



Estudio de la interacción entre agregados de beta amiloide y CLPFFD por técnicas de microscopía de efecto fuerza



Aurora Morales-Alvarez^{1,2}, Leonardo Caballero^{2,3}, Ariel Guerrero¹, Francisco Melo^{2,3}, Marcelo J. Kogan^{1,2}.

¹Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Santiago, Chile. E-mail: auroram@uchile.cl ²Centro para la Investigación Interdisciplinaria Avanzada en Ciencias de los Materiales, Av. B. Encalada 2008, Santiago, Chile. ³Departamento de Física, Facultad de Ciencias, Universidad de Santiago de Chile, Santiago, Chile

Introducción

La proteína beta amiloide (A β), involucrada en la enfermedad de Alzheimer, cambia su conformación en condiciones patológicas formando agregados tóxicos(AT), como protofibrillas, amiloesferoides o fibras amiloides (FA), que tienen un efecto neurodegenerativo¹. Para conocer a fondo la estructura de estos agregados y el proceso de agregación, diferentes autores han estudiado y postulado modelos estructurales de la disposición de los monómeros de A β en los AT. Los modelos más actuales sugieren que en las estructuras fibrilares los monómeros de A β ₁₋₄₂ ocultan del agua los residuos hidrofóbicos de la cadena desde el aminoácido 29 al 42. Un modelo sugiere que la disposición entre monómeros es paralela² y otro sugiere que es antiparalela³ (Figura 1).

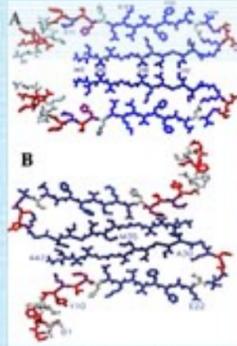


Fig. 1 A y B: Modelo Estructural de una FA de A β ₁₋₄₂ basado en la protección ante solvente obtenido por intercambio N/D por RMN en solución.

En un estudio previo se observó por microscopía de fuerza atómica que en la estructura de FA existen irregularidades periódicas cada ~100 nm⁴. En otro estudio se observó que nanopartículas de oro conjugadas a péptido CLPFFD, que reconoce AT de A β ⁵, interaccionan con FA y se alojan en su estructura manteniendo distancias cercanas a los 100 nm⁶. Esto indicaría que con esa periodicidad se exponen grupos que permiten la interacción de FA con dicho péptido como son los residuos hidrofóbicos L, F y F.

El objetivo del presente trabajo es determinar a través del modo espectroscopía de fuerza de un microscopio de fuerza atómica, si existen zonas de los AT adsorbidos sobre grafito pirolítico altamente orientado (HOPG) que interaccionen preferencialmente con el péptido CLPFFD. Esta aproximación pondría en evidencia la presencia de dominios estructurales en los AT lo que daría luz acerca de la estructura molecular de dichos agregados.

Desarrollo Experimental

Funcionalización de sonda para microscopía de fuerza

Para estudiar la interacción del péptido CLPFFD con los AT de A β se funcionalizó una sonda de oro Veeco TR400PB de radio nominal 15 nm. Se introdujo a una cámara de baja presión (10⁻²mbar) por 30 s que hace pasar una corriente de plasma a alta velocidad que retiró 2nm de la superficie metálica de la sonda(2 nm). La funcionalización con el péptido CLPFFD se realizó por el método de Langmuir-Blodgett empleando una solución del péptido CLPFFD a una concentración de 1x10⁻⁷ M con lo que se formó una mono-capa adsorbida en la superficie del oro⁷.

Preparación de FA pequeñas y adsorción sobre HOPG

Los AT se obtienen a partir de 0.05 mg de A β ₁₋₄₂ liofilizado (*r-Peptide*). Esta cantidad se resuspende en NaOH 1 mM, luego se agrega NaOH 10 mM hasta pH 7. La agregación se inició usando tampón fosfato 20 mM (pH=7.4) hasta una concentración de A β ₁₋₄₂ 100 μ M. El periodo de incubación de A β ₁₋₄₂ para obtener FA es de 20 horas a 23 °C. Los AT obtenidos fueron adsorbidos sobre una superficie de HOPG que tiene gran afinidad por estructuras de A β por su carácter hidrofóbico⁸.

