

**CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITECNICO
NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**“Estudio de las propiedades espectroscópicas y electroquímicas de
los complejos de Cu^{2+} con el péptido β -amiloide (1-16): Enfoque
bioinorgánico de la enfermedad de Alzheimer”**

T E S I S

Que presenta

LIDIA GUADALUPE TRUJANO ORTIZ

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

**EN LA ESPECIALIDAD DE
CIENCIAS QUÍMICAS**

Directora de la Tesis:

Dra. Liliana Quintanar Vera

Ciudad de México

Agosto 2016.



Esta tesis 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 del Instituto de Ciencia y Tecnología del DF (ICyTDF) (proyecto PIFUTP08-161) y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de los proyectos J48781, 128255 y 221134. Además de la beca CONACyT otorgada a LGTO y por la beca del proyecto 128411.

DEDICATORIAS

A Jehová

Por darme la vida y permitirme llegar hasta este momento, por poner en mí camino a las personas correctas que me han ayudado a ser quien soy y por permitirme saltar los obstáculos que la vida presenta.

Romanos 1:20, porque las cualidades invisibles de él se ven claramente desde la creación del mundo en adelante, porque se perciben por las cosas hechas, hasta su poder sempiterno y Divinidad de modo que ellos son inexcusables.

A mis padres

Leticia y Carlos, por creer en mí y permitirme elegir mi camino y apoyarme en todo momento. Por su amor, su entrega y por enseñarme que no hay límites para salir adelante.

A mis hermanos

Nancy y Alberto, por su apoyo constante, por ser mis compañeros de aventuras, por su comprensión, por su paciencia y porque son parte fundamental de mi vida. También agradezco a mi cuñado *David Ibáñez* por su cariño y amistad.

A mis sobrinos

Eduardo y Elean porque su llegada llenó mi vida de felicidad, porque me han permitido disfrutar la maravillosa experiencia de ser tía. Sin duda, son una bendición.

A mis abuelitos

Otoniel, Ángela y Lucila, gracias por su apoyo, consejos y amor incondicional. Por ahora descansan, pero confío en que nos volveremos a ver. A mi abuelito *Carlos* por su cariño y porque aún tenemos tiempo para compartir.

No tengo palabras para agradecerles el que formen parte de mi vida y que sean el motor de ella. Esta meta también es de ustedes.

¡GRACIAS!

AGRADECIMIENTOS

Al Departamento de Química del Cinvestav y al Conacyt por brindarme la oportunidad y los recursos necesarios para mi formación académica.

A la Dra. Liliana Quintanar, por abrirme las puertas de su laboratorio donde pude encontrar esa frontera entre la Biología y la Química que tanto buscaba, por enseñarme y contagiarme la pasión por hacer ciencia de calidad e innovadora. Por la paciencia, confianza y por haberme guiado durante este proceso de aprendizaje. Por todo lo que me aportó a lo largo de estos años tanto a nivel personal como académico.

Al Dr. Felipe González, gracias por las facilidades otorgadas durante todos estos años, por su apoyo, dedicación en este proyecto, y por transmitirme el gusto por la electroquímica. También quiero agradecerle por creer en mí en todo momento, por su amistad, porque siempre tuvo el consejo oportuno y la palabra de aliento que me ayudaron a enfrentar las adversidades para no rendirme. En verdad mil gracias, sin usted esto no hubiera sido posible.

A los miembros del jurado, Dra. Gloria Saab, Dra. Laura Gasque, Dra. María de Jesús Rosales, Dra. Rosa Santillán y Dr. Omar Solorza por el tiempo dedicado a la revisión de esta tesis y por sus acertadas aportaciones.

Al Dr. Omar Solorza por su invaluable apoyo desinteresado durante todos estos años, por las largas charlas tan edificantes que tuvimos, por su amistad y porque ha sido un ejemplo de trabajo, humildad y perseverancia. Con profundo respeto, cariño y admiración ¡gracias!

A los miembros de la Biblioteca del Departamento de Química: Lic. Alicia Hernández, Lic. Gonzalo Trejo y Lic. Alejandra Rodríguez por su apoyo bibliográfico.

A Gloria León Maturano por su apoyo en actividades de la coordinación académica.

Al Ing. Geiser Cuellar, por su apoyo técnico para la obtención de los espectros de masas.

A los compañeros del laboratorio 3. A Gabina por su apoyo en la parte técnica. Sarai, Italia y Luis Blancas por compartir sus conocimientos conmigo. En especial a Esaú y Lina no sólo por sus enseñanzas, sino por su compañerismo, por todos los momentos gratos y no tan gratos que vivimos juntos que forjaron una amistad.

A mis compañeros del laboratorio 46: Miguel, Dulce, Daniel, Nadia y Sidney, por sus asesorías en los experimentos de electroquímica. A Blanca y Doña Carmen por su apoyo técnico en el laboratorio. Pero a todos incluyendo a Vanessa, les agradezco por tantas pláticas y risas compartidas que hacían muy amenos los días. Por adoptarme en su laboratorio por más de un año y porque siempre me hicieron sentir parte del grupo hasta la fecha. Gracias por su apoyo y amistad.

A los compañeros del laboratorio 47, Andrés, Sebastián, Julio, Guadalupe, José, Gerardo, Fátima y Don Rubén, gracias por su apoyo, por compartir sus conocimientos conmigo y por todos los momentos agradables que pasamos juntos.

A Gloria, Teresa, Lourdes y Lorena por su amistad y solidaridad.

A Alicia, Gonzalo, Diana y Jorge por su apoyo incondicional en mis peores momentos y porque también compartieron mis alegrías, gracias por su amistad y soporte.

A Aurora, por brindarme su amistad desde que llegué a Cinvestav, por abrirme las puertas de su casa y porque siempre ha estado para mí.

A Rodrigo, Rafael, Carlos y Ulises, por su amistad, por siempre estar dispuestos a ayudarme a subsanar mis deficiencias, por todo el apoyo brindado y por hacer amena mi estancia en el Cinvestav.

A Sabina y Ricardo por su cariño y apoyo.

A mi familia materna y paterna, quienes de una u otra manera me han apoyado a lo largo de mi vida y en especial, a lograr esta meta. Gracias por estar conmigo.

Finalmente, deseo agradecer a todas aquellas personas que han confiado y creído en mí, que me han impulsado a seguir en mi camino y que me han mostrado que uno no está solo: Familia y amigos, esto no hubiera sido posible sin todos ustedes. ¡GRACIAS!

Isaías 33:24. Ningún residente dirá estoy enfermo...

Revelación 21:3-5. Con eso, oí una voz fuerte desde el trono decir: “¡Mira! La tienda de Dios está con la humanidad, y él residirá con ellos, y ellos serán sus pueblos. Y Dios mismo estará con ellos. Y limpiará toda lágrima de sus ojos, y la muerte no será más, ni existirá ya más lamento ni clamor ni dolor. Las cosas anteriores han pasado. Y aquél que estaba en el trono dijo “¡Mira!, voy a hacer nuevas todas las cosas. También, dice: “Escribe, porque estas palabras son ciertas y verdaderas”.

PRESENTACIÓN EN CONGRESOS

- 4th International Workshop Frontiers in Protein Folding, Evolution and Function, and 5^o Congreso de la Rama de Fisicoquímica, Estructura y Diseño de Proteínas de la Sociedad Mexicana de Bioquímica. “Redox cycling of copper–Amyloid β 1–16 peptide complexes is highly dependent on the coordination mode”. Lidia Trujano-Ortiz, Felipe J. González, Liliana Quintanar. Oaxaca, México. 03 al 07 de noviembre de 2015. Presentación Oral.
- 223rd ECS Meeting. “Redox Behavior of β -amyloid-Cu²⁺ Complexes Involved in Alzheimer’s Disease”. Lidia Trujano-Ortiz, Felipe J. González, Liliana Quintanar. Toronto, Ontario, Canadá. 12 al 16 de mayo de 2013. Presentación Oral.
- 11th European Biological Inorganic Chemistry Conference. “Spectroscopic and electrochemical characterization of β -amyloid Cu(II) complexes”. Trujano-Ortiz L, González-Bravo F., Quintanar L. Departamento de Química Inorgánica, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada. Granada, España. 12 al 17 de septiembre de 2012. Presentación en Cartel.
- XXVII Congreso de la Sociedad Mexicana de Electroquímica y el 5th Meeting of de Mexican Section of the ECS. “Estudio espectroscópico y voltamperométrico de los complejos β -amiloide-Cu(II) involucrados en la enfermedad del Alzheimer”, Lidia G. Trujano-Ortiz, Felipe González, Liliana Quintanar. Toluca, México. Universidad del Estado de México, Facultad de Ciencias Químicas, Toluca, Edo. De México. 11 al 15 de junio de 2012. Presentación en Cartel.
- Encuentro de Química Inorgánica 2011. “Estudio espectroscópico de la coordinación de Cu(II) a fragmentos de la proteína β -amiloide”. Lidia G. Trujano-Ortiz, Liliana Quintanar. Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, División de Ciencias Básicas/Departamento de Química. Guadalajara Jalisco, México. 29 de junio al 02 de julio de 2011. Presentación en Cartel.
- Tercer Congreso: Rama de Fisicoquímica, Estructura y Diseño de Proteínas. 2nd USA-Mexico Workshop in Biological Chemistry: Protein Folding, Misfolding and Design. “Spectroscopic study of Cu(II) binding to the β -amyloid fragments: coordination modes and redox activity”. Lidia G. Trujano-Ortiz, Felipe González, Liliana Quintanar. Torre de Ingeniería, Ciudad Universitaria, México, D.F. 18 a 23 a 23 de marzo de 2010. Presentación en Cartel.
- Semana de la Ciencia y la Innovación 2010. “Estudio espectroscópico de la interacción del Cu(II) con fragmentos de la proteína β -amiloide”. Trujano L, Blancas L, Quintanar L. “Generación de ROS y actividad de caspasa-3 inducida por complejos β A-Cu²⁺ en cultivos corticales primarios”. Moore S, Blancas L, Trujano G, Quintanar L, Massieu L. México, D.F. 24 de noviembre de 2010. Presentación en Cartel.

-
-
- Segundo Congreso Rama de Fisicoquímica, Estructura y Diseño de Proteínas. “Estudio espectroscópico de la coordinación de Cu(II) al fragmento β -amiloide (1-16)”. Lidia G. Trujano Ortiz y Liliana Quintanar. Sociedad Mexicana de Bioquímica, Rectoría General de la UAM. México, D.F. 28 de septiembre a 01 de octubre, 2009. Presentación en Cartel.
 - USA-México Workshop in Biological Chemistry: Multidisciplinary Approaches to Protein Folding. “Spectroscopic studies of Cu(II) binding to the β -amyloid fragment (1-16)”. Lidia Guadalupe Trujano Ortiz, Ana María Velázquez, Alberto Vela, Liliana Quintanar. CINVESTAV, IPN. México, D.F. 25 al 27 de marzo de 2009. Presentación en Cartel.
 - Summer School Metals in Biology—Key Elements of Life. “Spectroscopic studies of Cu(II) binding to the β -amyloid protein”. Lidia Guadalupe Trujano Ortiz, Liliana Quintanar. Cuernavaca, Morelos México. 18 al 31 de mayo de 2008. Presentación en Cartel.

Distinciones y/o reconocimientos

- 1^{er} lugar en el concurso de carteles de nivel Doctorado en el XXVII Congreso de la Sociedad Mexicana de Electroquímica y el 5th Meeting of de Mexican Section of the ECS, Toluca, México. Universidad del Estado de México, Facultad de Ciencias Químicas, Toluca, Edo. De México. 11 al 15 de junio de 2012.

Derivado del concurso, se ganó una beca por parte de *The Electrochemical Society* para asistir al 223rd ECS Meeting en Canadá.

- 2^o lugar en el concurso de carteles (sección B) en el Encuentro de Química Inorgánica 2011. Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, División de Ciencias Básicas/Departamento de Química. Guadalajara Jalisco, México. 29 de junio al 02 de julio de 2011.

Artículo publicado

La presente tesis doctoral dio lugar al siguiente artículo:

Redox Cycling of Copper–Amyloid β 1–16 Peptide Complexes Is Highly Dependent on the Coordination Mode. Lidia G. Trujano-Ortiz, Felipe J. González, and Liliana Quintanar. *Inorg. Chem.*, 2015, 54 (1), 4-6.

INDICE

Abreviaturas.....	iii
Resumen.....	iv
Abstract.....	vi
Introducción.....	vii
Capítulo 1. Antecedentes	1
1.1. Metales en sistemas biológicos.....	2
1.2. Metales de transición en el cerebro.....	2
1.3. Cobre en sistemas biológicos y su metabolismo.....	3
1.4. Cobre en el cerebro.....	4
1.5. Cobre y estrés oxidativo.....	5
1.6. Las enfermedades neurodegenerativas.	7
1.7. La enfermedad de Alzheimer.....	9
1.8. Proteína β -Amiloide ($A\beta$) y su relación con la enfermedad de Alzheimer.....	12
1.9. Coordinación de Cu^{2+} con la proteína β -Amiloide.....	17
1.10. Química redox de los sistemas $A\beta$ - Cu^{n+}	20
Capítulo 2. Objetivos y Estrategia experimental	24
Capítulo 3. Estudio espectroscópico de la coordinación de Cu^{2+} a diferentes fragmentos del péptido β-amiloide: $A\beta(1-16)$, $A\beta(1-16/Y10F)$ y $Ac-A\beta(1-16)$	37
3.1. Estudio de la unión de Cu^{2+} al péptido $A\beta(1-16)$ por absorción y dicroísmo circular en la región UV-visible.....	38
3.2. Estudio de la unión de Cu^{2+} al péptido $A\beta(1-16)$ por resonancia paramagnética electrónica.....	45
3.3. Estudio de la unión de Cu^{2+} al péptido $A\beta(1-16 /Y10F)$ por absorción y dicroísmo circular en la región UV-visible.....	48
3.4. Evaluación del efecto del pH en los modos de coordinación de la $A\beta(1-16)$ con Cu^{2+} por dicroísmo circular.....	50
3.5. Evaluación del efecto del pH en los modos de coordinación de $A\beta(1-16)$ con Cu^{2+} por resonancia paramagnética electrónica.....	57

3.6. Estudio de la unión de Cu^{2+} al péptido Ac-A β (1-16) por absorción y dicroísmo circular en la región UV-visible.....	59
3.7. Estudio de la unión de Cu^{2+} al péptido Ac-A β (1-16) por resonancia paramagnética electrónica.....	62
3.8. Evaluación del efecto del pH en los modos de coordinación del complejo Ac-A β (1-16)- Cu^{2+} por dicroísmo circular.....	65
3.9. Evaluación del efecto del pH en los modos de coordinación del complejo Ac-A β (1-16)- Cu^{2+} por resonancia paramagnética electrónica.....	70
Capítulo 4. Caracterización electroquímica de los complejos Aβ(1-16)-Cu^{2+} y Ac-Aβ(1-16)-Cu^{2+}	74
4.1. Estudio de la actividad redox de los complejos A β (1-16)- Cu^{2+} por voltamperometría cíclica.....	75
4.2. Evaluación de la actividad redox de los complejos Ac-A β (1-16)- Cu^{2+} por voltamperometría cíclica.....	86
Capítulo 5. Conclusiones y Perspectivas	90
Referencias	94
Anexo 1: Técnicas espectroscópicas utilizadas para el estudio de la interacción A β - Cu^{2+}	102
Anexo 2: Deducción de ecuaciones para la determinación de pKa.....	120

ABREVIATURAS

A	Acoplamiento hiperfino paralelo
A β	β -amiloide
Ala (A)	Alanina
APP	Proteína Precursora del Amiloide
Asp (D)	Aspártico
Arg (R)	Arginina
CD	Dicroísmo Circular
C-terminal	Extremo carboxilo terminal de una proteína
CV	Voltamperometría Cíclica
ϵ	Coefficiente de extinción molar ($M^{-1}cm^{-1}$)
E°	Potencial Redox
EA	Enfermedad de Alzheimer
ENDOR	Espectroscopia de Doble Resonancia Electrónica y Nuclear
EO	Estrés Oxidativo
EPR	Resonancia Paramagnética Nuclear
EXAFS	Estructura fina del espectro de absorción de rayos-X extendido
Fmoc	9-fluorenilmetoxicarbonilo
g	Tensor “g” paralelo
Gln (Q)	Glutamina
Glu (E)	Ácido glutámico
Gly (G)	Glicina
His (H)	Histidina
HYSCORE	Espectroscopía de Correlación de Subnivel Hiperfino
LMCT	Banda de transferencia de carga del ligante al metal
Lys (K)	Lisina
N ⁻	Amida desprotonada de la cadena peptídica
NEM	N-etilmorfolina
NH ₂ -terminal	Grupo /extremo amino terminal de una proteína
NHE	Electrodo Normal de Hidrógeno
ocp	Potencial a circuito abierto
pGluA β	piroglutamato A β
Phe (F)	Fenilalanina
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
Ser (S)	Serina
SNC	Sistema Nervioso Central
Tyr (Y)	Tirosina
UV-Vis	Ultra Violeta Visible
Val (V)	Valina
WE	Electrodo de trabajo
XAS	Espectroscopia de Absorción de Rayos X

Nota: Varios de los acrónimos o siglas son derivadas del idioma inglés.

RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer es la principal causa de demencia senil a nivel mundial, y conduce a la pérdida de la memoria y al deterioro cognitivo, lo que incapacita al paciente para realizar tareas habituales y/o sencillas. Esta patología ha sido asociada a la presencia de agregados proteicos en el cerebro cuyo componente es el péptido β -amiloide ($A\beta$). El péptido $A\beta$ posee gran afinidad por iones metálicos tales como el cobre, y se ha propuesto que dicha interacción conduce a la generación de especies reactivas de oxígeno y finalmente al daño neuronal. Se sabe que el sitio de coordinación a cobre en la $A\beta$ se localiza en los primeros 16 residuos del péptido. Sin embargo, a pesar de diversos estudios hay controversia sobre la esfera de coordinación alrededor del centro metálico y el mecanismo por el cual se generan las especies reactivas de oxígeno que conducen al estrés oxidativo y al daño neuronal.

Por lo tanto, con el propósito de profundizar en el conocimiento de los procesos moleculares involucrados en la enfermedad de Alzheimer, este trabajo está enfocado en entender espectroscópicamente y electroquímicamente la interacción de los iones de Cu^{2+} con el péptido $A\beta(1-16)$. A través de diferentes técnicas espectroscópicas (absorción electrónica en la región UV-Vis, dicroísmo circular y resonancia paramagnética electrónica) se encontró que a pH fisiológico se forman dos complejos de coordinación $A\beta(1-16)-Cu^{2+}$, cuya abundancia relativa depende de la concentración de Cu^{2+} y del pH. Estos dos complejos presentan diferentes esferas de coordinación. En el primer modo de coordinación participan dos histidinas, el grupo NH_2 -terminal y un átomo de oxígeno, mientras que en el *modo II* una histidina es reemplazada por una amida desprotonada de la cadena peptídica. Esta diferencia de ligantes repercute de manera importante en las propiedades redox de los complejos, lo cual fue evidenciado por los experimentos de voltamperometría cíclica, donde se encontró que los potenciales de reducción de los modos de coordinación son muy diferentes; el *modo I* tiene un potencial de reducción mucho mayor que el *modo II*. Considerando el entorno químico en la sinapsis, es posible concluir que el *modo I* sería capaz de ser reducido y reaccionar con oxígeno para generar especies reactivas de oxígeno, mientras que el *modo II* sería inerte desde el punto de vista redox en condiciones

fisiológicas. Este trabajo proporciona información valiosa sobre el comportamiento redox de los dos modos de coordinación presentes bajo condiciones fisiológicas, la cual puede servir de herramienta para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas para los pacientes con Alzheimer.

ABSTRACT

Alzheimer's disease is the most important cause of senile dementia worldwide, and leads to memory loss and cognitive impairment, which disables the patient to perform common and / or simple tasks. This disease has been associated with the presence of protein aggregates in the brain, where the main component is the amyloid- β peptide (A β). The A β peptide has high affinity for metal ions such as copper, and it has been proposed that this interaction leads to the generation of reactive oxygen species, and finally to neuronal damage. It is known that the copper coordination site in A β is located in the first 16 residues of the peptide. However, despite several studies, there is controversy over the coordination sphere around the metal center and the mechanism that generates the reactive oxygen species that lead to oxidative stress and neuronal damage.

In order to further understand the molecular processes involved in Alzheimer's disease, this work focused on studying the interaction of Cu²⁺ ions with the peptide A β (1-16), using spectroscopic and electrochemical tools. Through various spectroscopic techniques (electronic absorption and circular dichroism in the UV-Vis region, and electron paramagnetic resonance), it was found that at physiological pH, two coordination complexes A β (1-16)-Cu²⁺ form, whose relative abundance depends on the Cu²⁺ concentration and pH. These two complexes have distinct coordination spheres. The first coordination mode (*mode I*) involves two histidines, the NH₂-terminal group and an oxygen atom, while in the second mode (*mode II*) one histidine is replaced with a deprotonated amide of the peptide chain. This difference in coordination sphere affects the redox properties of the species, which was evidenced by the cyclic voltammetry experiments, where it was found that *mode II* has a much lower reduction potential than *mode I*. Considering the chemical environment in the synapse, it is possible to conclude that *mode I* could be reduced and react with oxygen to generate reactive oxygen species, while *mode II* would be redox inert under physiological conditions. This work provides valuable information on the redox behavior of the two A β (1-16)-Cu²⁺ coordination modes present under physiological conditions, which can serve as a tool for the design of new therapeutic strategies for Alzheimer's patients.

INTRODUCCIÓN

Los iones metálicos son esenciales para la vida y cumplen con diversas funciones en el cuerpo humano. Sólo por mencionar algunas, a nivel cerebral se encuentran iones de Na^+ y K^+ los cuales están involucrados en la transmisión de impulsos nerviosos, mientras que durante la sinapsis se liberan iones de Zn^{2+} y Cu^{2+} . Cabe mencionar que los iones con actividad redox como el Cu^{2+} y Fe^{2+} se encuentran en diversas metaloenzimas que son vitales en rutas metabólicas dentro del sistema nervioso. Por tal motivo, la concentración de estos iones en los diferentes compartimentos celulares está altamente regulada (homeostasis). Se ha encontrado evidencia de que la pérdida de homeostasis de metales en el cerebro está implicada en la patofisiología y patogénesis de diferentes enfermedades neurodegenerativas tales como el Alzheimer, el Parkinson, la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, y la esclerosis amiotrófica lateral (ALS, por sus siglas en inglés), entre otras. Las interacciones entre los iones de Cu/Fe y las proteínas relacionadas a estos padecimientos, conducen a una serie de eventos íntimamente relacionados como lo son el estrés oxidativo, neurodegeneración y finalmente muerte celular. Por otro lado, se ha encontrado que la concentración de estos iones aumenta con la edad, por lo que las personas de edad avanzada, son el blanco de estas patologías. Por lo tanto, es de suma importancia tratar de entender las diferentes interacciones metal-proteína y sus efectos en las diferentes enfermedades neurodegenerativas.

En el 2015 se reportaron cerca de 900 millones de personas mayores de 60 años, y se calcula que esta cifra aumentará significativamente para el año 2050. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud y con la Asociación Internacional de Alzheimer (ADI, por sus siglas en inglés), las enfermedades neurodegenerativas constituyen un problema de salud a nivel mundial, y se estima que actualmente existen más de 47.5 millones de casos de demencia reportados. Se pronostica que la cifra de pacientes con algún tipo de demencia se triplique para el año 2050, rebasando así los 135 millones de pacientes. Por tanto, la demencia se ha catalogado como una prioridad de salud pública, no sólo por la incidencia, sino también por las repercusiones socioeconómicas que conlleva.

La enfermedad de Alzheimer (EA) es el tipo de demencia senil más común a nivel global, ya que constituye el 60-70 % de los casos reportados de pacientes entre los 60 y 85 años de edad. En México, se estima que hay alrededor de 10 millones de personas de edad avanzada, de las cuales 800,000 padecen Alzheimer y se calcula que dicha cifra aumente a 3 millones para el año 2050. Cabe destacar que a pesar de la exhaustiva investigación a nivel mundial, aún no se comprenden completamente los mecanismos moleculares que producen esta enfermedad. Pese a ello, en las últimas décadas se han logrado aislar e identificar diversos elementos fisiológicos que son clave en la patogénesis de este padecimiento. Por ejemplo, la presencia de agregados proteicos extracelulares conocidos como placas seniles o amiloides conformados por el péptido β -amiloide ($A\beta$), las cuales interfieren en la sinapsis distorsionando la comunicación neuronal y por tanto, disminuyendo las capacidades mentales. Adicionalmente, en las placas amiloide se han encontrado altas concentraciones de Cu (~ 0.4 mM), sugiriendo que la interacción entre $A\beta$ y los iones de Cu están implicados en el desarrollo de la EA. Además, se ha asociado la participación de estos complejos en la generación de especies reactivas de oxígeno. Por tanto, la determinación de la coordinación de los iones Cu^+ y Cu^{2+} hacia el péptido y el proceso redox de los complejos $A\beta-Cu^{2+} / A\beta-Cu^+$ son de gran interés.

El presente trabajo está enfocado en el estudio de la interacción de iones Cu^{2+} con el péptido $A\beta(1-16)$ en función de la concentración de cobre y del pH. Se pudo observar la formación de dos modos de coordinación de los complejos $A\beta(1-16)-Cu^{2+}$. La población de cada modo de coordinación depende de la concentración de cobre y del pH. Dichos complejos presentan esferas de coordinación similares, sin embargo, el cambio de un solo ligante afecta sus propiedades redox. Este hecho, representa un factor clave en la producción de especies reactivas de oxígeno y por ende del estrés oxidativo. Por lo tanto, este trabajo contribuye a entender la química de coordinación y la química redox de las interacciones $A\beta-Cu^{2+}$ involucradas en la patología de Alzheimer.

Capítulo 1

A n t e c e d e n t e s

1.1. Metales en sistemas biológicos

Los iones metálicos son esenciales para distintas funciones biológicas, ya que por lo menos, una tercera parte de las proteínas poseen un centro metálico como cofactor. A estas proteínas se les llama *metaloproteínas*. Además, estos iones sirven como elementos estructurales, centros catalíticos y/o mensajeros para diversas funciones celulares. Cabe destacar que su contenido en los organismos vivos normalmente es menor que los elementos más abundantes como lo son el C, O, N e H; siendo los más cuantiosos Na, K, Mg y Ca, los cuales contribuyen del 0.05 al 1.5 % del peso corporal. Sin embargo, hay otros elementos que se encuentran en menor cantidad pero que son esenciales para la vida. Dentro de los metales que han sido establecidos como esenciales para los humanos son: Na, K, Mg, Ca, Fe, Zn, Cu, Mn, Co y Mo. Por tanto, se necesita de mecanismos selectivos que controlen el metabolismo de todos estos iones, incluyendo transporte y almacenamiento para un correcto funcionamiento.

Dentro de los metales que son responsables de acarrear cargas positivas y mantener el balance osmótico se encuentran Na^+ y K^+ . Otros, son estructurales como el Mg^{2+} y los metales que sirven como mensajeros son el Ca^{2+} y Zn^{2+} . Todos estos son metales inertes, es decir, no producen reacciones redox. Por el contrario, hay metales de transición que pueden existir en diferentes estados de oxidación, como lo son Cu^{+2+} , $\text{Fe}^{2+/3+}$, lo que los hace indispensables para catalizar reacciones redox. Además, pueden unir pequeñas moléculas a través de enlaces de coordinación de manera reversible o irreversible.¹

1.2. Metales de transición en el cerebro

En el cerebro se concentran más de 15 metales a nivel traza, los cuales han sido medidos tanto en tejidos como en neuronas, encontrándose los niveles más altos en el interior de éstas (> 90%). Sin embargo, también están presentes en la matriz extracelular (10^{-6} a 10^{-9} M). En promedio el cerebro pesa aproximadamente 1.4 Kg y contiene alrededor del 9 % de Cu, el 6 % de Zn y el 12.3 % de Fe del total que requiere el cuerpo para realizar sus diversas funciones. La homeostasis de metales en el cerebro es regulada por las barreras

hemato-encefálica y la barrera sangre-líquido cerebroespinal. Sin embargo, la falta o alteración de la homeostasis de dichos metales, puede conducir a diversas patologías como los trastornos neurológicos (ej. Alzheimer).² Se estima que las concentraciones de Zn, Cu y Fe en el fluido cerebroespinal son: $[Zn] = 0.38 \mu M$, $[Cu] = 0.34 \mu M$ y $[Fe] = 0.54 \mu M$.³

El Zn es el segundo metal de transición más abundante en el cerebro. Las vesículas sinápticas son su principal reservorio y puede alcanzar una concentración después de la excitación neuronal de hasta $300 \mu M$ en condiciones extremas.⁴ Dado que se localiza en las mismas vesículas que el glutamato, se ha propuesto la hipótesis que el Zn puede ser liberado y actuar como un neurotransmisor o neuromodulador en la sinapsis. Por otro lado, se ha encontrado que aproximadamente el 90 % del zinc está unido a enzimas, factores de transcripción y metaloproteínas. A diferencia de otros metales, éste se encuentra en mayor concentración al nacer y disminuye con la edad.⁵

Los mecanismos biológicos que regulan la homeostasis tanto de Cu como de Fe, tienen lugar en los procesos de absorción, distribución, biotransformación y excreción. El Fe está presente en el cuerpo humano en un promedio de 4-5 g, donde alrededor del 65 % se encuentra en la hemoglobina, el 4 % en la mioglobina y del 15 al 30 % está almacenado en el sistema retículo endotelial y en el hígado, principalmente en la forma de ferritina. En el cerebro, el Fe es requerido para la síntesis de DNA, respiración mitocondrial, síntesis de neurotransmisores, entre otras funciones. Bajo condiciones fisiológicas normales, el Fe se encuentra en altas concentraciones en el estriado y el hipocampo, mientras que en la corteza cerebral se observan bajas concentraciones de este metal.⁶

En el siguiente segmento se abarca el papel del Cu en los sistemas biológicos, enfocado principalmente en su función cerebral.

1.3. Cobre en sistemas biológicos y su metabolismo

El cobre compone el 0.00007% de la corteza terrestre y está presente en el cuerpo humano en altas cantidades, por ejemplo una persona sana que pesa 70 Kg, contiene 110

mg de Cu, de los cuales aproximadamente 46 mg se encuentran en el esqueleto y la médula ósea, 26 mg en los músculos esqueléticos, 10 mg en el hígado, 8.8 mg en el cerebro y 6 mg en la sangre. La ingesta promedio en adultos varía entre 0.6-1.6 mg/día,^{7, 8} es obtenido a través de semillas, granos, nueces, frijoles, mariscos e hígado.⁸ Es absorbido por el intestino delgado y almacenado en el hígado. En el hígado, la mayoría de estos iones están unidos a la ceruloplasmina y son liberados en la sangre. En el plasma sanguíneo, alrededor del 65-90 % del Cu está fuertemente unido a la ceruloplasmina y el resto está débilmente unido a la albúmina y transcupreina. La principal vía de excreción es a través de la bilis (~80 %).^{6, 9} La concentración de iones de cobre libre ha sido estimada en el orden 10^{-18} - 10^{-13} M en células de levadura y en el plasma humano respectivamente.⁸

1.4. Cobre en el cerebro

El cerebro humano requiere cobre para su desarrollo y funcionamiento normal. Es el tercer metal de transición más abundante en el cerebro [~ 0.1 mM] y su distribución es dependiente de la región cerebral, edad, factores ambientales y genéticos. Se sabe que el nivel de cobre en la sustancia gris es 2 o 3 veces más alto que en la sustancia blanca.¹⁰ (Tabla 1.1) En la corteza y el hipocampo, el cobre es liberado después de la despolarización en el espacio sináptico en concentraciones de 15-100 μ M,^{11, 12} mientras que el nivel de Cu^{2+} extracelular en el fluido cerebrospinal oscila entre 100 nM hasta aproximadamente 1 μ M.¹³

Tabla 1.1 Concentración de Cu en regiones del cerebro humano.¹⁰

	$\mu\text{g/g}$ (peso en seco)
Centro semioval	13.7
Corteza cerebral (frontal)	24.7
Corteza cerebelosa	33.1
Sustancia blanca cerebelosa	13.5
Cuerpo calloso	9.8
Hipocampo	21.0
Sustancia nigra	59.9

Por otro lado, la química del cobre en sistemas biológicos está limitada a los estados de oxidación 1+ y 2+. El ion Cu^+ , tiene una configuración electrónica $3d^{10}$, mientras que el ion Cu^{2+} es $3d^9$, es decir, tiene un electrón desapareado en su orbital de valencia. El par redox $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$ posee un potencial de reducción de 0.153 V (1 atm y 298.15 K, en medio acuoso),¹⁴ que le permite a ambos estados de oxidación formar complejos con varios ligantes. Esta característica es la que hace relevante al Cu en los sistemas biológicos, ya que sirve como cofactor de un gran número de enzimas. Entre las más destacadas se encuentran la citocromo *c* oxidasa (CcO), superóxido dismutasa de Cu/Zn (SOD1), ceruloplasmina (Cp) y la dopamina β monooxigenasa (D β M).^{1, 15}

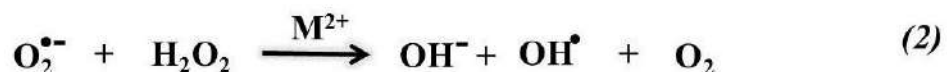
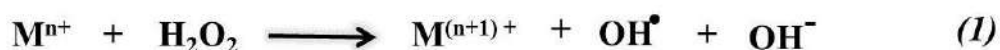
Bajo condiciones fisiológicas normales, las diferentes enzimas que tienen como cofactor al cobre, cumplen con diversas funciones, por ejemplo, la CcO lleva a cabo la fosforilación mitocondrial oxidativa y el transporte de electrones. La Cp es una ferroxidasa que está involucrada en el metabolismo del hierro,¹⁶ mientras que la SOD remueve los radicales libres de los tejidos,¹⁷ y la D β M está vinculada con la síntesis de dopamina, por mencionar sólo algunas.¹⁵

1.5. Cobre y estrés oxidativo

El estrés oxidativo (EO) es definido como el desequilibrio entre los procesos químicos que conducen a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, Reactive Oxygen Species) y los procesos que se encargan de removerlas, mejor conocidos como antioxidantes.¹⁸ Durante las últimas décadas se ha investigado la participación del EO en un sin número de enfermedades, principalmente aquellas que están relacionadas con la edad y se ha determinado que los radicales libres forman parte principal del envejecimiento y por lo tanto, sirven como base para el entendimiento de los cambios bioquímicos que ocurren en el organismo hacia el final de nuestra vida. Las ROS son conocidas por dañar lípidos, azúcares, proteínas, polinucleótidos, etc, conduciendo a productos secundarios que son igual de dañinos que las ROS iniciales, y en altas concentraciones causan apoptosis (muerte celular), necrosis, derivando en diferentes patologías.¹⁸⁻²⁰

El cerebro adulto contiene entre 10^{11} - 10^{12} neuronas, las cuales están soportadas y protegidas por las células gliales, cuya funcionalidad principal es controlar el microambiente celular, es decir, la composición iónica y los niveles de neurotransmisores presentes.² El cerebro posee altas concentraciones de iones metálicos capaces de generar ROS, lo que lo hace vulnerable al ataque de dichas especies, ya que comprende el 2 % de la masa total del cuerpo, consume grandes cantidades de oxígeno (20 % del total) y posee relativamente bajas concentraciones de antioxidantes, así como un alto contenido de lípidos poliinsaturados los cuales son susceptibles a oxidarse. Por lo tanto, el EO es un factor relevante en las enfermedades neurodegenerativas, donde el daño neuronal se ve reflejado a través de un alto proceso oxidativo y a su vez una disminución en las defensas antioxidantes del cerebro.²¹

Dentro de los radicales libres tenemos las especies denominadas reactivas de oxígeno (ROS), tales como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), óxido nítrico (NO) superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y los radicales hidroxilo (OH^{\bullet}) los cuales son altamente reactivos. Es importante mencionar que toxicológicamente, tanto el Cu como el Fe libres pueden fácilmente interactuar con oxígeno para iniciar una serie de reacciones bioquímicas que conducen a la producción de radicales libres y estrés oxidativo,^{22, 23} catalizando la formación de ROS por dos mecanismos: vía fenton y Haber-Weiss (reacciones 1 y 2 respectivamente. Donde $M = Cu, Fe$).²⁴⁻²⁷



Además, se sabe que altos niveles de cobre disminuyen los niveles de glutatión (un poderoso antioxidante celular y sustrato de varias enzimas encargado de la remoción de ROS), lo cual se ve traducido en el aumento citotóxico de las ROS permitiendo, que el metal sea catalíticamente más activo, es decir, que produzca mayor cantidad de ROS.²⁸ Por lo tanto, debido a su reactividad química, tanto el exceso como la deficiencia de estos iones,

pueden dañar el sistema nervioso central (SNC), dando lugar a diversas patologías como la enfermedad de Wilson, Menkes y las enfermedades neurodegenerativas, por mencionar algunas.²⁹

1.6. Las enfermedades neurodegenerativas

Se denomina enfermedad neurodegenerativa, a aquellos trastornos multifacéticos crónicos y progresivos que afectan el sistema nervioso, donde selectivamente las líneas neuronales son las más afectadas ya sea anatómica o fisiológicamente, causando finalmente la muerte neuronal. La vulnerabilidad de cada población neuronal va a determinar las manifestaciones clínicas de cada patología. A largo plazo, las enfermedades neurodegenerativas causan demencia y discapacidad por lo que los pacientes poco a poco van perdiendo su independencia y requieren de cuidados exhaustivos, lo que repercute en los familiares y en la economía tanto familiar como gubernamental. Estos padecimientos se relacionan con el envejecimiento afectando a millones de personas a nivel mundial.^{30, 31}

En el 2015 se reportaron cerca de 900 millones de personas mayores de 60 años, y se calcula que esta cifra aumentará significativamente para el año 2050 dependiendo del país de procedencia. Por ejemplo, se espera que el incremento de la población senil para los países con altos y medianos recursos sea menor (56 %) que en los países con medianos y bajos recursos, del cual se espera un alza del 185 %, mientras que para países de bajos recursos, se espera que sea del 239 %. Esto debido al aumento de la esperanza de vida que contribuye al crecimiento de la población de adultos de edad avanzada y como consecuencia, la prevalencia de enfermedades neurodegenerativas. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud y con la Asociación Internacional de Alzheimer (ADI, Alzheimer's Disease International), las enfermedades neurodegenerativas constituyen un problema de salud a nivel mundial y se estima que existen más de 47.5 millones de casos de demencia reportados, y cada año se registran 9.9 millones de nuevos casos, es decir, 1 caso cada 3.2 segundos, de los cuales poco más de la mitad (58%) viven en países de ingresos bajos y medios. Por otro lado, se calcula que entre un 5% y un 8% de la población general

de 60 años o más sufre demencia en un determinado momento, y se pronostica que la cifra de pacientes con algún tipo de demencia se triplique para el año 2050, rebasando así los 135 millones de pacientes. Por tanto, la demencia se ha catalogado como una prioridad de salud pública, no sólo por la incidencia, sino también por las repercusiones socioeconómicas que conlleva.³² Entre las enfermedades más comunes se encuentran la enfermedad de Alzheimer (EA), Parkinson, Creutzfeldt-Jakob, Huntington, entre otras.^{30, 31}

Todas estas enfermedades han sido estudiadas por décadas y a pesar de ser de distinta naturaleza, presentan características importantes en común:

- La presencia de agregados proteicos intra y/o extracelulares que se acumulan en el cerebro conduciendo a una pérdida selectiva de neuronas. (Tabla 1.2.)
- Cambio en la estructura secundaria, de una o varias proteínas, favoreciendo la formación de hojas β .
- Son enfermedades de origen esporádico y/o hereditarias (10 al 12 % de los casos).
- Estrés oxidativo provocado por el incremento de ROS.
- Desequilibrio en la homeostasis de ciertos metales, tales como el cobre.³³

Tabla 1.2. Proteínas relacionadas a enfermedades neurodegenerativas.

Enfermedad	Proteína	Lesión	Metal
Alzheimer	β -amiloide (A β) Tau	Placas Marañas neurofibrilares	Cu, Zn Fe
Parkinson	α -sinucleína	Cuerpos de Lewy	Cu, Fe
Creutzfeldt-Jakob	prion	placas	Cu, Fe
Huntington	Huntingtina	placas	Cu

Todas estas proteínas en condiciones fisiológicas normales son solubles, sin embargo, patológicamente se convierten en agregados insolubles que generalmente son

tóxicos para el cerebro. La causa para el plegamiento anómalo de dichas proteínas y su subsecuente acumulación en el cerebro no es clara hasta el momento. Tampoco se conoce el papel que juega la interacción de los iones metálicos con las respectivas proteínas que dan lugar a los diferentes trastornos. Sin embargo, factores genéticos y ambientales, así como la edad están involucrados. Actualmente, no existe un tratamiento que las revierta o inhiba el progreso de estas enfermedades.³⁴

Por todo lo descrito anteriormente, esta tesis está enfocada en el estudio de la interacción del ion cobre con el péptido A β y su relevancia en la enfermedad de Alzheimer. A continuación se dan detalles sobresalientes de esta enfermedad.

