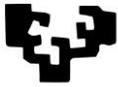


eman ta zabal zazu



Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea



ZTF-FCT

Zientzia eta Teknologia Fakultatea  
Facultad de Ciencia y Tecnología



Trabajo Fin de Grado  
Grado en Biotecnología

# Estudios de formación de fibras amiloides de lisozima por espectroscopia de infrarrojo

Efecto de los flavonoides

Egilea/Autor:  
Ane Orrantia Robles  
Zuzendaria/Director/a:  
Jose Luis Rodriguez Arrondo

© 2015,

# ÍNDICE

## 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1. FIBRAS AMILOIDES	1
1.2 ESPECTROSCOPIA DE INFRAROJO Y FIBRAS AMILOIDES	4
1.3 FLAVONOIDES	6
1.4 OBJETIVOS	7

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS	8
2.2 PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA INFRARROJO	8
2.3 FORMACIÓN DE FIBRAS AMILOIDES	9

## 3. RESULTADOS

3.1 LISOZIMA	10
3.2. QUERCETINA	15
3.3. MORINA	16

## 4. DISCUSIÓN

18

## 5. CONCLUSIONES

21

## REFERENCIAS

22

## 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

### 1. 1. FIBRAS AMILOIDES

Las fibras amiloides son agregados proteicos estables y ordenados formados por proteínas que, aunque en su conformación nativa son solubles, bajo determinadas circunstancias son capaces de ensamblarse para formar fibras que serán insolubles y resistentes a la degradación. La formación de estas fibras está relacionada con aproximadamente unas 50 enfermedades, como la enfermedad de Alzheimer o la Diabetes tipo II.

Una vez sintetizadas en los ribosomas, las proteínas están compuestas por una cadena de moléculas simples llamadas aminoácidos, pero para llegar a su estado funcional deben de plegarse de manera correcta, llegando a su estado nativo. La secuencia de la proteína, esto es, el número y el orden de esos aminoácidos, determina la estructura del estado nativo de la proteína y su proceso de plegamiento. Este proceso de plegamiento llevara a la proteína hasta la conformación de menor energía libre, que sería la conformación más estable que podría adoptar dicha proteína.

En condiciones fisiológicas, la conformación nativa, siendo ésta la conformación funcional de la proteína, ocupa un estado de baja energía, pero no tiene por qué ser la conformación con menor energía libre, ya que especies agregadas podrían llegar a tener menor energía libre que ésta.

Además de su conformación nativa funcional, las proteínas pueden estar en otros estados, incluyendo estados desordenados, parcialmente ordenados e incluso formando diferentes tipos de agregados. Entre las alternativas estructurales que pueden adoptar las cadenas polipeptídicas en su proceso de plegamiento están las fibras amiloides, que serán otra forma más de agregado proteico.

Al igual que la proteína en su conformación nativa, las fibras amiloides también estarán bien empaquetadas y ordenadas, esto es, tendrán un plegamiento incorrecto ordenado. Sin embargo, mientras que el estado nativo lo componen desde  $\alpha$ -hélices hasta hojas  $\beta$ , pasando por muchas otras topologías, las fibras amiloides poseen una estructura rica en hojas  $\beta$  y su formación y estructura no dependerá, en principio, de

la secuencia de aminoácidos de la proteína por la que se forman. Se puede decir, por lo tanto, que las fibras amiloides son agregados insolubles, alargados, filamentosos y con un alto contenido en estructuras beta. Además, todas las fibras tendrán estas características sin depender de la proteína de la cual provengan.

El estado amiloide no tendrá el plegamiento correcto para que la proteína lleve a cabo su función biológica específica. Además, las fibras amiloides son muy insolubles, por lo que a veces se suelen acumular en grandes cantidades dando lugar a fallos de órganos, como en el caso de enfermedades como la Amiloidosis sistémica. Por otro lado, los estados de "malplegamiento" de las proteínas suelen ser tóxicos, ya que, a consecuencia de su desplegamiento, habrá grupos químicos accesibles que interaccionarán inapropiadamente con otros componentes celulares como otras proteínas, ácidos nucleídos o incluso membranas lipídicas, causando el mal funcionamiento de éstos. Los agregados iniciales serán en este caso más tóxicos que las fibras maduras en las que se convertirán, ya que una mayor fracción de componentes estarán expuestos y podrán interaccionar.

Cuando las defensas celulares no son capaces de controlar un estado en el que las proteínas no se pliegan bien o que no se mantienen bien plegadas y por tanto se crean fibras amiloides, resultan en enfermedades amiloidogénicas. Las proteínas a la concentración en la cual se encuentran en las células, tienen la tendencia de pasar de su estado funcional soluble al estado agregado, pero una serie de mecanismos homeostáticos combaten esta tendencia y, si es necesario, degradan los agregados. Estos mecanismos de homeostasis están ayudados, además, de moléculas como chaperonas, proteosomas o lisosomas. Aun así, el comportamiento normal y el aberrante de las proteínas coexisten en un fino equilibrio, por lo cual, cualquier pequeño cambio en las condiciones (pequeñas mutaciones, cambios de dieta o de forma de vida...) puede ser el causante de la transición de uno a otro.

A pesar de todo, la formación de fibras amiloides no está relacionada solo con enfermedades, ya que hay una gran cantidad de proteínas que no están asociadas con enfermedades amiloidogénicas y que, sin embargo, bajo condiciones apropiadas pueden formar fibras con las mismas características que las mencionadas

anteriormente.(Dobson 1999; Dobson 2003; Morozova-Roche et al. 2000) Entre ellas está la lisozima.

La lisozima fue descubierta inesperadamente por Alexander Fleming en 1922, el cual le puso ese nombre (lysozyme) por ser una enzima capaz de lisar las bacterias. La lisozima humana es una proteína que consta de 130 residuos. Su estructura nativa consiste de dos dominios: un dominio alfa que consta de 4  $\alpha$ -hélices y una hélice  $3_{10}$ , y un dominio beta que consiste fundamentalmente de una hoja- $\beta$  antiparalela. Además, tiene 4 puentes disulfuro, uno de los cuales, une estos dos dominios y se encuentra entre los residuos 77 y 95. Como se ha mencionado anteriormente, es una enzima bacteriolítica que hidroliza preferentemente los enlaces  $\beta$ -1,4-glicosídicos entre en ácido *N*-acetilmurámico y *N*-acetilglucosamina que se dan en la pared celular de peptidoglicanos de ciertos microorganismos. (Merlini y Bellotti 2005)

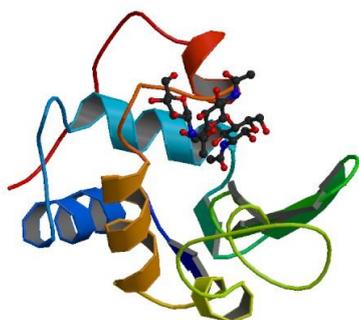


Figura 1. Estructura tridimensional de lisozima de clara de huevo. Código PDB: 1HEW