Observación por microscopía de fuerza atómica (AFM)

Las imágenes se obtuvieron en medio acuoso (tampón fosfato 5 mM pH=7.4) en una celda de fluido cerrada herméticamente con un O-ring, en la que se encuentra la punta en contacto con la superficie del HOPG. Se analizaron las FA con periodicidad cada 100 nm usando el modo contacto intermitente en fluidos (*fluid tapping*) de un microscopio de fuerza atómica MultiMode controlado por el programa Nanoscope IIIa 5303SR3 (*Digital Instruments*, Santa Barbara, CA), equipado con un escáner E, J o PF (Figura 2). Otra observación realizada por nuestro equipo de trabajo en las superficies de HOPG con FA adsorbidas a través del modo contacto intermitente en fluido es un completo recubrimiento con AT que forman una capa rugosa diferente a la de HOPG.(Figura 2A)

Espectroscopía de fuerza en volumen para el reconocimiento de dominios en las FA

Para obtener información detallada de los dominios estructurales de los AT de A β ₁₋₄₂, se usó la función de espectroscopía de fuerza en volumen (FV) del AFM en iguales condiciones. (Figura 3)

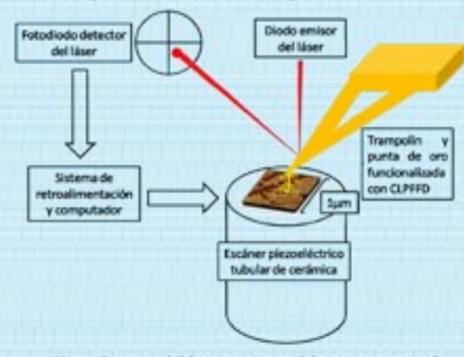


Fig. 3: Esquema del funcionamiento del experimento en el microscopio de fuerza atómica

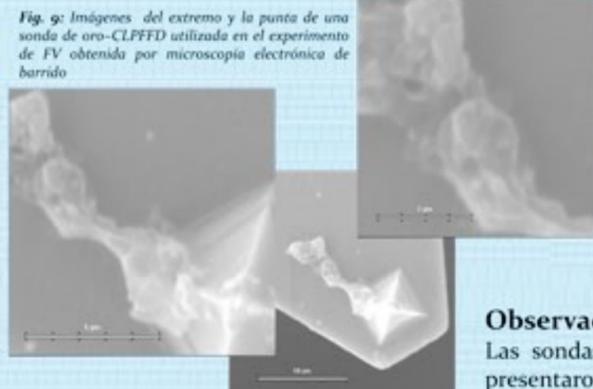


Fig. 9: Imágenes del extremo y la punta de una sonda de oro-CLPFFD utilizada en el experimento de FV obtenida por microscopía electrónica de barrido

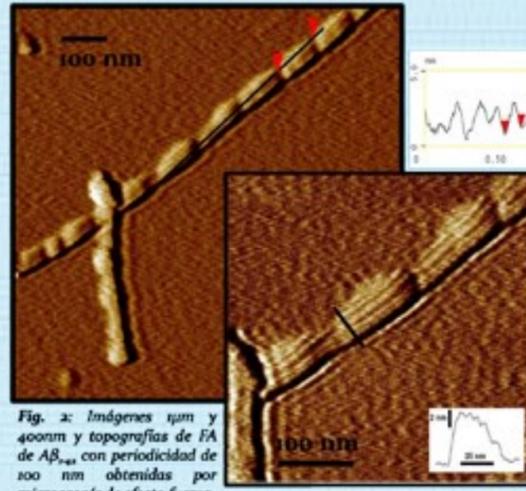


Fig. 2: Imágenes 1µm y 400nm y topografías de FA de A β ₁₋₄₂ con periodicidad de 100 nm obtenidas por microscopía de efecto fuerza.

