Estos resultados contradicen los datos obtenidos por Bush y colaboradores quienes informaron una alta afinidad del Zn^{2+} por el péptido (K_d $3.2 \mu M$). Debido a que el Zn^{2+} puede causar la deposición del amiloide *in vitro*, vale la pena considerar la posibilidad del significado fisiológico

de estos resultados. Aunque el valor de la K_d observada por diferentes grupos varía en el intervalo de 3-100 μM , nuestros resultados indican que en las condiciones homogéneas la afinidad para Zn^{2+} es baja con valores de K_d del orden de 100 μM . En consecuencia, la mayor parte del Zn^{2+} en los diversos tejidos probablemente se asocie con otras proteínas, por lo tanto la habilidad de Zn^{2+} para unirse al péptido amiloide dependerá de la concentración del Zn^{2+} libre y de las afinidades relativas de estas otras proteínas por el Zn^{2+} disponible. La afinidad de $\text{A}\beta$ por Zn^{2+} es considerablemente menor que la observada para muchas otras proteínas de unión al Zn^{2+} . Por ejemplo, las constantes de estabilidad para las metalo-proteínas como la termolisina, anhidrasa carbónica y la aminopeptidasa son 12, 10 y 15 μM respectivamente [Vallee y Galdes, 1984].

Clements y colaboradores [1996] informaron que el Zn^{2+} unido al $\text{A}\beta$ puede ser desplazado por el Cu^{2+} , sugiriendo que este último puede competir *in vivo* con el Zn^{2+} por la unión al péptido amiloide, pero cabe mencionar que la concentración de los metales utilizadas para desplazar al ion metálico enlazado fue varias veces mayor que la encontrada en tejidos. En el presente estudio se encontró que el Zn^{2+} en presencia de Cu^{2+} , en concentraciones fisiológicas (2 μM) mostraron que existe cierta cooperatividad en la unión de estos metales.

Las primeras evidencias de la interacción entre Cu^{2+} y $\text{A}\beta$ 1-40 fueron informadas por Bush [1994] y colaboradores, quienes por cromatografía de filtración en gel, encontraron que el Cu^{2+} estabiliza aparentemente una estructura dimérica. También encontraron mediante mediciones de absorbancia en 214 nm, que al igual que la proteína Prion, $\text{A}\beta$ une múltiples iones de cobre y que $\text{A}\beta$ 1-42 tiene mayor afinidad por Cu^{2+} que $\text{A}\beta$ 1-40 (K_d $\text{A}\beta$ 1-42 = 0.3 μM , K_d $\text{A}\beta$ 1-40 = 4 μM)

[Atwood, *et al.*, 1998]. Sin embargo, los datos obtenidos en el presente trabajo indican que aunque existe una alta afinidad por el Cu^{2+} , no hay una diferencia significativa en las constantes de disociación con el péptido dimérico A β 1-40 y el péptido agregado A β 1-42. Las razones por las cuales nuestros resultados no concuerdan con los datos reportados por Bush, son las diferencias en el tiempo de incubación del péptido A β 1-42, ellos sólo incubaron 5 min. mientras que nosotros incubamos el péptido por 24 h para estar seguros de su completa agregación. Estudios de agregación en función de la concentración y tiempo de incubación con los péptidos amiloides, han demostrado, que tiempos cortos de incubación del A β no son suficientes para inducir la agregación total del péptido [Burdick *et al.*, 1992; Walsh *et al.*, 1997].

La concentración total del Cu^{2+} en la corteza del cerebro es 100 μM , mientras que en las conexiones sinápticas es de 15 μM [Atwood *et al.*, 1998]. Aunque hay que subrayar que a pesar de que la corteza contiene altos niveles de Cu^{2+} , la disponibilidad de este metal está normalmente restringida por su unión a metaloproteínas tales como albúmina y ceruloplasmina [Owen, 1982].

La ferritina es el mayor almacenamiento proteínico de hierro en el cerebro, y se ha reportado un aumento de su concentración en pacientes con EA [Joshi, 1994]. La existencia de agregados de A β resistentes a SDS extraídos de cerebros de pacientes con EA, sugiere que *in vivo* ocurren modificaciones conformacionales y químicas y que promueven la deposición de A β . Dyrks y colaboradores [1992] informaron que la formación de los agregados resistentes a SDS requieren de la oxidación del Fe en presencia de peróxido de hidrógeno, produciendo probablemente el entrecruzamiento de A β . Además, informaron que en presencia

de ácido ascórbico la agregación se inhibió sugiriendo que ésta incluye un ataque radical por radicales libres y el entrecruzamiento peptídico [Dirks *et al.*, 1992]. Estos resultados también han sido confirmados recientemente por Smith [1997] quien encontró que la acumulación de Fe en pacientes con EA es la fuente para la generación de radicales.

En condiciones fisiológicas la cantidad de hierro libre es extremadamente baja. La mayoría del hierro se une a la transferrina y hemoproteínas como la hemoglobina y los citocromos. De esta manera es muy limitada la habilidad de un sistema oxidante que requiere Fe para estimular por ejemplo radicales *in vivo*; sin embargo, el daño en tejidos por cualquier mecanismo puede acelerar la formación de radicales seguido por una muerte celular y de esta manera dejando iones metálicos en el medio.

Con los péptidos diméricos A β 1-40 y A β F4W la afinidad de los metales al péptido está en el orden de Fe <Cu>Zn en concordancia con la serie de Irving-Williams de estabilidad de complejos [Glusker, 1991].

La afinidad del péptido amiloide por el Fe²⁺ no se había caracterizado cuantitativamente. Para excluir cualquier posibilidad de la contribución de formación de Fe³⁺, se tituló en presencia de ácido ascórbico (Fig. 32). Las constantes de disociación calculadas para A β 1-40 y A β 1-42 son 13 μ M y 0.33 μ M, respectivamente. De esta manera la alta afinidad del péptido A β 1-42 por Fe²⁺ no está asociada con su oxidación a Fe³⁺. La mayor afinidad de Fe²⁺ hacia el péptido agregado A β 1-42 en comparación con el péptido dimérico A β 1-40 indica que este metal estabiliza al agregado en concentraciones fisiológicas.

5.3 Estudios de apagamiento de la fluorescencia del péptido amiloide: En el estado dimérico y fibrilar

5.3.1 Diseño de los péptidos amiloide con triptofanos

Debido a que en la secuencia original no está presente el triptofano, se pensó en sustituir algunos aminoácidos en la secuencia del péptido por este residuo fluorescente. Esta estrategia ha sido extensamente usada cuando este aminoácido está ausente en proteínas, además, con el objetivo también de que dicha modificación no altere la estructura y la conformación del péptido. Se sustituyó por triptofano a la fenilalanina en la posición 4, y a la tirosina en la posición 10 en la terminal amino del péptido amiloide. Además, se sintetizaron dos mutantes del péptido amiloide donde se sustituyó por el triptofano a la lisina en la posición 34 y a la valina en la posición 40 en la terminal carboxilo. Los péptidos sintetizados que contienen un solo triptofano para el desarrollo de este proyecto fueron los siguientes:

A β F4W, A β Y10W, A β L34W y A β V40W.

5.3.2 Propiedades de agregación de los péptidos A β con triptofanos

Se comparó la agregación de los mutantes de triptofano (A β F4W, A β Y10W, A β L34W y A β V40W) con el péptido nativo A β 1-40 en condiciones fisiológicas donde éste es totalmente soluble, a pH 7.4; en condiciones en las que se promueve la agregación a pH=5.0 [Burdick *et al.*, 1992; Garzón-Rodríguez *et al.*, 1997] y en presencia de Zn²⁺ donde se ha informado que el péptido tiende también a agregarse [Bush *et al.*, 1994] (Fig. 33). En todas estas tres condiciones los cuatro mutantes con triptofanos prácticamente se comportaron de manera similar al péptido nativo A β 1-40.

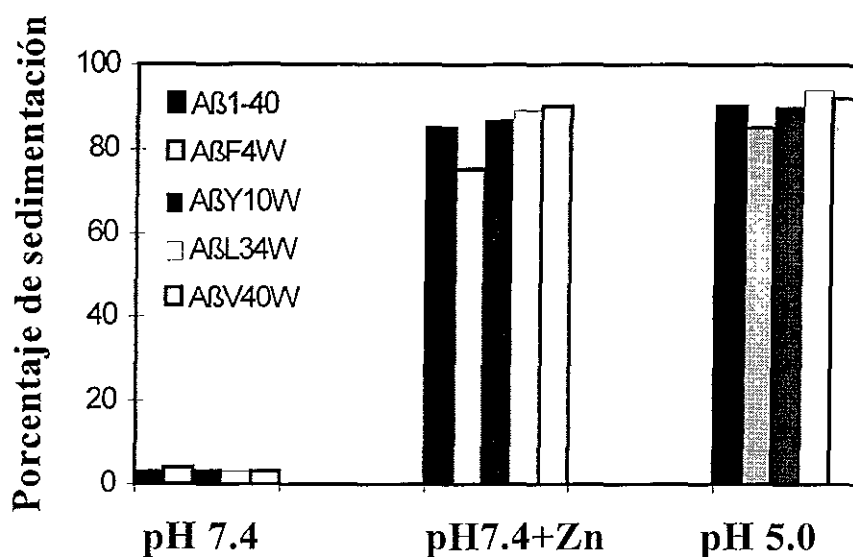


Figura 33. Propiedades de agregación de los mutantes del péptido amiloide Aβ1-40 con triptofano. En la gráfica se comparan las propiedades de agregación de los péptidos con triptofano con el tipo nativo de Aβ1-40, en condiciones fisiológicas (Tris HCl 10 mM pH 7.4) donde el péptido es soluble y bajo las otras dos condiciones en las que se promueve la agregación: a pH 7.4 en presencia de Zn²⁺ y a pH 5.0

En la figura 34 se muestran los espectros de emisión del péptido amiloide Aβ1-40 (A) y uno de los mutantes de triptofano AβF4W (B) en las 2 condiciones donde se promueve la agregación. Las muestras se incubaron en las diferentes condiciones por 24 h a una concentración de 230 μM (como se describió en métodos) y posteriormente se centrifugaron para separar el péptido agregado del soluble. Después, se obtuvo el espectro de emisión del sobrenadante (en la figura se muestra el espectro de emisión del péptido en el estado dimérico a pH 7.4) y del precipitado (se muestran los espectros de emisión de los precipitados obtenidos a

pH 7.4+Zn²⁺ o a pH 5.0, resuspendidos en los respectivos pH). Para el péptido nativo Aβ1-40, la intensidad de la fluorescencia aumentó en las dos condiciones que promueven la agregación, esto se debe a la alta hidrofobia de los agregados fibrilares. También observamos que el máximo de emisión permanece constante a 308 nm, debido a que la emisión de la tirosina no es sensible a la polaridad del disolvente. Por otro lado el péptido AβF4W mostró el mismo incremento en la emisión de la fluorescencia pero con un corrimiento hacia el azul, indicando de esta manera que el Trp en el estado agregado del péptido está expuesto a un medio más hidrofóbico. En la tabla 6 se resumieron todos los cambios del máximo de emisión para todos los mutantes con triptofanos.

Peptido	pH 7.4	pH 7.4 + Zn ²⁺	pH 5.0
Aβ-(1-40)	308	308	308
AβF4W	348	338	340
AβY10W	348	338	338
AβL34W	352	336	328
AβV40W	352	340	336

Tabla 6. Máximos de emisión de la fluorescencia de Aβ1-40 y de los mutantes de triptofano AβF4W, AβY10W, AβL34W y AβV40W.