1.7. La enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es el tipo de demencia senil más común a nivel global, ya que constituye el 60-70 % de los casos reportados de pacientes entre los 60 y 85 años de edad.³² En México, hay alrededor de 10 millones aproximadamente de personas en edad avanzada, de las cuales 800,000 padecen Alzheimer, y se estima que dicha cifra aumente a 3 millones para el 2050.³⁵

Los pacientes con EA, presentan una rápida y progresiva pérdida de la memoria, la cual se ve reflejada por la incapacidad de recordar y adquirir nueva información, además presentan lapsos de desorientación, problemas de lenguaje, como por ejemplo pierden la comprensión de palabras sencillas, no pueden resolver problemas, entre otras alteraciones cognitivas, neurológicas y conductuales, que los imposibilitan para realizar tareas cotidianas y sencillas, por lo tanto, se vuelven dependientes de algún familiar.³⁶ Esto tiene importantes repercusiones no solo físicas, psicológicas y económicas para los cuidadores de los paciente, sino que también tiene un gran impacto a nivel social, ya que se estima que el costo anual a nivel mundial para tratar este y otros problemas neurodegenerativos oscila alrededor de los \$604,000 millones de dólares.³²

La EA fue descrita por primera vez en 1906, por el neurólogo alemán Alois Alzheimer, a través de estudiar a una paciente de 51 años que presentó un cuadro de demencia, pérdida de la memoria y desorientación tiempo-espacio. Al fallecer, Alois analizó el cerebro de la paciente y observó la presencia de depósitos intra y extracelulares, además de gliosis (proliferación de astrocitos en regiones lesionadas del SNC), tejido atrofiado y pérdida neuronal. Estos resultados permitieron diferenciar esta enfermedad de la demencia senil y/o trastornos propios del envejecimiento. Actualmente, se sabe que la EA es un trastorno neurodegenerativo, irreversible y progresivo que generalmente después de los 7 a 10 años de diagnosticada, conduce a la muerte.^{37, 38}

El cerebro con EA, morfológicamente (Figura 1.1 A)³⁹ presenta daño en diferentes regiones como lo son el hipocampo, la amígdala y la neocorteza. Las dos características patológicas principales de la EA son: la formación de placas amiloides extracelulares, constituidas por el péptido β -Amiloide ($A\beta$) que interfieren en la sinapsis distorsionando la comunicación neuronal (daño a las dendritas) y por tanto, disminuyendo las capacidades mentales, e intracelularmente la formación de marañas neurofibrilares que están conformadas por la proteína tau hiperfosforilada (Figura 1.1 B). Existe una hipótesis llamada “cascada del amiloide”, la cual señala que la agregación o deposición de $A\beta$ es el agente causante de la patología de EA, y que las marañas neurofibrilares, la pérdida celular, el daño vascular y finalmente la demencia, son el resultado directo de esta deposición.⁴⁰ Por otro lado, se han reportado varias especies en las placas seniles, tales como monómeros, oligómeros, protofibras y fibras.⁴¹ No obstante, el mecanismo que relaciona a $A\beta$ con los daños celulares característicos de la EA no está del todo definido debido al equilibrio dinámico de las formas monoméricas, oligoméricas (solubles e insolubles) y fibrillas insolubles de amiloide que se encuentran en el cerebro.³⁴ (Figura 1.2)⁴² La neurotoxicidad del $A\beta$ se ha atribuido más a los monómeros y oligómeros solubles que a las fibras insolubles.⁴¹

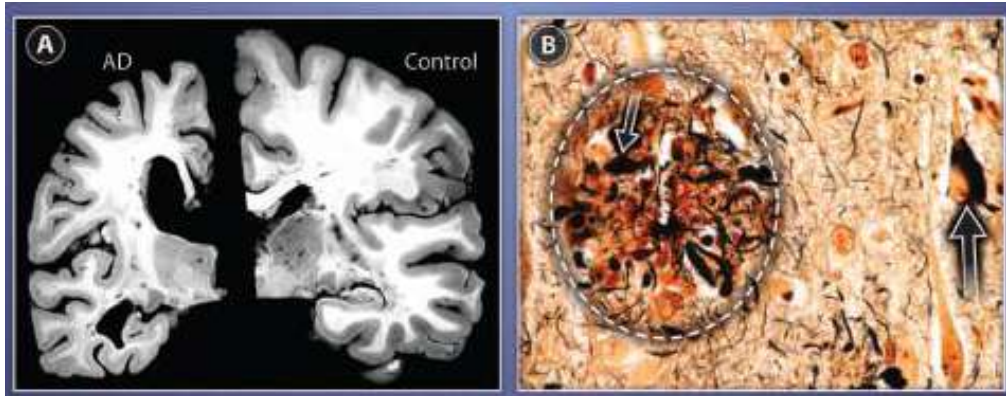


Figura 1.1. A) Comparación de un cerebro sano (derecha) y un cerebro con la enfermedad de Alzheimer (izquierda). B) Agregados amiloides. Figura tomada de la Ref.³⁹



Figura 1.2. Agregación del péptido β -amiloide (especies intermedias, oligómeros, fibrillas y placas amiloide) encontradas en un cerebro postmortem con Alzheimer. Figura adaptada de la Ref.⁴²

Finalmente, es importante destacar que en los cerebros postmortem de pacientes con EA, no existe una correlación entre la gravedad de la demencia y la densidad de las placas amiloides, es decir, que la deposición de A β no es un factor suficiente para generar la patogénesis de EA.⁴³

1.8. Proteína β -Amiloide (A β) y su relación con la enfermedad de Alzheimer

A pesar de que a principios de 1900 Alois Alzheimer descubrió que las placas eran la principal característica de la neuropatología de EA, la identidad del principal componente de éstas permaneció desconocido aproximadamente por 80 años. No fue hasta 1984 que Glenner y Wong aislaron el componente proteico y lo denominaron como “la proteína β ”.⁴⁴ Cabe mencionar que la extracción la realizaron de los vasos sanguíneos de un paciente con síndrome de Down, logrando secuenciar los primeros 28 aminoácidos de dicha proteína.⁴⁵ Un año más tarde, Masters y colaboradores aislaron la misma proteína de una placa amiloide de pacientes con EA y síndrome de Down,⁴⁶ lo que condujo a la hipótesis de que el gen que codifica para esta proteína pudiera estar en el cromosoma 21. Dicha hipótesis se corroboró más tarde al encontrar que la secuencia que codifica para la “proteína β ” es una pequeña parte de una proteína transmembranal mucho más grande (770 residuos) llamada proteína precursora del amiloide (*APP*, Amyloid Precursor Protein).⁴³ La APP es una proteína de membrana de 110-130 kDa y es una de las proteínas más abundantes en el sistema nervioso central; es expresada en el tejido humano y está localizada en la membrana plasmática y en diversos organelos como el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi y la mitocondria.⁴⁷ Actualmente se sabe que la “proteína β ” es un péptido que se produce por el corte proteolítico de la APP por β y γ - secretasas y es denominado como péptido *β -amiloide (A β)*. (Figura 1.3) El proceso de corte es iniciado por la β -secretasa después del residuo 671 dando lugar a la segregación del fragmento soluble de APP (β -sAPP), y los otros 99 residuos restantes del C-terminal son retenidos en la membrana. Posteriormente, la γ - secretasa corta este fragmento generando el péptido A β . El lugar de corte de la γ -secretasa es ligeramente variable, originando péptidos A β de diferente tamaño.⁴⁸

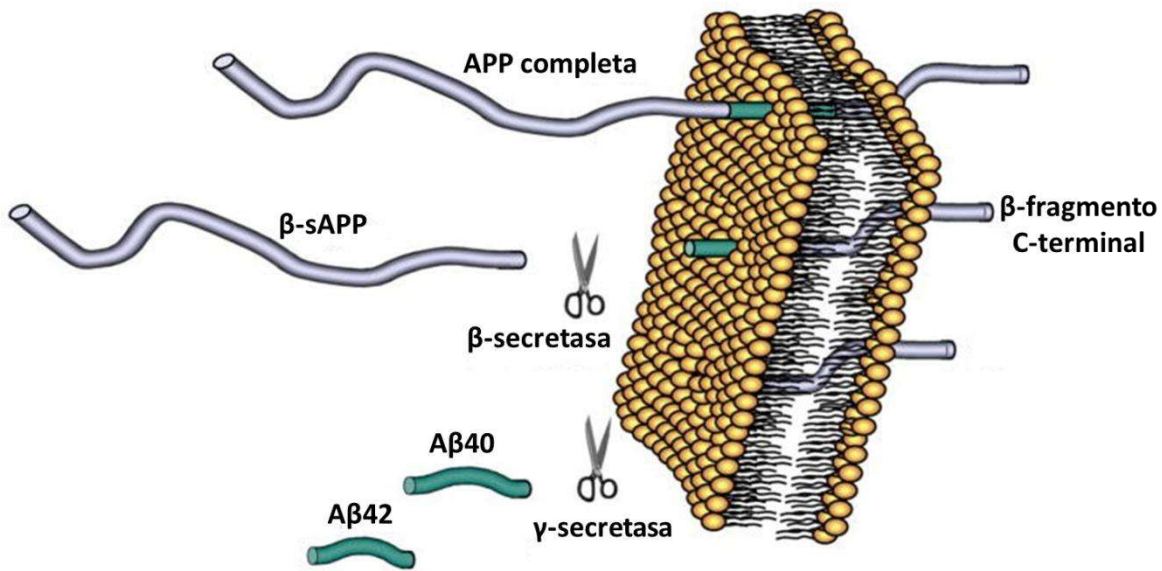


Figura 1.3. Corte proteolítico de APP por β y γ-secretasas para generar Aβ. Figura tomada de la Ref.⁴⁸

La Aβ es un péptido de 39-43 residuos (aproximadamente 4 kDa) que se encuentra de manera fisiológica a lo largo de la vida y circula en fluidos extracelulares como el líquido cefalorraquídeo y en el plasma sanguíneo.^{49, 50} Aunque aún no se ha descubierto su función fisiológica, se ha observado que se encuentra en el líquido cerebroespinal y en el torrente sanguíneo en concentraciones que oscilan entre 10 pM y 1 nM,⁵¹ particularmente durante la actividad sináptica. Se ha encontrado que el péptido Aβ a bajas concentraciones (pM) podría actuar como un modulador de la actividad sináptica, la cual está implicada en la memoria y aprendizaje. Adicionalmente, se han determinado niveles del orden pM de Aβ en el fluido intersticial en un cerebro normal y se sabe que los niveles de Aβ en el cerebro están influenciados directamente por la actividad sináptica.⁵² Sin embargo, en condiciones patológicas el péptido Aβ se encuentra en altas concentraciones (nM - μM) causando neurotoxicidad y muerte celular.⁵³

El péptido Aβ posee un largo dominio hidrofílico NH₂-terminal (región 1-28) y un dominio hidrofóbico que corresponde al C-terminal (29-40/43) (Figura 1.4) y se ha encontrado unido a membrana, agregada y de manera soluble. Fisiológicamente, el

fragmento predominante en el líquido cefalorraquídeo y en sangre es el A β (1-40), el cual es soluble, mientras que solo el 10 % corresponde al fragmento A β (1-42). Este último a pesar de ser el fragmento minoritario, se ha encontrado que aumenta proporcionalmente en los cerebros afectados con EA, tanto en los casos genéticos como esporádicos. A β tiene la habilidad de autoagregarse, de tal manera que puede existir como monómeros, dímeros u oligómeros, hasta llegar a la formación de fibras, y depositarse para formar las placas extracelulares, donde el fragmento A β (1-42) es el que predomina^{49, 54-56} (Figura 1.2) Adicionalmente, se sabe que A β (1-42) es más insoluble, lo que lo convierte en el péptido más neurotóxico.⁴¹

Cabe mencionar que bajo condiciones fisiológicas A β es “random coil”, sin embargo, patológicamente (en forma de placas amiloide) cambia su estructura a hojas- β .⁵⁷ Por otro lado, en las placas amiloides se han encontrado isoformas del péptido A β , tales como péptidos truncados tanto en el C-terminal [A β (1-33), A β (1-34), A β (3-34), A β (1-37), A β (1-38), A β (1-39)], como el NH₂-terminal [A β (1-5), A β (1-16), A β (6-16), A β (1-28), A β (4-42), pGlu A β (11-42), pGlu A β (3-40) y pGlu A β (3-42)].^{50, 58-62} A pesar de que son numerosas las isoformas observadas en las placas amiloides presentes en diferentes regiones del cerebro de pacientes con EA, ya sea de origen esporádico o genético, la relevancia todas estas isoformas en la patogénesis de EA no ha sido estudiada ni entendida completamente.⁶⁰

Con todo lo anterior se ha determinado la relevancia del péptido A β como factor clave en el desarrollo de EA, donde la sobreproducción, insuficiencia en la remoción y el aumento en la agregación de la A β son eventos asociados a la pérdida y disfunción neuronal que da lugar a la EA.^{36, 63}

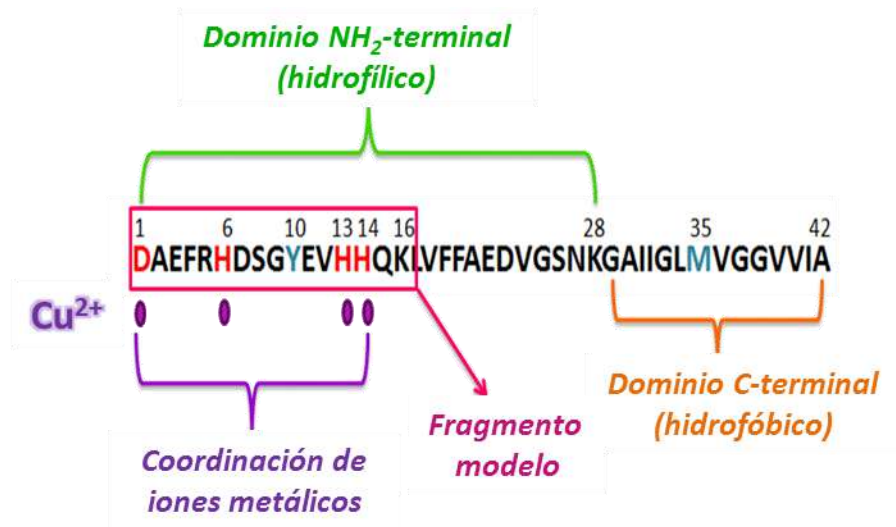


Figura 1.4. El péptido Aβ posee un dominio NH₂-terminal que abarca del residuo 1 al 16, mientras que el dominio C-terminal del 17 al residuo 40-42. El péptido Aβ(1-16) es el fragmento modelo para la coordinación de iones metálicos. Los residuos propuestos para el anclaje a iones metálicos son: Asp1 (D), His6, 13 y 14 (H) y la Tyr10 (Y), mientras que los residuos oxidados involucrados en la generación de ROS son la Y10 y la Met 5(M).

Por otro lado, muchos estudios han mostrado la importancia de algunos metales como el Cu²⁺, Fe³⁺ y Zn²⁺ en los eventos clave de la EA.^{64, 65} Estos estudios sugieren la pérdida de homeostasis de estos iones y los involucran en la agregación del péptido Aβ, así como en la producción de ROS inducidas por Aβ. Esto deriva de que en el espacio extracelular del cerebro con EA hay un exceso de éstos iones, los cuales también han sido detectados en las placas amiloides (Zn = 1055 μM, Fe = 940 μM, y Cu ~ 400 μM).⁶⁴ Un estudio por espectroscopía Raman de las placas seniles, evidencia que los centros de Cu²⁺ están unidos por residuos de histidinas provenientes de Aβ.^{66, 67} No obstante que Aβ es capaz de autoagregarse, diversos estudios han demostrado que ciertos iones metálicos, pueden inducir la agregación de las formas solubles del amiloide. Por ejemplo, Zn²⁺ induce la agregación a pH 7.4 *in vitro*, mientras que Cu²⁺ es relevante en la agregación a pH entre 6.6 y 6.8, lo cual representa una ligera acidosis, siendo ésta otra característica relevante de un cerebro con EA.^{65, 68}

De igual manera, se ha asociado la interacción Aβ-Cu²⁺/Fe³⁺ con la generación de ROS,⁶⁹ a través de la reducción del metal por medio de los agentes reductores que están en

el cerebro bajo condiciones fisiológicas (por ejemplo, ácido ascórbico) y la activación de O_2 para producir H_2O_2 , ocasionando EO y daño neuronal.^{70, 71} Asimismo, se ha sugerido que la reducción de los cationes metálicos está relacionada con la oxidación de la tirosina 10 y la metionina 35 presentes en la $A\beta$.^{66, 72} (Figura 1.5)

Por lo tanto, el estudio de la coordinación de los iones metálicos tales como el Cu^{2+} con $A\beta$, es esencial para entender el papel que desempeñan en la agregación del péptido y en la producción de ROS que conducen al daño neuronal. Por lo anterior, el conocer el entorno de coordinación de dichos iones en los complejos $A\beta-Cu^{2+}$ es de vital importancia, ya que ayudará a conocer sus propiedades redox y adicionalmente, puede servir para el diseño de nuevas moléculas con aplicaciones terapéuticas, la cual es un área de investigación muy activa en la actualidad.⁷³⁻⁷⁶

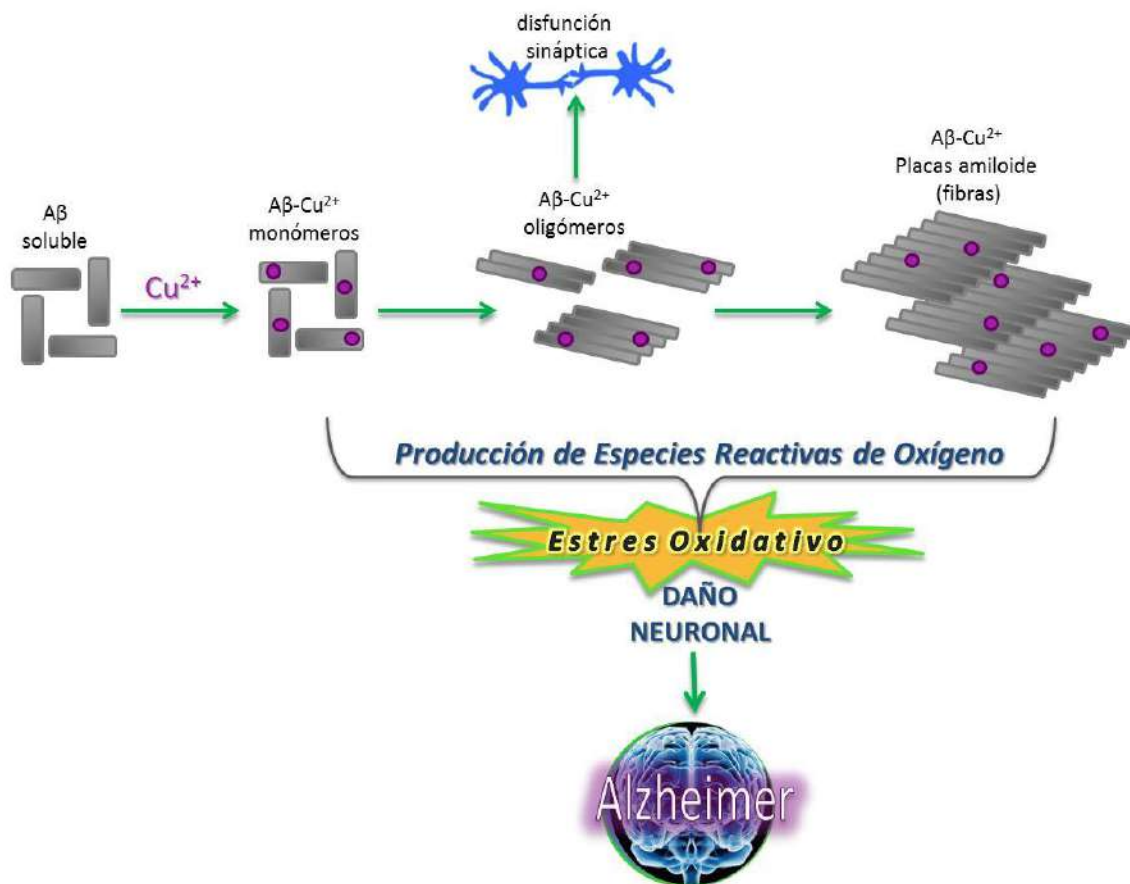


Figura 1.5. Relación de los complejos $A\beta-Cu^{2+}$ en la formación de placas amiloides (pasando por diversos intermediarios) y ROS presentes en la enfermedad de Alzheimer. Figura adaptada de la Ref.⁶⁹

1.9. Coordinación de Cu²⁺ con la proteína Aβ

En los últimos 15 años, diversos estudios se han enfocado en tratar de entender y establecer la química de coordinación de los complejos Aβ-metal, especialmente con el ión Cu²⁺. Se han estudiado diversos fragmentos truncados como el Aβ(1-16), Aβ(1-28) así como los péptidos completos Aβ(1-40) y Aβ(1-42). Sin embargo, sigue siendo controversial la esfera de coordinación alrededor del centro metálico. Esta discrepancia posiblemente se debe a las condiciones experimentales tales como: el pH, las relaciones péptido:Cu²⁺ utilizadas, los fragmentos estudiados, la afinidad de las soluciones amortiguadoras por Cu²⁺, etc.⁷⁷⁻⁸⁰

A través de diversos estudios se ha encontrado que Aβ puede unir dos equivalentes de Cu²⁺ de manera secuencial⁸¹⁻⁸⁴ donde el primer equivalente de Cu²⁺ presenta una mayor afinidad por el péptido que el segundo equivalente.⁸³ Contradictoriamente, otros reportes indican que sólo hay un sitio de coordinación.^{85, 86} Sin embargo, esta conclusión podría deberse a la baja afinidad del segundo equivalente de Cu²⁺, lo que impide su detección, especialmente cuando se utiliza una solución amortiguadora que presenta suficiente afinidad por el Cu²⁺ (por ejemplo, el amortiguador tris(hidroximetil)aminometano, *Tris*).⁸⁷ Adicionalmente, considerando que la cantidad de iones de cobre se encuentran coordinados sub-estequiométricamente en las placas amiloides de Aβ, este segundo sitio de coordinación podría no ser relevante biológicamente. Por tanto, la mayoría de los estudios se enfocan sólo en el primer sitio de coordinación. En estos, la titulación de Aβ con Cu²⁺ indica la formación predominante de un complejo monomérico soluble [Aβ₁-Cu₁²⁺] (1:1), determinándose que el sitio de coordinación a metales, especialmente para Cu²⁺ se encuentra en la parte amino terminal, por lo que el fragmento modelo para el estudio de la unión de cobre a la especie monomérica es el Aβ(1-16). Este fragmento es altamente soluble, no forma fibras y sólo se agrega a altas concentraciones. Debido a ello, su uso está limitado en el estudio de la coordinación de Cu²⁺.^{82-84, 88} Por otra parte, solamente Barnham y colaboradores reportan la formación de una especie dimérica [Aβ₂-Cu₂²⁺], donde se propone que los dos centros metálicos están unidos por un puente de His.^{89, 90} Sin embargo, esta propuesta ha sido refutada.⁸⁸

La coordinación de Cu^{2+} a A β del sitio de mayor afinidad ha sido ampliamente estudiada a través de diferentes técnicas espectroscópicas tales como resonancia paramagnética electrónica (EPR), dicroísmo circular (CD), absorción en la región UV-Vis, absorción de rayos X (XAS) y resonancia magnética nuclear (NMR) indicando la coexistencia de dos especies a pH fisiológico (pH entre 6 y 8), denominadas comúnmente como *componente I* (predominante a bajo pH) y *componente II* (predominante a pH alto), donde la transición entre I y II se ha reportado a $\text{pH } 8 \pm 1$.^{82-84, 88, 91-96} La variación en los valores de pKa reportados podría deberse a las condiciones de preparación de las muestras, como por ejemplo, la solución amortiguadora empleada.

Con respecto al ambiente de coordinación del *componente I*, es decir, la especie predominante a pH cercano al fisiológico, se ha determinado que presenta una geometría cuadrada plana distorsionada, donde la esfera de coordinación más probable es del tipo 3N1O. Este modo de coordinación ha sido asignado principalmente por experimentos de EPR⁹⁷ y análisis de la estructura fina del espectro de absorción de rayos-X (EXAFS). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que tanto las gráficas de correlación de Peisach Blumberg⁹⁸ (Ver anexo, sección 1.3) como los espectros obtenidos por EXAFS, no hacen una distinción precisa entre ligantes de oxígeno o nitrógeno. No obstante, la asignación de los parámetros de EPR es sensible a la geometría y a ligeras distorsiones del complejo.

Existen dos propuestas principalmente para este modo de coordinación (3N1O). La primera propuesta para los ligantes de N, consiste en la coordinación de los tres residuos de His (6, 13 y 14) a través de los grupos imidazol,⁹⁹ mientras que la segunda opción involucra solo a dos de las histidinas (6, 13 o 14) y al grupo NH_2 -terminal.⁹² Por otro lado, los ligantes de oxígeno que han sido propuestos para la coordinación de cobre, son el grupo fenolato de la Tyr 10,⁸⁹ o el grupo carbonilo (CO) proveniente de residuos de aspártico o de glutámico. También se ha propuesto la participación de un grupo carboxilato (COO^-) del Asp1.^{94, 100}

Por otro lado, para el *componente II* (predominante a pH alto) existen dos propuestas.¹⁰¹ La primera, basada en experimentos de EPR en banda S y de correlación de

subnivel hiperfino (HYSCORE) de péptidos marcados isotópicamente (^{13}C y ^{15}N), se propone que el ión de Cu^{2+} presenta en su esfera de coordinación un grupo CO proveniente del enlace peptídico entre la Ala2-Glu3 y 3 grupos imidazol de las 3His.^{101, 102} La segunda propuesta deducida por HYSCORE y espectroscopía de doble resonancia electrónica y nuclear (ENDOR) de péptidos marcados isotópicamente (^{13}C y ^{15}N), así como por NMR, se dilucidó la coordinación del grupo NH_2 -terminal, una amida desprotonada proveniente de Asp1-Ala2, 1His(6,13 o 14) y un CO de Ala2-Glu3.^{95, 103}

Adicionalmente, se ha propuesto la formación de otros modos de coordinación a altos valores de pH, los cuales han sido denominados como *III* y *IV* y se derivan de subsecuentes desprotonaciones de los complejos ya formados. El *componente II* se desprotona del enlace Ala2-Glu3 para dar lugar a la formación del *componente III*, cuyo modo de coordinación es 4N e involucra al NH_2 -terminal, a dos amidas desprotonadas (2N^-) provenientes de Asp1-Ala2 y Ala2-Glu3, y 1 imidazol de cualquiera de las tres histidinas. A mayor pH, el *componente IV* se forma después de la desprotonación del grupo amida entre Glu3-Phe4, por lo tanto, se propone que la esfera de coordinación de este componente involucra únicamente al grupo NH_2 -terminal y 3N^- .^{92, 96, 103, 104}

Con la finalidad de evaluar la participación del grupo NH_2 -terminal a pH fisiológico en la coordinación a Cu^{2+} al péptido $\text{A}\beta(1-16)$, se han realizado experimentos utilizando el fragmento acetilado en el extremo NH_2 -terminal [$\text{Ac-A}\beta(1-16)$], donde se ha propuesto que al acetilar el grupo NH_2 -terminal, se bloquea el sitio de coordinación y por tanto, su comportamiento espectroscópico será diferente respecto a su análogo sin acetilar.^{82, 92, 96, 104} Estos experimentos muestran la dependencia del pH de los complejos, proponiéndose también cuatro componentes de coordinación (*I'-IV'*), los cuales se obtienen por desprotonaciones consecutivas al aumentar el pH. Sin embargo, las esferas de coordinación no han sido identificadas o establecidas claramente. Para el *componente I'*, se descarta la coordinación del grupo NH_2 -terminal, de tal forma, que la esfera de coordinación para este modo sólo involucra a 3His y a un grupo CO, mientras que a mayor número de componente (*II'-IV'*), aumenta el número de amidas desprotonadas de la cadena peptídica.⁹⁶

En la Figura 1.6 se presenta la secuencia del péptido A β (1-16), y se resaltan los residuos propuestos en la esfera de coordinación de Cu²⁺. Cabe señalar que aún existe controversia sobre la participación del grupo amino terminal, y la naturaleza del ligante basado en oxígeno, el cual se ha propuesto que sea la Tyr10 o el Asp1.

Por lo tanto, este trabajo está enfocado en caracterizar e identificar los ligantes que rodean al centro metálico en los principales modos de coordinación (I y II) del complejo A β (1-16)-Cu²⁺, además de su dependencia de la concentración de Cu²⁺ y del pH.

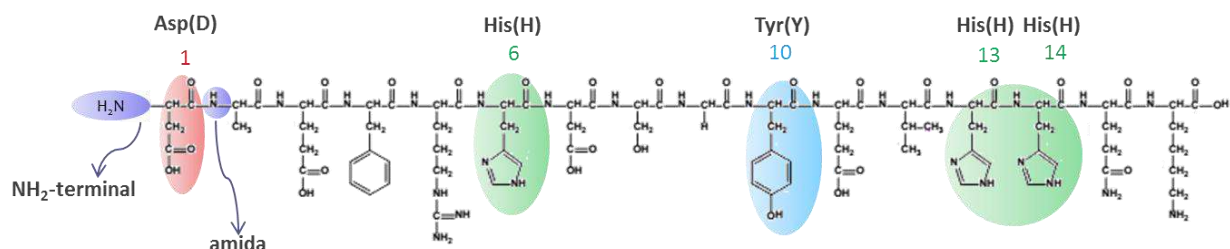


Figura 1.6. Residuos propuestos del péptido A β (1-16) para la coordinación a Cu²⁺.

1.10. Química redox de los sistemas A β -Cuⁿ⁺

Dado que se ha determinado que la interacción de Cu²⁺ con A β juega un papel muy importante en la etiología de EA, y se ha propuesto que contribuye al estrés oxidativo, es imperativo elucidar la coordinación y, el comportamiento redox de los complejos A β -Cu. Se sabe que el cobre es un elemento que puede fácilmente pasar de un estado de oxidación a otro 2+/+. Dicho proceso permite la generación de ROS, las cuales como se mencionó antes son un factor clave en las enfermedades neurodegenerativas. Por lo tanto, algunos grupos de investigación han tratado de determinar el potencial de reducción de los complejos A β (1-16)-Cu²⁺, con la finalidad de conocer las propiedades redox de dichos complejos. A continuación se presentan algunos de estos reportes.

En 1999, Huang y colaboradores reportaron el primer estudio voltamperométrico de los complejos A β -Cu²⁺, donde se determinó un E° redox de aproximadamente 0.5-0.55 V, lo cual representa un pico de reducción a ~0.42 V y un pico de oxidación a ~0.63 V (vs Ag/AgCl) para el complejo A β (1-42)-Cu²⁺, y dado que es un potencial muy positivo, los autores lo atribuyen a que el Cu⁺ es altamente estabilizado por el péptido. Además indicaron que A β no solo reduce al Cu²⁺, sino que también es capaz de atrapar al oxígeno molecular para producir H₂O₂.⁷¹ Años más tarde, en el 2007, Luc Guilloreau et al.¹⁰⁵ reportaron el estudio voltamperométrico de los fragmentos A β (1-16) y A β (1-28) con Cu²⁺ y observaron que el comportamiento electroquímico era similar para ambos complejos, obteniendo un potencial de reducción de ~ 0.09 V ($\Delta E = 0.30$ V) (vs Ag/AgCl). De los datos producidos, concluyen que el Cu²⁺ y el Cu⁺ no tienen el mismo sitio de unión en A β , ya que los residuos a los que se une el Cu²⁺ son 3 His y un COO⁻ y/o una amina del Asp1 formando una geometría cuadrado plano, mientras que para el Cu⁺ se desconocen los residuos que se coordinan al centro metálico. Finalmente, al comparar sus valores con los obtenidos por Huang en 1999, indican que las diferencias tal vez se deban a que la estructura y la esfera de coordinación de A β (1-42)-Cu²⁺ en su forma agregada cambia, lo cual no es el caso para A β (1-16) y A β (1-28).

Ese mismo año, Dianlu Jiang y colaboradores reportaron los potenciales redox de los complejos A β (1-16), A β (1-28) y A β (1-42)-Cu²⁺. Para el complejo A β (1-16)-Cu²⁺, observaron el pico de reducción a 0.0 V y el de oxidación a 0.17 V (vs Ag/AgCl) obteniendo un potencial redox de 0.085 V (vs Ag/AgCl o 0.28 V vs NHE, electrodo normal de hidrógeno), mientras que para los complejos A β (1-28)-Cu²⁺ y A β (1-42)-Cu²⁺, a pesar de ser fragmentos más largos e hidrofóbicos con tendencia a agregarse, no se afecta el potencial redox. Por lo tanto, los autores concluyen que la longitud de la cadena peptídica no afecta el potencial redox de los complejos A β -Cu²⁺.⁸⁵ Cabe destacar que estos tres reportes se hicieron a una relación 1:1 (A β :Cu²⁺) y a pH fisiológico, condiciones en las que ambos modos de coordinación están presentes. No obstante, en el 2010, Balland et al.¹⁰⁶ reportaron voltamperogramas de los complejos A β (1-16)-Cu²⁺ en una relación 5:1, ([A β] = 1 mM y pH 6.7) donde observaron que para pasar de A β (1-16)-Cu²⁺ a A β (1-16)-Cu⁺ el complejo sufre una reorganización, originando especies intermedias y el rompimiento de

algunos enlaces, para generar un complejo $A\beta(1-16)-Cu^+$ lineal con dos histidinas (13 y 14), como se ha reportado previamente para la coordinación de Cu^+ a $A\beta$.^{107, 108} (Figura 1.7).

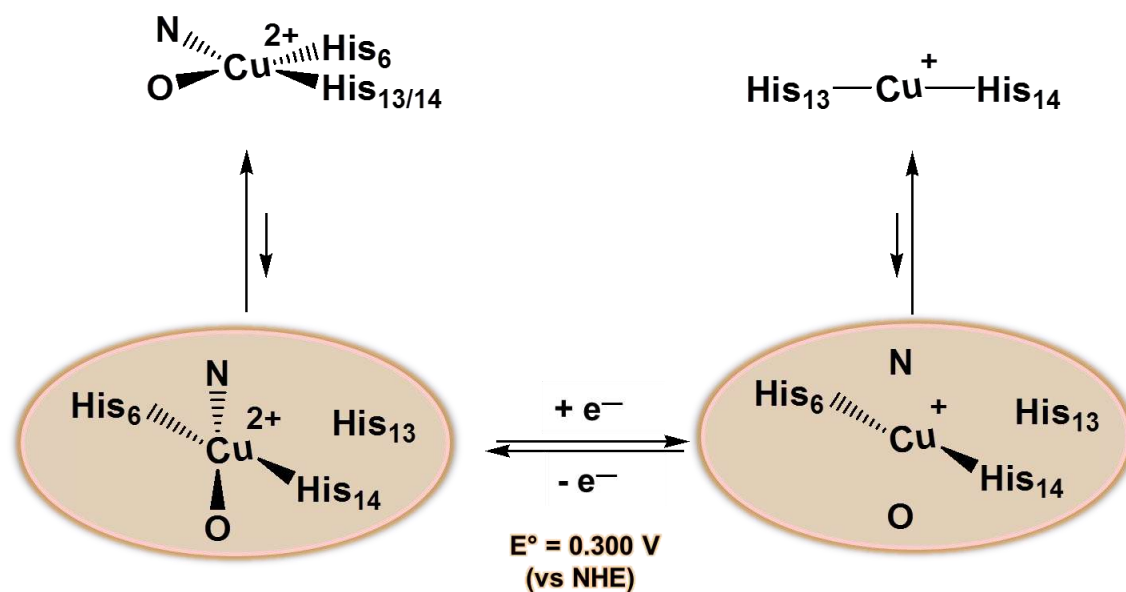


Figura 1.7. Mecanismo involucrado en la reducción del complejo $A\beta(1-16)-Cu^{2+/+}$. Las estructuras en los óvalos representan las especies intermedias derivadas de la reorganización del complejo. Figura tomada de la Ref.¹⁰⁶

Aunque parece que hay un consenso en que el potencial de reducción del complejo $A\beta(1-16)-Cu^{2+}$ esté aproximadamente a los 0.3 V vs NHE, hay que destacar que en ninguno de los trabajos citados se considera la coexistencia de los dos modos de coordinación a pH de 7.4, por lo tanto, no se sabe si ese valor de potencial corresponde al componente *I* o la mezcla de los componentes *I* y *II*.

Por otra parte, existen reportes teóricos^{109, 110} donde se consideran por separado los dos modos de coordinación, y claramente se ve reflejado el efecto de la esfera de coordinación de los complejos $A\beta(1-16)-Cu^{2+}$ en el potencial de reducción, ya que la presencia de un ligante cargado negativamente, como lo es una amida desprotonada (N^-) origina potenciales de reducción negativos.¹⁰⁹ En la Tabla 1.3 se resumen los valores de potenciales de reducción reportados para los complejos $A\beta(1-16)-Cu^{2+}$.

Debido a lo anterior, el presente trabajo está dirigido a determinar el potencial redox del complejo $A\beta(1-16)-Cu^{2+}$ a diferentes valores de pH, con el propósito de evaluar el efecto de la esfera de coordinación de ambos modos de coordinación, es decir, las repercusiones de los ligantes en la química redox de los complejos $A\beta(1-16)-Cu^{2+}$, lo cual será importante en la generación de ROS.

Tabla 1.3 Potenciales redox (E°) reportados para los complejos $A\beta(1-16)-Cu^{2+}$

Condiciones experimentales o teóricas	E° (V) vs. NHE	Referencia
$A\beta(1-42)$ /PBS pH 7.3	0.77*	Huang, X., et al, <i>J. Biol. Chem.</i> 1999 , 274, 37111–37116.
$A\beta(1-16)$ / 50 mM TRIS, 0.1 M NaCl, pH 7.4	0.09*	Guilloreau, L., et al, <i>Chem. Bio. Chem</i> 2007 , 8, 1317 – 1325.
$A\beta(1-16)$, (1-28), (1-40) y (1-42)/10 mM fosfatos, 0.1 M Na_2SO_4 pH 7.4	0.277	Jiang, D., et al, <i>Biochemistry</i> 2007 , 46, 9270-9282.
$A\beta(1-16)$ /25 mM PIPES, 0.2 M KCl, pH 6.7	0.3	Balland, V., et al., <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 2010 , 107, 17113-17118.
Estudio teórico: Modo I $A\beta(1-16)$ (con His6 e His13)	0.28	Alí-Torres, J., et al., <i>J. Phys. Chem. B</i> 2014 , 118, 4840-4850.
Estudio teórico: Modelo truncado para el Modo I	0.3	Azimi, S. and Rauk, A. <i>Int. J. Alzh. Dis.</i> 2011 , ID 539762
Estudio teórico: Modo II $A\beta(1-16)$ (con His6)	-0.37 a -0.81 (dependiendo de la geometría de optimización)	Alí-Torres, J., et al., <i>J. Phys. Chem. B</i> 2014 , 118, 4840-4850.

*Valores fuera de rango de ≈ 0.300 V encontrado para el *modo I*, por lo tanto, estos valores no son considerados en la discusión de los resultados.

Capítulo 2

O b j e t i v o s

y

**E s t r a t e g i a
e x p e r i m e n t a l**

OBJETIVOS

Objetivos generales

- Estudiar los modos de coordinación de Cu^{2+} unido al fragmento $\text{A}\beta(1-16)$, utilizando diversas técnicas espectroscópicas.
- Estudiar las propiedades electroquímicas de los complejos $\text{A}\beta\text{-Cu}$.

Objetivos particulares

- Sintetizar, purificar y caracterizar los péptidos $\text{A}\beta(1-16)$, $\text{A}\beta(1-16/\text{Y10F})$ y $\text{Ac-A}\beta(1-16)$.
- Determinar y caracterizar los modos de coordinación de Cu^{2+} a los fragmentos $\text{A}\beta(1-16)$, $\text{A}\beta(1-16/\text{Y10F})$ y $\text{Ac-A}\beta(1-16)$, utilizando técnicas espectroscópicas como: Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR), Absorción y Dicroísmo Circular (CD) en la región UV-Visible.
- Estudiar el efecto del pH en las especies formadas en cada uno de los fragmentos bajo estudio.
- Evaluar el papel de la tirosina 10 en la coordinación de Cu^{2+} al péptido $\text{A}\beta$.
- Evaluar el papel del grupo NH_2 -terminal en la coordinación de Cu^{2+} al péptido $\text{A}\beta$.
- Determinar los potenciales de reducción de los complejos $\text{A}\beta\text{-Cu}^{2+}$ mediante el uso de técnicas electroquímicas como la voltamperometría cíclica.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

2.1. Síntesis de péptidos en fase sólida

Los reactivos y disolventes utilizados para la síntesis de péptidos en fase sólida, fueron grado reactivo y adquiridos con diversos proveedores:

- 4-(2,4-Dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)-fenoxiacetamida norleucilaminometil) o mejor conocida como Rink Amide (RAM) y la resina 4-(2,4-Dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)-fenoxiacetamida (MBHA). Y los aminoácidos protegidos con el grupo N-fluorenilmetoxicarbonil (F-moc) (*NovaBiochem*).
- Piperidina (99.0 %), piridina, Ácido Trifluoro Acético (TFA), Anhídrido Acético (98.0 %), Triisopropilsilano (TIS, 99.0 %), N-metilpirrolidona (NMP, 99.5 %), N,N-diisopropil-carbodiimida (DIC, 99.0 %), cianuro de potasio (KCN, 99.5%) (*Sigma-Aldrich*).
- 1-Hidroxibenzotriazol (HOBt) (*CEM corporation*).
- Dimetilformamida (DMF), Diclorometano (DCM) (*Meyer*).
- Alcohol Isopropílico (IPA) (*Fermont*).
- 1,2-etanoditiol (EDT), 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU) (*Fluka*).
- Éter etílico (*Analitika*).

Los péptidos A β fueron obtenidos mediante la síntesis en fase sólida, usando como grupo protector al grupo F-moc. El protocolo de síntesis seguido fue el siguiente:

1. *Hinchamiento de la resina* (liberación de grupos funcionales de la misma). Consiste en colocar la resina en aproximadamente 3 mL de DCM y se deja en agitación por 2 horas.
2. *Desprotección de la resina* (se desprotege el grupo amino que se encuentra anclado en la resina para que se pueda hacer el acople del primer aminoácido). Se elimina el DCM

utilizado para el hinchamiento de la resina y se añaden 3 mL de la solución desprotectora (30 % de piperidina, 0.1 % de DBU y 69.9 % de DMF) y se agita por 40 minutos. Se desecha el disolvente y se repite el procedimiento una vez más. Al terminar, se lava con DMF (3 veces), IPA (3 veces) y DCM (3 veces) en ese orden, durante 5 minutos cada lavado.

3. *Acoplamiento* (La síntesis inicia del extremo carboxilo terminal hacia el NH₂-terminal). Por cada ciclo de acople, se empleó HOBt para evitar la racemización, DIC como agente activador, DCM y NMP como disolventes.
4. Para acetilar el grupo NH₂-terminal, como es el caso del fragmento Ac-Aβ(1-16), una vez terminados todos los acoples, se añade la solución de acetilación (piridina, anhídrido acético y DMF, 1:1:1) y se deja reaccionar por 30 minutos. Después desechar la solución y repetir por otros 30 min. Finalmente se lava la resina con DMF (3 veces), IPA (3 veces) y DCM (3 veces) en ese orden, durante 5 minutos cada lavado.
5. *Desanclaje* (cleavage). Antes de iniciar el desanclaje, lavar la resina con DCM para eliminar cualquier traza que haya quedado de DMF, ya que estos residuos pueden inhibir la acidólisis del TFA. El “cleavage” sirve para remover tanto el péptido de la resina como los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos (92.5 % TFA, 2.5 % TIS, 2.5 % EDT y 2.5 % agua Milli-Q, resistividad mayor de 18.2 MΩcm⁻¹ a 25 °C). El tiempo de reacción es de 2 horas.
6. *Precipitación del péptido*. Una vez removido el péptido de la resina, se agrega éter etílico frío para precipitarlo. La mezcla resultante, se centrifuga 3 veces a 3800 rpm durante 10 minutos y a 4° C.

La prueba de Kaiser o prueba de ninhidrina¹¹¹ es una prueba colorimétrica que sirve para la determinación de grupos amino libres. Se realiza al término de un acople, de una desprotección y/o de una acetilación, dicha prueba consiste en tomar una pequeña cantidad de resina seca y se coloca en un tubo eppendorf, se le añaden 2 gotas de la **solución A**

[constituida por la *solución 1* (40g de fenol grado reactivo en 10 mL de metanol absoluto) y la *solución 2* (1 mL de la solución de KCN en 50 mL de piridina de alta pureza), 1:1 (V/V)] y una gota de la **solución B** (1.25g de ninhidrina en 25 mL de etanol absoluto), se mezclan y se coloca el tubo en un baño previamente calentado a 100 °C durante 6 minutos. Una coloración azul oscuro, es indicativa de la presencia de grupos amino libres y se continua con el siguiente paso de la síntesis. Por otro lado, una coloración amarilla revela que hay aminas protegidas, y finalmente, coloraciones intermedias (verde, azul claro, amarillo-verdoso, etc) indican una mezcla de especies protegidas/desprotegidas, por lo que en estos casos, la reacción en curso (acople o desprotección) se debe repetir.

NOTAS:

*La *solución 1*, se almacena en frasco ámbar y en un lugar oscuro a temperatura ambiente.

**La solución de KCN (0.065g de KCN en 100 mL de agua Milli-Q) se almacena a baja temperatura (4° C).

Como se mencionó previamente, los péptidos fueron amidados del carboxilo terminal, mientras que el grupo NH₂-terminal se dejó libre en todos los péptidos excepto en Ac-Aβ(1-16). El péptido Aβ(1-16) fue sintetizado tanto en Sintetizador de Péptidos CEM Liberty como manualmente. Los otros péptidos Aβ(1-16/Y10F) y Ac-Aβ(1-16) se sintetizaron únicamente de forma manual, la cual se lleva a cabo usando reactores tipo jeringa de 10 mL y a temperatura ambiente. En la Tabla 2.1 se muestran las secuencias de los péptidos sintetizados.

Tabla 2.1. Péptidos Aβ sintetizados.

Péptido	Secuencia
Aβ(1-16)	Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys [DAEFRHDSGYEVHHQK]
Aβ(1-16/Y10F)	Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly- Phe -Glu-Val-His-His-Gln-Lys [DAEFRHDSG F EVHHQK]
Ac-Aβ(1-16)	Ac -Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys [Ac -DAEFRHDSGYEVHHQK]

2.2. Purificación y caracterización de péptidos

Al finalizar la síntesis, se obtuvieron los péptidos como sólidos blancos, los cuales se disolvieron en agua Milli-Q y se pasaron por membranas Millipore PDVF con tamaño de poro de 45 μm para filtrarlas y así evitar el paso de cualquier impureza que pudiera dañar el equipo.

La purificación se llevó a cabo mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) en fase reversa a temperatura ambiente. El equipo utilizado fue un HPLC marca WATERS Modelo 1525, con un detector de arreglo de diodos modelo 2998 de la misma marca. Para la realización de los HPLC analíticos, se usó una columna C18 Waters Symmetry, 4.6 X 150 mm, mientras que para la purificación la columna de elección fue una C18 Waters μ Bondapak semipreparativa 7.8 X 300 mm, 10 μm , 125 Å. Y como fase móvil se usaron: A. TFA al 0.05 % en agua MilliQ y B. TFA al 0.01% en acetonitrilo (JT Baker, grado HPLC). Los analitos fueron detectados monitoreando la absorbancia a 210 nm.

Se recolectaron todos y cada uno de los picos cromatográficos y se juntaron de acuerdo a su tiempo de aparición. Todos los picos se analizaron por espectrometría de masas, ESI-MS (Electrospray Ionization Mass Spectrometry) ESI-TOF (Agilent).

Los productos finales se congelaron empleando nitrógeno líquido y se almacenaron en un equipo de ultra congelación marca SOLOW a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, se liofilizaron a una temperatura menor de $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ y a una presión de 0.18 mBar. Finalmente, los péptidos se guardaron en un desecador.

