



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**“Estudio de la Coordinación de Cu a Sitios de las
Proteínas Prion y Alfa Sinucleína”**

TESIS

Que presenta

Trinidad de la Paz Arcos López

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE
CIENCIAS QUÍMICAS

Directora de Tesis:

Dra. Liliana Quintanar Vera

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Química del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de la Dra. Liliana Quintanar Vera, con el apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través de la beca doctoral otorgada 246845, los proyectos de investigación básica 221134, 128255 y 128369, y el proyecto de convenios bilaterales México-Estados Unidos 193318, así como las becas mixta de movilidad al extranjero de CONACYT y Fulbright-García Robles.

*Para mi esposo.
Sin ti, esto simplemente no existiría...
Creíste en mis sueños y me impulsaste para alcanzarlos.
Gabriel, has sido, eres y serás la inspiración de mi vida.*

Agradecimientos

A lo largo de este trabajo doctoral han estado a mi lado muchas personas que me acompañaron, apoyaron, animaron, enseñaron, aconsejaron, corrigieron... en fin, personas a las quiero agradecer por ser parte importante del trabajo que realicé en el doctorado y también parte muy importante de mi vida.

Dra. Liliana Quintanar. *Por dejarme formar parte de su grupo de investigación, por toda la motivación que me ha brindado en estos años para mejorar con mi trabajo. Por sus consejos, su ayuda y su apoyo para emprender nuevos retos. Por ser un gran ejemplo como investigadora y por inspirar en mí su pasión por la ciencia.*

Dr. Alberto Vela. *Por todo el apoyo y asesoramiento, y también por dejarme formar parte de su grupo en estos años. Mucho de lo que aprendí se ve reflejado en esta tesis y ha sido parte fundamental de mi formación.*

Colaboradores:

Dres. Ed. I. Solomon, Britt Hedman, Keith O. Hodgson y sus estudiantes Dra. Munzarin Qayyum y Hyeongtaek Lim. Por el acceso al Stanford Synchrotron Radiation Lightsource y por su ayuda en la obtención de los datos de absorción de rayos X presentados en esta tesis. También, por la gran experiencia que viví en la estancia realizada con su grupo en la Universidad de Stanford y por todos sus comentarios que hicieron de éste un mejor trabajo.

Dr. Claudio O. Fernández y su estudiante Marco Miotto, Laboratorio Max Planck de Biología Estructural, Química y Biofísica Molecular de Rosario, Argentina. Por toda su ayuda en la obtención de los datos de resonancia magnética nuclear, así como la expresión y purificación de la proteína alfa sinucleína y sus variantes. Y por supuesto, por sus valiosos comentarios y discusiones que contribuyeron a este trabajo.

Al Cinvestav y al Departamento de Química. *Por todas las facilidades que me brindaron para llevar a cabo mi proyecto de investigación, así como a las personas que están detrás de todo ello: Técnicos, Auxiliares, Secretarías, Bibliotecarios, gracias por hacer del Centro un lugar accesible, agradable y con calidad humana.*

Al Laboratorio 3 y al grupo de Química Teórica. *A los que están y a los que han estado. Caro, Maripaz, Toño, Rafa, Yanahí, Anacelia, Carlos, Maru, Esaú, Atenea, Luis Alberto, Kato, Ángel, Rodrigo, Gabi, Selena, Ulises, Jorge Luis, Daniel. Estos años que he compartido con ustedes aprendí que tus compañeros de trabajo también pueden ser tus amigos. Gracias por todo el apoyo que recibí de ustedes, por todos sus comentarios, dudas, sugerencias, consejos, etc. que me hicieron mejorar profesionalmente y también por los buenos momentos que compartimos en congresos, cumpleaños, graduaciones y demás.*

A mis amigos. Elizabeth, Caro (otra vez), Peter, Alonso, Miguel, Clau, Aldo, Dehni, Anita, Mayte, Octavio, Carlos Polanco. En ustedes he encontrado verdaderos amigos, además de excelentes personas. A lo largo de estos años su ejemplo me ha motivado a continuar y a mejorar. Además, han estado para mí en los momentos difíciles y han compartido conmigo las ocasiones más felices. Solo quiero decirles que espero compartir éste y muchos otros momentos de mi vida con ustedes.

A mi familia. A mis papás, mis hermanas y mis sobrinas, por ser un gran ejemplo, por creer en mí, animarme, quererme, cuidarme, apoyarme y compartir conmigo esto y todo lo demás de mi vida.

A mi nueva familia. Familia Fernández Álvarez. Gracias por todo el apoyo que me han brindado en estos años, por estar para mí cuando lo he necesitado, por ser para mí como mi familia, pero sobre todo, gracias por formar parte de mi vida.

Publicaciones, estancias, participaciones en congresos y distinciones

Artículos:

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesis dieron como resultado la siguiente publicación:

- **Spectroscopic and Theoretical Study of Copper(I) Binding to His111 in the Human Prion Protein Fragment 106-115.** Trinidad Arcos-López, Munzarin Qayyum, Lina Rivillas-Acevedo, Marco C. Miotto, Rafael Grande-Aztatzi, Claudio O. Fernández, Britt Hedman, Keith O. Hodgson, Alberto Vela, Edward I. Solomon, Liliana Quintanar. *Inorg. Chem.* **2016**, *55*, 2909-2922.

Los resultados descritos en la sección 6.2.1 de esta tesis forman parte de la publicación:

- **Role of N-terminal methionine residues in the redox activity of copper bound to alpha-synuclein.** Rodríguez, Esaú; Arcos-López, Trinidad; Trujano-Ortiz, Lidia; Fernández, Claudio; González, Felipe; Vela, Alberto; Quintanar, Liliana. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2016**, *21*, 691-702.

Por último, también participe en la siguiente revisión:

- **Copper coordination to the prion protein: Insights from theoretical studies.** Liliana Quintanar, Lina Rivillas-Acevedo, Rafael Grande-Aztatzi, Carlos Z. Gómez-Castro, Trinidad Arcos-López, Alberto Vela. *Coord. Chem. Rev.* **2013**, *257*, 429-444.

Estancias de investigación:

Estancias realizadas en el Departamento de Química de la Universidad de Stanford, CA, Estados Unidos, en los laboratorios del Dr. Edward I. Solomon y los Dres. Keith O. Hodgson y Britt Hedman.

- 17 al 25 de octubre del 2011
- 12 al 22 de mayo del 2013
- 2 al 6 de febrero del 2014
- 01 de septiembre de 2014 al 06 de Marzo de 2015.
- 8 al 13 de noviembre del 2015

Participaciones en congresos nacionales e internacionales:

- X Reunión Mexicana de Fisicoquímica Teórica. Pachuca, Hidalgo. Nov, 2011. Cartel.
- 2nd Penn State Bioinorganic Workshop. State College Pennsylvania, USA. 31 de Mayo al 9 de Junio, 2012. Cartel.
- XI Reunión Mexicana de Fisicoquímica Teórica. Toluca, Edo. Mex. Nov, 2012. Cartel.
- 6° Encuentro de Química Inorgánica. Puebla, Puebla. Mayo, 2013. Participación oral.
- Cuarto Congreso de la Rama de Fisicoquímica, Estructura y Diseño de Proteínas y 3rd USA-Mexico Workshop in Biological Chemistry: Protein Folding, Dynamics and Function. Guanajuato, Guanajuato. Noviembre, 2013. Cartel.
- XII Reunión Mexicana de Fisicoquímica Teórica. Querétaro, Querétaro. Noviembre, 2013. Cartel.
- Simposio Impacto de la Química en 100 años de Coordinación. México, D. F. Dic, 2013. Cartel.
- Gordon Research Conferences and Seminars: Metals in Biology, Bioinorganic Chemistry. Ventura, CA, USA. Ene, 2014. Cartel y participación oral.
- 14th deMon Developers Workshop from Quantum Chemistry to Molecular Simulations. Los Cabos, Baja California Sur. Abril, 2014. Cartel.
- IV Latin American Meeting on Biological Inorganic Chemistry. Chascomús, Argentina. 5 al 8 de agosto, 2014. Participación oral.
- 2014 LCLS/SSRL Users' Meeting and workshops. Menlo Park, CA. USA. 7 al 10 de octubre, 2014. Cartel.
- Gordon Research Seminars: Bioinorganic Chemistry, Ventura, CA, USA. 29 de enero al 01 de febrero, 2015. Cartel.
- 17th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (ICBIC17). Beijing, China. 20 al 24 de Julio del 2015. Cartel
- Simposio Conmemorativo por los 50 años del Departamento de Química del Cinvestav. México D. F. 28 al 30 de septiembre del 2015. Cartel
- 4th International Workshop Frontiers in Protein Folding, Evolution and Function and 5° Congreso de la Rama de Fisicoquímica, Estructura y Diseño de Proteínas de la Sociedad Mexicana de Bioquímica. Oaxaca, México. 3 al 7 de noviembre del 2015. Cartel

- XIV Reunión Mexicana de Fisicoquímica Teórica. Guadalajara, México. 19 al 21 de Noviembre del 2015. Participación Oral.

Distinciones:

- Beca Fulbright-García Robles para realizar una estancia de 6 meses en la Universidad de Stanford, CA. USA.
- Beca por parte de la *Society for Biological Inorganic Chemistry (SBIC)* para asistir al “IV Latin American Meeting on Biological Inorganic Chemistry”.
- *Student Travel Grant* para asistir a la “17th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (ICBIC17)”.
- *Best Poster Award* en el “4th International Workshop Frontiers in Protein Folding, Evolution and Function”.
- Beca de hospedaje para asistir a la “XII Reunión Mexicana de Fisicoquímica Teórica”.
- Beca de hospedaje para asistir a la “XIV Reunión Mexicana de Fisicoquímica Teórica”.

Índice

Índice.	ix
Resumen.	xii
Abstract.. . . .	xiv
Nomenclatura.. . . .	xvi
1. Introducción.	1
1.1. Referencias.	4
2. Objetivos.	5
3. Descripción general de la metodología.	6
4. Coordinación de Cu al sitio de la His111 en la proteína prion humana.	9
4.1. Antecedentes.	9
4.1.1. Encefalopatías espongiformes transmisibles (TSEs).	9
4.1.2. Proteína prion (PrP).	11
4.1.3. Coordinación de cobre a la proteína prion humana.	14
4.2. Resultados.	18
4.2.1. Espectroscopía de absorción de rayos X del complejo Cu(II)-PrP(106-115) a pH 6.5 y 8.5.	18
4.2.2. Validación teórica de los modelos 3N1O y 4N en la coordinación de Cu(II) al sitio de la His111.	23
4.2.3. Espectroscopía de absorción de rayos X del complejo Cu(I)-PrP(106-115) a pH 6.5 y 8.5.	24
4.2.4. Resonancia magnética nuclear del complejo Cu(I)-PrP(106-115) a pH 6.5 y 8.5.	28
4.2.5. Efecto del pH en el complejo Cu(I)-PrP(106-115) seguido por resonancia magnética nuclear.	31
4.2.6. Modelado de los complejos Cu(I)-PrP(106-115) usando cálculos de estructura electrónica.	33
4.2.6.1. Grupo 1. Modelos para el complejo formado a pH 6.5.	35
4.2.6.2. Grupo 2A. Modelos para el complejo formado a pH 8.5 que contienen a la Met109.	38

4.2.6.3. Grupo 2B. Modelos para el complejo formado a pH 8.5 que contienen a la Met112.	41
4.2.6.4. Evaluación del efecto de solvatación en modelos seleccionados.	43
4.3. Discusión.	47
4.4. Conclusiones.	50
4.5. Referencias.	50
5. Reactividad del complejo Cu(I)-PrP(106-115).	55
5.1. Antecedentes.	55
5.1.1. Actividad redox de los sitios de coordinación de Cu en la proteína prion.	55
5.2. Resultados.	56
5.2.1. Cálculo de la energía de reorganización de esfera interna asociada a la reducción de las especies de Cu(II) a Cu(I) a pH 6.5 y 8.5.	56
5.2.2. Estimación del $E^{\circ}_{\text{Cu(II/I)-PrP(106-115)}}$ a pH 6.5 y 8.5 por medio de titulaciones reductivas.	58
5.2.3. Estudio de la reducción de los complejos Cu(II)-3N1O y Cu(II)-4N.	59
5.2.4. Análisis de la velocidad de reacción en la reducción de los complejos Cu(II)-3N1O y Cu(II)-4N usando la ecuación de Marcus.	61
5.2.5. Efecto de la Met109 y Met112 en la reducción del complejo Cu(II)-PrP(106-115) a pH 6.5.	62
5.2.6. Reoxidación del complejo Cu(I)-PrP(106-115) con oxígeno a pH 6.5.	63
5.2.7. Evaluación del mecanismo de reacción en el proceso de reoxidación.	65
5.2.8. Oxidación de metioninas catalizada por el complejo de cobre.	66
5.3. Discusión.	68
5.4. Conclusiones.	71
5.5. Referencias.	71
6. Coordinación de Cu al sitio N-terminal de la proteína α sinucleína.	73
6.1. Antecedentes.	73
6.1.1. Enfermedad de Parkinson.	73
6.1.2. Proteína α sinucleína (AS).	74
6.1.3. Coordinación de cobre a la proteína AS.	76
6.2. Resultados.	79

6.2.1. Evaluación de la Met1 y Met5 como ligando axial en la coordinación de Cu(II) al fragmento AS(1-6) mediante cálculos de estructura electrónica.	79
6.2.2. Coordinación de Cu(I) al N-terminal de la proteína AS.	85
6.2.2.1. Caracterización del complejo Cu(I)-AS en el sitio del N-terminal de la proteína por medio de espectroscopia de absorción de rayos X.	86
6.2.2.2. Modelado de los complejos Cu(I)-AS(1-6) usando cálculos de estructura electrónica.	89
6.2.2.3. Cálculo de la energía de reorganización de esfera interna asociada a la reducción del complejo de Cu en el sitio del N-terminal de la proteína AS.	93
6.2.2.4. Evaluación del efecto de la acetilación del N-terminal en la proteína AS sobre la coordinación de Cu(I).	94
6.2.2.4.1. Espectroscopia de absorción de rayos X del complejo Cu(I)-AcASH50A y Cu(I)AcAS(1-6).	94
6.2.2.4.2. Cálculos de estructura electrónica del complejo Cu(I)-AcAS(1-6).	97
6.3. Discusión.	101
6.4. Conclusiones.	105
6.5. Referencias.	106
7. Discusión final	109
8. Conclusiones generales.	111
9. Perspectivas.	113
10. Materiales y Métodos.	115
10.1. Referencias.	123

Resumen

Las proteínas prion (PrP) y alfa sinucleína (AS) humanas se encuentran principalmente expresadas en el cerebro, en las membranas presinápticas del sistema nervioso central y en el citosol de terminales presinápticas en neuronas dopaminérgicas, respectivamente. Aunque la función biológica de estas proteínas aún no se ha descrito completamente, se ha propuesto que la interacción con cobre puede tener implicaciones tanto en su función, como en la patogénesis de las enfermedades neurodegenerativas vinculadas a la agregación de estas proteínas. En esta Tesis, se elucidó la coordinación de Cu(II) y Cu(I) al sitio de la His111 de la proteína PrP (usando como modelo el fragmento 106-115) y al sitio N-terminal de la proteína AS, utilizando diferentes técnicas de espectroscopía (absorción y dicroísmo circular electrónico en la región UV-visible, resonancia paramagnética electrónica, resonancia magnética nuclear y absorción de rayos X) en combinación con cálculos de estructura electrónica.

La proteína prion en el sitio de la His111 presenta el motivo MKHM que le confiere propiedades interesantes en la coordinación de Cu(II) y Cu(I). Respecto a Cu(II), la coordinación ocurre a través de ligandos oxígeno y/o nitrógeno en los modos de coordinación 3N1O y 4N, los cuales pueden existir en equilibrio a pH 7.5. En cuanto a Cu(I), además de que la coordinación es dependiente del pH, las metioninas 109 y 112 juegan un papel muy importante como ligandos del ión metálico. A pH > 8 se identificaron las especies 2N1O1S, con solo un residuo de metionina; en un rango de pH de 5 a 8 se favorece un modo de coordinación 1N1O2S, en el que las dos metioninas están presentes en la coordinación, además del nitrógeno imidazol de la His111 y un cuarto ligante que puede provenir de un grupo carbonilo o una molécula de H₂O; finalmente a pH < 5, los residuos de metionina hacen posible la existencia de la especie Cu(I)-2S. Por lo tanto, incluso si se presentan cambios drásticos en el ambiente químico como aquellos ocurridos en la endocitosis, el motivo MKHM permite la coordinación de Cu(I), consistente con una función de transportadora de Cu para esta proteína. Por otro lado, se identificó que al pH del medio extracelular, el complejo Cu(I)-1N1O2S podría ser la especie fisiológicamente relevante. Esta especie es capaz de activar O₂ a través de un mecanismo de esfera interna, que involucra la posible formación de un complejo Cu(II)-superóxido. En este proceso los residuos de

metionina son oxidados parcialmente a sulfóxido. La habilidad que tiene este sitio, gracias a la presencia de las metioninas, para contener especies reactivas de oxígeno puede ser parte de la función antioxidante que se ha propuesto para la proteína prion.

Respecto a la proteína AS, se exploró la coordinación de Cu en el sitio N-terminal (residuos MDVFM), en dos escenarios diferentes: cuando el N-terminal de la proteína se encuentra libre y cuando está en su forma acetilada. Los resultados indican que a pH 6.5 la forma no acetilada de la proteína AS coordina Cu(I) con un modo de coordinación 1N1O2S, donde participan los grupos tioéter de la Met1 y la Met5, el oxígeno carboxilato del Asp2 y el grupo amino terminal. Si este complejo se encontrara en un ambiente oxidante, por ejemplo en el espacio extracelular, la especie de Cu(I) podría reaccionar con O₂ y formar las especies Cu(II)-2N2O1S y Cu(II)-2N2O. Aunque este proceso tiene asociada una alta energía de reorganización, la óxido-reducción de este sitio podría generar especies reactivas de oxígeno que promoverán la oxidación de los residuos de metionina.

Por otro lado, si la proteína se encuentra acetilada, con Cu(I) se favorecerá el modo de coordinación 2O2S, donde el grupo NH₂ es remplazado por el oxígeno del grupo carbonilo del acetilo. Sin embargo en un ambiente oxidante, la acetilación de la proteína ofrece un panorama muy diferente respecto a la forma no acetilada. Con la proteína AcAS no es posible la coordinación de Cu(II) en este sitio, por lo tanto, el ión metálico podría ser liberado al espacio extracelular, teniendo implicaciones en la homeostasis del metal.

En general, este estudio aporta nueva información sobre las propiedades de coordinación con Cu y reactividad de los sitios His111 y N-terminal en las proteínas humanas PrP y AS.

Abstract

Human prion (PrP) and alpha synuclein (AS) proteins are mainly expressed in the brain, at the pre-synaptic membranes in the central nervous system and at the cytosol of dopaminergic neurons, respectively. Although the biological function of these proteins has not been elucidated completely, it has been proposed that interaction of them with copper may have implications in both, their physiological function and the pathogenesis of neurodegenerative diseases related to the aggregation of these proteins. In this Thesis, the coordination of Cu(II) and Cu(I) to the His111 site of PrP and to the N-terminal site of AS was elucidated, using several spectroscopic techniques (electronic absorption, circular dichroism, electronic paramagnetic resonance, nuclear magnetic resonance and X-ray absorption) in combination with electronic structure calculations.

The MKHM motif of the His111 site in PrP confers it with interesting Cu(II) and Cu(I) coordination properties. In this site, Cu(II) coordination occurs through oxygen and/or nitrogen ligands in the 3N1O and 4N coordination modes, which can exist in equilibrium at pH 7.5. Regarding Cu(I), the coordination is also pH-dependent, while Met109 and Met112 play an important role in Cu(I) coordination. At pH > 8, 2N1O1S species are formed, with only one methionine (Met) residue; in the range of pH 5-8, both Met residues are present in the 1N1O2S species, which involves the imidazole nitrogen of His111, and an oxygen ligand belonging to a water molecule or a carbonyl moiety; finally, at pH < 5, both Met residues anchor the metal ion to form a Cu(I)-2S species. Thus, even upon drastic changes in chemical environment, such as those occurring during endocytosis, the MKHM motif ensures Cu(I) binding, which is consistent with a copper transport function for this protein. On the other hand, the Cu(I)-1N1O2S complex is the physiologically relevant species in the extracellular space. This species activates O₂ via an inner-sphere mechanism, likely involving the formation of a Cu(II)-superoxide complex. In this process the Met residues are partially oxidized to sulfoxide. The ability to scavenge superoxide in this site may play a role in the proposed antioxidant function of PrP.

In this study, the Cu coordination at N-terminal site (MDVFM residues) of the AS protein was explored in two different scenarios: with a free unmodified N-terminus, and with an

acetylated N-terminal group. The results indicate that at pH 6.5 the non-acetylated form of AS coordinates Cu(I) with a 1N1O2S mode, with the participation of the thioether groups from Met1 and Met5, the carboxylate oxygen from Asp2 and the N-terminal group. In an oxidizing environment, as in the extracellular space, this complex could react with dioxygen to form the Cu(II)-2N2O1S and Cu(II)-2N2O species. Even though this process is inefficient, since is associated to a large reorganization energy, the redox activity at this site could generate reactive oxygen species that would result in the oxidation of Met residues. On the other hand, if the protein is acetylated, Cu(I) binding yields a 2O2S coordination mode, where the N-terminal group is replaced by the carbonyl oxygen of the acetyl group. However in an oxidizing environment, acetylation of AS provides a very different scenario, as compared to the non-acetylated form. Acetylated AS cannot coordinate Cu(II), therefore, the copper ion could be released into the extracellular space, having implications in the homeostasis of this metal ion.

Overall, this study provides further insight into the Cu coordination and reactivity properties of His111 and N-terminal sites in PrP and AS human proteins.

Nomenclatura

Aminoácidos:

Nombre	Notación	Estructura
Alanina	A, Ala	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$
Arginina	R, Arg	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{NH} \\ \\ \text{C}=\text{NH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$
Asparagina	N, Asn	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$
Ácido aspártico	D, Asp	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{OH} \end{array}$

Cisteína	C, Cys	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{SH} \end{array} $
Glutamina	Q, Gln	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array} $
Ácido glutámico	E, Glu	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{OH} \end{array} $
Glicina	G, Gly	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H} \end{array} $
Histidina	H, His	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{N} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{C} \quad \text{C} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{NH} \end{array} $

Isoleucina	I, Ile	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $
Leucina	L, Leu	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $
Lisina	K, Lys	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{NH}_2 \end{array} $
Metionina	M, Met	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{S} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $
Fenilalanina	F, Phe	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array} $ 

Prolina	P, Pro	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{HN} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{C} \quad \text{C} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{C} \quad \text{C} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{H} \quad \text{H} \end{array} $
Serina	S, Ser	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{OH} \end{array} $
Treonina	T, Thr	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $
Triptófano	W, Trp	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C} \\ / \quad \backslash \\ \text{C} \quad \text{C} \\ \backslash \quad / \\ \text{C} \quad \text{C} \\ \backslash \quad / \\ \text{C} \quad \text{C} \\ \backslash \quad / \\ \text{H} \quad \text{H} \end{array} $
Tirosina	Y, Tyr	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_4 \\ \\ \text{OH} \end{array} $
Valina	V, Val	$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $

* Siglas provenientes de términos en Inglés se muestran en *itálicas*.

AA	Ácido ascórbico
AcAS	Proteína α -sinucleína acetilada en el N-terminal
AS	α -sinucleína
ASH50A	Proteína α -sinucleína con una alanina en la posición 50, reemplazando al residuo de histidina.
AS(1-6)	Fragmento ¹ MDVFMK ⁶ de la proteína α -sinucleína
<i>BVS</i>	Bond valence sum
<i>CD</i>	Circular dichroism
<i>DFT</i>	Density functional theory
ΔG°_{3N1O}	Valor de ΔG° estimado para la reacción de reducción del complejo Cu(II)-PrP(106-115) a pH 6.5 (especie 3N1O)
ΔG°_{4N}	Valor de ΔG° estimado para la reacción de reducción del complejo Cu(II)-PrP(106-115) a pH 8.5 (especie 4N)
<i>EPR</i>	Electronic paramagnetic resonance
<i>EXAFS</i>	Extended X-ray absorption fine structure
His111	Residuo de histidina en la posición 111 de la secuencia de la proteína prion humana
HuPrP	Proteína prion humana
$k_{ET(3N1O)}$	Constante de rapidez de primer orden de la reducción del complejo Cu(II)-PrP(106-115) a pH 6.5 (especie 3N1O)
$k_{ET(4N)}$	Constante de rapidez de primer orden de la reducción del complejo Cu(II)-PrP(106-115) a pH 8.5 (especie 4N)
λ_{3N1O}	Energía de reorganización asociada a la reducción del complejo Cu(II)-3N1O para formar la especie Cu(I)-1N1O2S

λ_{4N}	Energía de reorganización asociada a la reducción del complejo Cu(II)-4N para formar la especie Cu(I)-2N1O1S
Met1	Residuo de metionina en la posición 1 de la secuencia de la proteína α -sinucleína
Met5	Residuo de metionina en la posición 5 de la secuencia de la proteína α -sinucleína
Met109	Residuo de metionina en la posición 109 de la secuencia de la proteína prion humana
Met112	Residuo de metionina en la posición 112 de la secuencia de la proteína prion humana
<i>NMR</i>	Nuclear magnetic resonance
<i>OR</i>	Octarepeat region, fragment 60-91 of prion protein
PrP	Proteína prion
PrP ^C	Isoforma celular de la proteína prion que se encuentra anclada a la membrana celular.
PrP ^{Sc}	Isoforma scrapie de la proteína prion y agente infeccioso de las TSEs
PrP(106-115)	Fragmento ¹⁰⁶ KTNMKHMAGA ¹¹⁵ de la proteína prion humana
PrP(106-115)M109A	Fragmento ¹⁰⁶ KTNAKHMAGA ¹¹⁵
PrP(106-115)M112A	Fragmento ¹⁰⁶ KTNMKHAAGA ¹¹⁵
PrP(106-115)M109&M112A	Fragmento ¹⁰⁶ KTNAKHAAGA ¹¹⁵
<i>ROS</i>	Reactive oxygen species
<i>TSEs</i>	Transmissible spongiform encephalopathies
<i>XANES</i>	X-ray absorption near edge spectroscopy
<i>XAS</i>	X-ray absorption spectroscopy

1. Introducción.

En los seres vivos las moléculas más abundantes que existen además del agua son las proteínas. En el interior de una célula, las proteínas y otras macromoléculas están presentes en una concentración de 300-400 mg/mL. El cuerpo humano contiene alrededor de 100,000 proteínas diferentes, que virtualmente, estimulan y/o controlan cada proceso químico de los que depende nuestra vida.¹ Naturalmente existen veinte diferentes tipos de aminoácidos que conforman las proteínas, estos se combinan en diferente orden y número en una cadena polimérica para dar como resultado una proteína única. Después de su biosíntesis en el ribosoma, la mayoría de las proteínas son convertidas en estructuras compactas altamente plegadas, esto es, adquieren su estado nativo, el que les confiere su función biológica. Sin embargo, diversos factores pueden inducir un plegamiento incompleto, originando que ciertas regiones de las proteínas que debieran estar en el interior, en el estado nativo, queden expuestas en la superficie; estas regiones expuestas pueden llevar a cabo interacciones inadecuadas con otras moléculas y facilitar la agregación y/o acumulación de las proteínas, con severas consecuencias para el funcionamiento de la célula.² Existe amplia evidencia de que muchas enfermedades están asociadas con el plegamiento anómalo de proteínas. Algunas de estas enfermedades resultan del simple hecho de que la proteína no tiene un correcto plegamiento y por lo tanto no lleva a cabo adecuadamente su función.³

Por otro lado, las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por la presencia de un exceso o acumulación anormal de proteínas agregadas, que conduce a la pérdida progresiva de la estructura y función de las neuronas y finalmente esto lleva a la muerte neuronal. Entre estos desordenes cognitivos, podemos encontrar las enfermedades de Parkinson y las Encefalopatías espongiformes transmisibles (*TSEs*, por sus siglas en Inglés). En estas dos enfermedades, proteínas que normalmente se encuentran solubles, se convierten en agregados insolubles que forman depósitos tóxicos extra y/o intracelulares en diversas regiones del cerebro.⁴

Los depósitos amiloides en estas enfermedades son agregados de las proteínas α -sinucleína (AS) en el caso de Parkinson,⁵ y prion (PrP) en el caso de las *TSEs*.⁶ Además de las proteínas, en los agregados amiloidogénicos también se encuentra una alta concentración de metales como Fe, Cu y Mn. También se ha propuesto que en estas enfermedades ocurre un desbalance homeostático de los metales mencionados,⁷ esto último podría estar generando la acumulación de estos metales en

los depósitos amiloides. En las últimas décadas diversos estudios han demostrado cómo los iones metálicos pueden promover eventos conectados con la neurodegeneración.⁷⁻¹⁰

La Tabla 1.1 lista varias enfermedades relacionadas con la agregación de proteínas y los iones metálicos que se han vinculado a su patogénesis. Como se puede notar, el ión Cu es un factor común involucrado en estas enfermedades. Actualmente se cuenta con amplia evidencia que demuestra que las proteínas AS y PrP coordinan Cu(II) con alta afinidad. Asimismo, a pesar de que la función fisiológica de estas proteínas aún no se ha descrito completamente, en cuanto a la proteína prion, muchas propuestas señalan que el cobre tiene un rol fundamental en su función.¹¹⁻

13

Tabla 1.1. Metales y proteínas vinculados en diversas enfermedades.

Enfermedad	Proteína	Metal
Alzheimer	Péptido β amiloide / proteína tau	Cu, Fe, Zn
<i>TSEs</i> /Creutzfeldt-Jakob	Prion	Cu, Mn
Parkinson	α -sinucleína	Cu, Fe, Mn
Cataratas	Cristalinas	Cu, Fe
Diabetes tipo 2	Péptido amilina	Cu, Zn
Esclerosis lateral amiotrófica	Superóxido dismutasa 1	Cu, pérdida de Zn

Otro común denominador que presentan las enfermedades neurodegenerativas es la participación de radicales libres y estrés oxidativo en su patogénesis.^{4, 14-15} Resulta muy importante destacar que el Cu(II) es un ión metálico que puede cambiar su estado de oxidación a Cu(I), por lo tanto los complejos que forma con las proteínas AS y PrP pueden formar sitios que generen especies reactivas. Esto pudiera vincularse con el estrés oxidativo que esta presente en la patogénesis de estas enfermedades. Algunos estudios han demostrado cómo los complejos de Cu-AS y Cu-PrP pueden generar especies reactivas de oxígeno y las posibles implicaciones que esto genera.¹⁶⁻²²

Para entender a detalle esta reactividad y su implicación en las enfermedades, es necesario conocer a nivel molecular las especies de Cu(II) y Cu(I) involucradas en las reacciones, así como la reactividad que presentarán las especies de Cu(I) frente a oxígeno. En los últimos años, la coordinación de Cu(II) en las proteínas PrP y AS ha sido descrita con gran detalle,²³⁻²⁴ sin embargo, la naturaleza de las especies Cu(I)-AS y Cu(I)-PrP no se ha estudiado al mismo nivel.²⁵⁻

²⁶ Aunado a esto, no se cuenta con el detalle molecular del mecanismo de la activación de oxígeno, ni de cómo se generan especies reactivas de oxígeno en estos complejos Cu(I)-proteína. Esto último debe ser de gran importancia, ya que conocer la naturaleza de los complejos Cu(I)-proteína puede ayudarnos a entender tanto su reactividad, las implicaciones de ésta en la patogénesis de la enfermedad y si esta reactividad está vinculada sólo con la patogénesis o también con las posibles funciones que se han propuesto para estas proteínas.

En este trabajo se elucidó la coordinación de Cu(I) en el sitio de la His111 de la proteína prion, usando el fragmento PrP(106-115) como modelo, así como la reactividad del sitio frente a oxígeno. Este sitio es de gran interés ya que contiene en su secuencia el motivo MKHM que le confiere propiedades interesantes tanto para la coordinación de cobre como en su reactividad. El rol de los residuos de metionina cercanos al sitio de coordinación fue evaluado a detalle, tanto en la coordinación del metal, como en la reactividad del complejo frente a oxígeno.

Por otro lado, en la proteína α -sinucleína se evaluó el sitio de coordinación de mayor afinidad de Cu(I), que se encuentra en la región N-terminal de la proteína. Este sitio contiene la secuencia MDVFM, que también presenta dos residuos de metionina que son importantes para la coordinación de Cu(I). Así mismo, también se evaluó el efecto que la acetilación del N-terminal tiene sobre la coordinación del ión metálico en este sitio.

1.1. Referencias

1. Ellis, R. J.; Minton, A. P., *Nature*, **2003**, *425*, 27-28.
2. Dobson, C. M., *Semin. Cell Dev. Biol.* **2004**, *15*, 3-16.
3. Dobson, C. M., *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **2001**, *356*, 133-145.
4. Kozłowski, H.; Luczkowski, M.; Remelli, M.; Valensin, D., *Coord. Chem. Rev.* **2012**, *256*, 2129-2141.
5. Kahle, P. J.; Haass, C.; Kretschmar, H. A.; Neumann, M., *J. Neurochem.* **2002**, *82*, 449-457.
6. Prusiner, S. B., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, *95*, 13363–13383.
7. Campbell, A.; Smith, M. A.; Sayre, L. M.; Bondy, S. C.; Perry, G., *Brain Res. Bull.* **2001**, *55*, 125-132.
8. Bush, A. I., *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 184-191.
9. Bush, A. I., *Trends in Neurosci.* **2003**, *26*, 207-214.
10. Rasia, R. M.; Bertocini, C. W.; Marsh, D.; Cherny, W. H. D.; Zweckstetter, M.; Griesinger, C.; Jovin, T. M.; Fernández, C. O., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102*, 4294-4299.
11. Pauly, P. C.; Harris, D. A., *J. Biol. Chem.* **1998** *273*, 33107–33110.
12. Herms, J.; Tings, T.; Gall, S.; Madlung, A.; Giese, A.; Siebert, H.; Schurmann, P.; Windi, O.; Brose, B.; Kretschmar, H., *J. Neurosci.* **1999**, *19*, 8866–8875.
13. Vassallo, N.; Herms, J., *J. Neurochem.* **2003**, *86*, 538-544.
14. Linert, W.; Kozłowski, H., *Springer-Verlag Wien, Metal Ions in Neurological Systems*, **2012**.
15. Sofic, E.; Sapcanin, A.; Tahirovic, I.; Gavrankapetanovic, I.; Jellinger, K.; Reynolds, G. P.; Tatschner, T.; Riederer, P., *J. Neural. Transm. Suppl.* **2006**, *71*, 39-43.
16. Turnbull, S.; Tabner, B. J.; Brown, D. R.; Allsop, D., *Biochemistry*, **2003**, *42*, 7675-7681.
17. Kawano, T., *Int. J. Biol. Sci.* **2007**, *3*, 57-63.
18. Nadal, R. C.; Abdelraheim, S. R.; Brazier, M. W.; Rigby, S. E.; Brown, D. R.; Viles, J. H., *Free Radic. Biol. Med.* **2007**, *42*, 79-89.
19. Shearer, J.; Soh, P., *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 710-719.
20. Liu, L.; Jiang, D.; McDonald, A.; Hao, Y.; Millhauser, G. L.; Zhou, F., *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 12229-12237.
21. Miotto, M. C.; Rodriguez, E. E.; Valiente-Gabioud, A. A.; Torres-Monserrat, V.; Binolfi, A.; Quintanar, L.; Zweckstetter, M.; Griesinger, C.; Fernández, C. O., *Inorg. Chem.* **2014**, *53*, 4350-4358.
22. Lucas, H. R.; DeBeer, S.; Hong, M.-S.; Lee, J. C., *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 6636-6637.
23. Binolfi, A.; Quintanar, L.; Bertocini, C. W.; Griesinger, C.; Fernández, C. O., *Coord. Chem. Rev.* **2012**, *256*, 2188–2201.
24. Quintanar, L.; Rivillas-Acevedo, L.; Grande-Aztatzi, R.; Gómez-Castro, C. Z.; Arcos-López, T.; Vela, A., *Coord. Chem. Rev.* **2013**, *257*, 429-444.
25. Miotto, M. C.; Binolfi, A.; Zweckstetter, M.; Griesinger, C.; Fernández, C. O., *J. Inorg. Biochem.* **2014**, *141*, 208-211.
26. Badrick, A. C.; Jones, C. E., *J. Inorg. Biochem.* **2009**, *103*, 1169-1175.

2. Objetivos.

Objetivo general.

Evaluar la participación de los residuos de metionina en la coordinación de Cu en los sitios de la His111 de la proteína prion humana y el N-terminal de la proteína α -sinucleína, y evaluar la reactividad del complejo de Cu(I) en el sitio de la His111 de la proteína prion humana frente a oxígeno.

Objetivos particulares.

Coordinación de Cu en el sitio de la His111 de la proteína prion humana usando el fragmento PrP(106-115) como modelo del sitio.

- Evaluar la participación de los residuos de metionina en la coordinación de Cu(II) en el complejo Cu(II)-His111.
- Elucidar la naturaleza estructural del sitio de coordinación Cu(I)-His111.
- Evaluar el efecto del pH sobre la coordinación del complejo Cu(I)-His111.
- Estudiar la reactividad del complejo Cu(I)-His111 frente a oxígeno.

Coordinación de Cu en el N-terminal de la proteína α -sinucleína.

- Evaluar la participación de los residuos de metionina como ligando axial en la coordinación de Cu(II) en el complejo Cu(II)-AS(1-6).
- Elucidar la coordinación del complejo Cu(I)-AS en el sitio del N-terminal de la proteína.
- Evaluar el efecto de la acetilación del N-terminal sobre la coordinación del complejo Cu(I)-AS

3. Descripción general de la metodología.

Estudio de la coordinación de Cu al sitio de His111 de la proteína prion humana. *

- El fragmento peptídico KTNMKHMAGA, que corresponde al fragmento PrP(106-115) en la secuencia de la proteína prion humana, fue sintetizado por síntesis en fase sólida. Este fragmento se usó para evaluar la coordinación de Cu en el sitio de la His111.
- Se sintetizaron además las secuencias KTNAKHMAGA (PrP(106-115)M109A), KTNMKHAAGA PrP(106-115)M112A y KTNAKHAAGA PrP(106-115)M109&M112A, en las cuales se sustituyeron los residuos de metionina por alanina. Esto se hizo para evaluar el rol de las metioninas 109 y 112 (Met109 y Met112) en la coordinación de Cu en el sitio de la His111.
- Se evaluó la coordinación de Cu en el sitio de la His111 de la proteína prion humana en los fragmentos arriba mencionados, usando las técnicas de espectroscopia de absorción de rayos X (*XAS*, por sus siglas en Inglés) y resonancia magnética nuclear (*NMR*, por sus siglas en Inglés).
- Se evaluaron los ligandos que participan en el complejo de coordinación Cu(I)-PrP(106-115), usando la Teoría de funcionales de la densidad (*DFT*, por sus siglas en Inglés), por medio de cálculos de estructura electrónica. Los resultados teóricos fueron comparados con los obtenidos por las técnicas experimentales.
- Una vez elucidada la estructura del complejo de coordinación Cu(I)-PrP(106-115), se estudió la reactividad del sitio por medio de experimentos cinéticos seguidos por absorción electrónica en la región UV-Vis.

Estudio de la coordinación de Cu en el N-terminal de la proteína α -sinucleína. *

- Se evaluó la participación de los residuos de metionina (M1 y M5), como ligandos axiales, en la coordinación de Cu(II) en el fragmento AS(1-6) de la proteína α -sinucleína usando *DFT*, por medio de cálculos de estructura electrónica.
- Se elucidó la coordinación de Cu(I) en el sitio N-terminal de la proteína α -sinucleína mediante *XAS*, para esto se usaron tanto fragmentos peptídicos, como la proteína completa.
- Se evaluaron los ligandos que participan en el complejo de coordinación Cu(I)-AS, usando *DFT*, por medio de cálculos de estructura electrónica. Los resultados obtenidos fueron comparados con los experimentales.
- Se evaluó el impacto de la acetilación del N-terminal de la proteína α -sinucleína en la coordinación de Cu(I) mediante *XAS* y *DFT*.

* *La información detallada de las técnicas usadas, así como de la preparación de las muestras se encuentra en la sección 10, Materiales y Métodos.*

4. Coordinación de Cu al sitio de la His111 en la proteína prion humana.

4.1. Antecedentes.

4.1.1. *Encefalopatías espongiformes transmisibles (TSEs).*

Las enfermedades de la prion son un grupo de enfermedades neurodegenerativas fatales que comparten un agente patogénico común. Son causadas por la acumulación de la isoforma resistente a las proteasas de la proteína prion celular (PrP^C), llamada prion scrapie (PrP^{Sc}).¹⁻² El mecanismo exacto de cómo la PrP^{Sc} causa neurodegeneración y muerte celular aún no se conoce. Sin embargo, se ha propuesto que la PrP^{Sc} es una forma amiloide que se auto propaga en las células, actuando como plantilla que recluta nuevos monómeros de PrP^C los cuales adquieren un alto contenido de hoja β y esto conduce al nacimiento de una nueva PrP^{Sc}.² Este cambio estructural viene acompañado de grandes cambios en la PrP^C. A diferencia de la PrP^C, la PrP^{Sc} es insoluble en detergentes no desnaturizantes y es resistente a la degradación por proteasas.³⁻⁴

La Tabla 4.1 muestra las principales enfermedades de la prion que se presentan en humanos y animales. Las enfermedades que se presentan en humanos pueden ser heredadas, esporádicas o adquiridas por contagio,⁵ en las cuales, los afectados manifiestan entre otros síntomas, ataxia y demencia progresiva hasta llegar a la muerte.

Los casos hereditarios, entre los que se encuentran la enfermedad de Gerstmann-Straussler-Scheinker, el Insomnio fatal familiar y la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob familiar, se presentan por mutaciones puntuales en el gen que codifica a la proteína PrP^C.⁶⁻⁸ Se han identificado hasta 20 diferentes mutaciones relacionados con los casos hereditarios de estas enfermedades.⁹

Las formas esporádicas comprenden la mayoría de los casos de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, aproximadamente el 85 % de los casos reportados.¹⁰ En estos pacientes no se han encontrado mutaciones en el gen de la PrP^C, y hasta la fecha, aún no se sabe cómo surgen las formas esporádicas. Las hipótesis incluyen: transmisión de priones de humanos o animales, mutaciones somáticas o la espontánea conversión de la PrP^C en la PrP^{Sc}.^{5, 11}

Entre las enfermedades priónicas adquiridas por transmisión se encuentra la enfermedad de Kuru, que fue desarrollada entre individuos de Nueva Guinea que practicaban el canibalismo en rituales,¹² esta enfermedad declinó después de que estos rituales dejaron de practicarse.⁹ También se encuentran las causadas por intervenciones quirúrgicas que incluían material contaminado con

priones, por ejemplo, en trasplantes de corneas y glándula pituitaria. Por último, casos atípicos reportados en adolescentes y adultos jóvenes en los años 90's, fueron relacionados con el contagio a partir del consumo de carne contaminada con la encefalopatía espongiforme bovina.⁹

Tabla 4.1. Enfermedades de la prion.⁹

Enfermedad	Mecanismo de patogénesis
<i>Enfermedades en humanos</i>	
Kuru	Infección a través del ritual de canibalismo.
Creutzfeldt-Jakob iatrogénica	Infección por tejidos contaminados con prion.
Variante de Creutzfeldt-Jakob	Infección a partir de prion bovina.
Creutzfeldt-Jakob familiar	Mutación en la PrP (E200K).
Gerstmann-Straussler-Scheinker	Mutación en la PrP (P102L).
Insomnio fatal familiar	Mutación en la PrP (D178N, M129).
Creutzfeldt-Jakob esporádica	¿Espontanea conversión de PrP ^C a PrP ^{Sc} ?
<i>Enfermedades en animales</i>	
Scrapie (Ovejas)	Infección en ovejas genéticamente susceptibles.
Encefalopatías espongiformes bovinas (Ganado)	Infección por alimento contaminado de prion, hecho de carne y huesos.

Independientemente de la etiología, las enfermedades de la prion se identifican por la deposición de placas parecidas a las amiloides, formadas por PrP^{Sc}, pérdida de neuronas por apoptosis, proliferación de astrocitos y microglía, así como la presencia de grandes vacuolas en el tejido cerebral, lo que le da apariencia de una esponja, debido a lo cual estas enfermedades también son conocidas como encefalopatías espongiformes transmisibles (*TSEs*, por sus siglas en Inglés).¹³

4.1.2. Proteína prion (PrP).

La proteína prion fue identificada por primera vez en la búsqueda del agente infeccioso de las *TSEs* en la década de los 80's.¹ En esa búsqueda se identificó que el agente infeccioso scrapie es una proteína que se acumula en el cerebro en forma fibrilar. Después de ser tratado con proteinasa K la mínima unidad del agente infeccioso presentó una masa de 27-30 kDa y fue llamado PrP^{Sc}.⁵ La secuenciación de la fracción de 27-30 kDa permitió la identificación del gen celular Prnp que codifica para esa proteína. También se identificó que este gen se encuentra en la misma cantidad tanto en cerebros afectados como en los sanos.¹⁴ La proteína que se encuentra en los tejidos sanos fue identificada como PrP^C y su secuencia fue obtenida en 1986.¹⁵ En estos estudios también se identificó que el gen de la proteína prion se encuentra en mayor cantidad en el cerebro, a comparación de otros tejidos, y que tanto la PrP^C como la PrP^{Sc} contienen la misma secuencia; por lo tanto, se propuso que la PrP^{Sc} y la PrP^C son isoformas de la misma proteína con diferente conformación.^{3-5, 16}

Numerosos estudios han sido realizados para identificar las propiedades de la PrP^{Sc}, así como su mecanismo de propagación.^{4, 17-20} Las características de la PrP^C y PrP^{Sc} difieren mucho, por ejemplo, la PrP^C es degradada por la digestión con proteinasa K, mientras que en la PrP^{Sc} sólo se remueven los primeros 67 aminoácidos del N-terminal para formar el fragmento resistente de 27-30 kDa. Por otro lado, la PrP^C se solubiliza en presencia de detergentes, mientras que la isoforma PrP^{Sc}, polimeriza en fibras tipo amiloide.⁵

Estudios sobre la isoforma celular de la proteína prion, han establecido que la PrP^C (Figura 4.1) es una glicoproteína de ~ 250 aminoácidos que se expresa predominantemente en el sistema nervioso central y se encuentra anclada a las membranas de las neuronas por medio de un grupo glicosilfosfatidilinositol (*GPI*, por sus siglas en Inglés).^{3, 21} Su estructura fue determinada en los años 90's mediante resonancia magnética nuclear (*NMR*, por sus siglas en Inglés).²²⁻²⁴ Ésta contiene dos regiones (N-terminal y C-terminal) que se distinguen claramente: la región del C-terminal es estructurada y la región del N-terminal no tiene una estructura secundaria definida.