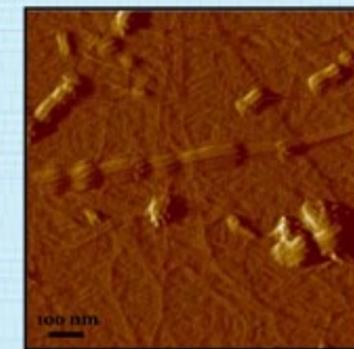


Fig. 2A: Imagen de 1µm (Amplitud 0.100V) PF, en que se observan FA recubriendo la superficie de HOPG

Durante la FV, la punta recogió información de la magnitud de la interacción entre la punta funcionalizada y la superficie de HOPG con FA adsorbidas. Se eligieron zonas de 3 μ m divididas en 64 pixeles. Cada pixel representó un promedio de 64 curvas de fuerza de interacción y evaluó zonas de 47 nm². (Figura 4)

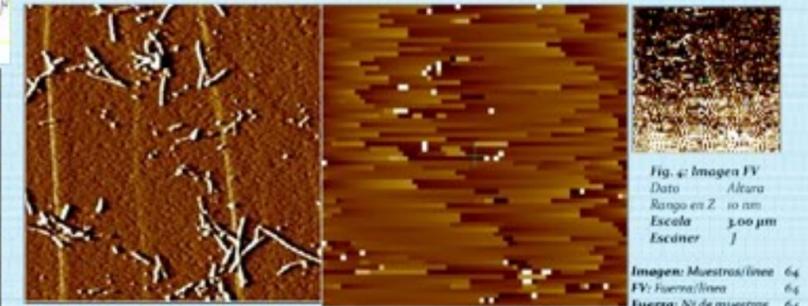


Fig. 4: Imagen FV
Dato: Altura
Rango en Z: 10 nm
Escala: 3.00 µm
Escáner: J
Imagen: Muestras/línea: 64
FV: Fuerza/línea: 64
Fuerza: Nº de muestras: 64

Espectroscopía de fuerza para evaluar la interacción de CLPFFD con FA

Las curvas de interacción entre oro-CLPFFD y las FA adsorbidas a HOPG presentaron fuerzas de adhesión < 8 nN (Figura 5) y mayoritariamente de contacto duro o nN (Figura 6). Esta condición se repitió en las curvas de fuerza entre oro sin funcionalizar y HOPG (Figura 7). Las curvas entre oro-CLPFFD y HOPG presentaron fuerzas de adhesión < 2.5 nN (Figura 8). Las curvas representadas en las figuras 7 y 8 se adquirieron utilizando sondas Novascan PT-GS-AU de oro, con una microesfera en su extremo de 2.5 μ m de radio nominal, y que se conjugaron a CLPFFD con la misma técnica. Los valores de fuerza de adhesión (F_a) se utilizaron para calcular la energía de adhesión (γ_{SL}) entre CLPFFD y FA adsorbidas a HOPG, resultando energías de adhesión no superiores a 56.6 μ J/m² que se indican en la tabla 1.

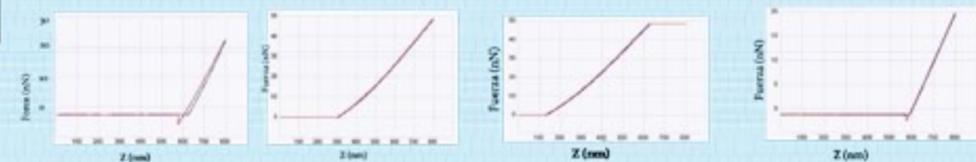


Fig. 5: Fuerza de adhesión entre oro-CLPFFD y FA adsorbidas a HOPG
Fig. 6: Fuerza entre oro-CLPFFD y FA adsorbidas a HOPG
Fig. 7: Fuerza oro contra HOPG
Fig. 8: Fuerza oro-CLPFFD contra HOPG

$$\gamma_{SL} = \frac{F_a}{R3\pi}$$

Curvas de Fuerza	Radio Sonda	F _a	γ_{SL}
Oro-CLPFFD/ HOPG+FA	~15 nm	<8 nN	0-56.6 μ J/m ²
Oro/HOPG	~2.5µm	0	0
Oro-CLPFFD/HOPG	~2.5µm	<2.5nN	<0.085 μ J/m ²