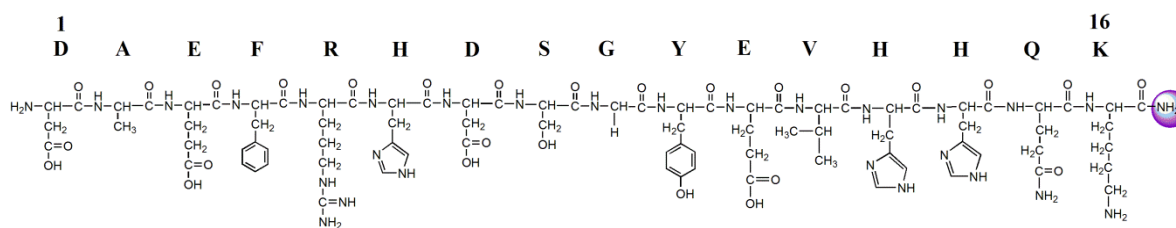
A continuación se presentan las secuencias y los respectivos espectros de masas de cada uno de los péptidos puros. En todos los casos se observaron picos a valores de m/z correspondientes a la masa esperada para especies protonadas con uno y dos H^+ (Tabla 2.2).

Tabla 2.2. Análisis de masas esperadas para cada péptido A β (m/z).

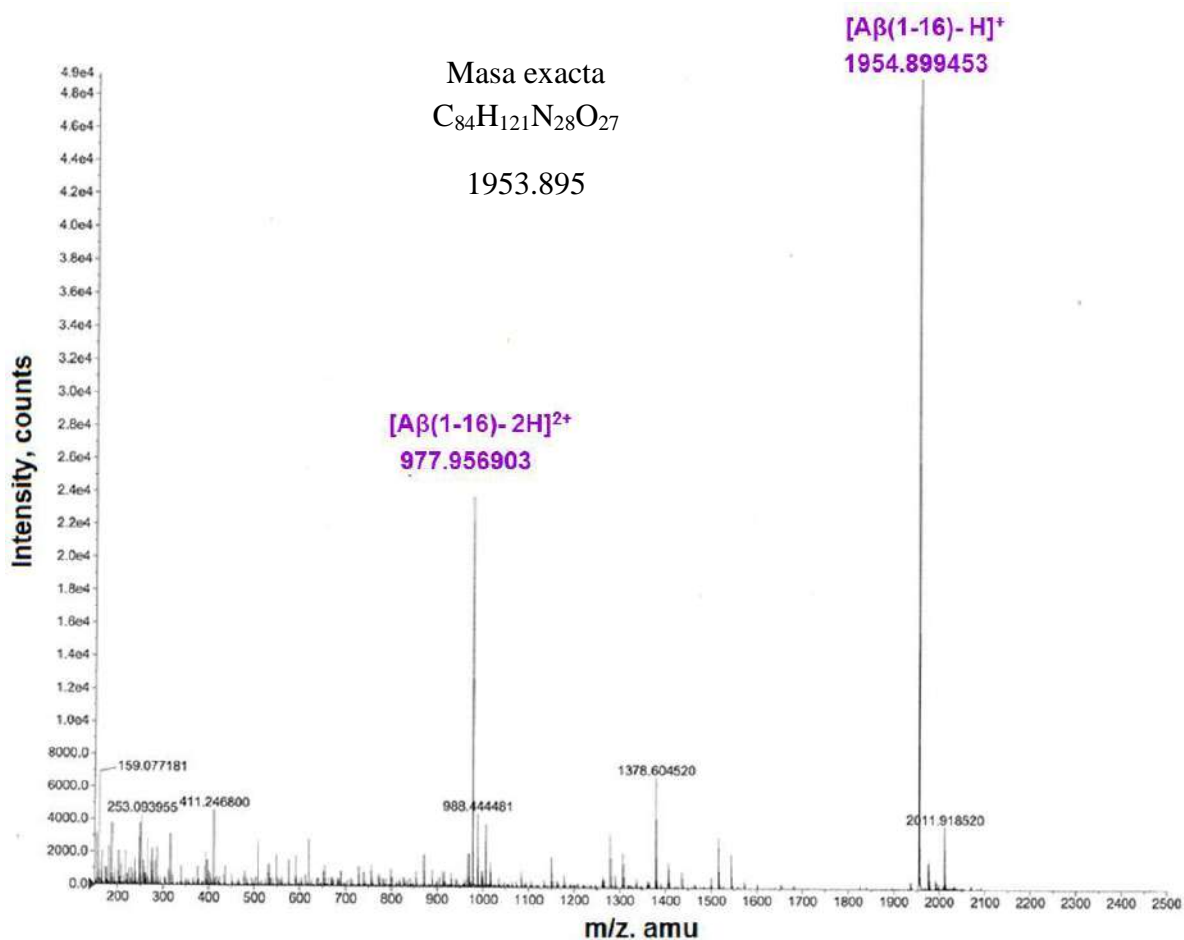
Péptido	Fórmula	Masa exacta	[A β -H] ⁺	[A β -2H] ²⁺
A β (1-16)	C ₈₄ H ₁₂₁ N ₂₈ O ₂₇	1953.895	1954.899	977.956
A β (1-16/Y10F)	C ₈₄ H ₁₂₁ N ₂₈ O ₂₆	1937.900	1938.898	969.956
Ac-A β (1-16)	C ₈₆ H ₁₂₃ N ₂₈ O ₂₈	1995.906	1996.908	998.960

Como se mencionó anteriormente, todos los péptidos fueron amidados en el extremo C-terminal, lo cual está representado con el círculo morado pequeño en cada secuencia. Además, se marcan las diferencias correspondientes para cada péptido; para el caso del fragmento A β (1-16/Y10F) se marca con un círculo verde el cambio de la Tyr10 (Y) por una Phe (F), mientras que para el derivado acetilado en el NH₂-terminal, se marca con un círculo azul.

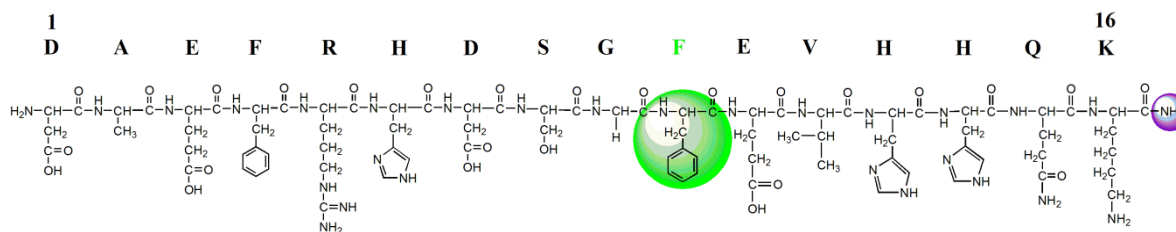
A β (1-16)



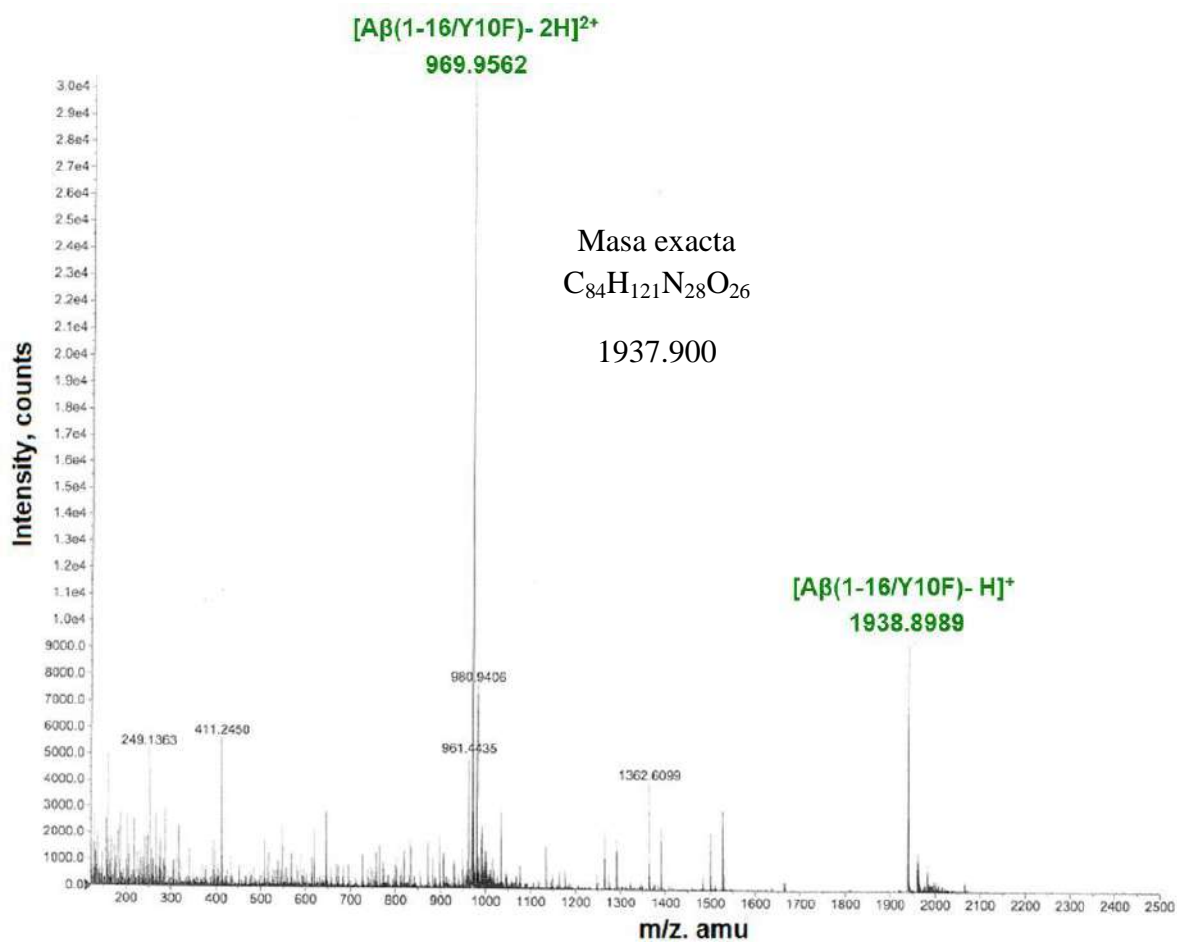
Espectro de masas



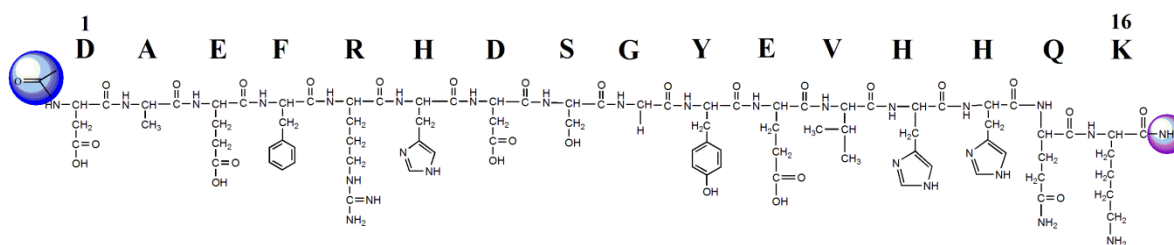
A β (1-16/Y10F)



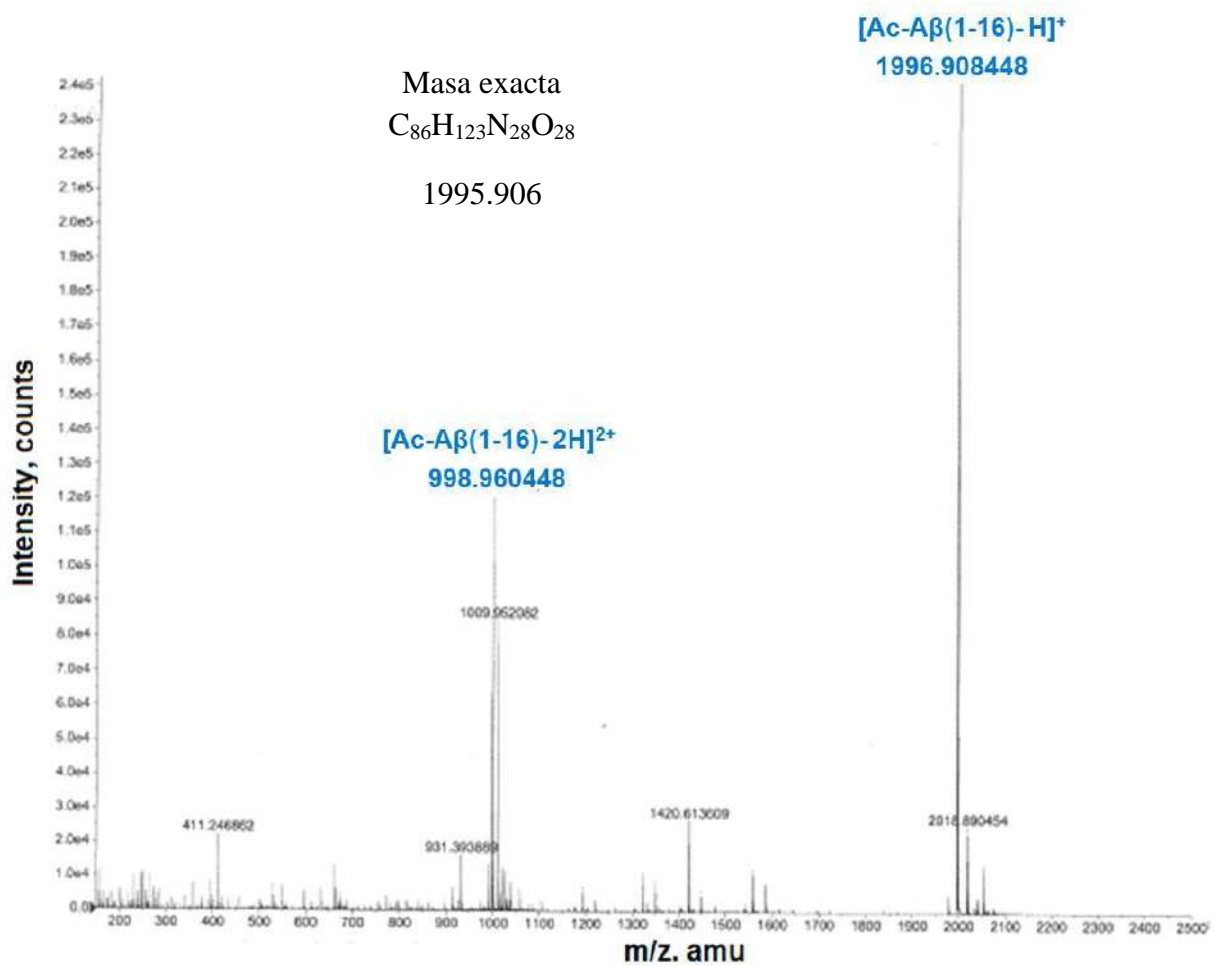
Espectro de masas



Ac-A β (1-16)



Espectro de masas



2.3. Preparación de las muestras para la caracterización espectroscópica y electroquímica.

Se prepararon las soluciones acuosas de cada uno de los péptidos bajo estudio y se determinaron los coeficientes de absorptividad molar ($\epsilon = \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) por Absorción Electrónica en la región UV-Visible, los cuales nos permitieron determinar la concentración de los péptidos de cada una de las muestras analizadas. En la Tabla 2.3, se presentan los ϵ determinados para cada fragmento peptídico a pH 7.5.

Tabla 2.3. Coeficientes de absorptividad molar determinados para los diferentes fragmentos A β

Péptido	ϵ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	λ (nm)
A β (1-16)	19693	213
A β (1-16/Y10F)	19692	216
Ac-A β (1-16)	20502	216

2.4. Preparación de las muestras

Condiciones experimentales para espectroscopía

La solución amortiguadora (buffer) elegida para la caracterización espectroscópica fue 100 mM de N-etilmorfolina (NEM, Sigma Aldrich), 100 mM de NaCl (Sigma Aldrich). Alcanzando una concentración final de péptido de 0.5 mM para los experimentos espectroscópicos.

Para las titulaciones o barridos de pH, el pH fue ajustado hasta el valor deseado adicionando pequeños volúmenes de NaOH o HCl. El pH fue medido con un potenciómetro equipado con un microelectrodo. *Thermo Scientific Orion** Dual Star pH/ISE Benchtop.

NOTA: El pH siempre fue ajustado antes de realizar las mediciones tanto espectroscópicas como electroquímicas.

Las muestras para EPR, fueron preparadas a la misma concentración, sin embargo, el buffer contenía 50 % de glicerol como agente crioprotector, para poder obtener un adecuado glaseado de la muestra. Es acertado mencionar que la adición de glicerol no afecta la estructura de los complejos A β -Cu²⁺, lo cual se comprobó por absorción electrónica en la región UV-Vis y por CD para las titulaciones de los péptidos con CuCl₂ y para los diferentes valores de pH estudiados.

Absorción Electrónica en la región UV-Vis y Dicroísmo Circular (CD). Ambos experimentos fueron realizados a temperatura ambiente. Se empleó un espectrofotómetro UV Agilent 8453 de arreglo de diodos, y un espectropolarímetro Jasco J-815 CD respectivamente. Los experimentos fueron corridos en celdas de cuarzo de paso óptico de 0.1 y/o 1 cm; los parámetros empleados para coleccionar los espectros de CD se muestran en la Tabla 2.4.

Tabla 2.4. Parámetros de CD utilizados.

Parámetro	Valor
Sensibilidad	Estándar (100 mdeg)
Inicio-fin	850-230 nm
Recolección de datos	2 nm
Modo de escaneo	continuo
Velocidad de escaneo	100 nm/min
Respuesta	1 segundo
Ancho de banda	5 nm
Acumulación	3 scans

Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR, Banda X). Los espectros fueron coleccionados usando un EMX Plus Bruker System, con una fuente de microonda ER 041 XG y una cavidad ER 4102ST, bajo las siguientes condiciones: Poder de microonda: 10 mW; amplitud de modulación: 5 G; frecuencia de modulación: 100 kHz; constante de tiempo: 327 ms; tiempo de conversión: 82 ms; and promedio: 12 barridos. Todos los experimentos

fueron corridos a 150°K, usando un sistema de nitrógeno para temperatura variable ER4131VT.

Para la titulación con cobre seguida por las diferentes técnicas espectroscópicas se utilizó una solución de CuCl_2 25 mM (Sigma-Aldrich) preparada en agua Milli-Q.

Voltamperometría Cíclica (CV). Los experimentos fueron obtenidos a temperatura ambiente utilizando un Voltalab potentiostat PGZ 100, con una celda convencional de tres electrodos: Electrodo de referencia (RE); Ag/AgCl, Electrodo de trabajo (WE); Carbón vítreo (GCE, 3 mm de diámetro) y Contra Electrodo (CE); Platino. El WE fue lijado y posteriormente pulido con alúmina de 0.3 μ sobre un paño especial para pulir y finalmente fue sonicado en agua Milli-Q y etanol.

Para estos experimentos, se utilizó un buffer de fosfatos (10 mM) y como electrolito soporte Na_2SO_4 (50 mM). Las muestras fueron mantenidas en atmósfera inerte durante los experimentos utilizando Argón de alta pureza. La concentración de péptido fue de 0.4 mM y 0.1 mM Cu^{2+} y se colectaron los voltamperogramas a 0.005 Vs^{-1} . La sal de cobre fue CuSO_4 10 mM (Sigma-Aldrich, 99.9 % pureza).

Capítulo 3

**Estudio espectroscópico de la
coordinación de Cu^{2+} a diferentes
fragmentos del péptido β -amiloide:
 $\text{A}\beta(1-16)$, $\text{A}\beta(1-16/\text{Y10F})$ y
 $\text{Ac-A}\beta(1-16)$**

3.1. Estudio de la unión de Cu^{2+} al péptido $\text{A}\beta(1-16)$ por absorción y dicroísmo circular en la región UV-visible

El fragmento 1-16 de la proteína β -amiloide [$\text{A}\beta(1-16)$] ha resultado ser un buen modelo de estudio para la coordinación de iones metálicos, por su alta solubilidad y por contener los aminoácidos involucrados en el anclaje a metales, como lo son las histidinas 6, 13 y 14 (sección 1.9, Figura 1.6). Debido a la gran discrepancia encontrada en la literatura sobre la esfera de coordinación del centro metálico en el complejo $\text{A}\beta(1-16)\text{-Cu}^{2+}$, en este estudio se propuso evaluar sistemáticamente el efecto del pH y de la relación de concentraciones $\text{A}\beta(1-16)\text{:Cu}$, para elucidar la esfera de coordinación del ión Cu^{2+} unido al fragmento peptídico. Las espectroscopias de absorción y dicroísmo circular en la región UV-visible permiten el estudio de las transiciones electrónicas asociadas a complejos proteína- Cu^{2+} (Anexo secciones 1.1 y 1.2). Es importante mencionar que los espectros de absorción y dicroísmo circular de metaloproteínas se presentan comúnmente en función del número de onda (cm^{-1}), como unidad proporcional de energía. Esto permite una mejor resolución de las transiciones de campo ligando de baja intensidad en la región de menor energía, así como la expansión de la región donde aparecen las bandas de transferencia de carga ligando a metal (ver Anexo 1, *NOTA* de la página 111).

El péptido $\text{A}\beta(1-16)$ fue titulado con CuCl_2 en una solución amortiguadora de N-etilmorfolina (NEM) ajustada a pH 7.5. El NEM es un amortiguador comúnmente utilizado en el estudio de metalo-proteínas, por su baja afinidad por iones metálicos.¹¹² La titulación se realizó hasta dos equivalentes de Cu^{2+} , y fue seguida simultáneamente por absorción y CD en la región UV-Visible (Figura 3.1). El espectro de absorción (Figura 3.1, superior) muestra claramente que la adición de Cu^{2+} ocasiona el crecimiento de una señal muy intensa a aproximadamente 40000 cm^{-1} (250 nm, $\epsilon = 7100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), mientras que en la región de menor energía se observan unas bandas de menor intensidad alrededor de 17160 cm^{-1} (585 nm, $\epsilon = 170 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Debido a que las señales son anchas en el espectro de absorción UV-Vis, la definición de las transiciones electrónicas es difícil. Sin embargo, en los espectros de CD (Figura 3.1, inferior) se puede observar el crecimiento de señales diferentes dependiendo de la cantidad de Cu^{2+} añadida a la solución del péptido.

De 0 a 0.6 equivalentes de Cu^{2+} , se observa el crecimiento de una señal negativa de baja intensidad, a 17300 cm^{-1} (578 nm), con un $\Delta\epsilon = -0.052 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (ampliación en la Figura 3.1 inferior). Mientras que a mayores energías, se observa la aparición de una banda positiva a 31900 cm^{-1} (313 nm, $\Delta\epsilon = 0.19 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), y dos negativas a alrededor de los 36700 cm^{-1} (272 nm hombro, $\Delta\epsilon = -0.09 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y 41200 cm^{-1} (243 nm, $\Delta\epsilon = -0.30 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). En contraste, a partir de 0.8 equivalentes de Cu^{2+} se observa la aparición de un segundo conjunto de señales: una señal positiva a 15500 cm^{-1} (645 nm, $\Delta\epsilon = 0.20 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y dos negativas a $\sim 20000 \text{ cm}^{-1}$ (500 nm, $\Delta\epsilon = -0.193 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y a $\sim 28500 \text{ cm}^{-1}$ (350 nm, $\Delta\epsilon = -0.20 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). A energía, se definen tres nuevas transiciones: una de mediana intensidad a 32400 cm^{-1} (308 nm, $\Delta\epsilon = 0.45 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), otra muy intensa a 37600 cm^{-1} (266 nm, $\Delta\epsilon = 3.15 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y por último, una banda negativa a $\sim 41000 \text{ cm}^{-1}$ (244 nm, $\Delta\epsilon = -1.1 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

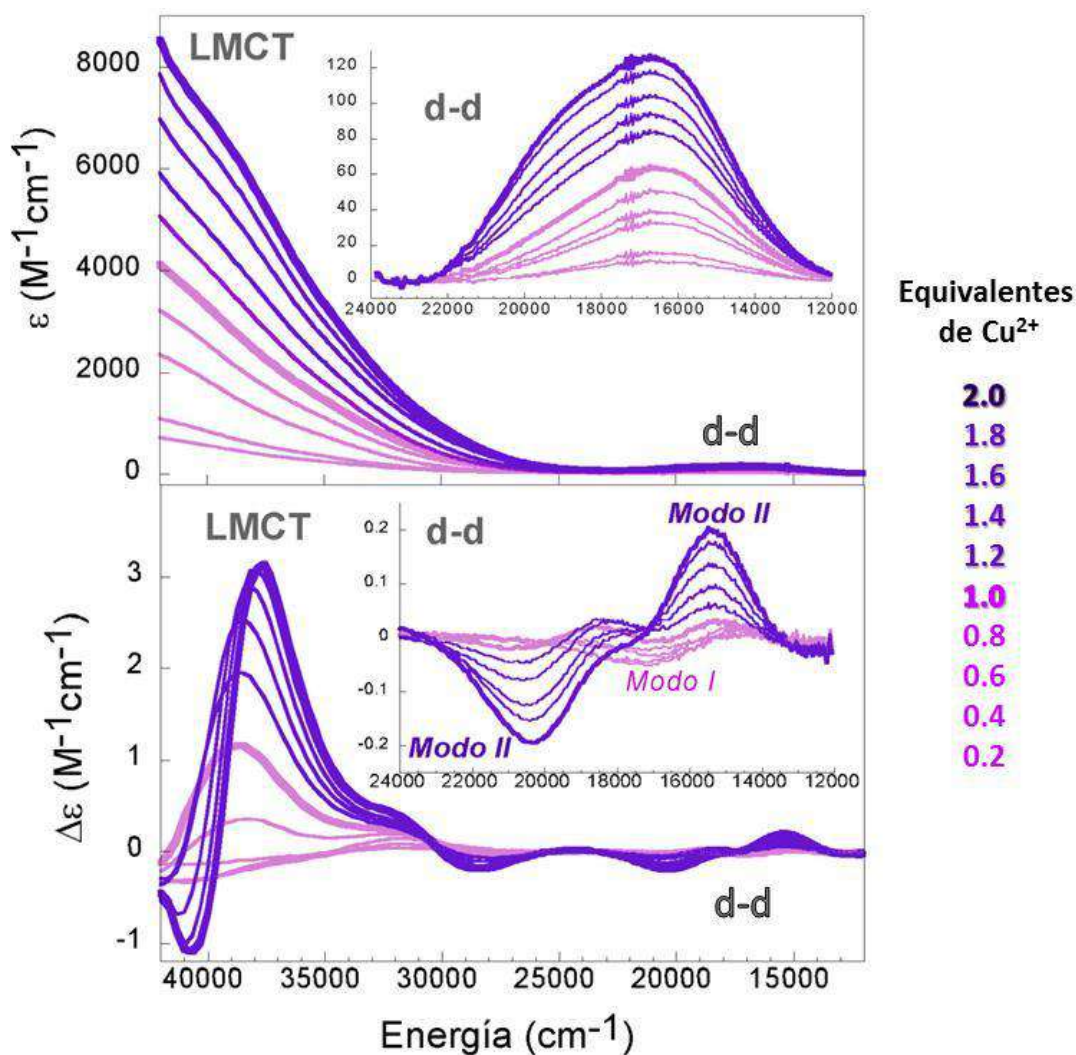


Figura 3.1. Titulación de A β (1-16) hasta 2.0 equivalentes de Cu²⁺ en NEM 100 mM + NaCl 100 mM, seguida cada 0.2 equivalentes de Cu²⁺ por absorción en la región UV-Vis (superior) y CD (inferior) a pH 7.5, Los espectros corresponden a la adición de diferentes equivalentes de Cu²⁺: de 0.2 a 1.0 equivalentes (color lila) y de 1.2 a 2.0 equivalentes de Cu²⁺ (color morado).

Por último, al agregar hasta 3.0 equivalentes de Cu²⁺ a pH 7.5, ya no se observan cambios significativos en los espectros de CD, y son prácticamente idénticos con respecto al espectro del péptido con 2.0 equivalentes de Cu²⁺ (Figura 3.2). Estos resultados indican que los sitios de coordinación en el péptido A β (1-16) se saturan con 2.0 equivalentes de Cu²⁺, por lo que, ya no se forma otro modo de coordinación a mayor relación A β :Cu²⁺.

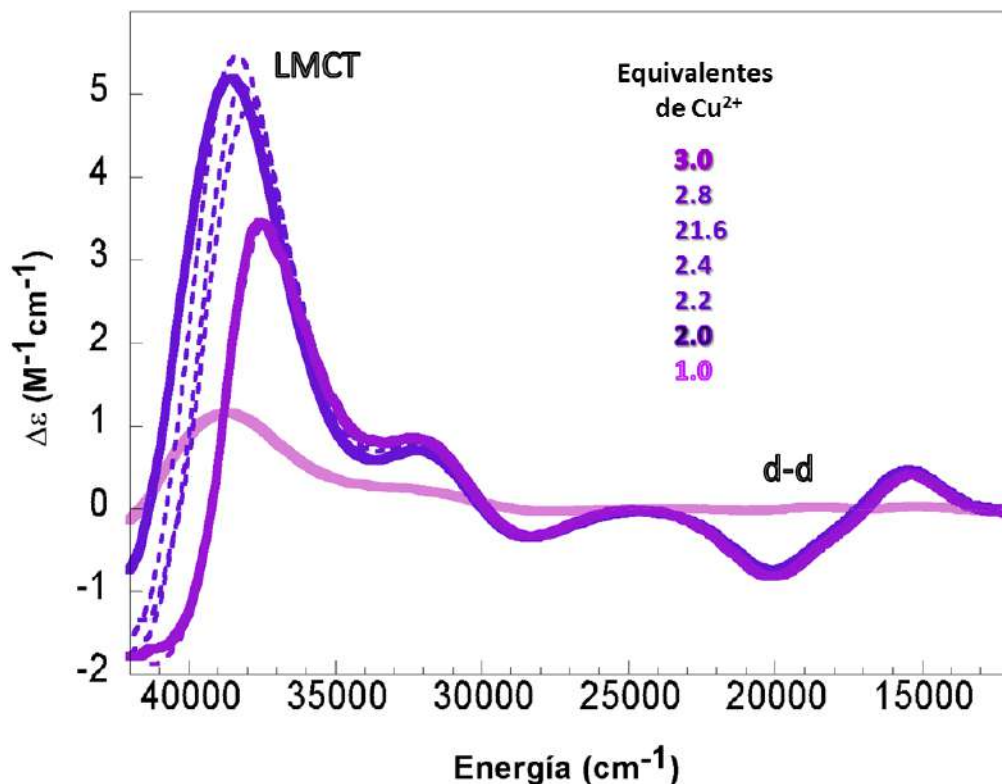


Figura 3.2. Titulación de A β (1-16) hasta 3.0 equivalentes de Cu²⁺ en NEM 100 mM + NaCl 100 mM seguida por CD a pH 7.5.

En los espectros de CD a baja concentración de Cu²⁺ (0-0.6 equivalentes), se aprecian únicamente 4 bandas de absorción a 17300, 31900, 36700 (hombro) y 41200 cm⁻¹, mientras que a la mayores concentraciones de Cu²⁺ (0.8-2.0 equivalentes) se observan 6 bandas a 15500, 20000, 28500, 32400, 37600 y 41000 cm⁻¹. Esto significa que en este intervalo de concentración de Cu²⁺ y a este pH existen dos modos de coordinación, los cuales son dependientes de la relación A β (1-16):Cu. Por tanto, los datos de CD indican claramente la formación de dos modos de coordinación diferentes, cuya abundancia relativa depende de la cantidad de metal adicionado. El primer modo de coordinación se forma durante la adición de los primeros 0.6 equivalentes de Cu (*modo I*), mientras que a partir de la adición de más de 0.8 equivalentes de Cu²⁺ predomina otro modo de coordinación denominado *modo II*. Un resumen de las energías, intensidades y asignación de las transiciones electrónicas asociadas a cada uno de estos modos de coordinación se muestra en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Transiciones electrónicas identificadas por CD en la titulación de A β (1-16) hasta 2 equivalentes de Cu²⁺ a pH 7.5.

Asignación de banda	<i>Modo I</i> A β (1-16) con 0.6 eq. Cu ²⁺		<i>Modo II</i> A β (1-16) con 2.0 eq. Cu ²⁺	
	Energía ^a	$\Delta\epsilon$ ^b	Energía ^a	$\Delta\epsilon$ ^b
d→d	17300 (578)	-0.05	15380 (650)	+0.20
d→d	-	-	20400 (490)	-0.19
N _{Im} π_1 → Cu	31900 (313)	+0.14	28500 (350)	-0.20
N _{amida} ⁻ → Cu	-	-	32400 (308) ^h	+0.45
N _{Im} π_2 → Cu	36700 (272) ^h	-0.09	37600 (265)	+3.15
NH ₂ amino → Cu	41270 (243)	-0.30	40750 (245)	-1.1

^aLa energía de las transiciones está reportada en cm⁻¹ y los valores entre paréntesis corresponden a la longitud de onda (en nm). ^bLa intensidad de CD ($\Delta\epsilon$) es reportada en M⁻¹cm⁻¹. h = hombro.

Para ambos modos de coordinación, las transiciones electrónicas a baja energía (menor que 20,000 cm⁻¹) son también las de menor intensidad en el espectro de absorción ($\epsilon < 130\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), indicando que son prohibidas por dipolo eléctrico. Sin embargo, estas transiciones ganan intensidad en el espectro de dicroísmo circular, indicando que son transiciones que involucran a orbitales *d* del centro metálico. Por tanto, estas transiciones son asignadas a bandas del tipo *d-d* o campo ligante (Tabla 3.1). Por otro lado, las transiciones electrónicas que aparecen a mayor energía muestran una mayor intensidad en el espectro de absorción ($\epsilon \approx 7000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y se asocian a bandas de transferencia de carga del ligante al metal (LMCT por sus siglas en inglés) (Tabla 3.1).¹¹³ Entre estas últimas, podemos distinguir transiciones que caen en el rango de energías asociadas a la coordinación del grupo imidazol (π_1 y π_2) de histidinas. Diferentes estudios de complejos de Cu²⁺ con este tipo de ligantes han demostrado que, la interacción de un grupo imidazol con este ion metálico da lugar a tres transiciones tipo LMCT: N_{Im} σ → Cu a 45454 cm⁻¹ (220 nm), N_{Im} π_1 → Cu entre 35714–28985 cm⁻¹ (280-345 nm) y N_{Im} π_2 → Cu a 40800–38500 cm⁻¹ (245-260 nm).¹¹⁴⁻¹¹⁶ Por tanto, la transición que aparece a 31900 cm⁻¹ (313 nm) para el *modo I* y a 28500 cm⁻¹ (350 nm) para el *modo II* puede ser asignada como un banda LMCT N_{Im} π_1 → Cu, mientras que la que aparece a 36700 cm⁻¹ (272 nm) para el *modo I* y a

37600 cm⁻¹ (265 nm) para el *modo II* puede ser asignada como un banda LMCT N_{lm} π₂ → Cu.

Adicionalmente, la transición intensa que se observa alrededor de los 41000 cm⁻¹ (244 nm) se encuentra en el rango de energías asociadas a bandas LMCT que se originan de la coordinación del grupo NH₂-terminal al ión Cu²⁺. Los valores reportados en la literatura para este tipo de transiciones varían de 245-278 nm.¹¹⁴⁻¹¹⁷ Por último, la banda de transferencia de carga a 32400 cm⁻¹ (308 nm) que sólo se observa en el *modo II* (Tabla 3.1) puede ser asignada como una banda LMCT asociada a la interacción del Cu²⁺ con una amida desprotonada de la cadena peptídica (N⁻), las cuales normalmente aparecen en la región de 33898 a 31746 cm⁻¹ (295-315 nm).¹¹⁵

La titulación del péptido Aβ(1-16) con Cu²⁺ realizada a pH 8.5 (Figura 3.3), presenta una tendencia similar a la observada a pH 7.5, es decir, la formación de dos modos de coordinación tiene lugar. Sin embargo, las señales asociadas al *modo I* son menos intensas a pH 8.5 a diferencia de las señales correspondientes al *modo II*, las cuales ganan intensidad. En particular, la banda de transferencia de carga a 32000 cm⁻¹ (312 nm), asociada a la interacción del Cu²⁺ con una amida desprotonada de la cadena peptídica (N⁻) se vuelve más intensa (Δε = 0.68 M⁻¹cm⁻¹). Este resultado es congruente con el hecho de que a valores de pH más altos se favorece la desprotonación de las amidas de la cadena peptídica.

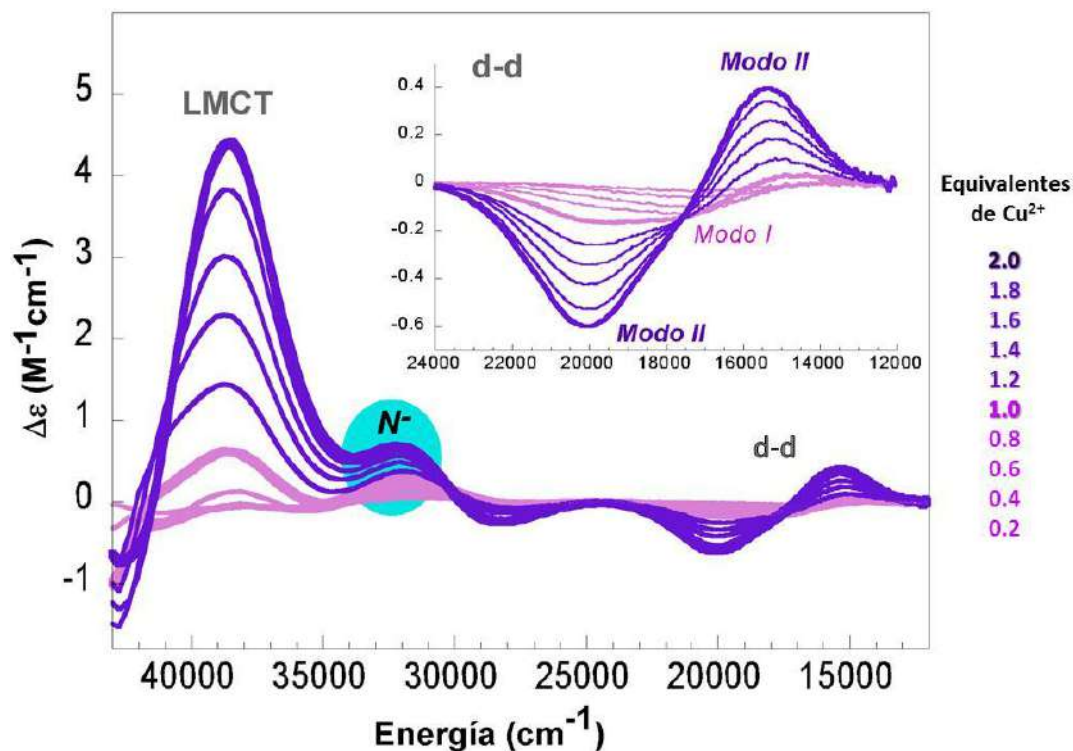


Figura 3.3. Titulación de A β (1-16) hasta 2.0 equivalentes de Cu²⁺ en NEM 100 mM + NaCl 100 mM, seguida por CD a pH 8.5. Los espectros corresponden a la adición de diferentes equivalentes de Cu²⁺: de 0.2 a 1.0 equivalentes (color violeta) y de 1.2 a 2.0 equivalentes de Cu²⁺ (color morado). Acercamiento en la región de las transiciones d-d.

En resumen, el análisis espectroscópico de los complejos A β (1-16)-Cu²⁺ a pH 7.5 y 8.5 indica que existen dos modos de coordinación del Cu²⁺ con este péptido y que en ambos complejos las histidinas y el grupo amino terminal participan como ligantes. Mientras que, sólo en el *modo II* se observa evidencia de la coordinación de una amida desprotonada de la cadena peptídica al cobre. Además, a partir de las titulaciones resulta claro que la población de los *modos I* y *II* son dependientes de la concentración de Cu²⁺ y también del pH.

3.2. Estudio de la unión de Cu^{2+} al péptido $\text{A}\beta(1-16)$ por resonancia paramagnética electrónica

Con la finalidad de obtener más información acerca de la estructura de los modos de coordinación *I* y *II*, se llevó a cabo una titulación del péptido $\text{A}\beta(1-16)$ seguida por resonancia paramagnética electrónica. Con esta espectroscopia, podemos obtener información sobre el ambiente químico en la vecindad del centro metálico, así como la geometría adoptada por el complejo $\text{A}\beta(1-16)\text{-Cu}^{2+}$ (Anexo sección 1.3).

Los espectros de EPR muestran que, con la adición de 0.4 equivalentes de Cu^{2+} al péptido $\text{A}\beta(1-16)$, aparecen dos conjuntos de señales, como se muestra en la Figura 3.4. El juego de señales más intensas corresponden a un valor g_{\parallel} de 2.27 y un acoplamiento hiperfino (A_{\parallel}) con Cu^{2+} de 170 G, mientras que el segundo conjunto de señales presentan un valor g_{\parallel} de 2.23 y un acoplamiento hiperfino con Cu^{2+} de 150 G. Estas señales cambian de intensidad en función de la concentración de Cu^{2+} . De 0.4 a 0.8 equivalentes de Cu^{2+} (Figura 3.4, espectros negro y azul respectivamente), la especie que se encuentra en mayor proporción (aproximadamente 70 % : 30 %) es la de mayor acoplamiento hiperfino. Sin embargo, la intensidad relativa de la segunda especie aumenta, tal que a 1.2 equivalentes de Cu^{2+} , la intensidad de los picos es la misma, lo que sugiere que las especies correspondientes a los *modos I* y *II* se encuentran en concentraciones equivalentes. Por último, al llegar a 1.6 y 2.0 equivalentes de Cu^{2+} , las señales pertenecientes al *modo I* se desplazan ligeramente a la derecha y se observan señales asociadas a cobre en solución.

En la Tabla 3.2 se presentan los valores de A_{\parallel} y g_{\parallel} para ambos modos de coordinación. De acuerdo a estos valores y con base en las gráficas de correlación de Peisach-Blumberg,⁹⁸ se asignó la coordinación ecuatorial de cada complejo. En ambos casos, los ligantes que están unidos alrededor del ión metálico corresponden a tres nitrógenos y un oxígeno (3N1O). Considerando que los datos de CD evidencian la participación del grupo NH_2 -terminal e His para el *modo I*, podemos concluir que en este modo de coordinación, deben participar dos de las tres histidinas del péptido $\text{A}\beta(1-16)$. Por otro lado, para el modo de coordinación *II*, los datos de CD indican la participación, no sólo del grupo NH_2 -terminal e His, sino también la participación de una amida desprotonada de

la cadena peptídica (N^-). Sin embargo, los datos de EPR indican el mismo contenido de ligantes de nitrógeno, 3N1O. Por lo tanto, podemos concluir que en el *modo II* participa sólo una histidina.

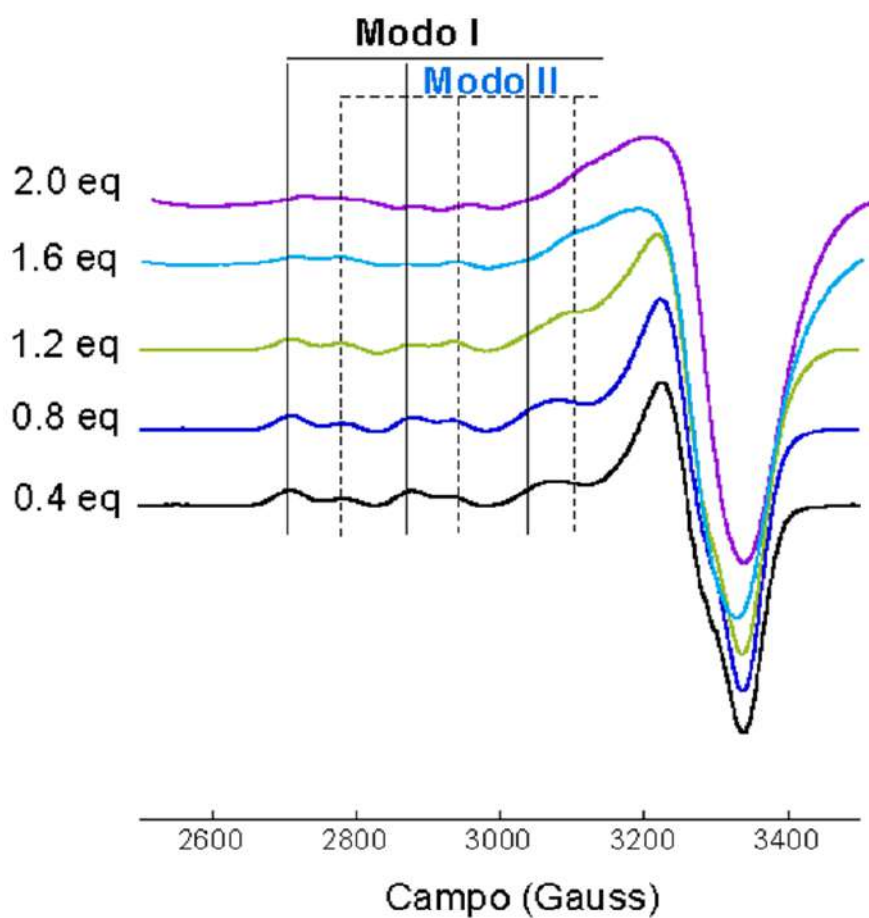


Figura 3.4. Titulación de $A\beta(1-16)$ hasta 2.0 equivalentes de Cu^{2+} en NEM 100 mM – NaCl 100 mM, Glicerol (50:50), seguida por EPR a pH 7.5. *Modo I* líneas negras. *Modo II* líneas azules.