La proteína nativa de lisozima en condiciones fisiológicas es estable y no forma fibra. Sin embargo, algunas mutaciones que promueven una disminución en la estabilidad de la proteína nativa, dan lugar a la aparición de fibras amiloides. La llamada amiloidosis sistémica no neuropática que se da en humanos, es a causa de un tipo de lisozima mutada, provocada por mutaciones puntuales en el gen que la codifica. Concretamente, esta enfermedad está asociada con dos variantes de lisozima (I56T y D67H) que fueron descubiertas en los años 90 y otras variantes naturales amiloidogénicas (F57I, F57I/T70N, W64R y T70N/W112R) descubiertas recientemente. (He et al. 2014) Hay que añadir que no se han encontrado diferencias destacables en el plegamiento nativo entre las dos primeras variantes descubiertas (I56T y D67H) y la proteína salvaje (wild-type). (Merlini y Bellotti 2005)

Sin embargo, no solo las variantes de lisozima mutadas son capaces de formar fibras, ya que se ha visto que la proteína nativa también puede formarlas cuando se desestabiliza su estructura funcional bajo condiciones duras, como pH extremo, temperaturas altas o agentes desnaturizantes. (Xie et al. 2012; Zou et al. 2013)

La lisozima es una proteína muy bien caracterizada en su estructura, función, dinámica de plegamiento y metabolismo, por ello es un paradigma en el estudio del plegamiento y desplegamiento de las proteínas y ha sido objeto de muchos estudios para aclarar el mecanismo de formación de fibras amiloides. (Xie et al. 2012)

Se ha visto, que la lisozima de clara de huevo también es capaz de formar fibras amiloides *in vitro*. Este enzima, además de ser altamente homóloga a la lisozima humana, es una de las proteínas mejor caracterizadas y de las más estudiadas (Arnaudov y de Vries 2005) y gracias a su bajo coste es una de las más utilizadas en investigación amiloide. (Zou et al. 2013)

## **1.2. ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO Y FIBRAS AMILOIDES**

Las fibras han sido caracterizadas usando múltiples técnicas biofísicas como la microscopía electrónica (EM) (Sunde y Blake 1997), microscopía de fuerza atómica (AFM) (Stine et al. 1996), resonancia paramagnética electrónica (EPR)(Török et al. 2002) y técnicas de más alta resolución en estado sólido como la resonancia magnética nuclear (ssNMR)(Balbach et al. 2000) y la difracción de rayos-X(Sunde y Blake 1997). Estas técnicas han revelado información importante en relación con la estructura tridimensional de las fibras. Sin embargo, las limitaciones principales de estas técnicas de alta resolución, son la cantidad importante de material proteico que se necesita para el análisis, el tiempo necesario para llevarlo a cabo y la necesidad de tratar con agregados insolubles.

La espectroscopia de infrarrojo ofrece una oportunidad única para hacer frente a esos problemas y permite caracterizar los agregados formados durante el proceso de agregación. El tiempo necesario para el análisis es pequeño, evitando así los posibles cambios estructurales que se dan por el paso del tiempo, y poca cantidad de proteína es suficientes para evaluar la estructura secundaria de los agregados. Además, la

contribución de las hojas- $\beta$  tiene el mayor coeficiente de absorción, por lo que la espectroscopia de infrarrojo es muy adecuada para el análisis de proteínas ricas en estas estructuras, como lo son las fibras amiloides. (Sarroukh et al. 2013) Por otra parte, esta técnica puede medir agregados independientemente de la turbidez que estos causan, al contrario de otras técnicas, por lo que puede ser apropiada para el estudio de proteínas grandes en suspensiones turbias, como ocurre en muchos casos con proteínas de membrana o agregados.

La espectroscopia de infrarrojo se basa en los cambios en la energía vibracional de los enlaces al absorber la radiación infrarroja. Todas las biomoléculas poseen niveles energéticos de vibración en el intervalo del infrarrojo medio ( $3000-600\text{ cm}^{-1}$ ). Tanto la frecuencia de la vibración como la probabilidad de que se produzca la absorción energética depende de la fuerza y de la polaridad de los enlaces. En el caso de las proteínas, el espectro consiste en numerosas bandas de absorción, relativamente intensas, generadas por la absorción del enlace peptídico, que estará integrado en el grupo amida, el grupo funcional más característico de las proteínas. El espectro infrarrojo de las proteínas, por tanto, está formado por las llamadas "bandas amida", las cuales se crean por diferentes tipos de vibración del grupo amida. La más útil de todas las bandas para el estudio de conformación de proteínas será la Amida I, ya que presenta mayor intensidad, es más sensible a la conformación y tiene una menor contribución de cadenas laterales. Esta banda estará compuesta, además, por diferentes bandas originadas por elementos de la estructura secundaria de la proteína, como son las  $\alpha$ -hélices, las hojas  $\beta$ , giros  $\beta$  y estructuras desordenadas. Cada una de estas estructuras tienen una frecuencia asociada en la banda Amida I. Por lo tanto, podríamos decir que la espectroscopia de infrarrojo nos informa principalmente de la estructura secundaria de las proteínas y sus cambios.

En el caso concreto de las fibras amiloides, la espectroscopia de infrarrojo nos permite seguir la aparición de estos agregados, esto es, podemos ver durante el transcurso de la formación del amiloide como va cambiando la estructura partiendo del estado nativo de la proteína, logrando así evitar las fotografías estáticas que se logran con otras técnicas como la cristalografía de rayos X.

Al estudiar los agregados con esta técnica, se observa en una gran parte de los casos una transición de estructura  $\alpha$  a una estructura  $\beta$ . Además, otra característica común que se observa, es la aparición de una banda de baja frecuencia alrededor de  $1620\text{ cm}^{-1}$ , que está normalmente acompañada de una banda menos intensa alrededor de  $1685\text{ cm}^{-1}$ . La aparición de estas bandas es debido a la formación de hojas  $\beta$  intermoleculares en los agregados de proteínas. (Nielsen et al. 2001)

### 1.3. FLAVONOIDES

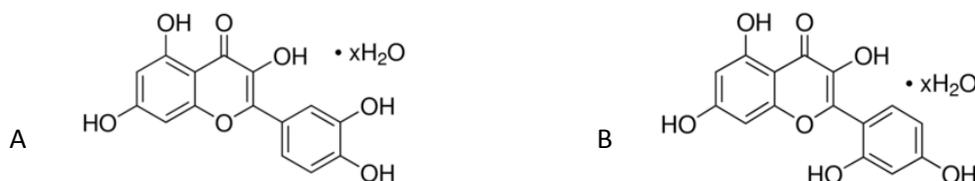
Hoy en día, se podría decir que en el tratamiento de enfermedades amiloidogénicas existen dos estrategias terapéuticas principales que se basan en la inhibición de la formación de fibras amiloides y la interrupción de los agregados amiloides que ya se han formado. Se ha demostrado que algunos compuestos polifenólicos naturales interrumpen las estructuras amiloides y atenúan la citotoxicidad de las fibras amiloides. (Wang et al. 2011)