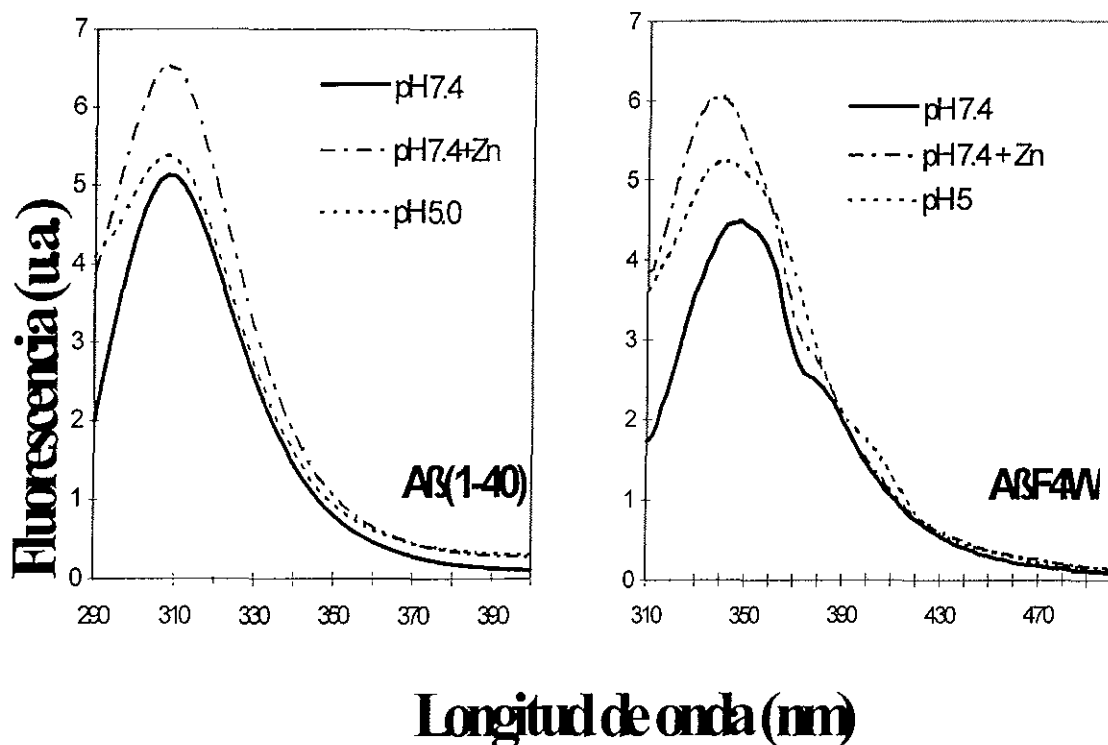


Figura 34. Espectros de emisión del péptido amiloide Aβ1-40 (A) y uno de los mutantes de triptofano AβF4W (B) en estado dimérico y en las dos condiciones en las que se promueve la agregación.

El estado oligomérico de los péptidos con triptofano fue caracterizado por cromatografía de filtración en gel y se encontró que los péptidos con los triptofanos AβF4W y AβL34W tienen el mismo tiempo de elución que el péptido nativo Aβ1-40 (Fig. 35). La columna se calibró con diferentes estándares de peso molecular y se encontró que la posición de elución de AβF4W y AβL34W corresponde a una estructura dimérica de 9000 daltones. Los otros dos péptidos con triptofano en la posición 10 y 40 que se usaron en el presente trabajo también mostraron el mismo tiempo de elución.

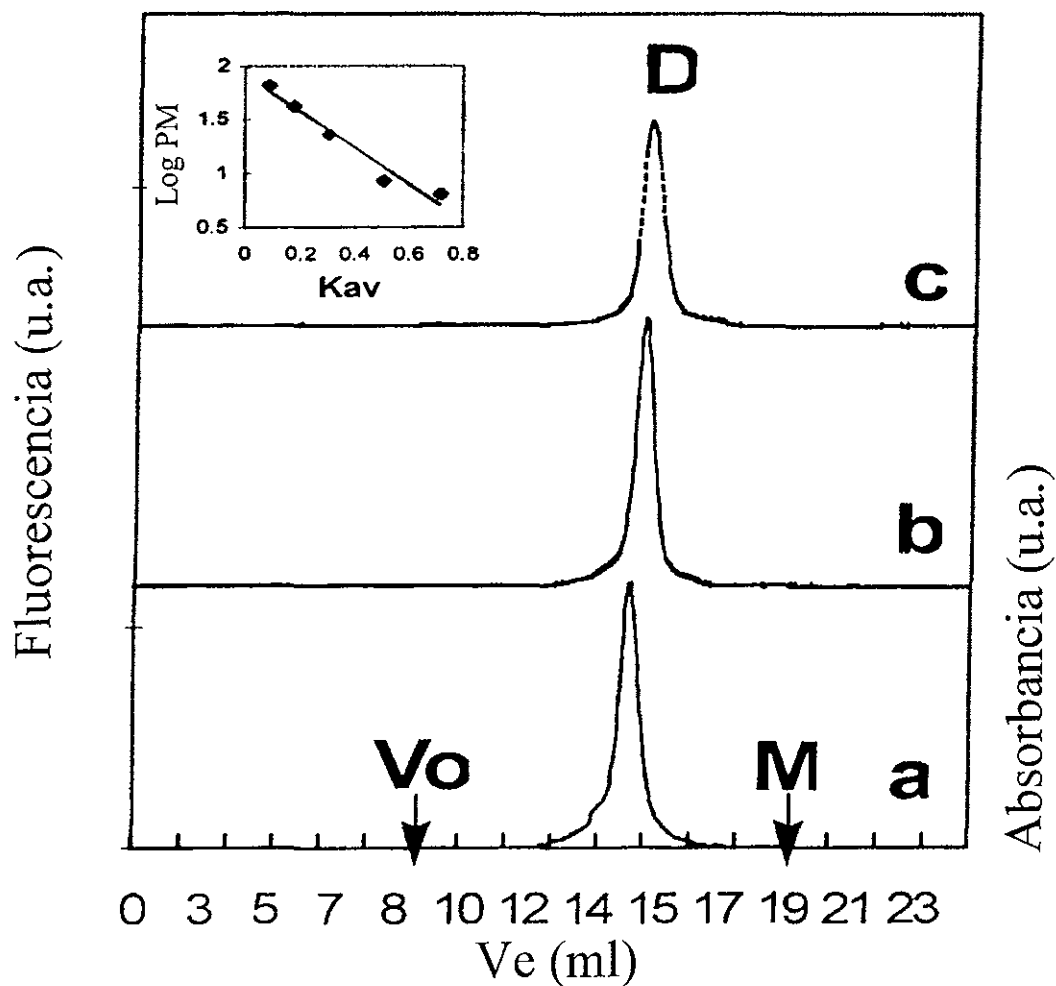


Figura 35. Cromatogramas de filtración en gel de los mutantes de triptofano del péptido A β 1-40. El cromatograma a muestra el perfil de elución del péptido nativo A β 1-40 detectado por uv-vis en 280 nm y los cromatogramas b y c corresponden a la elución de A β F4W y A β L34W detectados por fluorescencia en 350 nm. Las letras en la figura corresponden a: **D** dímero, **M** monómero, **Vo** volumen vacío. La esquina superior derecha muestra la curva de calibración para la columna usando una serie de péptidos y estándares de proteínas como se describe en métodos.

5.3.3 Determinación del agregado fibrilar por el método fluorescente y la microscopía electrónica

Para estudiar la propiedad que posee el péptido amiloide de formar agregados fibrilares, generalmente se utiliza un marcador fluorescente, la Tioflavina T. Se obtuvieron los fibriles amiloides con los mutantes de triptofano tal como se describió en la metodología, y se empleó el método fluorescente de la tioflavina T para estudiar la formación del fibril amiloide. El incremento de la fluorescencia de tioflavina-T indicó que tanto el péptido nativo A β 1-40, como los mutantes con triptofanos fueron capaces de unir a la tioflavina-T (Fig. 36). El Trp en la posición 10 (A β Y10W) mostró una menor fluorescencia, sugiriendo que quizás este residuo sea parte del sitio de unión de la tioflavina-T al péptido amiloide.

También se examinó la habilidad que tienen estos mutantes de formar agregados fibrilares por medio de la microscopía electrónica. Los experimentos consisten en incubar el péptido en altas concentraciones e inducir la formación de los fibriles por agitación. Se pudo observar que estos mutantes de triptofano forman agregados fibrilares de la misma morfología que el péptido nativo A β 1-40 como lo muestra la figura 37.

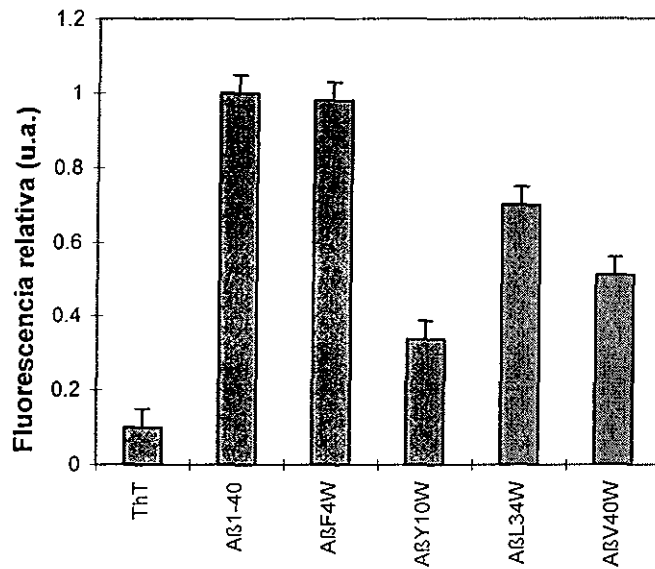


Figura 36. Comparación de las propiedades de unión de Tioflavina-T a los péptidos mutantes de triptofano y al péptido nativo Aβ1-40 por fluorescencia (excitación en 350 nm, emisión en 482 nm), después de incubar los péptidos por 24 h en una concentración de 230 μM de proteína.

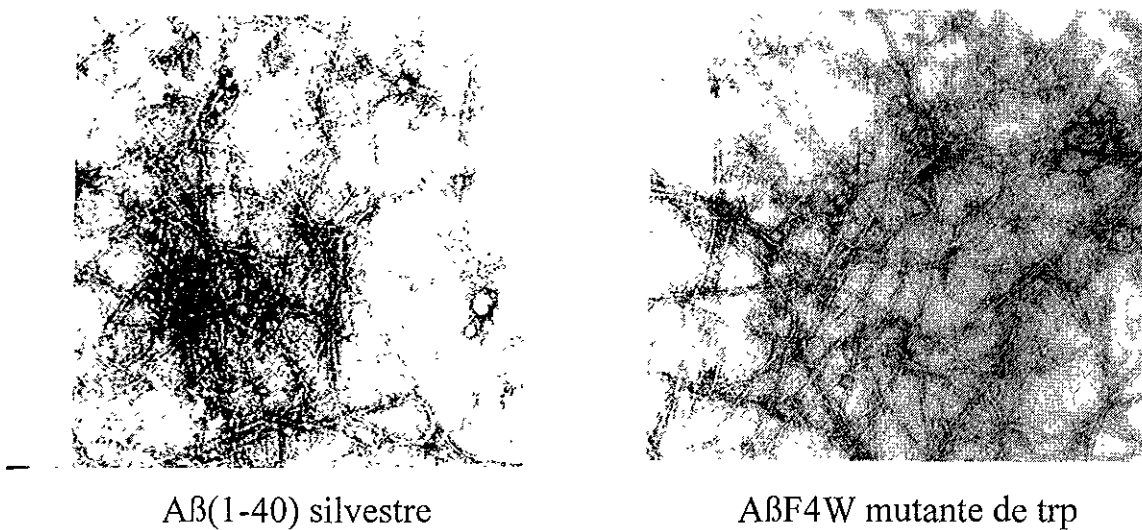


Figura 37. Microscopía electrónica del péptido nativo Aβ1-40 y AβF4W. Las fotografías revelan la formación de fibriles amiloides.

5.3.4 Estudios de apagamiento de la fluorescencia de los mutantes con triptofano

El apagamiento de la fluorescencia de los triptofanos se ha utilizado en estudios bioquímicos de las proteínas para discernir el grado de exposición que tienen estos residuos al microambiente [Lakowicz, 1983]. Ciertos aminoácidos pueden estar escondidos de la superficie, otros residuos pueden encontrarse expuestos al medio que los rodea.

