



Efecto de la secuencia sobre la estructura de conjugados del péptido CLPFFD con nanopartículas de oro

Arturo Guerrero^a, Ivonne Olmedo^a, Leonardo Caballero^{b,c}, Francisco Melo^{b,c} y Marcelo J. Kogan^{a,c}

^a Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Olivos 1007, Independencia, Santiago, Chile. ^b Laboratorio de Física No Lineal, Universidad de Santiago de Chile, Casilla 309000, Santiago, Chile. ^c Centro para la Investigación Interdisciplinaria Avanzada en Ciencias de los Materiales (CIMAT), Av. Blanco Encalada 2008, Santiago, Chile. E-mail de contacto: marcelo.kogan@uclm.cl

Introducción. Recientemente en nuestro laboratorio se ha demostrado que es posible la desagregación *in vitro* de agregados tóxicos de la proteína amiloide beta ($A\beta$), involucrada en la enfermedad de Alzheimer (EA), mediante el empleo de conjugados entre nanopartículas metálicas y péptidos que presentan afinidad por $A\beta$, y la aplicación de radiofrecuencias sobre los conjugados. Estos resultados han llevado a la proposición de una nueva estrategia terapéutica para la EA¹. Sin embargo, el recubrimiento superficial de las nanopartículas puede llevar a tanto a cambios en las propiedades fisicoquímicas de las mismas como también a cambios en la estructura espacial de los péptidos quimisorbidos², lo que puede afectar la interacción con la macromolécula a la cual se deben dirigir los conjugados, modificándose así la actividad biológica. En este trabajo se caracterizaron los conjugados de péptidos con afinidad por $A\beta$ (CLPFFD y dos de sus isómeros) con nanopartículas de oro (AuNP) empleando diferentes técnicas, con el fin de obtener información acerca de la estructura que los mismos adoptan al encontrarse anclados a las AuNP. Dicha información contribuirá a explicar el mecanismo de la interacción de los conjugados con los agregados de $A\beta$.

Obtención de AuNP y sus conjugados

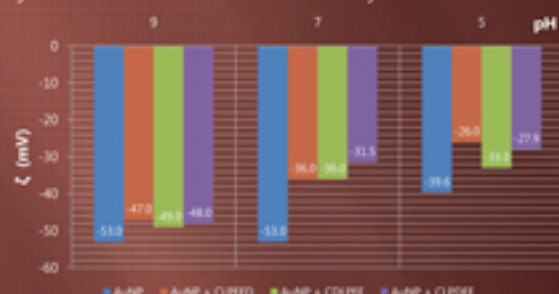
Síntesis de AuNP. Fueron sintetizadas mediante la reducción de una sal de oro, $H AuCl_4$, con citrato trisódico³ (AuNPt) y, alternativamente, con $NaBH_4$ como reductor y CTAB como estabilizante (AuNPz). Se caracterizaron por espectrofotometría al visible y microscopía electrónica de transmisión (TEM), obteniéndose un máximo de absorbancia a 520 nm y tamaños de alrededor de 10-12 nm.

Síntesis de los péptidos. Se sintetizaron el péptido CLPFFD-NH₂ y sus dos isómeros CDLPFF-NH₂ y CLPDDF-NH₂, mediante síntesis en fase sólida, en resina Rink amida siguiendo un esquema de protección Fmoc/t-Bu.

Conjugación de las AuNP a los péptidos. La reacción entre el péptido, que contiene un grupo tiol libre y la AuNP ocurre a temperatura ambiente en solución acuosa. A 20 mL de AuNP (estabilizadas a pH 8) se agregó 1 mg de péptido disuelto en 1 mL de agua Milli-Q y se dejó reaccionar por 15 min. Los conjugados se caracterizaron por electroforesis en gel de agarosa, en buffer TAE 1x a 120 mV.

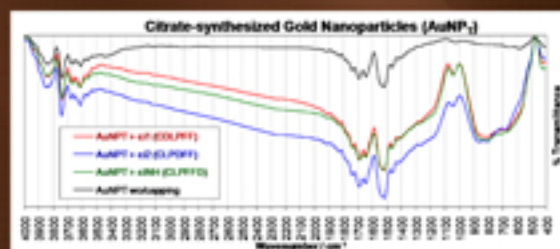
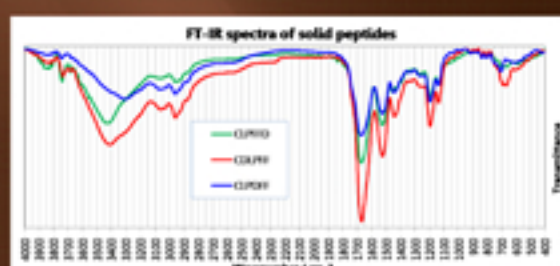
Medición de potencial zeta (ζ)

Se utilizó un equipo Zeta-sizer® 3000, donde 8 mL de las AuNPt conjugadas y sin conjugar fueron inyectadas. El pH fue ajustado con soluciones acuosas de HCl y NaOH.