Tabla 3.2. Parámetros de EPR de los complejos $A\beta(1-16)-Cu^{2+}$

Modo	$A_{ }$ (Gauss)	$g_{ }$	A ($\times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$)	Modo de coordinación
I	170	2.27	180	3N1O
II	150	2.23	157	3N1O

En conjunto, los datos de CD y EPR indican que el primer modo de coordinación (*modo I*), formado a baja concentración de Cu^{2+} , corresponde a un complejo donde los ligantes involucrados son: NH_2 , 2His (6,13 ó 14), y un oxígeno. Mientras que, a medida que se aumentan los equivalentes de Cu^{2+} , se observa un pequeño incremento en la población del *modo II*, para el cual, los ligantes propuestos son: NH_2 , 1His (6,13 ó 14), N^- y un oxígeno (3N1O). Es importante resaltar que el *modo II* sólo tiene un ligante de His, dejando libre dos residuos de His que estarían disponibles para un segundo equivalente de Cu^{2+} . Por tanto, es posible proponer la formación de especies donde un péptido coordine dos equivalentes de cobre: un ión en el extremo NH_2 -terminal con la esfera de coordinación del *modo II* y otro coordinado a las dos His restantes, posiblemente con una esfera de coordinación similar a la del *modo I*. Al adicionar más de 1 equivalente de cobre, se observó un aumento en la señal del *modo II*, a la vez que las señales asociadas al *modo I* presentaron un pequeño corrimiento. Estos cambios serían consistentes con la formación de las especies arriba descritas. Por otro lado, el hecho de que se observen señales de cobre en solución indica que la afinidad del segundo equivalente por el péptido es mucho menor que el primero.

La naturaleza del ligante basado en oxígeno ha sido materia de intenso debate. Por un lado, Peter Faller y colaboradores, basándose en experimentos de EPR, CD y resonancia magnética nuclear (NMR) proponen para el *modo I* la participación del grupo carbonilo $\text{C}=\text{O}$ proveniente del enlace Asp1-Ala2; mientras que para el *modo II*, proponen el grupo carbonilo del enlace peptídico Ala2-Glu3.^{78, 97} Por su parte, Veronika Szalai,⁹⁴ y otros autores,^{83, 92, 118} proponen que el ligante de oxígeno es un carboxilato de la cadena peptídica (COO^-), perteneciente al Asp1, Glu3, Asp7 o Glu11. Un estudio teórico reciente¹⁰⁰ soporta la participación del grupo carboxilato del Asp1 como ligante en la esfera de coordinación del Cu^{2+} . Por otro lado, estudios por espectroscopia Raman han involucrado al oxígeno del grupo fenólico de la Tyr10, en la coordinación a Cu^{2+} .⁹¹ Es esta última propuesta la que se evalúa en la siguiente sección.

3.3. Estudio de la unión de Cu^{2+} al péptido $\text{A}\beta(1-16/\text{Y10F})$ por absorción y dicroísmo circular en la región UV-visible

Se estudió la unión de Cu^{2+} a la variante $\text{A}\beta(1-16/\text{Y10F})$ [DAEFRHDSGFEVHHQK], en la cual, la Tyr10 fue reemplazada por una Phe, con el objeto de evaluar la participación del grupo fenólico de la Tyr 10. En la Figura 3.5 se muestran las estructuras de ambos residuos. Para fines prácticos se denominara Y10F a lo largo de la discusión.

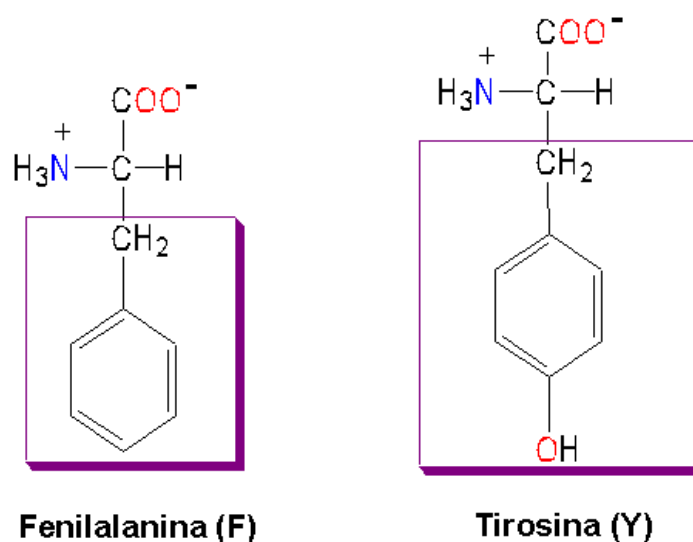


Figura 3.5. Estructura química de los aminoácidos Phe y Tyr.

Se hizo la titulación del péptido $\text{A}\beta(1-16/\text{Y10F})$ hasta 2 equivalentes de Cu^{2+} a pH 7.5, monitoreando en paralelo los espectros de absorción y CD en la región UV-Visible (Figura 3.6). Nuevamente, con la espectroscopia de absorción en la región UV-Visible es difícil la asignación de las transiciones electrónicas. Sin embargo, por CD se observa la aparición de dos bandas de muy baja intensidad de 0.2 a 0.6 equivalentes de Cu^{2+} , una a 17300 cm^{-1} (578 nm, $\Delta\epsilon = -0.1\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) correspondiente a una banda d-d, y otra a 31750 cm^{-1} (314 nm, $\Delta\epsilon = 0.250\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) designada como una LMCT. A partir de los 0.8 equivalentes, aparece una banda positiva de baja intensidad a 38574 cm^{-1} (260nm, $\Delta\epsilon = 2.06\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), mientras que en la región de las transiciones de campo ligante (baja energía) crece un segundo juego de señales con una banda positiva alrededor de los 15370 cm^{-1} (650

nm, $\Delta\epsilon = 0.425 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y una negativa a los 20000 cm^{-1} (578 nm , $\Delta\epsilon = -0.52 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Adicionalmente se observa el crecimiento de una banda a 28300 cm^{-1} (353 nm , $\Delta\epsilon = -0.125 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), y la desaparición de la banda de 17300 cm^{-1} . A mayor número de equivalentes de Cu^{2+} , la intensidad de todas las transiciones aumentan en intensidad, de tal forma que a los 2 equivalentes de Cu, las bandas LMCT se observan a 39090 cm^{-1} , 32000 cm^{-1} y 28720 cm^{-1} ($\Delta\epsilon = 7.4, 0.635$ y $-0.427 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ respectivamente), mientras que las bandas d-d a 20000 y 15360 cm^{-1} ($\Delta\epsilon = -0.522$ y $0.425 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), respectivamente.

Comparando las titulaciones de ambos péptidos hasta 2 equivalentes de Cu^{2+} seguidas por CD (comparar Figuras 3.1 y 3.6) a pH 7.5, se aprecian las mismas señales espectroscópicas, correspondientes a dos especies. Por tanto, en ambos casos, se observa la presencia de dos modos de coordinación que se encuentran en equilibrio y que son dependientes de la concentración de cobre. La similitud del comportamiento espectroscópico revela que la esfera de coordinación no cambia en la variante Y10F. Por lo tanto, se puede descartar la participación del grupo fenólico de la Tyr10 en la esfera de coordinación del Cu^{2+} .

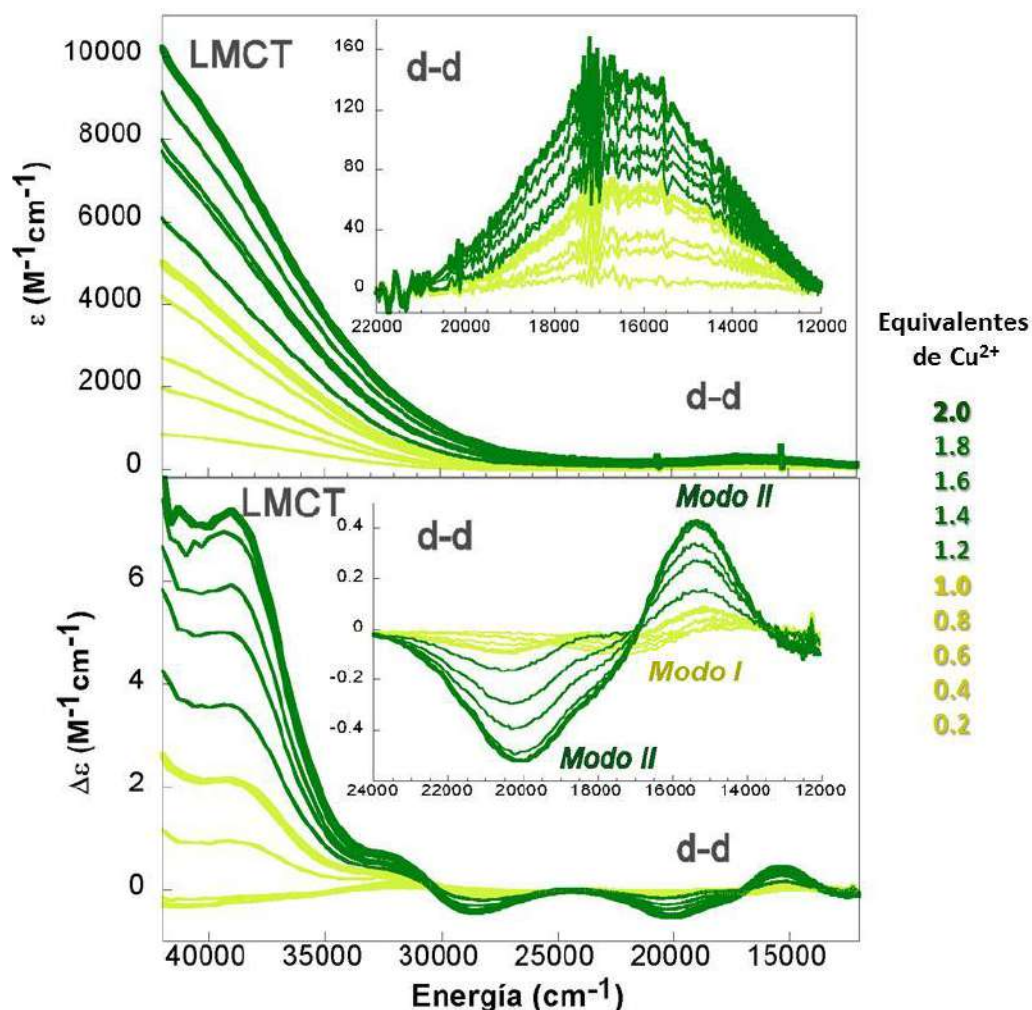


Figura 3.6. Titulación de A β (1-16/Y10F) hasta 2.0 equivalentes de Cu²⁺ en NEM 100 mM – NaCl 100 mM, seguida cada 0.2 equivalentes de Cu²⁺ por absorción en la región UV-vis (superior) y CD (inferior) a pH 7.5. Los espectros corresponden a la adición de diferentes equivalentes de Cu²⁺: de 0.2 a 1.0 equivalentes (verde claro) y de 1.2 a 2.0 equivalentes de Cu²⁺ (verde oscuro).

3.4. Evaluación del efecto del pH en los modos de coordinación de la A β (1-16) con Cu²⁺ por dicroísmo circular

Con el objeto de evaluar el efecto del pH en los dos modos de coordinación encontrados en el complejo A β (1-16)-Cu²⁺, se realizaron titulaciones de pH de dichos complejos. Dado que las señales espectroscópicas cambian drásticamente en función de la concentración de cobre, los barridos de pH se realizaron a dos diferentes relaciones Cu²⁺:péptido: 0.7:1 (Figura 3.7 A) y 2:1 (Figura 3.7 B). Los barridos realizados incluyeron un amplio rango de pH y fueron seguidos por CD.

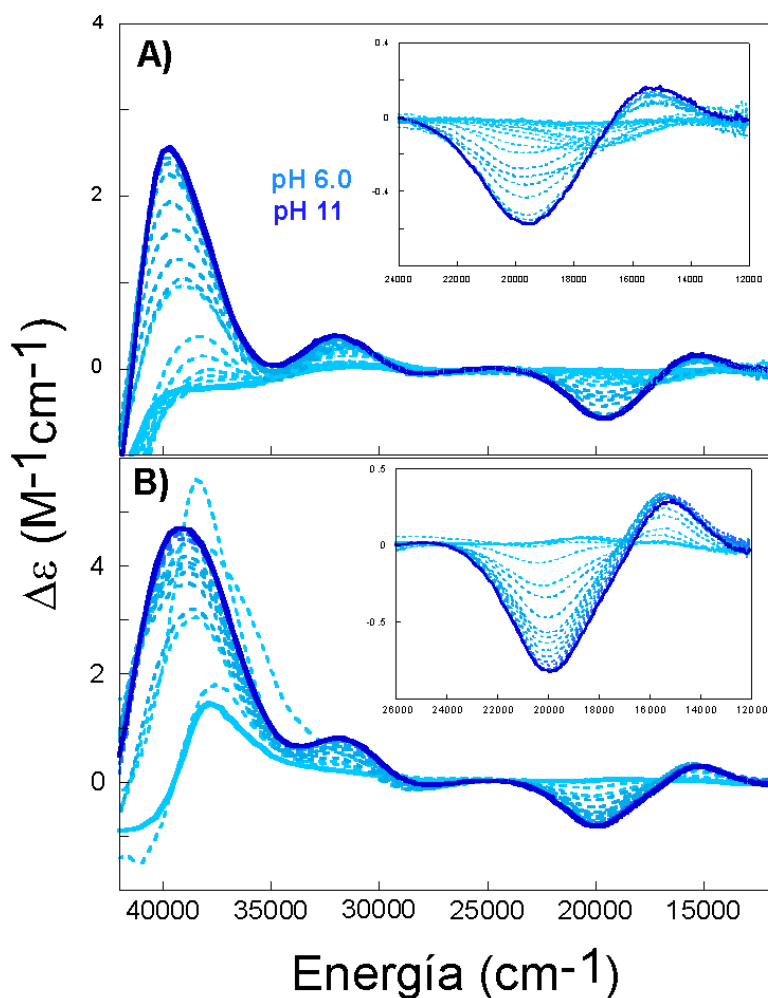


Figura 3.7. Barrido de pH de A β (1-16) con: 0.7 equivalentes de Cu $^{2+}$ (A) y 2.0 equivalentes de Cu $^{2+}$ (B) en NEM 100 mM – NaCl 100 mM, seguida por CD. El barrido se hizo aproximadamente cada 0.25 unidades de pH, desde pH 6.0 (azul claro) hasta pH 11 (azul oscuro).

A baja concentración de Cu $^{2+}$ (0.7 equivalentes) y a valores de pH entre 6 y 8.2, se observa una banda a aproximadamente 17300 cm $^{-1}$ de muy baja intensidad (578 nm, $\Delta\epsilon = -0.181 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, d-d), pero conforme se aumenta el pH (≤ 8.5), esta señal negativa desaparece y a su vez, aparece un segundo juego de señales de una intensidad significativamente mayor, con bandas a 15500 cm $^{-1}$ (645 nm, $\Delta\epsilon = 0.153 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y 20000 cm $^{-1}$ (500 nm, $\Delta\epsilon = -0.582 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) correspondientes a transiciones tipo *d-d*. Mientras que a mayor energía aparece una banda LMCT a $\sim 39000 \text{ cm}^{-1}$ (263 nm, $\Delta\epsilon = 2.57 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y otra a 32000 cm $^{-1}$ (312 nm, $\Delta\epsilon = 0.37 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$); ésta última se encuentra en el rango de energía asociado a transiciones LMCT de amidas desprotonadas a cobre. Por tanto, la

segunda especie que aparece a valores de pH altos debe involucrar la participación de N^- desprotonadas de la cadena peptídica. De hecho, las señales características de esta especie corresponden a aquellas observadas para el *modo II*. (Tabla 3.3).

Tabla 3.3. Transiciones electrónicas identificadas por CD en el barrido de pH de $A\beta(1-16)-Cu^{2+}$ [1:0.7]

Asignación de banda	<i>Modo I</i> $A\beta(1-16)-Cu^{2+}$ (pH 6.0-8.2)		<i>Modo II</i> $A\beta(1-16)-Cu^{2+}$ (pH 8.5-11)	
	Energía ^a	$\Delta\epsilon^b$	Energía ^a	$\Delta\epsilon^b$
d→d	17300 (578)	-0.18	15500 (645)	+0.15
d→d	-	-	20000 (500)	-0.58
$N_{Im} \pi_1 \rightarrow Cu$	31543 (317)	+0.24	28500 (350)	-0.20
$N^-_{amida} \rightarrow Cu$	-	-	32208 (310)	+0.37
$N_{Im} \pi_2 \rightarrow Cu$	36722 (272) ^h	-0.05	37680 (265) ^h	+1.3
$NH_2_{amino} \rightarrow Cu$	41270 (242)	-0.33	39787 (251)	2.54

^a La energía de las transiciones está reportada en cm^{-1} , y los valores entre paréntesis corresponden a la longitud de onda (en nm). ^b La intensidad de CD ($\Delta\epsilon$) es reportada en $M^{-1}cm^{-1}$. h = hombro.

Con el fin de caracterizar con mayor detalle el equilibrio de estas especies asociado a los cambios en las señales observadas por CD en función del pH para el complejo $A\beta(1-16)$ con 0.7 equivalentes de Cu^{2+} , se graficó la intensidad ($\Delta\epsilon$) de las transiciones electrónicas que aparecen a 17300, 20000, 31446 y 37878 cm^{-1} , en función de un rango de pH de 6 a 11 (Figura 3.8). A partir de estos datos, se determinó el valor de pKa asociado a los cambios observados en cada energía, mediante el ajuste de los datos a la ecuación 3.1:

$$\Delta\epsilon_{obs} = \frac{\Delta\epsilon_{bajo\ pH}[H^+] + \Delta\epsilon_{alto\ pH}Ka}{Ka + [H^+]}$$

Donde:

$\Delta\varepsilon_{obs}$ es la intensidad de la señal de CD observada a cualquier pH, K_a es la constante de equilibrio asociada al equilibrio de protonación del complejo Cu^{2+} -péptido, $\Delta\varepsilon_{bajopH}$ es la intensidad de la señal de CD asociada a la forma protonada del complejo y $\Delta\varepsilon_{altopH}$ es la intensidad de la señal de CD asociada a su forma desprotonada (ver Anexo 2 para la deducción de la ecuación 3.1).

Con los datos obtenidos, se identificaron tres valores de pKa: 7.1, 7.78 y 8.8-9.2 (Figura 3.8). El pKa ~ 7.1 corresponde a la aparición de la señal de 17300 cm^{-1} , mientras a valores de pH más bajos no se observa ninguna señal de CD. Esto implica que el pKa de 7.1 puede estar asociado a la unión del péptido libre a Cu^{2+} y la formación del complejo $\text{A}\beta(1-16)\text{-Cu}^{2+}$. Este complejo inicial sólo presenta la señal de campo ligante a 17300 cm^{-1} y una LMCT at 31900 cm^{-1} , señales que corresponden al modo de coordinación *I* descrito anteriormente. Por otro lado, el pKa de 7.78 asociado a la desprotonación del complejo $\text{A}\beta(1-16)\text{-Cu}^{2+}$ inicial, se logra apreciar con el crecimiento de la señal a 31446 cm^{-1} , característica de la participación de N^- de la cadena peptídica en la esfera de coordinación del metal. Las señales asociadas a esta especie corresponden a aquellas observadas para el *modo II* (comparar Tabla 3.1 con Tabla 3.3). Por tanto, es posible asignar el pKa de 7.78 a la conversión del *modo I* al *modo II*. Por último, una segunda desprotonación es detectada en las transiciones que crecen a 37878 y 20000 cm^{-1} con un pKa de 8.8-9.2. Sin embargo, este último pKa no es relevante bajo condiciones fisiológicas.

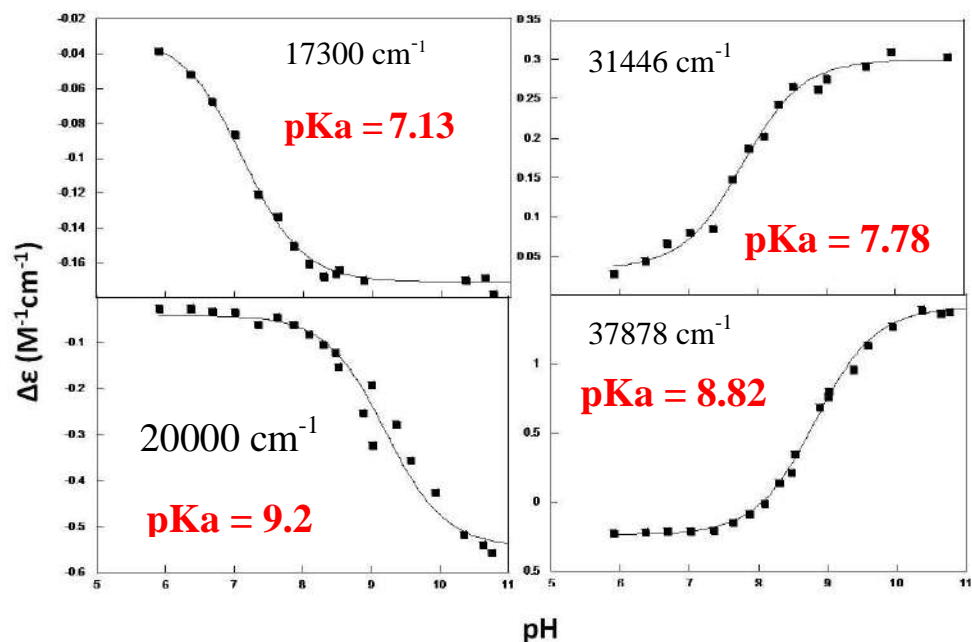


Figura 3.8. Determinación de valores de pKa del complejo A β (1-16)-Cu $^{2+}$ formado cuando 0.7 equivalentes de Cu $^{2+}$ son añadidos a 1.0 equivalente de péptido.

El espectro de CD del péptido con 2.0 equivalentes de Cu $^{2+}$ muestra también dependencia del pH (Figura 3.7, B). A valores de pH bajos, la intensidad de las transiciones del tipo d-d es muy baja, sin embargo, al aumentar el pH los espectros cambian drásticamente debido al crecimiento de dos bandas: una positiva a aproximadamente 15400 cm $^{-1}$ (649 nm, $\Delta\epsilon = 0.326 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y otra negativa alrededor de los 20000 cm $^{-1}$ (500 nm, $\Delta\epsilon = -0.826 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), asignadas como transiciones d-d. Estas transiciones corresponden a las señales asociadas al modo de coordinación II, como se describió anteriormente. Por otro lado, se observa que a mayores energías se hacen evidentes dos bandas positivas a 31300 y 39000 cm $^{-1}$, las cuales ganan intensidad a valores de pH entre 7 y 10. Estas transiciones se asocian a la unión de amidas desprotonadas y al grupo NH $_2$ -terminal respectivamente al ión metálico. Cabe destacar que en un rango de pH entre 10 y 11, la intensidad de las bandas no cambia significativamente (Tabla 3.4).

Tabla 3.4. Transiciones electrónicas identificadas por CD en el barrido de pH de $A\beta(1-16)-Cu^{2+}$ [1:2.0]

Asignación de banda	<i>Modo I</i> $A\beta(1-16)-Cu^{2+}$ (pH 6.0-8.2)		<i>Modo II</i> $A\beta(1-16)-Cu^{2+}$ (pH 8.5-11)	
	Energía ^a	$\Delta\varepsilon^b$	Energía ^a	$\Delta\varepsilon^b$
d→d	15500 (645)	+0.24	15277 (654)	+0.31
d→d	20370 (490)	-0.11	20000 (500)	-0.82
$N_{Im} \pi_1 \rightarrow Cu$	28582 (349)	-0.137	28300 (353)	-0.03
$N_{amida}^- \rightarrow Cu$	31689 (315)	+0.43	32037 (312)	+0.81
$N_{Im} \pi_2 \rightarrow Cu$	38976 (256)	3.11	37680 (265) ^h	+1.3
$NH_2 \text{ amino} \rightarrow Cu$	41938 (242) ^h	-1.03	39397 (254)	4.66

^a La energía de las transiciones está reportada en cm^{-1} , y los valores entre paréntesis corresponden a la longitud de onda (en nm). ^b La intensidad de CD ($\Delta\varepsilon$) es reportada en $M^{-1}cm^{-1}$. h = hombro.

Cabe destacar que a bajos valores de pH desaparece la banda de 17300 cm^{-1} que aparecía en el barrido de pH con 0.7 equivalentes de Cu^{2+} . Además, se puede observar que la intensidad de las bandas para el *modo II* es mayor. Por lo tanto, se puede deducir que se encuentra en mayor proporción el segundo modo de coordinación.

En la Figura 3.9, se presentan los cambios en intensidad de las señales de CD a 20000 cm^{-1} y 31847 cm^{-1} , a partir de los cuales se identifican dos valores de pKa (7.8 y 9.4), al ajustar los datos a la siguiente ecuación (ecuación 3.2):

$$\Delta\varepsilon_{obs} = \frac{\Delta\varepsilon_1 2[H^+] + \Delta\varepsilon_2 Ka_1 [H^+] + \Delta\varepsilon_3 Ka_1 Ka_2}{2[H^+] + Ka_1 [H^+] + Ka_1 Ka_2}$$

Donde:

$\Delta\varepsilon_{obs}$ es la intensidad de la señal de CD observada a cualquier pH, Ka_1 y Ka_2 son las constantes de equilibrio asociadas a los dos estados de protonación del complejo péptido- Cu^{2+} y $\Delta\varepsilon_1$, $\Delta\varepsilon_2$ y $\Delta\varepsilon_3$ son las intensidades de las señales de CD de las tres diferentes especies con diferentes estados de protonación (ver Anexo 2 para la deducción de la ecuación 3.2).

El pKa de 7.78 es asignado a la transición del *modo I* al *modo II*, mientras que el de 9.4 está implicado en la subsecuente desprotonación del *modo II* para dar lugar a una especie con mayor número de amidas desprotonadas, la cual ya no sería relevante a valores de pH fisiológico.

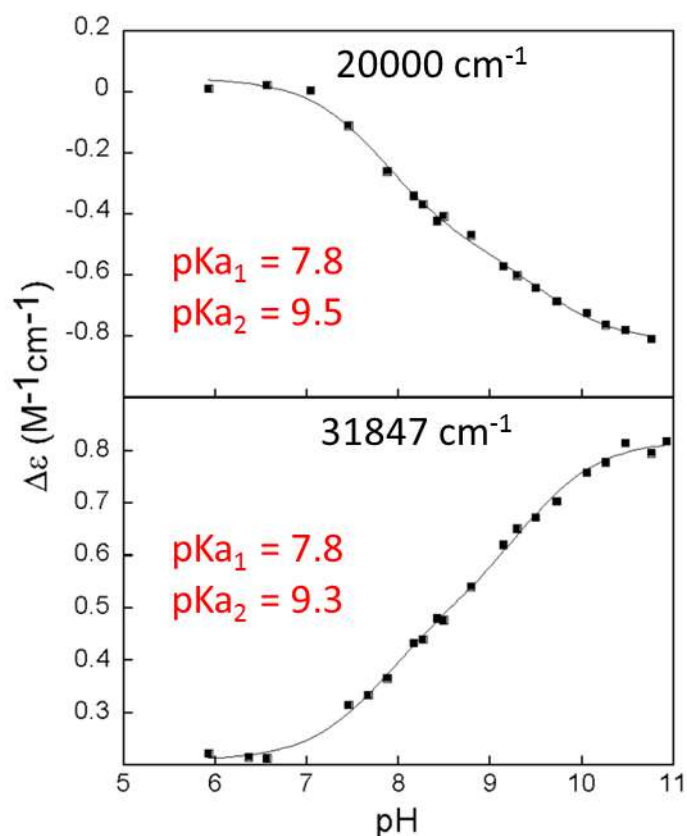


Figura 3.9. Determinación de pKa para el complejo $A\beta(1-16)-Cu^{2+}$ formado cuando 2.0 equivalentes de Cu^{2+} son añadidos a 1.0 equivalente de péptido.

Basándonos en las evidencias espectroscópicas, se puede concluir que ambos modos de coordinación se encuentran en equilibrio en un amplio rango de pH, sin embargo, a pH alto (mayor a 8.5) está implicada por lo menos una amida desprotonada de la cadena peptídica. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Alies y colaboradores,⁹⁶ quienes encontraron un $pK_a = 7.78$, asignado a la conversión del *modo I* al *modo II*.

3.5. Evaluación del efecto del pH en los modos de coordinación de A β (1-16) con Cu²⁺ por resonancia paramagnética electrónica

El efecto del pH en el complejo A β (1-16) con cobre fue evaluado por resonancia paramagnética electrónica a una relación de Cu:péptido de 0.4:1 (Figura 3.10). En estas condiciones, a pH 6.7 se observa un solo juego de señales con valores de $A_{||}$ y $g_{||}$ que corresponden a los asociados al *modo I* (Tabla 3.2). A partir de pH 7.5, se observa que están presentes dos modos de coordinación, los cuales persisten hasta pH 9. Sin embargo la proporción de dichos modos va cambiando en función del pH. En la Tabla 3.5 se muestran los valores de $A_{||}$ y $g_{||}$ de ambos modos de coordinación, así como la proporción aproximada de cada una de las especies. Los valores iniciales de la especie de mayor afinidad del complejo A β (1-16) con 0.4 equivalentes de Cu²⁺ a pH 7.5 son: $A_{||} = 170$ G, $g_{||} = 2.270$, mientras que a valores de pH mayores, la especie *II* con valores $A_{||} = 150$ G y $g_{||} = 2.242$ se hace más abundante.

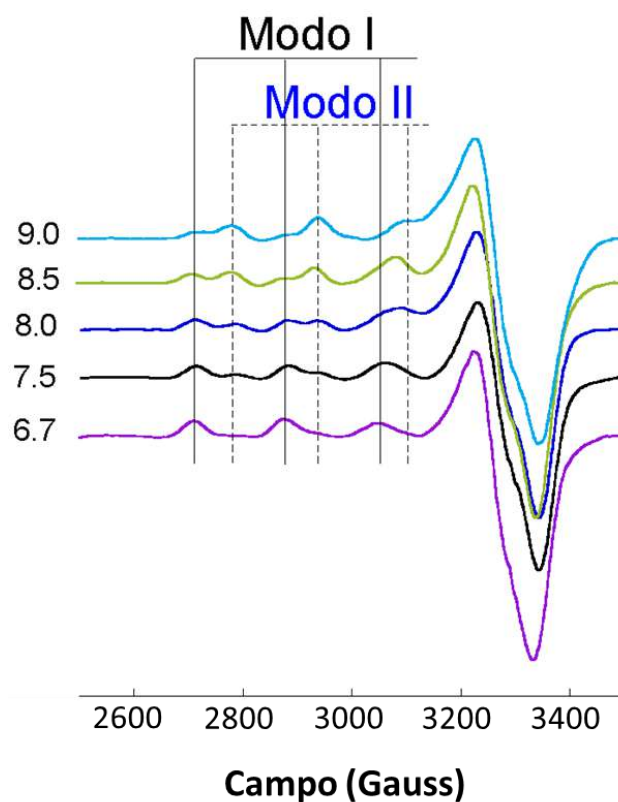


Figura 3.10. Barrido de pH de A β (1-16) con 0.4 eq de Cu²⁺ en NEM 100 mM – NaCl 100 mM, Glicerol (50:50), seguida por EPR. Modo I (líneas continuas), modo II (líneas punteadas).

Tabla 3.5. Parámetros de EPR de los complejos A β (1-16)-Cu²⁺ con 0.4 equivalentes de Cu²⁺ en función del pH

pH	% de especies I : II	Modo I		Modo II	
		A (Gauss)	g	A (Gauss)	g
6.7	100	170	2.270	-	-
7.5	70 : 30	170	2.2703	150	2.242
8.0	60 : 40	170	2.2691	151	2.2316
8.5	40 : 60	161	2.2772	152	2.2336
9.0	30 : 70	166	2.2756	158	2.2299

De manera consistente con los resultados obtenidos por CD, los espectros de EPR indican la presencia de dos modos de coordinación tipo 3N1O que están en equilibrio, y cuya abundancia relativa depende del pH. El hecho de que a pH 8.0, se observe una proporción aproximada de 1:1 de ambos modos de coordinación, es consistente con el valor de pKa del complejo (7.78), determinado por CD. En el siguiente esquema se representa el equilibrio de los dos complejos asociados a este pKa. Figura 3.11

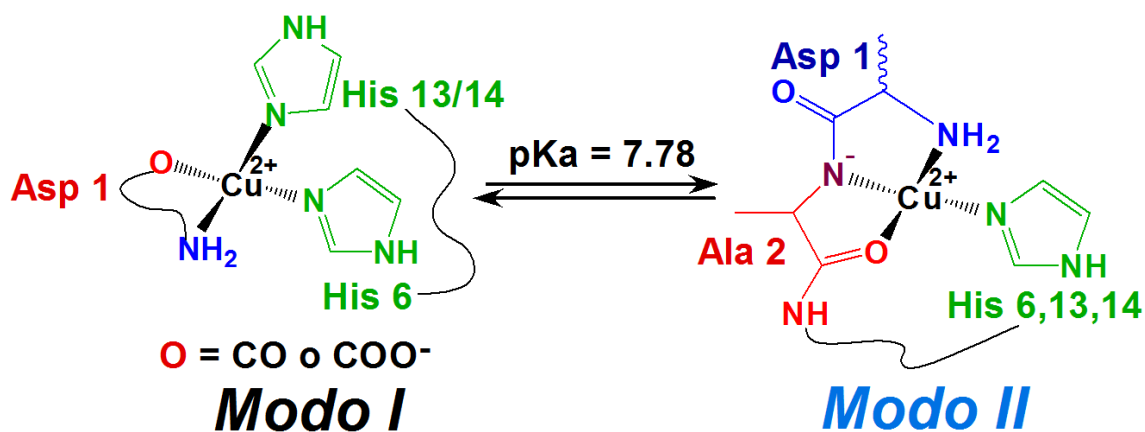


Figura 3.11. Esfera de coordinación del centro metálico en los *modos I* y *II* encontrados en el complejo A β (1-16)-Cu²⁺.

3.6 Estudio de la unión de Cu²⁺ al péptido Ac-Aβ(1-16) por absorción y dicroísmo circular en la región UV-visible

Debido a la controversia que se ha encontrado en la literatura, respecto al papel que juega el grupo NH₂-terminal en la coordinación a Cu²⁺, se acetiló el péptido β-amiloide 1-16 para poder evaluar la participación del grupo NH₂ en la esfera de coordinación alrededor del centro metálico. La titulación del péptido acetilado (denominado en el texto como Ac-Aβ(1-16)) se realizó hasta dos equivalentes de Cu²⁺, y fue seguida simultáneamente por absorción y CD en la región UV-Visible (Figura 3.12). El espectro de absorción (Figura 3.12, superior) muestra claramente que la adición de Cu²⁺ ocasiona el crecimiento de una señal muy intensa a aproximadamente 40000 cm⁻¹ (250 nm, ε = 7100 M⁻¹cm⁻¹), mientras que en la región de menor energía se observan unas bandas de menor intensidad alrededor de 16900 cm⁻¹ (625 nm, ε = 170 M⁻¹cm⁻¹). Debido a que las señales son anchas en el espectro de absorción UV-Vis, la definición de las transiciones electrónicas es difícil. Sin embargo, en los espectros de CD (Figura 3.12, inferior) se puede observar el crecimiento de señales diferentes dependiendo de la cantidad de Cu²⁺ añadida a la solución del péptido.

En los espectros de CD, se observa que a bajas concentraciones de Cu²⁺ (0.2 a 0.8 equivalente de Cu²⁺) aparece una señal positiva a baja energía, alrededor de 16970 cm⁻¹ (589 nm, Δε = 0.194 M⁻¹cm⁻¹), la cual es muy ancha y es asignada a una transición *d-d*. Por otro lado, a mayores energías, se observa una banda que tiene lugar a 27500 cm⁻¹ (363 nm, Δε = -0.262 M⁻¹cm⁻¹), la cual empieza a ganar intensidad a partir de 0.6 eq Cu²⁺. Adicionalmente, se observa otra señal a 37770 cm⁻¹ (264 nm, Δε = 0.843 M⁻¹cm⁻¹) con un pequeño hombro a 34004 cm⁻¹ (294 nm, Δε = 0.475 M⁻¹cm⁻¹) de muy baja intensidad. Finalmente, también se observa una banda a 41700 cm⁻¹ (240 nm, Δε = 1.281 M⁻¹cm⁻¹). Estas transiciones electrónicas son asignadas a bandas del tipo LMCT. En contraste, a mayores equivalentes de Cu²⁺ (1.0 a 2.0), observamos que la banda *d-d* asignada a bajos equivalentes de Cu²⁺, se desplaza ligeramente a mayor energía 18390 cm⁻¹ (543 nm, Δε = 0.543 M⁻¹cm⁻¹) y adicionalmente, se observa un pequeño hombro a 15300 cm⁻¹ (654 nm, Δε = 0.240 M⁻¹cm⁻¹). Por su parte, a mayores energías, se observa que la banda negativa que aparece a 28527 cm⁻¹ (350 nm, Δε = -0.266 M⁻¹cm⁻¹) gana intensidad al igual que el hombro a 34472 cm⁻¹ (290 nm, Δε = 1.135 M⁻¹cm⁻¹) y las bandas observadas a 37638 cm⁻¹

(266 nm, $\Delta\epsilon = 2.81 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y 41650 cm^{-1} (240nm, $\Delta\epsilon = 2.339 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) respectivamente. Nuevamente, estas bandas son asignadas como transiciones electrónicas LMCT. Figura 3.12.

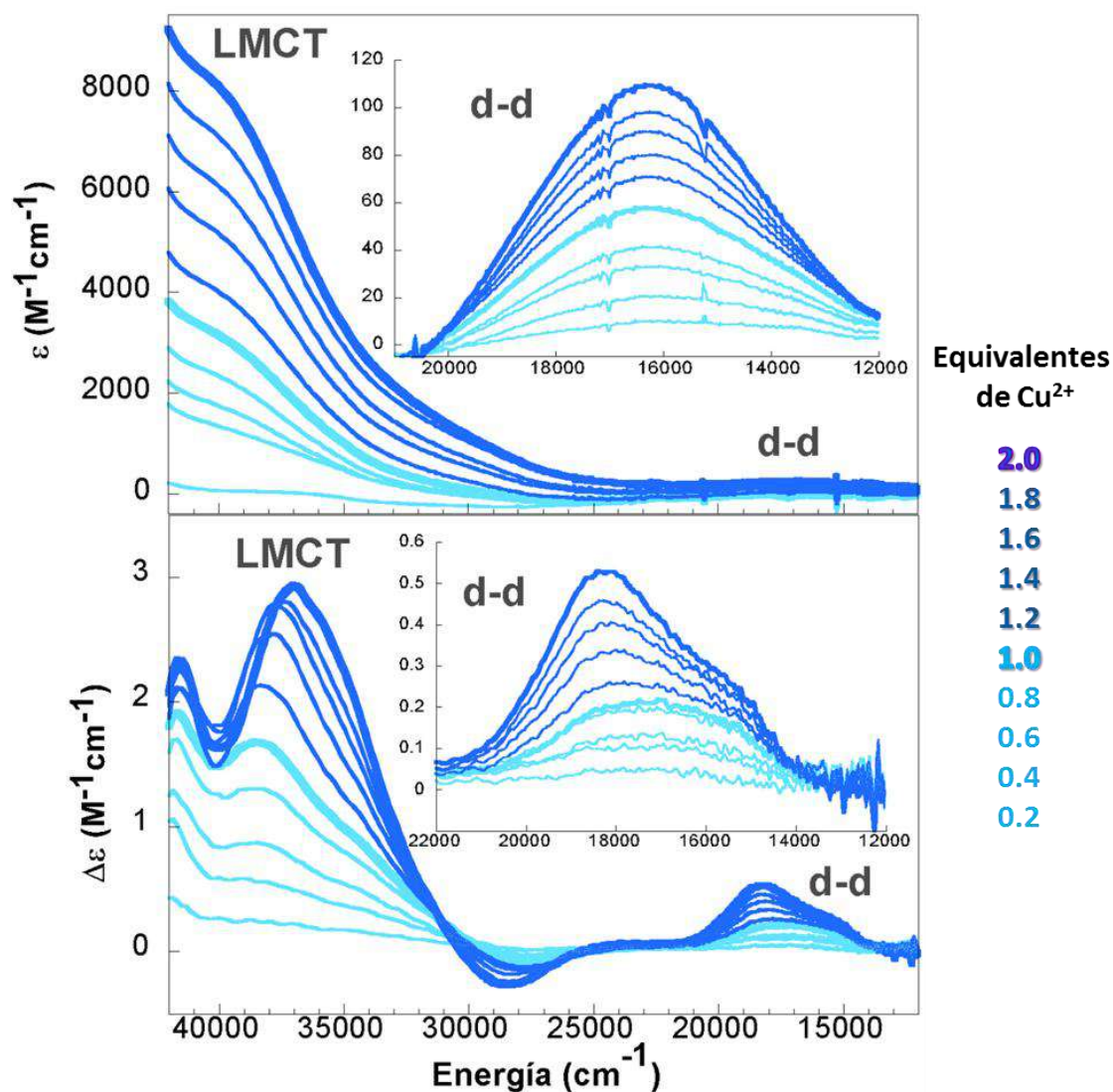


Figura 3.12. Titulación de Ac-A β (1-16) hasta 2.0 equivalentes de Cu $^{2+}$ en NEM 100 mM + NaCl 100 mM, seguida cada 0.2 equivalentes de Cu $^{2+}$ por absorción en la región UV-Vis (superior) y CD (inferior) a pH 7.5. Los espectros corresponden a la adición de diferentes equivalentes de Cu $^{2+}$: de 0.2 a 1.0 equivalentes (color azul cielo) y de 1.2 a 2.0 equivalentes de Cu $^{2+}$ (color azul oscuro).

Con los espectros obtenidos, se puede deducir que existen dos juegos de señales que son dependientes de la concentración de Cu^{2+} , y corresponden a dos modos de coordinación distintos. En el intervalo de 0.2 a 0.6 equivalentes de Cu, predominan las señales del *modo I*, mientras que a partir de los 0.8 equivalentes empieza a ser más evidente la formación del *modo II*. En la Tabla 3.6 se resumen las transiciones electrónicas correspondientes para cada modo de coordinación. Cabe señalar que las formas de los espectros de estas especies son muy diferentes, en comparación a los *modos I* y *II* observados con el péptido no acetilado, como se muestra en la figura 3.13, por lo tanto, son denominados como *I'* y *II'*. Esto se debe a que el efecto Cotton para varias de las transiciones electrónicas cambia al acetilar el péptido (comparar Tabla 3.1 y 3.6). Sin embargo, en ambos casos es posible identificar una transición LMCT del grupo NH_2 -terminal al Cu^{2+} (Tabla 3.6).

Tabla 3.6. Transiciones electrónicas identificadas por CD en la titulación de Ac-A β (1-16) con 2.0 equivalentes de Cu^{2+} a pH 7.5.

Asignación de banda	<i>Modo I'</i> Ac-A β (1-16) con 0.6 eq. Cu^{2+}		<i>Modo II'</i> Ac-A β (1-16) con 2.0 eq. Cu^{2+}	
	Energía ^a	$\Delta\epsilon^b$	Energía ^a	$\Delta\epsilon^b$
d→d	16970 (589)	+0.19	15300 (654) ^h	+0.24
d→d	—	—	18390 (543)	+0.54
$\text{N}_{\text{Im}} \pi_1 \rightarrow \text{Cu}$	27500 (363)	-0.26	28527 (350)	-0.26
$\text{N}_{\text{amida}}^- \rightarrow \text{Cu}$	34004 (294)	+0.47	34472 (290)	+1.13
$\text{N}_{\text{Im}} \pi_2 \rightarrow \text{Cu}$	37770 (264)	+0.84	37638 (266)	+2.81
$\text{NH}_2 \text{ amino} \rightarrow \text{Cu}$	41700 (240)	+1.281	41650 (240)	+2.33

^a La energía de las transiciones está reportada en cm^{-1} , y los valores entre paréntesis corresponden a la longitud de onda (en nm). ^b La intensidad de CD ($\Delta\epsilon$) es reportada en $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. h = hombro.

