

La química computacional aplicada al disseny de marcadors fluorescents per a la diagnosi de la malaltia d'Alzheimer

Computational chemistry applied to the design of fluorescent markers for the diagnosis of Alzheimer's disease

Francesca Peccati, Xavier Solans Monfort i Mariona Sodupe
Universitat Autònoma de Barcelona. Departament de Química

Resum: La malaltia d'Alzheimer suposa un dels reptes més importants de la medicina actual. S'espera que l'any 2050 el nombre de pacients amb aquesta malaltia neurodegenerativa superi els cent milions de persones, de manera que es convertirà en un problema insostenible per als sistemes de salut en l'àmbit mundial. La complexitat d'aquesta malaltia requereix un enfocament multidisciplinari que combini l'estudi dels aspectes patològics amb els processos que tenen lloc en l'àmbit molecular. En aquest context, la química computacional és una eina d'una importància fonamental per al disseny de molècules amb objectiu tant per al diagnòstic com per al tractament de la malaltia d'Alzheimer.

Paraules clau: Malaltia d'Alzheimer, química computacional, marcadors fluorescents.

Abstract: *Alzheimer's disease is one of the main medical challenges of our time. It is expected that by 2050 the number of patients suffering from this neurodegenerative disease will exceed 100 million, becoming an unsustainable burden for health-care systems worldwide. The complexity of this condition requires a multidisciplinary approach, combining the study of pathological aspects with processes happening at the molecular level. In this light, computational chemistry is a tool of extreme importance for the design of molecules aimed at diagnosing as well as curing Alzheimer's disease.*

Keywords: *Alzheimer's disease, computational chemistry, fluorescent markers.*

Introducció

La malaltia d'Alzheimer presenta símptomes devastadors, incloent-hi la pèrdua de memòria i cognició, així com al·lucinacions. Des d'un punt de vista anatomicopatològic, s'observa atrofia cerebral progressiva. A nivell microscòpic, es produeix una deposició de plaques i cabdells neurofibril·lars que bloquegen la comunicació entre les cèl·lules nervioses i destrueixen el sistema de transport de nutrients, la qual cosa en causa la mort. En l'àmbit molecular, les plaques estan constituïdes per agregats insolubles del pèptid β -amiloide. Malgrat que la funció d'aquest pèptid encara no està del tot clara, se sap que en condicions fisiològiques participa en processos enzimàtics i en la protecció contra l'estrès oxidatiu. En pacients que pateixen la malaltia d'Alzheimer, però, es produeix una acumulació de β -amiloide a causa d'un desequilibri entre la producció i l'eliminació d'aquest pèptid. El β -amiloide conté entre 40 i 42 aminoàcids, és lleugerament soluble i forma espontàniament agregats regulars anomenats *fibres amiloides*, les quals poden presentar diferents arquitectures.

Atès que la quantitat i la distribució d'aquests agregats en el cervell es correlaciona estretament amb símptomes neurològics, és crucial poder detectar aquestes espècies en pacients vius per tal de seguir el desenvolupament de la malaltia i provar l'eficàcia de nous fàrmacs [1-5].

Des d'un punt de vista clínic, la tècnica més usada per a la detecció d'aquests agregats és la tomografia per emissió de positrons (PET). Els inconvenients d'aquest mètode són la seva toxicitat, atès que usa traçadors radioactius, i l'alt cost pel que fa a la instrumentació necessària i l'obtenció de dades. Per aquest motiu, actualment s'estan desenvolupant altres tècniques, amb una toxicitat i un cost més baixos, que podrien ser emprades eficientment en l'àmbit clínic en un futur. Una tècnica amb un bon potencial en aquests termes és la imatge per fluorescència, la qual utilitza molècules orgàniques petites, no tòxiques, capaces d'absorbir radiació infraroja. Aquests marcadors s'uneixen selectivament a les fibres amiloides i retornen un senyal de fluorescència després d'excitar-los amb llum infraroja, que és diferent si estan interactuant amb les fibres o no. Recollint el senyal, és possible reconstruir la quantitat i la distribució de les fibres a la zona analitzada [6-8].