Después de un proceso proteolítico en el N- y C-terminal la PrP^C humana consiste de 209 aminoácidos, que incluye los residuos 23-231.³ La región estructurada del C-terminal contiene tres α -hélices localizadas en los residuos 144-154, 173-194 y 200-228. También están presentes dos pequeñas hoja- β antiparalelas en los residuos 128-131 y 161-164. Por otra parte, en la región N-

terminal de la proteína (residuos 23-126), se encuentran cuatro repeticiones de un octapéptido con secuencia PHGGGWGQ, que es conocido como la región *octarepeat* (OR), (residuos 60-91) y se encuentra altamente conservada en mamíferos. La región 92-126, conocida como región *non octarepeat*, es de particular interés, ya que el fragmento 106-126 posee propiedades similares a la PrP^{Sc}, la secuencia de esta región es altamente conservada entre las diferentes especies y se ha sugerido como uno de los dominios claves para la conversión de la PrP^C a la PrP^{Sc}. Este fragmento es capaz de generar fibras, es neurotóxico en cultivos celulares *in vitro*²⁵ y en la retina *in vivo*,²⁶⁻²⁷ además de presentar resistencia a las proteasas.²⁸

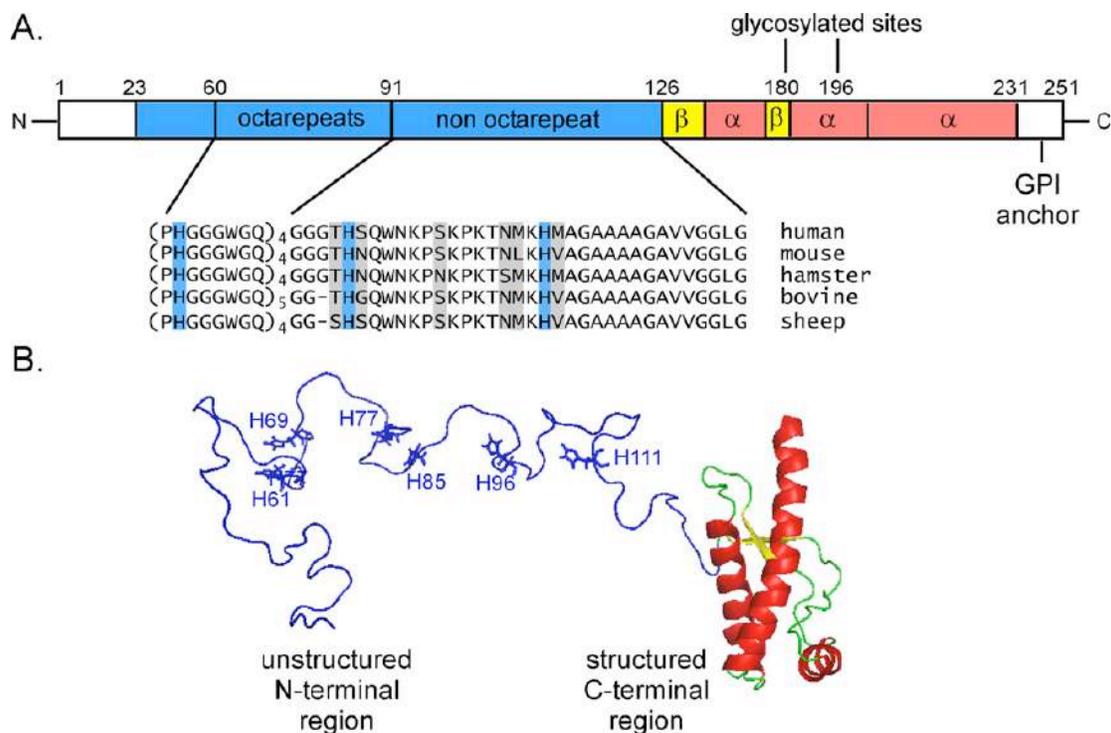


Figura 4.1. A. Representación esquemática de la PrP^C, mostrando un alineamiento de secuencias de diversas especies en la región *octarepeat* y *non octarepeat*. B. Modelo de la proteína PrP^C. Figura tomada de la referencia 29, Copyright 2013. Reproducida con permiso de Elsevier.

A la fecha se ha hecho un importante esfuerzo para identificar cual es la función de la proteína PrP^C. Diversos estudios se han realizado y existen varias propuestas acerca de la función fisiológica de la proteína.³⁰⁻³³ El hecho de que la PrP^C sea expresada en más altos niveles en neuronas que en otros tipos de células, sugiere que esta proteína tiene especial importancia para la actividad que se lleva a cabo en las neuronas.

La localización de la PrP^C en la superficie externa de las neuronas y la regulación de su expresión, sugieren un rol en reconocimiento celular o adhesión celular. Esta hipótesis es soportada por estudios en neuroblastos, los cuales muestran un aumento importante en los niveles de expresión de la PrP^C cuando están en las condiciones de diferenciación a neuronas.^{5, 34} Así mismo, diversos estudios señalan que la PrP^C juega un papel importante en la transducción de señales,³⁵ o en funciones alostéricas, implicadas en procesos de señalización.³⁶⁻³⁷

También se ha propuesto que puede tener un rol en la regulación de la apoptosis neuronal, inhibiendo la muerte celular inducida por la proteína pro-apoptótica Bax. En ese mismo estudio, se identificó que el efecto neuroprotector se inhibe parcial o totalmente si no esta presente la región *OR*, o con las mutaciones D178N y T183A, asociadas a enfermedades familiares.³⁸ Aunado a esto, la función neuroprotectora también se ha relacionado con las defensas antioxidantes celulares, ya que en la ausencia de PrP^C se observa un incremento en la oxidación de lípidos y proteínas y se reduce la actividad superóxido dismutada (SOD) en la célula.^{31, 39}

Por otro lado, estudios en extractos de cerebro de ratones que no contienen el gen que codifica para la expresión de la PrP^C, muestran una reducción de hasta 10 veces el contenido de Cu en membranas, sinaptosomas y endosomas, mientras que la cantidad de Zn o Fe no se ve alterada. Esto ha sugerido que la PrP^C puede existir como una Cu-metaloproteína *in vivo*,⁴⁰ encargada de captar Cu del medio extracelular y ayudar en la regulación de la distribución del metal en la célula o en compartimentos intracelulares. Esto también puede explicar por que, en ausencia de la PrP^C se reduce la actividad SOD.⁴¹ Más aún, se propuso que la misma PrP^C al coordinar Cu, podía funcionar como SOD.⁴²⁻⁴³

El ión Cu, si se encuentra libre, puede catalizar la generación de especies reactivas de oxígeno (*ROS*, por sus siglas en Inglés), por lo tanto, si la PrP^C funciona como una Cu-metaloproteína, al quelar al ión Cu, contribuiría a la protección de células que son sensibles al daño oxidativo. De hecho se ha identificado que la expresión de la PrP^C proporciona resistencia a la toxicidad de Cu y estrés oxidativo en la célula.^{32, 41}

También se ha propuesto que la PrP^C, no solo coordina iones Cu, sino que también desempeña una función en el metabolismo del ión metálico, ya que en presencia de Cu, se estimula la endocitosis reversible de la PrP^C. Esta captación y distribución del Cu que lleva a cabo la PrP^C se ha propuesto que es importante en la homeostasis del metal.^{37, 44-45}

4.1.3. Coordinación de cobre a la proteína prion humana.

A partir de que se identificó la capacidad de la proteína PrP^C para coordinar Cu *in vivo*, y diferentes estudios demostraron que esta coordinación puede formar parte de su función fisiológica, el estudio de la unión de Cu a la proteína PrP^C generó gran interés. En los últimos 15 años la coordinación de Cu(II) a la proteína PrP ha sido ampliamente estudiada. Actualmente sabemos que la proteína PrP humana coordina hasta seis iones de Cu(II) en la región del N-terminal, cuyos sitios de anclaje son los residuos de histidina en las posiciones 61, 69, 77, 85, 96 y 111, véase Figura 4.1.⁴⁶⁻⁴⁷

En la región OR, es decir, el fragmento 60-91, el modo de coordinación de Cu(II) es altamente dependiente de la concentración del metal y del pH. Usando una combinación de técnicas y métodos como, resonancia paramagnética electrónica (*EPR*, por sus siglas en Inglés) banda X y banda S, *electron spin echo envelope modulation (ESEEM*, por sus siglas en Inglés), cristalografía de rayos X y diseño de péptidos, se demostró que a bajas concentraciones del metal la coordinación de Cu(II) es a través de múltiples residuos de His; este modo de coordinación fue llamado Componente 3 o Cu(II)-OR (Figura 4.2).⁴⁸ Por otro lado, cuando la concentración del metal aumenta, se favorece un intermediario con un menor contenido de residuos de His en la esfera de coordinación. Por último, a mayor concentración del ión metálico, cada octapéptido puede coordinar un ión de Cu(II) con un modo de coordinación ecuatorial 3N1O, el cual es identificado como Componente 1 o Cu(II)₄-OR, Figura 4.2.⁴⁷⁻⁵⁰ En este último, el sitio de enlace involucra los residuos HGGGW, y el ión metálico es anclado por medio del nitrógeno imidazol de la cadena lateral de la His, mientras que la esfera de coordinación es completada por dos amidas desprotonadas y un oxígeno del grupo carbonilo de la cadena peptídica, provenientes de los residuos de Gly que siguen a la His en la secuencia (Figura 4.2).

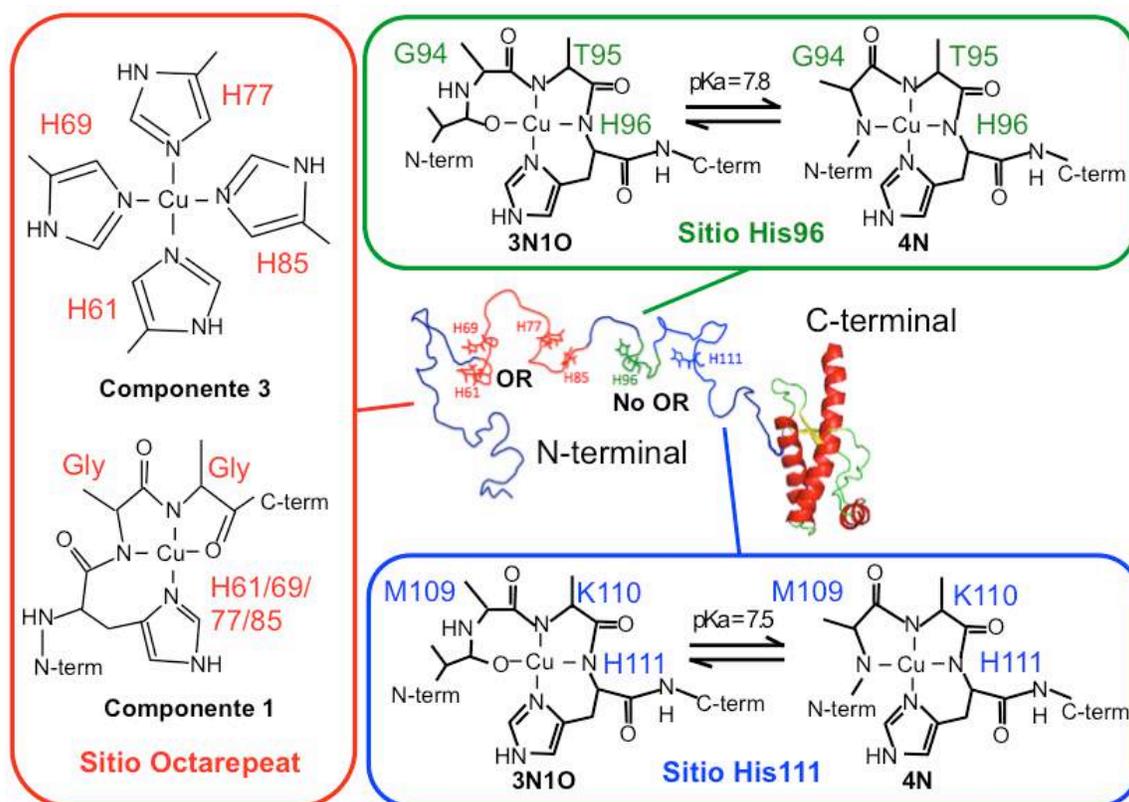


Figura 4.2. Modos de coordinación de Cu(II) en los diferentes sitios de His de la proteína PrP. El cuadro rojo contiene los modos de coordinación propuestos para la región OR, el cuadro verde aquellos para el sitio de la His96 y en azul se describe el sitio de la His111. Datos recopilados de las referencias 49, 51-52.

En la región conocida como *non octarepeat* se encuentran otros dos residuos de His en las posiciones 96 y 111 que también coordinan Cu(II). En el sitio de la His96, estudios experimentales y teóricos demostraron que el Cu(II) se enlaza al fragmento 92-96 (secuencia GGGTH) involucrando el nitrógeno imidazol de la His96 y amidas desprotonadas de la cadena peptídica que preceden a la His. Este sitio de coordinación es altamente dependiente del pH y puede adoptar los modos de coordinación 3N1O y 4N. El modo 4N contiene, además del nitrógeno imidazol de la His96, tres amidas desprotonadas provenientes de la misma histidina, Thr95 y Gly94. En la forma protonada del complejo (modo 3N1O), la amida de la Gly94 es remplazada por un ligando oxígeno. Experimentos de EPR usando agua enriquecida con ^{17}O , en combinación con cálculos de estructura electrónica, demostraron que el ligando oxígeno no proviene de una molécula de agua, sino que proviene de la misma cadena peptídica.⁵³ Las

especies 3N1O y 4N presentan un pKa de 7.7, por lo tanto, ambas especies pueden coexistir a pH fisiológico.^{47, 51, 54} (Figura 4.2)

Respecto a la coordinación de Cu(II) en el sitio de la His111, (secuencia KTNMKHM) se han realizado numerosos estudios. Usando calorimetría, potenciometría, absorción electrónica, dicroísmo circular (*CD*, por sus siglas en Inglés), *EPR* y *NMR* se llegó al consenso de que el Cu(II) está coordinado por el nitrógeno imidazol de la His111 y las amidas desprotonadas de la misma histidina y la Lys110. Sin embargo, la naturaleza del cuarto ligando ecuatorial y la posibilidad de que los grupos tioéter de las cadenas laterales de la Met109 y Met112 pudieran participar como ligando ecuatorial o axial fueron temas ampliamente discutidos.^{47, 55-58}

Un estudio teórico-experimental, demostró que existen dos estados de protonación del complejo de Cu(II) coordinado a la His111 en el fragmento 106-115. Estos dos modos de coordinación se encuentran en equilibrio con un pKa de 7.5, e involucran la desprotonación de la amida de la Met109 para pasar de un modo de coordinación 3N1O a pH bajo, a un modo de coordinación 4N a un pH mayor (Figura 4.2). También, haciendo uso de péptidos sintéticos en los que se remplazaba la Met109 y Met112 se evaluó la participación de los grupos tioéter en la coordinación del Cu(II). Se determinó que las metioninas no participan como ligandos ecuatoriales y que existe la posibilidad de que la Met109 pudiera participar como ligando axial en el complejo 3N1O.⁵²

Para cada sitio de coordinación de Cu(II) en la proteína PrP se han medido varias constantes de disociación. Para el Componente 3 de la región OR, se han reportado valores de K_d en un rango que va de 0.1 a 20 nM,⁵⁹⁻⁶¹ similarmente, en los sitios de la His96 y la His111 se han medido K_d 's en un rango de 20 a 100 nM.^{49, 60, 62} Finalmente el Componente 1 en la región OR, ha sido propuesto como el sitio de menor afinidad con valores de K_d reportados de 100 nM hasta 12 μ M.^{40, 59-60, 63} De acuerdo a estos valores, a baja concentración de Cu(II) (nM), la PrP^C puede coordinar hasta tres iones Cu(II), mientras que a altas concentraciones del metal (μ M) puede coordinar hasta seis iones de Cu(II).

Varios reportes han sugerido que el Cu coordinado a la PrP puede llevar a cabo reacciones redox,^{42, 64-69} por lo tanto la PrP puede tener la capacidad de coordinar también Cu(I).

Mientras que la coordinación de Cu(II) en la PrP ha sido ampliamente descrita, estudios de la coordinación de Cu(I) y su naturaleza son limitados.⁶⁹⁻⁷¹ A diferencia de otros sitios, el sitio de la His111 contiene dos residuos de metioninas adyacentes en las posiciones 109 y 112. Los grupos

tioéter de estas metioninas pueden actuar como buenos ligandos en la coordinación de Cu(I) y promover una reactividad redox interesante en este sitio. De hecho, estudios de absorción de rayos X (*Extended X-ray absorption fine structure, EXAFS*) han demostrado interacciones Cu(I)-S en complejos con los fragmentos PrP(106-114) y PrP(106-126) a pH 7.4.⁶⁹ Sin embargo, a este pH, los espectros de *EXAFS* pueden tener contribuciones de diferentes estados de protonación del complejo. Se sabe que a pH 7.4 hay una mezcla de las especies Cu(II)-3N1O y Cu(II)-4N, pero no se sabe si cuando estas especies se reducen conducen a un mismo complejo de coordinación con Cu(I) o a una mezcla de especies. Esta situación puede hacer que la asignación del modo de coordinación con Cu(I) sea ambigua.

A lo largo de este capítulo, se describirá el estudio de los modos de coordinación involucrados en el enlace de Cu(I) al fragmento 106-115 de la proteína PrP humana, empleando diferentes técnicas espectroscópicas (*XAS* y *NMR*) en combinación con cálculos de estructura electrónica. También se explican las propiedades de coordinación del Cu a este fragmento por medio de un estudio seguido a diferentes valores de pH, esto último permitió la identificación de especies de Cu(I) que pueden ser fisiológicamente relevantes. El uso de péptidos sintéticos para estudiar la coordinación de Cu a la proteína PrP ha sido una herramienta ampliamente usada, ya que los sitios de coordinación de Cu en el N-terminal de la proteína se encuentran en la región no estructurada. Por tanto, los fragmentos sintéticos reproducen y modelan los complejos de Cu formados en la proteína completa. En este trabajo, se ha utilizado el fragmento 106-115 (con secuencia KTNMKHMAGA) de la proteína prion humana para estudiar las propiedades de coordinación de Cu(II) y Cu(I) en el sitio de la His111.

4.2. Resultados.

4.2.1. Espectroscopía de absorción de rayos X del complejo Cu(II)-PrP(106-115) a pH 6.5 y 8.5.

Se sintetizaron el péptido KTNMKHMAGA (PrP(106-115)) y sus variantes KTNAKHMAGA (PrP(106-115)M109A), KTNMKHAAGA (PrP(106-115)M112A) y KTNAKHAAGA (PrP(106-115)M109&M112A), (ver sección 10, Materiales y Métodos), en los que las metioninas 109 y 112 fueron remplazadas por residuos de alanina. Esto permitió estudiar el rol que las metioninas desempeñan en la coordinación del metal.

La Figura 4.3 muestra la caracterización de los complejos de Cu(II) con los péptidos PrP(106-115) y sus variantes de Met-Ala por medio de absorción electrónica en la región UV-Vis y CD. Las señales que se obtuvieron a pH 6.5 y 8.5 son las características de los modos de coordinación 3N1O y 4N, respectivamente, y reproducen a las descritas previamente para este complejo.⁵²

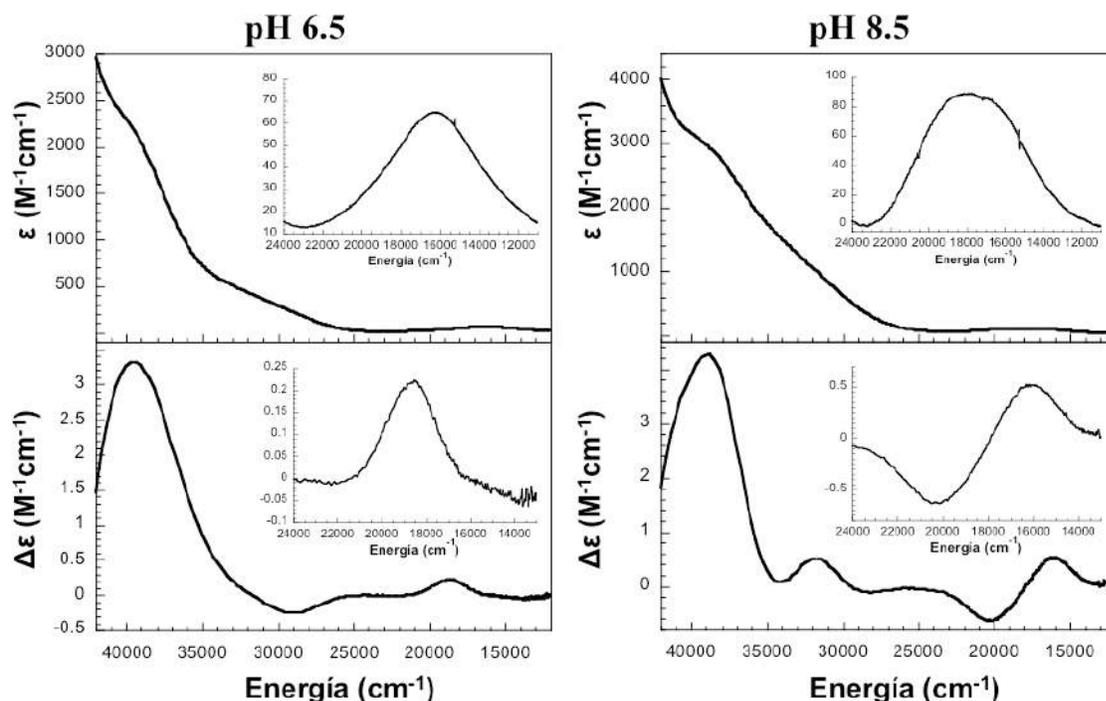


Figura 4.3. Espectros característicos de absorción electrónica en la región UV-Vis y CD de los complejos Cu(II)-PrP(106-115) y sus variantes Met-Ala a pH 6.5 y 8.5.

A continuación, estos complejos fueron analizados usando absorción de rayos X (XAS, por sus siglas en Inglés). Esta técnica es específica para cada elemento, cada “edge” o la primera señal

intensa del espectro, resulta de la absorción de energía, igual o mayor a la energía de enlace del electrón, para llevar a cabo una transición electrónica que sea permitida por dipolo eléctrico (transición $s \rightarrow p$). El *edge* se nombra de acuerdo a la capa electrónica donde es originada la transición. La Figura 4.4 muestra de forma representativa las transiciones que originan los *K-* y *L-edges*, así como los valores de energía necesaria para estas transiciones en los átomos de Cu y Fe. De esta forma, Cu *K-edge* significa que se provee suficiente energía al sistema (~ 9000 eV, en el caso de Cu) para inducir una transición electrónica de la capa K (1s) al orbital de valencia (4p).

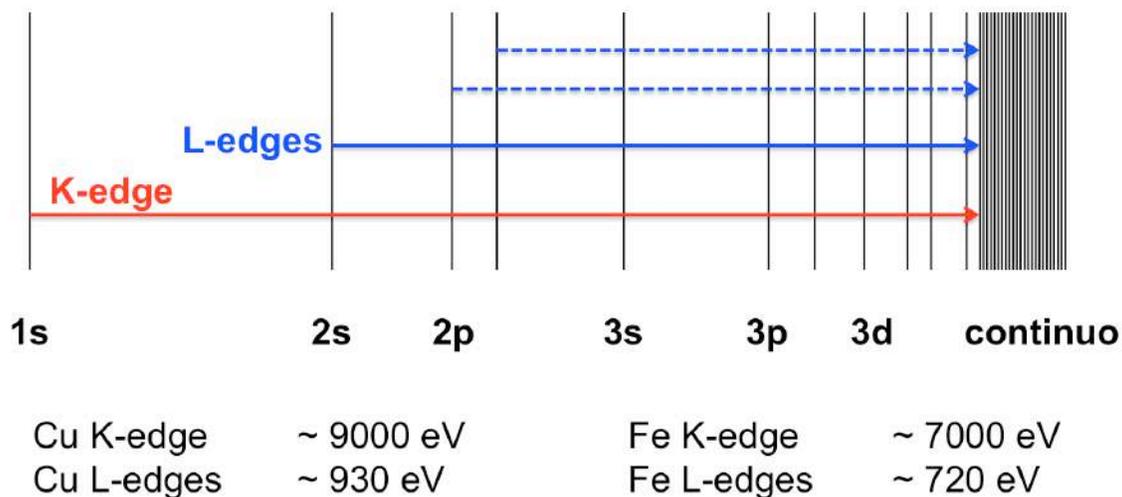


Figura 4.4. Representación esquemática de los *K-* y *L-edges*, así como sus valores para los átomos de Cu y Fe.

La Figura 4.5 muestra los espectros característicos de *XAS*. El *edge* puede observarse y analizarse en la región del espectro llamada *XANES* (*X-ray absorption near edge spectroscopy*). Por otro lado, la región del espectro llamada *EXAFS* (*Extended X-ray absorption fine structure*) es generada por la dispersión múltiple del electrón que sale de la capa de valencia del átomo, (orbital 4p, en el caso del Cu), e interactúa con átomos vecinos (los que se encuentren más cerca). Finalmente la transformada de Fourier del espectro *EXAFS*, nos permite observar la distribución radial de los átomos.⁷² A partir de estos espectros podemos obtener información de la coordinación alrededor de un ión metálico en particular.

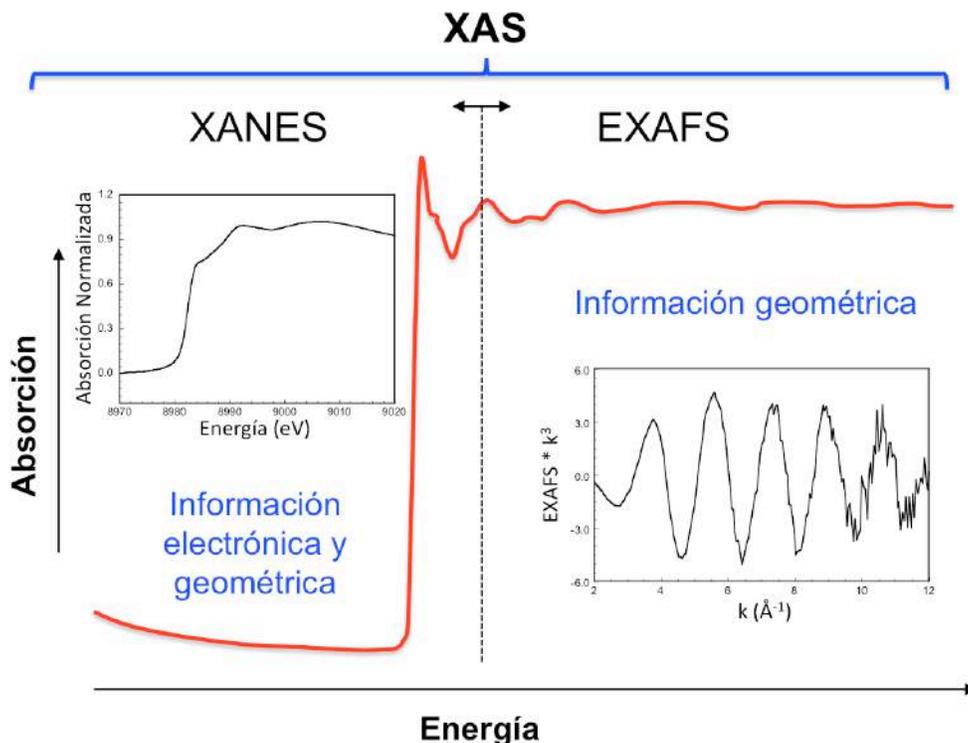


Figura 4.5. Representación del espectro de *XAS* y de las regiones *XANES* y *EXAFS* que lo conforman, así como sus espectros característicos. A partir de estos espectros se puede obtener información electrónica y geométrica de la coordinación alrededor de un ión metálico.

La Figura 4.6 muestra el espectro *Cu K-edge* de los complejos *Cu(II)-PrP(106-115)* (negro), *Cu(II)-PrP(106-115)M109A* (verde), *Cu(II)-PrP(106-115)M112A* (rojo) y *Cu(II)-PrP(106-115)M109&M112A* (azul) a pH 6.5 y 8.5. La señal extremadamente débil a 8979 eV en los espectros *XANES* es asociada a la transición electrónica $1s \rightarrow 3d$ que ocurre en el ion *Cu(II)* con configuración d^9 , esta señal aunque es prohibida por las reglas de selección, puede observarse debido a la mezcla de orbitales 3d y 4p, que la hacen permitida.

Como se puede observar en la Figura 4.6, los espectros lucen muy similares entre si, esto es, no se ven afectados al remplazar la Met109 y Met112 por Ala. Por lo tanto podemos concluir, que a ambos valores de pH, los grupos tioéter de las cadenas laterales de los residuos de Met no están involucrados en la coordinación de *Cu(II)*.

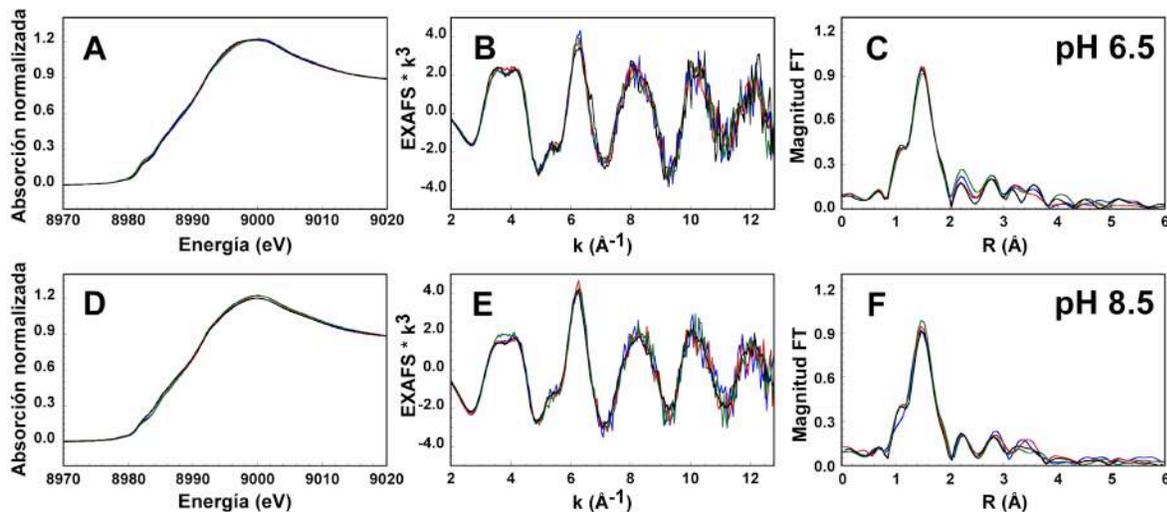


Figura 4.6. Espectros *XANES* (A y D), *EXAFS* (B y E) y transformada de Fourier del *EXAFS* (C y F) de los complejos Cu(II)-PrP(106-115) (línea negra), Cu(II)-PrP(106-115)M109A (línea verde), Cu(II)-PrP(106-115)M112A (línea roja) y Cu(II)-PrP(106-115)M109&M112A (línea azul). pH 6.5 (A-C) y 8.5 (D-F).

La forma del espectro *XANES*, depende del estado de oxidación del metal, del número de coordinación (con un error de $\pm 25\%$), de la covalencia del sitio y de la simetría del sistema, así, a partir del espectro *XANES* podemos obtener información estructural. Por otra parte, el espectro *EXAFS* es realmente el promedio de ondas senoidales producidas por la múltiple dispersión que lleva a cabo el electrón al chocar con átomos que se encuentren en la vecindad. A partir del espectro *EXAFS* es posible obtener información de distancias de enlace (con un error de ± 0.02 Å), número de coordinación y tipos de ligandos (dentro de $z = \pm 1$), todo esto, dentro de los primeros 6 Å que rodean al metal bajo estudio. Para obtener la información geométrica, es necesario obtener el ajuste del espectro y para ello se necesita hacer la deconvolución de la señal del espectro *EXAFS* en el total de sus componentes.

La Figura 4.7 muestra un ejemplo del ajuste de los espectros *EXAFS* de los complejos Cu(II) con el péptido PrP(106-115) y sus variantes Met-Ala. Los parámetros obtenidos para los mejores ajustes están listados en la Tabla 4.2. Como se puede observar, los complejos de Cu(II) con el péptido PrP(106-115) y sus variantes Met-Ala corresponden a complejos tetracoordinados, que contienen en su esfera de coordinación nitrógenos u oxígenos, con distancias Cu-ligando entre 1.96 y 1.98 Å (Tabla 4.2). Estos resultados están en acuerdo con lo previamente reportado

(Figura 4.2, sitio de His111, referencia 52). Debido a que el *EXAFS* no distingue diferencias entre átomos con número atómico $z = \pm 1$, no es posible hacer una distinción entre átomos como el nitrógeno y el oxígeno, por eso no se ve reflejado el efecto del pH. Sin embargo, la diferencia entre los modos 3N1O y 4N son claramente observadas por *CD* (Figura 4.3).

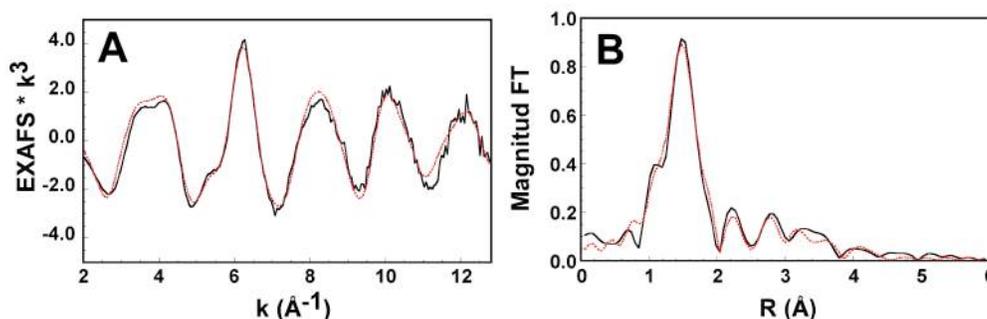


Figura 4.7. Espectro *EXAFS* representativo (A) y su transformada de Fourier (B) (línea negra) de Cu(II)-PrP(106-115) a pH 6.5, el ajuste de los datos es mostrado con la línea roja punteada.

Tabla 4.2. Ajuste de los espectros de *EXAFS* de los complejos Cu(II)-PrP(106-115) y sus variantes Met-Ala a pH 6.5 y 8.5.

Cu(II)-Complejo	Coord.	Distancias (Å)	
		pH 6.5	pH 8.5
Cu(II)-PrP(106-115)	4 Cu-O/N	1.96	1.97
Cu(II)-PrP(106-115)M109A	4 Cu-O/N	1.96	1.96
Cu(II)-PrP(106-115)M112A	4 Cu-O/N	1.97	1.98
Cu(II)-PrP(106-115)M109&M112A	4 Cu-O/N	1.97	1.96

En resumen, el complejo Cu(II)-PrP(106-115) corresponde a un complejo tetracoordinado, en el cual no participan los azufres de la Met109 y Met112 como ligandos axiales, y la coordinación del metal esta dada únicamente por ligantes de nitrógeno y oxígeno.

4.2.2. Validación teórica de los modelos 3N1O y 4N en la coordinación de Cu(II) al sitio de la His111.

Para comprobar que los modelos teóricos Cu(II)-3N1O y Cu(II)-4N pueden describir la coordinación del complejo Cu(II)-PrP(106-115) a pH 6.5 y 8.5, los modelos 3N1O y 4N, previamente reportados⁵² fueron reoptimizados (ver sección 10, Materiales y Métodos) y utilizados para simular el espectro de *EXAFS* del complejo Cu(II)-PrP(106-115) a pH 6.5 y 8.5. El promedio de las distancias de enlace en los modelos 3N1O y 4N es 1.99 y 1.96 Å, respectivamente. Estas distancias de enlace se encuentran en un buen acuerdo con las obtenidas experimentalmente (Tabla 4.2).

La Figura 4.8 muestra los modelos teóricos (C y F) usados para simular el espectro *EXAFS* (línea negra) a ambos valores de pH. Aunque los modelos contemplan solo una molécula, sin considerar los efectos del solvente o la interacción con otros complejos, el ajuste hecho a partir de los modelos teóricos (línea roja punteada) muestra un buen acuerdo con los datos experimentales, validando los modelos 3N1O y 4N propuestos para la coordinación de Cu(II) en el sitio de la His111.

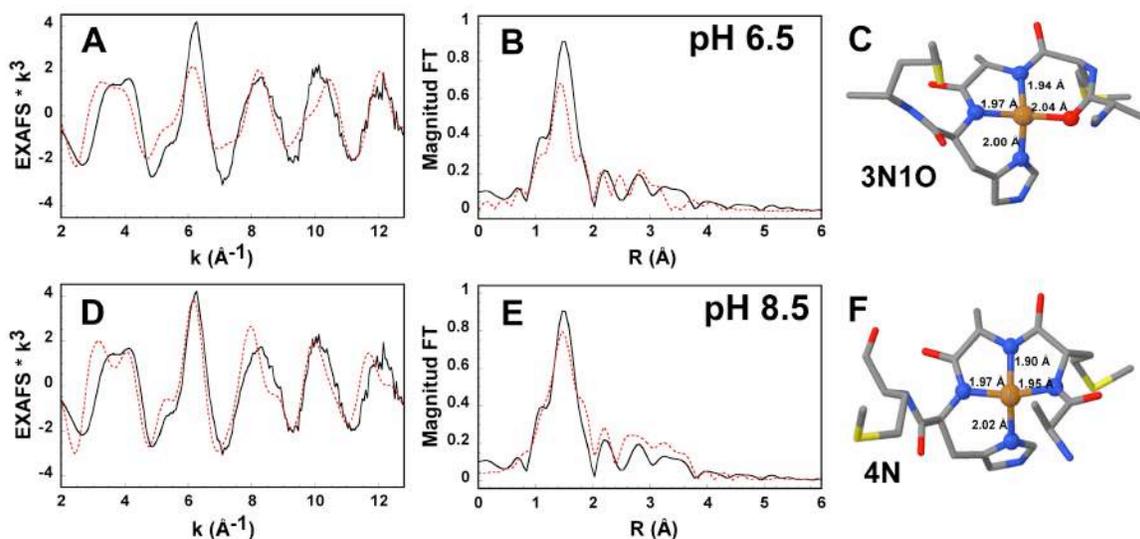


Figura 4.8. Datos de *EXAFS* y su transformada de Fourier de los complejos Cu(II)-PrP(106-115) a pH 6.5 (A y B) y 8.5 (D y E) (línea negra) y sus simulaciones (línea roja punteada) usando las estructuras reoptimizadas Cu(II)-3N1O (C) y Cu(II)-4N (F).

4.2.3. Espectroscopía de absorción de rayos X del complejo Cu(I)-PrP(106-115) a pH 6.5 y 8.5.

Una vez determinado el rol de las metioninas en la coordinación de Cu(II) en el sitio de la His111, se realizó el estudio por medio de *XAS* de la coordinación de Cu(I) al fragmento PrP(106-115) a pH 6.5 y 8.5. Para identificar el rol de la Met109 y Met112 en la coordinación de Cu(I), también se utilizaron los péptidos que contienen las variantes de Met-Ala. Los compuestos de Cu(I) fueron preparados a partir de la reducción de los compuestos de Cu(II) con ascorbato de sodio, en condiciones anaeróbicas; el porcentaje de reducción de los complejos de Cu(II) fue determinado por *EPR*. La Figura 4.9 muestra los espectros de los complejos Cu(II)-péptido (líneas sólidas) y de los complejos reducidos con ascorbato (líneas punteadas). Como se puede observar, los complejos de Cu(II) fueron reducidos completamente; de hecho, la cuantificación de espín de los espectros de *EPR* de los complejos reducidos indican una reducción $\geq 97\%$.

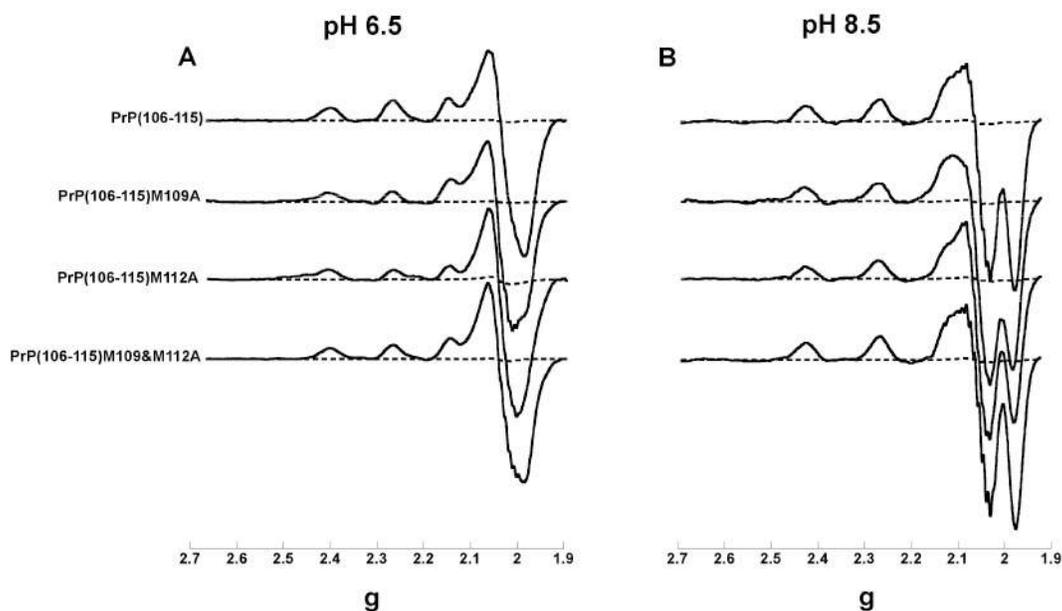
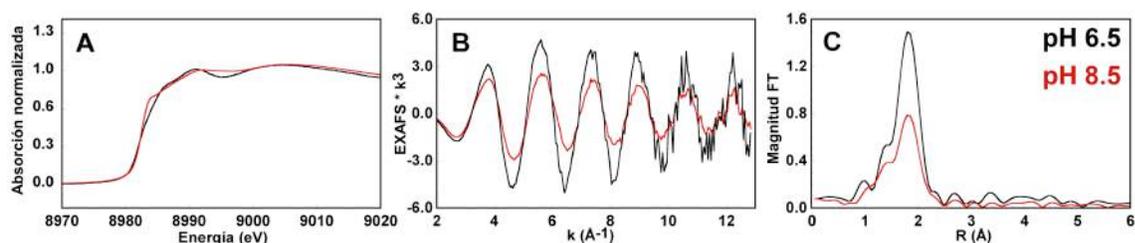


Figura 4.9. Espectros de *EPR* de los complejos Cu(II)-péptido (líneas sólidas) y después de adicionar 100 Eq de ascorbato en condiciones anaeróbicas (líneas punteadas) a pH 6.5 (A) y 8.5 (B). La cuantificación de espín muestra menos del 3 % de Cu(II) en los complejos reducidos.

Los complejos reducidos fueron analizados por *XAS*. La Figura 4.10 muestra los espectros de Cu *K-edge*, *XANES*, *EXAFS* y la transformada de Fourier del *EXAFS* de los complejos Cu(I)-péptido a pH 6.5 y pH 8.5.

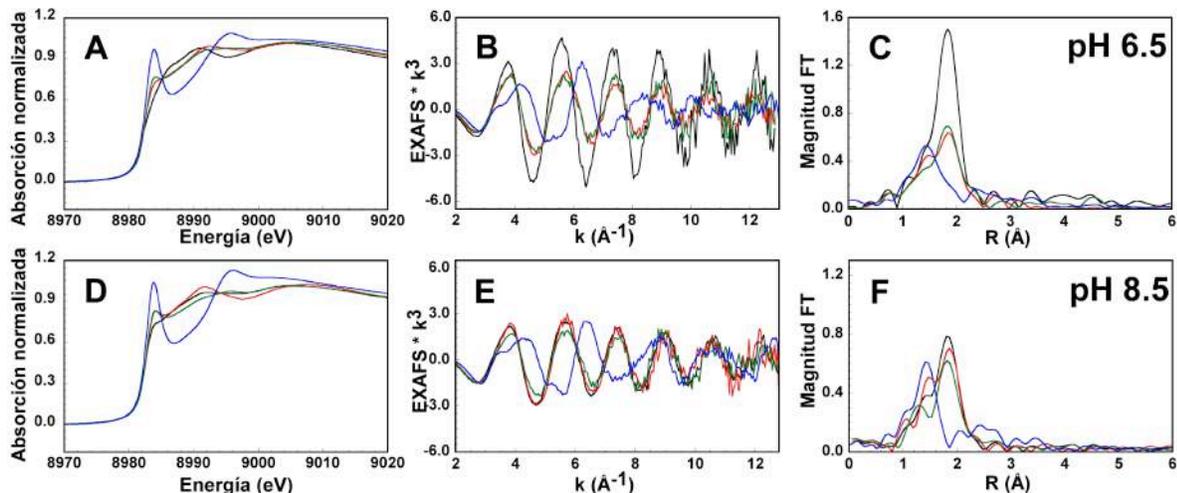
Los espectros *XANES* (Figura 4.10, A) muestran una intensa señal a 8984 eV, asociada con la transición electrónica $1s \rightarrow 4p$, característica de los complejos de Cu(I) y permitida por dipolo eléctrico.⁷³ También, de la misma figura, se puede observar que el espectro del complejo Cu(I)-PrP(106-115) presenta grandes cambios en función del pH. A pH 6.5 el espectro de *EXAFS* (línea negra) exhibe una intensidad mayor en comparación con el espectro a pH 8.5 (línea roja). Asimismo, a diferencia de los complejos con Cu(II), los espectros de los complejos Cu(I)-péptido muestran cambios drásticos cuando las metioninas son remplazadas por alaninas (Figura 4.11). Estos resultados indican claramente que la coordinación de Cu(I) al sitio de la His111 es dependiente del pH y de la presencia de los residuos de metionina.



Figur

a 4.10. Espectros *XANES* (A), *EXAFS* (B) y transformada de Fourier del *EXAFS* (C) del complejo Cu(I)-PrP(106-115) a pH 6.5 (línea negra) y pH 8.5 (línea roja).

Los espectros *XANES* a ambos valores de pH mostrados en la Figura 4.11 (A y D) de los complejos Cu(I)-PrP(106-115) (línea negra) y las variantes M109A y M112A (líneas roja y verde) muestran la señal característica de complejos tetracoordinados, mientras que el complejo Cu(I)-PrP(106-115)M109&M112A (línea azul), muestra un espectro con la forma característica de los complejos de Cu(I) bicoordinados. Por otro lado, a pH 6.5 los espectros *EXAFS* cambian considerablemente cuando los residuos de metionina son remplazados por alanina (Figura 4.11, B). Esto sugiere que a pH 6.5 ambas metioninas están involucradas en la coordinación de Cu(I). De la misma forma, la intensidad en la transformada de Fourier a pH 6.5 (Figura 4.11 C) se ve drásticamente reducida en los complejos que contienen las variaciones Met-Ala en comparación al complejo Cu(I)-PrP(106-115). Estos cambios son aún más pronunciados en el péptido sin metioninas (línea azul), y son indicativos de una disminución en la contribución de ligandos basados en azufre en la esfera de coordinación.



Fig

ura 4.11. Espectros *XANES* (A y D), *EXAFS* (B y E) y transformada de Fourier del *EXAFS* (C y F) de los complejos Cu(I)-PrP(106-115) (línea negra), Cu(I)-PrP(106-115)M109A (línea verde), Cu(I)-PrP(106-115)M112A (línea roja) y Cu(I)-PrP(106-115)M109&M112A (línea azul). pH 6.5 (A-C) y 8.5 (D-F).

Al contrario, a pH 8.5 los espectros *EXAFS* del complejo Cu(I)-PrP(106-115) y aquellos con los péptidos M109A y M112A muestran gran similitud (Figura 4.11, E y F, líneas negra, verde y roja). La intensidad similar de los espectros indica que los complejos tienen el mismo contenido de azufre en su esfera de coordinación. Solo el complejo de Cu(I) con el péptido que carece de las dos metioninas (M109&M112A), en el cual no hay la posibilidad de coordinación con azufre, muestra una clara diferencia con el complejo Cu(I)-PrP(106-115). Estos resultados indican que, a diferencia de pH 6.5, a pH 8.5 solo un residuo de Met participa en la coordinación de Cu(I).

Los mejores ajustes de los datos de *EXAFS* del complejo Cu(I)-PrP(106-115) a pH 6.5 y 8.5 se muestran en la Figura 4.12 y sus parámetros están listados en la Tabla 4.3. Los ajustes de los datos experimentales fueron determinados seleccionando el modelo que tiene los valores más bajos para el parámetro F_n (*goodness of fit parameter*) y además cumple con el análisis de la suma del enlace de valencia (*BVS*, por sus siglas en Inglés).⁷⁴⁻⁷⁶ En este análisis el valor del *BVS* debe ser, idealmente, igual al estado de oxidación del metal. (Ver sección 10, Materiales y Métodos).