Los compuestos fenólicos son sustancias naturales que están compuestos por uno o más anillos fenólicos aromáticos y que están presentes en el vino, el té, en frutos y vegetales, así como en una gran variedad de plantas. Muchos de estos compuestos son conocidos por sus muchas propiedades para la salud, gracias a su efecto antioxidante y a prevenir varias enfermedades. Además, otra de las características principales de los compuestos fenólicos es su habilidad para interacción con péptidos y proteínas. (Jagota y Rajadas 2012)

Los flavonoides son un grupo de compuestos fenólicos de origen vegetal. El interés que se ha creado en los últimos años por estos compuestos es debido a sus actividades antioxidantes, antitumorales y antimicrobianas, además del efecto que tienen en la formación de fibras. Se ha visto que inhiben la fibrilogénesis de proteínas amiloidogénicas, *in vitro*, en cultivos celulares, así como, *in vivo*. (Chandrashekar et al. 2010) Entre todos los flavonoides que presentan estas características podemos encontrar la quercetina y la morina.

La quercetina (3,3',4',5,7-penta-hidroxi-flavona) es uno de los polifenoles naturales más importantes de la familia de los flavonoides, que se encuentra en muchas hierbas

medicinales y alimentos. Debido a su capacidad antioxidante y quelante de iones metálicos, posee varios efectos biológicos incluyendo actividades antiinflamatorias, antineoplásicas y cardioprotectoras. Investigaciones recientes han demostrado que, además, exhibe un efecto inhibitorio en la formación amiloide del péptido  $\beta$ -amiloide y de  $\alpha$ -sinucleína, (Wang et al. 2011) relacionados con la enfermedad de Alzheimer y de Parkinson, respectivamente.



**Figura 2. Estructura química de los dos flavonoides** .A (izquierda) Quercetina y B (derecha) Morina.

La morina o hidrato de morina (2', 3, 4', 5, 7-penta-hidroxiflavona) es otro de los compuestos polifenólicos naturales que pertenece a la familia de los flavonoides. Posee una gran variedad de propiedades biológicas, además de tener efectos antiinflamatorios, antifibróticos, antitumorales y neuroprotectores. (MadanKumar et al. 2015) Varios estudios han demostrado que por otro lado, la morina inhibe la agregación del péptido  $\beta$ -amiloide y desestabiliza las fibras preformadas. (Lemkul y Bevan 2010) El mismo efecto se ha visto también en la amilina (Islet Amyloid Polypeptide), que está relacionada con la Diabetes de tipo II. (Noor et al. 2012)

En el presente trabajo estudiaremos la formación de fibras amiloides de lisozima de clara de huevo en condiciones desestabilizantes de pH y altas temperaturas, y cómo se ve influenciado dicho proceso por la presencia de flavonoides como quercetina y morina a diferentes relaciones molares.

#### 1.4. OBJETIVOS

- Caracterización de la formación de fibras amiloides de lisozima a pH básico mediante espectroscopia de infrarrojo.
- Análisis del efecto de los flavonoides, quercetina y morina, a diferentes concentraciones en dicho proceso amiloidogénico.

## **2. MATERIALES Y METODOS**

### **2.1. OBTENCIÓN DE MUESTRAS**

Para realizar los experimentos se utilizó lisozima de clara de huevo. Ésta y el resto de reactivos, salvo que se especifique lo contrario, fueron obtenidos de Sigma-Aldrich Co. (San Luis, EEUU).

### **2.2. PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA INFRARROJO**

Para lograr el stock de lisozima, la proteína en forma de polvo liofilizado fue resuspendida en agua deuterada ( $^2\text{H}_2\text{O}$ ) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), hasta conseguir una concentración final de proteína de 14mM. Esta proteína, fue después diluida en fosfato dipotásico,  $\text{K}_2^2\text{HPO}_4$ , con una concentración de 50mM y un p<sup>2</sup>H de 12.3, hasta lograr una concentración final de proteína de 2mM. Esta fue la concentración de lisozima con la que se llevaron a cabo todas las medidas.

Para la preparación de las muestras con flavonoides, el primer paso fue preparar el stock de ambos flavonoides, quercetina y morina, el cual tenía una concentración final de 200mM. Una vez obtenido el stock se pasó a hacer las diferentes diluciones de lisozima con los flavonoides, en este caso fueron tres, con relaciones molares de 1:1, 1:5 y 1:10, tanto para quercetina como para morina. En estas diluciones, junto con la proteína, los flavonoides y el buffer, se añadió  $\text{NaO}^2\text{H}$  en la medida de lo necesario para ajustar el p<sup>2</sup>H de la muestra en 12, ya que al añadir los flavonoides se aprecia una bajada de éste. Dichas diluciones fueron las que utilizamos para las diferentes medidas de Infrarrojo.

Una vez obtenidas las muestras se colocaron en ventanas excavadas Biocell (BioTools, Wuaconda, EE.UU.) de  $\text{CaF}_2$  que tenían pocillos de 25 $\mu\text{m}$  de profundidad y un volumen de muestra de 25 $\mu\text{l}$ .

### **2.3. FORMACIÓN DE FIBRAS AMILOIDES**

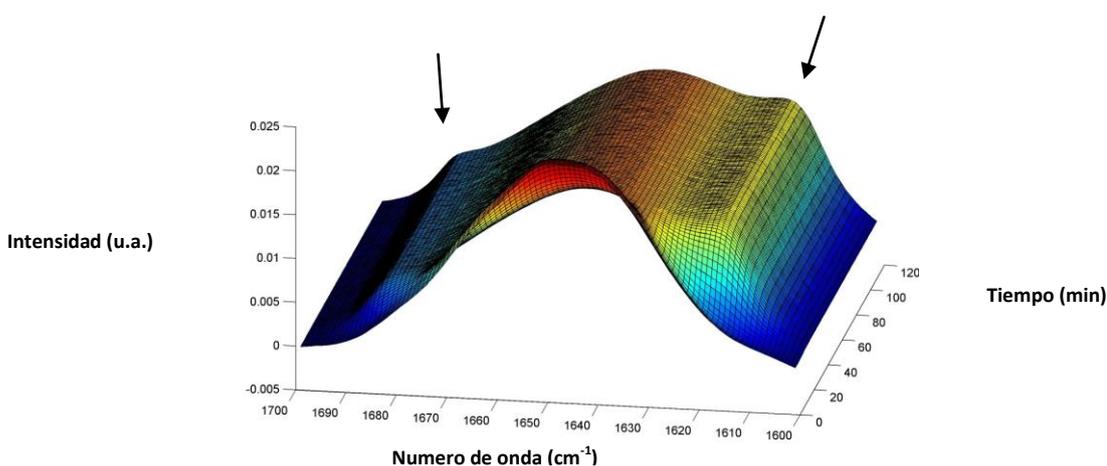
Para la obtención de fibras amiloides, las muestras, colocadas en las ventanas, fueron calentadas en una celda Peltier Tempcon (BioTools, Wuaconda, EEUU). La rampa de temperatura que se utilizó, partía de 25°C, subiendo a 50°C en 5 minutos y manteniendo dicha temperatura durante 2 horas para que se formaran los agregados proteicos. Todo el proceso fue monitorizado con el espectrofotómetro de infrarrojo Nicolet Nexus 5700 (Thermo, Madison, EEUU) tomando un espectro cada minuto .