Correspondència: Francesca Peccati
Universitat Autònoma de Barcelona. Departament de Química
Campus de la UAB, Bellaterra. 18193 Cerdanyola del Vallès
Tel.: +34 935 812 173. Fax: +34 935 812 920
A/e: francesca.peccati@uab.cat

Tot i que encara calen nous avenços perquè aquesta tècnica pugui ser usada en estudis clínics, en els últims deu anys s'han

fet molts avenços en aquesta direcció i s'han proposat diverses molècules amb diferents propietats de fluorescència per detectar fibres amiloides [6, 9-11]. En molts casos, però, es desconeix com actuen aquestes molècules i quins factors les fan més o menys idònies. En aquest context, la química computacional és una eina molt poderosa no només per explicar els mecanismes que controlen l'acció d'aquestes molècules, sinó també per dirigir el disseny de nous fàrmacs optimitzant-ne el rendiment biològic i fotofísic.

Requisits dels marcadors fluorescents per al seu ús *in vivo*

El disseny de molècules per a la generació d'imatges de fluorescència es basa en una sèrie de requisits estructurals estrictes. En primer lloc, els marcadors han de ser capaços de creuar la barrera hematoencefàlica. També cal que els marcadors emetin a la regió de l'infraroig proper, és a dir, a una longitud d'ona superior a 650 nm, per tal de disminuir els danys i l'autofluorescència de fons del material biològic. D'altra banda, és important fer èmfasi en el fet que les propietats fotofísiques del marcador han de ser fortament modificades per la seva interacció amb els dipòsits de β -amiloides, ja que és la marcada diferència entre les propietats de fluorescència de la molècula lliure i unida a la fibra el principi fonamental per a l'obtenció d'imatges de fluorescència [6]. És a dir, convé que, quan la molècula estigui lliure, emeti un senyal de fluorescència molt

més feble que quan està interaccionant amb la fibra amiloide, ja que això permetrà obtenir un bon contrast en la imatge. El punt interessant és que aquesta diferència no sempre té el mateix origen i, de fet, pot ser molt diferent per a cada classe de marcador. En aquest sentit, la comprensió dels diversos mecanismes responsables de l'augment de la fluorescència causada per la interacció amb les fibres és crucial per al desenvolupament de noves molècules més eficaces i d'acció específica.

A més a més, per permetre la detecció selectiva dels dipòsits d'amiloides i no de qualsevol proteïna present en el medi biològic, els marcadors han de ser selectius, és a dir, han de presentar una alta afinitat per la fibra. La selectivitat s'obté per l'elecció d'una estructura lineal aromàtica com la de les molècules que es mostren a la figura 1. El caràcter hidrofòbic de la fibra amiloide promou la interacció amb els anells aromàtics, i l'estructura lineal permet la interacció amb més filaments de la mateixa fibra [6].

Aspectes estructurals de les fibres amiloides

Actualment són conegudes diverses estructures de fibres amiloides, i, tot i tenir diferents simetries, totes conserven alguns aspectes estructurals comuns, tal com s'il·lustra a la figura 2. La unitat fonamental de la fibra amiloide és el proto-