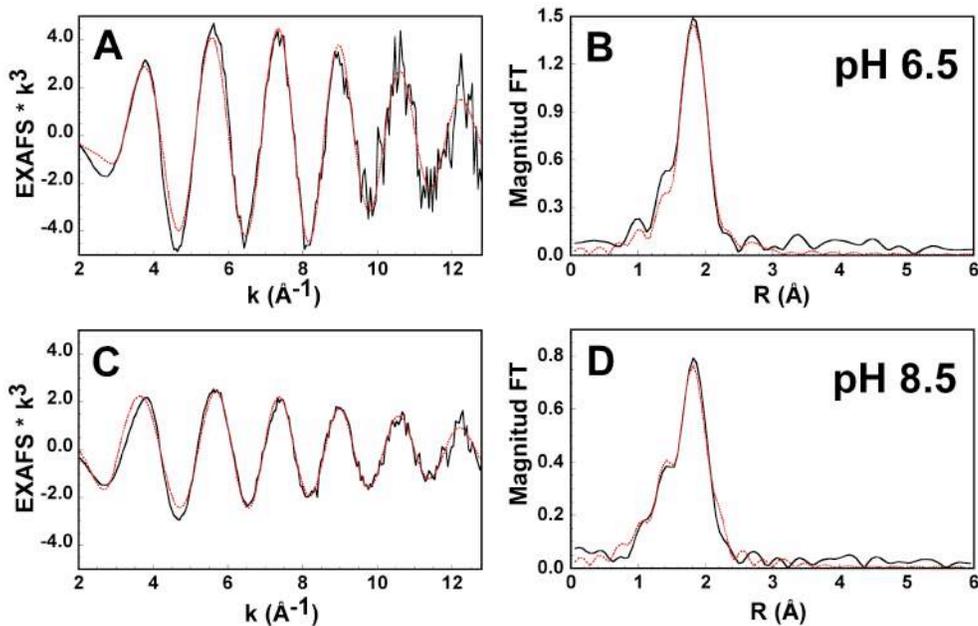


Figura 4.12. Espectros *EXAFS* (A y C) y sus transformadas de Fourier (B y D) del complejo Cu(I)-PrP(106-115) a pH 6.5 (A y B) y 8.5 (C y D). Los datos experimentales están mostrados en líneas negras, mientras que los ajustes en líneas rojas punteadas.

Tabla 4.3. Valores de los ajustes de los espectros *EXAFS* del complejo Cu(I)-PrP(106-115) a pH 6.5 y 8.5.

pH	Coord	Distancia (Å)	F_n	BVS
6.5	2 Cu-O/N	2.17	0.579	0.98
	2 Cu-S	2.37		
8.5	1 Cu-N/O	1.97	0.099	1.10
	2 Cu-N/O	2.15		
	1 Cu-S	2.35		

A pH 6.5, el mejor ajuste es logrado al contemplar en la esfera de coordinación dos átomos de azufre a 2.37 Å y dos ligandos de nitrógeno u oxígeno a 2.17 Å. La naturaleza tetracoordinada del complejo es soportada por el análisis *BVS* cuyo valor es 0.98. Si se considera una especie tricoordinada con dos átomos de azufre a 2.35 Å y un ligando nitrógeno u oxígeno a 2.15 Å, el valor del *BVS* es de solo 0.82.

A pH 8.5, la menor intensidad en la señal del espectro *EXAFS* del complejo Cu(I)-PrP(106-115) (Figura 4.11, E y F) es mejor modelada con un número menor de átomos de azufre, a comparación de pH 6.5. El mejor ajuste de los datos de *EXAFS* involucra solo un ligando de

azufre a 2.35 Å y tres ligandos nitrógenos u oxígenos que exhiben un enlace corto Cu(I)-N/O a 1.97 Å y dos enlaces largos Cu(I)-2N/O a 2.15 Å, (Tabla 4.3). Igualmente, el análisis del BVS está en mejor acuerdo con una estructura tetracoordinada ($BVS = 1.10$) en comparación con un complejo tricoordinado con un enlace Cu(I)-S a 2.35 Å y dos enlaces Cu(I)-2N/O a 2.15 Å, ($BVS = 0.74$).

4.2.4. Resonancia magnética nuclear del complejo Cu(I)-PrP(106-115) a pH 6.5 y 8.5.

Para obtener mayor información acerca de la naturaleza del complejo Cu(I)-PrP(106-115) a pH 6.5 y 8.5 se realizaron experimentos de *NMR* en una (^1H) y dos dimensiones (^1H - ^{13}C , *HSQC*, *heteronuclear single quantum coherence*). Es importante resaltar que todos los experimentos de RMN presentados en esta tesis fueron realizados por Marco Miotto, estudiante de Doctorado en el Laboratorio Max Planck de Biología Estructural, Química y Biofísica Molecular de Rosario, Argentina, bajo la asesoría del Dr. Claudio O. Fernández. Los datos de *NMR* han sido analizados en el contexto de los resultados obtenidos mediante *XAS* y *DFT* que se presentan en esta Tesis, con la finalidad de elucidar la coordinación de Cu(I) al fragmento PrP(106-115); de ahí la importancia de presentarlos aquí.

Los experimentos ^1H - ^{13}C , *HSQC* fueron hechos con el péptido PrP(106-115) en ausencia y presencia de 0.8 Eq de Cu(I) a pH 6.5 y 8.5 (Figuras 4.13 y 4.14). Un análisis detallado de los datos de *HSQC* muestra que a ambos valores de pH las señales $\text{C}\alpha$ - $\text{H}\alpha$ más afectadas corresponden a las señales de His111 y Lys110, mientras que las señales correspondientes a los pares $\text{C}\beta$ - $\text{H}\beta$, $\text{C}\gamma$ - $\text{H}\gamma$, $\text{C}\delta$ - $\text{H}\delta$ y $\text{C}\epsilon$ - $\text{H}\epsilon$ más afectadas se encuentran en los residuos de His111, Met109 y Met112 (Figuras 4.13 y 4.14 A, sección 10, Materiales y Métodos). En general, a partir de estos experimentos podemos decir que el Cu(I) está en la cercanía de la cadena peptídica alrededor de los residuos de His111 y Lys110 y cerca de las cadenas laterales pertenecientes a la Met109, Met112 e His111.

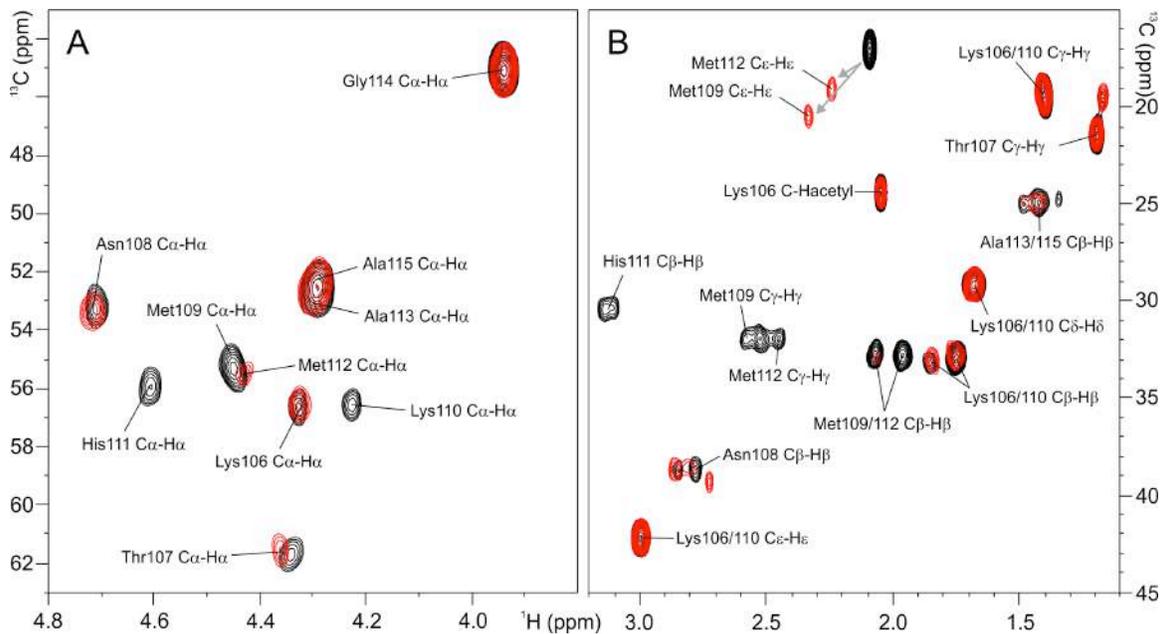


Figura 4.13. Espectro ^1H - ^{13}C HSQC del péptido PrP(106-115) (negro) y del complejo Cu(I)-PrP(106-115) (rojo) a pH 6.5. $\text{C}\alpha$ - $\text{H}\alpha$ (A), $\text{C}\beta$ - $\text{H}\beta$, $\text{C}\gamma$ - $\text{H}\gamma$, $\text{C}\delta$ - $\text{H}\delta$ y $\text{C}\epsilon$ - $\text{H}\epsilon$ (B).

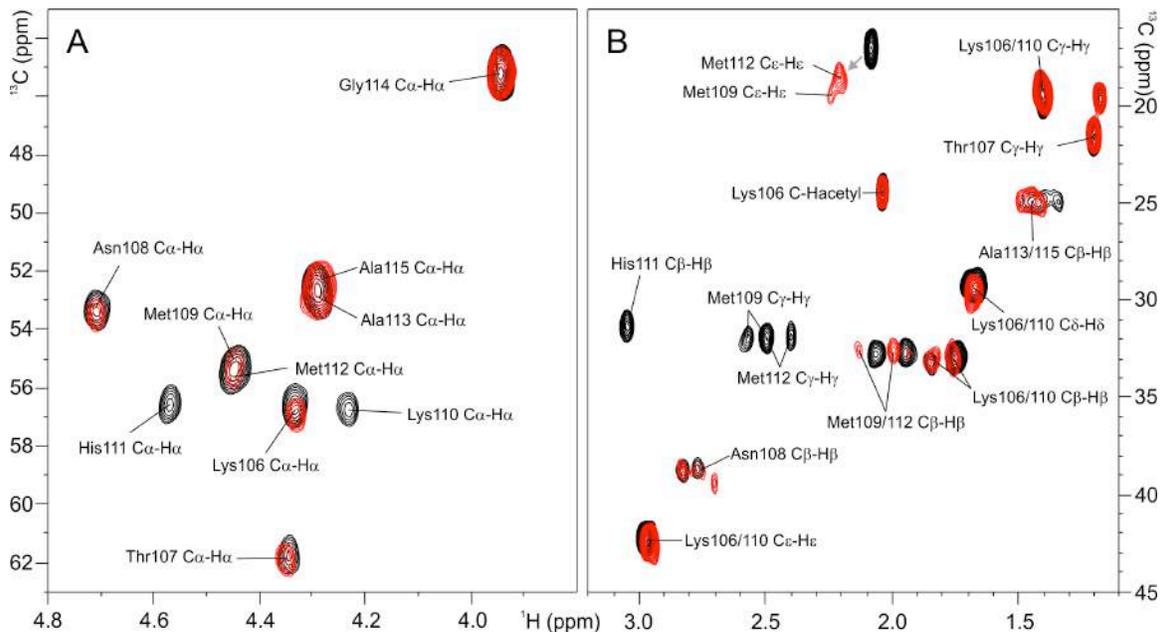


Figura 4.14. Espectro ^1H - ^{13}C HSQC del péptido PrP(106-115) (negro) y del complejo Cu(I)-PrP(106-115) (rojo) a pH 8.5. $\text{C}\alpha$ - $\text{H}\alpha$ (A), $\text{C}\beta$ - $\text{H}\beta$, $\text{C}\gamma$ - $\text{H}\gamma$, $\text{C}\delta$ - $\text{H}\delta$ y $\text{C}\epsilon$ - $\text{H}\epsilon$ (B).

Experimentos de NMR de ^1H a pH 6.5 y 8.5 del péptido PrP(106-115) y del complejo Cu(I)-PrP(106-115) se muestran en la Figura 4.15. La región aromática corresponde a la zona de 6.9 a

8.1 ppm, mientras que la región alifática comprende de 1.9 a 2.4 ppm. La línea negra corresponde al espectro ^1H de *NMR* del péptido y la línea roja al espectro del complejo de Cu(I) a pH 6.5 (Figura 4.15 A) y 8.5 (Figura 4.15 B). A pH 6.5 los desplazamientos químicos asociados a los H_ϵ de la Met109 y Met112 se ven claramente afectados en presencia de Cu(I), éstas sufren un ensanchamiento y un desplazamiento a frecuencia alta de 0.15 ppm (señal asociada a la Met112) y 0.23 ppm (señal asociada a la Met109). En acuerdo con los datos de *XAS*, los datos de *NMR* indican que a pH 6.5 el Cu(I) está coordinado por ambos residuos de metionina. A su vez, la región aromática del espectro muestra un ensanchamiento y un desplazamiento a frecuencia baja de las señales asociadas a los protones H_ϵ (0.12 ppm) y H_δ (0.04 ppm) de la His111 en presencia de Cu(I). Este resultado indica que a pH 6.5 el nitrógeno imidazol de la His111 participa en la coordinación de Cu(I).

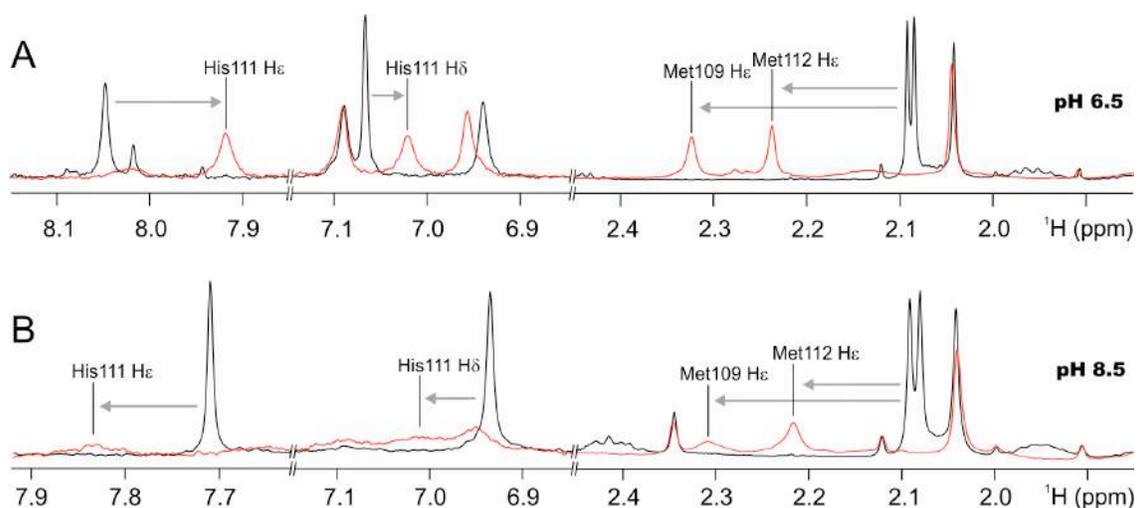


Figura 4.15. Espectro ^1H *NMR* del péptido PrP(106-115) (línea negra) y del complejo Cu(I)-PrP(106-115) (línea roja). pH 6.5 (A) y 8.5 (B). Las líneas negras indican los desplazamientos químicos de los protones H_ϵ de las metioninas y de los protones H_ϵ y H_δ de la histidina en el complejo de Cu(I). Las flechas grises muestran los cambios en las señales en presencia de Cu(I).

A pH 8.5, en la región alifática del espectro (Figura 4.15 B), los desplazamientos químicos asociados a los protones H_ϵ de la Met109 y Met112 sufren un ensanchamiento y un desplazamiento a frecuencia alta (0.12 ppm en la señal de la Met112 y 0.21 ppm en la señal de la Met109) en presencia de Cu(I). En la región aromática, las señales asociadas a los H_ϵ y H_δ de la His111 también sufren un ensanchamiento y un desplazamiento a frecuencia alta en el complejo

de Cu(I). El efecto del metal sobre las señales de la His111 sugiere que a pH 8.5 el nitrógeno imidazol de la His111 está participando en la coordinación del metal. Sin embargo, el ensanchamiento observado a pH 8.5 en ambas regiones es mucho más dramático que el observado a pH 6.5. Este efecto de ensanchamiento pudiera estar relacionado con la presencia de dos especies a pH 8.5, una especie que contenga al azufre de la Met109 como ligando de Cu(I) y otra especie en la que el ligando de azufre provenga de la Met112. Esta interpretación de los resultados es consistente con el comportamiento observado por *XAS* a pH 8.5 de los complejos de Cu(I) generados con las variantes Met-Ala, donde el único azufre disponible en los péptidos PrP(106-115)M109A y PrP(106-115)M112A parece coordinar Cu(I).

En resumen, los datos de *NMR* corroboran la coordinación de Cu(I) a los átomos de azufre de la Met109 y Met112 y claramente indican que el nitrógeno imidazol de la His111 también participa como ligando de Cu(I).

4.2.5. Efecto del pH en el complejo Cu(I)-PrP(106-115) seguido por resonancia magnética nuclear.

Con la finalidad de explorar con más detalle el papel que la Met109, la Met112 y la His111 juegan en la coordinación de Cu(I), se realizó un estudio detallado por ^1H *NMR* del péptido PrP(106-115) y del complejo Cu(I)-PrP(106-115) en un rango de pH de 3.5 a 9.5.

En la Figura 4.16 A se muestra el comportamiento de los $\text{H}\epsilon$ (línea negra punteada) y $\text{H}\delta$ (línea negra continua) de la His111 en el péptido libre y en el complejo Cu(I)-PrP(106-115) (líneas rojas punteada y continua). El pK_a asociado con la His en el péptido libre es ~ 6.2 , mientras que en la presencia de Cu(I) el pK_a cambia a ~ 5 , lo cual indica que la coordinación del Cu(I) al péptido favorece la desprotonación del residuo de His. Este cambio en el pK_a de la His al coordinarse con Cu(I) es consistente con valores ya reportados en complejos de Cu(I) en proteínas con Cu tipo 1 (T1Cu) o sitios de cobre azul.⁷⁷⁻⁷⁹

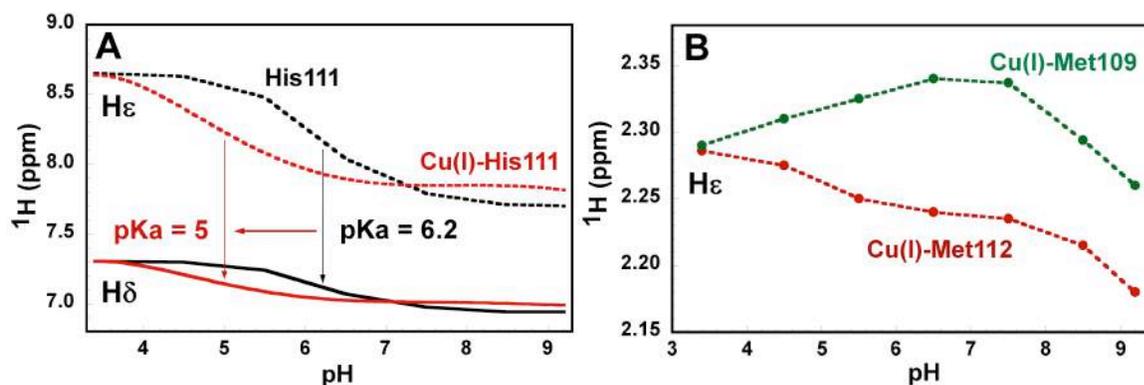


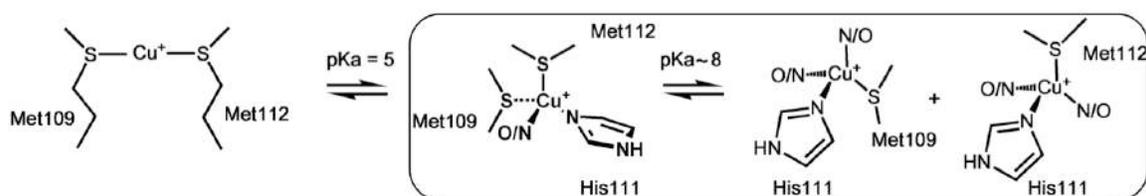
Figura 4.16. (A) Desplazamientos químicos de los $\text{H}\epsilon$ y $\text{H}\delta$ de la His111 en el péptido (líneas negra, continuas y punteadas) y en el complejo $\text{Cu(I)-PrP(106-115)}$ (líneas rojas, continuas y punteadas), en función del pH. (B) Desplazamientos químicos de los $\text{H}\epsilon$ de la Met109 (puntos verdes) y Met112 (puntos rojos) en el complejo $\text{Cu(I)-PrP(106-115)}$, en función del pH.

Por otro lado, en la Figura 4.16 B se puede observar que las señales asociadas con los residuos de Met en el complejo $\text{Cu(I)-PrP(106-115)}$ cambian drásticamente con el pH. En puntos verdes se muestra el comportamiento que tienen las señales de los $\text{H}\epsilon$ asociados a la Met109 y en rojo las asociadas a la Met112 en presencia de Cu(I) en varios valores de pH (3.5 – 9.5). El desplazamiento químico de estos protones en el péptido libre es 2.10 ppm (Figura 4.15). Sin embargo, en presencia de Cu(I) , incluso a pH tan bajo como 3.5, las señales asociadas con ambas metioninas cambian a 2.29 ppm, indicando que desde valores de pH muy bajos los residuos de Met ya están coordinados al Cu(I) . En el rango de pH de 3.5 a 7, aunque ambas señales se ven afectadas por la presencia de Cu(I) , cada una muestra un comportamiento diferente, siendo la señal de la Met109 la más afectada por la presencia de Cu(I) . A valores de pH > 8, ambas señales tienden a retornar al valor del desplazamiento químico asociado con el péptido libre (2.10 ppm). Este resultado indica que a altos valores de pH, ambas metioninas dejan la coordinación de Cu(I) y se forman especies sin ligandos tioéter. Dichas especies no fueron caracterizadas ya que se forman a valores de pH tan altos que ya no son fisiológicamente relevantes. Estos datos de *NMR* a diferentes valores de pH nos proporcionan información del papel que la Met109, la Met112 y la His111 juegan en la coordinación de Cu(I) en el sitio de la His111.

4.2.6. Modelado de los complejos Cu(I)-PrP(106-115) usando cálculos de estructura electrónica.

A partir de los datos experimentales de *XAS* y *NMR* se obtuvo información muy valiosa acerca de la coordinación de Cu(I) al sitio de la His111 de la PrP a diferentes valores de pH. El esquema 4.1 muestra las estructuras propuestas para el complejo Cu(I)-PrP(106-115) dependiendo del pH, de acuerdo a la información obtenida experimentalmente. A muy bajo pH (3.5), el Cu(I) es coordinado por los residuos de Met109 y Met112. Con un pKa de ~ 5 , el nitrógeno imidazol de la His111 entra en la esfera de coordinación, mientras que las dos metioninas permanecen coordinadas. Al incrementar el pH las metioninas dejan de jugar un papel importante en la coordinación de Cu(I) y únicamente un residuo de metionina (Met109 o Met112) se coordina al ión metálico a $\text{pH} > 8$.

Esquema 4.1. Modelos de coordinación propuestos para el complejo Cu(I)-PrP(106-115) a varios valores de pH, basado en los datos de *XAS* y *NMR*.



Para obtener una información completa acerca de los ligandos N/O que no se identificaron por las técnicas experimentales (especies mostradas en el recuadro del Esquema 4.1), se construyó una serie de modelos y se realizaron cálculos *Restricted Kohn-Sham (RKS)* usando *DFT*. Para construir los modelos se tomaron como punto de partida las estructuras de Cu(II) previamente reportadas,⁵² en las cuales el estado de oxidación fue dispuesto como Cu(I). Los modelos fueron clasificados en tres grupos y se encuentran listados en la Tabla 4.4.

Tabla 4.4. Modelos iniciales de Cu(I)-PrP(106-113) a pH 6.5 (grupo 1) y pH 8.5 (grupo 2A y 2B).*

Grupo 1		Grupo 2A			Grupo 2B		
Modelo	Cuarto ligando	Modelo	Tercer ligando	Cuarto ligando	Modelo	Tercer ligando	Cuarto ligando
2N2Sa*	N ⁻ _{H111}	3N1S _{M109a} *	N ⁻ _{H111}	N ⁻ _{K110}	3N1S _{M112a} *	N ⁻ _{H111}	N ⁻ _{K110}
2N2Sb*	N ⁻ _{K110}	3N1S _{M109b} *	N ⁻ _{H111}	N ⁻ _{M109}	3N1S _{M112b}	N ⁻ _{H111}	N ⁻ _{M109}
2N2Sa1	N _{H111}	3N1S _{M109c} *	N ⁻ _{K110}	N ⁻ _{M109}	3N1S _{M112c} *	N ⁻ _{K110}	N ⁻ _{M109}
2N2Sb1	N _{K110}	3N1S _{M109a1}	N _{H111}	N _{K110}	3N1S _{M112a1}	N _{H111}	N _{K110}
1N1O2Sa*	O _{H111}	3N1S _{M109a2}	N ⁻ _{H111}	N _{K110}	3N1S _{M112a2}	N ⁻ _{H111}	N _{K110}
1N1O2Sb*	O _{K110}	3N1S _{M109a3}	N _{H111}	N _{K110}	3N1S _{M112a3}	N _{H111}	N _{K110}
1N1O2Sc*	O _{N108}	3N1S _{M109b1}	N _{H111}	N ⁻ _{M109}	3N1S _{M112c1}	N _{K110}	N ⁻ _{M109}
1N1O2Sa1*	O _{w/H111}	3N1S _{M109b2}	N ⁻ _{H111}	N _{M109}	3N1S _{M112c2}	N ⁻ _{K110}	N _{M109}
1N1O2Sb1	O _{w/K110}	3N1S _{M109b3}	N _{H111}	N _{M109}	3N1S _{M112c3}	N _{K110}	N _{M109}
1N1O2Sc1*	O _{w/N108}	3N1S _{M109c1}	N _{K110}	N ⁻ _{M109}	2N1O1S _{M112a} *	N ⁻ _{K110}	O _{H111}
		3N1S _{M109c2}	N ⁻ _{K110}	N _{M109}	2N1O1S _{M112a1}	N _{K110}	O _{H111}
		3N1S _{M109c3}	N _{K110}	N _{M109}	2N1O1S _{M112b}	N ⁻ _{H111}	O _{M109}
		2N1O1S _{M109a} *	N ⁻ _{K110}	O _{H111}	2N1O1S _{M112c}	N ⁻ _{M109}	O _{H111}
		2N1O1S _{M109a1}	N _{K110}	O _{H111}	2N1O1S _{M112c1}	N _{M109}	O _{H111}
		2N1O1S _{M109b} *	N ⁻ _{H111}	O _{M109}	2N1O1S _{M112d} *	N ⁻ _{M109}	O _{K110}
		2N1O1S _{M109c} *	N ⁻ _{A113}	O _{A113}	2N1O1S _{M112d1}	N ⁻ _{M109}	O _{w/K110}
		2N1O1S _{M109a2}	N ⁻ _{K110}	O _{w/H111}	2N1O1S _{M112a2}	N ⁻ _{K110}	O _{w/H111}
		1N2O1S _{M109a}	O _{K110}	O _{H111}	1N2O1S _{M112a}	O _{H111}	O _{M109}
					1N2O1S _{M112b}	O _{H111}	O _{K110}
					1N2O1S _{M112c}	O _{M109}	O _{K110}

* Después de la optimización con el nivel más alto de teoría, sólo estos modelos mantienen una estructura tetracoordinada. Los modelos no marcados pierden uno o más ligandos en el proceso de optimización, resultando en estructuras tri o bicoordinadas.

El grupo 1 incluye modelos tetracoordinados usados para estudiar el complejo formado a pH 6.5 con un modo de coordinación Cu(I)-1N2S1X. Estos modelos incluyen dos átomos de azufre de ambas metioninas, el nitrógeno imidazol de la His111 y un cuarto ligando X, donde X puede ser un átomo de oxígeno de la cadena peptídica proveniente de un grupo carbonilo (CO) o de una molécula de H₂O, o un átomo de nitrógeno de una amida protonada (NH) o desprotonada (N⁻) de la cadena peptídica. Es importante notar que se incluyen los grupos amida que fueron mayormente afectados en los experimentos *HSQC* (sección 4.2.4).

El grupo 2A esta formado por modelos tetracoordinados con esfera de coordinación Cu(I)-1N1S2X usados para estudiar la especie formada a pH 8.5. En estos modelos el átomo de azufre proviene de la Met109, el nitrógeno imidazol de la His111 provee otro ligando y los ligandos 2X pueden ser una combinación de 2N⁻, 1NH1N⁻, 2NH, 1N⁻1O, 1NH1O o 2O; donde N⁻ y NH son

amidas en su forma desprotonada o protonada y O es un átomo de oxígeno que proviene de un grupo carbonilo o de una molécula de H₂O. Finalmente, el grupo 2B incluye modelos tetracoordinados, Cu(I)-1N1S2X, en una forma similar al grupo 2A, solo que aquí el átomo de azufre proviene de la Met112.

4.2.6.1. Grupo 1. Modelos para el complejo formado a pH 6.5.

Diez diferentes modelos tetracoordinados fueron construidos, todos contienen un ión Cu(I) coordinado al nitrógeno imidazol de la His111, a los dos átomos de azufre de los grupos tioéter de la Met109 y Met1112 y un cuarto ligando N/O (Tabla 4.4). Tres de estas estructuras no retuvieron la geometría tetracoordinada, principalmente los que contienen una amida en su forma protonada como cuarto ligando. Estos complejos no fueron incluidos en el análisis, ya que no cumplen con la condición tetracoordinada claramente indicada en los datos de *XAS* y el *BVS* análisis. Las siete estructuras que optimizaron como complejos tetracoordinados usando la metodología OPBE/TZVP/GEN-A2 (ver sección 10, Materiales y Métodos), se muestran en la Figura 4.17 y sus parámetros geométricos se listan en la Tabla 4.5. En estos siete modelos las estructuras mantienen una geometría de tetraedro distorsionado.

Los modelos del grupo 1 se dividen en tres subgrupos, de acuerdo al número total de átomos (142, 143 o 146), el cual depende del estado de protonación de las amidas de la cadena peptídica y la presencia de moléculas de H₂O explícitas.

En el subgrupo con 142 átomos, el cuarto ligando para los modelos 2N2Sa y 2N2Sb es un átomo de nitrógeno proveniente de la amida desprotonada de la His111 o Lys110, respectivamente. El promedio de distancia de enlace para los dos nitrógenos en cada estructura es alrededor de 2.10 Å (Tabla 4.5). Sin embargo el modelo 2N2Sb es más estable por 19.36 kcal/mol que el modelo 2N2Sa (Figura 4.17 y Tabla 4.5); además, las distancias de enlace Cu(I)-S en el modelo 2N2Sb (2.34 Å, 2.35 Å) están en mejor acuerdo con los datos experimentales de *EXAFS* (2.37 Å, Tabla 4.3) comparadas con las del modelo 2N2Sa (2.29 Å y 2.36 Å).

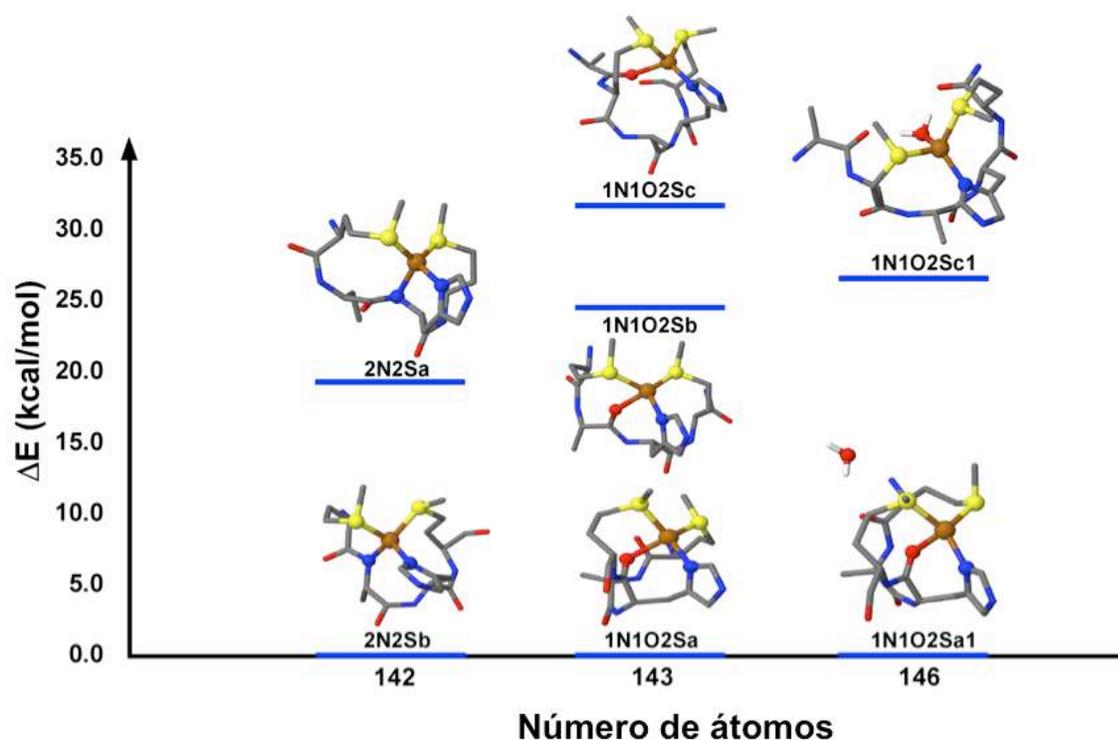


Figura 4.17. Diagrama energético de los modelos Cu(I)-1N2S1X para el complejo Cu(I)-PrP(106-115) a pH 6.5. Por claridad, la mayoría de las cadenas laterales no se muestran, sin embargo las optimizaciones fueron hechas incluyendo todos los átomos del complejo Cu(I)-PrP(106-113).

En el subgrupo con 143 átomos, el cuarto ligando para Cu(I) en los modelos 1N1O2Sa, 1N1O2Sb y 1N1O2Sc es un átomo de oxígeno proveniente de algún carbonilo de la cadena peptídica de los residuos His111, Lys110 o Asn108, respectivamente. En este subgrupo, la estructura 1N1O2Sa presenta la menor energía, mientras que los modelos 1N1O2Sb y 1N1O2Sc se encuentran a energías más altas (Figura 4.17 y Tabla 4.5). Todos los modelos comparten la característica de presentar un enlace Cu(I)-S < 2.30 Å, (2.28 Å en 1N1O2Sa y 2.29 Å en 1N1O2Sb y 1N1O2Sc), mientras que el promedio para las distancias 2 Cu(I)-N/O en los modelos 1N1O2Sa, 1N1O2Sb y 1N1O2Sc son 2.14, 2.16 y 2.155 Å, respectivamente. Es claro que en este subgrupo, donde el cuarto ligando es un átomo de oxígeno, el promedio de la distancia de enlace 2 Cu(I)-N/O (~ 2.15 Å) esta en mejor acuerdo con los datos experimentales (2.17 Å), a comparación de los modelos que tienen un átomo de nitrógeno como cuarto ligando.

Tabla 4.5. Parámetros estructurales y energéticos del grupo 1 generados por la optimización geométrica en los niveles LDA (Dirac-VWN), GGA (PBE) y OPBE, usando TZVP como base orbital. ΔE es la energía relativa en kcal/mol. Las distancias de enlace experimentales a partir de datos de *EXAFS* son: 2 Cu-S a 2.37 Å y 2 Cu-N/O a 2.17 Å, (Tabla 4.3).

No. átomos	ID	Ligandos	LDA	PBE	OPBE	Promedio OPBE	ΔE en OPBE	
142	2N2Sb	Cu-S _{M109}	2.27	2.38	2.34		0.00	
		Cu-S _{M112}	2.25	2.35	2.35	2S – 2.345		
		Cu-N _{Im}	1.98	2.05	2.09	2N – 2.095		
		Cu-N _{K110}	1.99	2.08	2.10			
	Enlace (Å)	2N2Sa	Cu-S _{M109}	2.24	2.33	2.29		19.36
			Cu-S _{M112}	2.23	2.28	2.36	2S – 2.325	
			Cu-N _{Im}	2.03	2.04	2.11	2N – 2.105	
			Cu-N _{H111}	2.05	2.13	2.10		
	143	1N1O2Sa	Cu-S _{M109}	2.22	2.31	2.28		0.00
			Cu-S _{M112}	2.23	2.31	2.32	2S – 2.300	
			Cu-N _{Im}	1.95	2.02	2.05	1N1O – 2.140	
			Cu-O _{H111}	2.07	2.18	2.23		
Enlace (Å)		1N1O2Sb	Cu-S _{M109}	2.25	2.31	2.35		24.65
			Cu-S _{M112}	2.23	2.28	2.29	2S – 2.320	
			Cu-N _{Im}	1.98	2.04	2.07	1N1O – 2.160	
			Cu-O _{K110}	2.17	2.20	2.25		
Enlace (Å)		1N1O2Sc	Cu-S _{M109}	2.32	2.39	2.34		31.73
			Cu-S _{M112}	2.23	2.31	2.29	2S – 2.315	
			Cu-N _{Im}	1.98	2.06	2.09	1N1O – 2.155	
			Cu-O _{N108}	2.02	2.20	2.22		
146	1N1O2Sa1 [#]	Cu-S _{M109}	2.28	2.30	2.33		0.00	
		Cu-S _{M112}	2.26	2.32	2.34	2S – 2.335		
		Cu-N _{Im}	1.95	2.04	2.05	1N1O – 2.120		
		Cu-O _{H111}	3.52	2.17	2.19			
		Cu-O _{w/H111}	2.05	4.34	6.37			
	Enlace (Å)	1N1O2Sc1	Cu-S _{M109}	2.28	2.38	2.34		26.57
			Cu-S _{M112}	2.27	2.33	2.34	2S – 2.340	
			Cu-N _{Im}	1.97	2.05	2.07	1N1O – 2.155	
			Cu-O _{w/N108}	2.02	2.14	2.24		

[#] En esta estructura, el Cu(I) recluta nuevamente al oxígeno del carbonilo de la His111, mientras que la molécula de H₂O se mantiene a 6.37 Å del Cu(I).

Finalmente, los modelos con 146 átomos contienen una molécula de H₂O (O_w) como ligando de oxígeno. Estos modelos fueron construidos a partir de los modelos con 143 átomos en los que el carbonilo fue reemplazado de la esfera de coordinación por una molécula de H₂O. Es interesante

notar que en el proceso de optimización del modelo 1N1O2Sa1, la molécula de H₂O se sale de la esfera de coordinación y el Cu(I) recluta nuevamente al oxígeno del carbonilo de la His111, dando lugar a un modelo en el que las distancias de enlace Cu(I)-S (2.33 y 2.34 Å) están en mejor acuerdo con los datos experimentales, en comparación con el modelo 1N1O2Sa (2.28 y 2.32 Å) que no tiene moléculas de H₂O. El promedio de la distancia de enlace de los otros dos ligandos 2 Cu(I)-N/O, no cambia significativamente con respecto al modelo 1N1O2Sa (2.12 Å vs. 2.14 Å) (Tabla 4.5), manteniéndose consistente con los datos experimentales. Por otro lado, el modelo 1N1O2Sc1 es el único modelo que mantiene el enlace Cu(I)-O_w, aunque energéticamente se encuentra a 26.57 kcal/mol sobre el modelo 1N1O2Sa1 (Figura 4.17 y Tabla 4.5). En este modelo nuevamente notamos que la presencia de la molécula de H₂O mejora las distancias de enlace Cu(I)-S (2.34 Å), mientras que el promedio en los otros dos ligandos, 2 Cu(I)-N/O, es de 2.155 Å.

En resumen, los mejores candidatos del grupo 1 son los modelos 2N2Sb, 1N1O2Sa y 1N1O2Sc1, por que estos modelos tienen las energías más bajas y/o exhiben distancias metal-ligando que mejor reproducen los datos experimentales.

4.2.6.2. Grupo 2A. Modelos para el complejo formado a pH 8.5 que contienen a la Met109.

En este grupo se construyeron 18 modelos tetracoordinados en los que el Cu(I) se coordina al nitrógeno imidazol de la His111, al átomo de azufre del grupo tioéter de la Met109 y a otros dos ligandos (Tabla 4.4). En todas las estructuras que contienen uno o dos átomos de nitrógeno pertenecientes a una amida de la cadena peptídica en su forma protonada, el enlace Cu(I)-NH se rompió en el proceso de optimización, dando como resultado complejos tri o bicoordinados. Tampoco fue posible obtener modelos con ligandos de oxígeno proveniente de moléculas de H₂O. Por consiguiente, solo aquellas estructuras que contienen en la esfera de coordinación una o dos amidas desprotonadas de la cadena peptídica, optimizaron, con la metodología OPBE/TZVP/GEN-A2, como complejos tetracoordinados (Tabla 4.4). De manera similar al grupo 1, en todos los casos las estructuras presentan una geometría de tetraedro distorsionado. Dentro de los 6 modelos que se estudiaron en este grupo, hay dos subgrupos con 141 y 142 átomos (Figura 4.18). Sus parámetros geométricos con diferentes niveles de teoría se listan en la Tabla 4.6.

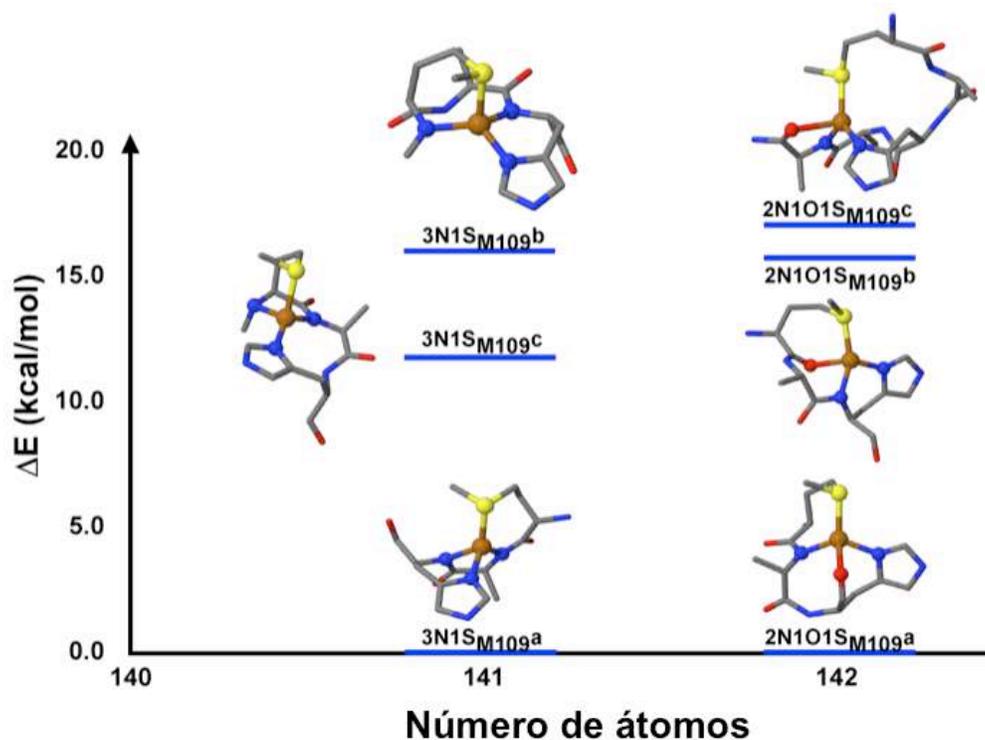


Figura 4.18. Diagrama energético de los modelos Cu(I)-1N1S2X para el complejo a pH 8.5 de Cu(I)-PrP(106-115) donde el ligando azufre proviene de la Met109 (grupo 2A). Por claridad, la mayoría de las cadenas laterales no se muestran, sin embargo las optimizaciones fueron hechas incluyendo todos los átomos del complejo Cu(I)-PrP(106-113).

En el subgrupo con 141 átomos, los modelos 3N1SM_{109a}, 3N1SM_{109b} y 3N1SM_{109c}, incluyen dos nitrógenos provenientes de amidas desprotonadas de la cadena peptídica: His111&Lys110, His111&Met109 y Lys110&M109, respectivamente. La estructura de menor energía, 3N1SM_{109a}, presenta una distancia de enlace Cu(I)-S (2.27 Å, Tabla 4.6) más corta que el valor experimental (2.35 Å, Tabla 4.3); sin embargo, exhibe un enlace corto Cu(I)-N a 2.04 Å, y dos enlaces 2 Cu(I)-N a 2.10 Å, la cual es la tendencia observada en los datos experimentales (Tabla 4.3). El modelo que sigue en energía 3N1SM_{109c} (a 11.78 kcal/mol, respecto a 3N1SM_{109a}) muestra una tendencia similar en los enlaces Cu(I)-N/O (un enlace corto Cu(I)-N a 2.04 Å y dos enlaces más largos 2 Cu(I)-N a 2.15 Å, Tabla 4.6), pero en este caso el enlace Cu(I)-S es de 2.31 Å, que esta en mejor acuerdo a los datos experimentales (Tabla 4.3). Finalmente, el modelo 3N1SM_{109b}, exhibe un enlace Cu(I)-S de 2.32 Å, pero la tendencia de los otros tres ligandos no es consistente con los datos experimentales: dos enlaces cortos 2 Cu(I)-N a 2.02 Å y un enlace largo Cu(I)-N a 2.10 Å, además también es el modelo de mayor energía dentro de su grupo (Tabla 4.6).

Tabla 4.6. Parámetros estructurales y energéticos del grupo 2A generados por la optimización geométrica en los niveles LDA (Dirac-VWN), GGA (PBE) y OPBE, usando TZVP como base orbital. ΔE es la energía relativa en kcal/mol. Las distancias de enlace experimentales a partir de datos de EXAFS son: 1 Cu-S a 2.35 Å, 1 Cu-N/O a 1.97 Å y 2 Cu-N/O a 2.15 Å (Tabla 4.3).

No. átomos	ID	Ligandos	LDA	PBE	OPBE	Promedio OPBE	ΔE en OPBE	
141	3N1S _{M109a}	Cu-S _{M109}	2.21	2.28	2.27	1S – 2.27	0.00	
		Cu-N _{Im}	1.98	2.06	2.10	1N – 2.04		
		Cu-N ⁻ _{H111}	2.00	2.08	2.10	2N – 2.10		
		Cu-N ⁻ _{K110}	1.97	2.04	2.04			
	Enlace (Å)	3N1S _{M109c}	Cu-S _{M109}	2.29	2.38	2.31	1S – 2.31	11.78
			Cu-N _{Im}	1.95	2.00	2.04	1N – 2.04	
			Cu-N ⁻ _{K110}	2.02	2.10	2.13	2N – 2.15	
			Cu-N ⁻ _{M109}	2.10	2.20	2.17		
	Enlace (Å)	3N1S _{M109b}	Cu-S _{M109}	2.29	2.40	2.32	1S – 2.32	16.06
			Cu-N _{Im}	1.95	2.00	2.01	1N – 2.10	
			Cu-N ⁻ _{H111}	1.99	2.07	2.10	2N – 2.02	
			Cu-N ⁻ _{M109}	1.94	1.99	2.03		
142	2N1O1S _{M109a}	Cu-S _{M109}	2.21	2.29	2.28	1S – 2.28	0.00	
		Cu-N _{Im}	1.94	2.02	2.13	1N – 2.02		
		N ⁻ _{K110}	2.03	2.12	2.02	1N1O – 2.20		
		O _{H111}	2.07	2.20	2.27			
	Enlace (Å)	2N1O1S _{M109b}	Cu-S _{M109}	2.19	2.24	2.27	1S – 2.27	15.76
			Cu-N _{Im}	1.93	2.00	2.02	1O – 2.36	
			N ⁻ _{H111}	1.96	2.00	2.02	2N – 2.02	
			O _{M109}	2.10	2.31	2.36		
	Enlace (Å)	2N1O1S _{M109c}	Cu-S _{M109}	2.20	2.23	2.22	1S – 2.22	17.12
			Cu-N _{Im}	1.92	2.18	2.04	1O – 2.30	
			N ⁻ _{A113}	1.97	1.98	1.98	2N – 2.01	
			O _{A113}	2.26	2.37	2.30		

Por otro lado, en el subgrupo con 142 átomos, los modelos 2N1O1S_{M109a}, 2N1O1S_{M109b} y 2N1O1S_{M109c} tienen en su esfera de coordinación una amida desprotonada de la cadena peptídica (N⁻_{Lys110}, N⁻_{His111}, y N⁻_{Ala113}, respectivamente) y un átomo de oxígeno proveniente de un grupo carbonilo (O_{His111}, O_{Met109} y O_{Ala113}, respectivamente); en todos los casos hay un enlace Cu(I)-S que es corto (2.28, 2.27 y 2.22 Å) si se compara con los datos experimentales (2.35 Å). Respecto a los otros ligandos, el modelo 2N1O1S_{M109a} presenta un enlace corto Cu(I)-N a 2.02 Å y dos enlaces más largos 2 Cu(I)-N/O a 2.20 Å, mostrando la misma tendencia que los datos experimentales. Por otro lado, los modelos de mayor energía 2N1O1S_{M109b} y 2N1O1S_{M109c}, (a

15.76 y 17.12 kcal/mol sobre el modelo 2N1O1S_{M109a}, respectivamente) exhiben una tendencia diferente, dos enlaces cortos y uno largo, la cual no es consistente con los datos experimentales. En síntesis, los modelos del grupo 2A que mejor representan las distancias Cu-ligando obtenidas de los datos experimentales son: 3N1S_{M109a}, 3N1S_{M109c} y 2N1O1S_{M109a}.