En este trabajo se usó la estrategia más común que consiste en utilizar diferentes apagadores aniónicos, catiónicos y neutros para localizar aquellos residuos que están expuestos o escondidos en el estado dimérico o fibrilar del péptido amiloide A β 1-40. Como apagadores neutros tenemos a la acrilamida, que es un compuesto polar que tiene la capacidad de introducirse al interior de las proteínas o péptidos y de esa manera proporcionar una estimación del grado de exposición que presentan los triptofanos. Para los experimentos de apagamiento en estado dimérico, el péptido se disolvió en un amortiguador Tris HCl 10 mM /NaCl 0.1M pH 7.4 a una concentración no mayor de 25 μ M; debido a que en estas condiciones se demostró mediante cromatografía de filtración en gel y transferencia de energía, que el péptido permanece en estado dimérico [Garzón-Rodríguez., 1997]. Para inducir la formación de los fibriles, los péptidos se incubaron por 24 horas en altas concentraciones (230 μ M) bajo agitación continua.

Usando la acrilamida como apagador neutro se ha informado que aquellos triptofanos que se encuentren muy expuestos en la superficie tienen una constante de Stern-Volmer (K_{SV}) mayor a 7, moderadamente expuesto una K_{SV} entre 7 y 4 y aquellos con una K_{SV} menores de 4 es característico de residuos muy escondidos en el interior de las proteínas [Barry y Matthews, 1997]. La constante Stern-Volmer

(K_{SV}) para la amida libre del N-acetilriptofano (NATA) en un amortiguador a pH 8.5 con acrilamida es 21 M^{-1} ; Zsabo y colaboradores [Merril *et al.*, 1993] informaron que el apagamiento de NATA con acrilamida es grande e independiente del pH con una constante bimolecular de apagamiento (k_q) de $8-8.5 \text{ M}^{-1} \text{ ns}^{-1}$. Las gráficas de Stern-Volmer del apagamiento de los mutantes con triptofano en el estado dimérico (A) y fibrilar (B) se pueden observar en las figuras 38 y 39 con los 3 tipos de apagadores yoduro, acrilamida y cesio. En las tablas 7 A y B se encuentran todas las constantes de Stern-Volmer (K_{SV}) que corresponden al valor de la pendiente y las constantes bimoleculares del apagamiento (k_q) que se obtuvieron usando la ecuación 7.

Usando la acrilamida, podemos observar que los valores de la constante de Stern-Volmer (K_{SV}) para los péptidos diméricos A β F4W y A β Y10W son más bajos que para el triptofano (NATA) libre en disolución acuosa, estos valores se diferencian por un factor de ~ 2.9 . Lo anterior nos indica que estos residuos en las posiciones 4 y 10 en el dímero A β 1-40 están expuestos al disolvente. En tanto que los mutantes diméricos A β L34W y A β V40W presentan K_{SV} de 4.7 M^{-1} y 1.9 M^{-1} respectivamente, sugiriendo que estos aminoácidos en la terminal carboxilo se encuentran menos accesibles al disolvente, con respecto a los residuos 4 y 10 de la terminal amino.

La constante bimolecular del apagamiento (k_q), nos proporciona una información más detallada que el valor de K_{SV} del grado de exposición de los triptofanos en proteínas [Lakowicz, 1983; Merrill *et al.*, 1993]. En algunos casos las K_{SV} puede llevar a interpretaciones erróneas. Por ello se calcularon las constantes bimoleculares del apagamiento k_q , ($k_q = K_{SV} / \tau$) para cada mutante a partir de los datos obtenidos de las gráficas de Stern-Volmer y de las mediciones de la vida

media de la fluorescencia (τ) por el método de conteo unitario para los mutantes en el estado dimérico y fibrilar (ver tabla 8 A y B).

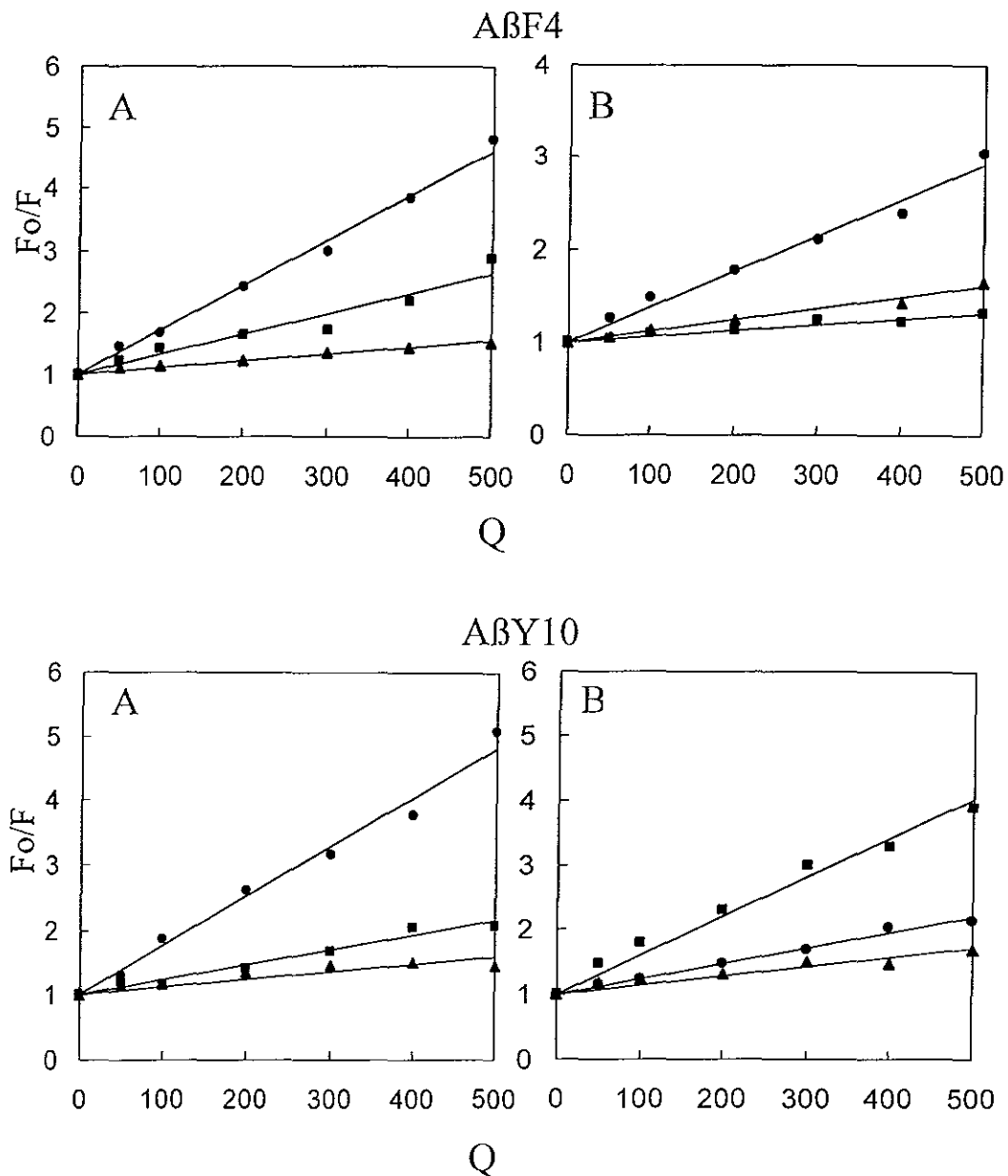
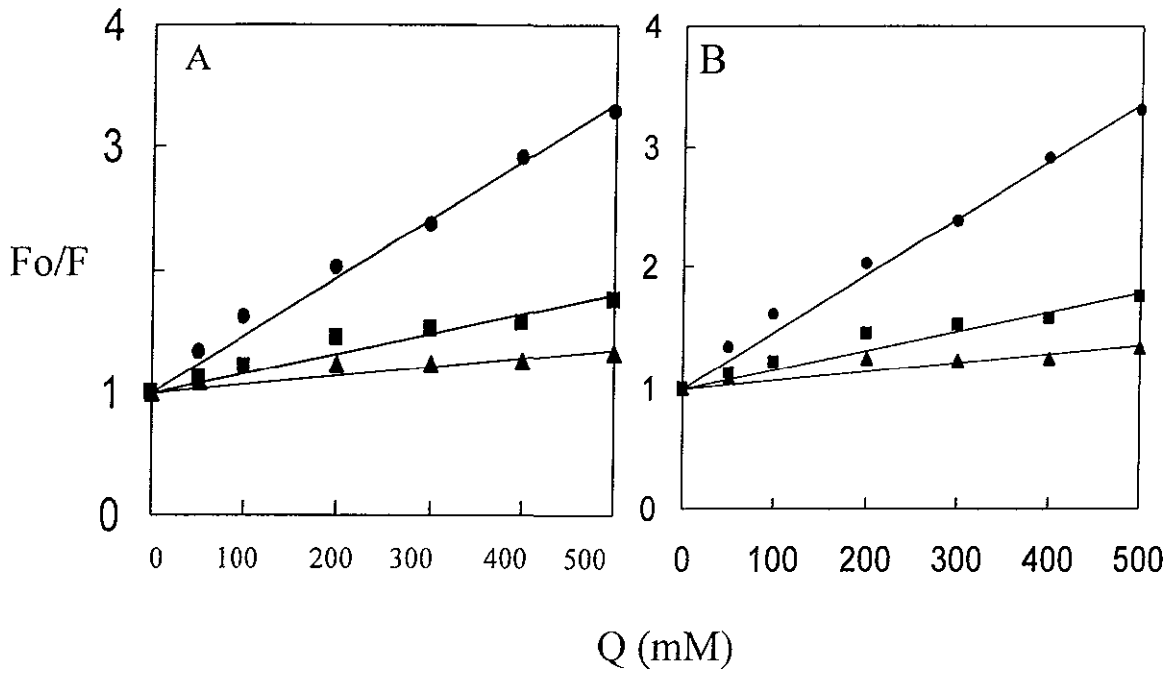


Figura 38. Gráficas de Stern-Volmer AβF4W y AβY10W en el estado dimérico (A) y fibrilar (B): con acrilamida (•), yoduro (■) y Cesio (▲)

ABL34W



ABV40W

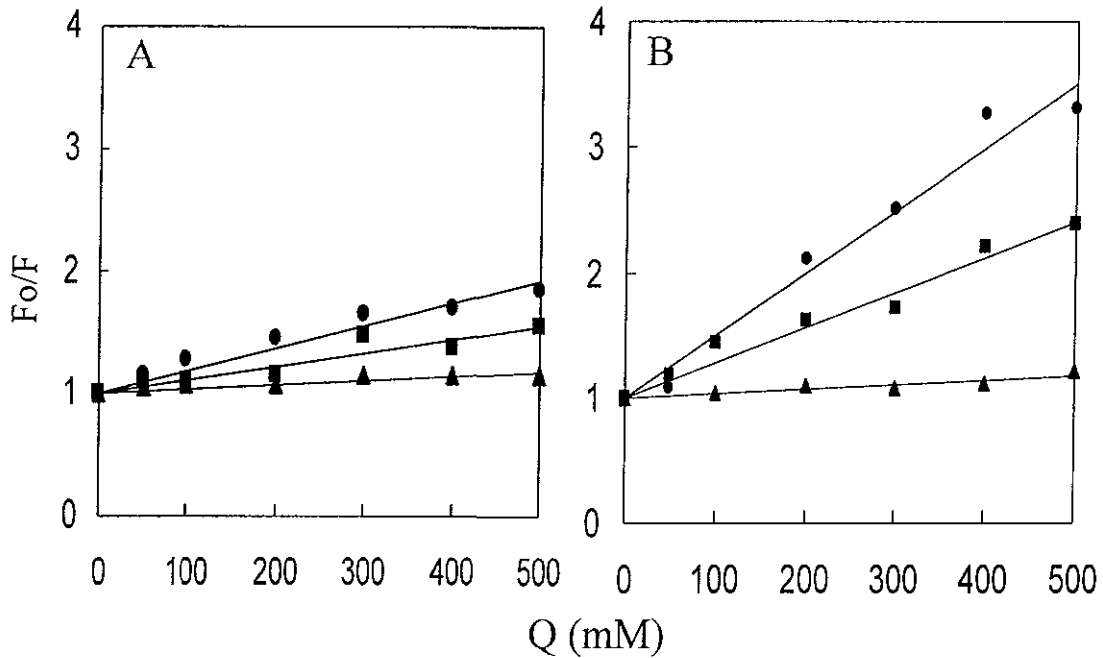


Figura 39. Gráficas de Stern-Volmer ABL34W y ABV40W en el estado dimérico (A) y fibrilar (B): con acrilamida (•), yoduro (■) y Cesio (▲)

Tabla 7. Constantes Stern-Volmer para el apagamiento de la fluorescencia ($K_{SV} M^{-1}$) y constantes bimoleculares del apagamiento ($k_q M^{-1} \cdot ns^{-1}$) para el péptido A β 1-40 y los mutantes de triptofano en el estado dimérico (A) y fibrilar (B).