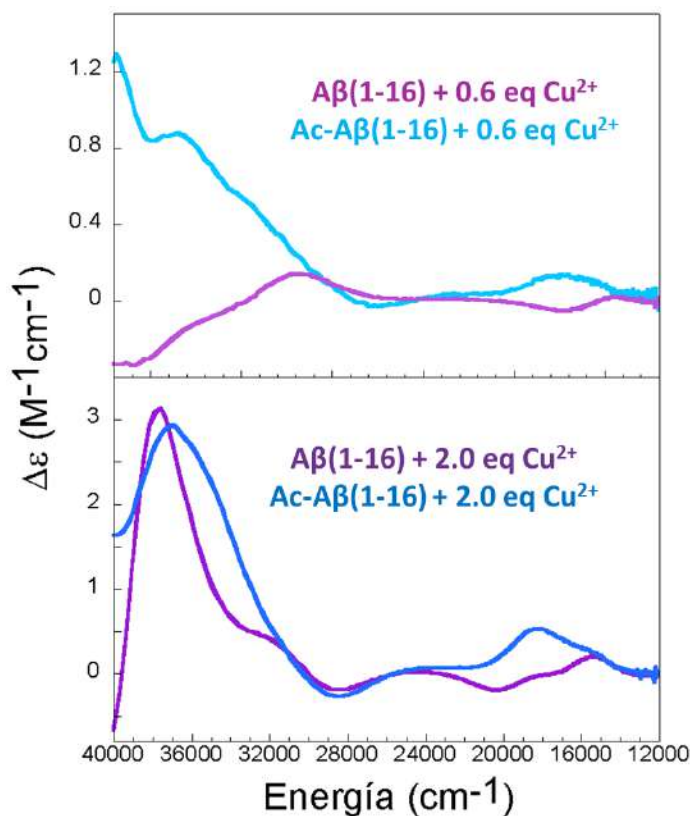


Figura 3.13. Comparación de los espectros de CD de los complejos $A\beta(1-16)-Cu^{2+}$ y $Ac-A\beta(1-16)-Cu^{2+}$ con 0.6 y 2.0 equivalentes de Cu^{2+} en NEM 100 mM + NaCl 100 mM a pH 7.5.

En resumen, los datos de CD indican que la acetilación del grupo N-terminal no impide la coordinación del Cu^{2+} , y de hecho, se forman complejos con transiciones electrónicas muy similares a las del complejo no acetilado. El principal efecto de la acetilación del péptido se ve reflejado en el efecto Cotton de las transiciones d-d. Además, los espectros de CD reflejan la presencia de una banda LMCT del grupo amino-terminal al Cu^{2+} , confirmando la participación de este grupo en la unión al metal.

3.7 Estudio de la unión de Cu^{2+} al péptido $Ac-A\beta(1-16)$ por resonancia paramagnética electrónica

De la misma manera que se hizo con el péptido análogo $A\beta(1-16)$, se llevó a cabo la titulación del péptido $Ac-A\beta(1-16)$ hasta 2.0 equivalentes de Cu^{2+} y fue seguida por EPR. Se observa que con la adición de 0.4 equivalentes de Cu^{2+} al péptido

Ac-A β (1-16), aparecen dos conjuntos de señales, como se muestra en la Figura 3.14. El juego de señales más intensas corresponden a un valor g_{\parallel} de 2.27 y un acoplamiento hiperfino (A_{\parallel}) con Cu de 173 G, mientras que el segundo conjunto de señales presentan un valor g de 2.24 y un acoplamiento hiperfino con Cu de 155 G. Estas señales cambian de intensidad en función de la concentración de Cu^{2+} . Se puede observar un comportamiento similar al péptido no acetilado para ambos juegos de señales, es decir, a 0.4 equivalentes de Cu^{2+} (Figura 3.14, espectro negro), la especie predominante es la de mayor acoplamiento hiperfino. Sin embargo, al aumentar a 0.8 equivalentes de Cu^{2+} la intensidad relativa de la segunda especie aumenta, observándose casi la misma proporción de ambas especies. A partir de 1.2 equivalentes de Cu^{2+} en adelante, la intensidad para la segunda especie aumenta, lo que sugiere que a mayor número de equivalentes de la sal metálica predomina la especie con menor acoplamiento hiperfino. Por lo tanto, por EPR, se puede determinar la presencia de dos modos de coordinación que varían en función de la concentración de Cu^{2+} , de igual modo que en el fragmento sin acetilar. Figura 3.14.

En la Tabla 3.7 se presentan los parámetros determinados por EPR para ambos modos de coordinación. Nuevamente, de acuerdo a estos valores y con base en las gráficas de correlación mencionadas en la sección 3.2, se asignó la esfera de coordinación ecuatorial de cada componente. En ambos casos, los ligantes enlazados al ión metálico corresponden a tres nitrógenos y un oxígeno (3N1O), mientras que los datos de CD evidencian la participación del grupo NH_2 -terminal e His. Por otro lado, para el modo de coordinación II' , los datos de CD indican la participación de al menos una amida desprotonada de la cadena peptídica (N^-). Adicionalmente, es posible observar por EPR que los parámetros de g_{\parallel} y A_{\parallel} tanto para el complejo $\text{A}\beta(1-16)\text{-Cu}^{2+}$ como para $\text{Ac-A}\beta(1-16)\text{Cu}^{2+}$ son muy parecidos para ambos modos de coordinación en cada péptido.

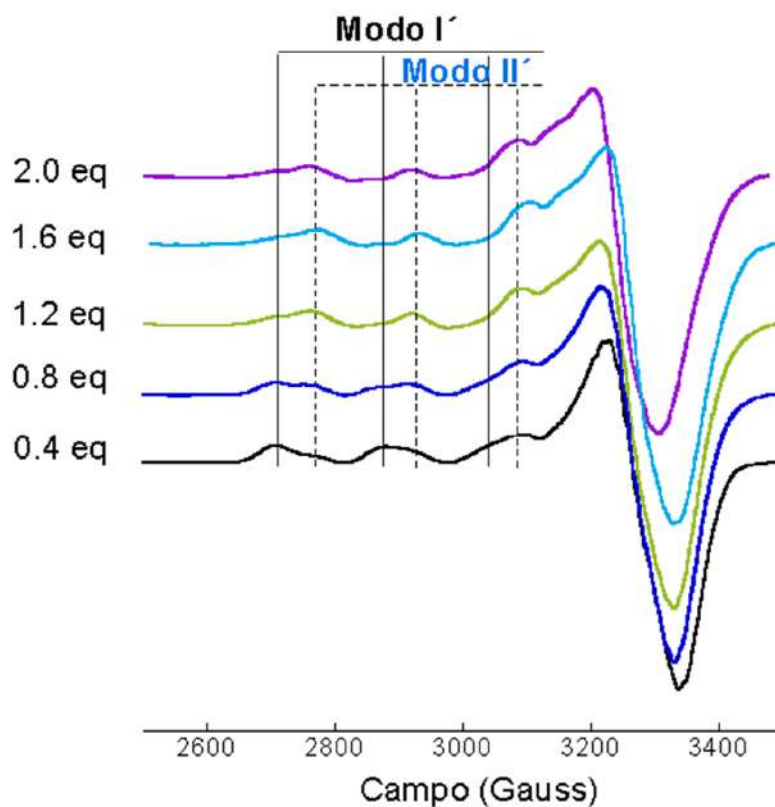


Figura 3.14. Titulación de Ac-A β (1-16) hasta 2.0 equivalentes de Cu²⁺ en NEM 100 mM – NaCl 100 mM, Glicerol (50:50), seguida por EPR a pH 7.5. *Modo I'* líneas continuas. *Modo II'* líneas punteadas.

Tabla 3.7. Parámetros determinados del complejo Ac-A β (1-16) con 2.0 equivalentes de Cu²⁺ por EPR.

Modo	A (Gauss)	g	A (x10 ⁻⁴ cm ⁻¹)	Modo de coordinación
I'	173	2.27	183	3N1O
II'	155	2.24	162	3N1O

En conclusión, los cambios observados en el efecto Cotton de los espectros de CD respecto a los espectros de su análogo no acetilado (Figura 3.1) permiten concluir que el grupo NH₂-terminal forma parte de la esfera de coordinación de los complejos A β (1-16)-Cu²⁺. En conjunto, las energías de las transiciones electrónicas observadas por CD y los

parámetros de EPR de los complejos indican que, contrario a lo propuesto por Faller et al.⁹⁶ la acetilación del grupo NH₂-terminal no impide la unión del metal al péptido.

3.8. Evaluación del efecto del pH en los modos de coordinación del complejo Ac-Aβ(1-16)-Cu²⁺ por dicroísmo circular

A continuación se evaluó el efecto del pH en la coordinación del Cu²⁺ al péptido acetilado. Para ello, se agregaron 0.7 (Figura 3.15, A) y 2.0 (Figura 3.15, B) equivalentes de Cu²⁺ al complejo Ac-Aβ(1-16)-Cu²⁺, haciéndose un barrido desde pH 6 hasta pH 11. En ambos casos, se observan cambios muy similares en los espectros de CD en función del pH. Sin embargo, la intensidad de las señales fue menor. A valores de pH bajos, se observan las siguientes señales: una banda ancha positiva alrededor de 17000 cm⁻¹, y una transición electrónica positiva poco intensa a 28000 cm⁻¹ (357 nm, Δε = -0.166 M⁻¹cm⁻¹). Estas señales corresponden a las observadas en las titulaciones del péptido Ac-Aβ(1-16) con cobre en la sección anterior, y se asocian al modo de coordinación I'. Al aumentar el pH, entre 8.2 y 11, se observa la desaparición de la transición electrónica positiva detectada a 17000 cm⁻¹, mientras que aparece una señal positiva muy intensa a 15500 cm⁻¹ (645 nm, Δε = 0.625 M⁻¹cm⁻¹) y otra negativa aún más intensa a 20000 cm⁻¹ (500 nm, Δε = -0.956 M⁻¹cm⁻¹). De igual manera, a mayores energías, crecen las señales a 28203 cm⁻¹ (354 nm, Δε = -0.383 M⁻¹cm⁻¹) y 31416 cm⁻¹ (318 nm, Δε = 0.656 M⁻¹cm⁻¹). Estas señales son similares a las observadas para el *modo II* del complejo Aβ(1-16)-Cu²⁺.

Cabe recordar que las transiciones electrónicas que ocurren a bajas energías (~15000 cm⁻¹ – 20500 cm⁻¹) son asignadas como transiciones *d-d*. Mientras que las de mayor energía (~28000 cm⁻¹ – 3200 cm⁻¹) como LMCT. Las bandas que aparecen alrededor de los 28000 cm⁻¹ son asignadas a la interacción de His con Cu²⁺ (N_{π1}→Cu²⁺). Por otro lado, la presencia de bandas a ~31000 cm⁻¹ indican la unión de N⁻ a Cu²⁺. (Figura 3.15) En la Tabla 3.8 se resumen las diferentes transiciones electrónicas para cada modo de coordinación.

Para caracterizar el equilibrio de las especies presentes, se siguieron los cambios observados en la señal a 20000 cm^{-1} de los espectros de CD en función del pH, tal como se hizo con el péptido A β (1-16) con 0.7 equivalentes de Cu^{2+} y utilizando la ecuación 3.1. (Figura 3.16)

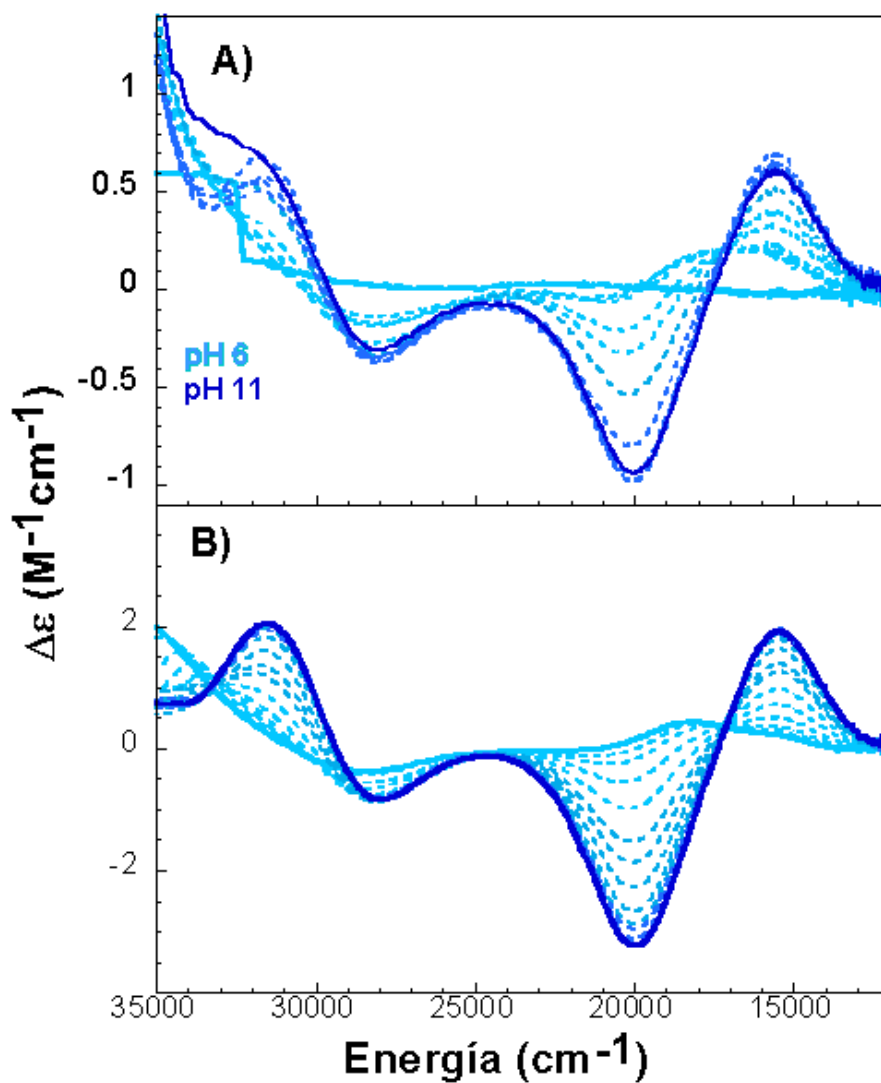


Figura 3.15. Barrido de pH de Ac-A β (1-16) con: 0.7 equivalentes de Cu^{2+} (A) y 2.0 equivalentes de Cu^{2+} (B) en NEM 100 mM – NaCl 100 mM, seguida por CD. El barrido se hizo aproximadamente cada 0.25 unidades de pH, desde pH 6.0 (azul claro) hasta pH 11 (azul oscuro).

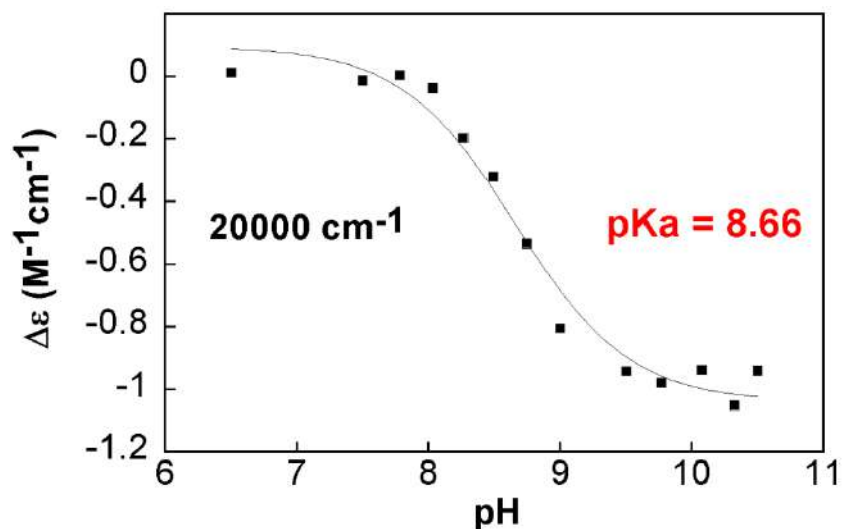


Figura 3.16. Determinación de pKa para el complejo Ac-Aβ(1-16)-Cu²⁺ formado cuando 0.7 equivalentes de Cu²⁺ son añadidos a 1.0 equivalente de péptido.

Tabla 3.8. Transiciones electrónicas identificadas por CD en el barrido de pH de Ac-Aβ(1-16)-Cu²⁺ [1:0.7]

Asignación de banda	<i>Modo I'</i> Ac-Aβ(1-16)-Cu ²⁺ (pH 6.0-8.2)		<i>Modo II'</i> Ac-Aβ(1-16)-Cu ²⁺ (pH 8.5-11)	
	Energía ^a	Δε ^b	Energía ^a	Δε ^b
d→d	17000 (588)	+0.20	15500 (645)	+0.625
d→d	—	—	20000 (500)	-0.956
N _{Im} π ₁ → Cu	28000 (357)	-0.166	28203 (354)	-0.383
N ⁻ _{amida} → Cu	—	—	31416 (318)	+0.65

^a La energía de las transiciones está reportada en cm⁻¹, y los valores entre paréntesis corresponden a la longitud de onda (en nm). ^b La intensidad de CD (Δε) es reportada en M⁻¹cm⁻¹.

Siguiendo el cambio de la intensidad de la transición a 20000 cm⁻¹, la cual cabe recordar es característica para el *modo II'*, se pudo determinar un pKa de 8.66 (Figura 3.16). Este valor de pKa puede asociarse a la transición del *modo I'* al *modo II'*, en la que participa una amida desprotonada en la esfera de coordinación del centro metálico.

Adicionalmente, se realizó el barrido de pH con 2 equivalentes de Cu^{2+} (Figura 3.15, B), donde a valores de pH bajos, la intensidad de la transición del tipo d-d es muy baja (línea azul claro continua), observándose como un pequeño hombro detectado alrededor de los 18300 cm^{-1} (546 nm, $\Delta\epsilon = 0.427 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Sin embargo, al aumentar el pH (8.2-11) en esta misma región, se observa el crecimiento de dos bandas: una positiva a aproximadamente 15500 cm^{-1} (645nm, $\Delta\epsilon = 1.9 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y otra negativa alrededor de los 20000 cm^{-1} (500 nm, $\Delta\epsilon = -3.25 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). En este mismo rango de pH pero a mayor energía, se observa una transición electrónica positiva poco intensa a 28185 cm^{-1} (354 nm, $\Delta\epsilon = -0.82 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y otra a 31436 cm^{-1} (318 nm, $\Delta\epsilon = 2.0 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Tabla 3.9. Transiciones electrónicas identificadas por CD en el barrido de pH de Ac-A β (1-16)-Cu $^{2+}$ [1:2]^c

Asignación de banda	<i>Modo I'</i> Ac-A β (1-16)-Cu $^{2+}$ (pH 6.0-8.2)		<i>Modo II'</i> Ac-A β (1-16)-Cu $^{2+}$ (pH 8.5-11)	
	Energía ^a	$\Delta\epsilon^b$	Energía ^a	$\Delta\epsilon^b$
d→d	18300 (546) ^h	+0.427	15500 (645)	+1.9
d→d	—	—	20000 (500)	-3.25
N _{Im} $\pi_1 \rightarrow \text{Cu}$	28000 (357)	-0.166	28185 (354)	-0.82
N ⁻ _{amida} $\rightarrow \text{Cu}$	—	—	31436 (318)	+2.0

^a La energía de las transiciones está reportada en cm^{-1} , y los valores entre paréntesis corresponden a la longitud de onda (en nm). ^b La intensidad de CD ($\Delta\epsilon$) es reportada en $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. h = hombro.

^c Es importante señalar que los espectros se recolectaron por debajo de los 40000 cm^{-1} debido a problemas de alto voltaje en el detector a mayores energías. Por tal motivo, no se pudieron observar transiciones a mayores energías, como la que se esperaría para la N_{im} $\pi_2 \rightarrow \text{Cu}$.

Para la determinación de los valores de pKa se utilizaron las ecuaciones 3.1 y 3.2, encontrándose diferentes valores en función de las siguientes transiciones electrónicas: a 15400 cm^{-1} se determinaron dos valores de pKa = 7.5 y 8.7, mientras que a 20000 cm^{-1} un pKa de 8.89. Por otro lado, a 28000 cm^{-1} los datos ajustaron para dos valores de pKa = 7.5 y 9.8, y finalmente a 31400 cm^{-1} 7.2 y 8.9 respectivamente. (Figura 3.17)

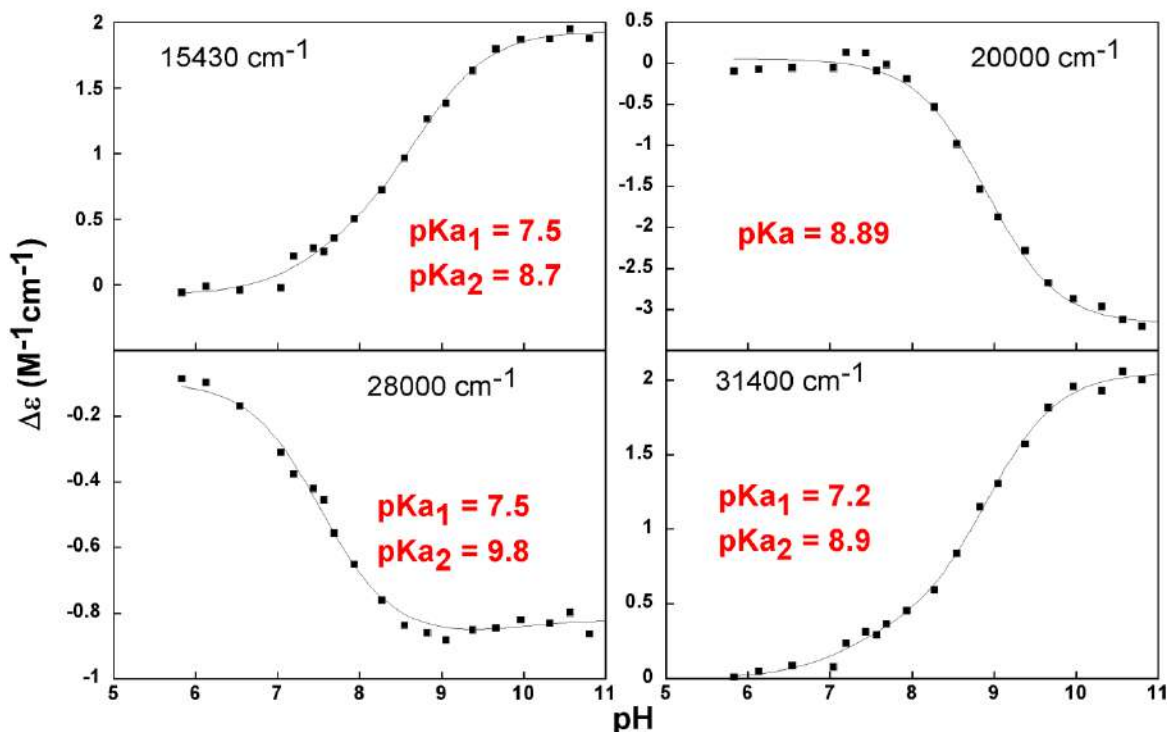


Figura 3.17. Determinación de pKa para el complejo Ac-A β (1-16)-Cu $^{2+}$ formado cuando 2.0 equivalentes de Cu $^{2+}$ son añadidos a 1.0 equivalente de péptido.

Con los datos obtenidos a las diferentes energías, se promediaron los respectivos valores de pKa, obteniendo principalmente tres valores de pKa: 7.5, 8.8 y 9.8. Donde el valor de 7.5 es asignado a la formación del complejo, es decir a la unión de Cu $^{2+}$ a Ac-A β (1-16), mientras que el pKa = 8.8, a la transición del *modo I'* al *modo II'*, con el cual se evidencia la participación de una amida desprotonada de la cadena peptídica en la esfera de coordinación del Cu $^{2+}$. Adicionalmente, el pKa = 9.8, se puede asociar a la formación de un tercer modo de coordinación, en el cual estarían involucradas dos N $^-$ de la cadena peptídica, es decir, representa la transición del *modo II'* a *III'*. Sin embargo, este complejo no sería relevante bajo condiciones fisiológicas.

Es importante notar que el seguimiento de la señal a 20000 cm^{-1} es relevante, ya que es indicativa de la transición de los primeros dos modos de coordinación (*I'* \rightarrow *II'*), tal como se observó en la formación del *modo II* del complejo análogo A β (1-16)-Cu $^{2+}$, cuyo pKa es

7.8. Por lo tanto, podemos concluir que en el complejo acetilado, se incrementa una unidad el pKa para la transición del *modo I'* a *modo II'*. De igual manera, el seguimiento de la transición electrónica que aparece a los 31400 cm⁻¹ aproximadamente, (asignada previamente como la unión de N⁻ a Cu²⁺) arroja un pKa igual a 8.9, por lo tanto, se corrobora la atribución de la transición de *I'* a *II'*. (Figura 3.18)

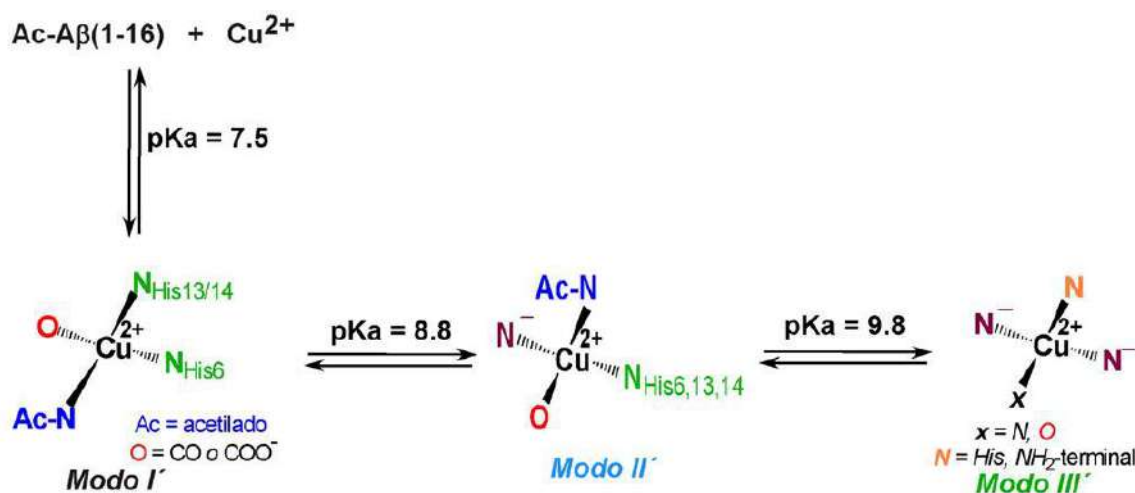


Figura 3.18. Formación de los complejos Ac-Aβ(1-16)-Cu²⁺. El pKa de 7.5 se asocia a la formación del complejo. La transición del modo I' a II' presenta un pKa = 8.8, donde queda evidenciada la unión de N⁻ de la cadena peptídica al Cu²⁺ y el pKa = 9.8 está asociado a la formación de un tercer modo de coordinación, el cual se origina de una subsecuente desprotonación del *modo II'*.

3.9. Evaluación del efecto del pH en los modos de coordinación del complejo Ac-Aβ(1-16)-Cu²⁺ por resonancia paramagnética electrónica

El efecto del pH en el complejo Ac-Aβ(1-16)-Cu²⁺ fue evaluado por EPR en una relación de péptido:Cu de 1:0.4 (Figura 3.18). A pH 7.5, se observa ligeramente la presencia de dos modos de coordinación, los cuales persisten hasta pH 9.5. No obstante, la proporción cambia al aumentar el pH. Por otro lado, a partir de pH 9.0 se observa un nuevo conjunto de señales poco intenso que se puede asociar a la formación de un tercer modo de coordinación, en el cual dado el valor de pH, se puede involucrar la participación de más amidas desprotonadas en la unión a cobre. (Figura 3.18). La formación de esta tercera especie se hace más evidente en la región perpendicular de los espectros, ya que cambian drásticamente en esta región conforme se incrementa el pH. Además, se puede esperar a

que tanto el *modo II'* (Figura 3.18, líneas punteadas negras) como el *modo III'* (Figura 3.18, líneas punteadas verdes) presenten valores de A_{\parallel} y g_{\parallel} muy parecidos, por tanto, se hace difícil la asignación inequívoca de las señales para el *modo III'*. Tabla 3.10

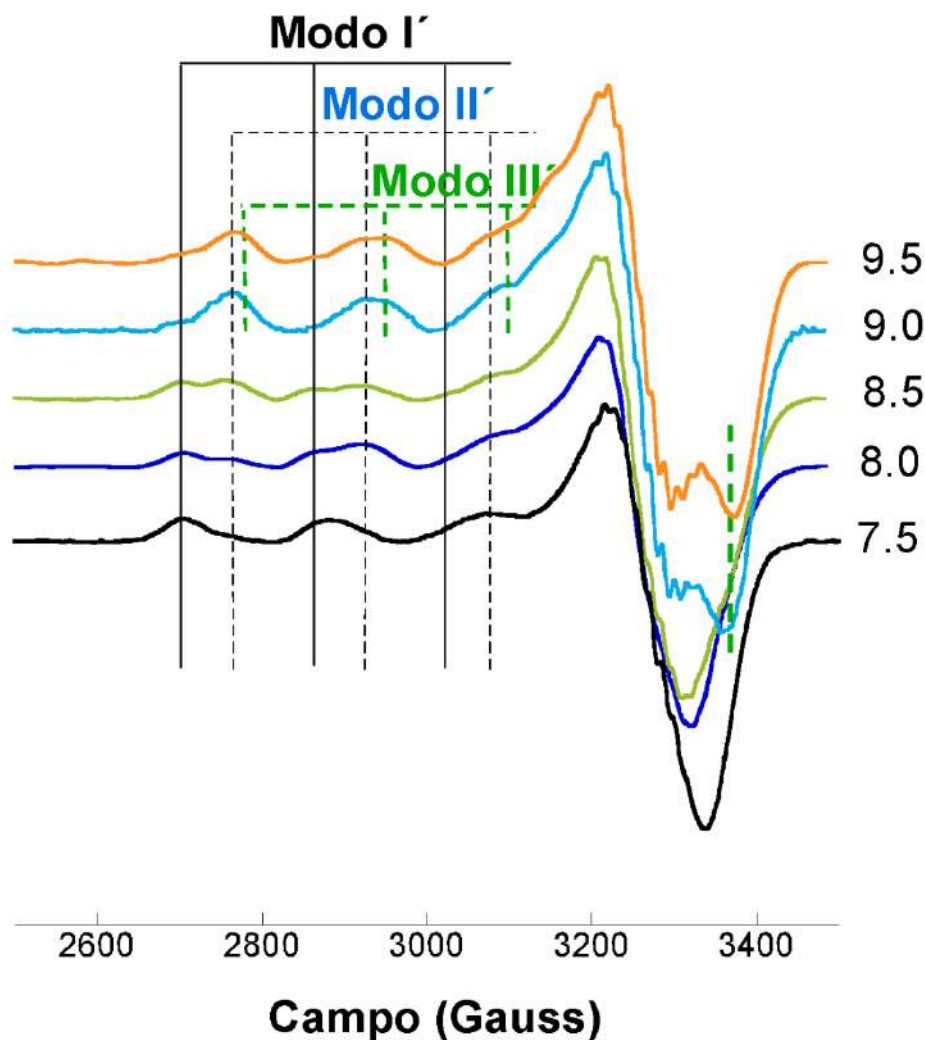


Figura 3.18. Barrido de pH de Ac-A β (1-16) con 0.4 equivalentes de Cu²⁺ en NEM 100 mM – NaCl 100 mM, Glicerol (50:50), seguida por EPR a pH 7.5. Modo I' líneas continuas. Modo II' líneas punteadas negras. Modo III' líneas punteadas verdes.

Tabla 3.10. Parámetros de EPR de los complejos Ac-A β (1-16)-Cu²⁺ con 0.4 equivalentes de Cu²⁺ en función del pH

pH	% aprox. de especies <i>I' : II' : III'</i>	<i>Modo I'</i>		<i>Modo II'</i>	
		A (Gauss)	g	A (Gauss)	g
7.5	80 : 20 : 0	173	2.270	155	2.240
8.0	60 : 40 : 0	165	2.277	153	2.238
8.5	50 : 50 : 0	165	2.277	165	2.237
9.0	10 : 45 : 45	165	2.278	165	2.237
9.5	0 : 50 : 50	164	2.288	165	2.236

Finalmente, es importante señalar que Alies y colaboradores⁹⁶ determinaron tres valores de pKa para este complejo, de los cuales, el pKa = 5.2 lo adjudican a la conversión del *modo I'* al *modo II'*, el de 7.5 lo asocian a la conversión del *modo II'* al *modo III'*; mientras que el pKa de 8.7 lo asignan a la conversión del *modo III'* al *modo IV'*. Utilizan esta denominación (') para indicar que los modos de coordinación observados son ligeramente diferentes a aquéllos encontrados en el complejo análogo A β (1-16)-Cu²⁺, lo cual se ve reflejado en las diferencias de los parámetros de EPR, posiblemente por la acetilación del grupo NH₂-terminal. Además, destacan que en el *modo II'* participa una amida desprotonada de la cadena peptídica, mientras que para el *modo III'* hay una subsecuente desprotonación, por lo tanto, en la esfera de coordinación del centro metálico se encuentran dos amidas desprotonadas. Sin embargo, la asignación de estos valores de pKa por Alies y colaboradores sugiere que la especie más abundante del complejo acetilado en un rango de pH entre 5.2 y 7.5 sería el *modo II'*, en el cual coordina una N⁻. Esta interpretación no es congruente, ya que en dicho rango de pH no se observan señales de CD asociadas a transiciones LMCT de amidas desprotonadas coordinadas al metal.

En resumen, se puede concluir que al igual que los complejos A β (1-16)-Cu²⁺, los complejos del fragmento acetilado también son dependientes de la concentración de cobre y del pH. Adicionalmente, también es importante notar, que a diferencia de lo propuesto

anteriormente, la acetilación del grupo NH₂-terminal no afecta ni impide la coordinación de Cu²⁺, y que las esferas de coordinación para el *modo I'* como para el *modo II'* son muy similares a las del *modo I* y *II* del complejo Aβ(1-16)-Cu²⁺; no obstante, la acetilación sólo afecta el efecto Cotton de las señales de los espectros de CD. Adicionalmente, se concluye que el pKa para la transición del *modo I'* a *II'*, es mayor por una unidad respecto al pKa correspondiente para el complejo análogo Aβ(1-16)-Cu²⁺.

Capítulo 4

**Caracterización electroquímica de
los complejos $A\beta(1-16)-Cu^{2+}$
y $Ac-A\beta(1-16)-Cu^{2+}$**

4.1. Estudio de la actividad redox del complejo $A\beta(1-16)-Cu^{2+}$ por voltamperometría cíclica

En el capítulo 1 (sección 1.5) se destacó que una de las principales características de la EA y en general de las enfermedades neurodegenerativas, es la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), que conducen al estrés oxidativo y por ende, al daño neuronal. Por dicha razón, es de vital importancia conocer la actividad redox de los complejos $A\beta(1-16)-Cu^{2+}$, es decir, es necesario evaluar la capacidad de este complejo para activar la molécula de O_2 . Como se mencionó en la sección 1.10, existen pocos reportes del potencial redox (E°) de dichos complejos, los cuales han sido determinados a pH fisiológico o menor (Tabla 1.3). Los valores reportados han sido muy diversos y dependientes de las condiciones del electrolito usado para evaluarlos, y en este sentido, el propósito de este estudio fue el de determinar los potenciales a diferentes valores de pH en función de los modos de coordinación encontrados por técnicas espectroscópicas (Capítulo 3).

Una vez caracterizados espectroscópicamente los complejos $A\beta(1-16)-Cu^{2+}$ formados en función del pH, se decidió determinar los potenciales redox correspondientes. Para ello, se utilizó la técnica de voltamperometría cíclica (CV, Cyclic Voltammetry). La CV es una técnica electroquímica que permite estudiar los procesos oxido/reducción de un sistema, y para ello requiere de tres electrodos: el de trabajo (WE, working electrode) que es en donde se lleva a cabo la reacción de interés, un electrodo auxiliar que es donde se cierra el circuito eléctrico y un electrodo de referencia, el cual es separado por un puente salino.¹¹⁹ Aquí se utilizó carbón vítreo de 3 mm de diámetro como electrodo de trabajo, Ag/AgCl como electrodo de referencia y Pt como electrodo auxiliar. Los experimentos se llevaron a cabo en una solución amortiguadora de fosfatos (10 mM) y Na_2SO_4 50 mM como electrolito soporte. Este amortiguador se eligió dado que las mediciones preliminares empleando PIPES y NEM mostraron poca reproducibilidad desde el punto de vista de la voltamperometría. Cabe mencionar que todas las mediciones de voltamperometría cíclica fueron realizadas en el laboratorio del Dr. Felipe González (Depto. de Química, Cinvestav), colaborador en el presente proyecto.

Con el propósito de evaluar el primer modo de coordinación, se decidió utilizar una concentración de 0.4 mM de péptido y 0.1 mM de solución de Cu^{2+} . De esta manera, el experimento se llevó a cabo en una relación péptido: Cu^{2+} de 1:0.25. La velocidad de barrido (v) seleccionada fue de 0.005 V/s, dado que el uso de bajas concentraciones hace significativa la contribución de la corriente capacitiva ($I \propto \omega$) sobre los procesos farádicos ($I \propto v^{1/2}$). Adicionalmente, el uso de una baja relación péptido: Cu^{2+} fue seleccionada para garantizar que la especie predominante a bajo pH sea el *modo I*. Cabe destacar que los valores de pH analizados fueron elegidos con base a los datos espectroscópicos y tomando en consideración el pKa (7.8) correspondiente a la transición del *modo I* a *modo II*.

Primeramente, se realizó la CV del complejo $\text{A}\beta(1-16)\text{-Cu}^{2+}$ a tres valores de pH en una ventana de potencial de 300 a -300 mV (Figura 4.1 A), iniciando la reducción a partir del potencial de circuito abierto (ocp, por sus siglas en inglés). A pH 6.5 (curva morada) se observa la aparición de un pico ancho en -0.080 V con una intensidad de corriente pico de -150 nA, mientras que en el sentido inverso (oxidación) aparece otro pico igualmente ancho a 0.160 V (85 nA). Estos picos corresponden a la reducción (pico catódico) y oxidación monoelectrónica del complejo (pico anódico) respectivamente. Se puede observar que los picos a pesar de ser anchos están bien definidos. Sin embargo, a pH 7.4 (curva azul), ambos picos se desplazan a potenciales más negativos, disminuyendo en intensidad de corriente y definición, específicamente el pico catódico aparece a -0.210 V (-140 nA), mientras que el pico anódico a 0.115 V (93 nA). Por otro lado, a pH 8.5 (curva verde) el pico de reducción desaparece en esta ventana de potencial, en tanto que en el barrido hacia la oxidación, se observa un pico poco intenso en aproximadamente 0.096 V (48 nA). La desaparición del pico de reducción indica que la especie que origina dicha corriente a pH 6.5 y 7.4 ya no está presente a pH 8.5.

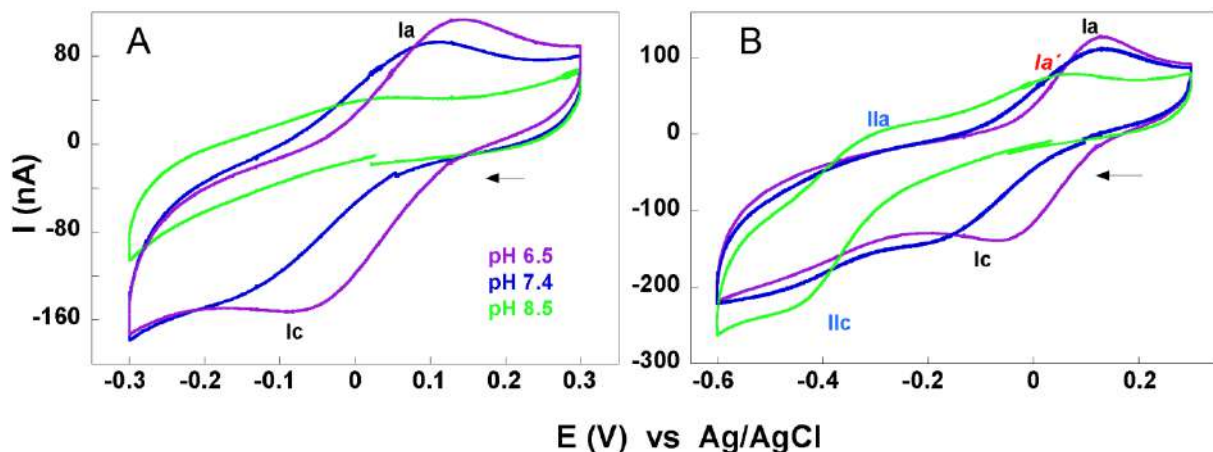


Figura 4.1. Voltamperogramas cíclicos de $A\beta(1-16)-Cu^{2+}$ [1:0.25] a diferentes valores de pH e intervalos de potencial en 10 mM de buffer de fosfatos con 50 mM de Na_2SO_4 como electrolito soporte en atmósfera de Ar y a una velocidad de barrido de 5 mV/s.

Dados los voltamperogramas mostrados en la figura 4.1 A, se extendió la ventana de potencial desde 300 mV hasta -600 mV (Figura 4.1 B), observándose a pH 6.5 (curva morada) un pico de reducción aproximadamente a -0.076 V (-138 nA) y un pico de oxidación en aproximadamente 0.140 V (126 nA) respectivamente. Al aumentar el pH a 7.4 (curva azul) se observa que el pico de reducción se desplaza a potenciales más negativos -0.213 V (-143 nA), respecto a pH 6.5, perdiendo definición e intensidad. Sin embargo, alrededor de los -0.480 V, se observa una pequeña señal de baja intensidad (-205 nA). En el proceso de oxidación, se observa un pico muy definido a 0.134 V (110 nA). Dicho valor es prácticamente el mismo que el registrado en la ventana de potencial corta (Figura 4.1 A, curva azul). Por otra parte, a pH 8.5 (curva verde) no se observa el primer pico catódico encontrado a valores de pH más bajos. No obstante, a potenciales más negativos se observa un nuevo pico de reducción a -0.476 V (-232 nA) con su correspondiente pico de oxidación a -0.276 V (10 nA). Adicionalmente, en el barrido hacia la oxidación a potenciales más positivos aparece otro pico a 0.073 V (78 nA). Cabe destacar que en general, los picos tanto de oxidación como de reducción son picos anchos en todos los casos, lo que sugiere una cinética de transferencia de electrón lenta.

Con base a los datos obtenidos espectroscópicamente, donde se encontró que el *modo I* predomina a pH bajo (6.5) y cuya esfera de coordinación está conformada por 2 His (6, 13 o 14), el grupo NH₂-terminal y un O (COO⁻ o CO) de la cadena peptídica, al primer pico (catódico) observado en la voltamperometría a -0.076 V se le denominó *Ic*, puesto que corresponde a la reducción de dicho complejo y al pico anódico detectado a 0.140 V, se denominó como *Ia* que corresponde a la subsecuente oxidación del complejo. Se puede apreciar una separación de picos grande ($\Delta E_p = -0.216$ V) correspondiente a un comportamiento cuasi-reversible, sugiriendo una transferencia electrónica lenta. A pesar de la amplitud de los picos se pudo determinar un $E^\circ = 0.032$ V vs Ag/AgCl (0.255 V vs NHE, *Normal Hydrogen Electrode*) para la reducción del *modo de coordinación I*. Este valor es consistente con reportes previos cuyo valor oscila entre 0.280 y 0.30 V vs NHE. (sección 1.10). A pH 7.4, las intensidades de corriente asociadas a los picos *Ic* y *Ia* decrecen, mientras que a pH 8.5, no se registran estos picos (Figura 4.1 A, curvas azul y verde respectivamente). Sin embargo, al ampliar la ventana del barrido de potencial (Figura 4.1 B), a pH 8.5 se aprecia claramente la formación de dos nuevos picos: uno catódico a -0.476 V y otro anódico a -0.276 V que corresponden a la reducción y oxidación del modo de coordinación *II*, el cual predomina a este valor de pH. Por lo tanto, estos picos son diferenciados como *Iic* y *Iia* respectivamente. Estos picos se encuentran a potenciales más negativos comparados con los registrados a menores valores de pH y que corresponden al *modo I*. El potencial determinado para el modo de coordinación *II* fue de -0.376 V vs Ag/AgCl (-0.153 V vs NHE). Cabe destacar que este trabajo constituye el primer reporte experimental del potencial de reducción de este modo de coordinación.

Estos resultados indican que el aumento del pH que deriva en la conversión del *modo I* al *modo II* ocasiona un desplazamiento de aproximadamente 0.4 V hacia valores más negativos (Tabla 4.1). El potencial más negativo para el *modo II* es consistente con el hecho de tener una amida desprotonada (N⁻) en la esfera de coordinación. Se sabe que un ligante duro con carga negativa (como lo es una amida desprotonada), puede estabilizar más el cobre en su estado de oxidación 2+ y como consecuencia, disminuir el potencial de reducción de dicho complejo.