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. LISOZIMA

A medida que la muestra de lisozima de clara de huevo se calienta, sufre unos cambios estructurales hasta llegar a la formación de fibras y estos cambios pueden ser seguidos gracias a la espectroscopia de infrarrojo.

En primer lugar, si observamos la representación tridimensional de los espectros a lo largo del tiempo de incubación, se puede observar como van apareciendo dos nuevas bandas.



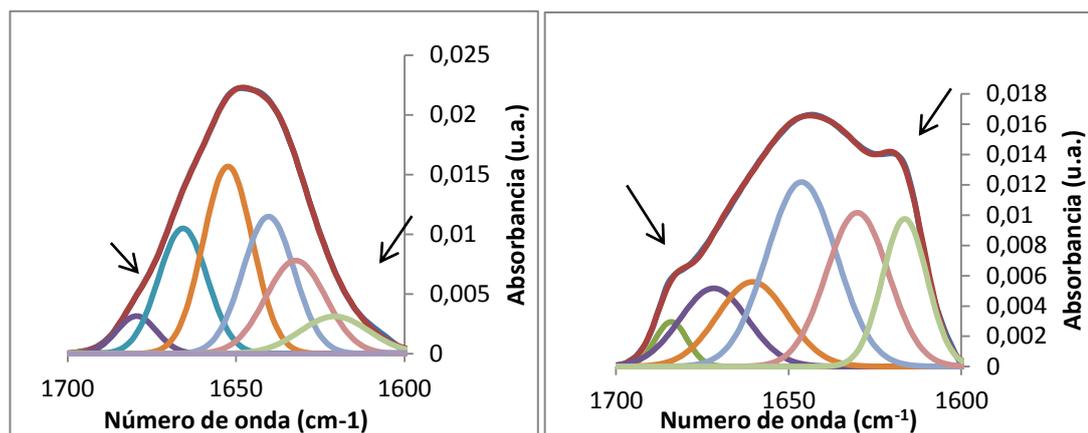
**Figura 3: Representación tridimensional de los espectros de lisozima a medida que transcurre el tiempo de incubación.** Se aprecia el aumento de intensidad de las bandas de entorno a  $1618\text{ cm}^{-1}$  y  $1684\text{ cm}^{-1}$  (señaladas con flechas).

Estas dos bandas mencionadas son características de las proteínas agregadas y se sitúan en torno a  $1618\text{ cm}^{-1}$ , la conocida como banda de baja frecuencia, y en torno a  $1684\text{ cm}^{-1}$ , conocida como banda de alta frecuencia. Observando la Figura 3, se ve claramente como ambas bandas (señaladas con flechas) van creciendo al mismo tiempo conforme avanza el proceso de agregación.

La estructura nativa de la lisozima de clara de huevo, como hemos mencionado previamente, está constituida predominantemente por motivos  $\alpha$ . El componente

mayoritario por tanto serán las hélices  $\alpha$ , las cuales vibran en espectroscopia de infrarrojo en torno a  $1652\text{ cm}^{-1}$ .

Para ver el cambio de estructuras que sufre la proteína durante la incubación, y para observar la aparición de esas dos bandas características de la agregación es interesante analizar el ajuste de bandas (Figura 4).



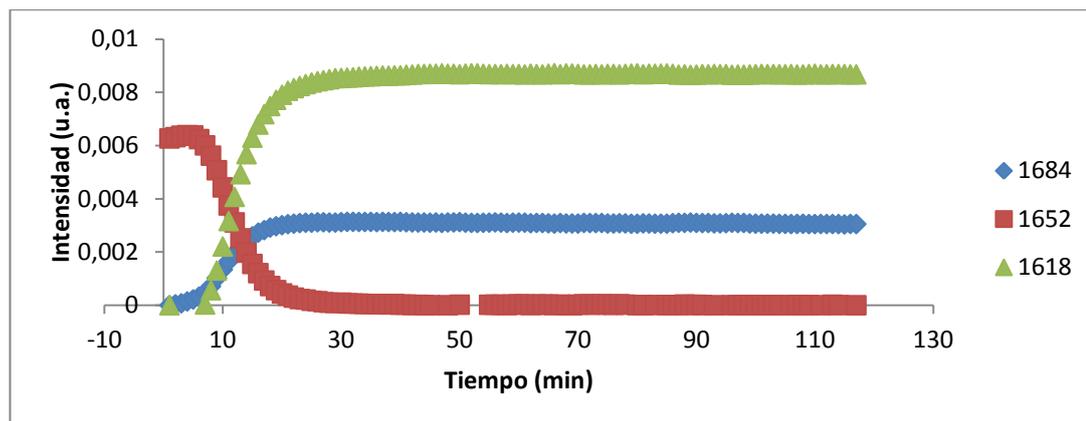
**Figura 4: Descomposición de la banda Amida I en sus diferentes componentes.** Ajuste de la izquierda: espectro nativo a tiempo 0 minutos de incubación de lisozima de clara de huevo, donde se observa que el componente mayoritario de estructura se puede atribuir a hélices  $\alpha$  ( $1652\text{ cm}^{-1}$ ). Ajuste de la derecha: espectro de lisozima después de 2 horas de incubación, donde se observa que las dos bandas asociadas a las fibras (flechas) han aumentado su contribución.

Como hemos dicho, a tiempo 0 de incubación, la estructura nativa de la proteína está compuesta principalmente por hélices  $\alpha$  y, por lo tanto, en el ajuste de bandas del inicio, la mayor contribución la tiene la banda de alrededor de  $1652\text{ cm}^{-1}$ , que corresponde a esa estructura secundaria. A medida que el tiempo de incubación pasa y por tanto la muestra es calentada, van apareciendo una serie de bandas relacionadas con la estructura fibrilar. Como se puede observar en el ajuste final, después de 2 horas de incubación, tanto la banda de  $1618\text{ cm}^{-1}$  como la de  $1684\text{ cm}^{-1}$  (señaladas con las flechas), aumentan su contribución.

Al mismo tiempo, el componente helicoidal irá perdiendo importancia poco a poco, aunque todavía después de los 2 horas de incubación mantiene una contribución importante en la estructura de la fibra.