4.2.6.3. Grupo 2B. Modelos para el complejo formado a pH 8.5 que contienen a la Met112.

En este grupo fueron construidos 20 modelos diferentes, en los que el Cu(I) se coordinó al nitrógeno imidazol de la His111 y al átomo de azufre de la cadena lateral de la Met112, mientras que los otros dos ligandos fueron combinaciones similares a las hechas en el grupo 2A (Tabla 4.4). De forma semejante a lo ocurrido en las optimizaciones del grupo 2A, en todas las estructuras que contienen amidas protonadas de la cadena peptídica, Cu(I)-NH, o una molécula de H₂O como ligando oxígeno, Cu(I)-O_w, el o los enlaces Cu(I)-NH/O_w se rompieron en el proceso de optimización, dando lugar a estructuras tri o bicoordinadas. En consecuencia, en el grupo 2B únicamente se obtuvieron cuatro modelos que conservan la geometría tetraordinada después de la optimización. Estos modelos son mostrados en la Figura 4.19 y sus parámetros geométricos son listados en la Tabla 4.7.

Dos de estas estructuras tienen 141 átomos (3N1S_{M112a} y 3N1S_{M112c}), en ellas hay dos enlaces Cu(I)-N, donde los átomos de nitrógeno provienen de amidas desprotonadas de la cadena peptídica de los residuos His111&Lys110 y Lys110&Met109, respectivamente. Aunque estos modelos presentan diferentes energías (la energía relativa del modelo 3N1S_{M112c} es 16.63 kcal/mol más alta que el modelo 3N1S_{M112a}), ambos muestran parámetros geométricos muy similares. Los dos exhiben un enlace Cu(I)-S a 2.30 Å y tres enlaces Cu(I)-N con distancias de enlace de 2.04 Å para 3N1S_{M112a} y 2.06 Å para 3N1S_{M112c} (Tabla 4.7). Tres enlaces Cu(I)-N/O de la misma longitud no es consistente con la tendencia observada experimentalmente de un enlace corto y dos largos.

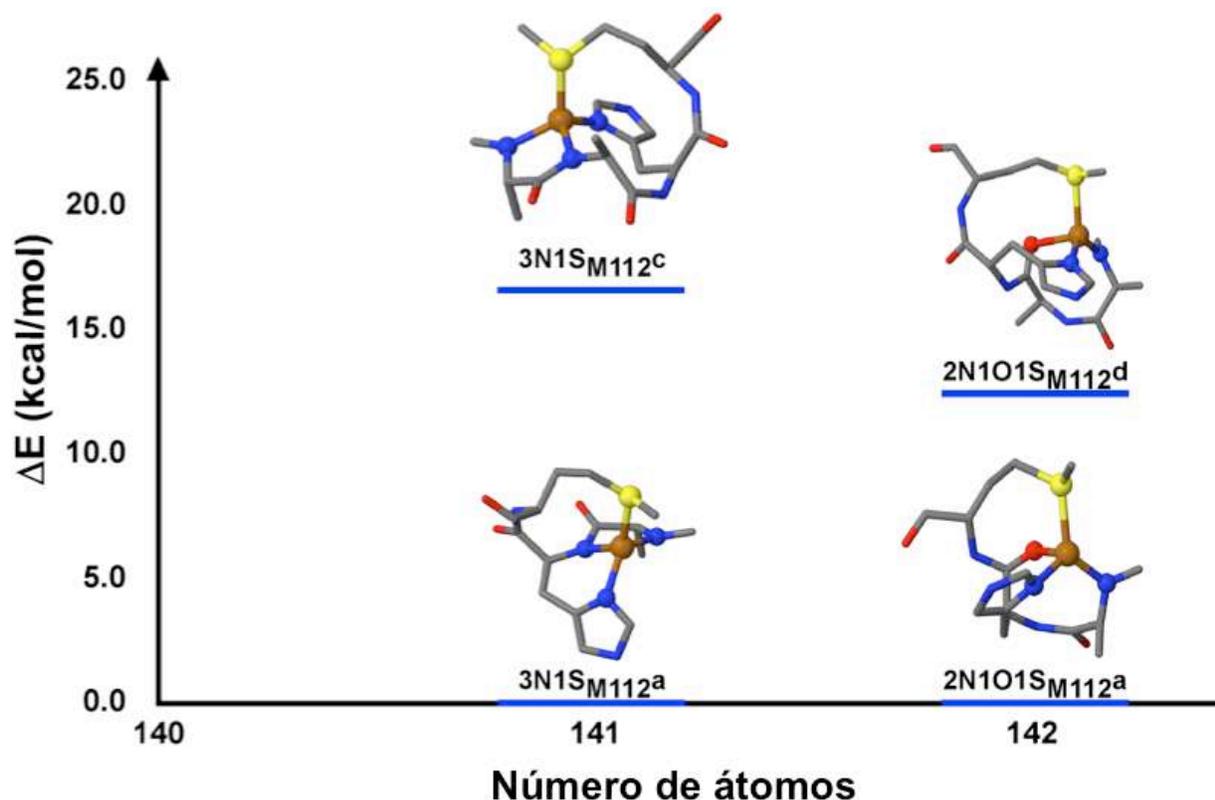


Figura 4.19. Diagrama energético de los modelos Cu(I)-1N1S2X para el complejo a pH 8.5 de Cu(I)-PrP(106-115) donde el ligando azufre proviene de la Met112 (grupo 2B). Por claridad, la mayoría de las cadenas laterales no se muestran, sin embargo las optimizaciones fueron hechas incluyendo todos los átomos del complejo Cu(I)-PrP(106-113).

Por otro lado, los dos modelos que tienen 142 átomos, 2N1O1SM_{112a} y 2N1O1SM_{112d}, contienen en la esfera de coordinación como tercer y cuarto ligando un átomo de nitrógeno que proviene de una amida desprotonada de la cadena peptídica, (N⁻_{Lys110} y N⁻_{Met109}, respectivamente) y un átomo de oxígeno de un grupo carbonilo (O_{His111}, y O_{Lys110}, respectivamente). Entre estos dos modelos, la estructura 2N1O1SM_{112a} es la de menor energía, mientras que el modelo 2N1O1SM_{112d} está 12.43 kcal/mol respecto al primero. Ambos modelos muestran un enlace Cu(I)-S a 2.36 Å y tendencias similares a las experimentales en los otros tres enlaces. Un enlace corto Cu(I)-N (2.01 Å y 2.04 Å, en 2N1O1SM_{112a} y 2N1O1SM_{112d}, respectivamente) y dos enlaces más largos 2 Cu(I)-N/O (2.14 Å y 2.20 Å, en 2N1O1SM_{112a} y 2N1O1SM_{112d}, respectivamente) (Tabla 4.7). Ambos modelos, geoméricamente, se encuentran en un buen acuerdo con los datos experimentales.

Así, los datos del grupo 2B claramente indican que la presencia de una amida desprotonada y un átomo de oxígeno producen distancias de enlace parecidas a las experimentales, tanto en la tendencia como en los valores.

Tabla 4.7. Parámetros estructurales y energéticos del grupo 2B generados por la optimización geométrica en los niveles LDA (Dirac-VWN), GGA (PBE) y OPBE, usando TZVP como base orbital. ΔE es la energía relativa en kcal/mol. Las distancias de enlace experimentales a partir de datos de EXAFS son: 1 Cu-S a 2.35 Å, 1 Cu-N/O a 1.97 Å y 2 Cu-N/O a 2.15 Å (Tabla 4.3).

No. átomos	ID	Ligandos	LDA	PBE	OPBE	Promedio OPBE	ΔE en OPBE
Enlace (Å)	141 3N1S _{M112a}	Cu-S _{M112}	2.23	2.30	2.30	1S – 2.30	0.00
		Cu-N _{Im}	1.93	2.00	2.04	3N – 2.04	
		Cu-N ⁻ _{H111}	2.04	2.09	2.07		
		Cu-N ⁻ _{K110}	2.02	2.04	2.01		
	3N1S _{M112c}	Cu-S _{M112}	2.25	2.24	2.29	1S – 2.29	16.63
		Cu-N _{Im}	1.96	2.25	2.10	3N – 2.06	
		Cu-N ⁻ _{K110}	1.94	2.05	2.06		
		Cu-N ⁻ _{M109}	1.99	2.03	2.04		
Enlace (Å)	142 2N1O1S _{M112a}	Cu-S _{M112}	2.26	2.37	2.36	1S – 2.36	0.00
		Cu-N _{Im}	1.96	2.03	2.11	1N – 2.01	
		N ⁻ _{K110}	1.94	1.99	2.01	1N1O – 2.14	
		O _{H111}	2.09	2.19	2.17		
	2N1O1S _{M112d}	Cu-S _{M112}	2.28	2.35	2.36	1S – 2.36	12.43
		Cu-N _{Im}	2.00	2.09	2.14	1N – 2.04	
		N ⁻ _{M109}	1.98	2.05	2.04	1N1O – 2.20	
		O _{K110}	2.13	2.25	2.26		

4.2.6.4. Evaluación del efecto de solvatación en modelos seleccionados.

Considerando la metodología utilizada (OPBE/TZVP), el error en las distancias de enlace calculadas es estimado que esté en el rango de $\sim 0.03 - 0.06$ Å para cálculos en fase gaseosa,⁸⁰⁻⁸⁴ y $\sim 0.03 - 0.02$ Å en cálculos que incluyan los efectos del solvente.⁸⁰⁻⁸¹ Por lo tanto, la solvatación es un factor que puede ayudarnos a superar las diferencias entre las distancias de enlace experimentales y las calculadas. Tomando en consideración que la adición de una molécula de H₂O en el modelo 1N1O2Sa (sección 4.2.6.1) mejoró significativamente las

distancias de enlace Cu(I)-S, se realizó un estudio más detallado incluyendo los efectos de la solvatación en modelos seleccionados de cada grupo.

Para los modelos del complejo a pH 6.5, del grupo 1 fueron seleccionadas las estructuras 2N2Sb, 1N1O2Sa y 1N1O2Sc1, mientras que para los complejos a pH 8.5 se seleccionaron los modelos 3N1S_{M109a}, 3N1S_{M109c}, 2N1O1S_{M109a}, 3N1S_{M112a}, 2N1O1S_{M112a} y 2N1O1S_{M112d}, de los grupos 2A y 2B. Todos ellos representan los mejores candidatos, ya que muestran las energías más bajas y/o exhiben las distancias metal-ligando que mejor reproducen los datos experimentales, tanto en tendencia como en valores.

Los efectos del solvente fueron evaluados con dos metodologías diferentes, (sección 10, Materiales y Métodos). En la primera aproximación las estructuras fueron reoptimizadas usando el modelo de solvatación implícita COSMO como está implementado en el programa ORCA. En la segunda forma se introdujeron cuatro y seis moléculas de H₂O explícitas en la cercanía de los complejos (las distancias entre Cu(I) y las moléculas de H₂O fueron de ~ 3.5 a 5.5 Å al inicio de la optimización) y las estructuras fueron reoptimizadas con OPBE/TZVP/GEN-A2 en el programa deMon2k.

La Tabla 4.8 muestra la comparación entre las distancias de enlace metal-ligando en los modelos sin solvente y aquellos optimizados con solvente implícito y explícito. Para el grupo 1 se seleccionaron tres modelos (2N2Sb, 1N1O2Sa y 1N1O2Sc1). En el modelo 2N2Sb, el efecto de la solvatación mejora ligeramente las distancias de enlace Cu(I)-S, sin embargo, las distancias Cu(I)-N permanecen más cortas que los valores experimentales (Tabla 4.8). En contraste, en los modelos que contienen un átomo de oxígeno como cuarto ligando, (1N1O2Sa y 1N1O2Sc1) los efectos de solvatación, ya sea implícita o explícita, mejora notablemente las distancias de enlace Cu(I)-S, mientras que las distancias Cu(I)-N/O permanecen en muy buen acuerdo con las distancias experimentales (Tabla 4.8). Mas aún, cuando el modelo 1N1O2Sc1, reoptimizado con ORCA, fue usado para simular el espectro de *EXAFS* en el programa EXAFSPAK, el espectro que se obtiene muestra un buen acuerdo con los datos experimentales del complejo Cu(I)-PrP(106-115) a pH 6.5 (Figura 4.20).

Tabla 4.8. Distancias Cu(I)-ligando (Å) para modelos seleccionados en los que se evaluó los efectos de la solvatación explícita e implícita. Las distancias de enlace experimentales para el complejo a pH 6.5 son: 2 Cu-S a 2.37 Å y 2 Cu-N/O a 2.17 Å. Y para el complejo a pH 8.5 son: 1 Cu-S a 2.35 Å, 1 Cu-N/O a 1.97 Å y 2 Cu-N/O a 2.15 Å (Tabla 4.3).

	Modelo	Sin solvatación	Solvatación implícita ORCA	Solvatación explícita (4 H₂O)	Solvatación explícita (6 H₂O)	
Modelos a	2N2Sb	2S – 2.345	2S – 2.395	2S – 2.345	2S – 2.365	
		2N – 2.095	2N – 2.110	2N – 2.085	2N – 2.090	
pH 6.5	1N1O2Sa	2S – 2.300	2S – 2.345	2S – 2.340	2S – 2.350	
		1N1O – 2.140	1N1O – 2.120	1N1O – 2.160	1N1O – 2.170	
Grupo 1	1N1O2Sc1	2S – 2.340	2S – 2.365	2S – 2.345	2S – 2.360	
		1N1O – 2.155	1N1O – 2.170	1N1O – 2.145	1N1O – 2.160	
Modelos a	3N1S _{M109a}	1S – 2.270	1S – 2.250	1S – 2.270	1S – 2.280	
		1N – 2.040	1N – 2.020	3N – 2.100	3N – 2.100	
		2N – 2.100	2N – 2.085			
	3N1S _{M109c}	1S – 2.310	1S – 2.450	1S – 2.370	1S – 2.360	
		1N – 2.040	3N – 2.100	1N – 2.010	1N – 2.040	
		2N – 2.150		2N – 2.105	2N – 2.130	
	pH 8.5	2N1O1S _{M109a}	1S – 2.280	1S – 2.300	1S – 2.310	1S – 2.320
			1N – 2.020	1N – 2.030	1N – 2.020	1N – 2.020
	Grupos 2A y 2B	3N1S _{M112a}	1N1O – 2.200	1N1O – 2.180	1N1O – 2.180	1N1O – 2.150
			1S – 2.300	1S – 2.250	1S – 2.300	1S – 2.280
y	2N1O1S _{M112a}	3N – 2.040	3N – 2.076	3N – 2.036	3N – 2.030	
		1S – 2.360	1S – 2.420	1S – 2.350	1S – 2.340	
		1N – 2.010	1N – 2.010	1N – 2.000	1N – 2.000	
		1N1O – 2.140	1N1O – 2.200	1N1O – 2.180	1N1O – 2.170	
		1S – 2.360	1S – 2.350	1S – 2.320	1S – 2.350	
2N1O1S _{M112d}	1N – 2.040	1O – 3.800	1O – 3.160	1O – 3.390		
	1N1O – 2.200	2N – 2.040	2N – 2.045	2N – 2.025		

Por lo tanto, se propone que a pH 6.5, el mejor modelo que representa el complejo Cu(I)-PrP(106-115) es aquel que contiene en su esfera de coordinación los dos átomos de azufre de la Met109 y Met112, el nitrógeno imidazol de la His111 y un átomo de oxígeno como cuarto ligando, el cual puede provenir del grupo carbonilo de la His111 (como en el modelo 1N1O2Sa) o de una molécula de H₂O (como en el modelo 1N1O2Sc1).

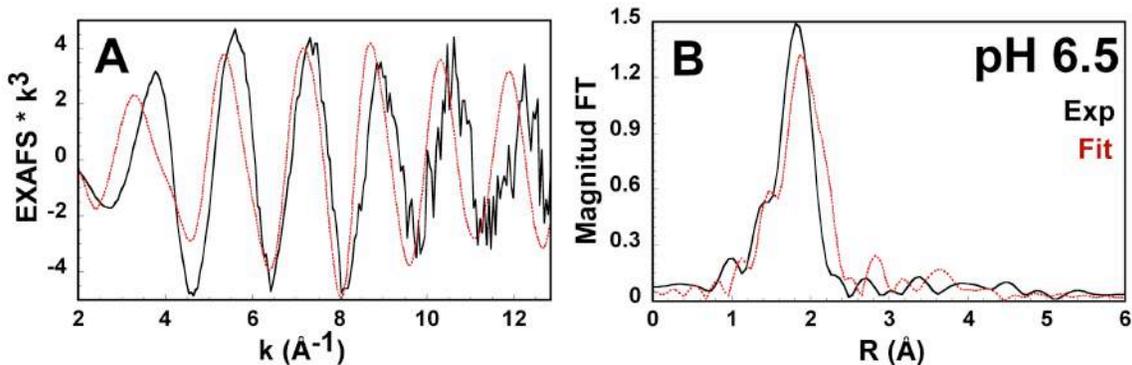


Figura 4.20. EXAFS (A) y su transformada de Fourier (B) del complejo Cu(I)-PrP(106-115) a pH 6.5 (línea negra) y el espectro calculado (línea roja punteada) usando la estructura 1N1O2Sc1 reoptimizada en el programa ORCA.

Por otro lado, en el grupo 2A, los efectos de solvatación fueron incluidos en los modelos 3N1S_{M109a}, 3N1S_{M109c} y 2N1O1S_{M109a}. En el modelo 3N1S_{M109a}, la solvatación, explícita o implícita, no muestra ningún efecto sobre las distancias de enlace Cu(I)-S (Tabla 4.8), mientras que la solvatación explícita cambia la tendencia en los enlaces Cu(I)-N, dando una estructura con tres enlaces con distancias muy similares, lo cual no es consistente con los datos experimentales. Un escenario similar es encontrado en el modelo 3N1S_{M109c}, en el cual, aunque la distancia del enlace Cu(I)-S se acerca a los valores experimentales, usando la solvatación explícita, se llega a una estructura con tres enlaces Cu(I)-N con distancias similares (Tabla 4.8). En contraste, el modelo 2N1O1S_{M109a}, muestra distancias de enlace Cu(I)-S cercanas a los datos experimentales y mantiene la tendencia correcta en los otros tres enlaces Cu(I)-N/O, un enlace corto y dos enlaces largos, cuyos valores están en buen acuerdo con los datos experimentales y son mantenidos en los dos métodos de solvatación. Por lo tanto, se propone que el mejor modelo para una de las especies de Cu(I)-PrP(106-115) a pH 8.5 es un complejo con el átomo de azufre de la Met109, el nitrógeno imidazol de la His111, un átomo de nitrógeno de la amida desprotonada de la Lys110 y un átomo de oxígeno del grupo carbonilo de la His111.

Finalmente, se incluyeron los efectos de solvatación en los modelos 3N1S_{M112a}, 2N1O1S_{M112a} y 2N1O1S_{M112d} del grupo 2B. No se observaron cambios significativos en el modelo 3N1S_{M112a} cuando la solvatación fue incluida; esto es, las distancias Cu(I)-ligando permanecen muy similares a las obtenidas sin solvatación, las cuales están lejos de las distancias experimentales. Por otro lado, en el modelo 2N1O1S_{M112d}, la distancia Cu(I)-O se alarga cuando la solvatación es

incluida, dando estructuras tricoordinadas. A diferencia de esto, el modelo $2N1O1S_{M112a}$, que ya mostraba un buen acuerdo con los datos experimentales, mantiene y mejora las distancias de enlace y la tendencia al incluir los efectos de solvatación, dando una estructura que está en muy buen acuerdo con los valores experimentales (Tabla 4.8). Por lo tanto, la estructura $2N1O1S_{M112a}$ es el mejor modelo que representa al complejo de coordinación a pH 8.5, que incluye a la Met112 y esta formado por el grupo tioéter de la Met112, el nitrógeno imidazol de la His111, la amida desprotonada de la Lys110 y el oxígeno proveniente del grupo carbonilo de la His111.

4.3. Discusión.

Los complejos Cu(II)-PrP(106-115) a pH 6.5 y 8.5 fueron estudiados por *XAS* y el papel de la Met109 y Met112 fue evaluada usando péptidos que contienen las variantes Met-Ala. Los resultados de *XAS* muestran que la coordinación de Cu(II) a la His111 se da a través de ligandos nitrógeno y oxígeno a ambos valores de pH. Sumado a esto, los espectros calculados a partir de los modelos Cu(II)-3N1O y Cu(II)-4N propuestos previamente,⁵² concuerdan muy bien con los espectros experimentales de *XAS*. Por lo tanto, la posibilidad de que los residuos de metionina actúen como ligandos axiales se puede descartar.

Por otro lado, el estudio espectroscópico de *XAS* y *NMR*, en combinación con cálculos de estructura electrónica, mostró que la coordinación de Cu(I) al péptido PrP(106-115) es también dependiente del pH. A pH < 5, los grupos tioéter de la Met109 y Met112 coordinan Cu(I); con un pKa de ~ 5, el nitrógeno imidazol de la His111 entra en la esfera de coordinación, mientras que los residuos de ambas metioninas permanecen coordinados, adoptando el modo de coordinación 1N1O2S. A pH 8.5, dos especies con el modo de coordinación 2N1O1S ($2N1O1S_{Met109}$ y $2N1O1S_{Met112}$) son formadas, con sólo un residuo de metionina enlazada a Cu(I) (Esquema 4.1). Aunque en este estudio se ha usado un fragmento corto de la PrP, que únicamente incluye el sitio de His111, las especies 2S y 1N1O2S descritas aquí, pudieran formarse en fragmentos más largos de la proteína PrP. A pH bajo (< 5), todos los residuos de His deben estar protonados y por lo tanto los residuos de Met109 y Met112 pudieran dominar la coordinación de Cu(I) para formar la especie Cu(I)-2S. A pH más alto, otros residuos de His de la región N-terminal, como la His96, pudieran participar en la coordinación de Cu(I); sin embargo, un estudio reciente de la coordinación de Cu(I) y Ag(I) al fragmento 91-127 demostró que la His96 no forma parte de la

esfera de coordinación, dejando a la His111, la Met109 y la Met112 como los principales grupos que coordinan al Cu(I);⁷¹ por lo tanto, la especie 1N1O2S que describimos en este estudio pudiera ser la especie dominante.

Como se ha descrito, la proteína PrP^C es una proteína que se encuentra anclada a las membranas de células sinápticas,⁴⁵ en donde puede estar expuesta a iones Cu(II) en un rango de concentraciones de 15 μM en el espacio sináptico (durante la liberación de las vesículas sinápticas), hasta 100-300 μM , durante la despolarización neuronal.⁸⁵⁻⁸⁷ Por lo tanto, la PrP^C puede interactuar con iones de Cu(II) en el espacio extracelular, y a pH 7.4 en el sitio de la His111 se pueden encontrar las especies Cu(II)-3N1O y Cu(II)-4N (Figura 4.21). También, agentes reductores, como el ácido ascórbico, son encontrados en concentraciones de hasta 150 μM en el fluido cerebroespinal.^{64, 88} Así, las especies de Cu(II)-His111 de la PrP^C pueden ser reducidas a Cu(I) por agentes reductores del medio. Nuestros resultados indican que en la presencia de ascorbato, la especie Cu(II)-3N1O se reduce para generar el complejo Cu(I)-1N1O2S y la especie Cu(II)-4N se reduce para dar una mezcla de especies en las que solo participa una de las metioninas (Met109 o Met112) en la coordinación de Cu(I) (Figura 4.21).

A diferencia de los otros sitios de coordinación de cobre en la proteína prion humana, el sitio de coordinación de la His111, contiene el motivo MKHM, el cual provee a este sitio con propiedades únicas de coordinación. En proteínas transportadoras de Cu, han sido identificados motivos MX₂MX₂M (por ejemplo Ctr1 de levadura) que coordinan Cu(I) selectivamente a través de los residuos de Met con afinidades del orden de $\sim 2.5 \times 10^{-6}$ M a pH 4.5.⁸⁹ Por otra parte, se han descrito varias proteínas involucradas en el transporte de cobre que utilizan residuos de His en combinación con residuos de Met para coordinar Cu(I), como la PcoC que tiene un sitio de coordinación Cu(I)-(His)(Met)₂,⁹⁰ la CopC, con un sitio de coordinación Cu(I)-(His)(Met)₃ y una $K_d \sim 10^{-13}$ M⁹¹⁻⁹² y la CusF, con un sitio de coordinación Cu(I)-(His)(Met)₂(O).⁹³ En estos casos la presencia del residuo de His en la esfera de coordinación juega dos papeles importantes, primero, incrementa la afinidad por Cu(I) y segundo permite la coordinación de iones Cu(II).⁹⁴⁻⁹⁵ Más aún, se ha demostrado que los ligandos tioéter son particularmente efectivos para coordinar Cu(I) cuando están separados por no más de dos aminoácidos.⁸⁹ El motivo MKHM de la PrP humana cumple con estas condiciones, de tal manera que a pH fisiológico el Cu(II) puede ser anclado a través del residuo de His111, mientras que, bajo condiciones reductoras, el Cu(I) es coordinado por los residuos de His y Met.

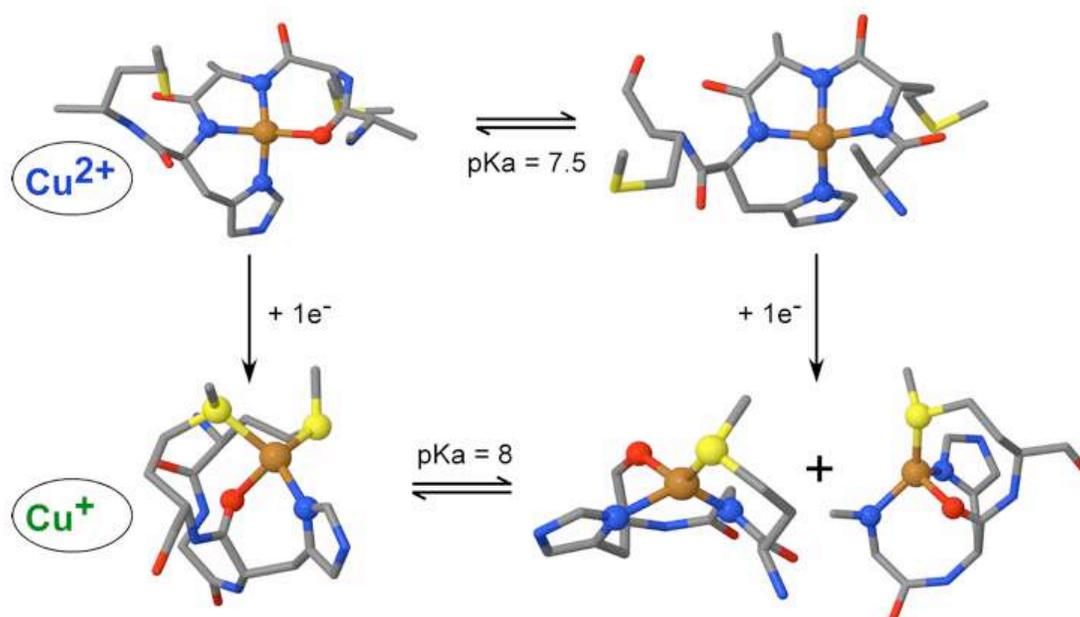


Figura 4.21. Modelos derivados de cálculos *DFT* para los complejos de Cu(II) y Cu(I) con el péptido PrP(106-115) a diferentes valores de pH.

Por último, altas concentraciones de Cu(II) pueden estimular la endocitosis de la PrP^C,⁴⁴ llevando a la proteína del espacio extracelular a pH 7.4, a los endosomas, donde hay altas concentraciones de protones (pH 4-5) y agentes reductores, como glutatión o nicotinamida adenina dinucleótido (*NADH*), que son encontrados en concentraciones de 1 – 3 mM y 200 μ M, respectivamente.⁹⁶⁻⁹⁷ Bajo estas condiciones, la His111 se protonaría y el Cu(I) podría ser anclado solo por los residuos de Met, en el modo de coordinación Cu(I)-2S (Esquema 4.1). Por lo tanto, este sitio está optimizado para coordinar tanto Cu(II) como Cu(I) y probablemente podría estar involucrado en el transporte de Cu(I) al interior de la célula.

4.4. Conclusiones.

El fragmento 109-112 de la proteína prion humana consta de la secuencia MKHM, la cual le confiere a este sitio propiedades de coordinación muy interesantes. A diferencia de los otros sitios de coordinación de la proteína prion, la presencia de los residuos de His y Met proveen los elementos necesarios para coordinar Cu(II) y Cu(I) en un amplio rango de pH.

Con Cu(II) la coordinación se da a través del grupo imidazol de la His111, además de ligandos nitrógeno y oxígeno provenientes de la cadena peptídica. Las especies Cu(II)-3N1O y Cu(II)-4N pueden existir en equilibrio a pH 7.5. Esta condición de pH se cumpliría por ejemplo en el medio extracelular. Por otro lado, en presencia de agentes reductores, las especies de Cu(II) pueden reducirse para formar los complejos Cu(I)-1N1O2S y Cu(I)-2N1O1S, respectivamente, en los que los residuos de metionina participan en la esfera de coordinación en función del pH. La posibilidad de coordinar Cu(II) y Cu(I) puede generar una reactividad interesante en este sitio de coordinación.

Por último, incluso si se presentan cambios drásticos en el pH, como aquellos ocurridos en la endocitosis, los residuos de metionina hacen posible la existencia de la especie Cu(I)-2S a pH muy bajo (< 4).

4.5. Referencias.

1. Prusiner, S. B., *Science*, **1982**, *216*, 136-144.
2. Prusiner, S. B., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, *95*, 13363–13383.
3. Meyer, R. K.; Mckinley, M. P.; Bowman, K. A.; Braunfeld, M. B.; Barry, R.; Prusiner, S. B., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1986**, *83*, 2310-2314.
4. Pan, K. M.; Baldwin, M.; Nguyen, J.; Gasset, M.; Serban, A.; Groth, D.; Mehlhorn, I.; Huang, Z.; Fletterick, R. J.; Cohenu, F. E.; Prusiner, S. B., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1993**, *90*, 10962-10966.
5. Prusiner, S. B., *Annu. Rev. Microbiol.* **1989**, *43*, 345-374.
6. Colombo, R., *Am. J. Hum. Genet.* **2000**, *67*, 528-531.
7. Zarranz, J. J.; Digion, A.; Atares, B.; Rodriguez-Martinez, A. B.; Arce, A.; Carrera, N.; Fernandez- Manchola, I.; Fernandez-Martinez, F.; Fernandez-Maiztegui, C.; Forcadas, I.; L Galdos; Gomez- Esteban, J. C.; Ibanez, A.; Lezcano, E.; Lopez de Munain, A.; Marti-Masso, J. F.; Mendibe, M. M.; Urtasun, M.; Uterga, J. M.; Saracibar, N.; Velasco, F.; de Pancorbo, M. M., *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **2005**, *76*, 1491-1496.
8. Manetto, V.; Medori, R.; Cortelli, P.; Montagna, P.; Tinuper, P.; Baruzzi, A.; Rancurel, G.; Hauw, J. J.; Vanderhaeghen, J. J.; Maillieux, P.; Bugiani, O.; Tagliavini, F.; Bouras, C.; Rizzuto, N.; Lugaresi, E.; Gambetti, P., *Neurology*, **1992**, *42*, 312–319.

9. Prusiner, S. B., *Science*, **1997**, 278, 245-251.
10. Prusiner, S. B.; Hsiao, K., *Ann. Neurol.* **1994**, 35, 385–395.
11. Hsiao, K.; Meiner, Z.; Kahana, E.; Cass, C.; Kahana, I.; Avrahami, D.; Scarlato, G.; Abramsky, O.; Prusiner, S. B.; Gabizon, R., *N. Engl. J. Med.* **1991**, 324, 1091-1097.
12. Gajdusek, D. C., *Science*, **1977**, 197, 943-960.
13. Prusiner, S. B., *Science*, **1991**, 252, 1515-1522.
14. Chesebro, B.; Race, R.; Wehrly, K.; Nishio, J.; Bloom, M.; Lechner, D.; Bergstrom, S.; Robbins, K.; Mayer, L.; Keith, J. M.; Garon, C.; Haase, A., *Nature*, **1985**, 315, 331-333.
15. Loch, C.; Chesebro, C.; Race, R.; Keith, J. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1986**, 83, 6372-6376.
16. Basler, K.; Oesch, B.; Scott, M.; Westaway, D.; Wälchli, M.; Groth, D. F.; McKinley, M. P.; Prusiner, S. B.; Weissmann, C., *Cell*, **1986**, 46, 417-428.
17. Caughey, B. W.; Dong, A.; Bhat, K. S.; Ernst, D.; Hayes, S. F.; Caughey, W. S., *Biochemistry*, **1991**, 30, 7672–7680.
18. Cohen, F. E.; Pan, K. M.; Huang, Z.; Baldwin, M.; Fletterick, R. J.; Prusiner, S. B., *Science*, **1994**, 264, 530–531.
19. Baldwin, M. A.; Pan, K. M.; Nguyen, J.; Huang, Z.; Groth, D.; Serban, A.; Gasset, M.; Mehlhorn, I.; Fletterick, R. J.; Cohen, F. E.; Prusiner, S. B., *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B*, **1994**, 343, 435–441.
20. Ross, C. A.; Poirier, M. A., *Nat. Med.* **2004**, 10 Suppl, S10-17.
21. Stahl, N.; Borchelt, D. R.; Hsiao, K.; Prusiner, S. B., *Cell*, **1987**, 51, 229-240.
22. Riek, R.; Hornemann, S.; Wider, G.; Billeter, M.; Giocshuber, R.; Wuthrich, K., *Nature*, **1996**, 382, 180-182.
23. Donne, D. G.; Viles, J. H.; Groth, D.; Mehlhorn, I.; James, T. L.; Cohen, F. E.; Prusiner, S. B.; Wright, P. E.; Dyson, H. J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1997**, 94, 13452–13457.
24. Zahn, R.; Liu, A.; Luhrs, T.; Riek, R.; von Schroetter, C.; Lopez-Garcia, F.; Billeter, M.; Calzolari, L.; Wider, G.; Wuthrich, K., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, 97, 145-150.
25. Forloni, G.; Angeretti, N.; Chiesa, R.; Monzani, E.; Salmona, M.; Bugiani, O.; Tagliavini, F., *Nature*, **1993**, 362, 543-546.
26. Ettaiche, M.; Pichot, R.; Vincent, J.-P.; Chabry, J., *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 36487-36490.
27. Chabry, J.; Ratsimanohatra, C.; Sponne, I.; Elena, P.-P.; Vincent, J.-P.; Pillot, T., *J. Neurosci.* **2003**, 23, 462-469.
28. Selvaggini, C.; De Gioia, L.; Cantù, L.; Ghibaudi, E.; Diomede, L.; Passerini, F.; Forloni, G.; Bugiani, O.; Tagliavini, F.; Salmona, M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, 194, 1380-1386.
29. Quintanar, L.; Rivillas-Acevedo, L.; Grande-Aztatzi, R.; Gómez-Castro, C. Z.; Arcos-López, T.; Vela, A., *Coord. Chem. Rev.* **2013**, 257, 429-444.
30. Linden, R.; Martins, V. R.; Prado, M. A. M.; Cammarota, M.; Izquierdo, I.; Brentani, R. R., *Physiol. Rev.* **2008**, 88, 673-728.
31. Roucou, X.; Gains, M.; LeBlanc, A. C., *J. Neurosci. Res.* **2004**, 75, 153–161
32. Brown, D. R., *TRENDS in Neurosci.* **2001**, 24, 85-90.
33. Kozłowski, H.; Łuczowski, M.; Remelli, M., *Dalton Trans.* **2010**, 39, 6371-6385.
34. Mange, A.; Milhavet, O.; Umlauf, D.; Harris, D.; Lehmann, S., *FEBS Lett.* **2002**, 514, 159-162.
35. Mouillet-Richard, S.; Ermonval, M.; Chebassier, C.; Laplanche, J. L.; Lehmann, S.; Launay, J. M.; Kellermann, O., *Science*, **2000**, 289, 1925-1928.

36. Linden, R.; Cordeiro, Y.; Lima, L. M. T. R., *Cell. Mol. Life Sci.* **2012**, *69*, 1105-1124.
37. Vassallo, N.; Herms, J., *J. Neurochem.* **2003**, *86*, 538-544.
38. Bounhar, Y.; Zhang, Y.; Goodyer, C. G.; LeBlanc, A., *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 39145-39149.
39. Klamt, F.; Dal-Pizzol, F.; Da Frota Jr., M. L. C.; Walz, R.; Andrades, M. E.; Da Silva, E. G.; Brentani, R. R.; Izquierdo, I.; Moreira, J. C. F., *Free Radic. Biol. Med.* **2001**, *30*, 1137-1144.
40. Michael L. Kramer, H. D. K., Bernhard Schmidt, Alice Romer, Otto Windl, Susanne Liemann, Simone Hornemann, and Hans Kretzschmar, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 16711-16719.
41. Brown, D. R.; Qin, K.; Herms, J. W.; Madlung, A.; Manson, J.; Strome, R.; Fraser, P. E.; Kruck, T.; von Bohlen, A.; Schulz-Schaeffer, W.; Giese, A.; Westaway, D.; Kretzschmar, H., *Nature*, **1997**, *390*, 684-687.
42. Brown, D. R.; Wong, B.; Hafiz, F.; Clive, C.; Haswell, S. J.; Jones, I. M., *Biochem. J.* **1999**, *344*, 1-5
43. Brown, D. R.; Clive, C.; Haswell, S. J., *J. Neurochem.* **2001**, *76*, 69-76.
44. Pauly, P. C.; Harris, D. A., *J. Biol. Chem.* **1998** *273*, 33107-33110.
45. Herms, J.; Tings, T.; Gall, S.; Madlung, A.; Giese, A.; Siebert, H.; Schurmann, P.; Windi, O.; Brose, B.; Kretzschmar, H., *J. Neurosci.* **1999**, *19*, 8866-8875.
46. Aronoff-Spencer, E.; Burns, C. S.; Avdievich, N. I.; Gerfen, G. J.; Peisach, J.; Antholine, W. E.; Ball, H. L.; Cohen, F. E.; Prusiner, S. B.; Millhauser, G. L., *Biochemistry*, **2000**, *39*, 13760-13771.
47. Burns, C. S.; Aronoff-Spencer, E.; Legname, G.; Prusiner, S. B.; Antholine, W. E.; Gerfen, G. J.; Peisach, J.; Millhauser, G. L., *Biochemistry*, **2003**, *42*, 6794-6803.
48. Chattopadhyay, M.; Walter, E. D.; Newell, D. J.; Jackson, P. J.; Aronoff-Spencer, E.; Peisach, J.; Gerfen, G. J.; Bennett, B.; Antholine, W. E.; Millhauser, G. L., *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12647-12656.
49. Millhauser, G. L., *Acc. Chem. Res.* **2004**, *37*, 79-85.
50. Burns, C. S.; Aronoff-Spencer, E.; Dunham, C. M.; Lario, P.; Avdievich, N. I.; Antholine, W. E.; Olmstead, M. M.; Vrielink, A.; Gerfen, G. J.; Peisach, J.; Scott, W. G.; Millhauser, G. L., *Biochemistry*, **2002**, *41*, 3991-4001.
51. Hureau, C.; Mathe, C.; Faller, P.; Mattioli, T. A.; Dorlet, P., *J. Biol. Inorg. Chem.* **2008**, *13*, 1055-1064.
52. Rivillas-Acevedo, L.; Grande-Aztatzi, R.; Lomeli, I.; Garcia, J. E.; Barrios, E.; Teloxa, S.; Vela, A.; Quintanar, L., *Inorg. Chem.* **2011**, *50*, 1956-1972.
53. Grande-Aztatzi, R.; Rivillas-Acevedo, L.; Quintanar, L.; Vela, A., *J. Phys. Chem. B*, **2013**, *117*, 789-799.
54. Hureau, C.; Charlet, L.; Dorlet, P.; Gonnet, F.; Spadini, L.; Anxolabehere-Mallart, E.; Girerd, J.-J., *J. Biol. Inorg. Chem.* **2006**, *11*, 735-744.
55. Remelli, M.; Donatoni, M.; Guerrini, R.; Janicka, A.; Pretegiani, P.; Kozłowski, H., *Dalton Trans.* **2005**, *17*, 2876-2885.
56. Di Natale, G.; Grasso, G.; Impellizzeri, G.; La Mendola, D.; Micera, G.; Mihala, N.; Nagy, Z.; Osz, K.; Pappalardo, G.; Rigo, V.; Rizzarelli, E.; Sanna, D.; Sovago, I., *Inorg. Chem.* **2005**, *44*, 7214-7225.
57. Belosi, B.; Gaggelli, E.; Guerrini, R.; Kozłowski, H.; Luczkowski, M.; Mancini, F. M.; Remelli, M.; Valensin, D.; Valensin, G., *ChemBioChem*, **2004**, *5*, 349-359.

58. Gaggelli, E.; Bernardi, F.; Molteni, E.; Pogni, R.; Valensin, D.; Valensin, G.; Remelli, M.; Luczkowski, M.; Kozlowski, H., *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 996-1006.
59. Walter, E. D.; Chattopadhyay, M.; Millhauser, G. L., *Biochemistry*, **2006**, *45*, 13083-13092.
60. Nadal, R. C.; Davies, P.; Brown, D. R.; Viles, J. H., *Biochemistry*, **2009**, *48*, 8929-8931.
61. Praneetha Gogineni, D.; Spuches, A. M.; Burns, C. S., *Inorg. Chem.* **2015**, *54*, 441-447.
62. Wells, M. A.; Jelinska, C.; Hosszu, L. L. P.; Craven, C. J.; Clarke, A. R.; Collinge, J.; Waltho, J. P.; Jackson, G. S., *Biochem. J.* **2006**, *400*, 501-510.
63. Whittal, R. M.; Ball, H. L.; Cohen, F. E.; Burlingame, A. L.; Prusiner, S. B.; Baldwin, M. A., *Protein Sci.* **2000**, *9*, 332-343.
64. Shiraishi, N.; Nishikimi, M., *FEBS Lett.* **2002**, *511*, 118-122.
65. Turnbull, S.; Tabner, B. J.; Brown, D. R.; Allsop, D., *Neurosci. Lett.* **2003**, *336*, 159-162.
66. Turnbull, S.; Tabner, B. J.; Brown, D. R.; Allsop, D., *Biochemistry*, **2003**, *42*, 7675-7681.
67. Kawano, T., *Int. J. Biol. Sci.* **2007**, *3*, 57-63.
68. Nadal, R. C.; Abdelraheim, S. R.; Brazier, M. W.; Rigby, S. E.; Brown, D. R.; Viles, J. H., *Free Radic. Biol. Med.* **2007**, *42*, 79-89.
69. Shearer, J.; Soh, P., *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 710-719.
70. Badrick, A. C.; Jones, C. E., *J. Inorg. Biochem.* **2009**, *103*, 1169-1175.
71. Valensin, D.; Padula, E. M.; Hecel, A.; Luczkowski, M.; Kozlowski, H., *J. Inorg. Biochem.* **2016**, *155*, 26-35.
72. Rehr, J. J., *Rev. Mod. Phys.* **2000**, *72*, 621-654.
73. Kau, L. S.; Spira-Solomon, D. J.; Penner-Hahn, J. E.; Hodgson, K. O.; Solomon, E. I., *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 6433-6442.
74. Brown, I. D.; Altermatt, D., *Acta Cryst.* **1985**, *B41*, 244-247.
75. Thorp, H. H., *Inorg. Chem.* **1992**, *31*, 1585-1588.
76. Liu, W.; Thorp, H. H., *Inorg. Chem.* **1993**, *32*, 4102-4105.
77. Dennison, C.; Kohzuma, T.; McFarlane, W.; Suzuki, S.; Sykes, A. G., *Inorg. Chem.* **1994**, *33*, 3299-3305.
78. Yanagisawa, S.; Sato, K.; Kikuchi, M.; Kohzuma, T.; Dennison, C., *Biochemistry*, **2003**, *42*, 6853-6862.
79. Hulsker, R.; Mery, A.; Thomassen, E. A.; Ranieri, A.; Sola, M.; Verbeet, M. P.; Kohzuma, T.; Ubbink, M., *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 4423-4429.
80. Swart, M., *J. Chem. Theory Comput.* **2008**, *4*, 2057-2066.
81. Anastasi, A. E.; Deeth, R. J., *J. Chem. Theory Comput.* **2009**, *5*, 2339-2352.
82. Ivanov, S. A.; Arachchige, I.; Aikens, C. M., *J. Phys. Chem. A*, **2011**, *115*, 8017-8031.
83. Ciancaleoni, G.; Rampino, S.; Zuccaccia, D.; Tarantelli, F.; Belanzoni, P.; Belpassi, L., *J. Chem. Theory Comput.* **2014**, *10*, 1021-1034.
84. Kuter, D.; Streltsov, V.; Davydova, N.; Venter, G. A.; Naidoo, K. J.; Egan, T. J., *Inorg. Chem.* **2014**, *53*, 10811-10824.
85. Hopt, A.; Korte, S.; Fink, H.; Panne, U.; Niessner, R.; Jahn, R.; Kretschmar, H.; Herms, J., *J. Neurosci. Meth.* **2003**, *128*, 159-172.
86. Kardos, J.; Kovacs, I.; Hajós, F.; Kálman, M.; Simonyi, M., *Neurosci. Lett.* **1989**, *103*, 139-144.
87. Gaier, E. D.; Eipper, B. A.; Mains, R. E., *J. Neurosci. Res.* **2013**, *91*, 2-19.
88. Carr, R. S.; Bally, M. B.; Thomas, P.; Neff, J. M., *Anal. Chem.* **1983**, *55*, 1229-1232.
89. Jiang, J.; Nadas, I. A.; Kim, M. A.; Franz, K. J., *Inorg. Chem.* **2005**, *44*, 9787-9794.