Tabla 4.1. Potenciales de reducción determinados para ambos modos de coordinación en el complejo A β (1-16)-Cu²⁺

Modo de coordinación	E° (V) vs Ag/AgCl	E° (V) vs NHE
<i>I</i>	0.032	0.255
<i>II</i>	-0.376	-0.153

Este fenómeno, ha sido observado en otros sistemas péptido-Cu²⁺, tales como los complejos de cobre en la región “*octarepeat*” (conocido como OR) de la proteína prion humana.¹²⁰⁻¹²² Este octapéptido tiene la secuencia PHGGGWGQ y se repite cuatro veces en la proteína. El modo de coordinación del OR a Cu²⁺ depende de la proporción péptido:Cu²⁺. En una relación 1:1, se favorece un tipo de coordinación 4N, con los grupos imidazol de las cuatro histidinas presentes. Sin embargo, a mayor concentración de Cu²⁺, cada OR puede unir solo un átomo de Cu²⁺, formando un modo de coordinación ecuatorial 3N1O. La esfera de coordinación alrededor del centro metálico está conformada por una histidina, dos amidas desprotonadas (provenientes de dos residuos de glicina continuas a la histidina) y un oxígeno de un grupo carbonilo de glicina. El potencial de reducción de esta especie es -0.305 V vs NHE¹²⁰ incluso más negativo que el *modo II* de nuestro complejo A β (1-16)-Cu²⁺, consistente con tener dos amidas desprotonadas en la esfera de coordinación del cobre. Es importante resaltar que la naturaleza de los ligantes involucrados en la unión a Cu²⁺ afecta drásticamente el potencial redox de dichos complejos. De manera tal que el complejo que está conformado por 4 histidinas presenta un potencial redox positivo (+0.323 V), mientras que el complejo que involucra dos amidas desprotonadas de la cadena peptídica desplaza el potencial aproximadamente 0.6 V generando un potencial redox negativo.

Los resultados de este trabajo concuerdan con la tendencia encontrada a través de estudios teóricos realizados por Alí-Torres y colaboradores,¹⁰⁹ quienes calcularon los potenciales de reducción para modelos de coordinación de los *modos I y II*. Para el *modo I*, estos autores predijeron un potencial de 0.280 V, mientras que para el *modo II* la predicción fue de -0.37 a -0.81 V. Esta gran disminución de potencial lo asocian a la presencia de un

ligante ecuatorial cargado negativamente (la amida desprotonada de la cadena peptídica), que estabiliza el estado de oxidación 2+ del ión metálico.

Existen grandes cambios estructurales asociados a la reducción de ambos modos de coordinación que implican una gran energía de reorganización, lo cual se ve reflejado en la gran amplitud de los picos (> 59 mV). Este comportamiento es característico de procesos cuya transferencia electrónica es semi-lenta o lenta. Cabe resaltar que la forma reducida del complejo $[A\beta(1-16)-Cu^+]$ ha sido caracterizada por espectroscopia de absorción de rayos-X (XAS, por sus siglas en inglés) y por resonancia magnética nuclear (NMR, por sus siglas en inglés) únicamente a $pH \approx 7$ (es decir, *modo I*), donde se identificó que el Cu^+ se enlaza a dos residuos de His en una geometría lineal, preferentemente con las His13 y 14, aunque la formación de complejos de Cu^+ donde se una con His6 y 13/14 no pueden ser descartados.¹²³⁻¹²⁵ Por tanto, durante el proceso de reducción del *modo I*, sería necesario que dos ligantes abandonen la esfera de coordinación del cobre (Figura 4.2, pico *Ic*). Este rearrreglo de los ligantes es consistente con la amplitud de los picos en el voltamperograma cíclico. (ver Nota de la página 81)

Por otro lado, a $pH 8.5$ (Figura 4.1 B, curva verde) el *modo II* es el que prevalece y se observa que en el proceso de oxidación aparecen dos picos anódicos: uno más intenso que corresponde a la oxidación del *modo II* ($E_{pIIa} = -0.276$ V) y otro de menor intensidad que aparece a potenciales positivos ($E_{pa} = 0.073$ V), el cual anteriormente había sido asociado a la oxidación del *modo I*, pero debido a la ausencia del correspondiente pico *Ic* y al ligero desplazamiento del pico (0.140 V) a potenciales menos positivos, se sugiere la existencia de dos diferentes complejos de Cu^+ que se forman durante la reducción del *modo II*. A este nuevo pico se le denomina como *Ia'* (Figura 4.2). Para explicar este comportamiento, se propone el siguiente esquema de reacción, en donde se ilustran las trayectorias de reacción al pasar de $pH 6.5$ a 8.5 , es decir, se describe la forma en que se reducen los *modos I* y *II* y cómo estos afectan el comportamiento voltamperométrico. A un pH de 6.5 , solo se forma el modo de coordinación *I*, en donde el Cu^{2+} involucra cuatro enlaces de coordinación al péptido. Al potencial de la señal *Ic* de la Figura 4.1A (curva morada), el centro metálico recibe un electrón y pasa al estado de oxidación Cu^+ . Esto

provoca una gran reorganización interna (número, longitudes y ángulos de enlace) y externa (esfera de solvatación del complejo de Cu^+ respecto al complejo de Cu^{2+}) que permite formar el complejo de Cu^+ pero ahora con solo dos enlaces de coordinación. Esta gran reorganización es congruente con una cinética de transferencia de electrón lenta que se manifiesta en la voltamperometría a través de la gran amplitud del pico de reducción y oxidación, que se encuentran además separados por más de 58 mV (216 mV). Cuando el pH se incrementa a un valor mayor al del pKa del *modo I* (8.5), se favorece la desprotonación de una amida y cambia la energética de los enlaces de coordinación del *modo II*. Por lo tanto la especie de Cu^{2+} se estabiliza y su potencial de reducción se desplaza a valores negativos respecto al *modo I*. Cuando el complejo correspondiente al *modo II* se reduce para formar el complejo de Cu^+ , nuevamente interviene una gran reorganización interna y externa, se pierden dos enlaces de coordinación y consecuentemente la señal de reducción es ancha (pico IIc). En el barrido inverso se logra atrapar el complejo de Cu^+ (pico IIa) generado en el barrido de reducción, sin embargo su intensidad es pequeña debido a que parte de éste se protona en el medio para generar la especie reducida del *modo I* (pico Ia'). El potencial de este pico es menos positivo (energéticamente más favorable hacia la oxidación) debido a la estabilización que se obtiene en el medio básico al formarse los dos enlaces de coordinación adicionales del *modo II*.

Nota: Es importante hacer notar que el ión Cu^+ , debido a su configuración electrónica (d^{10}), puede adoptar diferentes geometrías: lineal, trigonal plano o tetragonal.^{1, 126} Al ser un ácido blando, el ión Cu^+ presenta preferencia por coordinarse a bases de la misma naturaleza, como lo son los residuos de metionina y cisteína. Se ha demostrado que, en ausencia de dichos residuos, el Cu^+ se coordina a residuos de histidina, considerados como de naturaleza intermedia en la clasificación de bases duras y blandas.^{127, 128} Tal es el caso del péptido A β (1-16), ya que existen diversos reportes experimentales (EXAFS, XANES) y teóricos que demuestran la participación de dos histidinas en la esfera de coordinación del complejo A β (1-16)- Cu^+ , adoptando una geometría lineal.^{123, 125, 127, 129, 130}

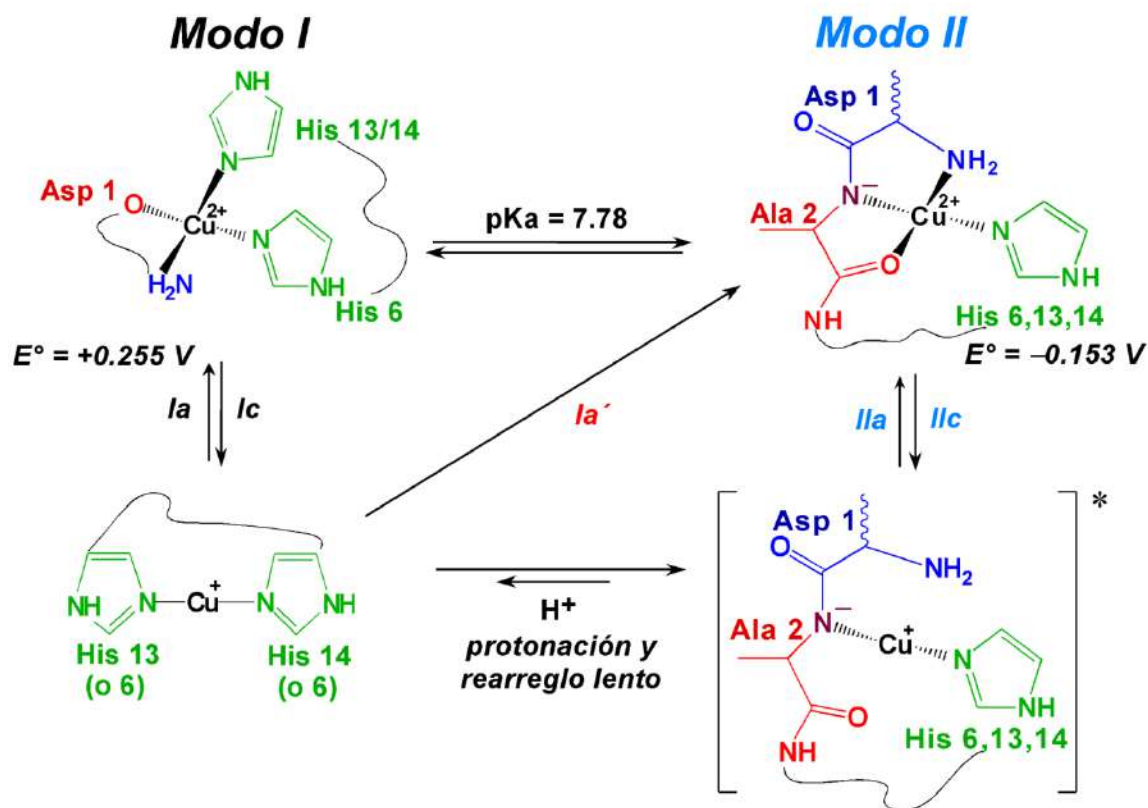


Figura 4.2. Mecanismo propuesto del ciclo redox de los dos modos de coordinación de $A\beta(1-16)-Cu^{2+}$ relevantes fisiológicamente.

Hasta el momento no ha habido ninguna caracterización espectroscópica de la forma reducida del *modo II*. Sin embargo, estudios computacionales han propuesto estructuras transitorias que pueden servir como intermediarios durante la reacción.^{79, 109, 131} Se sabe que para llegar a la forma reducida ($His13-Cu^+-His14$) debe haber una gran reorganización interna y externa donde los primeros ligantes que salen de la esfera de coordinación del Cu^+ son el NH_2 -terminal y el grupo carbonilo de la cadena peptídica (Figura 4.3). Posteriormente se requiere de la protonación del grupo N^- y la introducción de un segundo residuo de His en la esfera de coordinación alrededor del Cu^+ . Aunque las reacciones de protonación son rápidas, se predice que los rearrreglos geométricos que sufre el complejo para que se pueda enlazar el residuo de His al Cu^+ serían muy lentos.¹⁰⁹ Esto permite explicar el comportamiento electroquímico observado a pH 8.5, el pico de reoxidación *IIa* corresponde a la reoxidación de este intermediario de Cu^+ (Figura 4.3, estructura entre

corchetes). Dado que su conversión a la forma bis-His lineal es muy lenta, el intermediario reducido puede fácilmente reoxidarse a Cu^{2+} en el modo de coordinación *II* (pico *IIa*) de manera cuasireversible. La detección electroquímica de este intermediario es una consecuencia de su lenta conversión al complejo lineal bis-His. Por otro lado, la especie lineal de Cu^+ seguiría un mecanismo de Re oxidación diferente para llegar al complejo de Cu^{2+} *modo II*, el cual es evidente en la aparición del pico *Ia'*. Si esta asignación es correcta, se esperaría que la intensidad del pico *Ia'* variara en función de la concentración de la especie de Cu^+ lineal que se forme para cada velocidad de barrido en el experimento de voltamperometría cíclica.

Para entender el comportamiento del pico *Ia'*, se decidió hacer el experimento a diferentes velocidades de barrido ($v = 5, 100$ y 200 mV/s). Con el propósito de evitar la contribución de la corriente capacitiva y por lo tanto, incrementar la resolución de los picos, se aumentó la concentración del péptido a 1.2 mM y 0.3 mM de Cu^{2+} , manteniendo la relación $0.25:1$ péptido:Cu. Consistente con lo esperado en el modelo propuesto en la Figura 4.2, se observa que la intensidad del pico *Ia'* decrece drásticamente al aumentar la velocidad de barrido (Figura 4.3), lo cual es reflejo de una menor acumulación o formación del complejo de Cu^+ lineal en escalas de tiempo cortas. Es decir, al aumentar la velocidad de barrido, no se da tiempo suficiente para que el intermediario sufra el re-arreglo geométrico necesario para formar la especie de Cu^+ lineal.

Por lo tanto, de los datos arrojados por la voltamperometría cíclica se puede concluir que en el proceso de reducción del *modo II* del complejo $\text{A}\beta(1-16)\text{-Cu}^{2+}$, la transferencia electrónica va acompañada de cambios estructurales importantes y una energía de reorganización mayor, en comparación a la del *modo I*. Esta característica permitió la detección electroquímica de una especie intermediaria en el proceso de reducción del *modo II* del complejo $\text{A}\beta(1-16)\text{-Cu}^{2+}$.

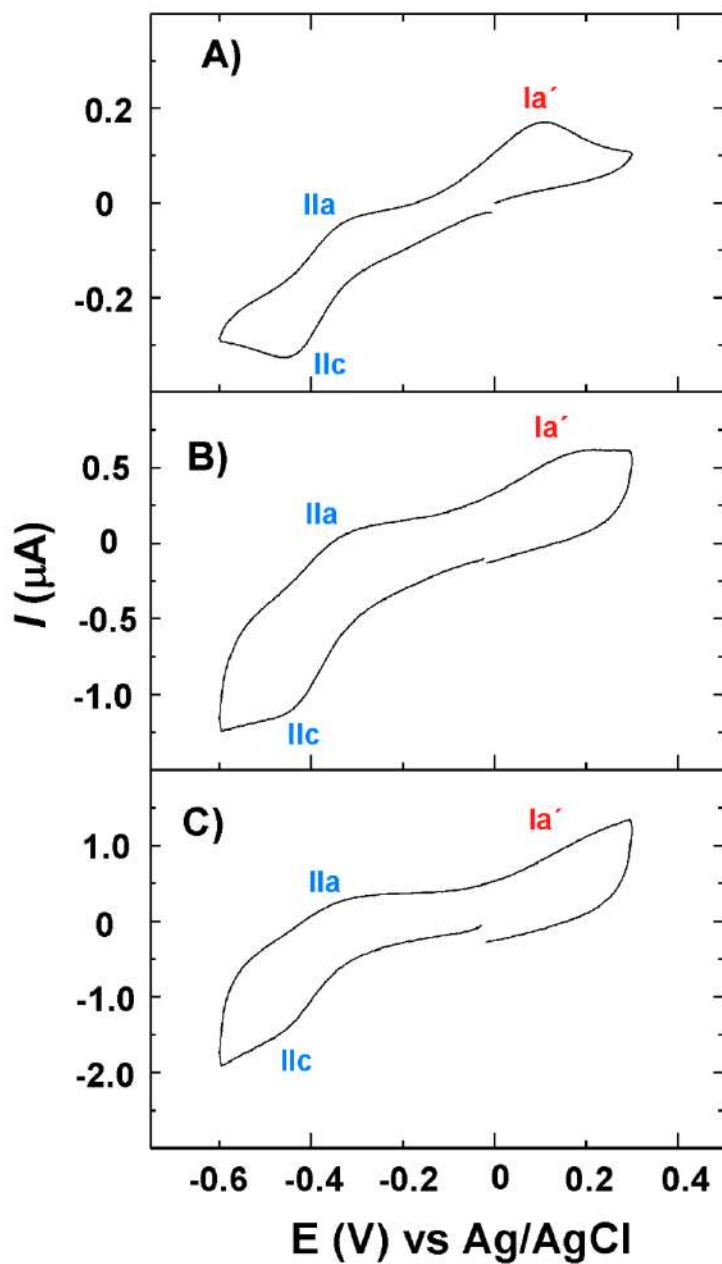


Figura 4.3. Velocidades de barrido del complejo $A\beta(1-16)-Cu^{2+}$ [1:0.25] A) 5 mV/s, B) 100 mV/s y C) 200 mV/s. A pH 8.5 en 10 mM de buffer de fosfatos con 50 mM de Na_2SO_4 como electrolito soporte en atmósfera de Ar.

TABLA 4.2. Potenciales de redox de complejos de Cu²⁺ Aβ(1-16)-Cu²⁺ y diversas especies redox de importancia biológica.

Sistema	E° V (vs NHE)
norepinefrina	0.384
epinefrina	0.372
Dopamina	0.370
OR-Cu ²⁺ / OR-Cu ⁺	0.323
O ₂ /H ₂ O ₂	0.295
PrP-Cu ₅ ²⁺ / PrP-Cu ₅ ⁺	0.267
Aβ(1-16)-Cu ²⁺ <i>modo I</i>	0.255
α-syn-Cu ²⁺ / α-syn-Cu ⁺	0.215
Cu ²⁺ /Cu ⁺	0.159
Ácido ascórbico	0.051
FMN/FMNH ₂ ^a	-0.120
Aβ(1-16)-Cu ²⁺ <i>modo II</i>	-0.153
Oxaloacetato/malato	-0.166
Glutation	-0.228
HGGG-Cu ²⁺ / HGGG-Cu ⁺	-0.29
OR-Cu ₄ ²⁺ / OR-Cu ₄ ⁺	-0.305
NAD ⁺ /NADH ^b	-0.320

^a Flavin mononucleotido oxidado/reducido. ^b Nicotinamida adenina dinucleótido.
OR = *octarepeat* de la proteína prion. PrP = proteína prion

Finalmente, considerando que en el cerebro existen diversos agentes reductores como el ascorbato, (Tabla 4.2) y con base en su potencial de reducción (0.051 V vs NHE), bajo condiciones fisiológicas, el **modo I** (E° = 0.255 V vs NHE) podría ser fácilmente reducido y por lo tanto, podría activar al oxígeno para la generación de ROS. Dado que el potencial de reducción del **modo II** es negativo (-0.153 V vs NHE), este modo no podría ser reducido por el ascorbato y por lo tanto, no contribuiría a la producción de ROS bajo condiciones fisiológicas. (Figura 4.4)

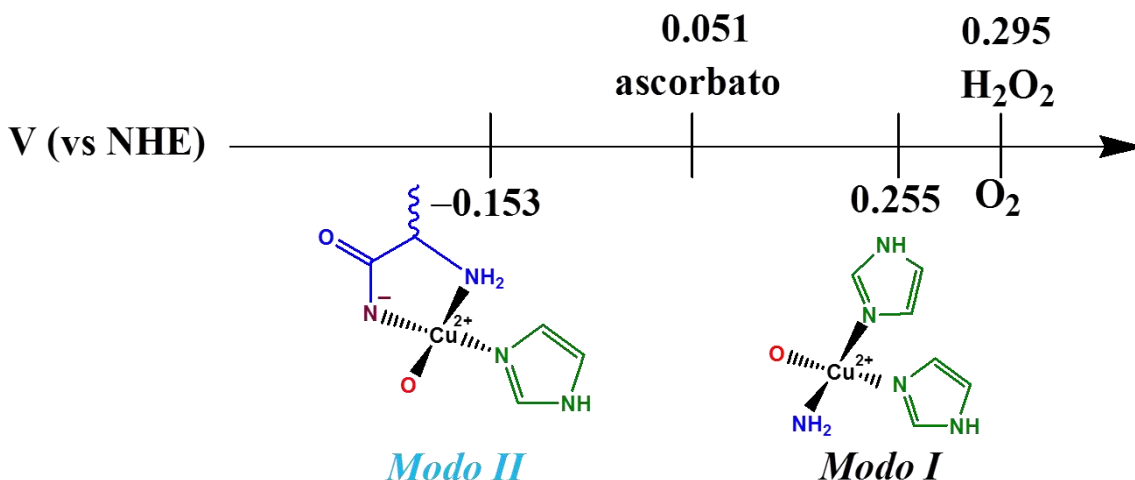


Figura 4.4. Representación de los potenciales de reducción (vs NHE) de diferentes especies para la posible producción de ROS.

4.2. Evaluación de la actividad redox de los complejos Ac-A β (1-16)-Cu²⁺ por voltamperometría cíclica

Una vez caracterizado por voltamperometría cíclica el complejo A β (1-16)-Cu²⁺, se realizó el mismo procedimiento con el complejo acetilado, a concentración de 0.4 mM de péptido y 0.1 mM de solución de Cu²⁺ [1:0.25]. La velocidad de barrido seleccionada fue de 0.005 V/s. Cabe destacar que en este trabajo se estudió por primera vez la actividad redox del complejo Ac-A β (1-16)-Cu²⁺.

Primeramente, se realizó la voltamperometría del complejo Ac-A β (1-16)-Cu²⁺ en una ventana de potencial de 300 a -300 mV (Figura 4.5 A), iniciando la reducción a partir del potencial de circuito abierto. A pH 6.5 (curva morada) se observa la aparición de un pico catódico ancho muy definido a 0.024 V (-74.4 nA, *I_c*), mientras que en el barrido hacia la oxidación aparece otro pico a 0.220 V (96 nA, *I_a*). A pH 7.4 (curva azul), ambos picos aparecen en dirección negativa pero mantienen su definición a pesar de la amplitud de los mismos: el pico de reducción (*I_c*) ahora aparece a \approx -0.074 V (-98 nA), mientras que el pico anódico a 0.188 V (80 nA). A pH 8.5 (curva verde) el pico *I_c* desaparece y sólo se aprecia la formación del pico anódico a 0.192 V (80 nA). Debido a que el complejo

presenta un mayor pKa (8.7), se decidió realizar también el experimento a pH 9.5 (curva anaranjada), pero no se observó respuesta redox en esta ventana de potencial.

Ampliando el barrido de potencial hasta -600 mV (Figura 4.5, B), se observa que a pH 6.5 (curva morada), aparecen los mismos picos Ic y Ia observados en la Figura 4.4 A, sin embargo, al aumentar el pH a 7.4 (curva azul) se observa un pico de reducción a potenciales más negativos respecto al pH anterior, lo que cualitativamente concuerda con lo observado en la voltamperometría realizada en la ventana de potencial corta. Sin embargo, alrededor de -0.437 V, se observa un pico de muy baja definición y corriente (-178 nA). En el sentido inverso, a potenciales positivos aparece un pico a 0.152 V (110 nA). A pH 8.5 (curva verde) no se observa el primer pico catódico encontrado a valores de pH más bajos, pero a potenciales más negativos se observa un nuevo pico de reducción (Iic) a -0.451 V (-163 nA) con su correspondiente pico de oxidación (IIa) determinado a -0.261 V (6.38 nA). Adicionalmente a potenciales más positivos se aprecia otro pico de oxidación (Ia') a ≈ 0.167 V (99 nA). Finalmente a pH 9.5 (curva anaranjada), se observa el mismo comportamiento que al pH anterior, observándose el pico catódico más intenso y mejor definido a -0.43 V (-302 nA), en tanto que al invertir el proceso, el pico anódico IIa y Ia' aparecen mejor definidos a -0.277 V (30.8 nA) y 0.132 V (90 nA) respectivamente.

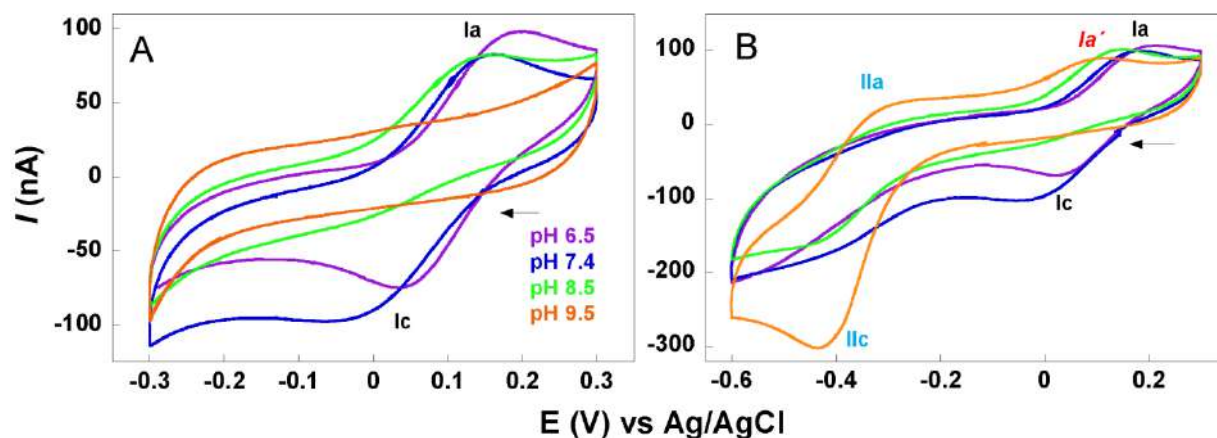


Figura 4.5. Voltamperogramas cíclicos de Ac-A β (1-16)-Cu²⁺ [1:0.25] a diferentes valores de pH y rangos de potencial en 10 mM de buffer de fosfatos con 50 mM de Na₂SO₄ como electrolito soporte en atmósfera de Ar y a una velocidad de barrido de 5 mV/s.

El complejo acetilado, muestra un comportamiento voltamperométrico similar que $A\beta(1-16)-Cu^{2+}$, excepto que la tendencia se desplaza una unidad de pH, debido al incremento del pKa con respecto al complejo no acetilado. A pH fisiológico (7.4), el modo de coordinación *I* predomina y presenta un $E^\circ = 0.060$ V vs Ag/AgCl (0.283 V vs NHE), con una separación de picos (*Ia* y *Ic*) de aproximadamente 0.183 V lo que sugiere un comportamiento cuasi-reversible cuya cinética de transferencia electrónica es lenta. El potencial se encuentra en el rango que se ha determinado para el *modo I* del complejo $A\beta(1-16)-Cu^{2+}$ (ver Tabla 4.1). Estos datos son consistentes con los resultados del estudio espectroscópico, y con la noción de que la acetilación del péptido no impide la coordinación del metal y da lugar a un modo de coordinación *I'*, de manera similar al péptido no acetilado. A este pH, el pico *Ic* se ensancha y pierde definición, de tal manera que cuando se alcanzan valores de pH entre 8.5 y 9.5 desaparece debido a que el modo de coordinación que predomina es el *modo II'*. Cabe recordar que el principal cambio en la esfera de coordinación del cobre, es la incorporación de una amida desprotonada de la cadena peptídica, lo cual se ve reflejado en ese pico de reducción que aparece a un potencial muy negativo (≈ -0.4 V), denominado *IIc* con su correspondiente pico de oxidación *IIa*. El potencial formal de reducción para este par redox es -0.353 V vs Ag/AgCl (-0.130 V vs NHE). Nuevamente, se observa que el potencial para el segundo modo de coordinación se desplaza aproximadamente 0.4 V respecto al primer modo de coordinación en el complejo Ac- $A\beta(1-16)-Cu^{2+}$ (Tabla 4.3).

Tabla 4.3. Potenciales de reducción determinados para ambos modos de coordinación en el complejo Ac- $A\beta(1-16)-Cu^{2+}$

Modo de coordinación	E° (V) vs Ag/AgCl	E° (V) vs NHE
<i>I</i>	0.060	0.283
<i>II</i>	-0.353	-0.130

Por otro lado, a pH 8.5 y 9.5 se observan dos picos de oxidación, indicando la presencia de dos especies reducidas. De manera análoga a la asignación realizada en el complejo no acetilado, el pico más intenso que aparece a potenciales más negativos (***IIa***) corresponde a la oxidación del complejo reducido del *modo II* con geometría idéntica al no acetilado mientras que el pico de menor intensidad a potenciales más positivos (***Ia***), se asocia a la oxidación del complejo reducido lineal (Figura 4.2), al igual que en el complejo sin acetilar, se propone la existencia de dos especies de Cu^+ durante la reducción del *modo II* (pico ***Ia***).

En resumen, el estudio electroquímico de los complejos $\text{Ac-A}\beta(1-16)\text{-Cu}^{2+}$ y $\text{Ac-A}\beta(1-16)\text{-Cu}^+$ reflejan un comportamiento muy similar al observado con el péptido sin acetilar, y confirman que la presencia de una o más amidas desprotonadas en la esfera de coordinación del Cu^{2+} desplazan el potencial a valores más negativos, lo cual está en concordancia con el valor de pKa determinado por espectroscopia.

Capítulo 5

Conclusiones y Perspectivas

Conclusiones

La presente tesis se enfocó al estudio espectroscópico y electroquímico de la unión del ión Cu^{2+} al péptido $\text{A}\beta(1-16)$. A través de los resultados espectroscópicos se encontró que el ion Cu^{2+} puede unirse al fragmento $\text{A}\beta(1-16)$, formando dos modos de coordinación (*modo I* y *modo II*) que se encuentran en equilibrio y cuya proporción es dependiente de la concentración de Cu^{2+} y del pH. El pKa asociado al equilibrio entre estos dos modos de coordinación es 7.8. El péptido $\text{A}\beta$ es producido en el espacio extracelular del tejido neuronal, donde el pH es 7.4 y existen fluctuaciones en las concentraciones de Cu^{2+} y protones durante la sinapsis. Por tanto, ambos modos de coordinación son relevantes desde el punto de vista fisiológico, ya que podrían formarse en el espacio sináptico.

El análisis espectroscópico aquí presentado ayudó a identificar las esferas de coordinación de los complejos $\text{A}\beta(1-16)\text{-Cu}^{2+}$. Por un lado, se descartó a la tirosina 10 como ligante para Cu^{2+} en estos complejos, mientras que por otro lado se confirmó la participación del grupo amino terminal en la esfera de coordinación del metal. Ambos modos de coordinación involucran la participación de tres ligantes nitrógeno y uno de oxígeno, con la participación del grupo amino terminal y grupos imidazol de los residuos de histidina. La diferencia más sobresaliente entre los dos modos de coordinación es el reemplazo de una histidina por una amida desprotonada de la cadena peptídica en el *modo II*. Esta diferencia en las esferas de coordinación es determinante en el comportamiento redox de los complejos, ya que resulta en un ambiente químico diferente que rodea al centro metálico. La presencia de una amida desprotonada en la esfera de coordinación logra estabilizar más al ión Cu^{2+} que a la especie reducida, de tal forma que el potencial de reducción del *modo II* está desplazado a valores más negativos (-0.153 V vs NHE), en comparación con el modo I (0.255 V vs NHE).

Considerando la presencia de agentes reductores y oxígeno en el espacio sináptico donde se encuentra el péptido β -amiloide, es factible que bajo estas condiciones el *modo I* sea capaz de generar ROS y por lo tanto, contribuir al incremento del estrés oxidativo descrito en la patología del Alzheimer. En contraste, el *modo II* tiene un potencial de

reducción tan negativo que, en condiciones fisiológicas ningún agente reductor sería capaz de reducirlo. Por tanto, el *modo II* del complejo $A\beta-Cu^{2+}$ es una especie inerte desde el punto de vista redox, ya que sería incapaz de generar especies reactivas de oxígeno en la sinapsis.

Los cerebros de pacientes con Alzheimer padecen acidosis ($pH = 6.7$), lo cual favorecería el *modo I* de coordinación y como consecuencia, el estrés oxidativo aumentaría. Por tanto, se podría considerar como una estrategia terapéutica el incremento del pH para favorecer la formación del *modo II* (inactivo redox) y de esta manera, actuar como un mecanismo de protección para silenciar la actividad redox del *modo I*.

Entender la naturaleza redox de los complejos β -amiloide-Cu que se forman en el espacio extracelular, ayudará a entender el rol del cobre en la neuropatología del cerebro con Alzheimer. Este trabajo sienta las bases para el estudio del mecanismo de reducción y re-oxidación con oxígeno del *modo I*, y representa una contribución importante al campo de la química bio-inorgánica de la enfermedad de Alzheimer.

Perspectivas

Con el objetivo de entender el mecanismo para la generación de especies reactivas de oxígeno, se propone realizar estudios por voltamperometría cíclica del *modo I* del complejo $A\beta(1-16)-Cu^{2+}$ bajo una atmósfera de oxígeno para detectar la posible formación de especies reactivas de oxígeno.

Adicionalmente, realizar experimentos de espectroelectroquímica con la finalidad de caracterizar por EPR los radicales formados *in-situ*. El uso de atrapadores de espin por EPR puede resultar también una estrategia para caracterizar dichas especies.

Por otro parte, dado que se han encontrado diferentes fragmentos truncados en los cerebros postmortem de pacientes con EA [pGlu $A\beta(11-42)$, pGlu $A\beta(3-40)$ y pGlu $A\beta(3-42)$, por mencionar algunos], es preciso estudiar su interacción con el cobre desde el punto de vista espectroscópico y electroquímico, para determinar su relevancia en el desarrollo de EA.

REFERENCIAS

1. Crichton, R. R., *Biological Inorganic Chemistry a New Introduction to Molecular Structure and Function*. Elsevier: UK, 2012; p 460.
2. Marx, G.; Gilon, C., *ACS Chem. Neurosci.* **2012**, *3*, 633–642.
3. Michalke, B.; Nischwitz, V., *Anal. Chim. Acta.* **2010**, *682*, 23-36.
4. Assaf, S. Y.; Chung, S. H., *Nature* **1984**, *308*, 734–735.
5. Duce, J. A.; Bush, A. I., *Prog. Neurobiol.* **2010**, *92*, 1-18.
6. Zheng, W.; Monnot, A. D., *Pharmacol. Ther.* **2012**, *133*, 177-188.
7. Linder, M. C., *Biochemistry of copper*. Springer science+business media, New York, 1991.
8. Linder, M. C.; Hazeg-Azam, M., *Am. J. Clin. Nutr.* **1996**, *63*, 797S-811S.
9. Jomova, K.; Valko, M., *Toxicology* **2011**, *283*, 65-87.
10. Prohaska, J. R., *Physiol. Rev.* **1987**, *67*, 858-901.
11. Hartter, D. E.; Barnea, A., *Synapse* **1988**, *2*, 412–415.
12. Kardos, J.; Kovacs, I.; Hajos, F.; Kalman, M.; Simonyi, M., *Neurosci. Lett.* **1989**, *103*, 139-144.
13. Sarell, C. J.; Wilkinson, S. R.; Viles, J. H., *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 41533-41540.
14. Lide, D. R. CRC Handbook of Chemistry and Physics, Internet Version 2005.
15. Crisponi, G.; Nurchi, V. M.; Gerosa, C.; Fanni, D.; Nemolato, S.; Faa, G., Copper uptake and trafficking in the brain. In *Metal ions in neurological systems*, Linert, W.; Kozłowzki, H., Eds. Springer: New York, 2012; Vol. 142, pp 47-63.
16. Musci, G.; Polticelli, F.; Calabrese, L., *Adv. Exp. Med. Biol.* **1999**, *448*, 175–182.
17. Kato, S.; Sumi-Akamuru, H.; Fujimura, H.; Sakoda, S.; Kato, M.; Hirano, A.; Takikawa, M.; Ohama, E., *Acta. Neuropathol.* **2001**, *102*, 233-238.
18. Harman, D., *J. Gerontol.* **1956**, *11*, 298-300.
19. Halliwell, B., *J Neurochem* **2006**, *97*, 1634-1658.

-
-
20. Martin, I.; Grotewiel, M. S., *Mech. Ageing. Dev.* **2006**, *127*, 411-423.
 21. Friedman, J., Why Is the Nervous System Vulnerable to Oxidative Stress? In *Oxidative Stress and Free Radical Damage in Neurology*, Gadoth, N.; Göbel, H. H., Eds. Humana Press, : New York., 2011; pp 19-27.
 22. Cadenas, E.; Davies, K. J. A., *Free. Radic. Biol. Med.* **2000**, *29*, 222-230.
 23. Jomova, K.; Vondrakova, D.; Lawson, M.; Valko, M., *Mol. Cell. Biochem.* **2010**, *345*, 91-104.
 24. Prousek, J., *Chem. Listy.* **1995**, *89*, 11-21.
 25. Prousek, J., *Pure Appl. Chem.* **2007**, *79*, 2325–2338.
 26. Kehrer, J. P., *Toxicology* **2000**, *149*, 43-50.
 27. Halliwell, B.; Gutteridge, J. M., *Biochem. J.* **1984**, *219*, 1-14.
 28. Weidinger, A.; Kozlov, A. V., *Biomolecules* **2015**, *5*, 472-484.
 29. Barnham, K. J.; Masters, C. L.; Bush, A. I., *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 205-214.
 30. Linert, W.; Jameson, G. N. L.; Jameson, R. F.; Jellinger, K. A., The Chemical Interplay between Catecholamines and Metal Ions in Neurological Diseases. In *Neurodegenerative diseases and metal ions*, Sigel, A.; Sigel, H.; Sigel, R. K. O., Eds. Wiley England, 2006; Vol. 1, pp 281-320.
 31. <http://www.who.int/topics/dementia/en/>
 32. <https://www.alz.co.uk/research/world-report-2015>.
 33. Kozlowski, H.; Janicka-Klosb, A.; Brasunb, J.; Gaggelli, E.; Valensin, D.; Valensin, G., *Coord. Chem. Rev.* **2009**, *253*, 2665-2685.
 34. Gaggelli, E.; Kozlowski, H.; Valensin, D.; Valensin, G., *Chem. Rev.* **2006**, *106* 1995-2044.
 35. <http://www.innn.salud.gob.mx/>
 36. Fu, H. J.; Liu, B.; Frost, J. L. ; Lemere, C. A., *CNS Neurol. Disord. Drug. Targets.* **2010**, *9*, 197-206.
 37. Kenche, V. B.; Barnham, K. J., *Br. J. Pharmacol.* **2011**, *163*, 211-219.
 38. Small, D. H.; Cappai, R., *J. Neurochem.* **2006**, *99*, 708-710.
 39. Holtzman, M.; Morris, J. C.; M., G. A., *Sci. Transl. Med.* **2011**, *3*, 1-17.

-
-
40. Hardy, J. A.; Higgins, G. A., *Science* **1992**, 256, 184-185.
41. Hardy, J.; Selkoe, D. J., *Science* **2002**, 297, 353-356.
42. Sanders, L., *Sci. News* **2011**, 179, 24-28.
43. Selkoe, D. J., *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **1994**, 53, 438-447.
44. Glenner, G. G.; Wong, C. W., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1984**, 120, 885-890.
45. Glenner, G. G.; Wong, C. W., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1984**, 122, 1131-1135.
46. Masters, C. L.; Simms, G.; Weinman, N. A.; Multhaup, G.; McDonald, B. L.; Beyreuther, K., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **1985**, 82, 4245-4249.
47. De-Paula, V. J.; Radanovic, M.; Diniz, B. S.; O., F., Alzheimer's Disease. In *Protein Aggregation and Fibrillogenesis in Cerebral and Systemic Amyloid Disease*, Harris, J. R., Ed. Springer: New York, 2012; Vol. 65, pp 329-352.
48. Hampel, H.; Shen, Y.; Walsh, D. M.; Aisen, P.; Shaw, L. M.; Zetterberg, H.; Trojanowski, J. Q.; Blennow, K., *Exp. Neurol.* **2010**, 223, 334-346.
49. Haass, C.; Schlossmacher, M. G.; Hung, A. Y.; Vigo-Pelfrey, C.; Mellon, A.; Ostaszewski, B. L.; Lieberburg, I.; Koo, E. H.; Schenk, D.; Teplow, D. B.; Selkoe, D. J., *Nature* **1992** 359, 322-325.
50. Seubert, P.; Vigo-Pelfrey, C.; Esch, F.; Lee, M.; Dovey, H.; Davis, D.; Sinha, S.; Schlossmacher, M.; Whaley, J.; Swindlehurst, C.; McCormack, R.; Wolfert, R.; Selkoe, D.; Lieberburg, I.; Schenk, D., *Nature* **1992**, 359, 325-327.
51. Mehta, P. D.; Pirttila, T.; Patrick, B. A.; Barshatzky, M.; Mehta, S. P., *Neurosc. Lett.* **2001**, 304, 102-106.
52. Cirrito, J. R.; May, P. C.; O'Dell, M. A.; Taylor, J. W.; Parsadanian, M.; Cramer, J. W.; Audia, J. E.; Nissen, J. S.; Bales, K. R.; Paul, S. M.; DeMattos, R. B.; Holtzman, D. M., *J. Neurosci.* **2003**, 23, 8844-8853.
53. Jellinger, K. A., *Curr. Alzheimer Res.* **2006**, 3, 377-391.
54. Burdick, D.; Soreghan, B.; Kwon, M.; Kosmoski, J.; Knauer, M.; Henschen, A.; Yates, J.; Cotman, C.; Glabe, C., *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 546-554.
55. Thinakaran, G.; Koo, E. H., *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 29615-29619.
56. Selkoe, D. J., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2000**, 924, 17-25.

-
-
57. Xu, Y.; Shen, J.; Luo, X.; Zhu, W.; Chen, K.; Ma, J.; Jiang, H., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 5403–5407.
 58. Wang, R.; Sweeney, D.; Gandy, S. E.; Sisodia, S. S., *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 31894–31902.
 59. Suzuki, N.; Cheung, T. T.; Cai, X. D.; Odaka, A.; Otvos, L. J.; Eckman, C.; Golde, T. E.; Younkin, S. G., *Science* **1994**, *264*, 1336–1340.
 60. Portelius, E.; Bogdanovic, N.; Gustavsson, M. K.; Volkman, I.; Brinkmalm, G.; Zetterberg, H.; Winblad, B.; Blennow, K., *Acta Neuropathol.* **2010**, *120*, 185–193.
 61. Portelius, E.; Price, E.; Brinkmalma, G.; Stiteler, M.; Olsson, M.; Persson, R.; Westman-Brinkmalma, A.; Zetterberg, H.; Simon, A. J.; Blennow, K., *Neurobiol. Aging* **2011**, *32*, 1090–1098.
 62. Portelius, E.; Mattsson, N.; Andreasson, U.; Blennow, K.; Zetterberg, H., *Curr. Pharm. Des.* **2011**, *17*, 2594–2602.
 63. Jucker, M.; Walker, L. C., *Ann. Neurol.* **2011**, *70*, 532–540.
 64. Lovell, M. A.; Robertson, J. D.; Teesdale, W. J.; Campbell, J. L.; Markesbery, W. R., *J. Neurol. Sci.* **1998**, *158*, 47–52.
 65. Atwood, C. S.; Moir, R. D.; Huang, X.; Scarpa, R. C.; Bacarra, N. M.; Romano, D. M.; Hartshorn, M. A.; Tanzi, R. E.; Bush, A. I., *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 12817–12826.
 66. Dong, J.; Atwood, C. S.; Anderson, V. E.; Siedlak, S. L.; Smith, M. A.; Perry, G.; Carey, P. R., *Biochemistry* **2003**, *42*, 2768–2773.
 67. Miura, T.; Mitani, S.; Takanashi, C.; Mochizuki, N., *J. Inorg. Biochem.* **2004**, *98*, 10–14.
 68. Yates, C. M.; Butterworth, J.; Tennant, M. C.; Gordon, A., *J. Neurochem.* **1990**, *55*, 1624–1630.
 69. Hureau, C.; Faller, P., *Biochimie* **2009**, *91*, 1212–1217.
 70. Opazo, C.; Huang, X.; Cherny, R. A.; Moir, R. D.; Roher, A. E.; White, A. R.; Cappai, R.; Masters, C. L.; Tanzi, R. E.; Inestrosa, N. C.; Bush, A. I., *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 40302–40308.
 71. Huang, X.; Cuajungco, M. P.; Atwood, C. S.; Hartshorn, M. A.; Tyndall, J. D.; Hanson, G. R.; Stokes, K. C.; Leopold, M.; Multhaup, G.; Goldstein, L. E.; Scarpa, R. C.; Saunders, A. J.; Lim, J.; Moir, R. D.; Glabe, C.; Bowden, E. F.; Masters, C. L.; Fairlie, D. P.; Tanzi, R. E.; Bush, A. I., *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 37111–37116.