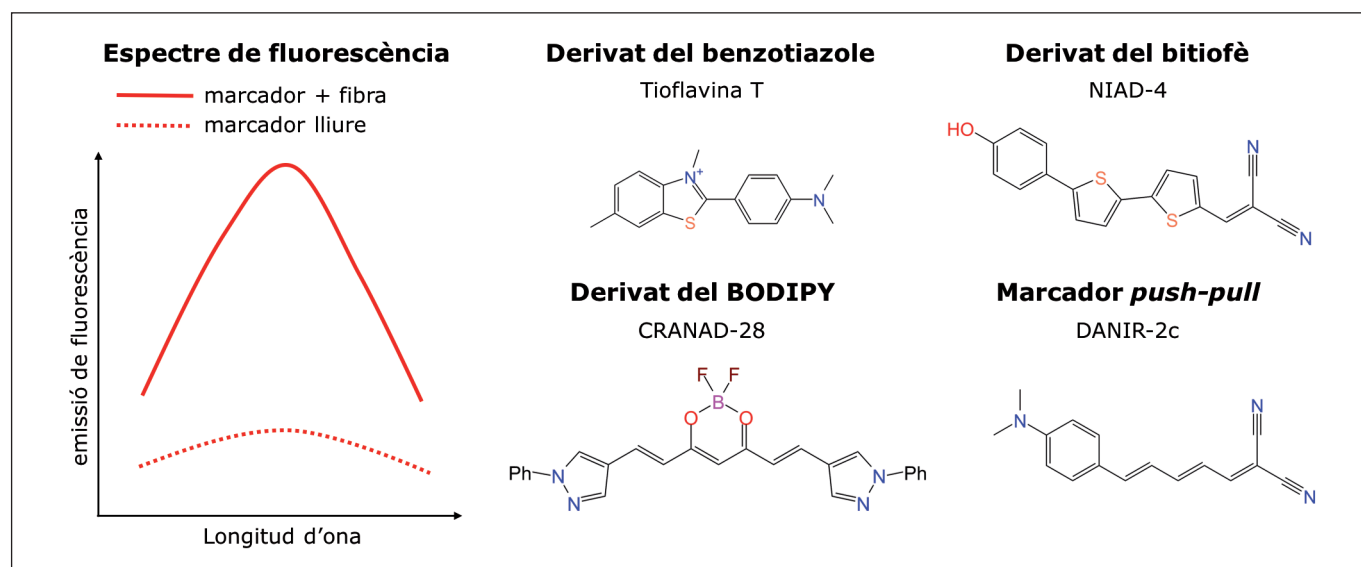


FIGURA 1. Marcadors fluorescents per a la detecció de fibres amiloides. El comportament fotofísic desitjat es mostra a la part esquerra de la imatge: si la molècula no interacciona amb la fibra, té una emissió de fluorescència modesta (línia de traços), mentre que si està enllaçada, té una emissió intensa (línia contínua).