90. Peariso, K.; Huffman, D. L.; Penner-Hahn, J. E.; O'Halloran, T. V., *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 342-343.
91. Arnesano, F.; Banci, L.; Bertini, I.; Mangani, S.; Thompsett, A. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2003**, *100*, 3814-3819.
92. Koay, M.; Zhang, L.; Yang, B.; Maher, M. J.; Xiao, Z.; Wedd, A. G., *Inorg. Chem.* **2005**, *44*, 5203-5205.
93. Loftin, I. R.; Franke, S.; Roberts, S. A.; Weichsel, A.; Heroux, A.; Montfort, W. R.; Rensing, C.; McEvoy, M. M., *Biochemistry*, **2005**, *44*, 10533-10540.
94. Haas, K. L.; Putterman, A. B.; White, D. R.; Thiele, D. J.; Franz, K. J., *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 4427-4437.
95. Rubino, J. T.; Chenkin, M. P.; Keller, M.; Riggs-Gelasco, P.; Franz, K. J., *Metallomics*, **2011**, *3*, 61-73.
96. Lin, S.; Guarente, L., *Curr. Opin. Cell Biol.* **2003**, *15*, 241-246.
97. Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology, *Amino Acids and Peptides in the Nervous System*, SPRINGER. **2007**, 3rd Edition, pp. 352.

5. Reactividad del complejo Cu(I)-PrP(106-115).

5.1. Antecedentes.

5.1.1. Actividad redox de los sitios de coordinación a Cu en la proteína prion.

Como se describió en la sección 4, el interés por estudiar la coordinación de cobre en la proteína PrP fue suscitado por reportes que vinculan al Cu con la posible función fisiológica de la proteína.¹⁻⁶ También, porque se ha indicado que el estrés oxidativo y las ROS desempeñan un papel fundamental en el desarrollo de las TSEs.⁷⁻¹⁰ Debido a que el Cu es un metal activo redox, se ha propuesto que su reactividad pudiera vincularse con una acción pro-oxidante y causante de la generación de radicales libres y ROS. Por ejemplo, se ha demostrado que el Cu(II) en presencia de agentes reductores, cataliza la oxidación de la PrP recombinante *in vitro*¹¹ y que puede generar H₂O₂¹²⁻¹⁴ y superóxido.¹⁵ Con esta reactividad se han relacionado posibles daños oxidativos dentro de la proteína o a otros componentes celulares.¹⁶

En los últimos años, el interés por la reactividad de los sitios de Cu en la PrP ha ido en aumento. Mediciones electroquímicas del sitio de Cu en el OR han concluido que el Componente 3 (Figura 4.2, sección 4.1.3) puede reducirse a una especie de Cu(I) ($E_{1/2}(\text{Cu}^{\text{II}}\text{-OR}/\text{Cu}^{\text{I}}\text{-OR}) = 0.323 \text{ V vs NHE}$), pero no tiene la capacidad para reducir oxígeno molecular a peróxido de hidrógeno ($E_{1/2}(\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}_2) = 0.296 \text{ V vs NHE}$), mientras que el complejo formado en el llamado Componente 1 ($(\text{Cu}^{\text{II}})_4\text{-OR}/(\text{Cu}^{\text{I}})_4\text{-OR}) = 0.172 \text{ V vs NHE}$) sí puede hacerlo.¹⁷ Con respecto a la región *non octarepeat*, se han llevado a cabo estudios en el sitio de la His111. Experimentos con atrapadores de espín, y en los que se detecta la generación de superóxido a través del ensayo con *nitroblue tetrazolium* (NBT) con los fragmentos PrP(106-126) y PrP(106-114) sugieren que los complejos de Cu(II) formados con estos péptidos son capaces de generar peróxido de hidrógeno y/o superóxido si se lleva a cabo su reducción con ácido ascórbico y los complejos reducidos reaccionan con oxígeno.^{14, 18} Como ya se mencionó, la reactividad en el sitio Cu-His111 puede tener características únicas respecto a otros sitios que coordinan Cu en la proteína PrP, debido a la presencia del motivo MKHM que le da la capacidad de coordinar tanto Cu(II) como Cu(I).

En la sección 4 de esta tesis se demostró que la coordinación de Cu(I) al fragmento PrP(106-115) es altamente dependiente del pH. A diferencia de Cu(II), el Cu(I) puede coordinarse inclusive a muy bajos valores de pH (< 4), gracias a los residuos de metionina. El Esquema 4.1 y la Figura

4.21 en la sección 4, muestran un resumen de las especies de Cu(II) y Cu(I) en el sitio de la His111. Por su parte, en esta sección se describirá el estudio de la reactividad de las especies de Cu-PrP(106-115) que fueron identificadas y descritas en la sección anterior.

Dado que la energía de reorganización del sitio puede jugar un papel determinante en su actividad redox, primero se presentará el cálculo de las energías de reorganización para ambos complejos, después el estudio de la reducción de las especies de Cu(II) frente a ascorbato, seguido por la evaluación de la reactividad del complejo Cu(I)-PrP(106-115) en la activación de oxígeno y las consecuencias oxidativas de esta reactividad.

5.2. Resultados.

5.2.1. *Cálculo de la energía de reorganización de esfera interna asociada a la reducción de las especies de Cu(II) a Cu(I) a pH 6.5 y 8.5.*

Es claro que los complejos de Cu(II) (Cu(II)-3N1O y Cu(II)-4N) tienen geometrías y esferas de coordinación muy diferentes si se comparan con sus contrapartes con Cu(I) (Cu(I)-1N1O2S y Cu(I)-2N1O1S) (Figura 4.21, sección 4.3). Por lo tanto, la energía de reorganización involucrada en la reducción de estos complejos debe ser grande. Para conocer este valor, se realizó el cálculo de la energía de reorganización de esfera interna, (ver sección 10, Materiales y Métodos) asociada a la reducción de las especies de Cu(II) a Cu(I), a pH 6.5 y 8.5. Para este fin, se utilizaron las estructuras de Cu(II) y Cu(I) identificadas como los mejores modelos en la sección 4.

La Tabla 5.1 muestra los valores calculados de las energías de reorganización de esfera interna para la reducción de los complejos Cu(II)-3N1O a Cu(I)-1N1O2S y Cu(II)-4N a Cu(I)-2N1O1S. Para las estructuras a pH bajo, Cu(II)-3N1O y Cu(I)-1N1O2S, la energía calculada λ_i es 1.79 eV cuando el ligando oxígeno proviene del grupo carbonilo de la His111 y 2.15 eV cuando proviene de una molécula de H₂O (modelos de Cu(I) 1N1O2Sa y 1N1O2Sc1, respectivamente). Por otro lado, a pH 8.5 la energía de reorganización de esfera interna asociada a la reducción del complejo Cu(II)-4N para formar la especie Cu(I)-2N1O1S es de 1.60 eV cuando la Met109 esta coordinada (modelo 2N1O1S_{M109a}) y 1.66 eV para la estructura que contiene la Met112 (modelo 2N1O1S_{M112a}).

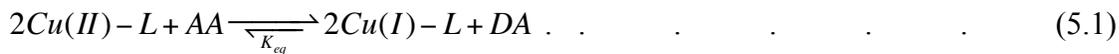
Tabla 5.1. Energías de reorganización (λ_i) para los complejos de Cu(II) y Cu(I) a pH 6.5 y 8.5.

	ID	Estructura	Energía (a. u.)	λ_i (a. u.)	λ_i (eV)
pH 6.5	$E_{ox}(\text{Red}_{geom})$	Cu(II)-1N1O2Sa	-5941.968973	0.065875	1.79
	$E_{ox}(\text{Ox}_{geom})$	Cu(II)-3N1O	-5942.132491		
	$E_{red}(\text{Ox}_{geom})$	Cu(I)-3N1O	-5942.271824		
	$E_{red}(\text{Red}_{geom})$	Cu(I)-1N1O2Sa	-5942.240056		
	$E_{ox}(\text{Red}_{geom})$	Cu(II)-1N1O2Sc1	-5941.986104	0.079190	2.15
	$E_{ox}(\text{Ox}_{geom})$	Cu(II)-3N1O	-5942.132491		
	$E_{red}(\text{Ox}_{geom})$	Cu(I)-3N1O	-5942.271824		
	$E_{red}(\text{Red}_{geom})$	Cu(I)-1N1O2Sc1	-5942.283818		
pH 8.5	$E_{ox}(\text{Red}_{geom})$	Cu(II)-2N1O1S _{M109a}	-5941.661874	0.058984	1.60
	$E_{ox}(\text{Ox}_{geom})$	Cu(II)-4N	-5941.906563		
	$E_{red}(\text{Ox}_{geom})$	Cu(I)-4N	-5942.015464		
	$E_{red}(\text{Red}_{geom})$	Cu(I)-2N1O1S _{M109a}	-5941.888744		
	$E_{ox}(\text{Red}_{geom})$	Cu(II)-2N1O1S _{M112a}	-5941.587744	0.061087	1.66
	$E_{ox}(\text{Ox}_{geom})$	Cu(II)-4N	-5941.906563		
	$E_{red}(\text{Ox}_{geom})$	Cu(I)-4N	-5942.015464		
	$E_{red}(\text{Red}_{geom})$	Cu(I)-2N1O1S _{M112a}	-5941.818821		

Como podemos observar, a pH bajo la energía de reorganización asociada a la reducción del complejo es mayor que a pH alto. Esto tiene sentido si se analizan los tipos de ligandos que se intercambian en cada caso. A pH 6.5 las especies involucradas son: Cu(II)-3N1O y Cu(I)-1N1O2S, en este caso, solo el residuo de His esta presente en ambos complejos, sin importar el estado de oxidación del metal, por lo tanto, hay un intercambio de tres ligandos de la esfera de coordinación. Por otro lado, a pH 8.5, las especies involucradas son: Cu(II)-4N y Cu(I)-2N1O1S, independientemente de cual Met este coordinada. En este caso, además del residuo de His111, también se mantiene en la esfera de coordinación la amida desprotonada de la Lys110, en los complejos de Cu(II) y Cu(I), por lo tanto, solo se intercambian dos ligandos de la esfera de coordinación y esto se ve reflejado en el valor mas bajo de la energía de reorganización en comparación con lo que sucede a pH 6.5. Estas energías de reorganización serán de utilidad para analizar la reactividad de los complejos en las secciones siguientes.

5.2.2. Estimación del $E^\circ_{(Cu(II/I)-PrP(106-115))}$ a pH 6.5 y 8.5 por medio de titulaciones reductivas.

El potencial de reducción de los complejos de Cu(II) con el péptido PrP(106-115) a pH 6.5 y 8.5. A fue estimado a partir de titulaciones anaeróbicas del complejo Cu(II)-3N1O y Cu(II)-4N con ácido ascórbico (AA). En éstas se siguió la desaparición de la señal asociada a las transiciones de campo ligando (banda d-d) a la longitud de onda de máxima intensidad (600 nm a pH 6.5 y 570 nm a pH 8.5, Figura 4.3, sección 4.2.1) por medio de absorción electrónica en la región UV-Vis. Considerando la ecuación 5.1, donde L es el ligando PrP(106-115), AA es ácido ascórbico y DA es dehidroascorbato, el valor de K_{eq} fue calculado a partir de la ecuación 5.2, donde C_i es la [Cu(II)-L] al punto inicial de la titulación y x es [Cu(I)-L], cuyo valor es obtenido por el porcentaje de reducción en la titulación del complejo de Cu(II).



$$K_{eq} = \frac{\left[\frac{x}{2}\right][x]^2}{\left[\frac{C_i - x}{2}\right][C_i - x]^2} \quad (5.2)$$

Las titulaciones fueron realizadas de 0 a 1 equiv. de AA para la reducción del complejo Cu(II)-3N1O y de 0 a 10 equiv. de AA para el complejo Cu(II)-4N, con la finalidad de obtener el mayor porcentaje en la reducción de los complejos (Figura 5.1).

El valor de los potenciales de reducción $E^\circ_{(Cu(II/I)-PrP(106-115))}$ fue estimado a partir de las ecuaciones 5.3, 5.4, 5.5 y tomando en cuenta que, $E^\circ_{(AA/DA)} = 0.052$ V vs. NHE.

$$\Delta G^\circ = -nF\Delta E^\circ \quad (5.3)$$

$$\Delta E^\circ = E^\circ_{(Cu(II/I)-PrP(106-115))} - E^\circ_{(AA/DA)} \quad (5.4)$$

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_{eq} \quad (5.5)$$

El valor de ΔG° estimado para la reacción a pH 6.5 es, $\Delta G^\circ_{3N1O} = -4.62$ kcal/mol, mientras que para la reacción a pH 8.5, $\Delta G^\circ_{4N} = -1.09$ kcal/mol. Por lo tanto, por la reacción a pH 6.5 el

potencial de reducción de la especie Cu(II)-3N1O se estima como: $E^{\circ}_{\text{Cu(II/I)-3N1O}} = 152 \text{ mV}$ y para pH 8.5, $E^{\circ}_{\text{Cu(II/I)-4N}} = 75.8 \text{ mV}$.

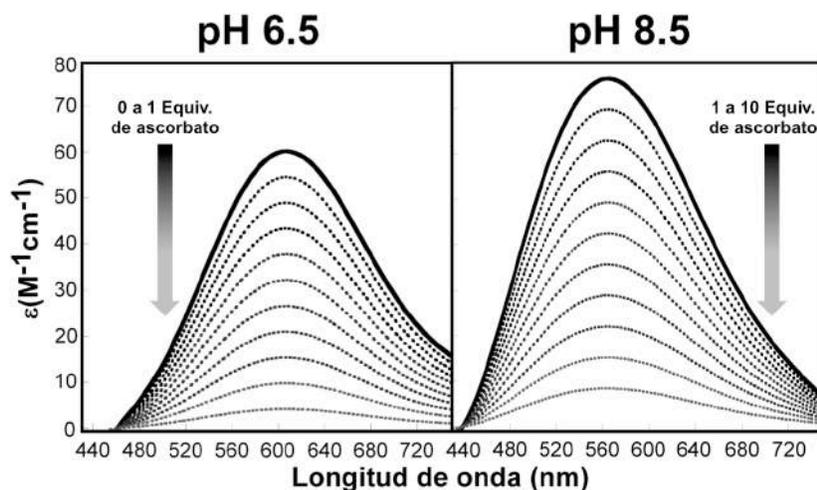


Figura 5.1. Titulaciones anaeróbicas representativas del complejo Cu(II)-PrP(106-115) con AA a pH 6.5 y 8.5 seguidas por la pérdida en la señal de la banda d-d (líneas punteadas).

Como podemos observar, existen diferencias en los valores estimados de ΔG° asociados a la reducción del complejo Cu(II)-3N1O y Cu(II)-4N, cuyos efectos se ven reflejados en diferencias significativas en el potencial de reducción de cada una de las especies de Cu(II).

5.2.3. Estudio de la reducción de los complejos Cu(II)-3N1O y Cu(II)-4N.

Una vez obtenidos los valores de la energía de reorganización y una estimación del ΔG° asociado a la reacción de reducción de los complejos Cu(II)-3N1O y Cu(II)-4N, se prosiguió con estudios para describir la reactividad del complejo, para esto se estudió la reducción de ambos complejos con ascorbato mediante absorción electrónica en *Stopped-Flow*. La desaparición de la señal asociada a las transiciones de campo ligando (banda d-d) a la longitud de onda de máxima intensidad (600 nm a pH 6.5 y 570 nm a pH 8.5) fue seguida en el tiempo después de mezclar los complejos Cu(II)-3N1O y Cu(II)-4N con el agente reductor. La reducción de los complejos fue seguida bajo condiciones de pseudo-primer orden, usando al menos un exceso de 20 veces el agente reductor, respecto a la concentración del complejo de cobre. La Figura 5.2 muestra gráficas de la intensidad de la absorción electrónica a 600 y 570 nm en función del tiempo,

mientras que datos representativos de los espectros de absorción electrónica se muestran en los recuadros; los ajustes de las trazas cinéticas se resumen en la Tabla 5.2.

La reducción del complejo Cu(II)-3N1O a pH 6.5 puede ser ajustada a una función exponencial simple para obtener una constante de rapidez de $0.287 \pm 0.010 \text{ s}^{-1}$ (Figura 5.2 A y Tabla 5.2). A diferencia de esto, la reducción del complejo Cu(II)-4N muestra un comportamiento lento con dos fases (Figura 5.2 B). La traza de la cinética del complejo Cu(II)-4N se ajusta a una ecuación con una doble exponencial, dando valores para la constante de rapidez de $0.134 \pm 0.023 \text{ s}^{-1}$ y $0.010 \pm 0.004 \text{ s}^{-1}$. Así, incluso la fase rápida de la reducción del complejo Cu(II)-4N a pH 8.5 es dos veces más lenta que la reducción del complejo Cu(II)-3N1O a pH 6.5 (Tabla 5.2).

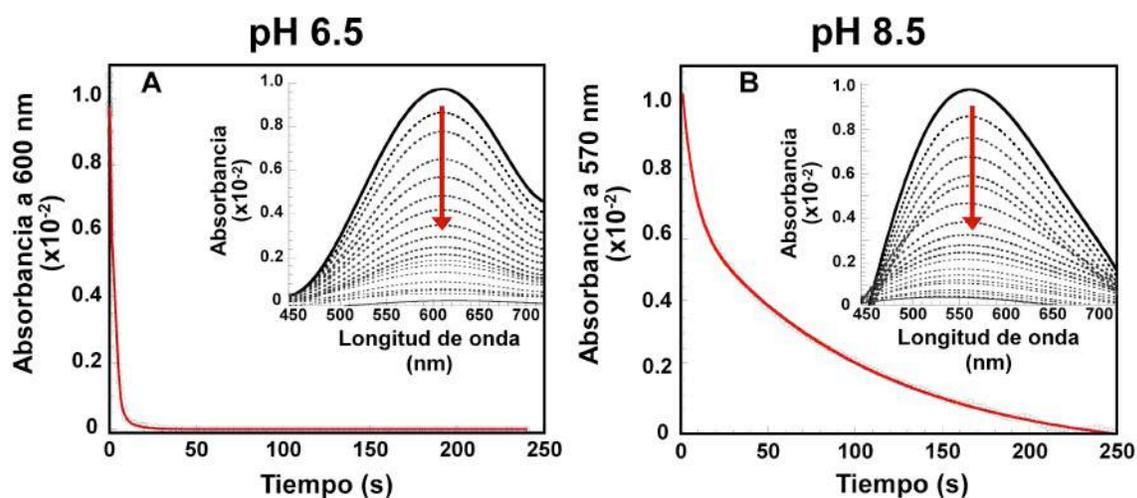


Figura 5.2. Datos de absorción electrónica en *Stopped-Flow* de la reducción del complejo Cu(II)-PrP(106-115) a pH 6.5 (especie 3N1O) (A) y a pH 8.5 (especie 4N) (B) con 20 equivalentes de ascorbato. En los recuadros se muestran espectros representativos de absorción electrónica, mostrando la pérdida en la intensidad de la banda asociada con las transiciones d-d en función del tiempo.

Tabla 5.2. Constantes de rapidez de primer orden de la reducción de los complejos Cu(II)-PrP(106-115) a pH 6.5 y 8.5, $k_{ET(3N1O)}$ y $k_{ET(4N)}$, respectivamente.

Complejo	pH	Constantes de rapidez de primer orden (s^{-1})	
		Fase rápida	Fase lenta
Cu(II)-4N	8.5	0.134 ± 0.023	0.010 ± 0.004
Cu(II)-3N1O	6.5	0.287 ± 0.010	

Considerando los valores calculados de energía de reorganización para estos dos complejos (sección 5.2.1), se esperaría la tendencia opuesta, dado que λ_{3N1O} es mayor que λ_{4N} . Esta tendencia opuesta puede producirse por las diferencias encontradas en el potencial de reducción de las especies Cu(II)-3N1O y Cu(II)-4N (sección 5.2.2), lo cual, puede resultar en diferentes fuerzas impulsoras para cada reacción.

5.2.4. Análisis de la velocidad de reacción en la reducción de los complejos Cu(II)-3N1O y Cu(II)-4N usando la ecuación de Marcus.

Usando la ecuación de Marcus de transferencia electrónica semiclásica¹⁹ se cálculo la relación entre las constantes de rapidez que presentan ambos complejos Cu(II)-3N1O y Cu(II)-4N, $k_{ET(3N1O)}/k_{ET(4N)}$. Para esto se consideraron los valores calculados de la energía de reorganización (λ_{3N1O} y λ_{4N}) y los valores ΔG°_{3N1O} y ΔG°_{4N} estimados (sección 5.1.1 y 5.2.2).

Asumiendo que el termino H_{AB} es comparable para ambos procesos de reducción, esto es $H_{AB(3N1O)}^2 = H_{AB(4N)}^2$, la razón $k_{ET(3N1O)}/k_{ET(4N)}$ toma la forma de la ecuación 5.6.

$$\frac{k_{ET(3N1O)}}{k_{ET(4N)}} = \frac{\lambda_{(4N)}^{\frac{1}{2}}}{\lambda_{(3N1O)}^{\frac{1}{2}}} e^{\frac{(\Delta G^\circ_{(4N)} + \lambda_{(4N)})^2}{4\lambda_{(4N)}k_B T} - \frac{(\Delta G^\circ_{(3N1O)} + \lambda_{(3N1O)})^2}{4\lambda_{(3N1O)}k_B T}} \quad (5.6)$$

Donde, sustituyendo los valores de λ_{3N1O} , λ_{4N} , ΔG°_{3N1O} y ΔG°_{4N} se obtiene: $k_{ET(3N1O)}/k_{ET(4N)} = 2.3$. Este valor es consistente con lo encontrado experimentalmente en las cinéticas de reducción, ($k_{ET(3N1O)}/k_{ET(4N)} = 2.14$, valor experimental). Por lo tanto, las diferencias en los potenciales de reducción de los complejos Cu(II)-3N1O y Cu(II)-4N dan como resultado una reducción más rápida en el complejo Cu(II)-3N1O a comparación de la que ocurre en el complejo Cu(II)-4N, a pesar de que la energía de reorganización es mayor para la especie Cu(II)-3N1O.

5.2.5. Efecto de la Met109 y Met112 en la reducción del complejo Cu(II)-PrP(106-115) a pH 6.5.

Con el fin de evaluar el efecto que la Met109 y la Met112 tienen sobre la rapidez de reducción del complejo Cu(II)-3N1O, se estudió la reducción con ascorbato de los complejos Cu(II)-PrP(106-115)M109A, Cu(II)-PrP(106-115)M112A y Cu(II)-PrP(106-115)M109&M112A a pH 6.5. La Figura 5.3 muestra trazas representativas de las cinéticas de reducción en *Stopped-Flow*, seguidas por UV-Vis y la Tabla 5.3 enlista los valores de las constantes de rapidez para cada complejo que contiene las variantes Met-Ala y su comparación con el complejo Cu(II)-PrP(106-115).

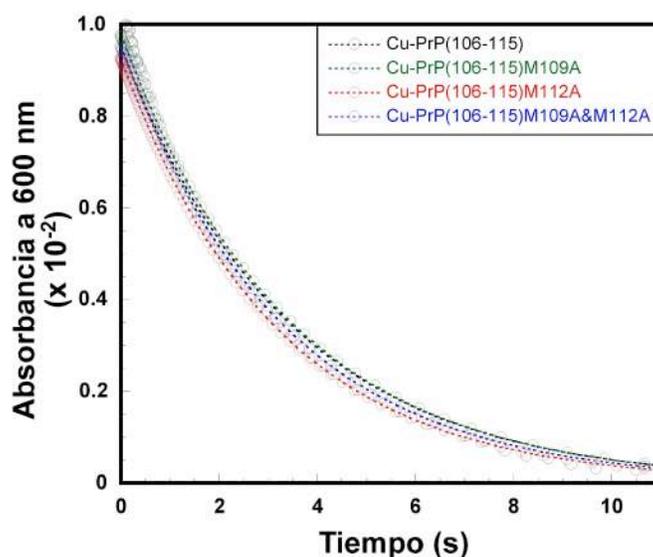


Figura 5.3. Datos de absorción en *Stopped-Flow* (círculos) y el ajuste de los datos (líneas punteadas) de la reducción de Cu(II)-PrP(106-115), Cu(II)-PrP(106-115)M109A, Cu(II)-PrP(106-115)M112A y Cu(II)-PrP(106-115)M109&M112A a pH 6.5 con 20 equivalentes de ascorbato.

Tabla 5.3. Constantes de rapidez de primer orden de la reducción de los complejos Cu(II)-PrP(106-115) y sus variantes Met-Ala a pH 6.5.

Péptido	Constantes de rapidez de primer orden (s ⁻¹)
PrP(106-115)	0.287 ± 0.010
PrP(106-115)M109A	0.295 ± 0.027
PrP(106-115)M112A	0.318 ± 0.024
PrP(106-115)M109&M112A	0.327 ± 0.023

Como se puede apreciar, dentro del error experimental, los complejos Cu(II)-PrP(106-115)M109A, Cu(II)-PrP(106-115)M112A y Cu(II)-PrP(106-115)M109&M112A a pH 6.5 exhiben la misma rapidez de reducción que el complejo Cu(II)-PrP(106-115). Estos resultados sugieren que en la reducción del complejo Cu(II)-PrP(106-115), a pH 6.5, primero ocurre la transferencia electrónica, seguida de un reordenamiento más lento del péptido, en el cual las metioninas entran en la coordinación para formar el complejo Cu(I)-1N1O2S. Sin embargo, experimentalmente se monitorea la desaparición de la banda de absorción asociada al complejo de Cu(II), en consecuencia, no es posible detectar los arreglos posteriores que sufre el complejo en su forma reducida.

5.2.6. Reoxidación del complejo Cu(I)-PrP(106-115) con oxígeno a pH 6.5.

A continuación se investigó el primer paso en la activación de oxígeno por el complejo Cu(I)-PrP(106-115) y los que incluyen las variaciones Met-Ala a pH 6.5. Para esto, los complejos Cu(I)-PrP(106-115), Cu(I)-PrP(106-115)M109A, Cu(I)-PrP(106-115)M112A y Cu(I)-PrP(106-115)M109&M112A se mezclaron con buffer oxigenado y la reacción fue seguida por espectroscopia de absorción electrónica en la región UV-Vis. La Figura 5.4 muestra las trazas de la aparición de la banda asociada con la transición d-d, indicativo de los compuestos de Cu(II), mientras que la rapidez de reoxidación de cada complejo se enlista en la Tabla 5.4.

Es importante notar que, a diferencia de la reducción, la rapidez del proceso de reoxidación sigue una correlación inversa al número de residuos de metionina en el complejo inicial de Cu(I) (Tabla 5.4), siguiendo la tendencia Cu(I)-PrP(106-115) < Cu(I)-PrP(106-115)M109A ~ Cu(I)-PrP(106-115)M112A < Cu(I)-PrP(106-115)M109&M112A. La rapidez de reoxidación del complejo Cu(I)-PrP(106-115)M109&M112A es 6 veces más rápida que aquellos complejos con una metionina y 10 veces más rápida que el complejo Cu(I)-PrP(106-115) que contiene a las dos metioninas. Esto sugiere que la presencia de los residuos de metionina en la coordinación del Cu(I) afectan el paso limitante del proceso de reoxidación.

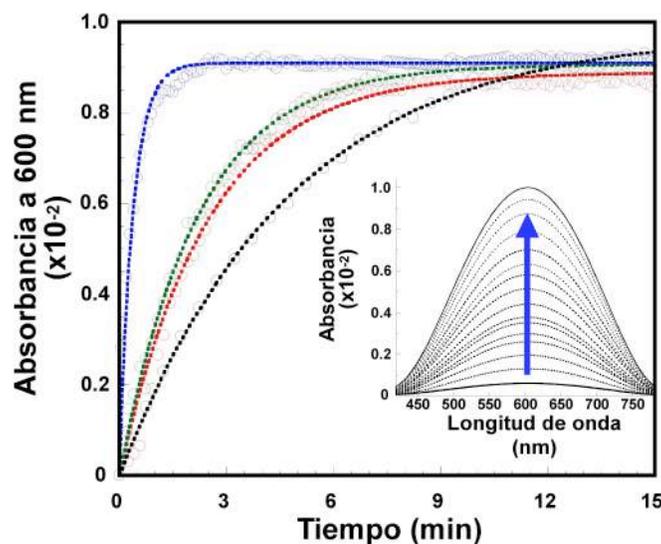


Figura 5.4. Trazas de las cinéticas de reoxidación con O_2 de los complejos Cu(I)-PrP(106-115) (negro) y sus variantes Met-Ala: M109A (verde), M112A (rojo) y M109&M112A (azul) a pH 6.5 seguida por absorción electrónica UV-Vis a 600 nm, (en círculos se encuentran los datos experimentales, mientras que las líneas punteadas muestran el ajuste de los datos). En el recuadro se muestran datos representativos de absorción, mostrando el incremento en la intensidad de la señal asociada a la transición d-d representativa de los complejos de Cu(II).

Tabla 5.4. Constantes de rapidez de primer orden de la reoxidación con O_2 del complejo Cu(I)-PrP(106-115) y sus variantes de Met-Ala a pH 6.5.

Complejo	Constantes de rapidez de primer orden	
	min^{-1}	$\text{s}^{-1} (10^{-3})$
Cu(I)-PrP(106-115)	0.218 ± 0.005	3.63 ± 0.08
Cu(I)-PrP(106-115)M109A	0.425 ± 0.060	7.08 ± 1.00
Cu(I)-PrP(106-115)M112A	0.421 ± 0.009	7.02 ± 0.15
Cu(I)-PrP(106-115)M109&M112A	2.582 ± 0.154	43 ± 2.570

El producto final de cada reacción de Cu(I)-péptido con O_2 fue caracterizado espectroscópicamente por *CD* y *EPR* (Figura 5.5). Por medio de *EPR* se identificó que al menos un 50 % del complejo original es recuperado en todos los casos.

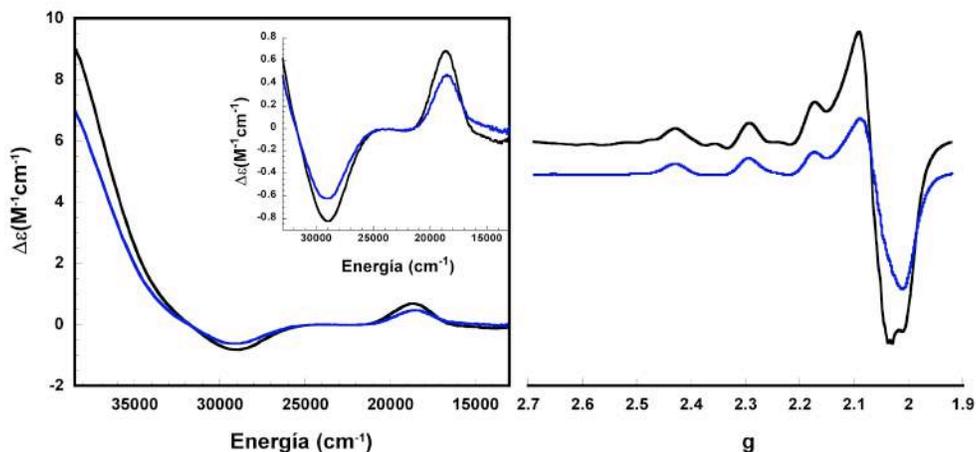


Figura 5.5. Espectros de *CD* y *EPR* representativos del complejo Cu(II)-PrP(106-115) (línea negra) y en el punto final de la cinética de reoxidación (línea azul).

5.2.7. Evaluación del mecanismo de reacción en el proceso de reoxidación.

La reoxidación del complejo Cu(I)-PrP(106-115) con O₂ puede seguir un mecanismo de transferencia electrónica de esfera interna o externa. En un mecanismo de esfera externa, el complejo de Cu(I) puede ser oxidado por el O₂ en un solo paso para regenerar el complejo de Cu(II), mientras que en un mecanismo de esfera interna puede estar involucrada la coordinación del O₂ al complejo de Cu(I) y la formación de un intermediario Cu(II)-O₂⁻, seguida por la liberación del superóxido para regenerar el complejo de Cu(II). La posibilidad de que la reoxidación de los complejos Cu(I)-PrP(106-115) suceda por un mecanismo de reoxidación de esfera externa se evaluó usando la ecuación de Marcus al analizar las constantes de rapidez mostradas en la Tabla 5.4.

La constante de rapidez de esfera externa para la reacción de reoxidación del complejo Cu(I)-PrP(106-115) con O₂ fue obtenida usando la ecuación 5.7.

$$k_{et} = Z e^{\left(\frac{-\Delta G^\ddagger}{RT}\right)} \dots \dots \dots (5.7)$$

Donde, *Z* es el factor de frecuencia y tiene un valor de 10¹¹ M⁻¹s⁻¹. Δ*G*[‡] y la energía de reorganización total λ, se definen en las ecuaciones 5.8 y 5.9, respectivamente

$$\Delta G^\ddagger = \left(\frac{\lambda}{4}\right)\left(\frac{\lambda + \Delta G^\circ}{\lambda}\right)^2 \quad (5.8)$$

$$\lambda = \frac{\lambda_{Cu-PrP} + \lambda_{O_2}}{2} \quad (5.9)$$

Usando el potencial de la reducción de un electrón de O₂ a O₂⁻ (-165 mV vs NHE),²⁰ su energía de reorganización (λ_{O₂}),²¹ el valor estimado para el potencial de reducción de la especie Cu(II)-3N1O de 152 mV (sección 5.2.2) y la energía de reorganización calculada para el sitio (sección 5.2.1), la rapidez de transferencia electrónica de esfera externa del complejo Cu(I)-PrP(106-115) con O₂ se estima ~ 2.81 x 10⁻⁴ s⁻¹, la cual es 10-100 veces más lenta que la determinada experimentalmente (3.6 x 10⁻³ s⁻¹) (Tabla 5.4). Por lo tanto, la transferencia del electrón en la reacción Cu(I)-PrP(106-115) con O₂ probablemente proceda vía un mecanismo de esfera interna que puede estar involucrando la formación de una especie Cu(II)-superóxido. Esto es consistente con un estudio reportado anteriormente en el que detectan de forma indirecta la formación de superóxido cuando someten al complejo Cu-PrP(106-114) a un ciclo de reducción y reoxidación.¹⁸

5.2.8. Oxidación de metioninas catalizada por el complejo de cobre.

Una vez que se caracterizó la reactividad que presenta el complejo Cu(I)-PrP(106-115) frente a oxígeno a pH 6.5, se estudió la susceptibilidad de oxidación del péptido después de que se produce superóxido en un ciclo redox. Para este fin, analizamos los productos obtenidos en el punto final de las cinéticas de reoxidación. Los complejos de Cu(II) resultantes fueron tratados con ácido etilendiaminotetraacético (*EDTA*, por sus siglas en Inglés) y analizados por *MALDI TOF/TOF* (*matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight/time of flight*). Como control, los complejos de Cu(II) antes de ser sometidos al ciclo redox también fueron analizados.

La Figura 5.6 muestra los espectros de masas obtenidos para los péptidos PrP(106-115), PrP(106-115)M109A, PrP(106-115)M112A y PrP(106-115)M109&M112A, antes y después de ser sometidos a un ciclo redox. En particular, observamos que el péptido PrP(106-115) muestra dos nuevas señales con picos m/z que corresponden a la masa del péptido + 16 y + 32 Da. Asimismo, los péptidos que contienen solo una metionina (PrP(106-115)M109A y PrP(106-115)M112A),

muestran una nueva señal asociada con la masa del péptido + 16 Da. En contraste, el péptido sin residuos de metionina (PrP(106-115)M109&M112A) no sufre ninguna modificación. Estos resultados indican que después de un ciclo redox en estos complejos Cu-péptido, se produce la oxidación específica de los residuos de metionina a su forma de sulfóxido de metionina, sin que haya evidencia de la oxidación hasta su forma de sulfona. Por lo tanto el Cu puede estar catalizando la oxidación específica de los residuos de metionina, a través del superóxido generado en la reacción con O₂.

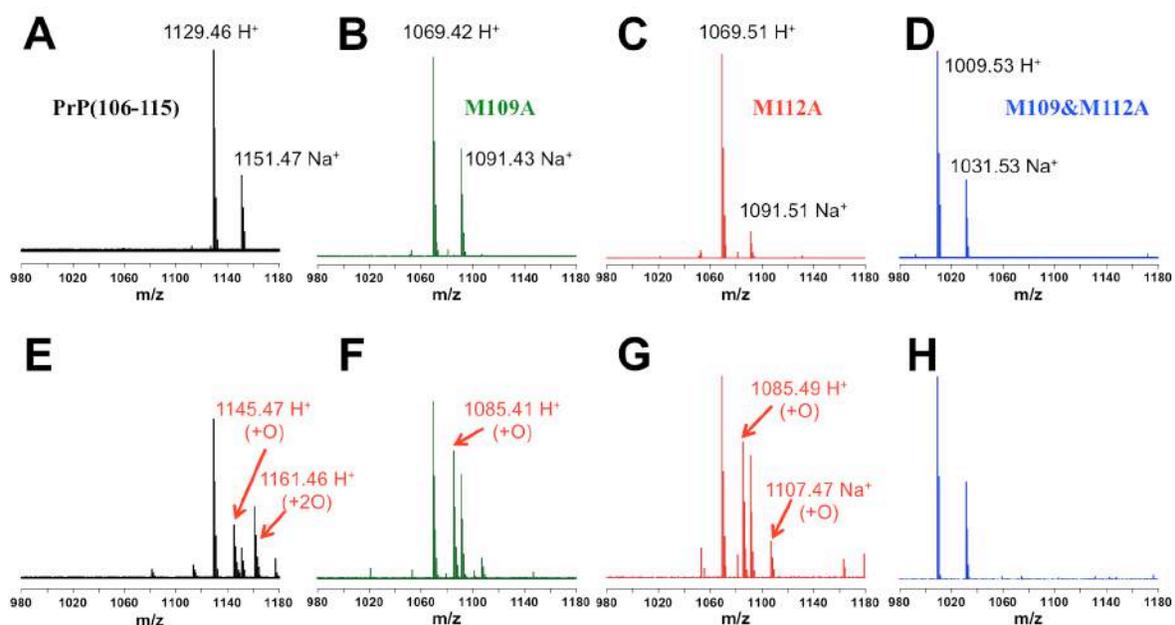


Figura 5.6. Análisis de los péptidos PrP(106-115) (negro), PrP(106-115)M109A (verde), PrP(106-115)M112A (rojo) y PrP(106-115)M109&M112A (azul), por medio de *MALDI TOF/TOF*, antes (A, B, C y D) y después de un ciclo redox con ascorbato y oxígeno (E, F, G y H).

5.3. Discusión

El sitio de la His111 a pH fisiológico coordina Cu(II) y Cu(I) a través del motivo MKHM (Figura 5.7), sin embargo los complejos de coordinación resultantes tienen geometrías y esferas de coordinación muy diferentes: Cu(II)-3N1O vs Cu(I)-1N1O2S a pH 6.5 y Cu(II)-4N vs Cu(I)-2N1O1S a pH 8.5 (Figura 4.21). Esto da como resultado que el cambio en el estado de oxidación del complejo implique una gran energía de reorganización en los sitios (~ 1.79 y 1.6 eV, respectivamente). Estos valores de energía de reorganización son significativamente grandes, si se comparan con sitios de cobre optimizados para soportar transferencia electrónica (por ejemplo sitios de Cu_{T1} y Cu_A) que presentan energías de reorganización en un rango que va de 0.5 a 0.82 eV.²²⁻²⁴ A pesar de esto, los complejos Cu(II)-3N1O y Cu(II)-4N tienen la capacidad para llevar a cabo reacciones óxido-reducción. Por otro lado, aunque el complejo Cu(II)-3N1O tiene una energía de reorganización mayor, su reducción es más rápida que la de la especie Cu(II)-4N, esto se debe a que tiene un potencial de reducción mayor. Considerando que, a pH fisiológico ambos complejos (Cu(II)-3N1O y Cu(II)-4N) están presentes (pK_a de 7.5), nuestros resultados indican que, bajo condiciones reductoras, el complejo Cu(II)-3N1O podría reducirse más rápido. Esto desplazaría el equilibrio entre las especies Cu(II)-3N1O y Cu(II)-4N hacia el complejo Cu(II)-3N1O, favoreciendo la producción del complejo Cu(I)-1N1O2S. Por lo tanto, a pH fisiológico, los complejos 3N1O y 4N son las especies de Cu(II) relevantes, mientras que el complejo Cu(I)-1N1O2S es el modo de coordinación de Cu(I) más favorecido en el sitio de la His111 de la proteína PrP (Figura 5.7). Por otro lado, este complejo Cu(I)-1N1O2S puede reaccionar con O₂. Varios estudios han reportado la actividad redox en complejos Cu-PrP.^{14, 18} Algunos estudios también han reportado la generación de especies reactivas de oxígeno (H₂O₂ o O₂⁻) por complejos Cu-PrP,^{12, 14-15, 17-18} sin embargo se conoce muy poco acerca del mecanismo por el cual el O₂ se activa en los diferentes complejos Cu-PrP.

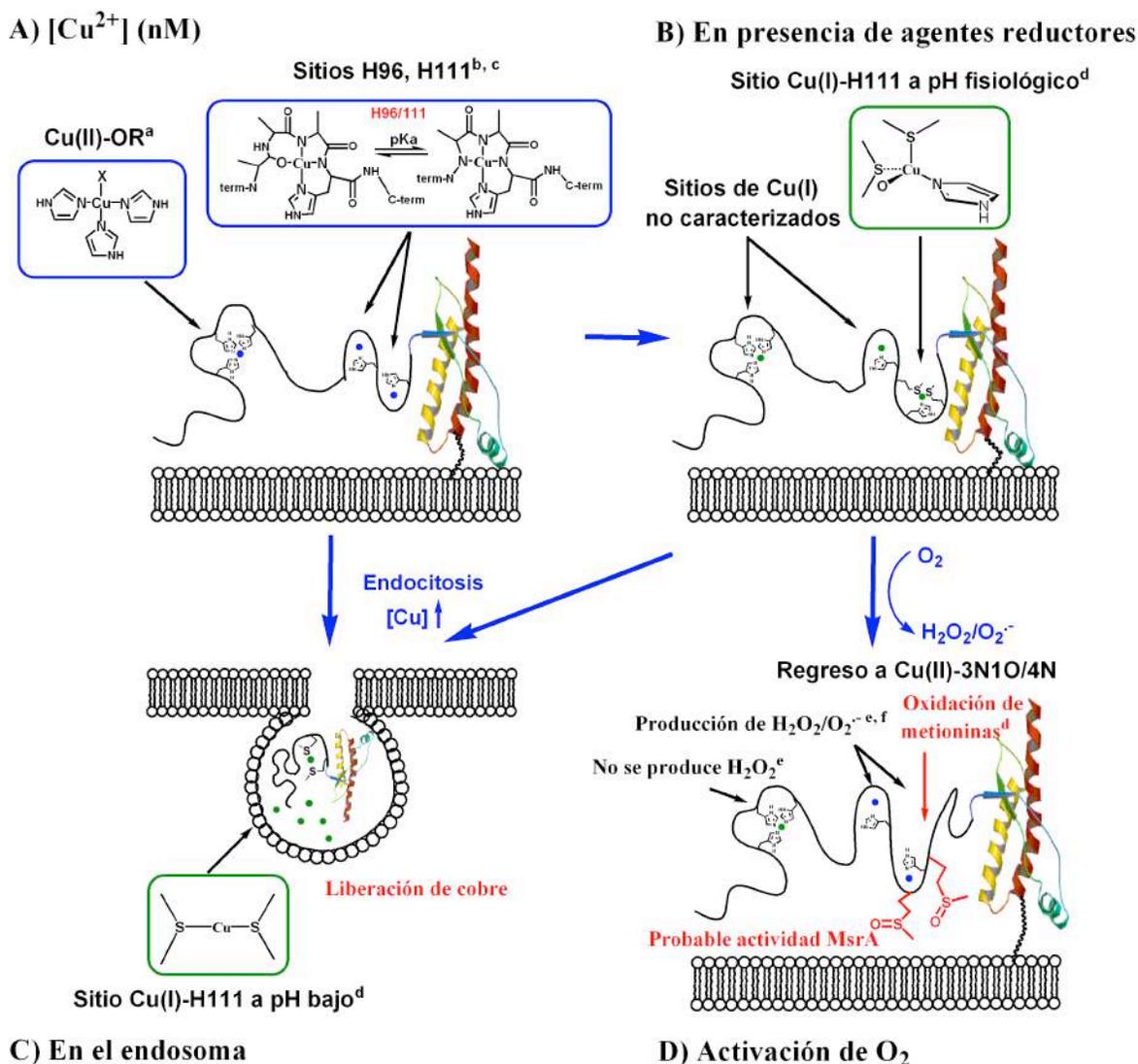


Figura 5.7. Representación esquemática de los principales complejos Cu-PrP^C bajo diferentes condiciones fisiológicas. (A) A bajas concentraciones de Cu(II) (nM) el Cu(II) podría estar coordinado en la región octarepeat (Componente 3, Cu(II)-OR) y en los sitios de His96 e His111 (Cu(II)-3N10 y Cu(II)-4N). (B) En presencia de agentes reductores los complejos de Cu(II) pueden ser reducidos; en el sitio de la His111 la especie más abundante podría ser Cu(I)-1N102S. (C) Altas concentraciones de Cu (100-500 μ M) pueden estimular la endocitosis de la proteína; en los endosomas, únicamente el sitio de la His111 podría coordinar Cu(I) a través de la Met109 y Met112. (D) En el espacio extracelular la activación de oxígeno por el Cu en el sitio de la His111 puede generar superóxido causando la oxidación de los residuos de Met.
^a Ref. 25, ^b Ref. 26, ^c Ref 27, ^d este trabajo, ^e Ref. 17, ^f Ref 18.

En este capítulo usando estudios cinéticos se investigó el primer paso en el mecanismo de activación de oxígeno por el complejo Cu(I)-PrP(106-115) a pH 6.5. Se observó que la rapidez de reoxidación es altamente dependiente de los residuos de metionina. También, se estimó que la

rapidez de reoxidación de esfera externa sería 10 a 100 veces menor que los valores experimentales provenientes de los datos cinéticos. Por lo tanto se concluye que el complejo Cu(I)-1N1O2S en el sitio de la His111 reacciona con O₂ siguiendo un mecanismo de transferencia electrónica de esfera interna que involucra la coordinación de O₂ al complejo de Cu(I) y la formación de un intermediario Cu(II)-superóxido, seguido de la liberación del superóxido y la regeneración parcial del complejo de Cu(II). También se demostró que en esta reacción catalizada por el Cu, los residuos de Met son selectivamente oxidados a sulfóxido. (Figura 5.7).

Ha sido propuesto que la oxidación de metioninas puede desencadenar cambios estructurales que conducen a la agregación de la proteína PrP^{C11,28} o al contrario, que puede prevenir la formación de la forma fibrilar.²⁹ Más allá de eso, los residuos de Met en la PrP^C pueden actuar como una defensa antioxidante innata de la proteína por su habilidad de limpiar o contener el superóxido producido, sufriendo oxidación y formando sulfóxido de metionina. Sin los residuos de metionina, el superóxido producido podría causar daño en otras proteínas o componentes celulares. Por otro lado, existe en las células la enzima reductasa de sulfóxido de metionina (MsrA y MsrB) que se encarga de reducir el sulfóxido de metionina a metionina, la cual, podría estar nuevamente disponible para reaccionar con especies oxidantes como O₂⁻.³⁰ De hecho, se ha observado que en cerebros afectados con la enfermedad de Alzheimer se produce una disminución de la actividad de MsrA comparado con sujetos control,³¹ mientras que la estimulación de la actividad MsrA puede ayudar a proteger a las neuronas de la toxicidad de β amiloide.³² Por lo tanto, es posible que un proceso reversible de oxidación/reducción de los residuos de metionina en el N-terminal de la PrP^C pueda estar ayudando a contener las especies reactivas de oxígeno generadas por reacciones óxido-reducción en los sitios de Cu-PrP. Esto puede ser consistente con la noción de que la PrP^C desempeña un papel en la defensa antioxidante de la célula.³³

5.4. Conclusiones

La coordinación de Cu(I) al fragmento PrP(106-115) a pH fisiológico puede generar los modos de coordinación Cu(I)-1N1O2S y Cu(I)-2N1O1S. Por medio de estudios cinéticos, hemos demostrado que bajo condiciones reductoras el complejo más poblado en el sitio de His111 puede ser la especie Cu(I)-1N1O2S, la cual, es capaz de activar oxígeno.