-
-
72. Barnham, K. J.; Haeffner, F.; Ciccotosto, G. D.; Curtain, C. C.; Tew, D.; Mavros, C.; Beyreuther, K.; Carrington, D.; Masters, C. L.; Cherny, R. A.; Cappai, R.; Bush, A. I., *FASEB J.* **2004**, *18*, 1427-1429.
73. Rodriguez-Rodriguez, C.; Telpoukhovskaia, M.; Orvig, C., *Coord. Chem. Rev.* **2012**, *256*, 2308-2332.
74. Hyman, L. M.; Franz, K. J., *Coord. Chem. Rev.* **2012**, *256*, 2333-2356.
75. Liu, Y.; Kochi, A.; Pithadia, A. S.; Lee, S.; Nam, Y.; Beck, M. W.; He, X.; Lee, D.; Lim, M. H., *Inorg. Chem.* **2013**, *52*, 8121-8130.
76. Nguyen, M.; Robert, A.; Sournia-Saquet, A.; Vendier, L.; Meunier, B., *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 6771-6785.
77. Faller, P.; Hureau, C., *Dalton Trans.* **2009**, *7*, 1080-1094.
78. Hureau, C.; Dorlet, P., *Coord. Chem. Rev.* **2012**, *256*, 2175-2187.
79. Faller, P.; Hureau, C.; La Penna, G., *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 2252-2259.
80. Rowinska-Zyrek, M.; Salerno, M.; Kozlowski, H., *Coord. Chem. Rev.* **2015**, *284*, 298-312.
81. Atwood, C. S.; Scarpa, R. C.; Huang, X.; Moir, R. D.; Jones, W. D.; Fairlie, D. P.; Tanzi, R. E.; Bush, A. I., *J. Neurochem.* **2000**, *75*, 1219-1233.
82. Syme, C. D.; Nadal, R. C.; Rigby, S. E. J.; Viles, J. H., *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 18169-18177.
83. Guilloreau, L.; Damian, L.; Coppel, Y.; Mazarguil, H.; Winterhalter, M.; Faller, P., *J. Biol. Inorg. Chem.* **2006**, *11*, 1024-1038.
84. Karr, J. W.; Szalai, V. A., *Biochemistry* **2008**, *47*, 5006-5016.
85. Jiang, D.; Men, L.; Wang, J.; Zhang, Y.; Chickenyen, S.; Wang, Y.; Zhou, F., *Biochemistry* **2007**, *46*, 9270-9282.
86. Garzón-Rodríguez, W.; Yatsimirsky, A. K.; Glabe, C. G., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 2243-2248.
87. Sarell, C. J.; Syme, C. D.; Rigby, S. E. J.; Viles, J. H., *Biochemistry* **2009**, *48*, 4388-4402.
88. Karr, J. W.; Kaupp, L. J.; Szalai, V. A., *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13534-13538.

-
-
89. Curtain, C. C.; Ali, F.; Volitakis, I.; Cherny, R. A.; Norton, R. S.; Beyruther, K.; Barrow, C. J.; Masters, C. L.; Bush, A. I.; Barnham, K. J., *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 20466-20473.
90. Tickler, A. K.; Smith, D. G.; Ciccotosto, G. D.; Tew, D. J.; Curtain, C. C.; Carrington, D.; Masters, C. L.; Bush, A. I.; Cherny, R. A.; Cappai, R.; Wade, J. D.; Barnham, K. J., *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 13355-13363.
91. Miura, T.; Suzuki, K.; Kohata, N.; Takeuchi, H., *Biochemistry* **2000**, *39*, 7024-7031.
92. Kowalik-Jankowska, T.; Ruta, M.; Wisniewska, K.; Lankiewicz, L., *J. Inorg. Biochem.* **2003**, *95*, 270-282.
93. Curtain, C. C.; Ali, F. E.; Smith, D. G.; Bush, A. I.; Masters, C. L.; Barnham, K. J., *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 2977-2982.
94. Karr, J. W.; Szalai, V. A., *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 3796-3797.
95. Hureau, C.; Coppel, Y.; Dorlet, P.; Solari, P. L.; Sayen, S.; Guillon, E.; Sabater, L.; Faller, P., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, *48*, 9522-9525.
96. Alies, B.; Eury, H.; Bijani, C.; Rechinat, L.; Faller, P.; Hureau, C., *Inorg. Chem.* **2011**, *50*, 1192-11201.
97. Hureau, C., *Coord. Chem. Rev.* **2012**, *256*, 2164-2174.
98. Peisach, J.; Blumberg, W. E., *Arch. Biochem. Biophys.* **1974**, *165*, 691-708.
99. Curtain, C. C.; Ali, F.; Volitakis, I.; Cherny, R. A.; Norton, R. S.; Beyreuther, K.; Barrow, C. J.; Masters, C. L.; Bush, A. I.; Barnham, K. J., *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 20466-20473.
100. Gómez-Castro, C. Z.; Vela, A.; Quintanar, L.; Grande-Aztatzi, R.; Mineva, T.; Goursot, A., *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 10052-10064.
101. Drew, S. C.; Barnham, K. J., *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 1146-1155.
102. Drew, S. C.; Masters, C. L.; Barnham, K. J., *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 8760-8761.
103. Dorlet, P.; Gambarelli, P.; Faller, P.; Hureau, C., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, *48*, 9273-9276.
104. Kowalik-Jankowska, T.; Ruta-Dolejsz, M.; Wiśniewska, K.; Łankiewicz, L., *J. Inorg. Biochem.* **2001**, *86*, 535-545.
105. Guilloreau, L.; Combalbert, S.; Sournia-Saquet, A.; Mazarguil, H.; Faller, P., *Chem. Bio. Chem* **2007**, *8*, 1317-1325.

-
-
106. Balland, V.; Hureau, C.; Savéant, J. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 17113-17118.
107. Cassagnes, L.-E.; Herve, V.; Nepveu, F.; Hureau, C.; Faller, P.; Collin, F., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2013**, *52*, 11110-11113.
108. Faller, P.; Hureau, C.; La Penna, G., *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 2252-2259.
109. Alí-Torres, J.; Mirats, A.; Maréchal, J. D.; Rodríguez-Santiago, L.; Sodupe, M., *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 4840-4850.
110. Azimi, S.; Rauk, A., *Int J Alzheimers Dis* **2011**, *2011*, 539762.
111. Kaiser, E.; Colescott, R. L.; Bossinger, C. D.; Cook, P. I., *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595-598.
112. Yu, Q.; Kandegedara, A.; Xu, Y.; Rorabacher, D. B., *Anal. Biochem.* **1997**, *253*, 50-56.
113. Williams, M. A.; Daviter, T., *Protein- Ligand Interaction. Methods and applications.* New York, 2013.
114. Bernanducci, E. E.; Schwindinger, W. F.; Hughey, J. L.; Krogh, J., K.; Schugar, H. J., *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 1686-1691.
115. Daniele, P. G.; Prenesti, E.; Ostacoli, G., *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1996**, 3269-3275.
116. Fawcett, T. G.; Bernanducci, E. E.; Krogh-Jespersen, K.; Schugar, H. J., *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 2598-2604.
117. Kowalik-Jankowska, T.; Lesniak, W.; Brasun, J.; Stasiak, M.; Leplawy, M. T., *Polyhedron* **2000**, *19* 241-245.
118. Streltsov, V. A.; Titmuss, S. J.; Epa, V. C.; Barnham, K. J.; Masters, C. L.; Varghese, J. N., *Biophys. J.* **2008**, *95*, 3447-3456.
119. Heinze, J., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1984**, *23*, 831-847.
120. Bonomo, R. P.; Impellizzeri, G.; Pappalardo, G.; Rizzarelli, E.; Tabbì, G., *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 4195-4202.
121. Liu, L.; Jiang, D.; McDonald, A.; Hao, Y.; Milhauser, G. L.; Zhou, F., *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 12229-12237.
122. Zhou, F.; Milhauser, G. L., *Coord. Chem. Rev.* **2012**, *256*, 2285-2296.

-
-
123. Shearer, J.; Szalai, V. A., *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 17826-17835.
124. Hureau, C.; Balland, V.; Coppel, Y.; Solari, P. L.; Fonda, E.; Faller, P., *J. Biol. Inorg. Chem.* **2009**, *14*, 995-1000.
125. Shearer, J.; Callan, P. E.; Tran, T.; Szalai, V. A., *Chem. Comm.* **2010**, *46*, 9137-9139.
126. Roe, J. A.; Shaw, B. F.; Valentine, J. S., Fundamentals of coordination chemistry: Tutorial II. In *Biological inorganic chemistry: structure and reactivity*, Bertini, I.; Gray, H. B.; Stiefel, E. I.; Valentine, J. S., Eds. University Science Books: California, 2007.
127. Himes, R. A.; Park, G. Y.; Barry, A. N.; Blackburn, N. J.; Karlin, K. D., *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5352-5353.
128. Park, G. Y.; Lee, J. Y.; Himes, R. A.; Thomas, G. S.; Blackburn, N. J.; Karlin, K. D., *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 12532-12535.
129. Himes, R. A.; Park, G. Y.; Siluvai, G. S.; Blackburn, N. J.; Karlin, K. D., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2008**, *47*, 9084-9087.
130. Raffa, D. F.; Rickard, G. A.; Rauk, A., *J. Biol. Inorg. Chem.* **2007**, *12*, 47-164.
131. Furlan, S.; Hureau, C.; Faller, P.; La Penna, G., *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 11899-11910.

A N E X O

1

TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS UTILIZADAS PARA EL ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN $\text{A}\beta\text{-Cu}^{2+}$

La radiación electromagnética tiene una componente eléctrica y una componente magnética, y puede describirse como una onda que tiene propiedades de longitud de onda, frecuencia, velocidad y amplitud. Las ondas electromagnéticas tienen diferentes características en función de su frecuencia, lo cual da origen al espectro electromagnético (Figura 1). Cada una de éstas bandas puede ser utilizada para diferentes técnicas espectroscópicas, como por ejemplo: las Microondas se utilizan en espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica, Rayos X para cristalografía y espectroscopía de absorción de rayos X, Infrarrojo para estudiar vibraciones moleculares, Visible, Ultravioleta, etc.¹

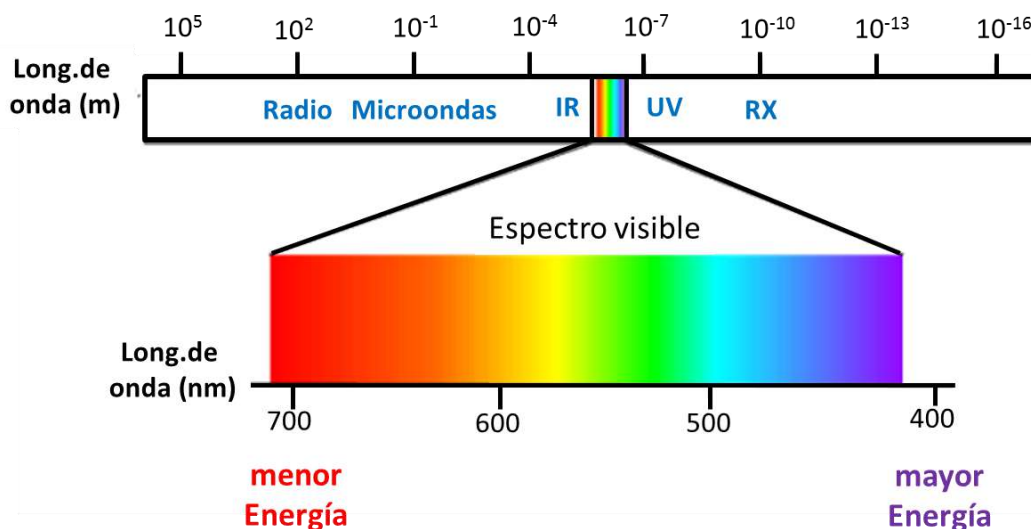


Figura 1. Espectro Electromagnético

Cabe destacar que las técnicas espectroscópicas han sido relevantes para el entendimiento de la estructura electrónica, propiedades físicas y la reactividad de diversos compuestos, incluyendo sitios activos de interés biológico. En el área de química bioinorgánica, las técnicas de espectroscopía son herramientas invaluable debido a que

proporcionan información de la geometría y de la estructura electrónica de los sistemas bajo estudio.^{2, 3} Las espectroscopías utilizadas en este trabajo para lograr la caracterización de las transiciones electrónicas asociadas al complejo metal-proteína fueron: absorción electrónica en la región UV-Visible, dicroísmo circular (CD) y resonancia paramagnética electrónica (EPR).

Antes de describir las diferentes técnicas espectroscópicas empleadas, es necesario tener en mente que dentro de la teoría de ácidos y bases duros y blandos, el ión Cu^{2+} tiene propiedades de un ácido de dureza intermedia,⁴ por lo tanto, la química de coordinación de este ión está favorecida por átomos donadores tales como los átomos de N, O y S.⁵ En el caso de la interacción de Cu^{2+} con el fragmento A β (1-16), los enlaces de coordinación se pueden formar a través de interacciones con los átomos de N de los residuos de las histidinas (His), del grupo amino terminal (NH_2 -terminal), de las amidas desprotonadas de la cadena peptídica (N^-) o a través de los oxígenos de los grupos carbonilo o carboxilato de la cadena peptídica.⁶

Cuando un metal de transición es coordinado por un conjunto de ligantes, los orbitales d del metal se desdoblan en energía como resultado de su interacción con los orbitales del(os) ligante(s) (Figura 2). La intensidad y las respectivas energías asociadas a las transiciones electrónicas de un complejo, dependen de la geometría que adopte el complejo y de la fuerza de las interacciones entre el metal y los ligantes.⁷

Los orbitales d de un metal que poseen menos de diez electrones, como es el caso del ión Cu^{2+} que posee nueve electrones en su capa de valencia (d^9), presenta dos tipos de transiciones electrónicas pueden tener lugar: las transiciones electrónicas que involucran orbitales d del metal se denominan transiciones $d-d$ o de campo ligando, y transiciones electrónicas que involucren orbitales moleculares con carácter del ligando, denominadas bandas de transferencia electrónica del ligando al metal (LMCT, Ligand to Metal Charge Transfer). Normalmente, las transiciones de campo ligando ocurren a energías más bajas que las transiciones tipo LMCT y son de menor intensidad por tratarse de transiciones prohibidas por dipolo eléctrico. En contraste, las transiciones LMCT generalmente son

permitidas por dipolo eléctrico y tienden a ser más intensas en el espectro de absorción electrónica. Sin embargo, ambos tipos de transiciones pueden ser detectados y analizadas por absorción electrónica y CD en la región UV-Visible del espectro electromagnético, dado que los centros metálicos encontrados en las proteínas, por lo general son centros de baja simetría, lo que les permite absorber diferencialmente la luz circularmente polarizada a la derecha y a la izquierda. Finalmente, para proteínas con centros metálicos paramagnéticos, es decir, que el ión metálico que se enlaza a la proteína bajo estudio ($A\beta$) posee uno más electrones desapareados (\uparrow), dicho complejo puede ser estudiado por EPR, debido a que es una herramienta poderosa que provee información sobre el ambiente químico alrededor del electrón desapareado, puesto que correlaciona la estructura electrónica y la geometría.^{3,7}

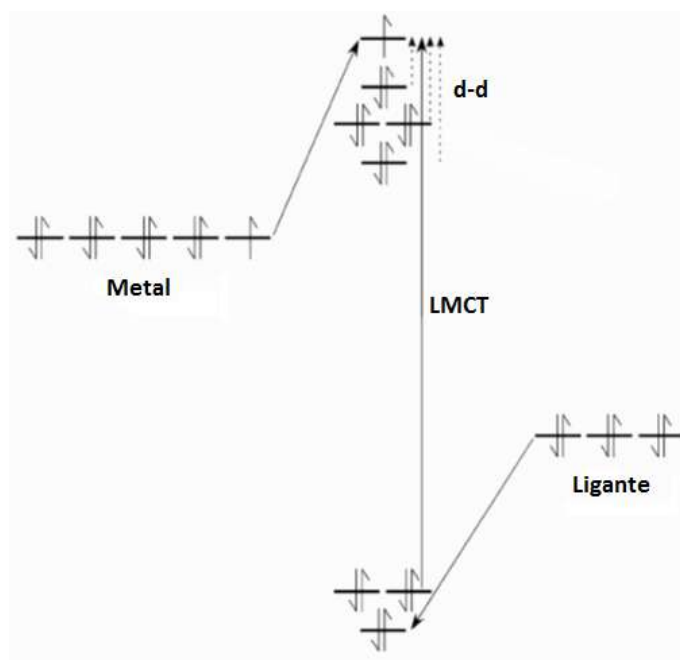
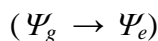


Figura 2. Esquema del diagrama de orbitales moleculares de un complejo metal-proteína. Las posibles transiciones d-d son representadas por las flechas discontinuas, mientras que las transiciones de transferencia de carga del tipo LMCT está representada por la flecha continua. Figura tomada de la Ref.⁷

1.1. Absorción electrónica en la región UV-Visible

La espectroscopía de Absorción Electrónica en la región UV-Visible es la técnica más utilizada debido a su sencillez y su bajo costo. Consiste en incidir un haz de luz sobre una muestra y medir con un detector la luz que fue transmitida (no absorbida) por el contenido de la muestra. Si el analito presenta transiciones electrónicas permitidas por dipolo eléctrico, éste absorberá la luz con la energía correspondiente a dicha transición, causando que la molécula pase de su estado basal (menor energía, Ψ_g) a un estado excitado (mayor energía, Ψ_e).



El tiempo de vida media de los estados electrónicos excitados es muy corto (10^{-18} s)⁸ y la energía absorbida por la muestra se grafica como función de la longitud de onda como se muestra en la Figura 3.

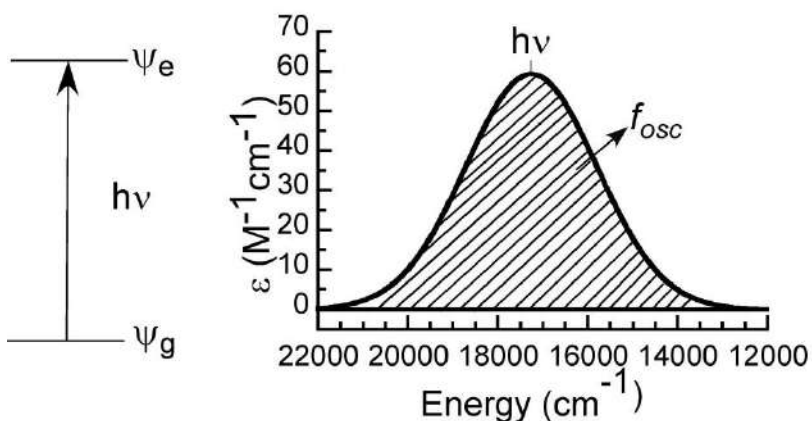


Figura 3. Representación de una transición electrónica que pasa del estado basal (Ψ_g) al estado excitado (Ψ_e) generando un espectro de absorción electrónica en el región UV-Vis. Figura tomada de la Ref.⁷

Una transición electrónica está expresada por el operador de momento de transición \hat{M} , el cual va a ser determinado por el dipolo eléctrico de tal manera, que la fuerza del

oscilador (f_{osc} , área bajo la curva) asociada a una transición electrónica depende de la integral:

$$\int \Psi_g \hat{M}_{\text{electric dipole}} \Psi_e d\tau \quad (1)$$

Existen ciertas reglas que establecen bajo qué condiciones dicha integral es diferente de cero y por tanto que una transición dada sea permitida y observada en esta espectroscopía:

- Si es $\neq 0$, la transición es **permitida** por dipolo eléctrico y por lo tanto, será observada en el espectro de absorción con gran intensidad.
- Si es $= 0$, la transición será **prohibida** por dipolo eléctrico.

Sin embargo, esto no implica necesariamente que una transición no pueda ser observada (con muy baja intensidad respecto a las transiciones que sí son permitidas), ya que una transición prohibida por dipolo eléctrico puede ganar intensidad por otros mecanismos, tales como acoplamiento espín-orbita y acoplamiento vibrónico.^{9, 10}

Además, debe recordarse que una transición puede ser permitida cuando se satisfagan las siguientes condiciones:

- Sólo un electrón puede estar implicado en la transición.
- No se pueden modificar las orientaciones relativas de los espines de un complejo ($\Delta S = 0$), es decir, únicamente pueden ser permitidas las transiciones que ocurran entre estados con la misma multiplicidad.
- Las únicas transiciones permitidas en sistemas centrosimétricos, son aquellas en las que hay un cambio de paridad (Regla de Laporté): $g \rightarrow u$. Por lo tanto, estarán prohibidas las transiciones entre los orbitales:

$$s \rightarrow s, \quad p \rightarrow p, \quad d \rightarrow d, \quad s \rightarrow d$$

Experimentalmente, una banda de absorción es caracterizada por su coeficiente de extinción molar (ϵ , en $M^{-1}cm^{-1}$), que relaciona la intensidad de la absorción (a una

determinada longitud de onda) con la concentración de la muestra y la longitud de la trayectoria de la radiación: Ley de Lambert-Beer:

$$A = \epsilon Cl \quad (2)$$

Donde: A = Absorción, C = concentración de la muestra (M) y l = longitud del paso óptico (cm).

Cabe mencionar, que el ϵ depende de la longitud de onda a la cual se determina el punto máximo de absorción de la banda (punto en el que tiene lugar la transición del estado basal al estado excitado). Y finalmente, se obtiene la representación de la Figura 3.

Enfocándonos en el estudio de complejos metal-proteína, se sabe que se pueden generar dos tipos de transiciones: de campo ligando o bandas d-d y bandas de transferencia de carga. En dichos complejos, se generan transiciones d-d, las cuales usualmente son prohibidas por dipolo eléctrico y se observan a bajas energías (cm^{-1}) por lo que generalmente son bandas de muy baja intensidad o incluso no llegan a ser observadas. Los ϵ de estas bandas son $< 200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Por otro lado, las bandas de transferencia de carga, al ser transiciones permitidas por dipolo eléctrico, van a ser bandas de gran intensidad, exhibiendo $\epsilon > 1000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.⁹

Debido a esta situación, se debe utilizar otras técnicas que nos permitan caracterizar las bandas de baja intensidad, tal es el caso del dicroísmo circular.

1.2. Dicroísmo Circular

El dicroísmo circular (CD, por sus siglas en inglés) ha sido comúnmente utilizado en la región UV-lejano (190-230 nm) para estudiar la estructura secundaria de las proteínas. Sin embargo, también ha sido usado en la región Visible para estudiar iones metálicos en un ambiente quirral, tal como lo es el caso de los complejos metal-proteína.¹¹ La

espectroscopía de CD permite resolver las transiciones electrónicas que no son detectadas por la espectroscopía de absorción clásica explicada anteriormente.

Dentro de las ventajas que ofrece esta técnica son: requiere bajas concentraciones de muestra, permite estudiar un amplio rango de variables (pH, temperatura, concentración). Además, permite obtener una alta reproducibilidad de los cambios que se dan en los complejos metal-ligando conforme se van desarrollando los experimentos y puede ser combinada con otras técnicas en “tiempo real”.¹²

La espectroscopía de CD, se origina de la actividad óptica que poseen las moléculas y utiliza luz circularmente polarizada: a la derecha (right, R) y a la izquierda (left, L), ambos componentes son de la misma magnitud. Cuando un haz de luz circularmente polarizado es incidido sobre una muestra ópticamente activa, los centros quirales de las moléculas presentes en la muestra absorberán cada componente de luz de manera diferente. Por lo tanto, la cantidad de luz absorbida hacia la derecha (ϵ_R) será diferente a la absorbida hacia la izquierda (ϵ_L) y dicha desigualdad de absorción estará relacionada a una transición electrónica y será mostrada como una elipse.¹³ Así, una señal observada en un espectro de CD, estará dada por:

$$\Delta A = A_L - A_R \quad (3)$$

Muchos equipos de CD (mejor conocidos como espectropolarímetros), reportan en términos de elepticidad ($\theta = 32.98 \Delta A$) en grados. Así, la elepticidad relaciona la concentración molar (C) de la molécula quiral absorbente y la diferencia en el coeficiente de extinción molar para los componentes L y R ($\Delta\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R$ en $M^{-1}cm^{-1}$) a través de la siguiente ecuación:¹⁴

$$\theta = 32.98 \Delta\epsilon Cl \quad (4)$$

* Donde l es la longitud del paso óptico.

Al igual que en la espectroscopía en la región UV-Visible, esta espectroscopía está dominada por un operador del momento de transición, el cual está conformado por el dipolo eléctrico ($\hat{M}_{\text{dipolo eléctrico}}$) y el dipolo magnético ($\hat{M}_{\text{dipolo magnético}}$). El parámetro que relaciona el área integrada bajo la curva y una señal de CD es la fuerza rotacional (R), la cual depende de las siguientes integrales⁷

$$\int \Psi_g \hat{M}_{\text{electric dipole}} \Psi_e d\tau \int \Psi_g \hat{M}_{\text{magnetic dipole}} \Psi_e d\tau \quad (5)$$

Así, si ambas integrales que conforman la ecuación (5):

- Son $\neq 0$, la transición será permitida tanto por dipolo eléctrico como por dipolo magnético, y se observará con una gran intensidad en el espectro de CD.

Cabe hacer hincapié que cuando una transición está prohibida por alguno de los dos dipolos (eléctrico o magnético) puede ganar intensidad por diferentes mecanismos y finalmente ser observada en el espectro de CD.¹⁰ (Para mayor información, revisar las referencias^{11, 12})

Como se mencionó anteriormente, en absorción electrónica no es posible diferenciar bandas superpuestas, sin embargo por CD dado que las transiciones electrónicas observadas pueden ser positivas o negativas dependiendo de la diferencia $\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R$, pueden ser fácilmente separadas y distinguibles en el espectro. En la Figura 4, se muestra la comparación de un espectro de absorción y uno de CD.

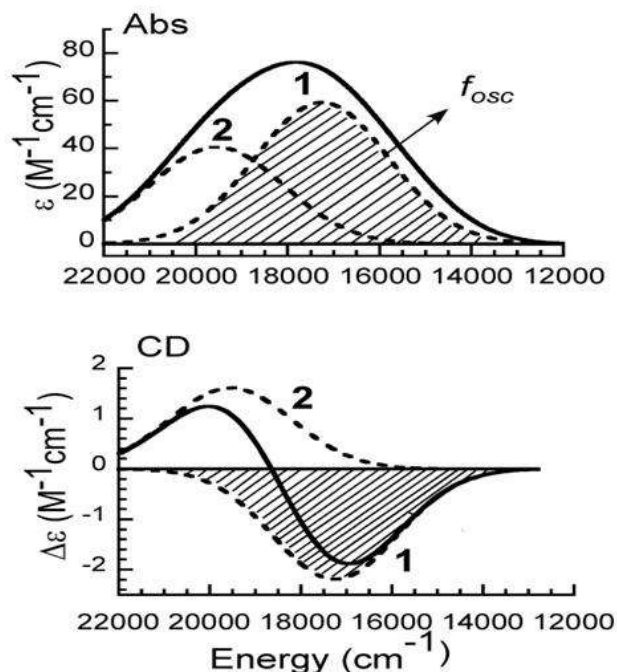


Figura 4. Representación de dos transiciones electrónicas cercanas en energía, las cuales producen dos bandas superpuestas en el espectro de absorción (arriba, 1 y 2). La deconvolución de ambas Gaussianas en el espectro de CD (abajo, 1 y 2) se facilita dado que para la transición 1 el $\Delta\epsilon$ es (-), mientras que para la transición 2 el $\Delta\epsilon$ es (+). Figura tomada de la Ref.⁷

NOTA:

La ecuación de Planck relaciona a la energía con el inverso de la longitud de onda ($E = hc/\lambda$ donde: h es la constante de Planck, c es la velocidad de la luz y λ es la longitud de onda). Dicha ecuación considera que la energía en una onda electromagnética de longitud λ que se transmite a través de paquetes discretos o fotones con energía única y fija, E .¹⁵ Por lo anterior, en el campo de espectroscopía se suele utilizar los cm^{-1} como una unidad de energía. Por ejemplo 1 cm^{-1} corresponde a $1.24 \times 10^{-4} \text{ eV}$.¹⁶ Esta es la energía que un fotón asociado a una longitud de onda de un cm poseería. Por otro lado, el número de onda es una magnitud de frecuencia que indica cuantos ciclos de una onda caben en una distancia determinada (por ejemplo un cm), de tal forma que lo que nos está indicando es el número equivalente de fotones asociados con una longitud de onda de 1 cm y por lo tanto la energía del fotón asociado con ese número de onda (ν), sería el equivalente al número de veces que cabe esa onda en la distancia de referencia por la energía del fotón de referencia. Por ejemplo, si hay 20 ciclos en un cm, entonces la energía del fotón asociado será 20 cm^{-1} , que equivaldría a $20 \times 1.24 \times 10^{-4} \text{ eV}$.¹⁷ Adicionalmente, los espectros de metaloproteínas se suelen graficar en cm^{-1} , dado que las bandas $d-d$ ganan resolución.

1.3. Resonancia Paramagnética Electrónica

La resonancia paramagnética electrónica (EPR, por sus siglas en inglés) o resonancia de spin electrónico (ESR), es una técnica espectroscópica que ha sido utilizada por más de 50 años para el estudio de diversos sistemas paramagnéticos,¹⁸ ya que gracias a su carácter no destructivo y a su alta versatilidad es el complemento ideal de otros métodos de análisis, permitiendo obtener valiosa información estructural y dinámica de moléculas que presentan uno o más electrones desapareados. Las aplicaciones de esta técnica son variados, ya que se emplea en diversas áreas del conocimiento, tales como son la Química, Física, Ciencias de los materiales, Biología, entre otras.

El EPR es una técnica muy sensible, que permite detectar especies paramagnéticas a concentraciones muy bajas (10^{-14} M), lo que ha permitido el estudio detallado sobre la estructura de los sitios de coordinación a iones metálicos paramagnéticos (principalmente Cu^{2+}) en un gran número de proteínas, incluyendo aquellas que han sido asociadas a enfermedades del sistema nervioso central.^{7, 19}

El sistema más simple para ser estudiado por EPR consiste de un solo electrón desapareado, el cual puede estar en cualquiera de sus estados cuánticos $m_s = \pm 1/2$. En la ausencia de un campo magnético, estos dos estados son degenerados, es decir, tienen la misma energía. Por el contrario, cuando un campo magnético externo es aplicado y se da la interacción de éste con el spin electrónico, se produce el desdoblamiento de cada subnivel de spin. A dicho desdoblamiento se le conoce como efecto Zeeman (Figura 5). Es importante recordar que la energía relativa de cada subnivel m_s depende de la magnitud del campo magnético aplicado a la muestra (H).⁷

$$E = m_s g\beta H \quad (5)$$

Donde:

β es el magnetón de Bohr ($4.6686 \times 10^{-5} \text{ cm}^{-1}/\text{G}$)

g es el factor g o valor g que determina la magnitud del desdoblamiento electrónico

H es el campo magnético

m_s es el subnivel de spin

***Nota:** Se sabe que para un electrón libre en el vacío $g = 2.00231930436153$ (incertidumbre de 0.00000000000053).²⁰

A diferencia de la resonancia magnética nuclear (NMR), donde los experimentos de onda continua (CW) han sido reemplazados por métodos de pulsos, los experimentos de EPR de CW son los más usados y consisten en colocar una muestra dentro de una cavidad, la cual es irradiada con microondas a una frecuencia fija (ν), mientras que se barre el campo magnético externo.²⁰ Una vez que la diferencia de energía del desdoblamiento Zeeman entre los dos subniveles de espín sea igual a la energía de microonda fija ($h\nu$), la condición de resonancia (Ec. 6) tendrá lugar y por tanto, ocurrirá la absorción de microondas y la señal de EPR será detectada.³

$$\Delta E = g\beta H = h \quad (6)$$

Las transiciones de los electrones del estado basal al estado excitado se observan como la absorción de una parte de la intensidad de microondas y dado que estas absorciones son bastante amplias, los espectros se reportan como la primera derivada (dA/dH) para aumentar la resolución de la señal. Lo que implica que el campo magnético al cual la condición de resonancia es alcanzada, corresponde al punto donde $dA/dH = 0$, y la distancia pico-pico corresponde al ancho de la señal.⁷

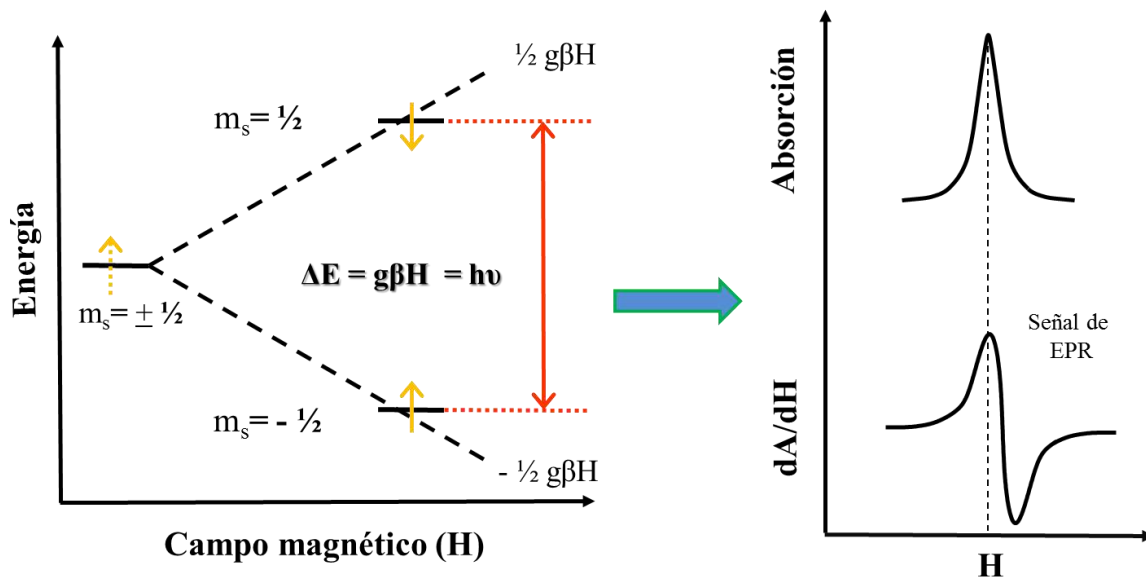


Figura 5. Efecto Zeeman y experimento de EPR de un sistema simple con un spin $=1/2$. Los subniveles de spin $m_s = \pm 1/2$ son desdoblados en energía por efecto de la aplicación de un campo magnético (H). Cuando su desdoblamiento energético ($g\beta H$) es igual a la energía de la microonda ($h\nu$), la absorción de las microondas es observada. Finalmente, el espectro de EPR es reportado como la primera derivada de la absorción de la microonda en función del campo magnético (dA/dH). Figura adaptada de la Ref. ³

El valor g de cada especie paramagnética, se puede determinar a partir del campo magnético en el que se observa la señal de EPR a través de la Ec. 6. El factor g es indicativo del ambiente químico alrededor del spin electrónico. Para moléculas cuyo spin $= 1/2$ (ej. radicales libres) el valor de $g = 2.0023$; sin embargo, para iones metálicos con un electrón desapareado dicho valor puede ser ligeramente diferente de 2, debido al acoplamiento espín-orbita. Por el contrario, para complejos de metales de transición con espín $> 1/2$, el valor g puede variar grandemente.

El valor de g depende del ambiente químico alrededor del electrón desapareado, así, la magnitud del desdoblamiento Zeeman dependerá de la orientación de las moléculas respecto al campo magnético externo. Por lo tanto, el factor g , es un parámetro dependiente de la orientación y su anisotropía depende del ambiente químico alrededor del electrón desapareado.³

De acuerdo a las orientaciones relativas de las moléculas, podemos encontrar simetrías anisotrópicas rómbica o axial. La primera, tiene lugar cuando las direcciones de los ejes x, y, z son diferentes y por lo tanto los valores para el factor g serán: $g_z \neq g_y \neq g_x$. Por el contrario, cuando g_x y g_y son iguales y g_z es diferente, tenemos la simetría axial (Figura 6). Cuando las orientaciones de una molécula con respecto al campo magnético externo no pueden ser controladas, como sucede en el caso de soluciones congeladas, se observa una distribución de absorciones de microondas a través de un rango de valores de campo magnético, los cuales corresponden al rango de g_z a g_y a g_x . Se emplea la primera derivada, ya que usualmente permite resolver las tres diferentes señales asociadas al valor g.⁷

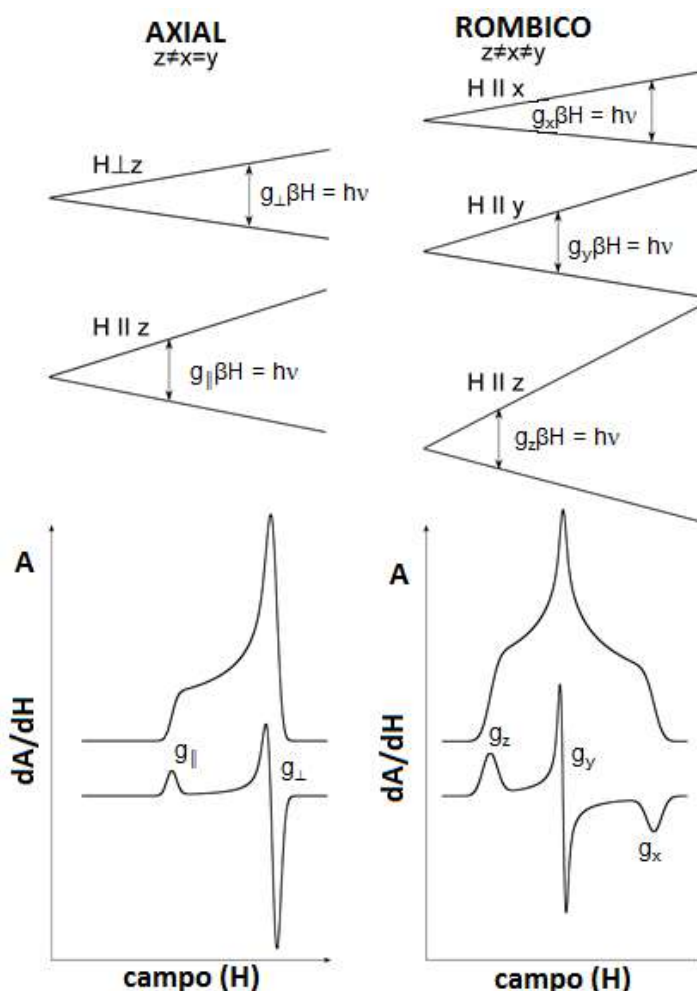


Figura 6. Anisotropía de los valores g de un complejo Axial ($g_z > g_y = g_x$) y rómbico ($g_z > g_y > g_x$). Figura tomada de la Ref. ⁷

Para un complejo axial ($g_z > g_y = g_x$), el espectro de absorción de microondas presenta una distribución de absorciones que van desde la condición de resonancia ($g\beta H = h\nu$) cuando el campo magnético es paralelo a z hasta la condición de resonancia para cuando el campo magnético es perpendicular a z , incluyendo todas las orientaciones posibles. Cabe destacar que por lo antes señalado g_z también es llamado g_{\parallel} y $g_y = g_x$ como g_{\perp} , en el caso de moléculas axiales. Por lo tanto, el espectro de EPR (dA/dH) mostrará dos señales asociadas a los valores de g_{\parallel} y g_{\perp} . De igual manera, para un complejo con simetría rómbica ($g_z > g_y > g_x$), la distribución de absorciones incluirá las tres condiciones de resonancia, y como consecuencia dará un espectro con tres señales. (Figura 6)²¹

Por otro lado, un espín nuclear (I) cercano a un electrón desapareado da lugar a un desdoblamiento hiperfino originando $2I + 1$ señales. La magnitud de la interacción hiperfina con núcleos aledaños (N) está dado por la constante de acoplamiento hiperfino ($^N A$) y la anisotropía. Por ejemplo, varios iones metálicos de transición tienen espines nucleares que se acoplan con el electrón desapareado, tal es el caso del ión Cu^{2+} posee un espín nuclear de $3/2$ y va a dar lugar a un desdoblamiento hiperfino de cuatro señales.^{7, 22} (Figura 7).

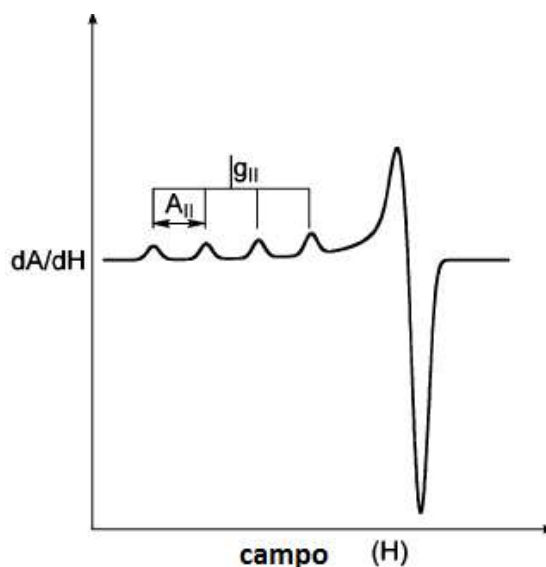


Figura 7. Espectro de EPR de un complejo axial de Cu^{2+} . La interacción hiperfina del electrón desapareado con el spin nuclear de ^{63}Cu y ^{65}Cu ($I = 3/2$) conduce al desdoblamiento de cuatro señales.

En conjunto, los valores de g y A proporcionan información sobre la geometría del complejo metal-proteína así como la naturaleza de los ligantes. En el caso de un complejo Cu^{2+} -proteína, tienen valores de g_{\parallel} y A_{\parallel} que son muy sensibles a la naturaleza de los ligantes en posición ecuatorial, y de esa forma se conoce la esfera de coordinación alrededor del centro metálico.²³

Una manera cualitativa de conocer la esfera de coordinación de un sitio de enlace de Cu^{2+} , es a través del gráfico de Peisach-Blumberg que se desarrolló en 1974, el cual correlaciona los valores de g_{\parallel} y A_{\parallel} en función de diferentes ligantes con átomos conocidos como aparecen en la Figura 8.²³ A pesar de que esta correlación o método de determinación del ambiente químico alrededor del Cu^{2+} está justificada por las teorías de campo ligando y cristalino, tiene algunas limitaciones, tales como el traslapamiento de las regiones para diferentes modos de coordinación, los efectos de la distorsión de la geometría cuadrada plana hacia la tetraédrica.