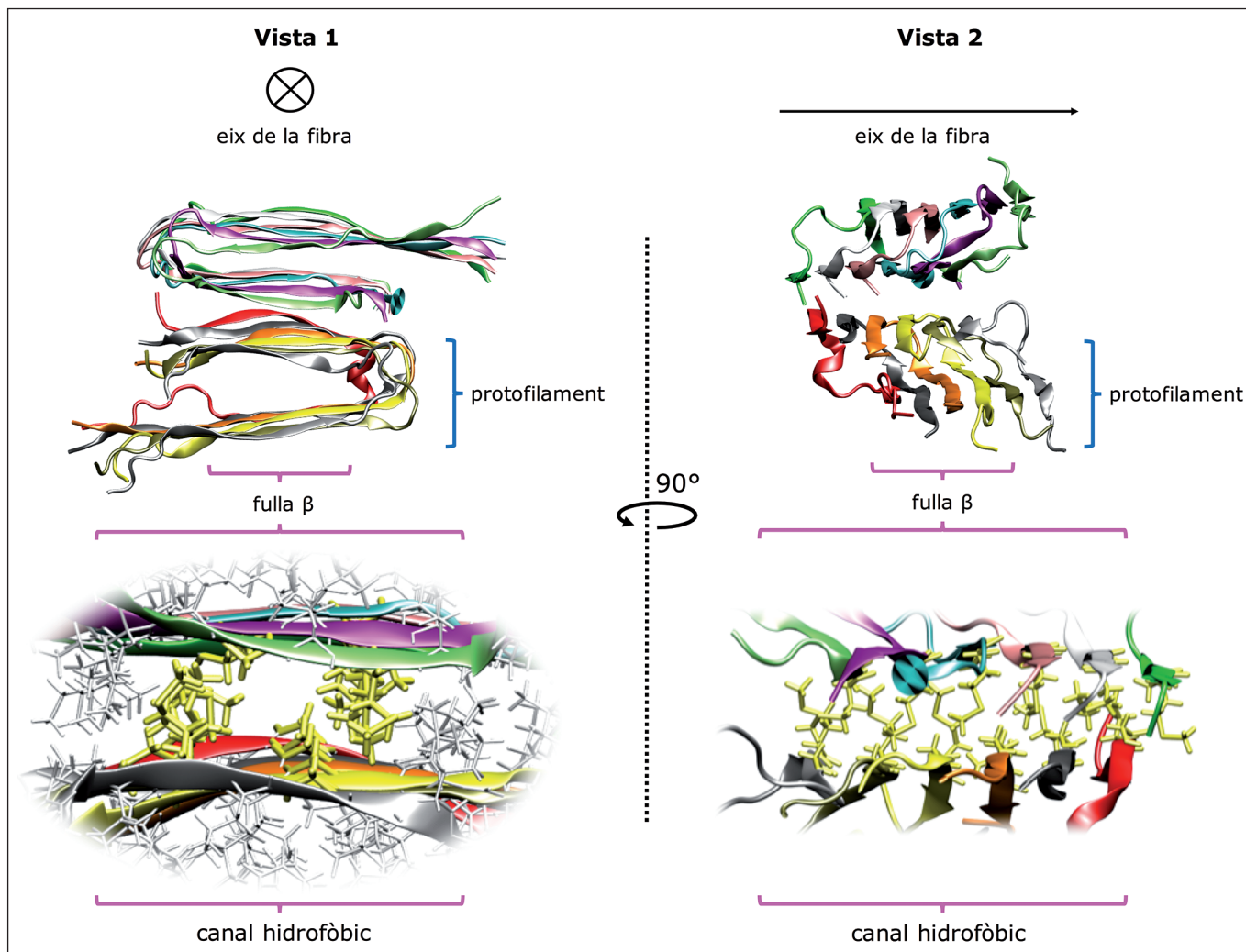


FIGURA 2. Estructura d'una fibra amiloide que consisteix en dos protofilaments. S'indiquen els residus d'aminoàcids que contribueixen a la formació d'un canal paral·lel hidrofòbic a l'eix de la fibra.

filament, el qual consisteix en una repetició regular de pèptids individuals en forma de fulles β . L'estructura completa de la fibra sorgeix de la interacció de dos o tres protofilaments per generar una arquitectura amb simetria binària (amb un eix de simetria C_2) o ternària (amb un eix de simetria C_3) [3, 12-14]. A la figura 2 s'il·lustra l'exemple d'una fibra amb un eix de simetria binari, en la qual es mostra una important característica estructural: la unió de protofilaments, les cadenes laterals hidrofòbiques de les làmines β estan disposades per definir un canal central, paral·lel a l'eix de la fibra (residus de color groc), que pot allotjar molècules amb una estructura lineal com els marcadors mostrats a la figura 1. En general, totes les fibres amiloides contenen aquests canals, que són responsables de la interacció amb la molècula fluorescent [6]. En aquest treball es presentaran els resultats de dues de les

classes de compostos il·lustrats a la figura 1: els derivats del bitiofè, representats pel marcador NIAD-4 [6, 15], i els marcadors *push-pull*, representats per la molècula DANIR-2c [11, 16].

L'enfocament computacional

L'estudi de les propietats fotofísiques de molècules orgàniques i la seva interacció amb fibres amiloides requereix la combinació de diverses tècniques computacionals. Per estudiar les propietats fotofísiques d'un marcador, cal descriure els seus estats excitats i els mecanismes de desactivació i, per tant, cal usar mètodes basats en la mecànica quàntica. Aquests mètodes, però, no poden ser usats per descriure els

sistemes bioquímics, en aquest cas, les fibres amiloides, atès que tenen un gran nombre d'àtoms (entre 6.000 i 40.000) i això suposaria un cost computacional extremament elevat. Per aquesta raó, aquests sistemes s'estudien amb tècniques més aproximades, com ara la mecànica molecular, que reproduceix amb una raonable precisió les propietats estructurals en l'àmbit atòmic, sense tractar-ne explícitament la distribució electrònica. Aquestes tècniques ens donen informació sobre com interacciona el marcador amb les fibres amiloides i els canvis induïts en la seva flexibilitat, la qual cosa pot modificar en gran manera les seves propietats fluorescents.