Nuestro estudio proporciona una mayor comprensión en el mecanismo molecular de la reacción de activación de oxígeno en este sitio. El complejo Cu(I)-1N1O2S reacciona con O₂ a través de un mecanismo de esfera interna, probablemente involucrando la formación de un intermediario Cu(II)-O₂⁻, seguido de la liberación del superóxido y la regeneración parcial del complejo de Cu(II). Los residuos de Met son oxidados a sulfóxido en este proceso. La habilidad de estos residuos para contener las especies reactivas de oxígeno podrían jugar un papel muy importante en las propiedades antioxidantes propuestas para la PrP^C.

5.5. Referencias

1. Brown, D. R.; Qin, K.; Herms, J. W.; Madlung, A.; Manson, J.; Strome, R.; Fraser, P. E.; Kruck, T.; von Bohlen, A.; Schulz-Schaeffer, W.; Giese, A.; Westaway, D.; Kretzschmar, H., *Nature*, **1997**, *390*, 684-687.
2. Pauly, P. C.; Harris, D. A., *J. Biol. Chem.* **1998** *273*, 33107–33110.
3. Brown, D. R.; Clive, C.; Haswell, S. J., *J. Neurochem.* **2001**, *76*, 69-76.
4. Vassallo, N.; Herms, J., *J. Neurochem.* **2003**, *86*, 538-544.
5. Kozłowski, H.; Łuczowski, M.; Remelli, M., *Dalton Trans.* **2010**, *39*, 6371-6385.
6. Roucou, X.; Gains, M.; LeBlanc, A. C., *J. Neurosci. Res.* **2004**, *75*, 153–161
7. Kozłowski, H.; Luczkowski, M.; Remelli, M.; Valensin, D., *Coord. Chem. Rev.* **2012**, *256*, 2129-2141.
8. Lehmann, S., *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 187-192.
9. Campbell, A.; Smith, M. A.; Sayre, L. M.; Bondy, S. C.; Perry, G., *Brain Res. Bull.* **2001**, *55*, 125-132.
10. Bush, A. I., *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 184-191.
11. Requena, J. R.; Groth, D.; Legname, G.; Stadtman, E. R.; Prusiner, S. B.; Levine, R. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2001**, *98*, 7170-7175.
12. Nadal, R. C.; Abdelraheim, S. R.; Brazier, M. W.; Rigby, S. E.; Brown, D. R.; Viles, J. H., *Free Radic. Biol. Med.* **2007**, *42*, 79-89.
13. Turnbull, S.; Tabner, B. J.; Brown, D. R.; Allsop, D., *Biochemistry*, **2003**, *42*, 7675-7681.
14. Turnbull, S.; Tabner, B. J.; Brown, D. R.; Allsop, D., *Neurosci. Lett.* **2003**, *336*, 159-162.
15. Kawano, T., *Int. J. Biol. Sci.* **2007**, *3*, 57-63.
16. Shiraishi, N.; Nishikimi, M., *FEBS Lett.* **2002**, *511* 118-122.

17. Liu, L.; Jiang, D.; McDonald, A.; Hao, Y.; Millhauser, G. L.; Zhou, F., *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 12229-12237.
18. Shearer, J.; Soh, P., *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 710-719.
19. Marcus, R. A.; Sutin, N., *Biochim. Biophys. Acta*, **1985**, *811*, 265-322.
20. Wood, P. M., *Biochem. J.* **1988**, *253*, 287-289.
21. Kjaergaard, C. H.; Qayyum, M. F.; Wong, S. D.; Xu, F.; Hemsworth, G. R.; Walton, D. J.; Young, N. A.; Davies, G. J.; Walton, P. H.; Salomon Johansen, K.; Hodgson, K. O.; Hedman, B.; Solomon, E. I., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2014**, *24*, 8797-8802.
22. Di Bilio, A. J.; Hill, M. G.; Bonander, N.; Karlsson, G.; Villahermosa, R. M.; Malmstrom, B. G.; Winkler, J. R.; Gray, H. B., *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9921-9922.
23. Mats, H.; Olsson, M.; Ryde, U., *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7866-7876.
24. Farver, O.; Hwang, H. J.; Lu, Y.; Pecht, I., *J. Phys. Chem. B*, **2007**, *111*, 6690-6694.
25. Chattopadhyay, M.; Walter, E. D.; Newell, D. J.; Jackson, P. J.; Aronoff-Spencer, E.; Peisach, J.; Gerfen, G. J.; Bennett, B.; Antholine, W. E.; Millhauser, G. L., *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12647-12656.
26. Hureau, C.; Mathe, C.; Faller, P.; Mattioli, T. A.; Dorlet, P., *J. Biol. Inorg. Chem.* **2008**, *13*, 1055-1064.
27. Rivillas-Acevedo, L.; Grande-Aztatzi, R.; Lomeli, I.; Garcia, J. E.; Barrios, E.; Teloxa, S.; Vela, A.; Quintanar, L., *Inorg. Chem.* **2011**, *50*, 1956-1972.
28. Younan, N. D.; Nadal, R. C.; Davies, P.; Brown, D. R.; Viles, J. H., *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 28263-28275.
29. Breydo, L.; Bocharova, O. V.; Makarava, N.; Salnikov, V. V.; Anderson, M.; Baskakov, I. V., *Biochemistry*, **2005**, *44*, 15534-15543.
30. Lowther, W. T.; Brot, N.; Weissbach, H.; Matthews, B. W., *Biochemistry*, **2000**, *39*, 13307-13312.
31. Gabbita, S. P.; Aksenov, M. Y.; Lovell, M. A.; Markesbery, W. R., *J. Neurochem.* **1999**, *73*, 1660-1666.
32. Moskovitz, J.; Maiti, P.; Lopes, D. H.; Oien, D. B.; Attar, A.; Liu, T.; Mittal, S.; Hayes, J.; Bitan, G., *Biochemistry*, **2011**, *50*, 10687-10697.
33. Klamt, F.; Dal-Pizzol, F.; Da Frota Jr., M. L. C.; Walz, R.; Andrades, M. E.; Da Silva, E. G.; Brentani, R. R.; Izquierdo, I.; Moreira, J. C. F., *Free Radic. Biol. Med.* **2001**, *30*, 1137-1144.

6. Coordinación de Cu al sitio N-terminal de la proteína α sinucleína.

6.1. Antecedentes.

6.1.1. Enfermedad de Parkinson.

La enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa con mayor incidencia en la actualidad.¹⁻² Se estima que afecta entre el 1 y 2 % de la población mayor de 60 años.³ Esta enfermedad descrita inicialmente en 1817 por James Parkinson, se trata de un desorden neurodegenerativo progresivo, caracterizado por el deterioro de la función motora. Se manifiesta por la presencia de temblor en reposo, rigidez, bradicinesia, inestabilidad postural, así como deterioro cognitivo y emocional. Esta sintomatología se produce por la afectación de la vía dopaminérgica nigro-estriatal, causada por la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la *substancia nigra pars compacta* (Figura 6.1).⁴⁻⁵

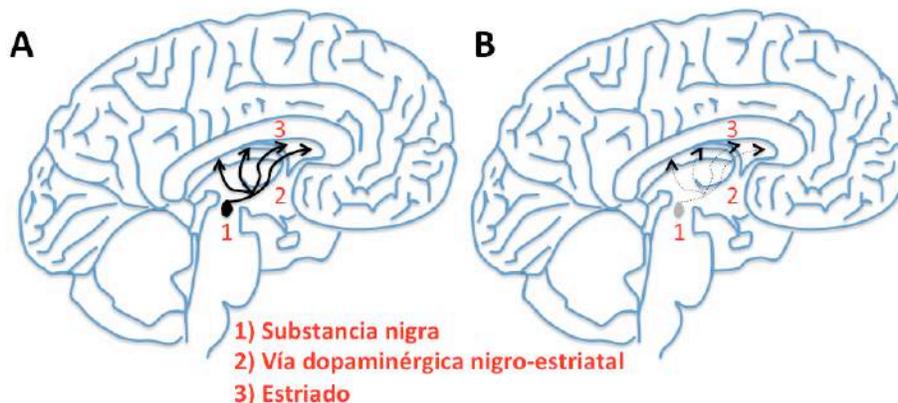


Figura 6.1. Representación esquemática de la pérdida de la vía dopaminérgica nigro-estriatal en la EP. (A) Cerebro normal, (B) Cerebro con EP.

Los síntomas motores comienzan a manifestarse cuando se ha perdido entre 70-80 % de las neuronas dopaminérgicas, mientras que los síntomas debilitantes más graves (como la inestabilidad postural) ocurren cuando se pierde el 90 %.⁶ En promedio, los síntomas empiezan a manifestarse en pacientes de 60-65 años, solo el 10 % de los pacientes con EP muestra síntomas antes de los 40 años.⁵ Por otro lado, en neuronas dopaminérgicas que sobreviven, así como en núcleos del tallo cerebral, amígdala y regiones corticales, se presentan inclusiones extracelulares

y citosólicas, conocidas como cuerpos de Lewi y neuritas de Lewi. Los cuerpos de Lewi típicamente tiene un tamaño de 5-25 μm de diámetro, presentan un núcleo denso, compuesto por material granular filamentoso y un halo más claro formado por filamentos orientados radialmente, mientras que las neuritas de Lewi muestran una estructura filiforme.⁷ Se ha identificado que el mayor componente de estas inclusiones es la proteína α sinucleína (AS) en forma agregada.⁸⁻⁹

De hecho, mutaciones autosómicas dominantes en el gen que codifica para la proteína AS se han identificado como la causa de la forma hereditaria de la enfermedad de Parkinson (10-20 % de los casos). Estas mutaciones corresponden a las sustituciones A53T, A30P y E46K.¹⁰⁻¹² Lo anterior, así como el hecho de que ratones transgénicos que sobreexpresan la proteína AS desarrollan inclusiones citoplasmáticas y deficiencias motoras,¹³⁻¹⁴ ha confirmado el papel crítico que la proteína AS tiene en la enfermedad de Parkinson.¹⁵

6.1.2. Proteína α sinucleína (AS).

La AS es una proteína citosólica perteneciente a la familia de las sinucleínas (α -, β -, γ -sinucleína y *synoretin*) las cuales son expresadas en vertebrados. La proteína AS tiene 140 aminoácidos (14 kDa) distribuidos en tres diferentes regiones: la región N-terminal (residuos 1-60) esta involucrada en la unión con lípidos y contiene repeticiones imperfectas de la secuencia KTKEGV; la región conocida como *NAC* (*non amyloid- β component*, residuos 61-95), que es altamente hidrofóbica y responsable del inicio de la fibrilización; y la región del C-terminal (residuos 96-140), rica en aminoácidos de Pro, Asp y Glu, esenciales para mantener soluble a la proteína (Figura 6.2).¹⁶ En el citosol, la AS es una proteína monomérica que, aunque se mantiene compacta gracias a contactos intramoleculares (C-terminal y la región NAC, C- y N-terminal), carece de una estructura secundaria definida,¹⁷⁻¹⁸ mientras que, asociada a superficies con lípidos o micelas puede formar dos α hélice antiparalelas (residuos 3-37 y 45-92, Figura 6.2).¹⁹⁻²⁰

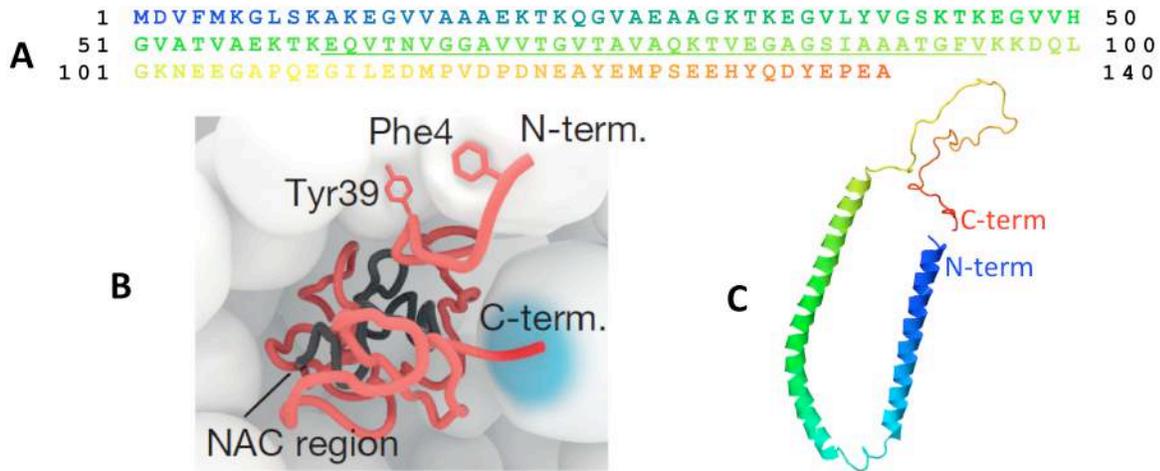


Figura 6.2. (A) Secuencia de la proteína AS, mostrando la región *NAC* subrayada. (B) Representación de la proteína AS en el citosol, la región *NAC* (negro) se encuentra protegida de la exposición al medio por el N- y C-terminal, quienes interactúan con componentes intracelulares. Adaptada con permiso de Macmillan Publishers Ltd: Nature, Theillet, F-X. Et al., 530, 45-50, copyright, 2016. (C) Conformación que adquiere la proteína AS en presencia de micelas; figura construida a partir de las coordenadas xyz descargadas del PDB 2KKW.

La proteína AS es expresada predominantemente en neuronas del sistema nervioso central, se localiza principalmente en terminales presinápticas, en las proximidades de vesículas sinápticas y representa el 1 % del total de las proteínas solubles en el estriado.²¹⁻²² En condiciones fisiológicas se ha propuesto que la proteína AS interactúa con proteínas que regulan la síntesis y absorción de dopamina, vinculando su función con el metabolismo de ésta.²³ También se ha propuesto que juega un papel en la regulación de la liberación de neurotransmisores, operando como una proteína chaperona que promueve el ensamble del complejo *SNARE* (*soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor*, complejo que resulta esencial para la liberación de neurotransmisores) a través de la unión a la proteína *SNARE synaptobrevin-2*.²⁴⁻²⁶ Además, se ha propuesto que tiene un papel en la protección de terminales nerviosas en conjunto con la proteína *cysteine-string a (CSPA)*.²⁷ En la enfermedad de Parkinson, aún no está claro como la proteína AS puede desencadenar la muerte celular, pero está comprobado que la agregación de la proteína AS está implicada en los efectos patológicos de la misma.

Se ha propuesto por ejemplo, que el plegamiento anómalo de la proteína AS impide su habilidad de asociarse a membranas, causando su acumulación en el citosol y promoviendo su

oligomerización y agregación. De esta forma, la AS podría interrumpir el metabolismo de la dopamina, incrementando los niveles de dopamina intracelulares, que a su vez, aumenta el estrés oxidativo, generando un círculo que termina en la muerte neuronal.^{23, 28}

Aunque el inicio de la agregación de la proteína AS aún no está entendido por completo, se ha propuesto que iones metálicos pueden estar involucrados en el proceso. Esta propuesta surgió por el hecho de que en pacientes con la EP la concentración de diversos iones metálicos se ve aumentada, en comparación a individuos control (aumento de Fe, Zn y Al, en sustancia nigra y Cu en fluido cerebroespinal).²⁹⁻³⁰ Por otro lado, estudios pioneros demostraron que los iones metálicos Al(III), Cu(II), Fe(III) y Mn(II) en concentración mM, incrementan la rapidez de fibrilización de la proteína AS *in vitro*,³¹ sin embargo, posteriormente se demostró que bajo concentraciones μM solo el Cu(II) acelera la formación de fibras de la proteína AS.³²

Se han propuesto varios escenarios para explicar como el Cu(II) acelera la fibrilización de la proteína AS. El caso más simple puede ser que la formación de complejos Cu(II)-AS produzca un cambio estructural en la proteína que pudiera generar especies propensas a la agregación. Por otro lado, se ha identificado que en neuronas dopaminérgicas de pacientes con la EP ocurre un incremento de estrés oxidativo y al mismo tiempo reducción de la defensa antioxidante.³³

Debido a lo anterior, el estudio de la naturaleza estructural de las especies Cu-AS, así como de su reactividad ha tomado gran importancia en los últimos 10 años, ya que se ha propuesto que la interacción Cu-AS y la reactividad de estos complejos podrían proveer un vínculo entre la agregación y acumulación de la proteína AS, así como con el daño oxidativo que causa la muerte neuronal en la enfermedad de Parkinson.

6.1.3. Coordinación de cobre a la proteína AS.

En los últimos años, usando una combinación de varias técnicas espectroscópicas como *NMR*, *EPR*, *CD* y utilizando mutaciones puntuales en la proteína AS, así como el uso de fragmentos peptídicos sintéticos, se identificó que la proteína AS tiene tres sitios de coordinación de Cu(II). Estos sitios presentan diferentes características, tanto estructurales como de afinidad.¹⁶ (Figura 6.3).

En el C-terminal se identificó un sitio de coordinación en la región $^{119}\text{DPDNEA}^{124}$, este sitio, además de tener la menor afinidad ($K_d = 10^{-3}$ M), presenta también baja especificidad por Cu(II), ya que coordina igualmente otros iones metálicos.^{32, 34}

Por otro lado, en el N-terminal se identificaron dos sitios de coordinación específicos para Cu(II). El de menor afinidad se encuentra alrededor de la His50 ($K_d = 35 \times 10^{-6}$ M). Aquí, el modo de coordinación es dependiente de pH, ya que involucra la desprotonación de amidas de la cadena peptídica. A pH bajo (6.5), se ha propuesto un modo de coordinación 1N3O, mientras que a pH alto (8.2) el modo de coordinación es 3N1O, involucrando al nitrógeno imidazol de la His50, amidas desprotonadas de la cadena peptídica y un ligando oxígeno que podría provenir de algún grupo carbonilo o de una molécula de H₂O.³⁵⁻³⁸ Por último, el sitio de mayor afinidad por Cu(II) se encuentra en el N-terminal de la proteína AS ($K_d = 0.11 \times 10^{-6}$ M) y presenta un modo de coordinación en la parte ecuatorial 2N2O a pH 7.5. En este sitio, el Cu(II) es anclado ecuatorialmente, por medio del nitrógeno del amino terminal, la amida desprotonada de la cadena peptídica del Asp2, el oxígeno del grupo carboxilato de la cadena lateral del Asp2 y un segundo oxígeno, que proviene de una molécula de agua.^{16, 36}

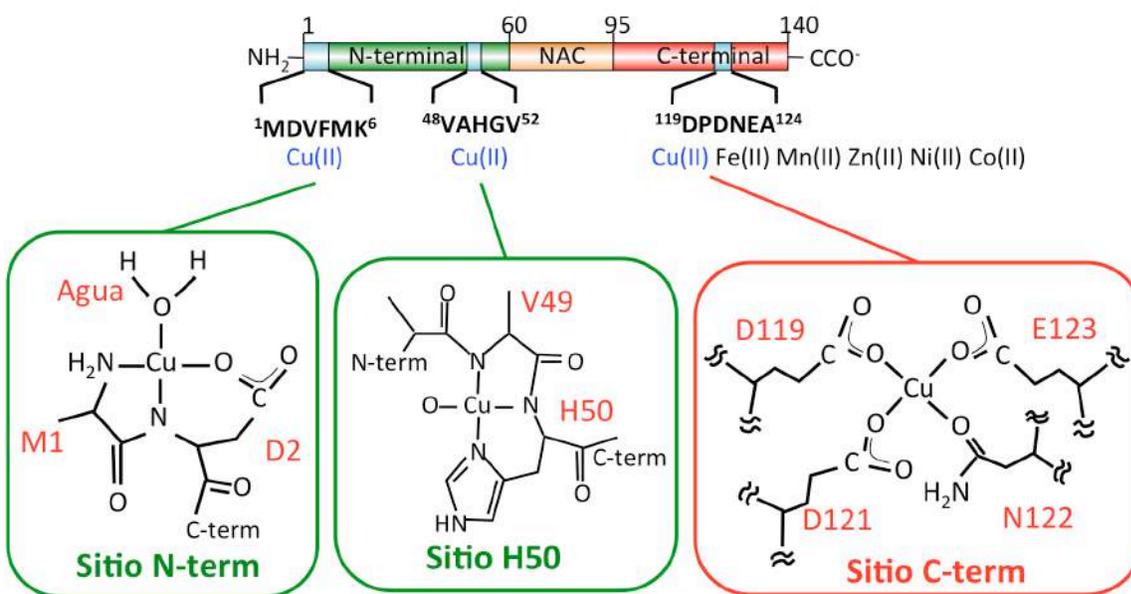


Figura 6.3. Coordinación de Cu(II) a los tres sitios de enlace de la proteína AS.

Así mismo, también se ha propuesto que los complejos Cu(II)-AS pueden participar en la generación de ROS, que a su vez, pueden causar modificaciones oxidativas en la proteína AS, lo cual, pudiera tener una repercusión en la estabilidad de la misma.³⁹⁻⁴³ La reactividad de los

complejos Cu(II)-AS involucra por lo tanto, la formación de especies reducidas Cu(I)-AS. Debido a lo anterior, la caracterización estructural de los complejos Cu(I)-AS, así como su reactividad frente a oxígeno, es un tema de gran relevancia que ha tomado importancia en los últimos años.

Al contrario de lo que sucede con Cu(II), la coordinación de Cu(I) a la proteína AS no ha sido caracterizada a detalle. Utilizando *NMR*, se identificó que a pH 6.5, igual que con Cu(II), con Cu(I) existen tres sitios de coordinación en diferentes regiones y con diferente afinidad.⁴⁴⁻⁴⁵ El sitio de menor afinidad ($K_d = 270 \times 10^{-6}$ M) se encuentra en el C-terminal (¹¹⁶MPVDPDNEAYEM¹²⁷). En este sitio se identificó que la Met116 y Met117 son los principales grupos que anclan el Cu(I). En el N-terminal, alrededor de la His50 se encuentra otro sitio de coordinación de Cu(I) con una afinidad mayor ($K_d = 50 \times 10^{-6}$ M). Por último, el sitio de mayor afinidad se encuentra también en el N-terminal de la proteína AS, e involucra los residuos ¹MDVFM⁵ ($K_d = 20 \times 10^{-6}$ M), siendo los residuos de metionina los principales grupos coordinantes. Recientemente, por medio de *XAS*, se propuso que el modo de coordinación a pH 7.5 del ión Cu(I) con el fragmento AS(1-15) es 2S2N/O, donde, además de las dos metioninas, participan otros dos ligandos que pueden ser nitrógeno u oxígeno.⁴⁶ Este último sitio ha sido de gran interés ya que presenta la mayor afinidad por el ión metálico y se ha identificado que en presencia de oxígeno conduce a la oxidación selectiva de los residuos de metionina 1 y 5.⁴³ La reactividad en este sitio puede desempeñar un papel importante en la generación de *ROS*, la formación de agregados de AS y/o en la pérdida de la función biológica de la proteína AS, por lo tanto su estudio es de gran importancia. Asimismo, se requiere tener una descripción completa tanto del sitio de coordinación de Cu(I), como de la reactividad que presenta frente a oxígeno.

Por último, reportes recientes han planteado la posibilidad de que, fisiológicamente, la proteína AS se encuentra acetilada en el amino terminal.⁴⁷ Esto podría suponer severas implicaciones, por lo que se necesita evaluar los efectos que la acetilación del N-terminal tiene sobre la coordinación y la reactividad del sitio.

En este capítulo se describirá la caracterización estructural de la coordinación de Cu(II) y Cu(I) en el sitio N-terminal de la proteína AS. Respecto a la coordinación de Cu(II), usando *DFT*, se evaluaron modelos diseñados para identificar la participación del azufre de la cadena lateral de Met como ligando axial en la coordinación del ión metálico, con la finalidad de obtener el escenario completo de la esfera de coordinación de Cu(II) en el sitio N-terminal de la proteína

AS. Este estudio se realizó partiendo de resultados previos, en los cuales, por medio de *CD* y *EPR*, fueron identificados los ligandos ecuatoriales.³⁶

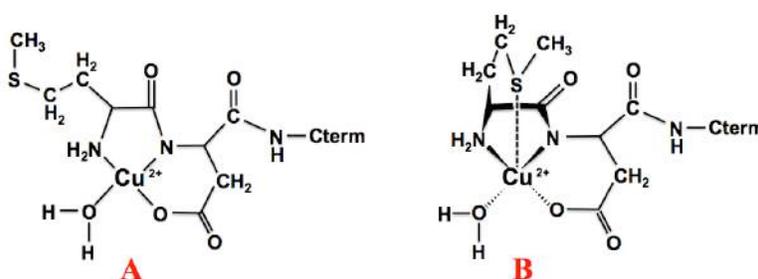
Por otro lado, usando *XAS* y *DFT* se elucidó la coordinación de Cu(I) en el sitio N-terminal de la proteína AS, asimismo, se evaluó el efecto de la acetilación del N-terminal sobre la coordinación del Cu(I).

6.2. Resultados.

6.2.1. Evaluación de la Met1 y Met5 como ligando axial en la coordinación de Cu(II) al fragmento AS(1-6) mediante cálculos de estructura electrónica.

La coordinación de Cu(II) al N-terminal de la proteína AS ha sido previamente estudiada por medio de *CD* y *EPR*.^{36, 48} Los resultados indican que en la región ecuatorial, el Cu(II) presenta un modo de coordinación 2N2O, y los ligandos son: el grupo NH₂ del amino terminal, el nitrógeno proveniente de la amida desprotonada del Asp2 (N_{D2}⁻), un oxígeno proveniente de la cadena lateral del Asp2 (β-COO_{D2}⁻) (lo cual permite la formación de dos anillos adyacentes de 5 y 6 miembros que contribuyen al efecto quelato) y un oxígeno de una molécula de H₂O. Además, se ha propuesto la posible participación de la Met1 como ligando axial (Esquema 6.1).

Esquema 6.1. Modos de coordinación tetracoordinado (A) y pentacoordinado (B) propuestos para el complejo Cu(II)-AS(1-6).



Para discernir entre los dos modelos de coordinación propuestos en el Esquema 6.1, se realizaron cálculos *UKS* (*unrestricted Kohn-Sham*) con el complejo Cu(II)-AS(1-6), usando modelos diseñados para evaluar la posición axial de la esfera de coordinación. Después de optimizar las estructuras, se realizó un análisis de frecuencias para comprobar que los puntos estacionarios corresponden a un mínimo. Por último, se calcularon los parámetros de *EPR* para cada modelo y los resultados fueron comparados con los reportados experimentalmente.³⁶ Para esta finalidad, se

probaron modelos tetracoordinados (etiquetados con el número 4) con una coordinación 2N2O, y otros pentacoordinados (etiquetados con el número 5) con un modo de coordinación 2N2O1S, en los cuales el ligando axial es un átomo de azufre de la Met1 o Met5. Así también, se evaluó el efecto de la conformación del péptido (a, b, t y e, que indican conformación alfa hélice, hoja beta, giro y extendida, respectivamente) sobre la coordinación del ión metálico (Tabla 6.1). La Figura 6.4 muestra la distribución energética de los ocho modelos que fueron evaluados, mientras que los parámetros geométricos y energéticos se enlistan en la Tabla 6.1.

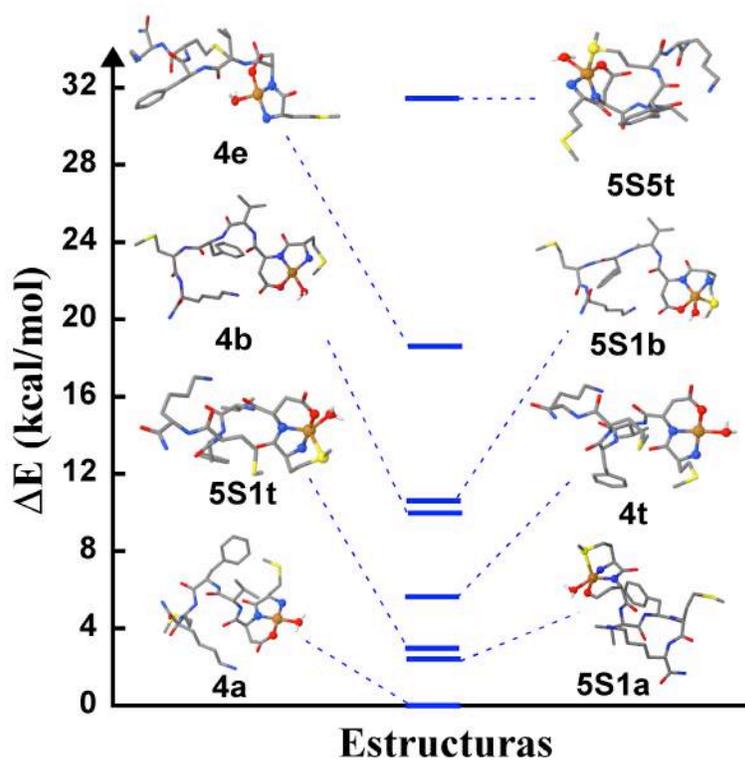


Figura 6.4. Diagrama energético de las estructuras tetra y pentacoordinadas del complejo Cu(II)-AS(1-6) que fueron optimizados con el funcional PBE. Por claridad la mayoría de los átomos de hidrógeno no se muestran.

Tabla 6.1. Parámetros geométricos de los modelos tetra y pentacoordinados del complejo Cu(II)-AS(1-6) optimizados con el funcional PBE. *

Modelo	Longitud de enlace (Å)	PBE	Ángulo (grados)	PBE	Frecuencia (cm ⁻¹)	ΔE (kcal/mol)
4a	Cu-N _{term}	2.06	O _w -Cu-N _{term}	100.3	6.7	0
	Cu-N _{D2} ⁻	1.93	N _{term} -Cu-N _{D2} ⁻	84.2		
	Cu-O _{COO}	1.99	N _{D2} ⁻ -Cu-O _{COO}	96.7		
	Cu-O _w	2.16	O _{COO} -Cu-O _w	79.0		
			O _w -Cu-N _{D2} ⁻	173.8		
			O _{COO} -Cu-N _{term}	177.5		
5S1a	Cu-N _{term}	2.11	O _w -Cu-N _{term}	95.7	8.9	2.48
	Cu-N _{D2} ⁻	1.98	N _{term} -Cu-N _{D2} ⁻	81.1		
	Cu-O _{COO}	2.02	N _{D2} ⁻ -Cu-O _{COO}	94.1		
	Cu-O _w	2.25	O _{COO} -Cu-O _w	77.0		
	Cu-S _{M1}	2.53	O _w -Cu-S _{M1}	105.9		
			S _{M1} -Cu-N _{D2} ⁻	108.4		
			O _{COO} -Cu-S _{M1}	115.9		
		S _{M1} -Cu-N _{term}	83.9			
5S1t	Cu-N _{term}	2.07	O _w -Cu-N _{term}	102.0	8.6	2.91
	Cu-N _{D2} ⁻	2.02	N _{term} -Cu-N _{D2} ⁻	80.2		
	Cu-O _{COO}	1.95	N _{D2} ⁻ -Cu-O _{COO}	96.7		
	Cu-O _w	2.30	O _{COO} -Cu-O _w	82.3		
	Cu-S _{M1}	2.49	O _w -Cu-S _{M1}	110.3		
			S _{M1} -Cu-N _{D2} ⁻	119.7		
			O _{COO} -Cu-S _{M1}	94.6		
		S _{M1} -Cu-N _{term}	84.4			
4t	Cu-N _{term}	2.04	O _w -Cu-N _{term}	96.8	10.0	5.71
	Cu-N _{D2} ⁻	1.96	N _{term} -Cu-N _{D2} ⁻	83.8		
	Cu-O _{COO}	1.92	N _{D2} ⁻ -Cu-O _{COO}	98.5		
	Cu-O _w	2.16	O _{COO} -Cu-O _w	79.4		
			O _w -Cu-N _{D2} ⁻	168.8		
			O _{COO} -Cu-N _{term}	171.8		
4b	Cu-N _{term}	2.03	O _w -Cu-N _{term}	98.1	5.9	9.93
	Cu-N _{D2} ⁻	1.94	N _{term} -Cu-N _{D2} ⁻	85.4		
	Cu-O _{COO}	1.98	N _{D2} ⁻ -Cu-O _{COO}	98.5		
	Cu-O _w	2.15	O _{COO} -Cu-O _w	82.0		
			O _w -Cu-N _{D2} ⁻	171.1		
			O _{COO} -Cu-N _{term}	153.5		
5S1b	Cu-N _{term}	2.06	O _w -Cu-N _{term}	106.0	1.4	10.51
	Cu-N _{D2} ⁻	2.02	N _{term} -Cu-N _{D2} ⁻	78.0		
	Cu-O _{COO}	2.00	N _{D2} ⁻ -Cu-O _{COO}	95.9		
	Cu-O _w	2.30	O _{COO} -Cu-O _w	83.4		
	Cu-S _{M1}	2.50	O _w -Cu-S _{M1}	107.1		
			S _{M1} -Cu-N _{D2} ⁻	125.1		

			O _{COO} -Cu-S _{M1}	93.7		
			S _{M1} -Cu-N _{term}	84.2		
4e	Cu-N _{term}	2.04	O _w -Cu-N _{term}	102.5		
	Cu-N _{D2} ⁻	1.92	N _{term} -Cu-N _{D2} ⁻	83.4		
	Cu-O _{COO}	1.94	N _{D2} ⁻ -Cu-O _{COO}	97.9	5.9	18.63
	Cu-O _w	2.21	O _{COO} -Cu-O _w	81.4		
			O _w -Cu-N _{D2} ⁻	150.9		
			O _{COO} -Cu-N _{term}	169.5		
5S5t	Cu-N _{term}	2.03	O _w -Cu-N _{term}	102.5		
	Cu-N _{D2} ⁻	2.03	N _{term} -Cu-N _{D2} ⁻	80.1		
	Cu-O _{COO}	2.00	N _{D2} ⁻ -Cu-O _{COO}	97.1		
	Cu-O _w	2.48	O _{COO} -Cu-O _w	76.2	13.7	31.39
	Cu-S _{M5}	2.54	O _w -Cu-S _{M5}	86.2		
			S _{M5} -Cu-N _{D2} ⁻	140.4		
			O _{COO} -Cu-S _{M5}	92.5		
			S _{M5} -Cu-N _{term}	92.5		

* En la Tabla:

N_{term} es un nitrógeno proveniente del N-terminal

N_{D2}⁻ es un nitrógeno proveniente de la amida desprotonada del Asp2

O_{COO} es un oxígeno proveniente de la cadena lateral del Asp2

O_w es un oxígeno proveniente de una molécula de agua

S_{M1} es un azufre proveniente de la cadena lateral de la Met1

S_{M5} es un azufre proveniente de la cadena lateral de la Met5

Los modelos 4a, 4b, 4t y 4e presentan una geometría de cuadrado plano, con dos enlaces con una longitud > 2 Å (Cu-N_{term} y Cu-O_w) y dos enlaces con una longitud < 2 Å (Cu-N_{D2}⁻ y Cu-O_{COO}). En los modelos 5S1t, 5S1a, 5S1b y 5S5t, los cuales contienen un átomo de azufre en la posición axial, las distancias de enlace ecuatoriales son mas grandes que en los modelos tetracoordinados, y muestran geometrías tetraédricas o piramidal de base cuadrada. Entre los modelos de menor energía (< 6 kcal/mol), dos de ellos son tetracoordinados (4a y 4t), y los otros dos contienen un átomo de azufre de la Met1 en la posición axial (5S1a y 5S1t). En general, los modelos en los que el péptido tiene conformación de alfa hélice (a) o giro (t) exhiben energías menores que aquellos modelos construidos con conformaciones de hoja beta (b) o extendidas (e). Únicamente fue posible optimizar un modelo pentacoordinado con el azufre de la Met5 como ligando axial (5S5t), el cuál resultó ser el de mayor energía, > 30 kcal/mol.

En conjunto, estos resultados indican que los modelos con la coordinación 2N2O y 2N2O1S, con el azufre de la Met1 como ligando axial, son energéticamente más favorables, siempre y cuando

la conformación del péptido sea compacta (como en el caso de la conformación tipo alfa hélice y giro), mientras que, descartan la participación del azufre de la Met5 como posible ligando axial. En la Tabla 6.2 se enlistan los valores de los tensores g y A calculados para los 8 modelos bajo estudio, así como los valores experimentales, provenientes de una simulación del espectro de *EPR* del complejo Cu(II)-AS(1-6), previamente reportada.³⁶ El modelo 5S1a es el único que presenta valores dentro del rango de error aceptado (± 0.03 ppm y ± 50 MHz, para los valores g y A , respectivamente),⁴⁹⁻⁵³ mientras que el modelo 4t, presenta un buen acuerdo con los valores experimentales, excepto por el valor de g_z .

Tabla 6.2. Parámetros de *EPR* calculados a partir de las estructuras optimizadas de los modelos tetra y pentacoordinados del complejo Cu(II)-AS(1-6). *

Modelo	Tensor g			Tensor A		
	g_{xx}	g_{yy}	g_{zz}	A_{xx}	A_{yy}	A_{zz}
4a	2.051	2.053	2.182	-55.44	-65.19	-632.12
5S1a	2.050	2.054	2.220	-36.56	74.97	-530.33
5S1t	2.017	2.112	2.189	-154.69	157.95	-471.34
4t	2.045	2.055	2.184	-25.05	-59.31	-614.61
4b	2.030	2.032	2.181	-10.32	-72.86	-493.28
5S1b	2.023	2.106	2.192	109.90	-152.75	-505.62
4e	2.044	2.054	2.179	-40.53	-67.65	-607.70
5S5t	2.032	2.088	2.192	75.73	-113.44	-522.18
Experimental ^a	2.051	2.059	2.250	57.00	24.00	567.00

* Los tensores g y A fueron calculados con el funcional PBE0. Los componentes del tensor A son reportados en MHz. Las estructuras están enlistadas en orden ascendente de acuerdo a su energía relativa.

^a Valores obtenidos de la simulación del espectro de *EPR*, como se encuentran reportados en la referencia 36.

En general, también se observa que los modelos que contienen al azufre como ligando axial exhiben valores g_z más cercanos a los valores experimentales, por lo tanto, la existencia de una interacción axial parece ser importante para modelar los parámetros de *EPR* que presenta el complejo de coordinación de Cu(II) en el sitio del N-terminal de la proteína AS.

El efecto de la interacción axial fue estudiada con mas detalle en el modelo 4t, este modelo presenta una geometría de cuadrado plano sin ningún tipo de interacciones axiales. A partir del modelo 4t se construyó el modelo 4ts en el que se incluyeron siete moléculas de agua alrededor de la esfera de coordinación, favoreciendo principalmente interacciones del ión metálico con las

moléculas de agua en las posiciones axiales. Siguiendo la misma metodología, el modelo 4ts fue optimizado y se calcularon sus parámetros de *EPR*. La Figura 6.5 muestra una comparación entre la geometría de la esfera de coordinación del modelo 4t y una vez que las moléculas de H₂O fueron incluidas (4ts), así como la adoptada en el modelo 5S1a.

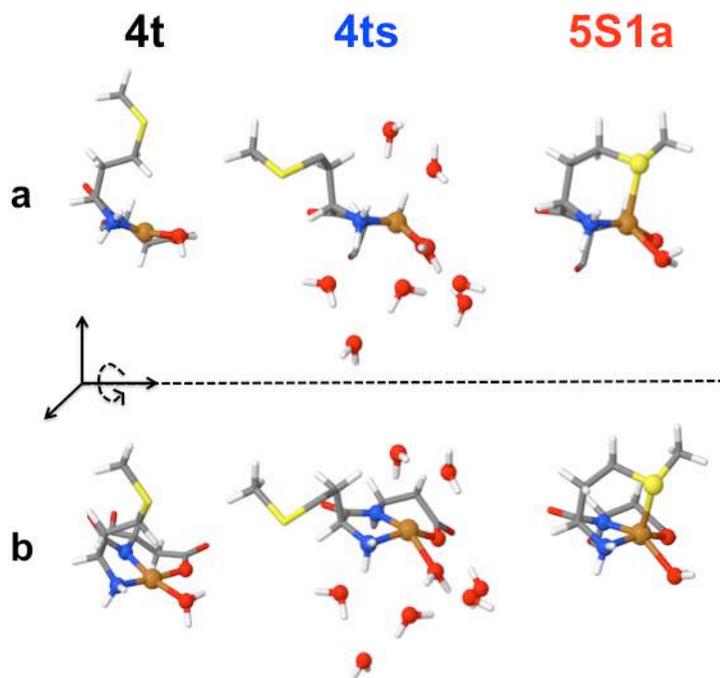


Figura 6.5. (a) Vista lateral y (b) vista superior de la esfera de coordinación de los modelos 4t, 4ts y 5S1a.

Como puede observarse, la interacción axial de las moléculas de H₂O en el modelo 4ts causa un cambio en la geometría de la esfera de coordinación, respecto al modelo sin moléculas de H₂O incluidas (4t). Esta pérdida en la planaridad es similar a la que se observa en los modelos que incluyen un átomo de azufre como ligando axial, por ejemplo en el modelo 5S1a. Por otro lado, los parámetros de *EPR* calculados a partir del modelo 4ts (Tabla 6.3), están en buen acuerdo con los valores reportados experimentalmente. Por lo tanto, la interacción axial, ya sea de un ligando azufre o de moléculas de H₂O, es necesaria para completar la esfera de coordinación y reproducir los datos experimentales de *EPR*.

Tabla 6.3. Parámetros de *EPR* calculados a partir del modelo 4ts y su comparación con los calculados para los modelos 4t y 5S1a. *

Modelo	Tensor g			Tensor A		
	g_{xx}	g_{yy}	g_{zz}	A_{xx}	A_{yy}	A_{zz}
4t	2.045	2.055	2.184	-25.05	-59.31	-614.61
4ts	2.050	2.053	2.225	-45.32	-40.41	-593.65
5S1a	2.050	2.054	2.220	-36.56	74.97	-530.33
Experimental ^a	2.051	2.059	2.250	57.00	24.00	567.00

* Los tensores g y A fueron calculados con el funcional PBE0. Los componentes del tensor A son reportados en MHz. ^a Valores obtenidos de la simulación del espectro de *EPR*, como se encuentran reportados en la referencia 36.

En conjunto, los cálculos de estructura electrónica en el complejo Cu(II)-AS(1-6), indican que la interacción axial es necesaria para reproducir los valores de los parámetros de *EPR*, así, es posible que el azufre de la Met1 este interactuando axialmente con el Cu(II), aunque el modo de coordinación 2N2O no puede ser descartado, ya que moléculas de solvente pueden realizar una acción similar sobre la esfera de coordinación que la del azufre en la posición axial. Por lo tanto, el sitio de coordinación de Cu(II) en el N-terminal de la proteína AS puede ser una mezcla de los modos 2N2O y 2N2O1S.

6.2.2. Coordinación de Cu(I) al N-terminal de la proteína AS.

Una vez confirmada la esfera de coordinación ecuatorial en el complejo Cu(II)-AS(1-6) y elucidado el papel de las metioninas 1 y 5 en la coordinación del metal, se procedió a estudiar la naturaleza de la esfera de coordinación del Cu(I) en el mismo sitio de la proteína por medio de *XAS* y *DFT*.

6.2.2.1. Caracterización del complejo Cu(I)-AS en el sitio del N-terminal de la proteína por medio de espectroscopía de absorción de rayos X.

Estudios precedentes de *NMR* indican que el sitio de mayor afinidad de Cu(I) en la proteína AS se encuentra en el N-terminal. Por medio de la misma técnica se han identificado a la Met1 y Met5 como los principales ligandos, (sección 6.1.3 de esta Tesis). Debido a que el Cu(I) es una especie diamagnética, técnicas como el EPR no se pueden utilizar para describir la coordinación del sitio. Por este motivo, la espectroscopía de absorción de rayos X, resulta muy útil y nos puede dar información valiosa para describir la esfera de coordinación alrededor del Cu(I).

Para evaluar la coordinación de Cu(I) en el sitio del N-terminal de la proteína AS, se prepararon los complejos Cu(I)-ASH50A, (ASH50A, es la proteína AS con una Ala en la posición 50, reemplazando la His) y Cu(I)-AS(1-6), a partir de la reducción con ascorbato de los complejos Cu(II)-ASH50A y Cu(II)-AS(1-6). Usar la proteína ASH50A permitió estudiar solo el sitio de coordinación del N-terminal, mientras que el uso del fragmento AS(1-6) ayuda a corroborar si el sitio de coordinación del N-terminal se encuentra en los primeros seis residuos de la proteína, como fue propuesto anteriormente.⁴⁴

La Figura 6.6 muestra los espectros de *EPR* de los complejos Cu(II)-ASH50A y Cu(II)-AS(1-6) a pH 6.5 (líneas sólidas). Como se puede ver, el complejo de coordinación de Cu(II) formado con el péptido AS(1-6), reproduce el espectro del complejo formado en la proteína ASH50A, indicando que el ión metálico está coordinado en el sitio del N-terminal de la proteína y que involucra solo los primeros seis residuos. Los parámetros g_z y A_z obtenidos de los espectros son: 2.25 y 180 G (567 MHz), respectivamente. Estos resultados reproducen los valores reportados anteriormente para este sistema.³⁶ Después de su reducción con ascorbato la cuantificación de espín de los espectros de *EPR* de los complejos reducidos (líneas punteadas) indica una reducción $\geq 95\%$.

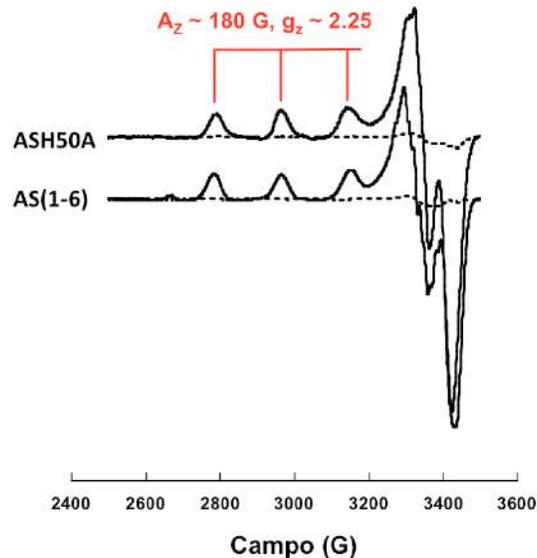


Figura 6.6. Espectros de *EPR* de los complejos Cu(II)-ASH50A y Cu(II)-AS(1-6) (líneas solidas) y después de adicionar 100 equivalentes de ascorbato en condiciones anaeróbicas (líneas punteadas) a pH 6.5. La cuantificación de espín muestra menos del 5 % de Cu(II) en los complejos reducidos.

Los complejos reducidos fueron estudiados por *XAS*. La Figura 6.7 muestra el Cu *K-edge*, *XANES*, *EXAFS* y la transformada de Fourier del *EXAFS* de los complejos Cu(I)-ASH50A y Cu(I)-AS(1-6) a pH 6.5. El espectro *XANES* muestra la señal a 8984 eV característica de complejos de Cu(I), corroborando que el Cu se encuentra en su estado reducido.

Ambos complejos Cu(I)-ASH50A y Cu(I)-AS(1-6) muestran espectros muy similares. Respecto a los espectros *XANES* (Figura 6.7, A), en ambos se observa la forma característica de complejos de Cu(I) tetracoordinados. Por otro lado, la similitud en los espectros de *EXAFS* y su transformada de Fourier (Figura 6.7, B y C indican que la esfera de coordinación, esto es, el tipo de ligandos y la distancia a la que se encuentran del ión metálico, es muy similar en ambos complejos. Por lo tanto, podemos concluir que el fragmento AS(1-6) contiene todos los elementos necesarios para reproducir la coordinación de Cu(I) en el sitio de mayor afinidad de la proteína AS.

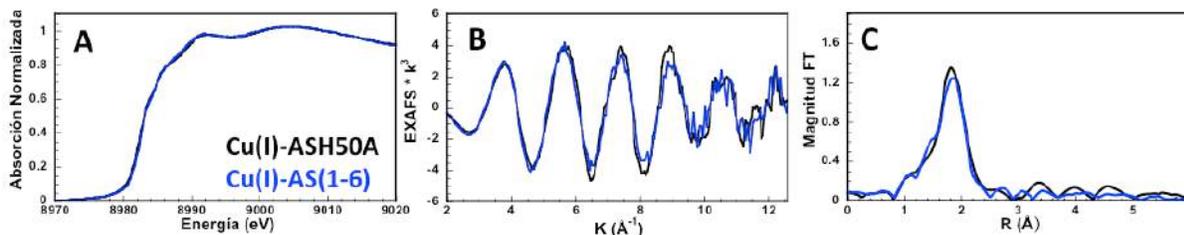


Figura 6.7. Espectros *XANES* (A), *EXAFS* (B) y transformada de Fourier del *EXAFS* (C) de los complejos Cu(I)-ASH50A (línea negra) y Cu(I)-AS(1-6) (línea azul) a pH 6.5.