La siguiente gráfica (Figura 5), muestra cómo va cambiando la intensidad de esas tres bandas que hemos nombrado, con el tiempo. Por lo tanto aquí también se puede

observar lo mencionado hasta el momento: la banda asignada a la hélice  $\alpha$  ( $1652\text{cm}^{-1}$ ) va perdiendo intensidad con el tiempo, a la vez que la banda de  $1618\text{cm}^{-1}$  va aumentando su intensidad. Por otra parte, el componente de baja frecuencia (banda de  $1684\text{cm}^{-1}$ ), también aumenta su intensidad con el tiempo, pero en menor medida que el componente de alta frecuencia (banda de  $1684\text{cm}^{-1}$ ).

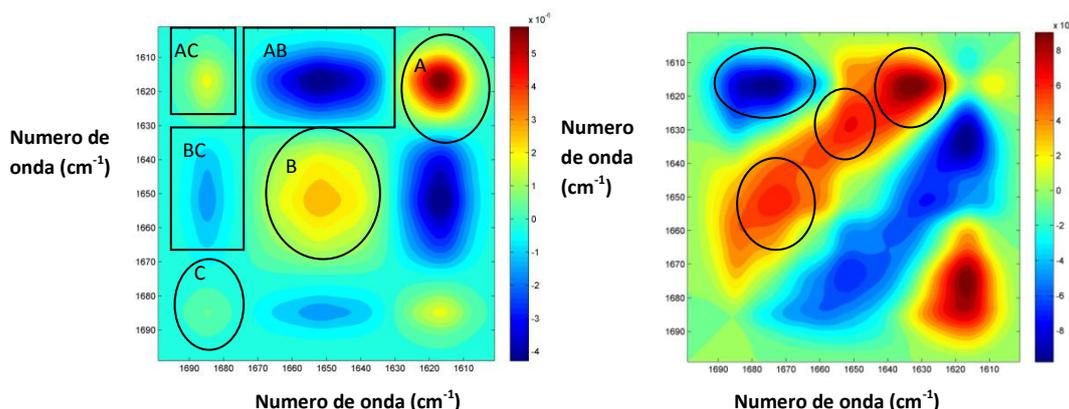


**Figura 5: Cambio de la intensidad de las diferentes bandas de lisozima de clara de huevo durante el tiempo de incubación.** La intensidad de la banda de  $1618\text{cm}^{-1}$  aumenta al igual que la de la banda de  $1684\text{cm}^{-1}$ , aunque esta última en menor medida. La intensidad de la banda de  $1652\text{cm}^{-1}$ , en cambio disminuye al mismo tiempo que las otras aumentan.

Cabe destacar que los cambios de intensidad en las tres bandas se dan en los primeros 30 minutos de incubación y que a partir de ese momento no se producen cambios notables en ninguna de las tres bandas analizadas.

Otra forma de seguir el proceso de formación de fibras amiloides es gracias a la espectroscopia de infrarrojo bidimensional de correlación (2DCOS). Para llevar a cabo este estudio, necesitamos de la existencia de una perturbación en el sistema, y en este caso hemos utilizado el tiempo de incubación a altas temperaturas como perturbación. A medida que va avanzando este tiempo de incubación el sistema va evolucionando, y el infrarrojo bidimensional nos puede informar de los sucesos más relevantes que están produciéndose, así como de la secuencia de eventos.

Los mapas bidimensionales (Figura 6) que obtenemos en el análisis son dos, uno síncrono, con los eventos en fase que evolucionan simultáneamente, y otro asíncrono, desfasado, que nos da una idea del orden de los cambios.



**Figura 6:** Mapa síncrono (izquierda) y asíncrono (derecha) de todo el proceso de incubación de lisozima. En el mapa síncrono, se han identificado con círculos los autopicos, situados en la diagonal, mientras que para identificar los picos cruzados, se han utilizado rectángulos. En el mapa asíncrono, en cambio, se han identificado con círculos los picos cruzados.

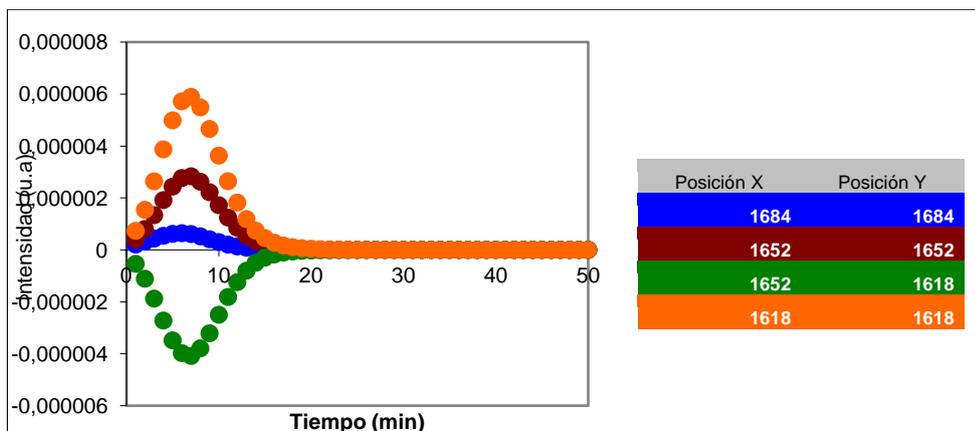
En el mapa síncrono del proceso de incubación de 2 horas, podemos observar la existencia de tres autopicos en la diagonal, identificados como A, B y C. El autopico A correspondería a la banda de agregación de baja frecuencia ( $1618\text{cm}^{-1}$ ), el autopico B a la hélice  $\alpha$  ( $1652\text{cm}^{-1}$ ) y el autopico C, a la banda de alta frecuencia ( $1684\text{cm}^{-1}$ ). La intensidad de estos autopicos está relacionada con la intensidad de cambio que ha sufrido cada banda. Como se puede ver en el mapa, el autopico con mayor intensidad es el A, por lo que la banda que mas cambio sufrirá durante ese proceso de incubación será la banda de baja frecuencia. Aun así, el autopico B también tiene una alta intensidad, por lo que la estructura hélice  $\alpha$  de la proteína también ira variando a lo largo de la incubación. La intensidad del último autopico, C, es bastante inferior a los otros dos, por lo que se puede decir que la banda de alta frecuencia sufre una variación menor que las otras dos. Hay que decir que ya que este autopico aparece en el mapa bidimensional, aunque sea en menor medida esa variación será significativa en el proceso general.

Asociados a estos autopicos, siempre aparecen fuera de la diagonal picos cruzados que los correlacionan. Estos picos cruzados se sitúan a ambos lados de la diagonal, pero debido al carácter simétrico que presentan estos mapas, basta con tener en cuenta uno de los lados de la diagonal para el análisis. En este caso nos centramos en lado superior.