Propietats fotofísiques dels marcadors amb interacció i sense interacció amb fibres amiloides

Els marcadors NIAD-4 i DANIR-2c, que es mostren a la figura 3, tenen dues coses en comú: 1) tots dos tenen un sistema d'electrons π deslocalitzats, i 2) aquest sistema π connecta dos grups amb efecte inductiu oposat, un donador ($-\text{OH}$ o $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$) i un acceptor ($=\text{C}(\text{CN})_2$). Aquestes dues característiques són importants, perquè determinen les propietats fotofísiques de la molècula. En particular, els càlculs quàntics rea-

litzats han mostrat que, per als dos marcadors, les transicions electròniques actives són de transferència de càrrega, és a dir, són transicions que impliquen una transferència de densitat d'electrons des del grup donador fins al grup acceptor de la molècula. Aquesta transició és intensa i és la responsable de l'emissió de la fluorescència observada quan el marcador interacciona amb les fibres amiloides.

En el cas del NIAD-4, quan la molècula està lliure, sense interactuar amb la fibra, no presenta cap fluorescència. Es podria pensar que això és degut al fet que, en dissolució, el NIAD-4 retorna al seu estat electrònic fonamental a través d'un procés no radiatiu que està impedit quan aquest interacciona amb la fibra. Tanmateix, un estudi detallat sobre els possibles mecanismes de desactivació no radiativa d'aquesta molècula ha mostrat que això no és degut ni a la presència d'un encreuament entre sistemes (*intersystem crossing*), ni al fet que es comporti com un rotor, com en el cas de la tioflavina. Per tant, l'absència de fluorescència en dissolució ha de ser deguda a altres factors. De fet, la raó per la qual el NIAD-4 no mostra fluorescència en dissolució és que aquesta molècula no és gaire soluble en solució aquosa i forma agregats apilats de tipus π en concentracions molt petites. Les nostres simulacions mostren que aquests agregats no donen emissió de fluorescència (*quenching*) a causa de la formació de dímers.