Los parámetros de los mejores ajustes de los datos de *EXAFS* se muestran en la Tabla 6.4. Para ambos, el mejor ajuste se obtiene con un complejo tetracoordinado que incluye dos enlaces Cu(I)-S a 2.35 y 2.33 Å y dos enlaces Cu(I)-N/O a 2.16 y 2.11 Å para los complejos Cu(I)-ASH50A y Cu(I)-AS(1-6), respectivamente. Las diferencias entre las distancias de enlace obtenidas en ambos ajustes caen dentro del error experimental de la técnica, por lo tanto, podemos decir que el complejo de Cu(I) formado con el fragmento AS(1-6) representa al complejo formado en el N-terminal de la proteína AS.

En resumen, los datos de *XAS* confirman la participación de los grupos tioéter de la Met1 y Met5 en la coordinación de Cu(I) en el sitio del N-terminal de la proteína AS, además, nos indican la existencia de otros dos ligandos que pueden ser oxígeno o nitrógeno.

Tabla 6.4. Ajustes de los espectros *EXAFS* de los complejos Cu(I)-ASH50A y Cu(I)-AS(1-6).

Complejo	Coord	Distancia (Å)	F_n	BVS
Cu(I)-ASH50A	2 Cu-N/O	2.16	0.282	1.022
	2 Cu-S	2.35		
Cu(I)-AS(1-6)	2 Cu-N/O	2.11	0.252	1.130
	2 Cu-S	2.33		

6.2.2.2. Modelado de los complejos Cu(I)-AS(1-6) usando cálculos de estructura electrónica.

Para obtener la descripción completa del sitio de coordinación de Cu(I) en el N-terminal de la proteína AS, se realizaron cálculos *Restricted Kohn-Sham (RKS)* en una serie de modelos usando el fragmento AS(1-6). En todos los modelos, el estado de oxidación fue dispuesto como Cu(I) y, basándonos en la información experimental, los átomos de azufre pertenecientes a la Met1 y Met5 fueron incluidos en la esfera de coordinación. Por otro lado, también fue evaluado el efecto del número de ligandos sobre la coordinación del ión metálico, esto es, se incluyeron modelos bi, tri y tetracoordinados.

La coordinación de cada modelo se encuentra detallada en la Tabla 6.5. Como punto de partida se construyó el modelo bicoordinado 2S, el cuál, tras el proceso de optimización, reclutó al oxígeno de la cadena lateral del Asp2 (O_{COO}) y terminó como una estructura tricoordinada ($2SO_{COO}$). Por otro lado, dentro de las estructuras tricoordinadas, fueron evaluados los modelos $2SO_w$, $2SO_{COO}$ y $2SN_{term}$, los cuales incluyen como tercer ligando una molécula de H_2O (O_w), el oxígeno de la cadena lateral del Asp2 (O_{COO}) y el nitrógeno del N-terminal (N_{term}), respectivamente. Dentro de estos modelos, el $2SO_w$ y $2SO_{COO}$ mantienen la misma coordinación después del proceso de optimización, mientras que el modelo $2SN_{term}$ recluta un nuevo ligando, un oxígeno proveniente del grupo carbonilo de la Met1 (O_{COM1}) y termina como un modelo tetracoordinado $2SN_{term}O_{COM1}$. Por último, en los modelos tetracoordinados se evaluaron las estructuras $2SN_{term}O_w$, $2SN_{term}O_{COO}$ y $2SO_wO_{COO}$. En ellas, el tercer y cuarto ligando son una combinación de N_{term} , O_w y O_{COO} . En estos modelos, se mantuvo la coordinación inicial después de la optimización. El N_{term} , O_w y O_{COO} se eligieron como posibles ligandos en la coordinación de Cu(I) debido a que estos participan en la coordinación de Cu(II) en el mismo sitio. Por lo tanto, podría esperarse que representen a los mejores candidatos para los dos ligandos N/O de Cu(I), que de acuerdo a los datos obtenidos por *XAS*, están presentes en la esfera de coordinación.

De acuerdo a la experiencia obtenida al trabajar sistemas similares (sección 4.2.6.4 de esta Tesis), una vez optimizados los modelos se incluyeron explícitamente seis moléculas de H_2O alrededor de la esfera de coordinación y se reoptimizaron las estructuras con la misma metodología. Así, los resultados que se muestran a continuación incluyen el efecto de solvatación explícita sobre la esfera de coordinación.

Tabla 6.5. Modelos construidos para el complejo Cu(I)-AS(1-6).

Estructura inicial	Tercer ligando	Cuarto ligando	Estructura final
2S			2SO _{COO}
2SO _w	O _w		2SO _w
2SO _{COO}	O _{COO}		2SO _{COO}
2SN _{term}	N _{term}		2SN _{term} O _{COM1}
2SN _{term} O _w	N _{term}	O _w	2SN _{term} O _w
2SN _{term} O _{COO}	N _{term}	O _{COO}	2SN _{term} O _{COO}
2SO _w O _{COO}	O _w	O _{COO}	2SO _w O _{COO}

Las seis diferentes estructuras obtenidas usando la metodología OPBE/TZVP/GEN-A2 (sección 10, Materiales y Métodos), que incluyen seis moléculas de H₂O explícitas alrededor de la esfera de coordinación, se muestran en la Figura 6.8 y sus parámetros geométricos y energéticos se listan en la Tabla 6.6.

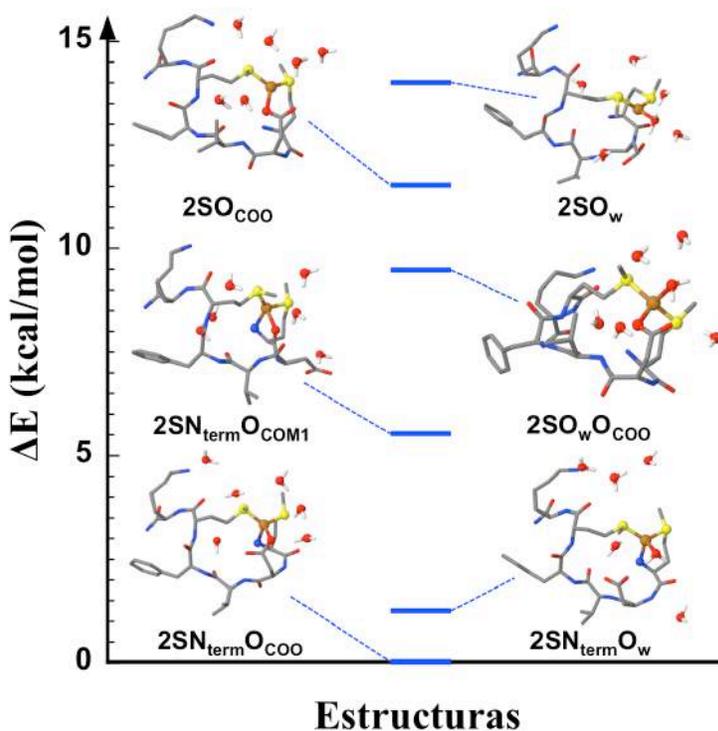


Figura 6.8. Diagrama energético de los modelos del complejo Cu(I)-AS(1-6), que incluyen seis moléculas de H₂O alrededor de la esfera de coordinación. La optimización se realizó con OPBE/TZVP/GEN-A2. Por claridad, la mayoría de los átomos de hidrógeno no se muestran.

De los seis modelos bajo estudio, los que tienen cuatro ligandos ($2\text{SN}_{\text{term}}\text{O}_{\text{COO}}$, $2\text{SN}_{\text{term}}\text{O}_{\text{w}}$, $2\text{SN}_{\text{term}}\text{O}_{\text{COM1}}$ y $2\text{SO}_{\text{w}}\text{O}_{\text{COO}}$) son los que presentan una menor energía, en comparación a los modelos tricoordinados (2SO_{COO} y 2SO_{w}). Más aún, es de resaltar que aquellos modelos que contienen al N-terminal como ligando presentan las energías más bajas dentro de toda la serie (entre las primeras 6 kcal/mol). Por lo tanto, energéticamente, este estudio indica que la forma tetracoordinada del complejo Cu(I)-AS(1-6) es más estable, respecto a modelos tricoordinados, y que el N-terminal puede ser un ligando de Cu(I) en este complejo.

Por otro lado, cuando analizamos las distancias de enlace obtenidas en los modelos estudiados (Tabla 6.6), podemos observar que cuando se incluyen los efectos de solvatación explícita se obtienen distancias Cu(I)-S más cercanas a los valores experimentales (Columna 3 y 4 de la Tabla 6.6). Este efecto ya se había observado anteriormente con el sistema Cu(I)-PrP(106-115) (sección 4.2.6.4 de esta Tesis). También, se observa que en los modelos tricoordinados, al tener solo tres ligandos, las distancias de enlace son más cortas en comparación con las obtenidas en los modelos tetracoordinados, contrastando con los valores de distancias de enlace provenientes de los datos experimentales (Tabla 6.3). En resumen, los modelos tricoordinados, además de no ser favorables energéticamente, tampoco presentan longitudes de enlace cercanas a las experimentales. Por lo tanto se puede descartar a las estructuras tricoordinadas como candidatos para representar el modelo Cu(I)-AS(1-6).

En cambio, dentro de las estructuras tetracoordinadas, el modelo $2\text{SN}_{\text{term}}\text{O}_{\text{COO}}$, además de ser energéticamente favorable, presenta distancias de enlace (2 Cu-S a 2.33 Å y 2 Cu-N/O a 2.12 Å) que están en excelente acuerdo con las distancias experimentales (2 Cu-S a 2.33 Å y 2 Cu-N/O a 2.11 Å). Así pues, se propone que el mejor modelo que representa el complejo Cu(I)-AS(1-6) es aquel que contiene en su esfera de coordinación los dos átomos de azufre de la Met1 y Met5, el nitrógeno del N-terminal y un átomo de oxígeno proveniente del grupo carboxilato del Asp2.

Tabla 6.6. Parámetros estructurales y energéticos de los modelos del complejo Cu(I)-AS(1-6), generados por la optimización geométrica con OPBE/TZVP/GEN-A2. ΔE es la energía relativa en kcal/mol. Las distancias de enlace experimentales a partir de datos de EXAFS son: 2 Cu-S a 2.33 Å y 2 Cu-N/O a 2.11 Å (Tabla 6.4).*

Modelo	Ligandos	OPBE	OPBE (6 H ₂ O)	Promedio OPBE (6 H ₂ O)	ΔE en OPBE (6 H ₂ O)
2SN _{term} O _{COO}	Cu-S _{M1}	2.33	2.34	2S – 2.330 2N/O – 2.120	0.00
	Cu-S _{M5}	2.31	2.32		
	Cu-N _{term}	2.15	2.15		
	Cu-O _{COO}	2.09	2.11		
2SN _{term} O _w	Cu-S _{M1}	2.27	2.30	2S – 2.295 2N/O – 2.190	1.30
	Cu-S _{M5}	2.28	2.29		
	Cu-N _{term}	2.11	2.08		
	Cu-O _w	2.26	2.30		
2SN _{term} O _{COM1}	Cu-S _{M1}	2.27	2.31	2S – 2.295 1N1O – 2.130	5.49
	Cu-S _{M5}	2.24	2.28		
	Cu-N _{term}	2.14	2.15		
	Cu-O _{COM1}	2.14	2.12		
2SO _w O _{COO}	Cu-S _{M1}	2.25	2.28	2S – 2.285 2O – 2.245	9.46
	Cu-S _{M5}	2.26	2.29		
	Cu-O _w	2.23	2.25		
	Cu-O _{COO}	2.20	2.24		
2SO _{COO}	Cu-S _{M1}	2.26	2.27	2S – 2.260 1O – 2.030	11.51
	Cu-S _{M5}	2.23	2.25		
	Cu-O _{COO}	2.04	2.03		
2SO _w	Cu-S _{M1}	2.24	2.26	2S – 2.255 1O – 2.070	14.02
	Cu-S _{M5}	2.20	2.25		
	Cu-O _w	2.06	2.07		

* En la Tabla:

N_{term} es un nitrógeno proveniente del N-terminal

O_{COO} es un oxígeno proveniente de la cadena lateral del Asp2

O_w es un oxígeno proveniente de una molécula de agua

O_{COM1} es un oxígeno proveniente del carbonilo de la Met1

S_{M1} es un azufre proveniente de la cadena lateral de la Met1

S_{M5} es un azufre proveniente de la cadena lateral de la Met5

6.2.2.3. Cálculo de la energía de reorganización de esfera interna asociada a la reducción del complejo de Cu en el sitio N-terminal de la proteína AS.

Una vez que se obtuvo el panorama completo de la coordinación de Cu(II) y Cu(I) en el sitio del N-terminal de la proteína AS se realizó el cálculo de la energía de reorganización de esfera interna (ver sección 10, Materiales y Métodos) asociada a la reducción de estas especies. En este cálculo se usaron las estructuras de Cu(II) y Cu(I) obtenidas en las secciones 6.2.1 y 6.2.2.2, incluyendo a: 5S1a, con modo de coordinación 2N2O1S; 4a, con el modo de coordinación 2N2O, como modelos del complejo de Cu(II) y la estructura 2SN_{term}O_{COO} como modelo del complejo de Cu(I).

La Tabla 6.7 muestra los valores de las energías de reorganización de esfera interna calculadas para cada par de modelos. Para las estructuras Cu(II)-2N2O y Cu(I)-1N1O2S, la energía calculada λ_i es 1.60 eV, mientras que, cuando se uso la estructura Cu(II)-2N2O1S, que contempla una interacción axial del azufre de la Met1, la energía calculada es de 1.58 eV.

Tabla 6.7. Energías de reorganización (λ_i) para el complejo de Cu(II) y Cu(I) en el sitio N-terminal de la proteína AS.

ID	Estructura	Energía (a. u.)	λ_i (a. u.)	λ_i (eV)
$E_{ox}(\text{Red}_{geom})$	Cu(II)-1N1O2S	-4881.563642		
$E_{ox}(\text{Ox}_{geom})$	Cu(II)-2N2O	-4882.610209	0.059075	1.60
$E_{red}(\text{Ox}_{geom})$	Cu(I)-2N2O	-4882.802402		
$E_{red}(\text{Red}_{geom})$	Cu(I)-1N1O2S	-4881.873986		
$E_{ox}(\text{Red}_{geom})$	Cu(II)-1N1O2S	-4881.563642		
$E_{ox}(\text{Ox}_{geom})$	Cu(II)-2N2O1S	-4881.590363	0.058236	1.58
$E_{red}(\text{Ox}_{geom})$	Cu(I)-2N2O1S	-4881.764535		
$E_{red}(\text{Red}_{geom})$	Cu(I)-1N1O2S	-4881.873986		

Como podemos observar, independientemente de que el complejo de Cu(II) solo este coordinado ecuatorialmente por ligandos N/O (Cu(II)-2N2O), o contenga la interacción del azufre de la Met1 como parte de la esfera de coordinación (complejo Cu(II)-2N2O1S), la energía de reorganización asociada a la reducción es muy similar. Si analizamos lo que pasa en cada proceso, globalmente, en el primer caso (Cu(II)-2N2O a Cu(I)-1N1O2S) dos ligandos, el N_{D2O} y O_w, se intercambian por los dos ligandos S_{M1} y S_{M5}. A diferencia de esto, en el segundo caso, (Cu(II)-2N2O1S a

Cu(I)-1N1O2S), se debe reclutar al azufre proveniente de la Met5 (S_{M5}) y sacar los mismos dos ligandos (N_{D2O} y O_w) de la esfera de coordinación. Estos resultados nos indican que el mayor gasto energético asociado al rearrreglo de los ligandos en la especie de Cu(I) es el reclutamiento de la Met5. Esto es congruente con lo obtenido en la sección 6.2.1, en donde se observó que las estructuras de Cu(II) con coordinación 2N2O y 2N2O1S $_{M1}$ mantienen una energía relativa muy similar, mientras que la inclusión del azufre de la Met5 en la esfera de coordinación, modelo 2N2O1S $_{M5}$, representa un gasto energético mayor. La energía de reorganización es un parámetro importante que, aunado al ΔG° de la reacción, describe la reactividad que un sistema puede tener. De esta forma, el valor de λ_i que se calculó en esta sección servirá para analizar la reactividad de este sistema en la sección 6.3.

6.2.2.4. Evaluación del efecto de la acetilación del N-terminal en la proteína AS sobre la coordinación de Cu(I).

Como se mencionó al final de la sección 6.1.3, reportes recientes han planteado que la proteína AS se encuentra acetilada en el amino terminal. Teniendo esto en cuenta, se utilizó la técnica de espectroscopía de absorción de rayos X, en combinación con cálculos de estructura electrónica, para evaluar el efecto que la acetilación produce sobre la coordinación de Cu(I) en el sitio del N-terminal.

6.2.2.4.1. Espectroscopía de absorción de rayos X del complejo Cu(I)-AcASH50A y Cu(I)-AcAS(1-6).

Para esta evaluación se usó la proteína AcASH50A, que es la proteína AS acetilada en el N-terminal y con un residuo de Ala en la posición 50, reemplazando a la His50. Del mismo modo, se usó el péptido AcAS(1-6), que es el fragmento de los primeros seis residuos de la proteína AS con el N-terminal acetilado. De este modo, nos aseguramos de obtener información del sitio de Cu(I) del N-terminal y podemos comparar los resultados con los obtenidos previamente con la proteína sin acetilar.

Los complejos Cu(I)-AcASH50A y Cu(I)-AcAS(1-6), fueron preparados en un ambiente anaeróbico a partir de la mezcla de Cu(II) con la proteína o el péptido y ascorbato (ver sección

10, Materiales y Métodos). La Figura 6.9 muestra los espectros de *EPR* iniciales (líneas sólidas) y después de la reducción (líneas punteadas). En este caso, el complejo Cu(II)-AcASH50A muestra los valores g_z y A_z de 2.36 y 140 G, respectivamente, estos valores nos indica que el complejo de Cu(II) presente corresponde al identificado en el C-terminal de la proteína,³⁴⁻³⁵ ya que el grupo NH_2 se encuentra bloqueado y no esta presente la His50. Por otro lado, el espectro obtenido con Cu(II) y el fragmento AcAS(1-6) muestra las señales características de Cu(II) en solución (asteriscos). Esto indica que, cuando el N-terminal se encuentra bloqueado no se forma el complejo Cu(II)-péptido a pH 6.5. Después de llevar a cabo la reducción con ascorbato, los espectros de *EPR* no muestran señales de Cu(II) (~ 5 % de Cu(II) residual, según la cuantificación de espín).

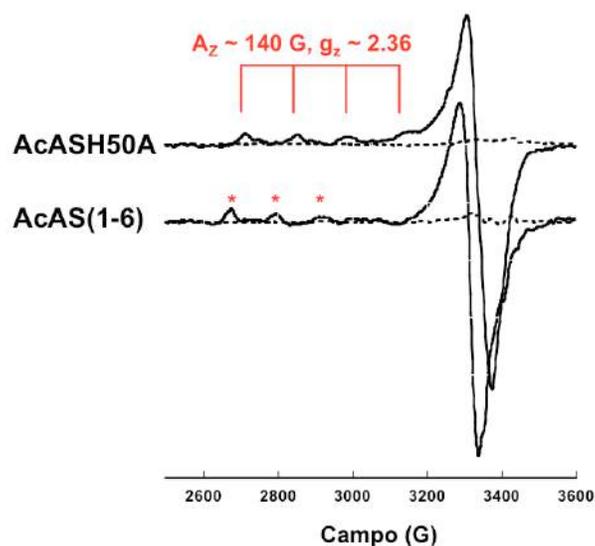


Figura 6.9. Espectros de *EPR* del complejo Cu(II)-AcASH50A (sitio de Cu(II) en el C-terminal) y de la muestra del péptido AcAS(1-6) con Cu(II), antes (líneas solidas) y después de adicionar 100 equivalentes de ascorbato en condiciones anaeróbicas (líneas punteadas). En el caso del péptido acetilado, los asteriscos indican señales típicas de Cu(II) en solución. La cuantificación de espín de las muestras reducidas con ascorbato muestra menos del 5 % de Cu(II) remanente.

Una vez obtenidas las especies de Cu(I), se llevó a cabo un estudio de las mismas por medio de *XAS*. La Figura 6.10 muestra una comparación de los espectros de *XAS* de los complejos Cu(I)-AcASH50A y Cu(I)-AcAS(1-6), y sus contrapartes no acetiladas, Cu(I)-ASH50A y Cu(I)-AS(1-6). Cabe resaltar que en las muestras acetiladas (espectros rojo y naranja) aunque no se parte del

complejo de Cu(II) en el sitio del N-terminal (como lo demuestra el *EPR*, Figura 6.9), se llega a un complejo de Cu(I) ubicado en el N-terminal de la proteína, esto ha sido previamente observado en experimentos seguidos por *NMR*.⁵⁴

Las secciones A, B y C de la Figura 6.10 muestran la comparación de los complejos Cu(I)-ASH50A y Cu(I)-AcASH50A, como se puede observar, aunque los espectros se ven parecidos, existen ligeras diferencias en la intensidad del espectro *EXAFS*. De la misma forma, cuando se comparan los complejos de Cu(I) formados con el fragmento AS(1-6) y su equivalente acetilado (Figura 6.10 D, E y F) las diferencias en la intensidad persisten. Cuando el N-terminal esta libre, los cálculos de estructura electrónica apuntan a que el grupo amino participa como ligando del complejo de Cu(I) (sección 6.2.2.2), en consecuencia podemos inferir que las diferencias que exhiben los espectros de los complejos usando las formas con el N-terminal libre, con respecto a las acetiladas, podrían deberse exclusivamente a la participación (o falta de ella) del N-terminal en el complejo de coordinación.

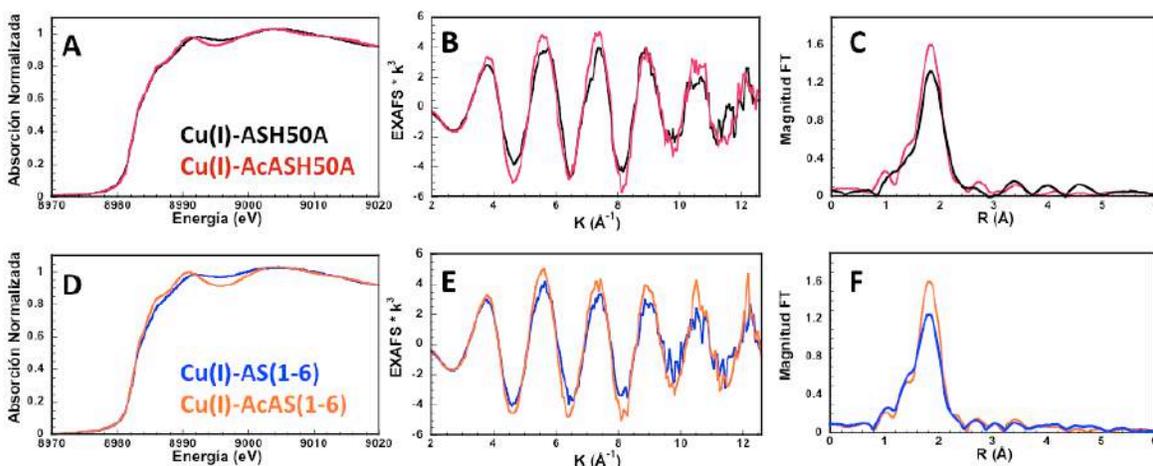


Figura 6.10. Espectros *XANES* (A y D), *EXAFS* (B y E) y transformada de Fourier del *EXAFS* (C y F) de los complejos Cu(I)-ASH50A (negro), Cu(I)-AcASH50A (rojo), Cu(I)-AS(1-6) (azul) y Cu(I)-AcAS(1-6) (naranja) a pH 6.5.

Por el contrario, cuando se comparan los espectros de los complejos de Cu(I) con las formas acetiladas (Figura 6.11) observamos que los espectros prácticamente se superponen. Por lo tanto, podemos deducir que el complejo de Cu(I) en el sitio del N-terminal con la proteína acetilada puede reproducirse con los primeros seis residuos, siempre y cuando el N-terminal esté acetilado.

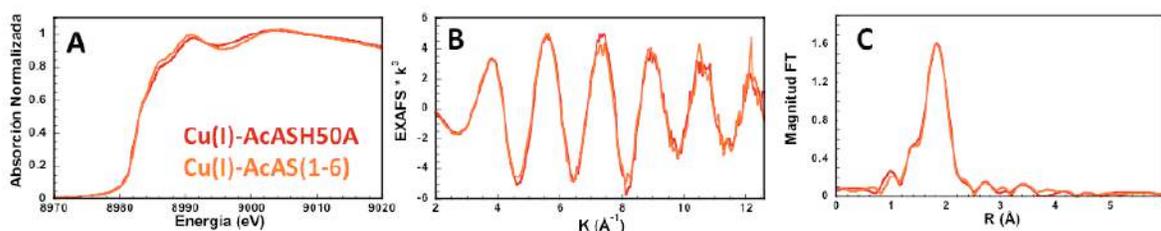


Figura 6.11. Espectros *XANES* (A), *EXAFS* (B) y transformada de Fourier del *EXAFS* (C) de los complejos Cu(I)-AcASH50A (rojo) y Cu(I)-AcAS(1-6) (naranja) a pH 6.5.

Los parámetros del mejor ajuste de los datos del *EXAFS* para el complejo Cu(I)-AcAS(1-6) se muestran en la Tabla 6.8. El mejor ajuste se obtiene con un complejo tetracoordinado que incluye dos enlaces Cu-S a 2.36 Å y dos enlaces Cu-N/O a 2.16 Å; estos valores son muy parecidos a los obtenidos con las especies sin acetilar (Tabla 6.4). Estos resultados sugieren que la naturaleza de los dos enlaces Cu(I)-S no se ve afectada por la acetilación; por tanto, las diferencias encontradas entre las muestras acetiladas se deben a la naturaleza de los ligandos N/O, específicamente a la capacidad de coordinación del grupo amino en su forma acetilada.

Tabla 6.8. Ajuste del espectros *EXAFS* del Cu(I)-AcAS(1-6).

Complejo	Coord	R(Å)	F _n	BVS
Cu(I)-AcAS(1-6)	2 Cu-N/O	2.16	0.214	1.006
	2 Cu-S	2.36		

6.2.2.4.2. Cálculos de estructura electrónica del complejo Cu(I)-AcAS(1-6).

La capacidad de coordinación del grupo amino acetilado en los complejos de Cu(I) fue probada mediante cálculos de estructura electrónica. Para esto se utilizaron como punto de partida las estructuras tetracoordinadas $2SN_{\text{term}}O_{\text{COO}}$, $2SN_{\text{term}}O_{\text{w}}$, $2SN_{\text{term}}O_{\text{COM1}}$ y $2SO_{\text{w}}O_{\text{COO}}$, previamente optimizadas. En éstas se incluyó el grupo acetilo en el amino terminal y se optimizaron nuevamente. Las estructuras iniciales y finales de estos cuatro modelos se muestran en la Figura 6.12. Como se puede observar los tres modelos que inicialmente tenían al grupo amino como ligando, además de presentar una energía mayor después de la optimización, no conservan la coordinación del grupo amino y terminan como estructuras tricoordinadas. Por lo tanto, a partir de estos cálculos, podemos concluir que el N-terminal acetilado no es un buen ligando para Cu(I) en el complejo Cu(I)-AcAS(1-6). Así mismo, es evidente que a falta de otro ligando que

provenza de un átomo de nitrógeno, los dos ligandos N/O detectados por *XAS*, deben ser una combinación de dos átomos de oxígeno. Sin embargo, el modelo $2SO_wO_{COO}$, aunque mantiene la coordinación inicial, exhibe distancias de enlace que no concuerdan con los valores experimentales (2 Cu(I)-S a 2.26 Å, 1 Cu(I)- O_{COO} a 2.15 Å y 1 Cu(I)- O_w a 2.37 Å). Los enlaces cortos Cu(I)-S pueden ser producto de que el enlace Cu(I)- O_w es muy largo, comportándose más como una estructura tricoordinada que tiene una interacción con una molécula de agua. Así, una molécula de agua tampoco parece ser un ligando adecuado para este sistema. Por estas razones es necesario evaluar otros ligandos oxígeno que provengan de los grupos carbonilo, en combinación con el oxígeno de la cadena lateral del Asp2.

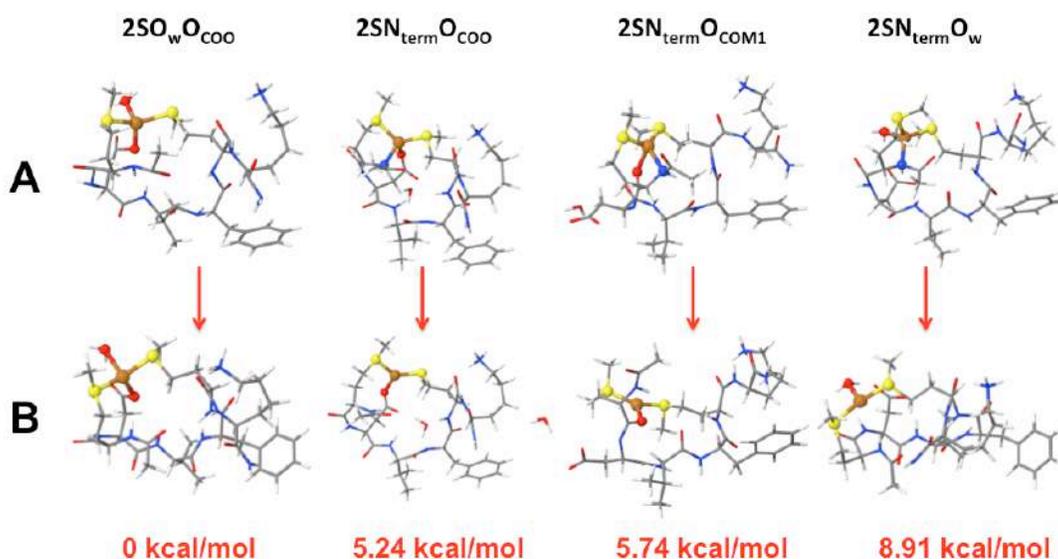


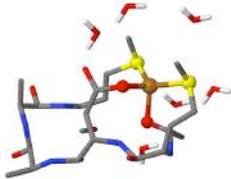
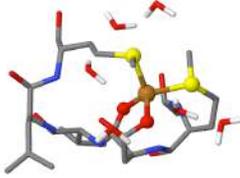
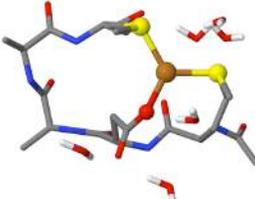
Figura 6.12. Modelos iniciales en los que fue añadido el grupo acetilo en el N-terminal (A) y después de reoptimizarse (B). La energía relativa de los modelos optimizados se muestra para cada caso.

De acuerdo a lo anterior, se construyeron los modelos $2S2O_{COac}$, $2S2O_{COM1}$ y $2S2O_{COD2}$. En estos tres modelos se mantienen los dos grupos tioéter y el oxígeno de la cadena lateral del Asp2 como ligandos de Cu(I). Para el cuarto ligando se probaron los átomos de oxígeno de los grupos carbonilo provenientes del grupo acetilo del N-terminal y de los enlaces peptídicos de la Met1 y del Asp2 (O_{COac} , O_{COM1} y O_{COD2} , respectivamente). En la Tabla 6.9 se enlistan los resultados obtenidos; se muestran los parámetros geométricos, energéticos, así como las tres estructuras bajo estudio. Como se puede observar, el modelo $2S2O_{COM1}$, además de presentar la energía más alta del grupo, optimiza como una estructura tricoordinada. Por otro lado, el modelo $2S2O_{COD2}$, presenta enlaces Cu(I)-S (2.325 Å) más cortos que los reportados experimentalmente (2.36 Å),

además también tiene un enlace corto Cu(I)-O a 2.01 Å, que no concuerda con los valores experimentales. En contraste, el modelo 2S2O_{COac}, además de ser el de menor energía, presenta distancias de enlace Cu(I)-S y Cu(I)-O en buen acuerdo con las distancias experimentales.

Por lo tanto, se propone que cuando el N-terminal se encuentra acetilado, éste no puede participar como ligando de Cu(I), siendo remplazado por el carbonilo del mismo grupo acetilo, mientras que los otros tres ligandos identificados S_{M1}, S_{M5} y O_{COO} se mantienen en la esfera de coordinación.

Tabla 6.9. Parámetros estructurales y energéticos de los modelos del complejo Cu(I)-AcAS(1-6), generados por la optimización geométrica con OPBE/TZVP/GEN-A2. ΔE es la energía relativa en kcal/mol. Las distancias de enlace experimentales a partir de datos de EXAFS son: 2 Cu-S a 2.36 Å y 2 Cu-N/O a 2.16 Å (Tabla 6.8).*

Modelo	Ligandos	OPBE	OPBE (6 H ₂ O)	Promedio OPBE (6 H ₂ O)	ΔE en OPBE (6 H ₂ O)
 2S2O _{COAc}	Cu-S _{M1}	2.30	2.33	2S – 2.340	0.00
	Cu-S _{M5}	2.32	2.35		
	Cu-O _{COO}	2.13	2.14	2O – 2.130	
	Cu-O _{COac}	2.11	2.12		
 2S2O _{COD2}	Cu-S _{M1}	2.29	2.31	2S – 2.325	5.30
	Cu-S _{M5}	2.31	2.34	1O – 2.130	
	Cu-O _{COO}	2.10	2.12	1O – 2.010	
	Cu-O _{COD2}	2.03	2.02		
 2S2O _{COM1}	Cu-S _{M1}	2.28	2.26	2S – 2.270	9.80
	Cu-S _{M5}	2.29	2.28	1O – 2.040	
	Cu-O _{COO}	1.99	2.01		
	Cu-O _{COM1}	2.30	3.64		

* En la Tabla:

O_{COO} es un oxígeno proveniente de la cadena lateral del Asp2

O_{COM1} es un oxígeno proveniente del carbonilo de la Met1

O_{COD2} es un oxígeno proveniente del carbonilo del Asp2

S_{M1} es un azufre proveniente de la cadena lateral de la Met1

S_{M5} es un azufre proveniente de la cadena lateral de la Met5

6.3. Discusión

La coordinación de Cu(II) en el sitio del N-terminal de la proteína AS ha sido estudiada ampliamente mediante diversas técnicas espectroscópicas. Por medio de *CD* y *EPR*, se han identificado los ligandos ecuatoriales que participan en la coordinación del ión metálico.³⁶ Sin embargo, la participación de las metioninas 1 y 5 como posibles ligandos axiales aún estaba por evaluarse. En este trabajo, mediante cálculos de estructura electrónica, se evaluaron varios modelos tetra y pentacoordinados para describir de forma completa el sitio de coordinación de Cu(II). Para poder obtener una fuente de comparación con los resultados experimentales también se calcularon los parámetros de *EPR* en los modelos estudiados. Los resultados presentados en esta Tesis demostraron que energéticamente los modelos tetracoordinados y aquellos en los que participa el azufre de la Met1 como ligando axial son más estables. De la misma forma, se demuestra que la participación del azufre de la Met5 como ligando axial no es favorable (su coordinación representa un costo energético de ~ 30 kcal/mol), por lo tanto se puede descartar a la Met5 como ligando axial de Cu(II). Por otro lado, se demostró que para reproducir los valores experimentales de *EPR* es necesario incluir la interacción axial, ya sea con el azufre de la Met1 o con moléculas de H₂O. Por tanto, el complejo de Cu(II), además de tener ecuatorialmente un modo de coordinación 2N2O, necesita una interacción axial que puede provenir del átomo de azufre de la Met1. Esto daría lugar a un complejo Cu(II)-2N2O1S en el sitio del N-terminal de la proteína AS.

La coordinación de Cu(II) en la proteína AS ha sido ampliamente estudiada. A la fecha se tiene una descripción muy detallada de la naturaleza de los complejos formados con Cu(II), sin embargo, la coordinación del ión Cu(I) no se ha estudiado con el mismo detalle. En este trabajo se utilizó la espectroscopía de absorción de rayos X, en combinación con cálculos de estructura electrónica, para obtener información estructural del complejo de Cu(I) en el sitio de mayor afinidad de la proteína AS. Por medio de *XAS*, se demostró que a pH 6.5 en el sitio del N-terminal de la proteína AS se forma un complejo de Cu(I) tetracoordinado cuyos ligandos son los grupos tioéter de la Met1 y Met5, así como otros dos ligandos N/O. La participación de ambas metioninas en la coordinación de Cu(I) fue propuesta previamente mediante *NMR*,⁴⁴ en este trabajo hemos corroborado dicha interacción. Por otro lado, un estudio reciente realizado por Riccardo De Ricco et al., a partir de datos de *XAS*, propone que a pH 7.5 el complejo Cu(I)-AS(1-

15) tiene en su esfera de coordinación dos enlaces Cu(I)-S a 2.294 Å y otros dos enlaces Cu(I)-N/O a 1.92 Å.⁴⁶ Si se analizan los resultados previamente publicados por De Ricco con los descritos en esta Tesis, es claro que hay una concordancia en el número de ligandos en la esfera de coordinación de Cu(I), esto es, que el complejo reducido muestra un ambiente tetracoordinado. También, en acuerdo con los estudios anteriores, tanto por *NMR* como por *XAS*, los resultados aquí descritos muestran que las metioninas 1 y 5 participan como ligandos del complejo de Cu(I). Sin embargo, respecto a las distancias de enlace reportadas por De Ricco y las presentadas en este trabajo (2 Cu-S a 2.33 Å y 2 Cu-N/O a 2.11 Å, Tabla 6.4), existen ligeras diferencias. Estas diferencias pueden ser explicadas si se considera el pH usado en cada estudio; en los datos reportados por De Ricco el pH usado fue de 7.5, mientras que este estudio se llevó a cabo a pH 6.5. Como fue demostrado en la sección 4.2 de esta Tesis y en reportes anteriores,⁵⁵ la coordinación de los grupos tioéter de los residuos de metionina a Cu(I) es altamente dependiente del pH. Los resultados descritos a pH 7.5 podrían presentar contribuciones de especies presentes a pH alto. En este trabajo, para asegurar la caracterización de una sola especie y evitar la presencia de complejos de Cu(I) con uno y dos azufres en la esfera de coordinación, los experimentos fueron realizados a pH 6.5. También, considerando que la proteína AS se encuentra en el citosol, cuyo pH es ~ 7, las especies formadas a pH más alto podrían no ser relevantes en el ambiente intracelular. Otro aspecto importante que se debe resaltar, es que en el estudio publicado por De Ricco, se proponen dos oxígenos, provenientes del carboxilato del Asp2 y de una molécula de H₂O, como los ligandos que completan la esfera de coordinación del complejo Cu(I)-AS(1-15) a pH 7.5, sin embargo, no se muestra ninguna evidencia de que estos ligandos sean los que participan en la coordinación del ión metálico. En el presente trabajo, mediante cálculos de estructura electrónica, se identificó al grupo amino terminal y al oxígeno del grupo carboxilato del Asp2 como los otros dos ligandos de la esfera de coordinación (Figura 6.13). La posibilidad de que la molécula de H₂O, u otros ligandos, participaran en la coordinación de Cu(I) fueron descartados por criterios energéticos y geométricos (sección 6.2.2.2).

Por otro lado, en esta Tesis se presenta el cálculo de la energía de reorganización de esfera interna obtenida a partir de las estructuras que se identificaron como los mejores candidatos para modelar los complejos de Cu(II) y Cu(I) en el sitio N-terminal de la proteína AS. La energía calculada resultó ser de 1.60 eV, cuando se parte de los complejos Cu(II)-2N2O y Cu(I)-1N1O2S; mientras que es 1.58 eV si se usan los complejos Cu(II)-2N2O1S y Cu(I)-1N1O2S.

Estos resultados indican que el gasto energético para llegar al complejo Cu(I)-1N1O2S se debe en gran parte a la energía necesaria para reclutar al grupo tioéter de la Met5. Aunado a esto, recientemente se reportó que el potencial de reducción de este sitio es de 82 mV.⁴⁸ Por lo tanto, este sitio presenta una alta energía de reorganización y un potencial de reducción bajo. A partir de estos datos se puede concluir que este sistema no está optimizado para llevar a cabo reacciones óxido-reducción.

Por último, en este trabajo también se investigó el efecto que tiene la acetilación del N-terminal en la coordinación de Cu(I). En este aspecto, se demostró por medio de *XAS* que la forma acetilada de la proteína AS también coordina Cu(I) en el sitio del N-terminal, formando un complejo tetracoordinado que contiene dos ligandos azufre y otros dos ligandos N/O, de forma muy similar a su contraparte sin acetilar. Sin embargo, los resultados teóricos indican que el grupo amino acetilado ya no es capaz de participar como ligando de Cu(I), en su lugar, el oxígeno del grupo carbonilo del acetilo fue identificado como el cuarto ligando de la esfera de coordinación.

La proteína AS se encuentra principalmente en el citosol de neuronas dopaminérgicas,²² posiblemente llevando a cabo diversas funciones relacionadas con el metabolismo y liberación de neurotransmisores.^{23, 25} En este contexto, la proteína AS se encuentra principalmente en un ambiente reductor.⁵⁶⁻⁵⁷ Por lo tanto, bajo estas condiciones fisiológicas, la coordinación con Cu(I) pudiera ser más relevante. Sin embargo, en la enfermedad de Parkinson, la proteína AS es encontrada en agregados que constituyen los cuerpos y neuritas de Lewi, los cuales se presentan intra y extracelularmente.⁸ En estas circunstancias, los complejos de Cu(I)-AS podrían enfrentarse a un ambiente oxidante en el medio extracelular. La Figura 6.13 resume los posibles escenarios del sitio de coordinación de Cu en el N-terminal de la proteína AS. En primer lugar, con el N-terminal libre, en el medio intracelular se daría lugar a la formación del complejo Cu(I)-2S1N1O, el cual, bajo un ambiente oxidante, como en el medio extracelular, podría oxidarse para formar la mezcla de especies Cu(II)-2N2O1S y Cu(II)-2N2O. La oxidación de los complejos Cu(I)-AS puede ir acompañada de la generación de *ROS* y la oxidación parcial de los residuos de Met.^{43, 48} Por otro lado, en presencia de agentes reductores, los complejos de Cu(II)-AS podrían regresar a la especie de Cu(I) y comenzar nuevamente el ciclo. Aunque este ciclo de reacciones no sería muy eficiente, ya que el sistema presenta una alta energía de reorganización y un potencial de reducción bajo.⁴⁸ (Figura 6.13, A). Por otro lado, si el N-terminal se encuentra

acetilado, (Figura 6.13, B) en el citosol podría formarse el complejo Cu(I)-2S2O en el sitio del N-terminal de la proteína AS. De hecho se ha demostrado que la forma acetilada de la proteína AS en presencia de Cu(I) favorece una conformación tipo α hélice en los primeros diez residuos de la proteína,⁵⁴ esto contribuiría a llevar a la proteína a la conformación que se ha descrito como fisiológicamente relevante en el ensamble de complejos necesarios para la liberación de neurotransmisores.²⁵ Sin embargo, si este complejo se enfrentara a un ambiente oxidante, por ejemplo, en el espacio extracelular, el sitio no es capaz de coordinar al ión Cu(II) y posiblemente lo liberaría en el medio. Esto podría suponer un exceso de Cu(II) en el medio extracelular, lo cual a su vez, podría tener implicaciones en el balance homeostático del Cu, la generación de ROS y la misma agregación de la proteína AS.

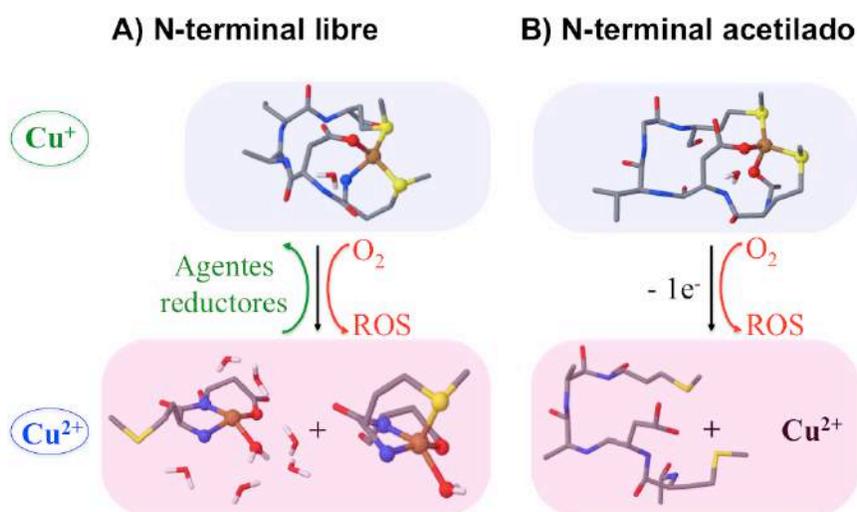


Figura 6.13. Coordinación de cobre en el sitio del N-terminal de la proteína AS con el N-terminal libre (A) y acetilado (B). En azul se muestra la coordinación de Cu(I) en un ambiente reductor, como en el citosol, mientras que en rosa se muestra lo que ocurriría en un ambiente oxidante, por ejemplo el espacio extracelular.

6.4. Conclusiones.

En este trabajo, la coordinación de Cu(II) y Cu(I) en el sitio del N-terminal de la proteína AS y el efecto de la acetilación del N-terminal sobre la coordinación se estudiaron en detalle. Con los resultados obtenidos se proporcionan dos escenarios diferentes: cuando la proteína se encuentra acetilada y cuando el N-terminal no presenta ninguna modificación. En el primer caso, en el ambiente intracelular, podría formarse el complejo de coordinación Cu(I)-2O2S, en el cual los ligandos son: los azufres de la Met1 y Met5, el oxígeno carboxilato del Asp2 y el oxígeno del grupo carbonilo del acetilo. Por otro lado, si la proteína se encuentra sin acetilar, se favorecerá el modo de coordinación Cu(I)-1N1O2S, con el grupo NH₂ reemplazando al oxígeno del grupo carbonilo del acetilo.

Sin embargo, bajo circunstancias que sitúen a la proteína AS en un ambiente oxidante, como en el espacio extracelular, los dos escenarios ofrecen panoramas muy diferentes. En primer lugar, con el grupo N-terminal libre, a pesar de que el sitio no está optimizado para llevar a cabo reacciones óxido-reducción, esto es, presenta una energía de reorganización alta y un potencial de reducción bajo, las especies Cu(I)-1N1O2S y Cu(II)-2N2O1S podrían existir. En este contexto, este sitio podría ser capaz de generar especies reactivas de oxígeno y desencadenar la oxidación parcial de los residuos de metionina. Por el contrario, con la proteína en su forma acetilada, no es posible la coordinación de Cu(II) en este sitio, por lo tanto el ión metálico podría ser liberado al espacio extracelular y esto podría tener implicaciones en la homeostasis del metal.