En este mapa aparecen tres picos cruzados: AB, BC y AC. Los dos primeros correlacionan la estructura  $\alpha$  de la proteína (B) con la banda de baja y alta frecuencia, respectivamente, mientras que el último de los picos cruzados (AC) correlaciona las dos bandas características del proceso de agregación de proteínas. Los picos AB y BC son negativos y esto nos indica que las bandas que se correlacionan en estos picos tienen un comportamiento inverso a lo largo de la perturbación. En este caso, mientras que las bandas asociadas a los autopicos A ( $1618\text{cm}^{-1}$ ) y C ( $1684\text{cm}^{-1}$ ) aumentan su intensidad durante el proceso, como observábamos anteriormente en los espectros de infrarrojo clásico, la banda que se encontraba en torno a  $1652\text{cm}^{-1}$ , asociada al autopico B, disminuye su intensidad. El otro pico cruzado (AC), en cambio, es positivo por lo que las bandas correlacionadas aumentarán o disminuirán su intensidad durante el proceso. En este caso, como hemos visto anteriormente estas dos bandas relacionadas con la fibra van aumentando su intensidad conforme aparece la estructura amiloide.

Para estudiar cómo varían los picos del mapa bidimensional sincrónico a lo largo de la perturbación, se han calculado las intensidades de dichos mapas en intervalos de 10 minutos y se han representado en la Figura 7, en la que se observa claramente que los autopicos aumentan su intensidad en la primera fase de la perturbación, para dejar de hacerlo posteriormente, lo que nos indica que es en esos primeros minutos cuando se produce la reorganización estructural de la proteína, observándose la mayor tasa de cambio en el intervalo de 7-16 minutos. La relación de cambio entre la estructura nativa y la fibra, puede seguirse observando el pico cruzado AB, que sigue un patrón similar al de los autopicos, pero con intensidad negativa.

En el mapa asíncrono, por su parte, no aparecen autopicos, ya que una banda no puede variar consigo misma a diferentes tiempos, por lo que solo encontramos picos cruzados. Para el análisis de este mapa tendremos en cuenta solamente la diagonal superior, ya que el mapa presenta una simetría invertida que hace que ambos lados de la diagonal se interpreten de forma similar. En el mapa se observan cuatro picos más intensos debido a correlaciones a diferentes tiempos entre las bandas correspondientes a las estructuras desordenadas/hélices  $3_{10}$ ,  $\beta$  nativa de la proteína, las dos bandas de la fibra y la banda correspondiente a la estructura  $\alpha$ .

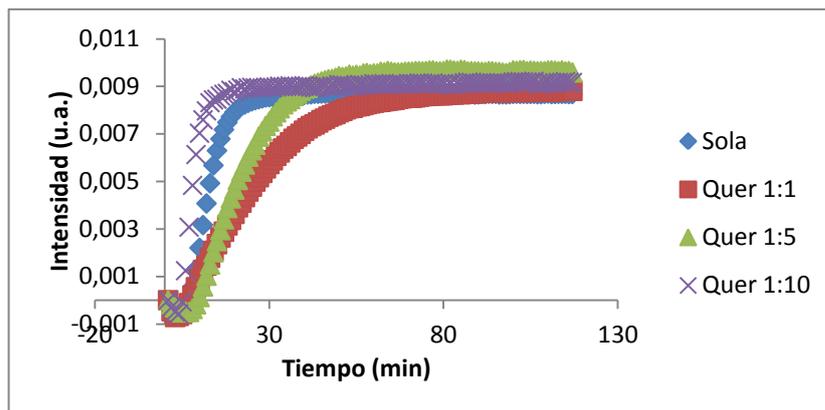


**Figura 7. Cambio de intensidad de los picos del mapa bidimensional sincrónico en ventanas de tiempo de 10 minutos.** Cada uno de los valores mostrados corresponde a la intensidad del pico calculado para intervalos de 10 minutos. (1-10 minutos, 2-11 minutos, 3-12 minutos...) El eje X (tiempo) indica el minuto de inicio del intervalo.

### 3.2. QUERCETINA

Para analizar el efecto de la quercetina en la formación de fibras amiloides, como se ha explicado previamente, se añadió a la muestra de lisozima este flavonoide a tres relaciones molares (1:1, 1:5 y 1:10), estudiando así el efecto de la concentración sobre la inhibición de la formación de la fibra. Los cambios estructurales que se dan durante la incubación pueden seguirse gracias a la espectroscopia de infrarrojo igual que se ha mostrado anteriormente con la muestra sin flavonoides.

En este caso, para analizar los cambios estructurales que ocurren nos centramos en la banda de  $1618\text{cm}^{-1}$ , esto es la banda de baja frecuencia, ya que es característica de la formación de agregados y como hemos visto en el apartado anterior, es la que mayor cambio sufre durante el proceso.



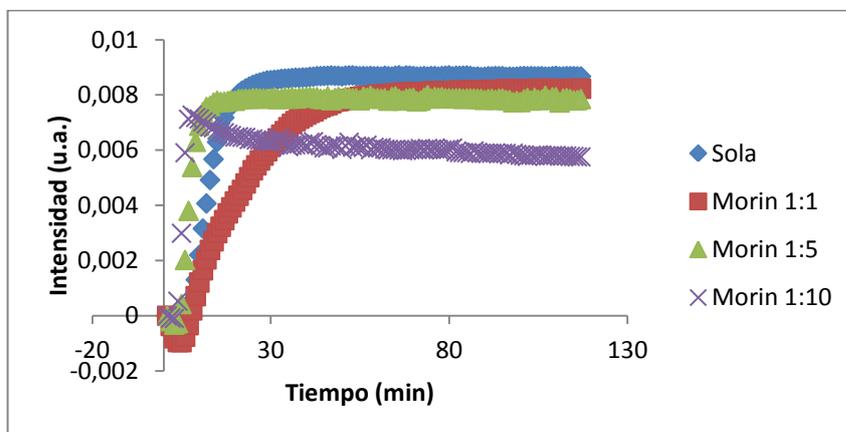
**Figura 8.** Perfil de intensidad de la banda  $1618\text{cm}^{-1}$  de lisozima de clara de huevo a diferentes relaciones molares de quercetina. Se puede apreciar el efecto retardador de la quercetina en relaciones molares 1:1 y 1:5. Por otra parte se puede ver, también, que a concentraciones superiores (1:10), ese efecto se pierde.

En la gráfica superior (Figura 8), se comparan los resultados de intensidad obtenidos con las tres relaciones molares utilizadas en el experimento. Como se puede apreciar, la concentración utilizada tiene un efecto notable en el perfil de intensidad de la banda  $1618\text{cm}^{-1}$ , y por tanto, en la formación de la fibra amiloide. Para ver más claramente los resultados obtenidos en la gráfica, se ha calculado el tiempo de formación del 50% de la fibra (Tabla 1). En el caso de la lisozima sola, esto es, sin añadir el flavonoide, el tiempo es de 12 minutos. Añadiendo el flavonoide en relaciones molares de 1:1, ese tiempo de formación aumenta y alcanza los 22 minutos, viéndose así el efecto retardador de este flavonoide en la formación de la fibra. Al añadir una concentración superior, esto es una relación molar de 1:5, el tiempo de formación disminuye un poco, 20 minutos, aunque sigue siendo superior al de la lisozima sin flavonoide, y por tanto sigue existiendo ese efecto retardador. En cambio, en concentraciones superiores de quercetina, esto es, 1:10, se invierte este efecto, ya que el 50% de la fibra se formara a los 8 minutos, tiempo inferior al que se necesita en el caso de la lisozima sola.