Se midieron las intensidades de emisión para cada mutante a diferentes concentraciones de acrilamida, KI o CsCl. Las constantes de Stern-Volmer para el apagamiento dinámico (K_{SV}) y las constantes bimoleculares del apagamiento (k_q) se obtuvieron usando las ecuaciones 6 y 7. (A) estado dimérico, (B) estado fibrilar.

A	A β F4W	A β Y10W	A β L34W	A β V40W
K_{SV}, M^{-1}				
Acrilamida	7.2	7.6	4.7	1.9
KI	3.3	2.3	1.6	1.2
CsCl	1.1	1.2	0.7	0.4
$k_q M^{-1} ns^{-1}$				
Acrilamida	3.5	3.3	2.36	0.62
KI	1.6	1.0	0.8	0.36
CsCl	0.5	0.52	0.35	0.13

B	A β F4W	A β Y10W	A β L34W	A β V40W
K_{SV}, M^{-1}				
Acrilamida	3.8	2.4	4.3	5.0
KI	0.6	6.0	3.2	0.6
CsCl	1.2	1.4	0.6	0.4
$k_q M^{-1} ns^{-1}$				
Acrilamida	1.82	1.52	3.07	3.28
KI	0.28	3.82	2.28	0.39
CsCl	0.57	0.89	0.42	0.26

Tabla 8. determinación de la vida media de la fluorescencia de los mutantes de triptofano de A β 1-40 en estado dimérico (A) y en el estado fibrilar (B). Las abreviaturas usadas son: τ vida media, **a** el factor pre-exponencial. Los parámetros del decaimiento de la fluorescencia se obtuvieron de un análisis global. Para calcular los valores de $\langle \tau \rangle$, donde $\langle \tau \rangle = \sum a_i \tau_i / \sum a_i$, se usaron las vidas medias de la fluorescencia τ , y los valores pre-exponenciales **a**.

A	A β F4W	A β Y10W	A β L34W	A β V40W
λ (nm)	350	350	350	346
τ 1 (ns)	1.41	1.42	1.32	1.61
a1	0.656	0.607	0.673	0.313
τ 2 (ns)	3.41	3.88	3.44	3.91
a2	0.313	0.340	0.307	0.497
τ media (ns)	2.05	2.3	1.99	3.02

B	A β F4W	A β Y10W	A β L34W	A β V40W
λ (nm)	348	348	348	346
τ 1 (ns)	0.88	0.28	0.45	0.48
a1	0.59	0.586	0.744	0.763
τ 2 (ns)	2.85	1.74	2.09	2.16
a2	0.46	0.618	0.499	0.434
τ 3 (ns)	6.9	4.82	5.35	5.5
a3	0.075	0.202	0.092	0.129
τ media (ns)	2.08	1.57	1.4	1.52

Las constantes bimoleculares de apagamiento con acrilamida (k_q) en el estado dimérico de los mutantes A β F4W A β Y10W y A β L34W fueron $3.51 \text{ M}^{-1} \text{ ns}^{-1}$, $3.3 \text{ M}^{-1} \text{ ns}^{-1}$ y $2.36 \text{ M}^{-1} \text{ ns}^{-1}$ respectivamente, las cuales se encuentran en el intervalo $2\text{-}5 \text{ M}^{-1}\text{ns}^{-1}$ característico de residuos de triptofanos que están expuestos al disolvente (tabla 2). Estos resultados sugieren que los triptofanos en las posiciones 4, 10 y 34 están altamente expuestos al disolvente. Por el contrario el péptido A β V40W mostró una constante bimolecular k_q de $0.62 \text{ M}^{-1} \text{ ns}^{-1}$, la cual se encuentra en el intervalo de $0.6\text{-}1.5 \text{ M}^{-1} \text{ ns}^{-1}$, característico de triptofanos moderadamente expuestos.

En el estado fibrilar los mutantes con triptofanos A β F4W y A β Y10W mostraron un grado de apagamiento con acrilamida de 2 a 3 veces menor que en el estado dimérico. Mientras que A β L34W y A β V40W presentan una K_{SV} mayor en el fibril (4.3 y 5 M^{-1}) con una constante bimolecular k_q de 3.07 y $3.28 \text{ M}^{-1} \text{ ns}^{-1}$. Lo anterior indica que los residuos 34 y 40 están altamente expuestos en el ensamblaje fibrilar, mientras que los aminoácidos 4 y 10 presentan un menor grado de exposición.

En la figura 40 se graficó la relación entre la constante bimolecular de apagamiento (k_q) y la posición del triptofano en la secuencia del péptido amiloide: en el estado dimérico y fibrilar, usando a la acrilamida como apagador. Podemos observar que en los mutantes en la terminal carboxilo (A β L34W y A β V40W), los residuos están más expuestos en el estado fibrilar.

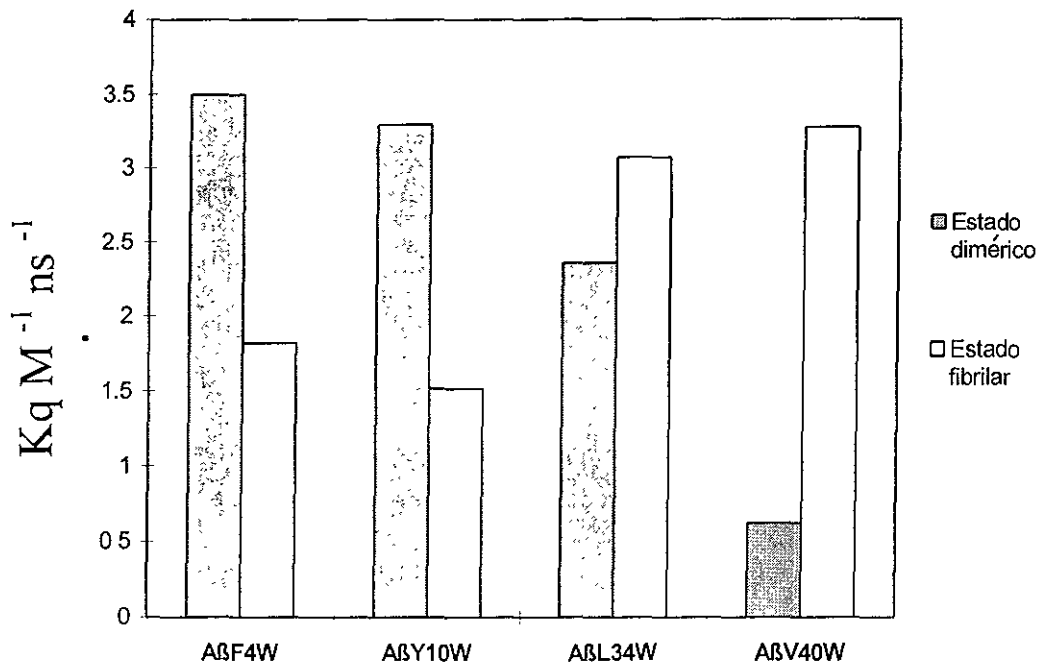


Figura 40. Relación entre la constante bimolecular (k_q) y la posición de los mutantes de triptofanos en la secuencia del péptido amiloide en el estado dimérico y fibrilar, usando a la acrilamida como apagador.

Utilizando apagadores iónicos como el yoduro y el cesio es posible obtener información adicional sobre qué cargas están rodeando a los triptofanos. El yoduro es un apagador que debido a su gran tamaño y carga negativa, se utiliza para localizar aquellos triptofanos que se encuentran cerca de la superficie de las proteínas. Una de las desventajas con el cesio como apagador catiónico es que su eficiencia de apagamiento es mucho menor que la del yoduro [Lakowicz, 1983]. Cuando las constantes de apagamiento con yoduro y el cesio presentan valores similares se puede decir que tanto cargas positivas como negativas rodean al fluoróforo (Eftnik *et al.*, 1983).

Usando el yoduro como apagador aniónico podemos decir que aquellos triptofanos con una constante Stern-Volmer (K_{SV}) con un valor mayor a 1, se

caracterizan por estar muy expuestos al disolvente. Cuando la K_{SV} es menor que 1 generalmente los triptofanos están ligeramente menos expuestos. Usando el yoduro como apagador aniónico se observó que todas los mutantes con triptofanos en el estado dimérico tienen una constante de Stern-Volmer (K_{SV}) mayores a 1 (ver tabla 7A). Mientras que los mutantes fibrilares de A β Y10W y A β L34W están altamente expuestos como lo indica K_{SV} de 6 y 3.2 M respectivamente y sus constantes bimoleculares k_q fueron de 3.82 y 2.28 M ns⁻¹, característicos de triptofanos expuestos (2-5 M⁻¹ ns⁻¹) (ver tabla 7B).

5.3.5 Discusión de los estudios de apagamiento de la fluorescencia del péptido amiloide: en el estado dimérico y fibrilar

Para estudiar el apagamiento de la fluorescencia del péptido amiloide en los estados dimérico y fibrilar, se sintetizaron varios péptidos con un solo residuo de Trp en la secuencia del péptido amiloide. La fluorescencia del triptofano en proteínas y péptidos se ha utilizado ampliamente para discernir que tan expuestos o accesibles al medio se encuentran estos residuos y para estudiar la estructura y conformación de las proteínas o péptidos cuando no se conoce su estructura terciaria [Bujalowski y Klonowska, 1994; Polkalsky *et al.*, 1995; Shen *et al.*, 1996; Gibson *et al.*, 1996; Barry y Matthews, 1997]. Mediante esta estrategia se obtuvo información acerca del grado de exposición de los residuos sustituidos a lo largo de la secuencia del péptido amiloide .

Estudios de la formación del fibril amiloide *in vitro*, se han llevado a cabo usando péptidos de varias longitudes y secuencias. Esta estrategia ha mostrado que el corazón hidrofóbico del péptido amiloide está entre los residuos 17 al 21, y

ejerce un control significativo en la formación del fibril (Leslie *et al*, 1995). Además, Hilbich y colaboradores (1992) informaron que el péptido A β 10-43 forma fibriles, pero cuando ellos reemplazaron los residuos phe19-phe20 por Ile-Gly en este péptido no ocurrió la formación del fibril. Wood y colaboradores (1995) informaron que en el péptido A β 12-26, la sustitución de cualquier aminoácido de la región 17-23 por prolina, completamente suprime la formación del fibril. Estos resultados demuestran el papel importante del segmento Leu₁₇-Val₁₈-Phe₁₉-Phe₁₉-Ala₂₁ en la formación del fibril, motivo por el cual nosotros no hicimos ninguna sustitución en esta región.

Terry y colaboradores establecieron en 1964 la naturaleza fibrilar del péptido amiloide mediante estudios de microscopía electrónica, que indicaron que los fibriles están constituidos de uno o más filamentos de 75-80 Å de diámetro, los cuales a su vez están compuestos de un arreglo pentagonal de protofibriles de 25-35 Å de diámetro lateralmente asociados. Cada protofibril está formado por de 2-3 subprotofibriles de 10-15 Å de ancho. Estudios recientes mediante microscopía electrónica de alta resolución han revelado estructuras del amiloide consistentes con este modelo (Teplow, 1998); sin embargo, aún queda mucho por entender acerca de la organización y la conformación del fibril amiloide.