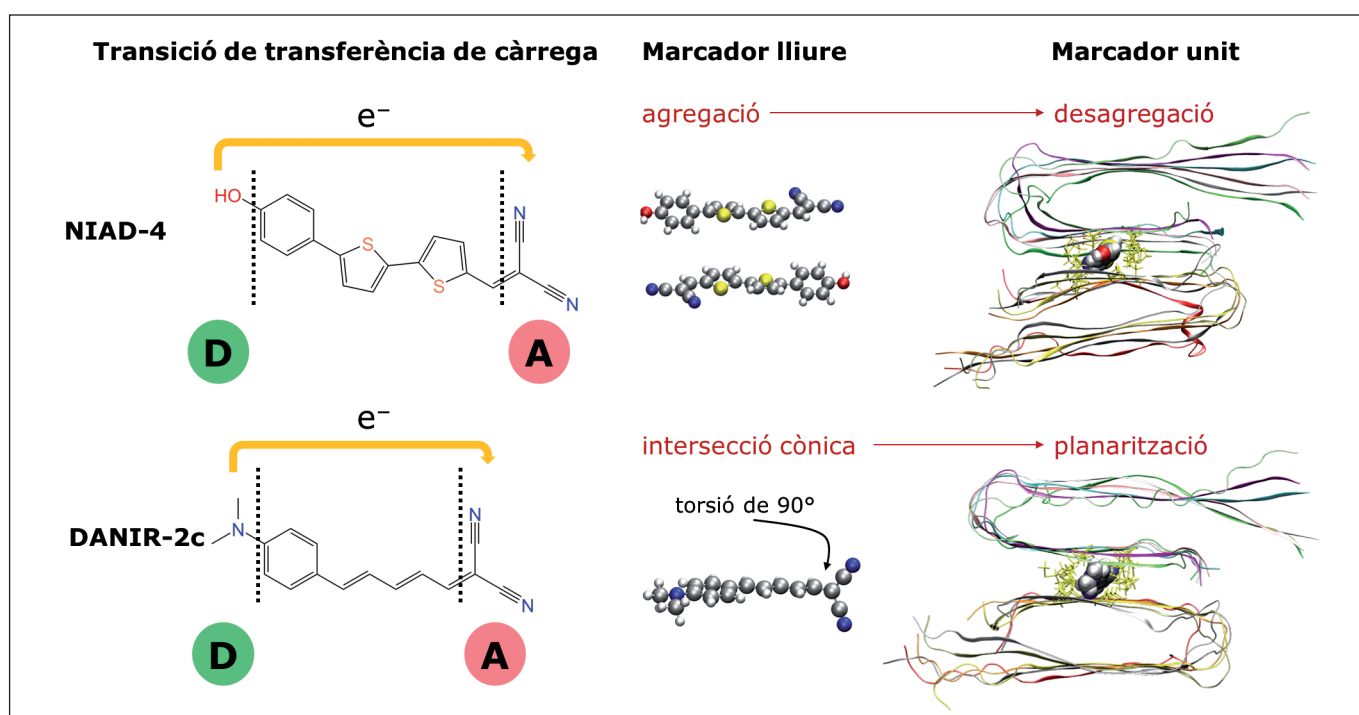


FIGURA 3. Excitació i processos de relaxació del NIAD-4 i el DANIR-2c.

La interacció amb la fibra causa la recuperació de les propietats fluorescents d'aquesta molècula, ja que implica la destrucció dels agregats. De fet, les simulacions computacionals realitzades mostren que els canals hidrofòbics, paral·lels a l'eix de la fibra, tenen les dimensions adequades per allotjar només una molècula de marcador, i no dímers o agregats de dimensions més grans. D'aquesta manera, la interacció amb els canals hidrofòbics provoca la desagregació del marcador, que en la seva forma monomèrica presenta fluorescència amb un bon rendiment quàntic. Així, doncs, aquesta desagregació explicaria l'augment de la fluorescència observada per al NIAD-4 en presència de fibres de β -amiloide [15]. Sobre la base d'aquest mecanisme d'agregació-desagregació es pot pensar en el disseny de nous marcadors amb un rendiment millor, per exemple, mitjançant l'ampliació del sistema π . Una tal extensió causaria un augment de la fluorescència de la molècula aïllada i, al mateix temps, també augmentariem la propensió a l'agregació, la qual cosa permetria augmentar el contrast entre el marcador lliure i l'unit i, per tant, millorar la imatge de fluorescència.

En el cas del DANIR-2c, l'augment de fluorescència observat en presència de fibres amiloides té un origen diferent. De fet, la molècula lliure és menys propensa a l'agregació que el NIAD-4 i, després de l'excitació, pot decaure a l'estat fonamental per emissió de fluorescència, fins i tot sense interaccionar amb la fibra. No obstant això, la molècula presenta un camí important de desactivació no radiativa a través d'interseccions còniques. S'ha calculat que hi ha geometries per a les quals l'estat de transferència de càrrega i l'estat fonamental estan degenerats. Aquestes geometries corresponen a rotacions de 90° al voltant dels dobles enllaços del sistema π i són accessibles a través de la simple torsió dictada per la flexibilitat de la molècula en solució. Quan el marcador és a l'interior de la fibra amiloide en el canal hidrofòbic, la seva flexibilitat es redueix a causa dels contactes estèrics amb les cadenes laterals que constitueixen el canal. Aquesta reducció en la flexibilitat força la molècula a mantenir una geometria plana, la qual cosa impedeix que la intersecció cònica sigui accessible, i això afavoreix la fluorescència. D'aquesta manera, la desactivació no radiativa es veu molt impedida i l'emissió de fluorescència es converteix en el procés dominant, la qual cosa explicaria l'augment de fluorescència observat quan el marcador està unit a les fibres amiloides [16]. També en aquest cas, les modificacions estructurals orientades a augmentar el contrast entre el marcador lliure i l'unit podrien millorar el rendiment quàntic.