### 3.3. MORINA

En este caso, se analiza el efecto del hidrato de morina en la formación de fibras amiloides, de la misma manera que en el caso de la quercetina y de la lisozima sola. Se hace uso también, de la espectroscopia de infrarrojo para analizar los cambios

estructurales de la proteína, y se estudia de la misma manera que en el apartado anterior, la banda  $1618\text{cm}^{-1}$  de la lisozima de clara de huevo.



**Figura 9.** Perfil de intensidad en la banda  $1618\text{cm}^{-1}$  de lisozima de clara de huevo, a diferentes relaciones molares de morina. Se puede apreciar el efecto retardador de la morina en la relaciones molar 1:1. Por otra parte se puede ver también, que a concentraciones superiores (1:5 y 1:10), ese efecto retardador se pierde.

Como en el caso de la quercetina, en la grafica superior (Figura 9) se comparan los perfiles de intensidad obtenidos con las tres relaciones molares utilizadas en el experimento. En este caso también, la concentración de flavonoide tiene su efecto, en la formación de la fibra amiloide. De la misma manera que para quercetina se ha calculado el tiempo de formación del 50% de la fibra (Tabla 1). Como veíamos anteriormente, en el caso de la lisozima sola, esto es, sin añadir el flavonoide, el tiempo es de 12 minutos. Añadiendo el flavonoide en relaciones molares de 1:1, ese tiempo de formación aumenta y alcanza los 18 minutos, viéndose así el efecto retardador de este flavonoide en la formación de la fibra. En relación molar 1:5, el tiempo de formación disminuye considerablemente, siendo de 7 minutos, por lo que ya en esta concentración se pierde el efecto retardador de la morina. Por último, al calcular el tiempo de formación del 50% de fibra a concentraciones superiores (1:10), se ve como ese tiempo disminuye aun mas, llegando a ser de 5 minutos.

## 4. DISCUSIÓN

Gracias a ser una proteína muy bien caracterizada, la lisozima se usa como modelo para el estudio del plegamiento y desplegamiento de proteínas y formación de fibras amiloides. Se han llevado a cabo muchos estudios en los que tras incubar la proteína en pH ácidos y a temperaturas altas se formaba esa fibra. (Morozova-Roche et al. 2000; Zou et al. 2013) Por el contrario, y aunque se sabe que la lisozima es capaz de agregarse en pH básicos, (Homchaudhuri et al. 2006) los estudios en estas condiciones no son tan abundantes, y en esto reside el interés principal de este trabajo.

Como se ha podido comprobar, tras el periodo de incubación, aparecen dos bandas características de las proteínas agregadas, situadas en torno a  $1618\text{cm}^{-1}$ , que será el componente de baja frecuencia, y la otra en torno a  $1684\text{cm}^{-1}$ , que será el componente de alta frecuencia, por lo que se da esa formación de fibras que se mencionaba. Estas fibras poseen una estructura rica en hojas  $\beta$ , pero existen dos tipos configuración, paralela y antiparalela. Esta información será importante a la hora de saber con detalle la estructura atómica y molecular de las fibras amiloides que se forman. Gracias a la espectroscopia de infrarrojo, somos capaces de diferenciar esas dos configuraciones en agregados de proteína. Mientras que las hojas  $\beta$  paralelas no tendrán el componente de alta frecuencia, en el caso de las hojas  $\beta$  antiparalelas aparece tanto el componente de baja frecuencia ( $1618\text{cm}^{-1}$ ), como el de alta frecuencia ( $1684\text{cm}^{-1}$ ). (Sarroukh et al. 2013; Zou et al. 2013) Por lo tanto, en el caso de la lisozima, al estar presente los dos componentes, la fibra que está apareciendo está formada por hebras  $\beta$  antiparalelas.

El estudio llevado a cabo con espectroscopia de infrarrojo bidimensional de correlación, nos deja ver como ya hemos dicho, que la banda que sufre una mayor intensidad de cambio es la banda de  $1618\text{cm}^{-1}$ , mientras que la banda de  $1684\text{cm}^{-1}$  sufre un cambio muchísimo menor. También se ha podido observar como la banda de  $1652\text{cm}^{-1}$  correspondiente a la hélice  $\alpha$ , sufre un cambio notable, pero su comportamiento es inverso al de las otras dos bandas. Por lo tanto, mientras que las dos bandas asociadas con la fibra van aumentando su intensidad conforme aparece la

estructura amiloide, la banda asociada a la estructura nativa de la proteína disminuye, pero no llega a desaparecer completamente, ya que, debido a que los puentes disulfuro se mantienen en la estructura final de la fibra, ésta mantiene parte de la estructura nativa de la proteína.

El tratamiento de enfermedades amiloidogénicas, se centra en la inhibición de la formación de esas fibras amiloides y la interrupción de los agregados amiloides ya formados. El caso del uso de flavonoides, como son la quercetina o la morina, es interesante ya que se ha visto que pueden llegar a inhibir la fibrilogénesis de proteínas amiloidogénicas. (Chandrashekar et al. 2010)

Analizando los resultados obtenidos, se puede ver que tanto la quercetina como la morina tienen un efecto retardador a ciertas concentraciones en la formación de la fibra de lisozima de clara de huevo.

**Tabla 1. Comparación del tiempo de formación del 50% de la fibra en presencia de los dos flavonoides a diferentes concentraciones.** Se puede observar el efecto retardador en la formación de fibras de la quercetina a concentraciones de 1:1 y 1:5, y el mismo efecto de la morina a concentraciones de 1:1.

Concentración flavonoide	Tiempo de formación del 50% de la fibra (min)	
	Quercetina	Morina
Lisozima sola	12	12
1:1	22	18
1:5	20	7
1:10	8	5

Como se puede observar en la tabla superior (Tabla 1), aunque el efecto retardador se da con los dos flavonoides, este efecto no es igual. Mientras que la quercetina aumenta el tiempo necesario para la formación del 50% de fibra tanto en relaciones molares de 1:1 y 1:5, la morina solo lo hace a concentraciones de 1:1 y en menor medida.

Si se observa la estructura molecular de los dos flavonoides, (Figura 2) se puede apreciar que la única diferencia que existe entre ellos es el grupo hidroxilo situado en

la posición 3' en la quercetina y en 2' en la morina. Por lo tanto, se podría deducir que este grupo sería el responsable de la diferencia que existe entre ambos flavonoides en el efecto retardador sobre la formación de fibra.