Para llevar a cabo los estudios de apagamiento con el péptido amiloide A β 1-40 en el presente estudio, se requirió alterar la estructura de A β 1-40. Es posible considerar que la mutación de un aminoácido por triptofano cambie las propiedades del péptido amiloide. Sin embargo, los estudios realizados con los mutantes de triptofano, demuestran que esta sustitución no alteró su conformación. Esto se pudo observar por cromatografía de filtración en gel en donde los mutantes con triptofano tuvieron el mismo comportamiento de elución que el péptido nativo

indicando que éstos presentan el mismo radio hidrodinámico en disolución acuosa. La microscopía electrónica confirmó que los mutantes con triptofano fueron capaces de formar fibriles amiloides similares al péptido nativo.

Los análogos de triptofano usados en el presente estudio en el estado dimérico se pueden clasificar en 2 grupos: expuestos y moderadamente expuestos. Los análogos A β F4W, A β Y10W en el estado dimérico están expuestos al medio, y tienen unas altas constantes de apagamiento (K_{SV} , k_q), mientras que los mutantes A β L34W, A β V40W están menos accesibles al microambiente. Los valores similares de las constantes de Stern-Volmer para el apagamiento con yoduro y cesio de los mutantes diméricos A β F4W y A β Y10W sugieren que los residuos 4 y 10 están rodeados tanto de cargas positivas como negativas (Fig. 42). Estos datos concuerdan con el modelo propuesto por Chaney y colaboradores (1998) quienes recientemente mediante homología de secuencia predijeron un modelo para la estructura dimérica del péptido amiloide. Ellos sugieren que en la terminal amino los residuos His13, His14, Gln15 y Lys16 representan un dominio cargado positivamente y expuesto a la superficie de la hoja β . Además, la mayoría de las cargas negativas de esta región: Asp1, Glu3, Asp7, Glu11, Glu22 y Asp23 se encuentran también expuestas al medio acuoso. Por otra parte, solamente dos de los residuos de 30-42 con terminal carboxilos contribuyen al corazón hidrofóbico: Val36 y Val40; confirmando nuestra observación de que el residuo 40 se encuentra escondido del microambiente.

En el estado fibrilar se encontró que el residuo de triptofano en la posición 40 (A β V40W) está altamente expuesto al disolvente, pero significativamente menos expuesto en el estado dimérico (Fig. 40). La interpretación más simple a este cambio de exposición sería que ocurre un cambio conformacional en la transición

de dímero a fibril. Esto concuerda con estudios previos de la dependencia de temperatura para la formación del fibril, en donde informaron un cambio conformacional debido a una alta energía de activación para la transición de dímero a fibril (Kusumoto *et. al.*, 1998). Aunque estos estudios se realizaron en 0.1M de HCl, nosotros también encontramos una evidencia de un cambio conformacional bajo condiciones fisiológicas.

Las constantes de Stern-Volmer para los péptidos en el fibril A β Y10W y A β L34W con yoduro son de 4 a 5 veces más grandes que con el cesio, esto sugiere que se encuentran aminoácidos con carga positiva muy próximos a estos residuos. Mientras que para A β F4W y A β V40W en el fibril las constantes K_{SV} con cesio y yoduro son muy similares, esto sugiere que tanto aminoácidos con carga negativa como positiva están rodeando a los triptofanos 4 y 40.

6. Conclusiones

6.1 Transferencia de energía para investigar la estructura y el ensamblaje del péptido amiloide

1. Se demostró que el marcaje individual con sondas fluorescentes en las posiciones 4, 7, 25 y 34 no alteró las propiedades del péptido amiloide en comparación con el péptido nativo, mediante los experimentos de sedimentación conjuntamente con la cromatografía de filtración en gel.
2. Por primera vez se utilizó la fluorescencia intrínseca del péptido amiloide así como también el péptido fluorescente A β C25AEDANS para estudiar la desnaturalización y la reasociación del péptido amiloide en DMSO. El punto medio de la transición del estado nativo (dimérico) al estado desnaturalizado (monomérico) se observó en 40 % de DMSO. Al diluir el disolvente orgánico, durante la reasociación de los monómeros del péptido amiloide, se observó la restauración de la estructura dimérica, como lo indicó la recuperación de la fluorescencia intrínseca. Estos experimentos constituyeron la base para el estudio de la formación del dímero mediante la transferencia de energía.
3. Se determinó la naturaleza dimérica del péptido amiloide en disolución acuosa, mediante la transferencia de energía con tres diferentes pares donador-aceptor. A β C25AEDANS-A β C7FM, A β C34AEDANS-A β C4FM y A β 1-40-A β Y10W
4. El par A β 1-40-A β Y10W mostró una mayor en la eficiencia de la transferencia de energía (0.46) en 2% de DMSO, sugiriendo que a altas diluciones del disolvente orgánico ocurren cambios conformacionales que favorecen la formación de un dímero más compacto.
5. La cromatografía de filtración en gel demostró que los tres pares donador-aceptor, usados en los experimentos de transferencia de energía, presentaron el

mismo tiempo de elución que el péptido nativo A β 1-40, correspondiente a una molécula dimérica.

6. Los resultados del presente trabajo sugieren que el péptido A β 1-40 forma dímeros en disolución acuosa, que son estables por largos períodos de incubación y que la dimerización es el evento inicial en la agregación del amiloide.

6.2 Interacción con metales del péptido amiloide: estudios por fluorescencia

1. Por primera vez se midieron las constantes de disociación (K_d) en disolución acuosa de los complejos del péptido amiloide con Zn^{2+} , Cu^{2+} y Fe^{2+} en condiciones homogéneas por medio de la fluorescencia.
2. La baja afinidad del péptido amiloide por el Zn^{2+} (100 μM) en comparación con otras metalo-proteínas sugiere que este metal catiónico no es el único causante de la deposición de amiloides.
3. La alta afinidad de A β 1-42 por el Fe^{2+} ($K_d = 0.2 \mu M$) y el Cu^{2+} ($K_d = 1.6 \mu M$) sugiere que el péptido amiloide puede competir por estos metales con otras metalo-proteínas en sistemas biológicos.
4. La alta afinidad del Fe^{2+} con el péptido agregado A β 1-42 en uno de sus sitios de unión no está relacionada con su oxidación a Fe^{3+} , sugiriendo que este metal estabiliza al agregado en concentraciones fisiológicas.
5. La adición de cinc incrementó la fluorescencia de la tirosina y el triptofano, mientras que el cobre y el fierro la apagaron. La observación del apagamiento de la fluorescencia con estos metales indica la posibilidad de un contacto directo entre la unión del metal y el fluoróforo del péptido.

6. El efecto del incremento de la fluorescencia con cinc posiblemente refleja algunos cambios conformacionales en el péptido, los cuales atraen al fluoróforo a un medio más hidrofóbico.

6.3 Apagamiento de la fluorescencia en el estado dimérico y fibrilar del péptido amiloide.

1. Con el propósito de estudiar el grado de accesibilidad al microambiente de ciertos aminoácidos del péptido amiloide en los estados dimérico y fibrilar, se sintetizaron péptidos amiloides en los cuales se sustituyeron los residuos de las posiciones 4, 10, 34 ó 40 por triptofano. La cromatografía de filtración en gel y los estudios de sedimentación demostraron que la sustitución de los residuos 4, 10, 34 ó 40 por el triptofano no alteraron las propiedades o la estabilidad del péptido amiloide.
2. Los estudios de apagamiento de la fluorescencia en el estado dimérico mostraron que los triptofanos en la amino terminal (A β F4W y A β Y10W) se encuentran expuestos al medio que los rodea, presentando valores altos de la constante de Stern-Volmer (K_{SV}) y de la constante bimolecular de Volmer (k_q). El uso de los apagadores aniónicos y catiónicos confirmó el modelo propuesto por Chaney y colaboradores, en el cual se propuso que en la terminal amino del péptido amiloide, los aminoácidos cargados positiva y negativamente se encuentran totalmente expuestos en la superficie dimérica.
3. Para los mutantes en la región carboxilo en el estado dimérico A β L34W y A β V40W, los valores de K_{SV} y k_q indicaron que el residuo 34 se encuentra moderadamente expuesto y el aminoácido 40 se localiza muy escondido del medio.

4. En el estado fibrilar, los mutantes con triptofano A β L34W y A β V40W, presentaron valores más altos de las constantes de apagamiento en comparación con los mutantes en el estado dimérico. Esto sugiere que existe un cambio conformacional en la región carboxilo durante la transición del estado dimérico al fibrilar a raíz del cual los residuos 34 y 40 se vuelven expuestos al medio.
5. Los estudios de apagamiento de fluorescencia de los triptofanos del péptido amiloide en el estado fibrilar con apagadores catiónicos y aniónicos sugieren que los residuos 34 y 40 se encuentran rodeados de cargas positivas, mientras que los aminoácidos en las posiciones 4 y 40 están rodeados por cargas de naturaleza tanto positiva como negativa.

Perspectivas para trabajos futuros

1. Debido a que A β 1-40 forma estructuras diméricas en disolución acuosa sería interesante utilizar los derivados fluorescentes de este péptido para explorar otros aspectos de la estructura del amiloide. Se podría obtener un número suficiente de distancias medidas a través de la transferencia de energía, que junto con un modelaje por computadora ayudaría a tratar de elucidar la organización estructural del polipéptido en el estado dimérico.
2. Debido a que se ha demostrado que el estado de agregación del péptido amiloide es un factor importante en la toxicidad *in vitro*, sería interesante diseñar diversas moléculas inhibitoras que se unan fuertemente al dímero y prevengan la nucleación, así como también moléculas que prevengan la oligomerización de los dímeros o la extensión de los fibriles.
3. Se ha informado que los residuos de tirosina en las proteínas son propensos a formar puentes de ditirosina bajo condiciones oxidativas; los cuales conllevan a

4. En el estado fibrilar, los mutantes con triptofano A β L34W y A β V40W, presentaron valores más altos de las constantes de apagamiento en comparación con los mutantes en el estado dimérico. Esto sugiere que existe un cambio conformacional en la región carboxilo durante la transición del estado dimérico al fibrilar a raíz del cual los residuos 34 y 40 se vuelven expuestos al medio.
5. Los estudios de apagamiento de fluorescencia de los triptofanos del péptido amiloide en el estado fibrilar con apagadores catiónicos y aniónicos sugieren que los residuos 34 y 40 se encuentran rodeados de cargas positivas, mientras que los aminoácidos en las posiciones 4 y 40 están rodeados por cargas de naturaleza tanto positiva como negativa.

Perspectivas para trabajos futuros

1. Debido a que A β 1-40 forma estructuras diméricas en disolución acuosa sería interesante utilizar los derivados fluorescentes de este péptido para explorar otros aspectos de la estructura del amiloide. Se podría obtener un número suficiente de distancias medidas a través de la transferencia de energía, que junto con un modelaje por computadora ayudaría a tratar de elucidar la organización estructural del polipéptido en el estado dimérico.
2. Debido a que se ha demostrado que el estado de agregación del péptido amiloide es un factor importante en la toxicidad *in vitro*, sería interesante diseñar diversas moléculas inhibitoras que se unan fuertemente al dímero y prevengan la nucleación, así como también moléculas que prevengan la oligomerización de los dímeros o la extensión de los fibriles.
3. Se ha informado que los residuos de tirosina en las proteínas son propensos a formar puentes de ditirosina bajo condiciones oxidativas; los cuales conllevan a

la formación de agregados de alto peso molecular. Hasta el momento no se ha explorado la posibilidad de la formación de ditirosinas entre los péptidos amiloides.