6.5. Referencias.

1. Chiti, F.; Dobson, C. M., *Ann. Rev. Biochem.* **2006**, *75*, 333-366.
2. Luheshi, L. M.; Crowther, D. C.; Dobson, C. M., *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 25-31.
3. Linert, W.; Kozlowski, H., *Springer-Verlag Wien, Metal Ions in Neurological Systems*, **2012**.
4. Samii, A.; Nutt, J. G.; Ransom, B. R., *Lancet.* **2004**, *363*, 1783-1793.
5. Pfeiffer, R. F., *Movement Disorders, Second Edition*, **2015**, Elsevier Inc, 229-238.
6. Stanley, F., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2003** *991*, 1-14.
7. Hughes, A. J.; Daniel, S. E.; Kilford, L.; Lees, A. J., *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* **1992**, *55*, 181-184.
8. Spillantini, M. G.; Schmidt, M. L.; Lee, V. M.; Trojanowski, J. Q.; Jakes, R.; Goedert, M., *Nature*, **1997**, *388*, 839-840.
9. Forno, L. S., *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **1996**, *55*, 259-272.
10. Krüger, R.; Kuhn, W.; Müller, T.; Voitalla, D.; Graeber, M.; Kösel, S.; Przuntek, H.; Epplen, J. T.; Schöls, L.; Riess, O., *Nat. Genet.* **1998** *18*, 106-108.
11. Polymeropoulos, M. H.; Lavedan, C.; Leroy, E.; Ide, S. E.; Dehejia, A.; Dutra, A.; Pike, B.; Root, H.; Rubenstein, J.; Boyer, R.; Stenroos, E. S.; Chandrasekharappa, S.; Athanassiadou, A.; Papapetropoulos, T.; Johnson, W. G.; Lazzarini, A. M.; Duvoisin, R. C.; Di Iorio, G.; Golbe, L. I.; Nussbaum, R. L., *Science*, **1997**, *276*, 2045-7.
12. Prusiner, S. B., *Science*, **1991**, *252*, 1515-1522.
13. Feany, M. B.; Bender, W. W., *Nature*, **2000**, *404*, 394-398.
14. Masliah, E.; Rockenstein, E.; Veinbergs, I.; Mallory, M.; Hashimoto, M.; Takeda, A.; Sagara, Y.; Sisk, A.; Mucke, L., *Science*, **2000**, *287*, 1265-9.
15. Trojanowski, J. Q.; Goedert, M.; Iwatsubo, T.; Lee, V. M., *Cell Death Differ.* **1998**, *5*, 832-7.
16. Binolfi, A.; Quintanar, L.; Bertoncini, C. W.; Griesinger, C.; Fernández, C. O., *Coord. Chem. Rev.* **2012**, *256*, 2188–2201.
17. Theillet, F.-X.; Binolfi, A.; Bekei, B.; Martorana, A.; May Rose, H.; Stuver, M.; Verzini, S.; Lorenz, D.; van Rossum, M.; Goldfarb, D.; Selenko, P., *Nature*, **2016**, *530*, 45-50.
18. Fauvet, B.; Mbefo, M. K.; Fares, M.-B.; Desobry, C.; Michael, S.; Ardah, M. T.; Tsika, E.; Coune, P.; Prudent, M.; Lion, N.; Eliezer, D.; Moore, D. J.; Schneider, B.; Aebischer, P.; El-Agnaf, O. M.; Masliah, E.; Lashuel, H. A., *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 15345-15364.
19. Ulmer, T. S.; Bax, A.; Cole, N. B.; Nussbaum, R. L., *J Biol Chem.* **2005** *280*, 9595-603.
20. Borbat P; Ramlall TF; Freed JH; D., E., *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 10004-5.
21. Surguchov, A.; Surgucheva, I.; Solessio, E.; Baehr, W., *Mol Cell Neurosci.* **1999** *13*, 95-103.
22. Maroteaux, L.; Campanelli, J. T.; Scheller, R. H., *J. Neurosci.* **1988**, *8*, 2804-2814.
23. Yu, S.; Ueda, K.; Chan, P., *Mol Neurobiol.* **2005**, *31*, 243-54.
24. Philipp J. Kahle; Christian Haass; Kretschmar, H. A.; Neumann, M., *J. Neurochem.* **2002**, *82*, 449–457.
25. Burré, J.; Sharma, M.; Tsetsenis, T.; Buchman, V.; Etherton, M. R.; Südhof, T. C., *Science*, **2010**, *329*, 1663-1667.
26. Burré, J.; Sharma, M.; Südhof, T. C., *J. Neurosci.* **2012** *32*, 15227–15242.

27. Diao, J.; Burré, J.; Vivona, S.; Cipriano, D. J.; Sharma, M.; Kyoung, M.; Südhof, T. C.; Brunger, A. T., **2013**, DOI: 10.7554/eLife.00592.
28. Park, S. S.; Schulz, E. M.; Lee, D., *Eur. J. Neurosci.* **2007**, *26*, 3104-12.
29. Dexter, D. T.; Carayon, A.; Javoy-Agid, F.; Agid, Y.; Wells, F. R.; Daniel, S. E.; Lees, A. J.; Jenner, P.; Marsden, C. D., *Brain*, **1991**, *114* 1953-75.
30. Pall, H. S.; Williams, A. C.; Blake, D. R.; Lunec, J.; Gutteridge, J. M.; Hall, M.; Taylor, A., *Lancet*, **1987**, *2*, 238-41.
31. Uversky, V. N.; Li, J.; Fink, A. L., *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 44284-96.
32. Binolfi, A.; Rasia, R. M.; Bertocini, C. W.; Ceolin, M.; Zweckstetter, M.; Griesinger, C.; Jovin, T. M.; Fernández, C. O., *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9893-9901
33. Sofic, E.; Sapcanin, A.; Tahirovic, I.; Gavrankapetanovic, I.; Jellinger, K.; Reynolds, G. P.; Tatschner, T.; Riederer, P., *J. Neural. Transm. Suppl.* **2006**, *71*, 39-43.
34. Rasia, R. M.; Bertocini, C. W.; Marsh, D.; Cherny, W. H. D.; Zweckstetter, M.; Griesinger, C.; Jovin, T. M.; Fernández, C. O., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102*, 4294-4299.
35. Binolfi, A.; Lamberto, G. R.; Duran, R.; Quintanar, L.; Bertocini, C. W.; Souza, J. M.; Cerveñansky, C.; Zweckstetter, M.; Griesinger, C.; Fernández, C. O., *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11801-11812.
36. Binolfi, A.; Rodríguez, E. E.; Valensin, D.; D'Amelio, N.; Ippoliti, E.; Obal, G.; Duran, R.; Magistrato, A.; Pritsch, O.; Zweckstetter, M.; Valensin, G.; Carloni, P.; Quintanar, L.; Griesinger, C.; Fernández, C. O., *Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 10668-10679.
37. Quiroz, A. R., *Tesis de Maestría* **2011**, *Farmacología, Cinvestav*.
38. Valensin, D.; Camponeschi, F.; Luczkowski, M.; Baratto, M. C.; Remelli, M.; Valensin, G.; Kozłowski, H., *Metallomics*, **2011**, *3*, 292-302.
39. Uversky, V. N.; Yamin, G.; Souillac, P. O.; Goers, J.; Glaser, C. B.; Fink, A. L., *FEBS Lett.* **2002**, *517*, 239-244.
40. Lucas, H. R.; DeBeer, S.; Hong, M.-S.; Lee, J. C., *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 6636-6637.
41. Wang, C.; Liu, L.; Zhang, L.; Peng, Y.; Zhou, F., *Biochemistry*, **2010**, *49*, 8134-8242.
42. Sevcsik, E.; Trexler, A. J.; Dunn, J. M.; Rhoades, E., *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 7152-7158.
43. Miotto, M. C.; Rodríguez, E. E.; Valiente-Gabioud, A. A.; Torres-Monserrat, V.; Binolfi, A.; Quintanar, L.; Zweckstetter, M.; Griesinger, C.; Fernández, C. O., *Inorg. Chem.* **2014**, *53*, 4350-4358.
44. Binolfi, A.; Valiente-Gabioud, A. A.; Duran, R.; Zweckstetter, M.; Griesinger, C.; Fernández, C. O., *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 194-196.
45. Miotto, M. C.; Binolfi, A.; Zweckstetter, M.; Griesinger, C.; Fernández, C. O., *J. Inorg. Biochem.* **2014**, *141*, 208-211.
46. De Ricco, R.; Valensin, D.; Dell'Acqua, S.; Casella, L.; Elena Gaggelli; Valensin, G.; Bubacco, L.; Mangani, S., *Inorg. Chem.* **2015**, *54*, 265-272.
47. Dikiy, I.; David, E., *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 3652-3665.
48. Rodríguez, E.; Arcos-López, T.; Trujano-Ortiz, L.; Fernández, C.; González, F.; Vela, A.; Quintanar, L., *J. Biol. Inorg. Chem.* **2016**, *10.1007/s00775-016-1376-5*.
49. Patchkovskii, S.; Ziegler, T., *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 3506-3516.
50. Neese, F., *J. Chem. Phys.* **2003**, *118*, 3939-3948.
51. Rivillas-Acevedo, L.; Grande-Aztatzi, R.; Lomeli, I.; Garcia, J. E.; Barrios, E.; Teloxa, S.; Vela, A.; Quintanar, L., *Inorg. Chem.* **2011**, *50*, 1956-1972.

52. Grande-Aztatzi, R.; Rivillas-Acevedo, L.; Quintanar, L.; Vela, A., *J. Phys. Chem. B*, **2013**, *117*, 789-799.
53. Gomez-Castro, C. Z.; Vela, A.; Quintanar, L.; Grande-Aztatzi, R.; Mineva, T.; Goursot, A., *J. Phys. Chem. B*, **2014**, *118*, 10052-10064.
54. Miotto, M. C.; Valiente-Gabioud, A. A.; Rossetti, G.; Zweckstetter, M.; Carloni, P.; Selenko, P.; Griesinger, C.; Binolfi, A.; Fernández, C. O., *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 6444–6447.
55. Rubino, J. T.; Chenkin, M. P.; Keller, M.; Riggs-Gelasco, P.; Franz, K. J., *Metallomics*, **2011**, *3*, 61-73.
56. Lin, S.; Guarente, L., *Curr. Opin. Cell Biol.* **2003**, *15*, 241-246.
57. Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology, *Amino Acids and Peptides in the Nervous System*, SPRINGER. **2007**, 3rd Edition, pp. 352.

7. Discusión final.

A lo largo de esta Tesis se presentan los resultados obtenidos del estudio de la coordinación de Cu(II) y Cu(I) en el sitio de la His111 de la proteína prion humana y en el sitio N-terminal de la proteína α sinucleína.

Las proteínas PrP y AS se encuentran fisiológicamente bajo ambientes muy diferentes. La PrP se encuentra anclada a la membrana celular en el espacio extracelular (condiciones oxidantes, pH 7.4) y bajo condiciones específicas, puede sufrir endocitosis, que la situaría al interior de endosomas (condiciones reductoras, pH 4-5). Por su parte, la AS es una proteína que se encuentra en el citosol (condiciones reductoras, pH \sim 7). En este trabajo se ha descrito la coordinación de Cu(II) y Cu(I) bajo los diferentes ambientes de pH que presentan estos dos sistemas.

La Figura 7.1 muestra una comparación de las especies de Cu(II) y Cu(I) caracterizadas a pH 6.5 en el sitio de la His111 de la proteína prion (recuadro azul) y en el sitio del N-terminal de la proteína AS (recuadro verde). Podemos ver que existen varias similitudes y diferencias en estos sistemas de los cuales se puede hacer un interesante análisis. En primer lugar, la coordinación de Cu(II) al sitio de la His111 en la proteína prion humana ocurre a través de los residuos MKHM (fragmento 109-112 de la proteína PrP humana), mientras que, en el sitio del N-terminal de la proteína AS se coordina por los residuos MDVFM (fragmento 1-5 de la AS). En el caso de la PrP, el grupo principal que ancla al ión Cu(II) es la His (coordinación hacia el N-terminal), mientras que, en la AS es el grupo amino terminal y la coordinación ocurre hacia el C-terminal. Por otro lado, en el caso de la PrP, la desprotonación de dos amidas y la participación de un grupo carbonilo de la cadena peptídica permiten la formación del complejo 3N1O que contiene tres anillos adyacentes de 6,5,7 miembros, sin olvidar que, a pH más alto puede existir también otra especie con un modo de coordinación 4N (tres anillos de 6,5,5 miembros) debido a la desprotonación de una tercera amida de la cadena peptídica (Figura 4.2, sección 4.2.3). Sin embargo, en la AS, la presencia del Asp2 provee un grupo carboxilato como ligando, desfavoreciendo la desprotonación de una segunda amida. Esto se refleja en la estabilidad del complejo de Cu(II) en un amplio rango de pH (5 - 7.5).

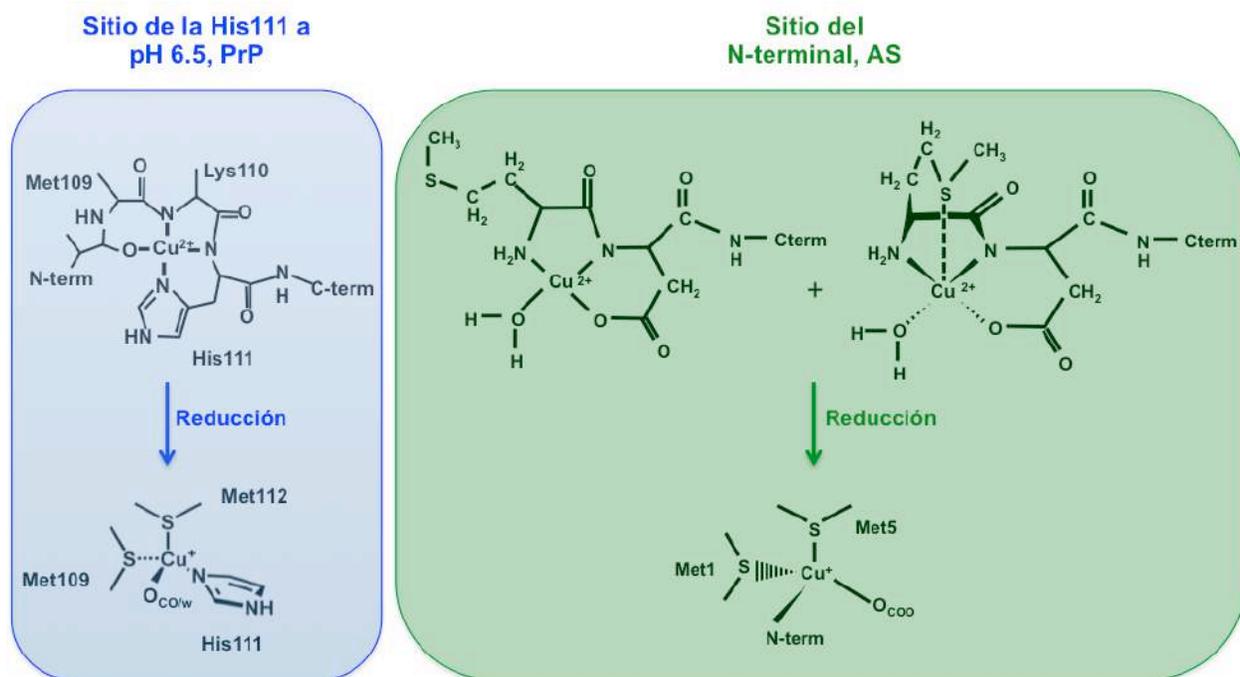


Figura 7.1. Comparación de la coordinación de Cu(II) y Cu(I) entre el complejo formado a pH 6.5 en el sitio de la His111 de la PrP (azul) y el sitio del N-terminal de la proteína AS (verde).

Por otro lado, si analizamos las especies reducidas, ambos sitios tienen un modo de coordinación 1N1O2S, aunque en el caso de la PrP, los ligandos N/O pertenecen al imidazol de la His y a un grupo carbonilo o una molécula de H₂O, mientras que en la AS, provienen del grupo terminal NH₂ y del carboxilato del Asp2. Además, aunque ambos sitios tienen dos residuos de Met en la esfera de coordinación, hay una diferencia importante que resaltar, en la PrP las metioninas están separadas por dos residuos (MKHM), mientras que en la AS se encuentran separadas por tres (MDVFM). Como se discutió en la sección 4.4, los residuos de metionina son particularmente efectivos en la coordinación de Cu(I) cuando están separados por no más de dos residuos. Todas estas condiciones tienen implicaciones en la formación, estabilidad y reactividad de estos complejos, por eso, aunque parezcan sistemas similares, en realidad tienen características muy particulares. Por ejemplo, para el sitio de la PrP la energía de reorganización es 1.79 eV, mientras que para el sistema de la AS es 1.58 eV. La diferencia de estos valores se puede explicar si se considera que en el primer caso se intercambian tres ligandos y en el segundo caso sólo dos. No obstante, el potencial redox en el caso de la PrP es 152 mV (sección 5) y para el sitio del N-terminal de la proteína AS es de 82 mV. Esto tiene consecuencias importantes en la reactividad

de cada sistema, siendo en comparación, más eficiente el sitio de la PrP para llevar a cabo reacciones de óxido-reducción.

8. Conclusiones generales.

Como se ha demostrado a lo largo de esta Tesis, aunque ambos sistemas Cu-PrP y Cu-AS, parecen compartir muchas similitudes, en realidad, el tipo de ligandos, la disposición de estos en la esfera de coordinación y el ambiente químico en el que se encuentran estas proteínas, origina diferencias importantes en la formación, estabilidad y reactividad de los complejos de Cu en estos dos sistemas.

El sitio de coordinación a Cu alrededor de la His111 de la proteína PrP (motivo MKHM), le confiere propiedades de coordinación muy interesantes. La presencia de los residuos de His y Met proveen los elementos necesarios para coordinar Cu(II) y Cu(I) en un amplio rango de pH. Las especies Cu(II)-3N1O y Cu(II)-4N pueden existir en equilibrio a pH 7.5. En presencia de agentes reductores, el complejo más poblado del sitio Cu(I)-His111 puede ser la especie Cu(I)-1N1O2S, la cual es capaz de activar O₂ a través de un mecanismo de esfera interna. En este proceso, los residuos de metionina son oxidados a sulfóxido. La habilidad que presentan las metioninas para contener las especies reactivas de oxígeno podría jugar un papel muy importante en las propiedades antioxidantes de la PrP. Por otro lado, incluso si se presentan cambios drásticos en el ambiente químico, como aquellos ocurridos en la endocitosis, los residuos de metionina hacen posible la existencia de la especie Cu(I)-2S a pH muy bajo (< 5).

Por su parte, el sitio de coordinación de Cu en el N-terminal de la proteína AS está constituido por los residuos MDVFM. En este sistema se exploró la coordinación de Cu en dos escenarios diferentes: cuando el N-terminal de la proteína se encuentra libre y en su forma acetilada. Los resultados de este trabajo indican que si la proteína AS se encuentra bajo un ambiente reductor, por ejemplo en el citosol, en el primer caso, se formaría el complejo Cu(I)-1N1O2S, en el cual participan como ligandos los dos residuos de metionina (Met1 y Met5), el oxígeno carboxilato del Asp2 y el grupo N-terminal. Por otro lado, si la proteína se encuentra acetilada, el grupo N-terminal no puede participar en la coordinación y por lo tanto se favorecerá el modo de coordinación Cu(I)-2O2S, en el que el grupo carbonilo del acetilo reemplaza al NH₂ en la esfera de coordinación. Sin embargo, si la proteína AS se sitúa en un ambiente oxidante, por ejemplo si

se encontrara en el espacio extracelular, la acetilación de la proteína ofrece un panorama muy diferente respecto a la forma no acetilada. Con el grupo N-terminal libre, el complejo Cu(I)-1N1O2S, aunque de forma poco eficiente, podría oxidarse, generar especies reactivas de oxígeno y desencadenar la oxidación parcial de los residuos de metionina. Por el contrario, con la proteína en su forma acetilada, no es posible la coordinación de Cu(II) en este sitio, por lo tanto el ión metálico podría ser liberado al espacio extracelular, esto último podría tener implicaciones en la homeostasis del Cu.

9. Perspectivas.

Teniendo en cuenta el avance realizado en este estudio, se proponen las siguientes perspectivas que ayudarían a entender con mayor detalle estos sistemas Cu-proteína, tanto en la función biológica como en las posibles implicaciones en las enfermedades neurodegenerativas TSEs y Parkinson.

En esta Tesis se estudió en detalle la coordinación de Cu(I) en el sitio de la His111 de la proteína PrP, además se determinó que la reacción del complejo de Cu(I) frente a oxígeno sigue un mecanismo de transferencia electrónica de esfera interna. Sería muy interesante continuar con un estudio detallado por *DFT* para identificar la naturaleza del mecanismo de esfera interna, esto es, si la formación del intermediario Cu(II)-superóxido sigue un mecanismo asociativo o disociativo. Por otra parte, sería de gran utilidad medir la afinidad de los complejos Cu(I)-His111 a diferentes valores de pH, los resultados obtenidos servirían para comparar la efectividad de la coordinación de Cu(I) de este sitio, respecto a los encontrados en otras proteínas, por ejemplo las transportadoras de Cu. También, sería de gran importancia cuantificar el porcentaje de oxidación que sufren los residuos de metionina, así como las especies reactivas de oxígeno producidas por la reacción. Con estos resultados, se podría evaluar la capacidad de las metioninas como especies que compiten por el daño oxidativo frente a otros componentes. Esto podría darnos información valiosa respecto al daño oxidativo generado por las ROS producidas por estos sistemas. En este mismo contexto, sería muy interesante evaluar la capacidad de la enzima reductasa de sulfóxido de metionina (MsrA y MsrB) para regenerar la Met109 y Met112 desde su forma de sulfóxido; además de estudiar el efecto que la oxidación de estas metioninas tiene sobre la agregación de la proteína PrP.

Así mismo, en esta Tesis se presentó la caracterización de la coordinación de Cu(I) en el sitio N-terminal de la proteína AS y el efecto que la acetilación tiene sobre dicha coordinación. Para continuar con este trabajo sería de gran relevancia evaluar el efecto del pH sobre la coordinación de Cu(I) en este sitio, así como elucidar la coordinación de Cu(I) en el sitio alrededor de la His50, que, a pesar de presentar una menor afinidad podría ser importante. Por otro lado, sería muy interesante estudiar de forma detallada la reactividad del complejo Cu(I)-AcAS (modo 2O2S) y

Cu(I)-His50 frente a oxígeno. También sería de gran importancia evaluar el efecto del ión Cu(I) en el plegamiento y agregación de la proteína AS y en su forma acetilada (AcAS).

En este trabajo se ha obtenido información muy útil y valiosa acerca de la coordinación y reactividad de los complejos de Cu en los fragmentos MKHM y MDVFM, esta información puede resultar de mucha ayuda tanto para continuar con el estudio de los sistemas Cu-PrP y Cu-AS, así como en el diseño de sitios de coordinación con capacidades de reactividad específicas a diferentes valores de pH.

10. Materiales y Métodos.

Reactivos. Los reactivos usados en la síntesis de péptidos, purificación y preparación de las muestras fueron: resina MBHA Fmoc-Rink amid, aminoácidos con el grupo Fmoc (fluorenylmethoxycarbonyl) como grupo protector, DMF (N,N-dimethylformamide), DCM (dichloromethane), IPA (isopropyl alcohol), DIC (N,N-diisopropylcarbodiimide), HOBt (1-hydroxybenzotriazole), NMP (N-methyl-2-pyrrolidone), piperidina, DBU (1, 8-diazabicyclo [5.4.0] undeceno), soluciones para ensayo de ninhidrina: SolA (fenol, etanol, KCN, piridina, amberlite MB-3), SolB (Ninhidrina (2,2-dihydroxyindane-1,3-dione), etanol, amberlite MB-3), anhídrido acético, dietil éter, TIS (tris(isopropyl)silane), EDT (ethanedithiol), TFA (trifluoroacetic acid), ACN (acetonitrilo, grado HPLC), buffer A (MES/NEM 20 mM (2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid /N-ethylmorpholine)) para el sistema de la prion, buffer B (MOPS/NaCl (3-(N -morpholino) propanesulfonic acid, 20 mM/100mM)) para el sistema de la alfa sinucleína, glicerol, NaOH, HCl, ditionita de sodio, EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) ácido ascórbico y CuSO₄. El agua usada en todos los experimentos fue purificada a una resistividad de 18 MΩ/cm usando un sistema Millipore Gradient deionizing.

Síntesis de péptidos. Los péptidos KTNMKHMAGA (PrP(106-115), KTNAKHMAGA (PrP(106-115)M109A), KTNMKHAAGA (PrP(106-115)M112A), KTNAKHAAGA (PrP(106-115)M109&M112A) fueron sintetizados en fase sólida con el método Fmoc.¹⁻² Brevemente, ~ 300 mg de resina MBHA Fmoc-Rink amid fueron tratados con DCM, esto permite que la resina se expanda y que los grupos amida-Fmoc de la resina se acondicionen para iniciar el proceso de síntesis. Posteriormente la resina fue tratada con una solución desprotectora (30 % piperidina, 0.1 % DBU, 69.9 % DMF) para remover el grupo Fmoc. El acoplamiento de aminoácidos a la resina se inicia en el C-terminal y acaba en el N-terminal, por lo tanto el primer acople realizado corresponde al último aminoácido de la secuencia que se desee sintetizar. Para llevar a cabo el primer acople, el aminoácido fue tratado con HOBt, NMP, DIC y DCM, después fue añadido a la resina. La reacción se mantuvo por 7-8 horas en agitación. El paso siguiente fue tratar la resina nuevamente con la solución desprotectora y repetir el proceso de acople del siguiente aminoácido. Al finalizar, si el diseño así lo requiere, después de la última desprotección se acetila el N-terminal con una solución 1:1:1 de

anhídrido acético, piridina y DMF. Entre cada ciclo de desprotección y acople se realizaron lavados (DMF, IPA y DCM) de la resina y el ensayo de ninhidrina (2:1, solA:solB) para detectar la presencia de aminas primarias. Por último la resina es tratada con 92.5 % TFA, 2.5 % agua, 2.5 % EDT y 2.5 % TIS para desproteger las cadenas laterales de los aminoácidos y desanclar del soporte el péptido sintetizado. Finalmente el péptido obtenido se precipita usando éter frío. Una vez que el precipitado se seca se procede a su posterior purificación.

Los péptidos MDVFMK (AS(1-6) y AcAS(1-6)) fueron sintetizados por Esaú E. Rodríguez, en el laboratorio de la Dra. Liliana Quintanar en el Cinvestav, siguiendo la misma técnica de síntesis descrita.

Todos los péptidos fueron amidados en el C-terminal y, a excepción del péptido AS(1-6), todos fueron acetilados en el N-terminal. Los péptidos fueron purificados por HPLC (high performance liquid chromatography) en fase reversa con un método semi-preparativo usando una columna semiprep Waters® μ Bondapak C18. La masa molecular de cada péptido fue confirmada por ESI-MS (electrospray ionization mass spectroscopy) y la pureza final fue determinada por HPLC analítico, obteniendo una pureza > 95 %.

Proteínas recombinantes. Las proteínas ASH50A (α sinucleína, AS, con una Ala en la posición 50 reemplazando la His) y AcASH50A (α sinucleína acetilada con una Ala en la posición 50 reemplazando la His) usadas en este proyecto de investigación fueron proporcionadas por el grupo de investigación del Dr. Claudio O. Fernández, Laboratorio Max Planck de Biología Estructural, Química y Biofísica Molecular de Rosario, Argentina.

Espectroscopía de absorción de Rayos X (XAS, por sus siglas en Inglés) K-edge. Las muestras fueron preparadas en el departamento de Química de la Universidad de Stanford y los datos fueron colectados en el Stanford Synchrotron Radiation Lightsource (SSRL), con la ayuda de Munzarin Qayyum y Hyeongtaek Lim, estudiantes de los grupos de investigación de los Dres. Ed. I. Solomon, Britt Hedman y Keith O. Hodgson. *Preparación de las muestras.* Los complejos Cu(II)-péptido/proteína fueron preparados a 2 mM de concentración de péptido con 0.5 equivalentes de Cu(II) (sistema PrP a pH 6.5) o 1 mM de péptido/proteína con 0.8 equivalentes de Cu(II) (sistema PrP a pH 8.5 y sistema AS), en una mezcla de 50 % buffer A o buffer B y 50% glicerol; el pH fue ajustado adicionando pequeñas cantidades de

NaOH o HCl. La naturaleza de los complejos Cu(II)-péptido/proteína fue examinada por resonancia paramagnética electrónica (EPR), en todos los casos se obtuvieron valores g_z y A_z consistentes con los previamente reportados para los sistemas bajo estudio. Los complejos Cu(I)-péptido/proteína fueron obtenidos de la reducción de los complejos correspondientes de Cu(II) con 100 equivalentes de ácido ascórbico (ajustado al pH correspondiente), bajo condiciones anaeróbicas. Los complejos reducidos fueron caracterizados por EPR y en todos los casos se encontró que tenían menos del 5 % de la especie de Cu(II). *Colección de datos de XAS.* Los datos de XAS Cu K-edge fueron colectados en la línea 7-3, los parámetros del anillo de almacenamiento del sincrotrón fueron 3 GeV y 300-350 mA o 500mA. Un pre-monocromador revestido de Rh fue usado para la colimación vertical, para la selección de energía fue usado un monocromador de doble cristal de Si(220). Las muestras fueron colocadas en celdas de XAS de Lucite de 2 mm con ventanas de Kapton de 38 μm y mantenidas a temperatura constante de ~ 10 K durante la colección de los datos, para esto se usó un criostato de He de flujo continuo CF1208. Un detector Canberra Ge 30-element solid-state fue usado para coleccionar el Cu $K\alpha$ fluorescencia. La calibración interna de energía fue hecha mediante la medición simultanea de la absorción de una lamina de Cu colocada entre dos cámaras de ionización, delante de la muestra. El primer punto de inflexión del espectro de la lamina de Cu fue asignado a 8980.3 eV. En las muestras de Cu(I) no se observó daño por radiación, por lo tanto todos los barridos se usaron en el promedio final. Cada conjunto de datos comprende de un promedio de 7 a 27 barridos. Los espectros de las muestras de Cu(II) fueron colectados en cuatro puntos físicamente separados de la celda con un promedio de 2 a 4 barridos por punto para minimizar el efecto de fotoreducción. *Análisis de los datos de XAS.* Los datos de la región pre-edge fueron obtenidos por medio de un ajuste polinomial de segundo orden del promedio de los datos. Para modelar la región post-edge se uso un modelo polinomial de tres partes (2°, 3° y 3° orden). Los datos fueron normalizados por escalamiento a un valor de 1.0 en la región edge a 9000 eV. El tratamiento de los datos fue realizado usando PySpline.³ El programa de ajuste por mínimos cuadrados OPT del paquete computacional EXAFSPAK⁴ fue usado para el ajuste de los datos. Las funciones de fase y amplitud iniciales fueron generadas en el programa FEFF 7.0⁵ usando como estructuras iniciales los modelos de Cu(I) calculados. Los números de coordinación fueron variados sistemáticamente para mejorar los ajustes y obtener un acuerdo entre los datos de EXAFS y

su transformada de Fourier. Los ajustes fueron evaluados comparando el error normalizado (Fn) de cada ajuste. $F_n = \frac{\sum k^6 (\chi_{\text{exp}} - \chi_{\text{calcd}})^2}{N_{\text{data}}}$, donde la suma se realiza sobre k, el vector de onda del fotoelectrón y χ son los puntos calculados o experimentales.

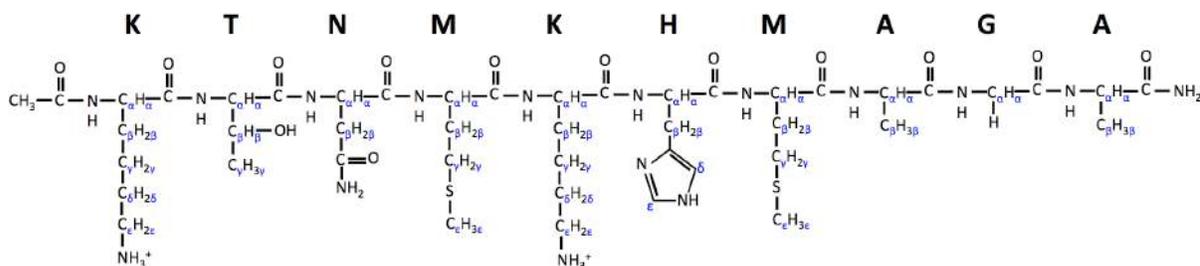
Análisis BVS (Bond Valence Sum).⁶⁻⁷ El análisis BVS realizado sobre los modelos provenientes del ajuste de los datos del EXAFS se hizo a partir de las ecuaciones: $s_i = e^{\left(\frac{r_0 - r}{0.37}\right)}$ y

$$BVS = \sum_{i=1}^n s_i$$

Donde, r es la distancia de enlace para el ligando i derivada de los datos experimentales y r_0 es la distancia de enlace de referencia. Los valores usados para r_0 incluyen: $r_{\text{Cu(I)-S}} = 1.898 \text{ \AA}$, $r_{\text{Cu(I)-N}} = 1.595 \text{ \AA}$, y $r_{\text{Cu(I)-O}} = 1.519 \text{ \AA}$.

Resonancia magnética nuclear de muestras Cu(I)-PrP. Estos experimentos fueron realizados en el Laboratorio Max Planck de Biología Estructural, Química y Biofísica Molecular de Rosario, Argentina, por Marco C. Miotto, estudiante del grupo de investigación del Dr. Claudio O. Fernández. Los complejos de Cu(I)-PrP (0.3 mM, concentración de péptido y 0.8 equivalentes de Cu) fueron preparados a partir de sus contrapartes de Cu(II), en buffer A sin glicerol, degasificados y reducidos con 100 equivalentes de ascorbato y preparados en un rango de pH de 3.4 a 9.2. La asignación homonuclear de los péptidos fue realizada a partir de los experimentos $^1\text{H}-^1\text{H}$, Total Correlated Spectroscopy (TOCSY), y $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC) a pH 6.5 y 8.5. Los picos cruzados que se afectaron en los experimentos $^1\text{H}-^1\text{H}$ y $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ en presencia de Cu(I) fueron identificados por su comparación con los valores de los desplazamientos químicos en los experimentos realizados en ausencia del ión metálico. Todos los experimentos fueron adquiridos a 288 K en tubos de NMR sellados bajo una atmósfera de N_2 , usando un espectrometro Bruker Avance II 600 MHz equipado con una crio-sonda de triple resonancia con detección inversa. La adquisición, procesamiento y visualización de los espectros de NMR fue realizada usando los programas TOPSPIN 2.1 (Bruker) y Sparky.

Las señales a las que se hace referencia en las figuras 4.14 - 4.16 y la sección 4.2.4 y 4.2.5 de esta Tesis siguen la siguiente asignación:



Absorción electrónica UV-Vis y Dicroísmo circular (CD, por sus siglas en Inglés). Los experimentos de absorción electrónica y CD de las muestras Cu(II)-péptido fueron realizados a temperatura ambiente usando un espectrómetro Agilent 8453 equipado con un arreglo de diodos, y un espectropolarímetro CD Jasco J-815. Los espectros fueron colectados en celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico.

Resonancia paramagnética electrónica (EPR, por sus siglas en Inglés). Las muestras de Cu(II) y Cu(I) fueron adquiridas en un equipo Bruker EMX de banda X, con una fuente de microondas ER 041 XG y una cavidad ER 4102ST. Las condiciones experimentales fueron las siguientes: frecuencia de la microonda, 9.4 GHz; temperatura, 77 K; potencia de la microonda, 10 mW; amplitud de modulación, 5G; frecuencia de modulación, 100 kHz; constante de tiempo, 327 ms; tiempo de conversión, 83 ms y promedio de barridos, 12. La línea base de los espectros de EPR fue corregida usando el programa KaleidaGraph 4.1.3.

Mediciones cinéticas por medio de Stopped-Flow. Los estudios cinéticos de la reducción de los complejos Cu(II)-PrP con ascorbato fueron realizados por medio de absorción electrónica UV-Vis en un sistema de stopped-flow SX20, equipado con una lámpara de Xe de 150 W y un sistema de arreglo de diodos. Todos los experimentos fueron realizados en un modo de mezclado simple, con una razón de mezclado 1:1 (v/v), en una celda con un paso óptico de 1 cm. La temperatura fue mantenida a 25.0 ± 0.1 °C por medio de un recirculador y se monitoreó la temperatura con un sensor interno en la unidad de mezclado. El análisis de los datos fue hecho con el programa Pro-data. Los complejos Cu(II)-PrP y el ascorbato fueron

degasificados en una línea de vacío y colocados en las jeringas de inyección del equipo de stopped-flow de forma anaeróbica, usando válvulas de tres vías. Todas las líneas de flujo del equipo de stopped-flow fueron lavadas exhaustivamente antes de cargar las jeringas de inyección con la muestra de Cu(II) y el agente reductor con ditionita de sodio y buffer A degasificados. Las concentraciones finales de los complejos Cu(II)-PrP en la celda fueron 0.15 mM. La reducción fue seguida bajo condiciones de pseudo-primer orden con un exceso de 20 veces el agente reductor. La pérdida de la absorbancia como función del tiempo fue monitoreada a 570 nm (pH 8.5) o 600 nm (pH 6.5). El tiempo muerto en las mediciones fue de 1 ms. Las constantes de rapidez reportadas representan el promedio de tres experimentos independientes.

Mediciones de las cinéticas de re-oxidación. Los estudios cinéticos de re-oxidación de los complejos Cu(I)-PrP a pH 6.5 con oxígeno fueron realizados en un espectrómetro Agilent 8453 equipado con un arreglo de diodos. Todos los experimentos se llevaron a cabo en una celda de cuarzo con tapa, el paso óptico fue de 1 cm. El análisis de los datos se hizo con el programa Origin 6.1. Los complejos Cu(I)-PrP a pH 6.5 fueron preparados adicionando 1 equivalente de ascorbato a la solución degasificada del correspondiente complejo de Cu(II) (0.8 mM de péptido y 0.5 equivalentes de Cu en buffer A), la reducción total de los complejos bajo estas condiciones fue confirmada por absorción electrónica. La reoxidación de los complejos de Cu(I) después de adicionar buffer A saturado con aire (~ 0.5 equivalentes de O₂), fue monitoreada por la aparición de la banda d-d característica a 600 nm. Las constantes de rapidez reportadas son el promedio de tres mediciones independientes.

Espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization time of flight/time of flight). Estos datos fueron colectados en la unidad de Genómica, proteómica y metabolómica, LaNSE, Cinvestav. La masa molecular de los péptidos de PrP antes y después de un ciclo de reducción-oxidación fue determinada por medio de un equipo MALDI-TOF/TOF 4800 plus (AB Sciex, Framingham, MA). Las muestras de los péptidos de PrP fueron colectadas en el punto inicial y final de los experimentos de reducción (bajo condiciones anaeróbicas) y reoxidación con oxígeno. Los complejos Cu-PrP fueron tratados con 15 equivalentes de EDTA para remover el ión Cu de

los complejos, después, las muestras fueron desaladas en una micro-columna C18 (C18 ZipTip Agilent Technologies, Santa Clara, CA.), y eluidos en una mezcla de 0.1 % TFA y 50 % ACN. Los péptidos eluidos fueron concentrados en un volumen de 2 μ L y mezclados en una solución matriz (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid en 50 % agua 50 % ACN y 0.1 % TFA). 1000 barridos por cada muestra fueron colectados en un rango de masas de 850 a 4000 Da. Los datos fueron analizados en el programa Data Explorer 4.9. Una calibración externa de una mezcla de péptidos estándar fue usada como control.

Cálculos de estructura electrónica. Los cálculos presentados en esta tesis fueron realizados en el clúster híbrido de supercómputo Xiuhcoatl del Cinvestav.

Modelado de los complejos Cu(II)-AS(1-6). Los cálculos de estructura electrónica del complejo Cu(II)-AS(1-6) se realizaron usando la secuencia completa MDVFMK, con el C-terminal amidado y el N-terminal sin ninguna modificación, el número total de átomos en estos modelos fue de 111. La construcción de los modelos estudiados se realizó en Molden;⁸ diferentes conformaciones iniciales fueron estudiadas: α hélice (a), hoja- β (b), vuelta (t) y extendida (e). Ocho modelos diferentes fueron construidos (4a, 4b, 4t, 4e, 5S1a, 5S1b, 5S1t, 5S5t). En estos, los números 4 y 5 denotan modelos tetra y penta coordinados, respectivamente, las letras a, b, t y e indican la conformación inicial del péptido y S1 y S5 indican si el ligando azufre proviene de la Met1 o Met5, respectivamente. La estructura electrónica fue obtenida usando la teoría de Kohn-Sham spin-unrestricted (UKS) dentro de la aproximación de combinación lineal de orbitales gaussianos para resolver las ecuaciones de Kohn-Sham⁹ implementada en el programa deMon2k,¹⁰ el cuál usa el ajuste variacional de la energía de Coulomb para evitar el cálculo de integrales de cuatro centros, a expensas de introducir un conjunto de bases auxiliares. Todas las estructuras tienen una multiplicidad de espín de dos (doblete) y fueron optimizadas sin ninguna restricción geométrica a nivel local (LDA) con el funcional de intercambio-correlación Dirac¹¹-VWN¹² y con el funcional de intercambio-correlación PBE¹³ de gradientes generalizados (GGA), usando un conjunto de bases orbitales double- ζ plus polarization (DZVP)¹⁴ y un conjunto de bases auxiliares GEN-A2.¹⁵⁻¹⁶ Un análisis de frecuencias fue hecho para todos los puntos estacionarios localizados en la superficie de energía potencial con el funcional PBE. Las estructuras optimizadas fueron

utilizadas para calcular los parámetros de EPR (tensores g y A) con el programa ORCA,¹² usando el funcional híbrido no-empírico PBE0¹⁷ con la base CP¹⁸ para el cobre y la base DGAUSS¹⁴ en los otros átomos. La solvatación implícita fue incluida en el cálculo de los parámetros de EPR usando el modelo COSMO de ORCA.¹⁹⁻²⁰

Reoptimización de los modelos Cu(II)-3N1O y Cu(II)-4N en el sistema de la PrP. Los modelos 3N1O y 4N fueron reoptimizados a partir de los modelos 4Na, 4Nb y 3Nb1 reportados anteriormente.²¹ Los cálculos del modelo 4N fueron hechos con el programa deMon2k usando la metodología OPBE/TZVP/GEN-A2. Los cálculos del modelo 3N1O fueron realizados en el programa ORCA con los funcionales B3LYP y BP86 y la base orbital TZVP. En estos cálculos se incluyó el modelo de solvatación implícita con COSMO.

Modelado de los complejos Cu(I)-PrP, Cu(I)-AS y Cu(I)-AcAS. Para el sistema Cu(I)-PrP se utilizó el péptido completo PrP(106-113) con secuencia KTNMKHMA, con el N-terminal acetilado y el C-terminal amidado. Las estructuras tienen un total de 141-161 átomos, dependiendo del estado de protonación de las amidas de la cadena peptídica y el número de aguas explícitas usadas en el cálculo. Para el sistema de la AS, el péptido con secuencia MDVFMK fue usado en los modelos de coordinación. Para modelar el complejo Cu(I)-AS se utilizó el péptido amidado en el C-terminal y el N-terminal se mantuvo sin ninguna modificación; estos modelos contienen un total de 112-130 átomos, dependiendo del número de aguas explícitas usadas en el cálculo. En cambio para modelar el complejo Cu(I)-AcAS, se incluyó la acetilación en el N-terminal, por lo tanto las estructuras contienen entre 117-135 átomos. Cada modelo fue construido usando el programa GaussView 4.1.2. Todas las estructuras fueron optimizadas en el programa deMon2k sin ninguna restricción geométrica bajo la aproximación restricted Kohn-Sham (RKS), usando una multiplicidad de espín de uno (singulete). El funcional OPBE (que combina el funcional de intercambio OPTX de Handy y Cohen²² y la correlación del funcional PBE¹³) fue usado para estos cálculos. Inicialmente también se realizaron cálculos al nivel LDA en estos sistemas. La base orbital TZVP^{14, 23} y auxiliar GEN-A2 fueron usadas en todos los casos. Los efectos de solvatación fueron incluidos por dos métodos: incluyendo seis moléculas de agua explícitas alrededor de la esfera de coordinación y reoptimizando las estructuras en el programa deMon2k con la

metodología OPBE/TZVP/GEN-A2, e incluyendo la solvatación implícita por medio de COSMO, reoptimizando las estructuras en el programa ORCA.

Cálculo de la energía de reorganización de esfera interna. La energía de reorganización λ_i fue calculada para los sistemas Cu(II)/Cu(I)-PrP y Cu(II)-Cu(I)-AS, usando la siguiente expresión:²⁴

$$\lambda_i = \frac{1}{2} [E_{ox}(red_{geom}) - E_{ox}(ox_{geom}) + E_{red}(ox_{geom}) - E_{red}(red_{geom})]$$

donde $E_{ox}(red_{geom})$ es la energía del estado oxidado en la geometría de la estructura del estado reducido y $E_{red}(ox_{geom})$ es la energía del estado reducido en la geometría de la estructura del estado oxidado.

10.1 Referencias.

1. Kates, E.; Albericio, F., *Solid-Phase Synthesis*, Marcel Dekker Inc.: New York, 2000.
2. Hood, C. A.; Fuentes, G.; Patel, H.; Page, K.; Menakuru, M.; Park, J. H., *J. Pept. Sci.* **2008**, *14*, 97-101.
3. Tenderholt, A.; Hedman, B.; Hodgson, K. O., *AIP Conference Proceedings* **2007**, *882*, 105-107.
4. George, G. N., *EXAFSPAK Stanford Synchrotron Radiation Laboratory*, Menlo Park, CA, 2000.
5. Rehr, J. J., *Rev. Mod. Phys.* **2000**, *72*, 621-654.
6. Brown, I. D.; Altermatt, D., *Acta Cryst.* **1985**, *B41*, 244-247.
7. Thorp, H. H., *Inorg. Chem.* **1992**, *31*, 1585-1588.
8. Schaftenaar, G.; Noordik, J. H., *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **2000**, *14*, 123-134.
9. Kohn, W.; Sham, L. J., *Phys. Rev.* **1965**, *140*, A1133-A1138.
10. Koster, A. M.; Geudtner, G.; Calaminici, P.; Casida, M. E.; Dominguez, V. D.; Flores-Moreno, R.; Gamboa, G. U.; Goursot, A.; Heine, T.; Ipatov, A.; Janetzko, F.; del Campo, J. M.; Reveles, J. U.; Vela, A.; Zuniga-Gutierrez, B.; Salahub, D. R., *deMon2k, Version 2*, The deMon developers, Cinvestav, Mexico City, 2011.
11. Dirac, P. A. M., *Proc. Cambridge Philos. Soc.* **1930**, *26*, 376-385.
12. Vosko, S. H., *J. Phys.* **1980**, *58*, 1200-1211.
13. Perdew, J. P.; Burke, K.; Ernzerhof, M., *Phys. Rev. Lett.* **1996**, *77*, 3865-3868.
14. Godbout, N.; Salahub, D. R.; Andzelm, J.; Wimmer, E., *Can. J. Chem.* **1992**, *70*, 560-571.
15. Dunlap, B. I.; Connolly, J. W. D.; Sabin, J. R., *J. Chem. Phys.* **1979**, *71*, 3396-3402.
16. Köster, A. M.; del Campo, J. M.; Janetzko, F.; Zuniga-Gutierrez, B., *J. Chem. Phys.* **2009**, *130*, 114106.
17. Adamo, C.; Barone, V., *J. Chem. Phys.* **1999**, *110*, 6158.

18. Maltsev, A. S.; Chen, J.; Levine, R. L.; Bax, A., *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 2943–2946.
19. Klamt, A.; Schuurmannt, G., *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1993**, *2*, 799-805.
20. Sinnecker, S.; Rajendran, A.; Klamt, A.; Diedenhofen, M.; Neese, F., *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110*, 2235-2245.
21. Rivillas-Acevedo, L.; Grande-Aztatzi, R.; Lomeli, I.; Garcia, J. E.; Barrios, E.; Teloxa, S.; Vela, A.; Quintanar, L., *Inorg. Chem.* **2011**, *50*, 1956-1972.
22. Handy, N. C.; Cohen, A. J., *Mol. Physics* **2001**, *99*, 403-412.
23. Calaminici, P.; Janetzko, F.; Köster, A. M.; Mejia-Olvera, R.; Zuniga-Gutierrez, B., *J. Chem. Phys.* **2007**, *126*, 044108.
24. Klimkans, A.; Larsson, S., *Chemical Physics* **1994**, *189*, 25-31.