A bajas concentraciones, el efecto de los flavonoides podría ser el de interactuar con las zonas hidrofóbicas de la proteína que van quedando expuestas al solvente durante el proceso de desplegamiento, estabilizando así la estructura y retardando la formación de los agregados. Sin embargo, según se va aumentando su concentración, este efecto se invierte, dando lugar a un aumento en la velocidad de formación de los agregados. Esto podría ser debido a que a altas concentraciones de flavoinoide, se favorecerían las interacciones quercetin-quercetin o morin-morin perdiéndose el efecto estabilizador en la proteína, por lo que podríamos decir que, a concentraciones superiores, el efecto retardador se va perdiendo.

## **5. CONCLUSIONES**

Como se ha podido observar, la lisozima es capaz de formar agregados proteicos en condiciones extremas, como son en este caso altas temperaturas y pH básico. Además, las fibras que se forman son de carácter antiparalelo, a diferencia de lo que ocurre con otras fibras amiloides.

Por último, hay que añadir, que ambos flavonoides, quercetina y morina, tienen un efecto retardador en la formación de la fibra a bajas concentraciones, mientras que a concentraciones superiores ese efecto se invierte.

## REFERENCIAS

- Arnaudov, Luben N., and Renko de Vries. 2005. "Thermally Induced Fibrillar Aggregation of Hen Egg White Lysozyme." *Biophysical Journal* 88(1): 515–26.
- Balbach, John J, Yoshitaka Ishii, Oleg N Antzutkin, Richard D Leapman, Nancy W Rizzo, Fred Dyda, Jennifer Reed, and Robert Tycko. 2000. "Amyloid Fibril Formation by A Beta 16-22, a Seven-residue Fragment of the Alzheimer's Beta-amyloid Peptide, and Structural Characterization by Solid State NMR." *Biochemistry* 39(45): 13748–59.
- Chandrashekar, Indu R, Christopher G Adda, Christopher a MacRaild, Robin F Anders, and Raymond S Norton. 2010. "Inhibition by Flavonoids of Amyloid-like Fibril Formation by Plasmodium Falciparum Merozoite Surface Protein 2." *Biochemistry* 49(28): 5899–5908.
- Dobson, C M. 1999. "Protein Misfolding, Evolution and Disease." *Trends in biochemical sciences* 24(9): 329–32.
- Dobson, Christopher M. 2003. "Protein Folding and Misfolding." *Nature* 426(6968): 884–90.
- He, Jianwei, Yu Wang, Alan K Chang, Linan Xu, Na Wang, Xiaoying Chong, Hui Li, Bing Zhang, Gary W Jones, and Youtao Song. 2014. "Myricetin Prevents Fibrillogenesis of Hen Egg White Lysozyme." *Journal of agricultural and food chemistry* 62(39): 9442–49.
- Homchaudhuri, Lopamudra, Satish Kumar, and Rajaram Swaminathan. 2006. "Slow Aggregation of Lysozyme in Alkaline pH Monitored in Real Time Employing the Fluorescence Anisotropy of Covalently Labelled Dansyl Probe." *FEBS letters* 580(8): 2097–2101.
- Jagota, Seema, and Jayakumar Rajadas. 2012. "Effect of Phenolic Compounds Against A $\beta$  Aggregation and A $\beta$ -induced Toxicity in Transgenic C. Elegans." *Neurochemical research* 37(1): 40–48.
- Lemkul, Justin a., and David R. Bevan. 2010. "Destabilizing Alzheimer's A $\beta$  42 Protofibrils with Morin: Mechanistic Insights from Molecular Dynamics Simulations." *Biochemistry* 49(18): 3935–46.
- MadanKumar, Perumal, Perumal NaveenKumar, Halagowder Devaraj, and Sivasithamparam NiranjaliDevaraj. 2015. "Morin, a Dietary Flavonoid, Exhibits Anti-fibrotic Effect and Induces Apoptosis of Activated Hepatic Stellate Cells by Suppressing Canonical NF- $\kappa$ B Signaling." *Biochimie* 110: 107–18.

- Merlini, Giampaolo, and Vittorio Bellotti. 2005. "Lysozyme: a Paradigmatic Molecule for the Investigation of Protein Structure, Function and Misfolding." *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 357(2): 168–72.
- Morozova-Roche, L a, J Zurdo, a Spencer, W Noppe, V Receveur, D B Archer, M Joniau, and C M Dobson. 2000. "Amyloid Fibril Formation and Seeding by Wild-type Human Lysozyme and Its Disease-related Mutational Variants." *Journal of structural biology* 130(2-3): 339–51.
- Nielsen, L, S Frokjaer, J F Carpenter, and J Brange. 2001. "Studies of the Structure of Insulin Fibrils by Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy and Electron Microscopy." *Journal of pharmaceutical sciences* 90(1): 29–37.
- Noor, Harris, Ping Cao, and Daniel P Raleigh. 2012. "Morin Hydrate Inhibits Amyloid Formation by Islet Amyloid Polypeptide and Disaggregates Amyloid Fibers." *Protein science*: a publication of the Protein Society 21(3): 373–82.
- Sarroukh, Rabia, Erik Goormaghtigh, Jean-Marie Ruyschaert, and Vincent Raussens. 2013. "ATR-FTIR: a 'Rejuvenated' Tool to Investigate Amyloid Proteins." *Biochimica et biophysica acta* 1828(10): 2328–38.
- Stine, W B, S W Snyder, U S Lador, W S Wade, M F Miller, T J Perun, T F Holzman, and G A Krafft. 1996. "The Nanometer-scale Structure of Amyloid-beta Visualized by Atomic Force Microscopy." *Journal of protein chemistry* 15(2): 193–203.
- Sunde, M, and C Blake. 1997. "The Structure of Amyloid Fibrils by Electron Microscopy and X-ray Diffraction." *Advances in protein chemistry* 50: 123–59.
- Török, Marianna, Saskia Milton, Rakez Kaye, Peng Wu, Theresa McIntire, Charles G Glabe, and Ralf Langen. 2002. "Structural and Dynamic Features of Alzheimer's A $\beta$  Peptide in Amyloid Fibrils Studied by Site-directed Spin Labeling." *The Journal of biological chemistry* 277(43): 40810–15.
- Wang, Jian-Bo, Yi-Min Wang, and Cheng-Ming Zeng. 2011. "Quercetin Inhibits Amyloid Fibrillation of Bovine Insulin and Destabilizes Preformed Fibrils." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 415(4): 675–79.
- Xie, Jin-Bing, Yi Cao, Hai Pan, Meng Qin, Zhi-Qiang Yan, Xiang Xiong, and Wei Wang. 2012. "Photoinduced Fibrils Formation of Chicken Egg White Lysozyme Under Native Conditions." *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 80(11): 2501–13.
- Zou, Ye, Yiyi Li, Wenying Hao, Xiaoqian Hu, and Gang Ma. 2013. "Parallel B-sheet Fibril and Antiparallel B-sheet Oligomer: New Insights into Amyloid Formation of Hen Egg White Lysozyme Under Heat and Acidic Condition from FTIR Spectroscopy." *The journal of physical chemistry. B* 117(15): 4003–13.