4. Utilizar los péptidos fluorescentes para estudios a nivel citoquímico e histoquímico. Esto proporcionaría datos muy informativos con respecto a la detección y localización del péptido amiloide y de las posibles moléculas que interaccionen con éste en las neuronas y en general en las diversas regiones cerebrales.
5. Utilizar los péptidos fluorescentes para el estudio del ensamblaje del péptido amiloide en un sistema que simule condiciones biológicas, como por ejemplo en micelas invertidas o liposomas formadas por fosfolípidos.
6. Sintetizar mutantes del péptido amiloide en las cuales se remplace a los aminoácidos histidina o tirosina u otros posibles ligantes de los metales, con el fin de determinar la importancia de cada uno de estos residuos en la formación del complejo metal-péptido. Estos estudios permitirían la búsqueda de compuestos que bloqueen la unión del metal al péptido inhibiendo así la formación de agregados.
7. Caracterizar la formación de agregados del péptido amiloide inducidos por metales; estos estudios podrían contribuir a elucidar la deposición del amiloide.
8. Crear otros mutantes de triptofano del péptido amiloide diferentes a los usados en esta tesis, con el propósito de ser empleados en estudios de apagamiento de la fluorescencia, para elucidar el grado de exposición de varios residuos a lo largo de la cadena polipeptídica.

8. Apéndices

8.1 Apéndice No. 1. Ecuación para calcular la constante de asociación Metal-ligante por fluorescencia

La formación del complejo metal-ligante con una estequiometría de 1:1 está dada por la siguiente ecuación en el equilibrio:



donde

M= metal,

L=Ligante

M-L=complejo Metal-ligante

La constante de equilibrio para el proceso (A.1.1) es:

$$K = [M-L]/[M][L] \quad \text{donde } [M-L] = K[M][L] \quad (A.1.2)$$

se escriben las ecuaciones de balance de masas, considerando que $[M]_T \gg [L]_T$

$$[M]_T = [M] \quad (A.1.3)$$

$$[L]_T = [L] + [M-L] \quad (A.1.4)$$

donde $[L]_T$ = concentración total de ligante

Sustituyendo en la ecuación (A.1.4) la concentración de $[M-L]$ se obtiene la ecuación

$$[L]_T = [L] + K[M]_T[L] \quad (A.1.5)$$

Despejando $[L]$ de la ecuación (A.1.5) obtenemos:

$$[L] = [L]_T / (1 + K \cdot [M]_T) \quad (A.1.6)$$

Si en la longitud de onda de estudio la intensidad de fluorescencia observada (I_{obs}) resulta solo de la suma de fluorescencia del L y del complejo M-L:

$$I_{\text{obs}} = I_L + I_{M-L} \quad (\text{A.1.7})$$

$$I_{\text{obs}} = i_L [L] + i_{M-L} [M-L] \quad (\text{A.1.8})$$

Substituyendo [M-L] y M de las ecuaciones (A.1.2) y (A.1.3), respectivamente en la ecuación (A.1.8):

$$I_{\text{obs}} = i_L [L] + I_{M-L} [M-L] * K [M] * [L] \quad (\text{A.1.9})$$

Substituyendo [L] de la ecuación (A.1.6) en la ecuación (A.1.9)

$$I_{\text{obs}} = [L]_T / (1 + K * [M]_T) (i_L [L] + I_{M-L} * K * [M]_T) \quad (\text{A.1.10})$$

Si se considera que $[M]_T = 0$ en la ecuación (A.1.10):

$$I_{\text{obs}} = I_L [L]_T = I_0 \quad (\text{A.1.11})$$

Si se considera $[M]_T \rightarrow \infty$ en la ecuación (A.1.10):

$$I_{\text{obs}} = I_{M-L} * [L]_T = I_\infty \quad (\text{A.1.12})$$

sustituyendo I_0 e I_∞ de las ecuaciones (A.1.11 y A.1.12) :

respectivamente en la ecuación (A.1.10):

$$I_{\text{obs}} = \frac{I_0 + I_\infty * K * [M]_T}{(1 + K * [M]_T)} \quad (\text{A.1.13})$$

Si se analiza el cambio de intensidad de fluorescencia (ΔI) es decir, I_{obs} menos la intensidad de fluorescencia de ligante (I_L):

$$\Delta I = I_{\text{obs}} - I_0 \quad (\text{A.1.14})$$

Substituyendo la ecuación (A.1.13) en la ecuación (A.1.14):

$$\Delta I = I_{\text{obs}} - I_0 + I_\infty * K * [M]_T / (1 + K * [M]_T) - I_0 \quad (\text{A.1.15})$$

$$\Delta I = (I_{\infty} - I_0) \cdot K[M]_T / 1 + K \cdot [M]_T \quad (\text{A.1.16})$$

Sustituyendo $(I_{\infty} - I_0) = \Delta I_{\infty}$ en la ecuación (A.1.16):

$$\Delta I = \Delta I_{\infty} \cdot K[M]_T / 1 + K \cdot [M]_T \quad (\text{A.1.17})$$

8.2 Apéndice No. 2

Ecuación para calcular la constante de asociación Metal-ligante por fluorescencia considerando que las concentraciones totales de metal y ligantes son equivalentes

La formación del complejo metal-ligante con una estequiometría de 1:1 está dada por la siguiente ecuación en el equilibrio:



donde

M= metal,

L=Ligante

M-L=complejo Metal-ligante

La constante de equilibrio para el proceso (A.2.1) es:

$$K = [M-L] / [M][L] \quad (A.2.2)$$

Despejando [M-L] de la ecuación (A.2.2)

$$[M-L] = K[M][L] \quad (A.2.3)$$

se escriben las ecuaciones de balance de masas, considerando que $[M]_T = [L]_T$

$$[M]_T = [M] + [ML] \quad (A.2.4)$$

$$[L]_T = [L] + [ML] \quad (A.2.5)$$

Sustituyendo [M-L] ecuación (A.2.3) en la ecuación (A.2.4)

$$[M]_T = [M] + K[M][L] = [M] \{1 + K[L]\} \quad (A.2.5)$$

Sustituyendo [M-L] ecuación (A.2.3) en la ecuación (A.2.5)

$$[L]_T = [L] + K[M][L] = [L] \{1 + K[L]\} \quad (A.2.6)$$

Despejando [M] en la ecuación (A.2.4) y sustituyendo en la ecuación (A.2.6) obtenemos

$$[L]_T = [L] \{1+K * [M]_T / 1+K[L]\} = [L] * \frac{1+K[L]+[M]_T}{1+K[L]} \quad (A.2.7)$$

Multiplicando [L]_T por el común denominador obtenemos:

$$[L]_T \{1+K[L]\} = [L] + K[L]^2 + K[M]_T[L] \quad (A.2.8)$$

Reordenando términos e igualando a cero

$$K[L]^2 + [L] \{1+K[M]_T - K[L]_T\} - [L]_T = 0 \quad (A.2.9)$$

Dividiendo (A.2.9) entre K obtenemos

$$[L]^2 + \{1/K + [M]_T - [L]_T\} [L] - [L]_T/K = 0 \quad (A.2.10)$$

$$1/K = K_d \quad (A.2.11)$$

Sustituyendo (A.2.11) en la ecuación (A.2.10)

$$[L]^2 + \{K_d + [M]_T - [L]_T\} [L] - K_d [L]_T = 0 \quad (A.2.12)$$

Despejando [L] de la ecuación (A.2.12)

$$[L] = \frac{-K_d + [M]_T - [L]_T}{2} \pm \left[\frac{\{K_d + [M]_T - [L]_T\}^2 + 4 K_d [L]_T}{4} \right]^{1/2} \quad (A.2.13)$$

$$[L] = \frac{-K_d + [M]_T - [L]_T}{2} + 1/2 \left[\{K_d + [M]_T - [L]_T\}^2 + 4 K_d [L]_T \right]^{1/2} \quad (A.2.14)$$

Reordenando términos en la ecuación (A.2.14)

$$= 1/2 \left[\{K_d + [M]_T - [L]_T\}^2 + 4 K_d [L]_T \right]^{1/2} - \{K_d + [M]_T - [L]_T\} \quad (A.2.15)$$

Si en la longitud de onda de estudio la intensidad de fluorescencia I_{obs} resulta solo de la suma de la fluorescencia del L y del complejo M-L:

$$I_{obs} = i_L [L] + i_{ML} [ML] = i_L [L] + i_{ML} \{[L]_T - [L]\} \quad (A.2.16)$$

Despejando [M-L] de la ecuación (A.2.4) y sustituyendo en la ecuación (A.2.16)

$$= i_L[L] + i_{ML}[L]_T - i_{ML}\{[L]\} \quad (A.2.17)$$

Reordenando términos en la ecuación (A.2.17)

$$= i_{ML}[L]_T - \{i_{ML} - i_L\}[L] = i_{ML}[L]_T - \Delta_i[L] \quad (A.2.18)$$

$$\text{de donde } (i_{ML} - i_L) = \Delta_i \quad (A.2.19)$$

Substituyendo [L] en la ecuación (A.2.15) en la ecuación (A.2.20)

$$I_{obs} = i_{ML}[L]_T - \Delta_i \frac{1}{2} \left[\left\{ K_d + [M]_T - [L]_T \right\}^2 + 4 K_d [L]_T \right]^{1/2} - \{K_d + [M]_T - [L]_T\} = \quad (A.2.20)$$

de donde

$$\begin{aligned} \{K_d + [M]_T - [L]_T\}^2 + 4 K_d [L]_T &= K_d^2 + M_T^2 + L_T^2 + 2K_d M_T - 2K_d L_T - 2M_T L_T + 4K_d L_T \\ &= K_d^2 + M_T^2 + L_T^2 + 2K_d M_T + 2K_d L_T - 2M_T L_T + 2M_T L_T - 2M_T L_T \\ &= \{K_d^2 + M_T^2 + L_T^2 + 2K_d M_T + 2K_d L_T + 2M_T L_T\} - 4 M_T L_T \\ &= \{K_d + M_T + L_T\}^2 - 4 M_T L_T \quad (A.2.21) \end{aligned}$$

Reemplazando la ecuación (A.2.21) en la ecuación A.2.20

$$I_{obs} = i_{ML}[L]_T - \Delta_i \frac{1}{2} \left[\{K_d + M_T + L_T\}^2 - 4 M_T L_T \right]^{1/2} - \{K_d + [M]_T - [L]_T\} \quad (A.2.22)$$

$$\text{de donde } I_{\infty} = i_{ML}[L]_T \quad (A.2.23) \quad \text{y} \quad I_o = i_L[L]_T \quad (A.2.24)$$

$$I_{obs} = i_{ML}[L]_T - (i_{ML} - i_L) \frac{1}{2} \left[\{K_d + M_T + L_T\}^2 - 4 M_T L_T \right]^{1/2} - K_d - [M]_T + [L]_T \quad (A.2.25)$$

Reordenando términos en la ecuación (A.2.25)

$$\begin{aligned} &= i_{ML}[L]_T - \frac{(i_{ML} - i_L)}{2} \left\{ K_d + M_T + L_T \right\}^2 - 4 M_T L_T \Bigg)^{1/2} + \frac{(i_{ML} - i_L)}{2} K_d + \\ &\frac{(i_{ML} - i_L)}{2} [M]_T - \frac{(i_{ML} - i_L)}{2} [L]_T \quad (A.2.26) \end{aligned}$$

Substituyendo A.2.24 en A.2.26

$$= I_0 + \frac{i_{ML}[L]_T}{2} - \frac{i_L[L]_T}{2} + \frac{\Delta_i K_d}{2} + \frac{\Delta_i[M]_T}{2} - \frac{\Delta_i \{ \{ K_d + M_T + L_T \}^2 - 4 M_T L_T \}^{1/2}}{2} \quad (A.2.27)$$

$$= I_0 + \frac{i_{ML}[L]_T}{2} - \frac{i_L[L]_T}{2} + \frac{(i_{ML} - i_L)}{2} K_d + \frac{(i_{ML} - i_L)}{2} [M]_T - \frac{\Delta_i \{ \{ K_d + M_T + L_T \}^2 - 4 M_T L_T \}^{1/2}}{2} \quad (A.2.28)$$

$$\Delta_i[L] = \frac{i_{ML}[L]_T}{2} - \frac{i_L[L]_T}{2} \quad (A.2.29)$$

$$\frac{i_{ML}[L]_T}{2} - \frac{i_L[L]_T}{2}$$

$$= I_0 + \frac{\Delta_i \{ [L]_T + [M]_T + K_d - \{ \{ K_d + M_T + L_T \}^2 - 4 M_T L_T \}^{1/2} \}}{2} \quad (A.2.30)$$

$$\text{de donde } \Delta_i = \Delta_i / [L]_T = (I_\infty - I_0) / [L]_T = i_{ML} - i_L \quad (A.2.31)$$

$$= I_0 + \Delta_i \cdot 0.5 [L]_T \{ [L]_T + [M]_T + K_d - \{ \{ K_d + M_T + L_T \}^2 - 4 M_T L_T \}^{1/2} \} \quad (A.2.31)$$