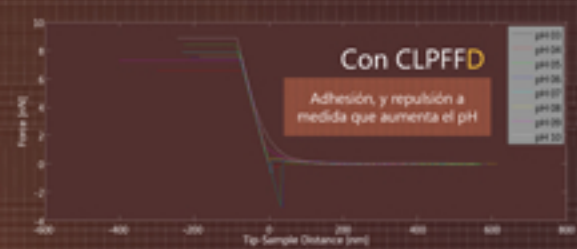
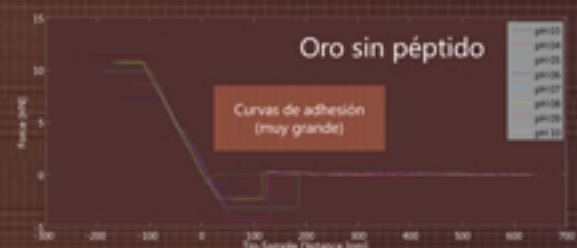
Espectroscopia FT-IR

Se probó la técnica de FT-IR para indagar sobre la estructura de los péptidos conjugados a las nanopartículas. Primero, se tomaron espectros de los péptidos en sólido, y luego de los conjugados. Éstos fueron centrifugados a 13200 rpm por 15 minutos, luego se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en metanol, para luego llevar a sequedad. Luego se agregó el KBr y se fabricaron las pastillas y los espectros fueron realizados en un espectrofotómetro Bruker® IFS-55. Se hizo corrección de línea de base utilizando el software OPUS®. Sin embargo, sólo se observó el espectro característico del agua, con muy débil intensidad.



Microscopía de fuerza atómica (AFM)

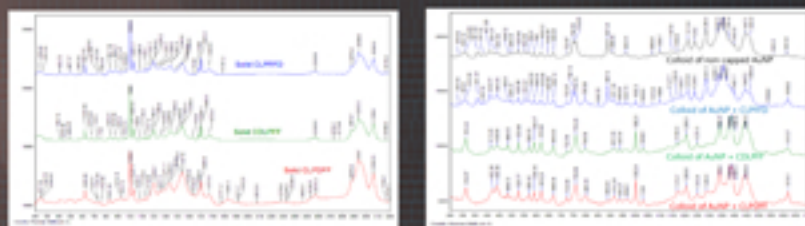
Se utilizó el AFM en modo contacto, para evaluar repulsión electrostática péptido contra péptido. Se recubrió una superficie de vidrio con 2 nm de Cr y 28-30 nm de Au mediante evaporación en campana de vacío. Las superficies de oro fueron funcionalizadas con los péptidos introduciéndolos en soluciones 100 nM de cada péptido. Se tomaron curvas de fuerza en una celda de líquidos, utilizando sondas Novascan® PT-GS-AU recubiertas de oro, con microesfera de 5 μm en su extremo, y conjugadas con el péptido correspondiente. El pH fue ajustado con soluciones acuosas de HCl y NaOH. Se muestran curvas de fuerza que son representativas de cada pH, tomadas sobre las superficies conjugadas.



Espectroscopia Raman/SERS.

También con la finalidad de obtener datos de la estructura del péptido, se tomaron espectros Raman de los péptidos en estado sólido, y luego SERS en los coloides. Se tomó 1 mL de coloide de plata sintetizado según literatura⁴, y sobre él se agregaron 2 gotas de AuNPz. Se utilizó una línea láser de He/Ne de 633 nm, tomando 25 acumulaciones por cada espectro en un microscopio Raman Renishaw® inVia. Se realizó corrección de línea de base multipunto y suavizado utilizando el software GRAMS/AI® v7.00. Las AuNPt no dieron espectros SERS (datos no mostrados).

Bandas más representativas (cm⁻¹):
669: stretching C-S (Cys)
796: bending COO (Asp)
~1002: stretching anillos aromáticos (Phe)
1390: stretching COO (Asp)
~2570: stretching (S-H)



Conclusiones. En la medición de potencial zeta se observa mayor carga en las AuNP sin conjugar respecto de las conjugadas debido al efecto del citrato estabilizador observándose que a pH=5 la carga de los conjugados es menor, lo cual puede atribuirse a que este pH es cercano al punto isoeléctrico del péptido (aprox. 5,6). En las mediciones de AFM se observa carga en la superficie funcionalizada los isómeros CLPDDF y CLPFFD, respecto de CDLPFF hecho que podría deberse a la baja exposición del residuo D en este último. La técnica de FT-IR no fue útil para explorar la estructura del péptido adsorbido. De los análisis de SERS y AFM se desprende que los péptidos probablemente se ubican extendidos horizontalmente sobre la AuNP (figura a la derecha), lo que explicaría el bajo grado de conjugación reportado previamente⁶. La conformación extendida que adoptan los péptidos anclados a la AuNP, hace que se expongan los grupos hidrofóbicos F-F (Phe-Phe) de los mismos, permitiendo así la exposición de los grupos (LF y F) que interaccionan con los agregados tóxicos de $A\beta$.

Los autores agradecen: Al laboratorio de Bioelectroquímica, y al CEPEDQ de la Fac. de Cs. Químicas y Farmacéuticas de la U. de Chile. Al profesor Dr. Pedro Toledo de la U. de Concepción. Al *Materials and Surface Science Group* de la U. de Windsor, Ontario, Canadá, especialmente al profesor Dr. Ricardo Aroca. A los proyectos FONDECYT 1061142 y FONDAP 11980002.

Referencias: 1. Kogan MJ, Bastus N, Amigo R et al. *Nano Lett* 6 (1):110-115, 2006. 2. Lévy R, Thanh RTN, Doty RC et al. *J Am Chem Soc* 126 (32):10076-10084, 2004. 3. Turkevich J, Stevenson PC, Hillier J. *Discuss Faraday Soc* 11:55-75, 1951. 4. Zhang LX, Sun XP, Song YH, Jiang X, Dong SJ, Wang EA. *Langmuir* 22(6): 2838-2843, 2006. 5. Aroca, Ricardo F. SERS, the analytical tool. En *su: Surface-enhanced vibrational spectroscopy*, 1ª ed., John Wiley & Sons Ltd., Inglaterra, 2006, pp. 171-184. 6. Medina Consuegra, Elias Daniel. Obtención de nanopartículas metálicas como posible estrategia terapéutica para la enfermedad de Alzheimer. Memoria para optar al título de Químico-Farmacéutico. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, 2006.