Tabla 1: Radio nominal de las sondas, Fuerza de adhesión y energía de adhesión de curvas de fuerza obtenidas en los experimentos de FV

Observación de las puntas funcionalizadas por microscopía de barrido (SEM)

Las sondas de oro funcionalizadas con CLPFFD utilizadas en FV contra HOPG con FA adsorbidas presentaron agregados moleculares, los que no han sido observados en sondas utilizadas sin funcionalizar, a través de SEM (Figura 9)

Discusión, Conclusiones y Perspectivas

- Las FA son adsorbidas en el grafito por interacciones hidrofóbicas. Las FA que mantienen una periodicidad cada 100 nm presentan una topografía compatible con los modelos actuales de su estructura molecular que indican que estas FA adoptan conformaciones helicoidales para ocultar del agua sus dominios hidrofóbicos, resultando estructuras como las observadas por AFM.
- En los experimentos de FV se encontró que no existe una correlación entre la imagen de altura durante la FV y la imagen de FV que indique algún tipo de patrón de interacción cada 100 nm entre la punta con CLPFFD y las FA adsorbidas al HOPG. Para obtener una información acabada de la periodicidad de FA es necesaria una FV con mayor resolución, lo que no es factible en el tiempo óptimo en que se ejecuta este experimento.
- La fuerza de adhesión entre la sonda con microesfera y la superficie de HOPG es aproximadamente igual a 0, por lo tanto todas las adhesiones observadas corresponden a interacciones entre el CLPFFD y el HOPG o entre el CLPFFD y FA. La interacción hidrofóbica entre el CLPFFD y la superficie del HOPG es <0.085 μ J/m². Ésta, es menor que las interacciones hidrofóbicas típicas que oscilan en 50 μ J/m² (9). Las interacciones entre CLPFFD y FA que recubren el HOPG oscilan entre 0 y 0-56.6 μ J/m². Estas observaciones indican que la interacción hidrofóbica es baja o no está presente, lo que puede ser explicado por los modelos de estructura helicoidal de FA (2,3) y por la gran adsorción de éstas sobre el HOPG a través de interacciones hidrofóbicas. De esta manera, al estar las FA adsorbidas sobre la superficie de HOPG no se exponen los sitios hidrofóbicos, lo que impide la interacción con CLPFFD.
- Es importante destacar que el péptido CLPFFD *in volumen* se une a las FA produciendo incluso hasta la desagregación (5). Los resultados obtenidos en el presente trabajo evidencian que es muy diferente la situación de una FA adsorbida sobre una superficie, respecto de lo que sucede *in volumen*. Tal vez, la situación *in situ* es más parecida a la condición patológica, en la cual los AT se encuentran formando placas amiloides. Estos resultados indicarían que para el diseño de nuevos inhibidores de la agregación o desagregantes de A β más efectivos desde un punto de vista terapéutico, sería de gran importancia considerar sus interacciones *in situ*.
- Una de las direcciones de esta investigación es realizar experimentos para determinar *in situ* e *in volumen* si existe efecto diferencial del péptido LPFFD en diferentes zonas de los AT de A β ₁₋₄₂, a través de microscopía de efecto fuerza en fluido. Actualmente, se están llevando a cabo experimentos con conjugados AuNP-CLPFFD que servirán para la visualización de dichas zonas.

Referencias

- ¹Pike C.J. *J Neuroscience*. 1993;13:1676-87
²Olofsson A. *JBC*. 2006;281(1):477-83
³Arimon M. *FASEB J*. 2005;19(10):1344-6
⁴Soto C. *Nature Medicine*. 1998;4(7):822-6
⁵Duschl C. *Biophysical J*. 1994;67(3):1229-37
⁶Morris VJ. *Londres, ICP*, 1999, 332 p.
⁷Sato T. *Biochemistry*. 2006, 45, 5503-5516
⁸Kogan M.J. *Nano Letters*. 2006;6(1):110-5
⁹Helm C. *Biochemistry*. 1992; 18:31(6):1794-805

Agradecimientos

Proyectos FONDECYT 1061142 y FONDAP 11980002