8.3 Apéndice No.3

Ecuación para calcular la constante de asociación Metal-ligante por fluorescencia considerando una estequiometría metal-ligante 1:2

La formación del complejo metal-ligante con una estequiometría de 1:2 está dada por la siguiente ecuación en el equilibrio

$$[M]_T \gg [L]_T$$



La constante de equilibrio para el proceso (A.3.1) y (A.3.2)

$$K_1 = [ML]/[M][L] = \beta_1 \quad (A.3.3)$$

$$K_2 = [M_2L]/[M][L] = [M_2L]/[M][M][L] * K_1 = [M_2L]/[M]^2[L] \quad (A.3.4)$$

$$K_1 * K_2 = \beta_2 \quad (A.3.5)$$

Si en la longitud de onda de estudio la intensidad de fluorescencia observada (I_{obs}) resulta solo de la suma de fluorescencia de L y del complejo ligante ML y M_2L

$$I = i_L[L] + i_{LM}[ML] + i_{M_2L}[M_2L] \quad (A.3.6)$$

Substituyendo [ML] y $[M_2L]$ de las ecuaciones (A.3.3) y (A.3.4)

$$= i_L[L] + i_{LM} * \beta_1[M][L] + i_{M_2L} * \beta_2[M]^2[L] \quad (A.3.7)$$

Reagrupando términos

$$= [L]\{i_L + i_{LM} \beta_1[M] + i_{M_2L} * \beta_2[M]^2\} \quad (A.3.8)$$

Se escriben las ecuaciones de balance de masas, considerando que $[M]_T \gg [L]_T$

$$[M] = [M]_T \quad (\text{A.3.9})$$

$$[L]_T = [L] + [ML] + [M_2L] \quad (\text{A.3.10})$$

Sustituyendo $[ML]$ y $[M_2L]$ de las ecuaciones (A.3.3) y (A.3.4)

$$[L]_T = [L] + \beta_1[M][L] + \beta_2[M]^2[L] \quad (\text{A.3.11})$$

Reordenando términos

$$[L]_T = [L] \{ 1 + \beta_1[M] + \beta_2[M]^2 \} \quad (\text{A.3.12})$$

$$[L] = [L]_T / \{ 1 + \beta_1[M] + \beta_2[M]^2 \} \quad (\text{A.3.13})$$

Sustituyendo $[L]$ de la ecuación (A.3.13) en la ecuación (A.3.11)

$$I = \{ [L]_T / \{ 1 + \beta_1[M] + \beta_2[M]^2 \} \} \{ i_L + i_{ML} \beta_1[M] + i_{M_2L} \beta_2[M]^2 \} \quad (\text{A.3.14})$$

$$I = \frac{I_0 + I_1 \beta_1[M]_T + I_2 \beta_2[M]_T^2}{1 + \beta_1[M]_T + \beta_2[M]_T^2} \quad (\text{A.3.15})$$

$$1 + \beta_1[M]_T + \beta_2[M]_T^2$$

Bibliografia

- Askwith, C. C., de Silva, D., and Kaplan, J. [1996]. Molecular biology of iron acquisition in *saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **20**, 27-34.
- Atwood, C. S., Huang, X., Moir, R. D., Tanzi, R. E. and Bush, A. I. [1998]. Role of free radicals and metal ions in the pathogenesis of Alzheimer disease, In *Metals in Biological Systems. Interrelation between free radicals and metals ions in life processes*. Vol 36, A. Sigel and Sigel eds. (Marcel Dekker, Inc., New York.
- Atwood, C. S., Moir, R. D., Huang, X., Scarpa, R. C., Bacarra, N. M. E., Romano, D. M., Hartshorn, M. A., Tanzi, R. E., and Bush, A. I. [1998]. Dramatic aggregation of alzheimer A β by Cu(II) is induced by condicions representing physiological acidosis. *J. Biol. Chem.*, **273**, 1281.
- Barrow, C. J., Yasuda, A., Kenny, P. T., and Zagorski, M. G. [1992]. Solution conformations and aggregational properties of synthetic amyloid beta-peptides of Alzheimer's disease. Analysis of circular dichroism spectra. *J. Mol. Biol.* **225**:1075-1093.
- Barrow, C. J., and Zagorski, M. G. [1992]. NMR studies of amyloid β - peptides: proton assignments, secondary structure, and mechanism of an α -helices- \rightarrow β -sheet conversion for a homologous, 28 residues, N-terminal fragment. *Biochemistry* **31**, 5621-5631.
- Barry, J. K., and Matthews, K. S. [1997]. Ligand-induced conformational changes in lactose repressor: a fluorescence study of a single tryptophan mutants. *Biochemistry* **36**, 15632-15642.
- Benzi, G., and Morretti, A. [1995]. Are reactive oxygen species involved in Alzheimer ? *Neurobiol. Aging* **16**, 661-674.

- Brewer, J. M. and Weber, G. [1966]. The effect of magnesium on some physical properties of yeast enolase *J. Biol. Chem.* **241**, 2550-2557.
- Brown, A. M., Tummolo, D. A., Rhodes, K. J., Hofmann, J. R., Jacobsen, J. S., and Sonneberg-Reines, J. [1997]. Selective aggregation of endogenous β -amyloid peptide and soluble amyloid precursor protein in cerebrospinal fluid by zinc. *J. Neurochem.*, **69**, 1204-1211.
- Bujalowski, W., and Klonowska, M. M. [1994]. Close proximity of tryptophan residues and ATP-binding site in *escherichia coli* primary replicative helicase DnaB protein. *J. Biol. Chem* **269**, 31359-31371.
- Burdick, D., Soreghan, B., Kwon, M., Kosmoski, J., Knauer, M., Henschen, A., Yates, J., Cotman, C., and Glabe, C. [1992]. Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's A β /beta amyloid peptide analogs. *J. Biol. Chem.* **267**:546-554.
- Bush, A. I., Pettingel, W. H., Paradis, Md. Jr., and Tanzi, R. E. [1994]. Modulation of A β adhesiveness and secretase site cleavage by Zn. *J. Biol. Chem.* **269**, 12152-12155.
- Bush, A. I., Pettingell, W. H., Multhaup, G., Paradis, Md. Jr., Bonsattel, J-P., Gusella, J. F., Beyreuther, K., Masters, C. L., and Tanzi, R. E. [1994]. Rapid induction of Alzheimer A β amyloid formation by zinc. *Science* **265**, 1464-1467.
- Castaño, E. M., and Frangione, B. [1988]. Biology of disease human Amyloidosis Alzheimer's disease and related disorder. *Laboratory Investigation* **58**, N 2.
- Chaney, M. O., Webster, S. D., Kuo, Y. M., and Roher, A. E. [1998]. Molecular modeling of the A β 1-42 peptide from Alzheimer's disease. *Protein Eng.* **11**, 761-767.

- Chen, F. R [1976] The effect of metals cations on intrinsic protein fluorescence. In Biochemical Fluorescence: Concepts (Chen, R., and Edelhoch, H., eds.), Vol 2, 573-606, Dekker, New York.
- Clements, A. Allsop, D., Walsh, D. M., and Williams, C. H. [1996]. Aggregation and metals binding properties of mutant forms of the amyloid A β peptide of Alzheimer disease. *J. Neurochem.* **66**, 740-747.
- Conner, J. R., Menzies, S. L., St. Martin, S. M., and Mufson, E. J. [1992]. A histochemical study of iron and transferrin and ferritin in Alzheimer's diseased brain *J. Neurosci. Res.* **31**, 75-83.
- Cuatrecasas, P., Edelhoch H., and Snfinsen, C. B. [1967]. Fluorescence studies of the interaction of nucleotides with the active site of the nuclease of staphylococcus aureus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **58**, 2043-2050.
- Davies, L. J. T., Musa, M., and Dormandy T. L. [1968]. Measurements of plasma zinc. In health and disease. *J. Clin. Pathol.* **21**, 359-363.
- Dyrks, T., Dyrks, E., Hartman, T., Master, C. and Beyreuther K. [1992]. *J. Biol. Chem.* Amyloidogenicity of β A4 and β A4-bearing amyloid protein precursor fragments by metals-catalyzed oxidation. **267**, 18210-18217.
- Ebadi, M., [1991]. Metallothioneins and other zinc binding proteins in brain. *meth. Enzymol.* **205**, 363-387.
- Eftnik, M. R., and Ghiron, C. A. [1981]. Fluorescence quenching studies with proteins. *Anal. Biochem.* **114**, 199-227.
- Enya, M., Morishima-Kawashima, M., Yoshimura, M., Shinkai, Y., Kusui, K., Khan, K., Games, D., Schenk, D., and Sugihara, S. [1999]. Appearance of sodium sulfate-stable amyloid β -protein (A β) dimer in the cortex during aging. *Am. J. of Pathology*, **154**, 271-279.

- Ehmann, W. D., Markesbber, W. R., Allaudin, M. Hossain, T. I., and Brubaker, E. H. [1986]. Brain traces elements in Alzheimer's disease *Neurotoxicology*, **7**, 195-206.
- Esler, W. P., Stimson, E. R., Ghilardi, J. R., Vinter, H. V., Lee, J. P., Manthy, P. W., and Maggio, J. E. [1996]. In vitro growth of Alzheimer's disease β amyloid plaques displays first-order kinetic. *Biochemistry* **35**, 749-757.
- Estus, S., Golde, T. E., Kunishita, T., Blades, D., Lowery, D., Eisen, M., Usiak, M., Qu, X. M., Tabira, T., and Greenberg, B. D. [1992]. Potentially amyloidogenic, carboxyl-terminal derivatives of the amyloid protein precursor. *Science* **255**, 726-728.
- Failla, M. L., van de veerdonk, M, Morgan, W. T., and Smith, J. C. [1982]. Characterization of Cinc binding proteins of plasma in familial hypercincemia. *Lab. Clin. Med.* **100**, 943-953, 52.
- Falchuk, K. H. [1986]. Clinical disorders of Zn metabolism and their treatment. *Frontiers in Bioinorganic Chemistry*. 355-365.
- Frederickson, C. J. [1989]. Neurobiology of Zn and cinc-containing neurons *Int. Rev. Neurobiol.* **31**, 145-238.
- Garzón-Rodríguez, W., Sepulveda-Becerra, M., Milton, S., and Glabe, C. [1997]. Soluble amyloid A β 1-40 exist as stable dimers in solution *J. Biol. Chem.* **272**, 21037-21044.
- Gibbson, L. Don., Hixson, J. D., Hay, N., Lund, P., and gorovits, M. B., Ybarra, J., and Horowitz, M. P. [1996]. Intrinsic fluorescence studies of the chaperonin GroEL containing single Tyr-Trp replacements reveals ligands induced comformational changes. *J. Biol. Chem.* **271**, 31989-31995.
- Glusker, J. P. [1991]. Structural aspects of metal liganding to functional groups in protein. *Adv. Prot. Chem.* **42**, 1-76.