Conclusions

Aquest treball il·lustra l'aplicació dels mètodes de la química computacional per a l'estudi d'un problema complex, com és ara el dels marcadors fluorescents per al diagnòstic de la malaltia d'Alzheimer. Diverses tècniques de càlcul contribueixen a la descripció dels estats excitats de molècules orgàniques petites i la seva interacció amb els agregats de proteïnes com ara fibres amiloides. Les nostres simulacions porten llum als camins de desactivació de dos marcadors fluorescents, el NIAD-4 i el DANIR-2c. En el primer cas, es mostra que els agregats de NIAD-4 que es formen de manera espontània en solució no emeten fluorescència, i que l'augment de fluorescència observat en presència de fibres de β -amiloide és degut al procés de desagregació induït en interaccionar amb la fibra. En el cas del DANIR-2c, però, l'origen de l'augment de la fluorescència es deu al fet que, en interaccionar amb la fibra, es produeix una important reducció de la flexibilitat del marcador que fa inaccessible camins de desactivació no radiativa, de manera que s'observa un augment significatiu de la fluorescència. Aquests dos exemples mostren no només com un estudi computacional és essencial per a la comprensió dels mecanismes fonamentals d'acció d'aquestes molècules bàsiques d'interès biològic, sinó també com el coneixement derivat de les simulacions pot orientar el disseny de nous marcadors d'alt rendiment.

Referències

- [1] LA FERLA, F. M.; GREEN, K. N. «Animal models of Alzheimer disease». *Cold. Spring Harb. Perspect. Med.*, núm. 2 (2012), p. 1-13.
- [2] FALLER, P.; HUREAU, C.; BERTHOUMIEU, O. «Role of metal ions in the self-assembly of the Alzheimer's amyloid- β peptide». *Inorg. Chem.*, núm. 52 (2013), p. 12193-12206.
- [3] LU, J.; QIANG, W.; YAU, W.; SCHWIETERS, C. D.; MEREDITH, S. C.; TYCKO, R. «Molecular structure of β -amyloid fibrils in Alzheimer's disease brain tissue». *Cell*, núm. 154 (2013), p. 1257-1268.
- [4] QUERFURTH, H. W.; LA FERLA, F. M. «Alzheimer's disease». *N. Engl. J. Med.*, núm. 326 (2010), p. 329-344.
- [5] KARRAN, E.; MERCKEN, M.; STROOPER, B. de. «The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics». *Nat. Rev. Drug Discov.*, núm. 10 (2011), p. 698-712.
- [6] NESTEROV, E. E.; SKOCH, J.; HYMAN, B. T.; KLUNK, W. E.; BACSKAI, B. J.; SWAGER, T. M. «*In vivo* optical imaging of amyloid aggre-