- Haass, C., and Selkoe, D. J. [1993]. Cellular processing of beta-amyloid precursor protein and the genesis of amyloid beta-peptide. *Cell*. **75**:1039-1042.
- Hamaguchi, [1991]. *Biochemistry*. **30**, 1012-1019.
- Hilbich, C., Kisters-Woike, B., Reed, J., Masters, C. L., and Beyreuther, K. [1991]. Aggregation and secondary structure of synthetic amyloid beta A4 peptides of Alzheimer's disease. *J. Mol. Biol.* **218**:149-163.
- Iwatsubo, T., Odaka, A., Suzuki, N., Mizusawa, H., Nukina, N., and Ihara, Y. [1994]. Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). *Neuron*. **13**:45-53.
- Jacob, [1987]. in *Fundamentals of Clinical Chemistry* (Tietz, N.W., ed). Saunders, W.B. company, Philadelphia, Pp517-532.
- Job, P. [1928]. *Ann. Chim.* **9**, 113-203.
- Joshi, G. J., Dhar, M., Clauberg, M. and Chauthaiwale V. [1994]. Iron and Aluminum homeostasis in neural disorders. *Environmental health perspectives*. **102**, 207-213.
- Kang, J., Lemaire, H. G., Unterbeck, A., Salbaum, J. M., Masters, C. L., Grzeschik, K. H., Multhaup, G., Beyreuther, K., and Muller-Hill, B. [1987]. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*. **325**, 733-736.
- Kaplan, J., and O'Halloran, T. V. [1996]. Iron metabolism in eukaryotes; mars and venus and it again (comment). *Science* **271**, 1510-1512.
- Kasa, P., Szerdahelyi, P. and Wisniewski, H. M. [1995]. Lack of topographical relations between sites of aluminum deposition and senile plaques in the Alzheimer disease brain. *Acta Neuropathol.* **90**, 526-531.

- Kirschner, D. A., Abraham, C., and Selkoe, D. J. [1986]. X-ray diffraction from intraneuronal paired helical filaments and extraneuronal amyloid fibers in Alzheimer disease indicates cross-beta conformation. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**, 503-507.
- Kirschner, D. A., Inouye, H., Duffy, L. K., Sinclair, A., Lind, M., and Selkoe, D. J. [1987]. Synthetic peptide homologous to beta protein from Alzheimer disease forms amyloid-like fibrils in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 6953-6957.
- Kusumoto, Y., Lomakin, A., Teplow, D. B., and Benedek, G B. [1998]. Temperature dependence of amyloid β -protein fibrillization. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**, 12277-12282.
- Lakowicz, J. R. [1983]. Principles of Fluorescence. Plenum Press, New York, N.Y.
- Landsberg, J. P., McDonald, B., Watt, F. [1992]. Absence of Aluminium in neuritic plaques cores in Alzheimer's disease. *Nature.* **360**, 65-68.
- Lehrer, S. S. [1968]. *Biophysical J.*
- Iversen, L. L., Mortishire-Smith, R. J., Pollack, S. J., and Shearman, M. S. [1995]. Review. The toxicity in vitro of β amyloid protein. *Biochem j.* **311**, 1-16.
- LeVine, H. 3d. [1997]. Stopped flow kinetics reveal multiple phases of thioflavine T binding to Alzheimer β (1-40) amyloid fibril. *Arch of Biochem and Biophys.* **342**, 306-316.
- LeVine, H. 3d. [1993]. Thioflavine T interacción with syntetic Alzheimer's disease β -amyloid péptides: Detection of amyloid aggregation in solution. *Protein. Sci.* **2**, 04-410.
- Linder, M. C. [1991]. *The Biochemistry of Copper.* New york, Plenum.

- Linder, M. C., and Hazegh-Azam, M. [1996]. Copper biochemistry and molecular biology *Am. J. Clin. Nutr.* **63**, 797-811.
- Lovell, M. A., Robertson, J. D., Teesdale, W. J., Campbell, J. L., and Markesbery. [1998]. Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *J. Neurol. Sci.* **158**, 47-52.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. [1951]. *J. Biol. Chem* **193**, 265-275.
- Mantyh, P. W., Ghilardi, J. R., Rogers, S., DeMaster, E., Allen, C. J., Stimson, E. R., and Maggio, E. [1993]. Aluminium, Iron, and Zinc promote aggregation of physiological concentrations of β -amyloid peptide. *J. Neurochem* **61**, 1171-1174.
- Markesbery, W. R. [1997]. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free radic. Biol. Med.* **23**, 134-147.
- Merrill, A. R., Palmer, L. R., Szabo, A. G. [1993]. Acrylamide quenching of the intrinsic fluorescence of tryptophan residues genetically engineered into the soluble colicin E1 channels peptide. *Biochemistry.* **32**, 6974-6981.
- Musier, M. K., and Hammes, G. G. [1988]. Assessment of the number of nucleotide binding sites on chloroplast coupling factor 1 by the continuous variations methods. *Biochemistry.* **27**, 7015-7020.
- Owen, C. A. [1982] *Biological Aspects of Copper*, Noyes Publications, Park Ridge, NJ, pp.117-129
- Permanne, B., Perez, C., Soto, C., Frangione, B., and Wisniewski, T [1997]. Detection of apolipoprotein E/dimeric soluble amyloid beta complex in Alzheimer's disease brain supernatants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **240**, 715-720.

- Polkalsky, C., Wick, P., Harms, E., lytle, E. F., and Van Etten, L. [1995]. Fluorescence resolution of the intrinsic tryptophan residues of bovine protein tyrosyl phosphatase *J. Biol. Chem.* **270**, 3809-3815.
- Riedere, P., Sofic, E., Rausch, W. D., Schmidt, B., Reynolds, G. P., Jellinger, K., and Youdim, M. B. [1989]. Transition metals, ferritin, glutathione, and ascorbic acid in parkinsonian brains *J. Neurochem.* **52**, 515-520.
- Roher, A. E., Lowenson, J. D., Clarke, S., Woods, A. S., Cotter, R. J., Gowing, E., and Ball, M. J. [1993]. beta-Amyloid (1-42) is a mayor component of cerebrovascular Amyloid deposits: implications for the pathology of Alzheimer's disease. *Proc. Acad. Sci. U. S. A.* **90**: 10836-10840.
- Sato, M., Ohtomo, K., Daimon, T., Sugiyama, T., and Iijima, K. [1994]. Localization of copper to afferent terminals in rats locus ceruteus, in contract to mitochondrial copper in cerebellum. *J. Hictochem. Cytochem.* **42**, 1585-1591.
- Schellenberg, G. D. [1995]. Molecular genetics of familial Alzheimer's disease. *Arzneimittelforschung.* **45**:418-424.
- Selkoe, D. J. [1994]. Cell biology of the amyloid beta-protein precursor and the mechanism of Alzheimer's disease. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **10**:373-403.
- Sepulveda-Becerra, M. S., Ferreira, S., Strasser, R., Garzón-Rodriguez, W., Beltran, C., Gomez-Poyou, A and Darszon, A [1996]. Refolding of triosephosphate isomerase in low water media investigated by fluorescence resonance energy transfer. *Biochemistry* **35**, 15915-15922.
- Shen, F., Triezenberg, J. S., Hensley, P., Porter, D., and Knutson, R. J. [1996]. Critical amino acids in the Herpevirus protein VP16 are solvent exposed in highly mobile protein segment. *J. Biol. Chem.* **271**, 4819-4826.

- Shinobu, L. A. and Beal, M. F. [1997]. in *Metal and Oxidative Damage in Neurological Disorders*, (Connor, J.R. ed), Plenum Publishing Corporation, New York, NY.
- Shoulson, I. [1998]. Experimental therapeutic of neurodegenerative disorders: Unmet needs. *Science*. **282**, 1072-1074. National Institutes on Aging. Discoveries in health of agings americans: progress reports on Alzheimer's disease. U. S. department of Helth and human Services. Washington D. C.: National Institute of Health, [1992]. Gaceta Unam No 2.863 pag 28
- Smith, M. A., Harris, P. L. R., Sayre, L. M., and Perry, G. [1997] Iron accumulation in Alzheimer's disease is a source of redox-generated free radicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 9866-9868.
- Smith, R. M. [1983]. In *Traces elements neurobiology and deficiencies. Neurobiology of the traces elements*. Humans Press, Clifton, N.J.
- Snyder, S. W., Lador, U. S., Wade, W. S., Wang, G. T., Barrett, L. W., Matayoshi, E. D., Huffaker, H. J., Krafft, G. A., and Holzman, T. F. [1994]. Amyloid-beta aggregation: selective inhibition of aggregation in mixtures of amyloid with different chain lengths. *Biophys. J.* **67**:1216-1228.
- Soreghan, B., Kosmoski, J., and Glabe, C. [1994]. Surfactant properties of Alzheimer's A beta peptides and the mechanism of amyloid aggregation. *J. Biol. Chem.* **269**, 28551-28554.
- Spencer, R. G., Halverson, K. J., Auger, M., McDermott, A. E., Lansbury P. T., and Griffin, Jr. [1991]. An unusual peptide conformation may precipitate amyloid formation in Alzheimer's disease: application of solid-state NMR to the determination of protein secondary structure. *Biochemistry*. **30**:10382-10387.
- Strittmatter, W. J., Weisgraber, K. H., Huang, D. Y., Dong, L. M., Salvesen, G. S., Pericak-Vance, M., Schmechel, D., Saunders, A. M., Goldgaber, D., and Roses,

- A. D. [1993]. Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 8098-8102.
- Suelter, C. H. [1970]. Enzymes activated by monovalent cations. *Science* **168**, 789-795.
- Tanzi, R. E., Bush, A. I., and Wasco, W. [1994]. Genetic studies of Alzheimer's disease: lessons learned and future imperatives. *Neurobiol. Aging.* **15** Suppl 2:S145-S148.
- Tanzi, R. E., Petrukhin, K., Chernov, I., Pellequer, J. L., Wasco, W., Ross, B., Romano, D. M., Parano, E., Pavone, L., Brzustowicz, L. M., Devot, M., Peppercorn, J., Bush, A. I., Stemlieb, I., Piratsu, M., Gusella, J. F., Evgrafove, O., Penchaszadeh, F. K., Honig, B., Edelman, I. S., Soares, M. B., Scheinber, I. H., and Gilliam, T. C. [1993]. The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene. *Nature Gen.* **8**, 344-350.
- Teplow, D. B. [1998]. Structural and kinetic features of amyloid protein fibrillogenesis. *Int. J. Exp. Clin. Invest.* **5**, 121-142.
- Tjernberg, L. O., Callaway, D. J. E., Tjernberg, A., Hahne, S., Lilliehook, C., Teranius, L., Thyberg, J., and Nordstedt, C. [1999]. A molecular model of Alzheimer's amyloid β -peptide fibril formation. *J. Bio. Chem.* **274**, 12619-12625.
- Terry, R. D., Gonatas, N. K., and Weiss, M. [1964]. Ultrastructural studies in Alzheimer's presenile dementia. *Am. J. Pathol.* **44**, 269-297.
- Vanderkooi, J. M., Lerokomar, A., Nakamura, H., and Martinosi, A [1977]. Fluorescence energy transfer between Ca transport ATPase molecules in artificial membranes. *Biochemistry.* **16**, 1262-1267.

- Vallee, B. L., and Galdes, A. [1984] The metalbiochemistry of zinc enzymes. *Adv. Enzymol.* **56**, 283-430.
- Vallee, B. L., and Auld D. S. [1993]. Zn: biological function and coordination Motifs. *Acc. Chem. Res.*, **26**, 543-551.
- Walsh, D. M., Lomakin, A., Benedek, G. B., Gondron, M. M., and Teplow D. B. [1997]. Amyloid β -protein fibrillogenesis: detection of a protofibrillar intermediate. *J. Biol. Chem.* **272**, 22364-22372.
- Ward, L. D. [1985]. Measurement of ligand binding to protein by fluorescence spectroscopy. *Mtd in Enzml.* **117**, 400-415.
- Weber, G., and Teale, F. W. [1959]. *Disc. Faraday. Soc.*
- Wood, S. T., Wetzel, R., Martin, J. D., and Hurle, M. R. [1995]. Prolines and amyloidogenicity in fragments of Alzheimer's peptide. *Biochemistry* **34**, 724-730.
- Wu, P., and Brand, L. [1994]. Resonance energy transfer: methods and applications. *Anal. Biochem.* **218**, 1-13.