- gates in brain: design of fluorescent markers». *Angew. Chemie Int. Ed.*, núm. 44 (2005), p. 5452-5456.
- [7] NTZIACHRISTOS, V. «Fluorescence molecular imaging». *Annu. Rev.*, núm. 8 (2006), p. 1-33.
- [8] NORDBERG, A.; RINNE, J. O.; KADIR, A.; LÄNGSTRÖM, B. «The use of PET in Alzheimer disease». *Nat. Rev. Neurol.*, núm. 6 (2010), p. 78-87.
- [9] AMDURSKY, N.; EREZ, Y.; HUPPERT, D. «Molecular rotors: what lies behind the high sensitivity of the thioflavin-T fluorescent marker». *Acc. Chem. Res.*, núm. 45 (2012), p. 1548-1557.
- [10] ZHANG, X.; TIAN, Y.; LI, Z.; TIAN, X.; SUN, H.; LIU, H.; MOORE, A.; RAN, C. «Design and synthesis of curcumin analogues for *in vivo* fluorescence imaging and inhibiting copper-induced cross-linking of amyloid beta species in Alzheimer's disease». *J. Am. Chem. Soc.*, núm. 135 (2013), p. 16397-16409.
- [11] CUI, M.; ONO, M.; WATANABE, H.; KIMURA, H.; LIU, B.; SAJI, H. «Smart near-infrared fluorescence probes with donor-acceptor structure for *in vivo* detection of beta-amyloid deposits». *J. Am. Chem. Soc.*, núm. 136 (2014), p. 3388-3394.
- [12] PETKOVA, A. T.; YAU, W.; TYCKO, R. «Experimental constraints on quaternary structure in Alzheimer's β -amyloid fibrils». *Biochemistry*, núm. 45 (2006), p. 498-512.
- [13] TYCKO, R. «Solid-state NMR studies of amyloid fibril structure». *Annu. Rev. Phys. Chem.*, núm. 62 (2011), p. 279-299.
- [14] LÜHRS, T.; RITTER, C.; ADRIAN, M.; RIEK-LOHER, D.; BOHRMANN, B.; DÖBELI, H.; SCHUBERT, D.; RIEK, R. «3D structure of Alzheimer's amyloid-beta[1-42] fibrils». *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, núm. 102 (2005), p. 17342-17347.
- [15] PECCATI, F.; HERNANDO, J.; BLANCAFORT, L.; SOLANS MONFORT, X.; SODUPE, M. «Disaggregation-induced fluorescence enhancement of NIAD-4 for the optical imaging of amyloid- β fibrils». *Phys. Chem. Chem. Phys.*, núm. 17 (2015), p. 19718-19725.
- [16] PECCATI, F.; WIŚNIEWSKA, M.; SOLANS MONFORT, X.; SODUPE, M. «Computational study on donor-acceptor optical markers for Alzheimer's disease: a game of charge transfer and electron delocalization». *Phys. Chem. Chem. Phys.*, núm. 18 (2016), p. 11634-11643.



F. Peccati



X. Solans Monfort



M. Sodupe

Francesca Peccati és llicenciada i màster en química per la Universitat de Torí. Actualment realitza la tesi doctoral a la Universitat Autònoma de Barcelona, sota la direcció de Mariona Sodupe i Xavier Solans Monfort. Els seus interessos científics se centren principalment en l'ús d'eines computacionals per entendre processos fotofísics d'interès biològic.

Xavier Solans Monfort és llicenciat en química per la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB). Realitzà la tesi doctoral a la mateixa universitat, sota la direcció de M. Sodupe i V. Branchadell, entre el 1998 i el 2003. Realitzà una estada postdoctoral a la Universitat de Montpeller, en el grup d'O. Eisenstein. L'any 2006 va tornar a la UAB, on treballa actualment com a professor agregat Serra Hùnter. És coautor de més de quaranta articles científics i tres capítols de llibre. Els seus interessos científics se centren principalment en l'ús d'eines computacionals per entendre processos catalítics.

Mariona Sodupe va obtenir el doctorat en química a la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB) l'any 1990. Posteriorment, va realitzar una estada postdoctoral (1990-1992), com a becària Fulbright, a la NASA Ames Research Center (Califòrnia), amb el professor C. W. Bauschlicher. L'any 1992 va tornar a la UAB i, des del 2008, és catedràtica d'universitat del Departament de Química. Ha estat guardonada amb la Distinció de la Generalitat de Catalunya per a la Promoció de la Investigació a la Universitat (2001) i amb el Premi ICREA Acadèmia (2011). És coautora de cent vuitanta articles en revistes internacionals en l'àmbit de la química computacional. Els seus projectes més recents se centren en: a) el disseny *in silico* de marcadors fluorescents de fibres amiloides; b) l'efecte de metalls amb activitat redox en malalties neurodegeneratives, i c) el paper de les superfícies de minerals en processos químics prebiòtics.