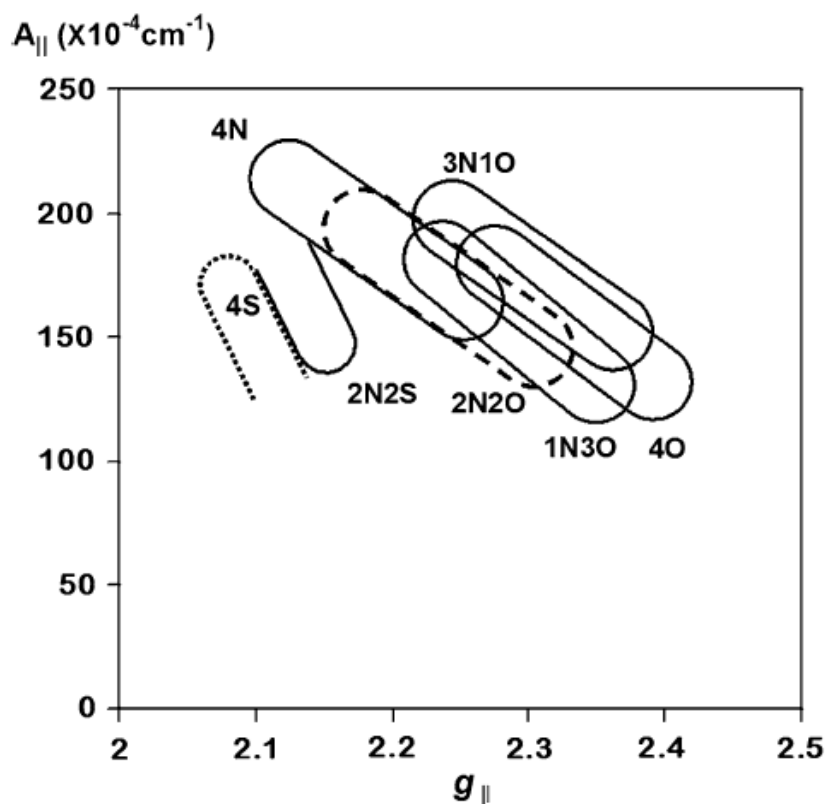


Figura 8. Gráfica de correlación Peisach-Blumberg. Figura tomada de la Ref. ¹⁹

REFERENCIAS

1. Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J., *Química Analítica*. 2001.
2. Solomon, E. I.; Bell III, C. B., Inorganic and Bioinorganic Spectroscopy. In *Physical Inorganic Chemistry. Principles, methods, and models.* , Bakac, A., Ed. Wiley: New Jersey, 2010.
3. Palmer, G., Electron Paramagnetic Resonance of Metalloproteins. In *Physical Methods in Bioinorganic Chemistry Spectroscopy and Magnetism*, Que, L., Ed. University Science Books: California, 2000; pp 121-185.
4. Lawrance, G., Introduction to Coordination Chemistry. In *Inorganic chemistry (John Wiley & Sons)*, Wiley: United Kingdom, 2010; p 290.
5. Roe, J. A.; Shaw, B. F.; Valentine, J. S., Fundamentals of coordination chemistry: Tutorial II. In *Biological inorganic chemistry: structure and reactivity*, Bertini, I.; Gray, H. B.; Stiefel, E. I.; Valentine, J. S., Eds. University Science Books: California, 2007.
6. Bertini, I.; Turano, P., Metal ions and proteins: binding, stability, and folding. In *Biological Inorganic Chemistry Structure & Reactivity*, Bertini, I.; Gray, H. B.; Stiefel, E. I.; Valentine, J. S., Eds. University Science Books: California, 2007; pp 31-41.
7. Quintanar, L.; Rivillas-Acevedo, L., Studying Metal Ion–Protein Interactions: Electronic Absorption, Circular Dichroism, and Electron Paramagnetic Resonance. In *Protein-Ligand Interaction. Methods and applications*, Williams, M. A.; Daviter, T., Eds. Springer: New York, 2013; pp 267-297.
8. Gerloch, M.; Constable, E. G., *Transition Metal Chemistry*. Federal Republic of Germany, 1994.
9. McMillin, D. R., Electronic Absorption Spectroscopy. In *Physical Methods in Bioinorganic Chemistry Spectroscopy and Magnetism*, Que, L. J., Ed. University Science Books: Sausalito, California., 2000.
10. Harris, D. C.; Bertolucci, M. D., Symmetry and Spectroscopy: An Introduction to Vibrational and Electronic Spectroscopy. In Publications, D., Ed. New York., 1978.
11. Johnson, M. K., CD and MCD Spectroscopy. In *Physical Methods in Bioinorganic Chemistry Spectroscopy and Magnetism*, Que, L. J., Ed. University Science Books: California, 2000; pp 233-249.
12. Scott, R. A.; Lukehart, C. M., *Applications of Physical Methods to Inorganic and*

-
-
- Bioinorganic Chemistry*. England, 2007.
13. Miller, A.; Tanner, J., *Essentials of Chemical Biology. Structure and Dynamics of Biological Macromolecules*. In John Wiley & Sons, Ltd.: England, 2008; pp 175-189.
 14. Kelly, S. M.; Jess, T. J.; Price, N. C., *Biochim. Biophys. Acta.* 2005, *1751*, 119-139.
 15. Levine, I. N., La ecuación de Schrödinger. In *Química Cuántica*, Pearson Educación S.A. Madrid, 2001; p 2.
 16. Struve, W. S., *Fundamentals of Molecular Spectroscopy*. Wiley: Canadá., 1989; p 379.
 17. Martin, W. C.; Wiese, W. L., *Atomic Spectroscopy*. In *Atomic, Molecular, and Optical Physics Handbook*, Drake, G. W. F., Ed. American Institute of Physics: New York, 1996; p 137.
 18. Munro, A. W.; McLean, K. J., *Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy*. In *Encyclopedia of Biophysics*, First ed.; Roberts, G. C. K., Ed. Springer: Berlin, 2013; pp 601-606.
 19. Boas, J. F.; Drew, S. C.; Curtain, C. C., *Eur. Biophys. J.* 2008, *37*, 281-294.
 20. Sahu, I. D.; McCarrick, R. M.; Lorigan, G. A., *Biochemistry* 2013, *52*, 5967–5984.
 21. Solomon, E. I.; Hanson, M. A., *Bioinorganic spectroscopy*. In *Inorganic Electronic Structure and Spectroscopy*, Solomon, E. I.; Lever, A. B. P., Eds. Wiley: New York, 1999.
 22. Hales, B. J., *Electron Paramagnetic Resonance (EPR) Spectroscopy*. In *Encyclopedia of Inorganic Chemistry*, Second ed.; King, B., Ed. Wiley: 2005; pp 1-16.
 23. Peisach, J.; Blumberg, W. E., *Arch. Biochem. Biophys.* 1974, *165*, 691-708.

A N E X O

2

DEDUCCIÓN DE ECUACIONES PARA LA DETERMINACIÓN DE pKa

2.1. Dedución de la ecuación 3.1



Donde:

A = especie a bajo pH

B = especie a alto pH

$$ka = \frac{[H^+][B]}{[A]}$$

$$[A] = \frac{[H^+][B]}{Ka}$$

$$[B] = \frac{Ka[A]}{[H^+]}$$

$$[Péptido]_{total} = [A] + [B]$$

Expresando la concentración total de péptido en términos de [B]:

$$[Péptido]_{total} = \frac{[H^+][B]}{Ka} + [B]$$

$$[Péptido]_{total} = \frac{[H^+][B] + Ka[B]}{Ka}$$

$$[Péptido]_{total} = [B] \left\{ \frac{[H^+] + Ka}{Ka} \right\}$$

Despejando:

$$\frac{[B]}{[Péptido]_{total}} = \frac{Ka}{[H^+] + Ka}$$

Esta ecuación da el porcentaje de especies a alto pH, siendo B la especie desprotonada.

Expresando la concentración total de péptido en términos de [A]:

$$[Péptido]_{total} = [A] + \frac{Ka[A]}{[H^+]}$$

$$[Péptido]_{total} = \frac{[A][H^+] + Ka[A]}{[H^+]}$$

$$[Péptido]_{total} = [A] \left\{ \frac{[H^+] + Ka}{[H^+]} \right\}$$

$$\frac{[A]}{[Péptido]_{total}} = \frac{[H^+]}{[H^+] + Ka}$$

Esta ecuación da el porcentaje de especies a bajo pH, siendo A la especie protonada.

Introduciendo la intensidad Y y sustituyendo:

$$Y = \varepsilon_A \frac{[A]}{[Péptido]_{total}} + \varepsilon_B \frac{[B]}{[Péptido]_{total}}$$

$$Y = \varepsilon_A \frac{[H^+]}{[H^+] + Ka} + \varepsilon_B \frac{ka}{[H^+] + ka}$$

$$Y = \frac{\varepsilon_A[H^+] + \varepsilon_B Ka}{[H^+] + Ka}$$

Finalmente, se obtiene la ecuación 3.1

$$\Delta\varepsilon_{obs} = \frac{\Delta\varepsilon_{bajo\ pH}[H^+] + \Delta\varepsilon_{alto\ pH}Ka}{Ka + [H^+]}$$

Donde:

$\Delta\varepsilon_{obs}$ es la intensidad de la señal de CD observada a cualquier pH, K_a es la constante de equilibrio asociada al equilibrio de protonación del complejo péptido-Cu²⁺, $\Delta\varepsilon_{bajopH}$ es la intensidad de la señal de CD asociada a la forma protonada del complejo y $\Delta\varepsilon_{altopH}$ es la intensidad de la señal de CD asociada a su forma desprotonada.

2.2. Deducción de la ecuación 3.2

Para la determinación de 2 valores de pKa tenemos:



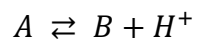
Donde:

A = especie a bajo pH

B = especie a alto pH

C = especie a más alto pH

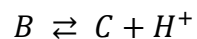
Los equilibrios se pueden expresar como:



$$Ka_1 = \frac{[B][H^+]}{[A]}$$

$$[B] = \frac{Ka_1[A]}{[H^+]}$$

$$[A] = \frac{[B][H^+]}{Ka_1}$$



$$Ka_2 = \frac{[C][H^+]}{[B]}$$

$$[C] = \frac{Ka_2[B]}{[H^+]}$$

$$[B] = \frac{[C][H^+]}{Ka_2}$$

Considerando que $[Péptido]_{total} = [A] + [B] + [C]$

Expresando la concentración total de péptido en términos de $[A]$:

$$[Péptido]_{total} = [A] + \frac{Ka_1[A]}{[H^+]} + \frac{Ka_2}{[H^+]} \frac{Ka_1[A]}{[H^+]}$$

$$[Péptido]_{total} = [A] + \frac{Ka_1[A]}{[H^+]} + \frac{Ka_2Ka_1[A]}{[H^+]^2}$$

$$[Péptido]_{total} = \frac{[A][H^+]^2 + Ka_1[A][H^+] + Ka_2Ka_1[A]}{[H^+]^2}$$

$$[Péptido]_{total} = [A] \left\{ \frac{[H^+]^2 + Ka_1[H^+] + Ka_2Ka_1}{[H^+]^2} \right\}$$

$$\frac{[A]}{[Péptido]_{total}} = \frac{[H^+]^2}{[H^+]^2 + Ka_1[H^+] + Ka_2Ka_1}$$

Esta última ecuación da el porcentaje de la especie protonada.

Expresando la concentración total de péptido en términos de $[B]$:

$$[Péptido]_{total} = \frac{[B][H^+]}{Ka_1} + [B] + \frac{Ka_2[B]}{[H^+]}$$

$$[Péptido]_{total} = \frac{[B][H^+]^2 + [B][H^+]Ka_1 + Ka_2Ka_1[B]}{Ka_1[H^+]}$$

$$[Péptido]_{total} = \frac{[B]\{[H^+]^2 + [H^+]Ka_1 + Ka_2Ka_1\}}{Ka_1[H^+]}$$

$$[Péptido]_{total} = [B] \left\{ \frac{[H^+]^2 + [H^+]Ka_1 + Ka_2Ka_1}{Ka_1[H^+]} \right\}$$

$$[B] = \frac{[Péptido]_{total}}{\left\{ \frac{[H^+]^2 + [H^+]Ka_1 + Ka_2Ka_1}{Ka_1[H^+]} \right\}}$$

$$\frac{[B]}{[Péptido]_{total}} = \frac{1}{\left\{ \frac{[H^+]^2 + [H^+]Ka_1 + Ka_2Ka_1}{Ka_1[H^+]} \right\}}$$

$$\frac{[B]}{[Péptido]_{total}} = \left\{ \frac{[H^+]^2 + [H^+]Ka_1 + Ka_2Ka_1}{Ka_1[H^+]} \right\}^{-1}$$

$$\frac{[B]}{[Péptido]_{total}} = \frac{Ka_1[H^+]}{[H^+]^2 + [H^+]Ka_1 + Ka_2Ka_1}$$

Esta última ecuación da el porcentaje de la primera especie desprotonada.

Finalmente, expresando la concentración total de péptido en términos de [C]:

$$[Péptido]_{total} = \frac{[H^+][C][H^+]}{Ka_1 Ka_2} + \frac{[C][H^+]}{Ka_2} + [C]$$

$$[Péptido]_{total} = \frac{[C][H^+]^2}{Ka_1Ka_2} + \frac{[C][H^+]}{Ka_2} + [C]$$

$$[Péptido]_{total} = \frac{[C][H^+]^2 + Ka_1[C][H^+] + Ka_1Ka_2[C]}{Ka_1Ka_2}$$

$$[Péptido]_{total} = [C] \left\{ \frac{[H^+]^2 + Ka_1[H^+] + Ka_1Ka_2}{Ka_1Ka_2} \right\}$$

$$\frac{[C]}{[Péptido]_{total}} = \frac{1}{\frac{[H^+]^2 + Ka_1[H^+] + Ka_1Ka_2}{Ka_1Ka_2}}$$

$$\frac{[C]}{[Péptido]_{total}} = \frac{Ka_1Ka_2}{[H^+]^2 + Ka_1[H^+] + Ka_1Ka_2}$$

Esta última ecuación da el porcentaje de la segunda especie desprotonada.

Introduciendo la intensidad Y

$$Y = \varepsilon_A \frac{[A]}{[Péptido]_{total}} + \varepsilon_B \frac{[B]}{[Péptido]_{total}} + \varepsilon_C \frac{[C]}{[Péptido]_{total}}$$

Sustituyendo:

$$Y = \varepsilon_A \frac{[H^+]^2}{[H^+]^2 + Ka_1[H^+] + Ka_2Ka_1} + \varepsilon_B \frac{Ka_1[H^+]}{[H^+]^2 + [H^+]Ka_1 + Ka_2Ka_1} + \varepsilon_C \frac{Ka_1Ka_2}{[H^+]^2 + Ka_1[H^+] + Ka_1Ka_2}$$

$$Y = \frac{\varepsilon_A[H^+]^2 + \varepsilon_B K a_1 [H^+] + \varepsilon_C K a_1 K a_2}{[H^+]^2 + K a_1 [H^+] + K a_1 K a_2}$$

Finalmente, se obtienen la ecuación 3.2:

$$\Delta\varepsilon_{obs} = \frac{\Delta\varepsilon_1 2[H^+] + \Delta\varepsilon_2 K a_1 [H^+] + \Delta\varepsilon_3 K a_1 K a_2}{2[H^+] + K a_1 [H^+] + K a_1 K a_2}$$

Donde:

$\Delta\varepsilon_{obs}$ es la intensidad de la señal de CD observada a cualquier pH, $K a_1$ y $K a_2$ son las constantes de equilibrio asociadas a los dos estados de protonación del complejo péptido- Cu^{2+} y $\Delta\varepsilon_1$, $\Delta\varepsilon_2$ y $\Delta\varepsilon_3$ son las intensidades de las señales de CD de las tres diferentes especies con diferentes estados de protonación.

Redox Cycling of Copper–Amyloid β 1–16 Peptide Complexes Is Highly Dependent on the Coordination Mode

Lidia G. Trujano-Ortiz, Felipe J. González, and Liliana Quintanar*

Departamento de Química, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (Cinvestav), Avenida Instituto Politecnico Nacional 2508, San Pedro Zacatenco, 07360 Ciudad de México, D.F., Mexico

Supporting Information

ABSTRACT: Copper (Cu)–amyloid β ($A\beta$) interactions play a role in the etiology of Alzheimer's disease. This work presents a spectroscopic and electrochemical study of two physiologically relevant $A\beta$ –Cu^{II} complexes, as a function of pH and relative Cu– $A\beta$ (1–16) concentrations. Our results reveal that these coordination modes display distinct redox behaviors and provide experimental evidence for the existence of an intermediate Cu^I species. A mechanism for the redox cycling of these complexes is proposed, providing further insight into the redox relevance of $A\beta$ –Cu interactions.

Alzheimer's disease (AD) is the most common neurodegenerative disorder in the world. One of the hallmarks of AD is the presence of extracellular deposits of amyloid β ($A\beta$) peptides,¹ while a high concentration of metal ions such as copper (Cu), zinc (Zn), and iron (Fe) is found in senile plaques.² Moreover, the interaction of $A\beta$ with redox-active metal ions such as Cu^{I/II} and Fe^{II/III} is proposed to play a key role in the production of reactive oxygen species (ROS) and neuronal damage.³ The potential role of metal– $A\beta$ interactions in the etiology of AD has sparked numerous studies on the coordination chemistry of $A\beta$ in the past decade.⁴ On the basis of these studies two different coordination modes that are relevant at physiological pH have been structurally characterized, namely, modes I and II (Figure 1A). Mode I predominates at low pH (~ 6.7), whereas increasing the pH (~ 8.2) favors the formation of mode II. The coordination sphere for mode I involves two His residues at positions 6 and 13 or 14, the N-terminal group and an oxygen-based ligand. Mode II involves a deprotonated amide group (N[−]) that replaces one of the His ligands, while the oxygen-based ligand is assigned to the backbone carbonyl group of Ala2.⁵

The changes in the coordination sphere of Cu^{II} associated with the conversion of mode I to mode II would imply changes in the redox properties of the Cu– $A\beta$ complex, yet information about how the redox potential of the Cu– $A\beta$ complexes changes as a function of pH is still lacking. This study presents a spectroscopic and electrochemical characterization of Cu– $A\beta$ complexes as a function of the pH. We find that these two coordination modes display distinct redox behaviors that reflect the different nature of their coordination spheres.

A titration of $A\beta$ (1–16) with Cu^{II} at pH 7.5, followed by electronic absorption, circular dichroism (CD), and electron paramagnetic resonance (EPR) shows the presence of two

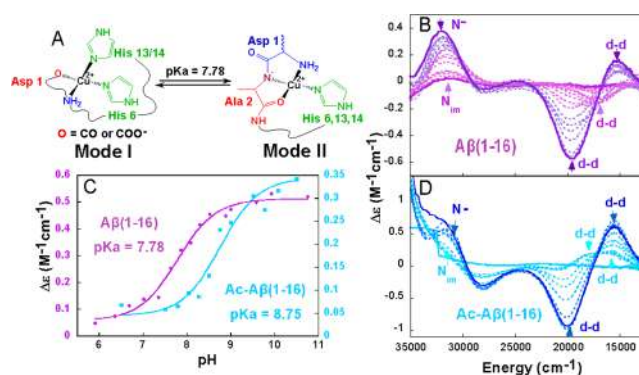


Figure 1. Structural models for Cu^{II}– $A\beta$ (1–16) complexes at physiological pH (A). pH titrations of the Cu^{II} complexes with $A\beta$ (1–16) (B) and Ac– $A\beta$ (1–16) (D) at 0.5 mM with 0.7 equiv of Cu in 100 mM NEM with 100 mM NaCl, as followed by CD: pH 6.0 (light-blue lines) to pH 10.5 (dark-blue lines). pK_a values associated with CD changes at 31000 cm^{−1} for Cu– $A\beta$ (1–16) (purple) and Cu–Ac– $A\beta$ (1–16) (light blue) (C).

distinct species that correspond to coordination modes I and II (Figures S1 and S2 in the Supporting Information, SI). Our results indicate that the relative proportion of modes I and II is highly dependent on the Cu to $A\beta$ (1–16) ratio. Upon the addition of a second Cu equivalent, modification of the EPR spectrum is in line with an increase of the mode II concentration (Figure S2 in the SI), consistent with an earlier study.⁶

Titration of the $A\beta$ (1–16)–Cu^{II} complex by the pH, followed by CD (Figure 1B) and EPR (Figure S3A in the SI) shows that deprotonation drives the conversion of mode I, with a negative ligand-field signal at 17300 cm^{−1} and EPR parameters $g_z = 2.27$ and $A_z = 180 \times 10^{-4}$ cm^{−1}, into mode II, with $g_z = 2.23$ and $A_z = 157 \times 10^{-4}$ cm^{−1}, distinct d–d transitions at 15300 and 20000 cm^{−1}, and an intense ligand-to-metal charge-transfer (LMCT) band at 31900 cm^{−1} (313 nm), associated with an amide N[−]-to-Cu^{II} transition. A pK_a of 7.78 is associated with this conversion (Figure 1C), consistent with previous reports.⁷ A similar effect is observed for the acetylated form of the complex, Ac– $A\beta$ (1–16)–Cu^{II}, because its CD and EPR features change drastically from pH 7 to 9.5, with a pK_a of 8.75 (Figures 1C,D and S3B in the SI). Namely, mode I' (with positive ligand-field transitions at 15600 and 17800 cm^{−1} and EPR parameters $g_z = 2.27$ and $A_z = 183 \times 10^{-4}$ cm^{−1}) turns into a species with distinct d–d

Received: August 15, 2014

Published: December 18, 2014

transitions at 15600 and 20000 cm^{-1} and an amide N^- -to- Cu^{II} LMCT band at 31600 cm^{-1} (316 nm), while the EPR spectrum indicates the presence of two different coordination modes (Figure S3B in the SI). Although the pK_a values and coordination models for the acetylated complex are different from those of the $\text{A}\beta(1-16)\text{-Cu}^{\text{II}}$ complex shown in Figure 1A (see Note 1 in the SI), their comparison is useful to interpret their electrochemical behavior, particularly because in both cases deprotonated amide groups participate in the coordination sphere of copper at pH values higher than their respective pK_a 's [7.78 for $\text{A}\beta(1-16)\text{-Cu}^{\text{II}}$ and 8.75 for the acetylated complex].

Figure 2A shows the cyclic voltammetry (CV) of the $\text{A}\beta(1-16)\text{-Cu}^{\text{II}}$ complex at different pH values, at a Cu to peptide ratio

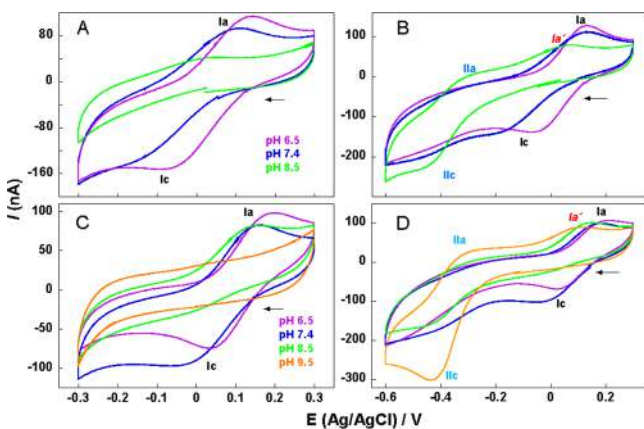


Figure 2. CV of $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-A}\beta(1-16)$ (A and B) and $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-Ac-A}\beta(1-16)$ (C and D) complexes at different pH values and potential ranges. The peptide concentration was 0.4 mM with 0.1 mM Cu^{II} in 10 mM phosphate buffer with 50 mM Na_2SO_4 as the supporting electrolyte. Scan rate: 5 mV s^{-1} .

of 0.25:1. Under these conditions, coordination mode I is prevalent at pH 6.5, where a cathodic peak (Ic) is observed at a potential of approximately -0.076 V, associated with the reduction of the complex, and an anodic peak (Ia) is observed at $\approx +0.140$ V, associated with the oxidation of the complex. This quasi-reversible behavior with a large anodic-to-cathodic peak difference suggests slow electron-transfer kinetics. Still, a formal potential of 0.032 V vs Ag/AgCl (0.255 V vs normal hydrogen electrode, NHE) can be determined for this reaction. This value is consistent with previous reports ranging from 0.28 to 0.30 V vs NHE (Table S1 in the SI).⁸ At higher pH values, the current intensities associated with peaks Ic and Ia decrease, while no current is recorded at pH 8.5 (green trace in Figure 2A). CV recorded in a wider range of potential clearly shows the presence of new cathodic and anodic peaks at pH 8.5 (IIc and IIa; green trace in Figure 2B), where coordination mode II is prevalent. These peaks are significantly shifted to more negative potentials, compared to those associated with coordination mode I observed at lower pH values. The formal potential for coordination mode II is -0.376 V vs Ag/AgCl (-0.153 V vs NHE). Thus, the formal potential associated with the reduction and oxidation of the $\text{A}\beta(1-16)\text{-Cu}^{\text{II}}$ complex shifts to more negative values by ~ 400 mV upon conversion of mode I into mode II. Such a large shift is consistent with having an amide N^- as a ligand for Cu^{II} in mode II (Figure 1A), as observed in other Cu^{II} -peptide systems, such as Cu complexes in the octarepeat region of the human prion protein.⁹ Certainly, a negatively charged hard ligand, such as a deprotonated amide, would provide further stabilization of the

Cu^{II} redox state of the complex, thus lowering its reduction potential.

CV of the $\text{Ac-A}\beta(1-16)\text{-Cu}^{\text{II}}$ complex at different pH values with a Cu-peptide ratio of 0.25:1 shows a similar behavior, except the trend is shifted by approximately one pH unit because of the shift in the pK_a of the complex. At pH 7.4, coordination mode I' is prevalent, and the cathodic (Ic) and anodic (Ia) peaks are observed with an associated formal potential of 0.060 V vs Ag/AgCl (0.283 V vs NHE; Figure 2C). At higher pH values, the intensities of peaks Ic and Ia decrease, while no current is recorded at pH 9.5 (orange trace in Figure 2C), where coordination modes with deprotonated amide groups are prevalent (see Note 1 in the SI). CV recorded in a wider range (orange trace in Figure 2D) leads to the measurement of a formal potential of -0.353 V vs Ag/AgCl (-0.130 V vs NHE). Again, similar to that observed for $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-A}\beta(1-16)$, a decrease of ~ 400 mV is observed upon an increase of the pH, with the concomitant introduction of a deprotonated amide group in the Cu^{II} coordination sphere.

It should be noted that this trend in the reduction potential has been predicted recently by a theoretical study.¹⁰ Alí-Torres et al. calculated the reduction potentials for models of coordination modes I and II. A potential of 0.28 V was calculated for mode I, while their prediction for the reduction potential of mode II is -0.37 to -0.81 V. The authors associate the large shift in the formal potential to the presence of a negatively charged equatorial ligand that stabilizes the Cu^{II} redox state. Moreover, it is important to consider that a Cu-N bond that arises from coordination to an amide N^- is a highly covalent bond, as demonstrated by electronic structure calculations of Cu^{II} -prion complexes.¹¹ Thus, our electrochemical results are consistent with the coordination models for $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-A}\beta(1-16)$ shown in Figure 1A and with the theoretical predictions of Alí-Torres et al., while they also underscore the conclusion that a negatively charged hard ligand, such as a deprotonated amide group, would provide strong stabilization of the Cu^{II} redox state of the complex.

Figure 3 shows a scheme for the redox cycling of the two physiologically relevant coordination modes of $\text{A}\beta(1-16)\text{-Cu}^{\text{II}}$.

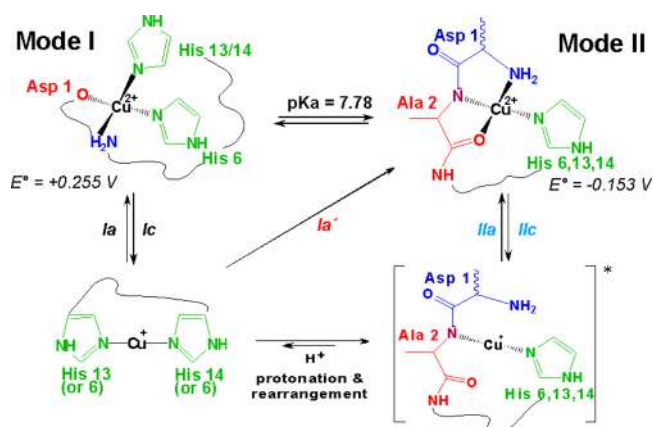


Figure 3. Mechanism for redox cycling of the $\text{Cu-A}\beta$ complex.¹³

The reduced form of this complex has been characterized only at $\text{pH} \approx 7$ by X-ray absorption spectroscopy and NMR, finding that Cu^{I} binds to two His residues in a linear fashion, preferentially using His13 and His14, although the presence of Cu^{I} complexes with combinations of His6 with His13 or His14 cannot be excluded.¹² The large structural changes associated with the

reduction of both coordination modes imply a large reorganization energy, explaining the observed quasi-reversible behavior and slow electron-transfer kinetics.¹³ In fact, in the cases where coordination mode II is prevalent (green trace in Figure 2B and orange trace in Figure 2D), the reoxidation process displays two anodic peaks: the most intense current is registered at peak IIa, associated with the reoxidation of mode II, while a small current is observed at peak Ia', a potential normally associated with reoxidation of mode I. This unusual behavior suggests the existence of two different forms of Cu^I complexes upon the reduction of mode II, which can be detected in our electrochemical experiment (Figure 3). Structural characterization of the reduced form of mode II has not been explored; however, recent computational studies have proposed transient structures that might serve as an intermediary during this reaction.^{4a,10,14} Namely, they find that, upon reduction of mode II, the first ligands to leave the coordination sphere are the N-terminal group and the backbone carbonyl, while a large geometric reorganization must happen to lead to a linear bis-His-Cu^I complex, involving protonation of the amide ligand and inclusion of a second His residue into the metal coordination shell (Figure 3). Although protonation reactions are fast, the geometric rearrangement for the His residue to coordinate Cu^I is predicted to be very slow,^{10,14} slow enough for our experiment to detect the reoxidation of such an intermediate Cu^I complex that readily converts into Cu^{II} coordination mode II at peak IIa, while the linear Cu^I species reoxidizes into Cu^{II} at peak Ia'. Indeed, the intensity of peak Ia' decreases drastically as the scan rate is increased (Figure S4 in the SI), reflecting significantly less accumulation of the rearranged linear Cu^I complex. Thus, our CV experiment provides direct experimental evidence for the existence of an intermediate Cu^I complex upon reduction of the A β (1–16)–Cu^{II} mode II.

In summary, our spectroscopic study reveals that the pH and relative Cu–A β ratio can modulate the population of coordination modes I and II. Electrochemical experiments show that these two A β (1–16)–Cu^{II} modes display very distinct redox behaviors. Considering the reduction potentials of physiologically relevant reducing agents, mode I would suffer reduction under physiological conditions, and thus it could activate oxygen for reduction and ROS production. In contrast, the reduction potential of mode II is very negative, so this species would not be reduced under physiological conditions. A β is present at the synapse, where there are transient changes in pH and copper concentrations.¹⁵ Thus, it is tempting to propose that the availability of the redox-inactive coordination mode II, which can be populated by an increase of the pH and/or Cu concentration, may be a protective mechanism to silence the redox activity of A β –Cu complexes. Interestingly, several naturally occurring N-terminal modifications of A β result in a lower pK_a for the conversion of mode I to mode II,¹⁶ and they may constitute a biological mechanism to silence the redox activity of A β –Cu complexes. Conversely, acidosis has been implicated in AD,¹⁷ and the low pH in the AD brain would favor the presence of the redox-active A β (1–16)–Cu^{II} mode I, potentially causing further oxidative damage.

■ ASSOCIATED CONTENT

■ Supporting Information

Experimental methodology, Figures S1–S4, and Table S1. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: lilianaq@cinvestav.mx. Phone: +52-55-57473723.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

This research was funded by ICyTDF (Grant PIFUTP08-161) and CONACYT (Grants J48781Q and CB2009-128255 to L.Q. and a Ph.D. fellowship to L.G.T.-O.).

■ REFERENCES

- (1) Glenner, G. G.; Wong, C. W. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1984**, *120*, 885–890.
- (2) Bush, A. I. *Trends Neurosci.* **2003**, *26*, 207–214.
- (3) Kozłowski, H.; et al. *Coord. Chem. Rev.* **2009**, *253*, 2665–2685.
- (4) (a) Faller, P.; et al. *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 2252–2259. (b) Karr, J. W.; et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13534–13538.
- (5) (a) Hureau, C. *Coord. Chem. Rev.* **2012**, *256*, 2164–2174. (b) Hureau, C.; Dorlet, P. *Coord. Chem. Rev.* **2012**, *256*, 2175–2187.
- (6) Alies, B.; et al. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 1501–1508.
- (7) Alies, B.; et al. *Inorg. Chem.* **2011**, *50*, 1192–11201.
- (8) (a) Balland, V.; et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, *107*, 17113–17118. (b) Jiang, D.; et al. *Biochemistry* **2007**, *46*, 9270–9282.
- (9) (a) Bonomo, R. P.; et al. *Chem.—Eur. J.* **2000**, *6*, 4195–4202. (b) Zhou, F.; Milhauser, G. L. *Coord. Chem. Rev.* **2012**, *256*, 2285–2296.
- (10) Ali-Torres, J.; et al. *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 4840–4850.
- (11) (a) Quintanar, L.; et al. *Coord. Chem. Rev.* **2013**, *257*, 429–444. (b) Rivillas-Acevedo, L.; et al. *Inorg. Chem.* **2011**, *50*, 1956–1972.
- (12) (a) Hureau, C.; et al. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2009**, *14*, 995–1000. (b) Shearer, J.; et al. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 9137–9139. (c) Shearer, J.; Szalai, V. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 17826–17835.
- (13) Note that a mechanism involving preorganized Cu^{II}/Cu^I structures for the processes Ia and Ic have been described in ref 8a.
- (14) Furlan, S.; et al. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 11899–11910.
- (15) (a) Que, E. L.; et al. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 1517–1549. (b) Scheiber, I. F.; et al. *Prog. Neurobiol.* **2014**, *116*, 33–57.
- (16) Alies, B.; et al. *Inorg. Chem.* **2012**, *51*, 12988–13000.
- (17) Yates, C. M.; et al. *J. Neurochem.* **1990**, *55*, 1624–1630.

Supporting Information

Redox Cycling of Copper-Amyloid- β 1-16 Peptide Complexes Is Highly Dependent on Coordination Mode

*Lidia G. Trujano-Ortiz, Felipe J. González, Liliana Quintanar**

Departamento de Química, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (Cinvestav)

* To whom correspondence should be addressed:

Liliana Quintanar

Departamento de Química, Cinvestav

Av. Instituto Politécnico Nacional No. 2508,

Col. San Pedro Zacatenco,

México, 07360, D.F.

Mexico City

Phone: +52-55-57473723

Fax: +52-55-57473389

lilianaq@cinvestav.mx

Experimental Section

N-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) protected amino acids, Fmoc-Rink amide AM resin, and the hydroxybenzotriazole (HOBt) were obtained from Novabiochem (Switzerland); N,N-dimethylformamide (DMF) peptide synthesis grade was obtained from Fermont; N,N-diisopropylethylamine (DIEA), pyridine, N,N-diisopropylcarbodiimide (DIC), trifluoroacetic acid (TFA), tris(isopropyl)silane (TIS), ethanedithiol (EDT), acetonitrile (HPLC grade) and piperidine were obtained from Sigma (Saint Louis). All other chemicals were reagent grade and used without further purification. Water was purified to a resistivity of 18 M Ω /cm using a Millipore Gradient deionizing system.

Peptide Synthesis and Purification. The following amyloid β peptide fragments (A β) were synthesized by solid-phase synthesis and Fmoc strategy (Kates, E.; Albericio, F., *Solid-Phase Synthesis*. Marcel Dekker Inc: New York, 2000; and Hood, C. A., et al., *J. Pept. Sci.* **2008**, *14*, 97–101), using Fmoc- Rink amide AM resin and MBHA resin: A β (1-16) with sequence DAEFRHDSGYEVHHQK, A β (1-16/Y10F) DAEFRHDSGFVHHQK, and Ac-A β (1-16) with sequence Ac-DAEFRHDSGYEVHHQK. All peptides were amidated at the carboxylic terminal, while only the Ac-A β (1-16) peptide was acetylated at the amino terminus. Crude peptides were purified by semipreparative reversed phase high performance liquid chromatography (HPLC). Peptide purity was determined by analytical HPLC and was found to be >95%. The molecular weight of each peptide was determined by electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS), and all purified products presented the expected molecular mass.

Preparation of Peptide Samples. Peptide solutions were prepared in 100 mM of N-ethylmorpholine (NEM) with 100 mM NaCl at a final concentration of 0.5 mM for spectroscopic experiments. For pH titrations, the pH was adjusted to the desired value by adding small volumes

of NaOH or HCl solutions, and measuring the pH with a pHmeter equipped with a micro-electrode; pH was always adjusted right before spectroscopic or electrochemical measurements. Peptide samples for EPR spectroscopy were prepared at the same concentration, in buffer with 50% glycerol to achieve adequate glassing. The addition of glycerol has no effect in the structure of the Cu(II)-peptide complexes, as evaluated by absorption and circular dichroism spectroscopy for all pH values used in this study. The absorption coefficient for each peptide at 215nm around was determined in each buffer solution at pH 7.5. These absorption coefficients were used to determine the concentration of peptide in each sample that was analyzed.

Absorption and Circular Dichroism (CD) Spectroscopy. Room temperature absorption and CD spectra were recorded using an Agilent 8453 diode array spectrometer and a Jasco J-815 CD spectropolarimeter, respectively. Spectra were recorded in quartz cells with either 1 or 0.1 cm path lengths. CD spectra were collected under the following conditions: 200 and 830 nm sampling points every 2 nm.

Electron Paramagnetic Resonance (EPR) Spectroscopy. X-band EPR spectra were collected using an EMX Plus Bruker System, with an ER 041 XG microwave bridge and an ER 4102ST cavity. The following conditions were used: microwave power, 10 mW; modulation amplitude, 5 G; modulation frequency, 100 kHz; time constant, 327 ms; conversion time, 82 ms; and averaging over 12 scans. EPR spectra were recorded at 150K, using a ER4131VT variable temperature nitrogen system.

Cyclic Voltammetry (CV). CV experiments were performed at room temperature using a Voltalab potentiostat PGZ 100 in a three electrode arrangement with a Ag/AgCl reference electrode, a platinum wire as the auxiliary electrode, and a glassy carbon electrode (GCE, 3 mm diameter) as the working electrode; the latter was polished with 0.3 μm alumina powder on a

cloth polishing pad and washed with water and ethanol under sonication. Phosphate buffer (10 mM) was used with Na₂SO₄ (50 mM) as the supporting electrolyte. Argon was used to maintain inert conditions during the experiments. For data shown in figure 2, total peptide concentration was 0.4 mM with 0.1 mM Cu(II), yielding a copper to peptide ratio of 0.25, while the potential scan rate was 0.005 Vs⁻¹. The use of low concentrations makes significant the contribution of the capacitive current ($I \propto \nu$) over the faradaic processes ($I \propto \nu^{1/2}$); hence, the need to use a very low scan rate. On the other hand, a low copper to peptide ratio was used in order to assure that coordination mode I is the most abundant species at low pH. CD and EPR data indicate that at Cu:peptide ratios higher than 0.6, a more significant amount of mode II can be observed. Also, at Cu:peptide ratios close to 1 or 1.2, some small amount of free Cu(II) in buffer solution can be detected by EPR. Avoiding the presence of free Cu(II) is particularly important at low pH values, as Cu(II) in buffer solution yields cyclic voltammetry traces that are also pH dependent, with associated formal reduction potential of -0.076 V vs Ag/AgCl (+0.147 V vs NHE) at pH 6.5 and 7.5, while no signals are observed at higher pH values (8.5 and 9.5). Thus, even a small amount of free Cu(II) in solution could complicate the analysis of the electrochemical data, particularly at low pH. Therefore, with a 0.25 Cu(II) to 1 peptide ratio we can assure that the CV response at low pH would only correspond to mode I, and that at any pH, the CV signals would correspond to Cu(II) bound to the peptide. Finally, in order to study the effect of the scan rate in the CV experiments, the peptide concentration was increased to 1.2 mM, keeping the same 0.25:1 Cu:peptide ratio, i.e. with Cu(II) 0.3 mM (Figure S4). This was done to avoid the relevant contribution of capacitive currents and hence, increase the resolution.

Note 1. Assignment of pKa values and coordination modes for the acetylated complex: Ac-A β (1-16)-Cu(II).

While the pKa of the A β (1-16)-Cu(II) complex is 7.8, and it has been ascribed to the conversion of mode I into mode II (as shown in Figure 1A and also reported by Alies et al in ref 7), a different scenario is observed for the Ac-A β (1-16)-Cu(II) complex. For the acetylated complex, different pKa values have been reported. Alies et al in ref 7 (and revisited with other N-terminal modified peptides in ref 16) report that the acetylated complex has a pKa of 5.2 associated to the conversion of mode I' into mode II', a second pKa of 7.5 associated to conversion of mode II' into mode III', while the pKa of 8.7 is assigned to the conversion of mode III' into IV'. The authors use a prime (') to denote that the coordination modes display different EPR parameters from those of the A β (1-16)-Cu(II) modes, and hence, reflecting some differences in the coordination sphere of copper, due to the acetylation of the N-terminal. In both cases, A β (1-16)-Cu(II) and Ac-A β (1-16)-Cu(II), modes II and II' have been associated to coordination models that involve a deprotonated amide group, while modes III and III' correspond to species with two deprotonated amides. However, the pKa assignments concluded by Alies et al. would mean that an acetylated complex would majorly populate a coordination mode II' with a deprotonated amide at pH values between 5.2 and 7.5. Our electrochemical results are not consistent with such interpretation for the acetylated peptide. As we discuss in our manuscript, the main change in copper coordination that explains the drastic decrease in reduction potential is the involvement of a deprotonated amide in the coordination sphere. This conclusion is further supported by the electrochemical studies of other well-characterized copper systems, such as the Cu complexes with octarepeat prion fragments (ref 9) and theoretical studies that predict such as decrease in reduction potential when a deprotonated amide is introduced in the coordination sphere (Ref 10). Moreover, the EPR parameters of the coordination mode termed II' for the acetylated complex

by Alies et al ($g_z = 2.27$ and $A_z = 183 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$) are quite close to those of mode I in Cu(II)-A β ($g_z = 2.27$ and $A_z = 180 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$). Thus, we propose that the pKa of 5.2 for the acetylated complex is associated to the formation of mode I', while the pKa values of 7.5 and 8.7 observed by EPR by Alies et al would correspond to the conversions of mode I' into mode II', and mode II' into III', respectively. We did not perform a detailed EPR study of the acetylated complex as a function of pH, hence we have not corroborated the pKa of 7.5 reported by Alies et al. However, we do detect by CD the pKa of 8.7 associated to a drastic increase in the ligand to metal charge transfer band associated to deprotonated amide to Cu(II) transition, consistent with the reports of Alies et al. The alternative assignment of the pKa of 7.5 to the formation of mode II' would be consistent with our electrochemical results, where the CV of the acetylated complex at pH 7.4 (blue trace in figure 2D) does show a small current at -0.35 V, suggesting the presence of a species with a deprotonated amide. The effect is also seen at pH 8.5 (green trace in Figure 2D), while at pH 9.5, the acetylated complex would have a mixture of mode II' and mode III' (in fact this is evident from the EPR data in Figure S3), explaining the very large current at -0.35 V (orange trace, Figure 2D). This would actually imply that the electrochemical behavior of coordination mode III' is fairly similar to that of mode II', consistent with both modes having deprotonated amides. However, considering that coordination mode III is not physiologically relevant (as it would not be populated at physiological pH 7.4), we did not pursue further electrochemical characterization of this coordination mode). Finally, it should be noted that the different pKa values observed for the acetylated complex are likely to be due to the different stabilizing properties of a His residue in comparison to the amino terminal group.

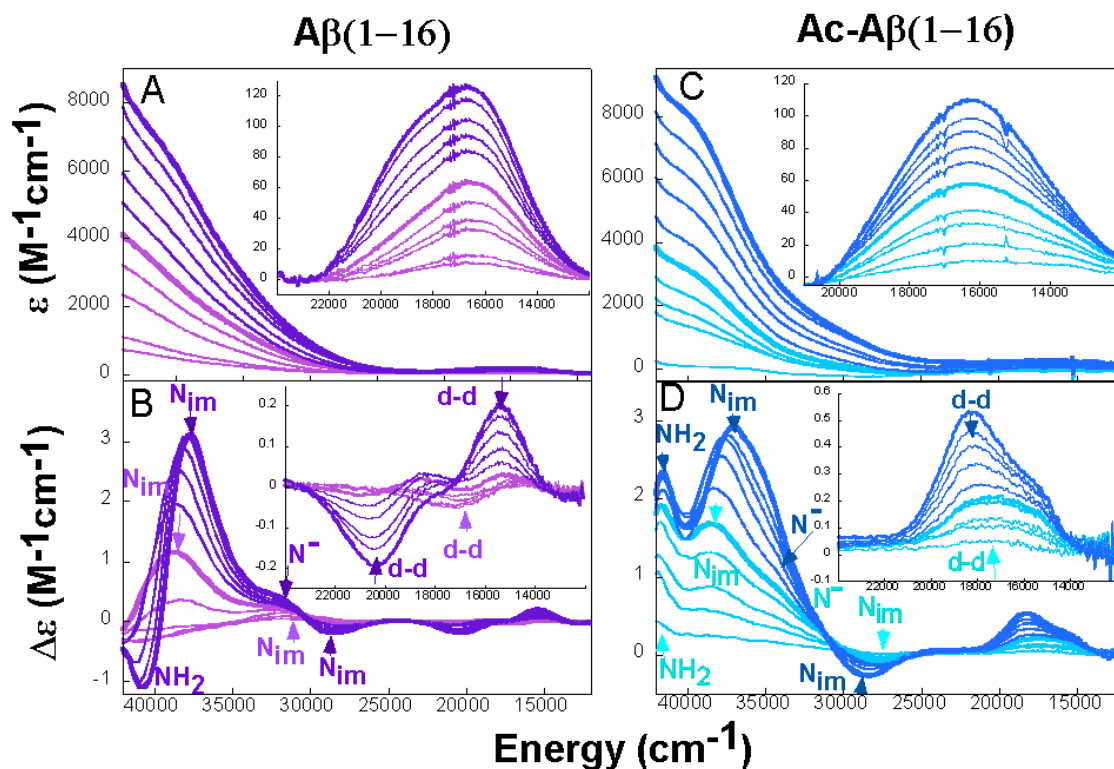


Figure S1. Titration of Aβ(1-16) 0.5 mM (A&B) and Ac-Aβ(1-16) 0.5 mM (C&D) with Cu(II) as followed by UV-Vis absorption (A, C, and E respectively), and circular dichroism (B, D, and F respectively) at pH 7.5. Spectra recorded after the addition of 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 (in light colored lines), 1.2, 1.4, 1.6, 1.8 eq. (in darker lines), and 1.0 and 2.0 eq. (solid lines) of Cu(II) are displayed. A close-up of the lower energy region is shown in the inset for each figure. In the titration of Aβ(1-16), it is clear that the relative proportion of mode II increases upon addition of a second Cu equivalent. A comparable effect is also observed in the acetylated form of the Aβ peptide, Ac-Aβ(1-16), although the spectral features of the Cu(II)-peptide complex at pH 7.4 are different than those for the Aβ(1-16) peptide with a free N-terminal group.

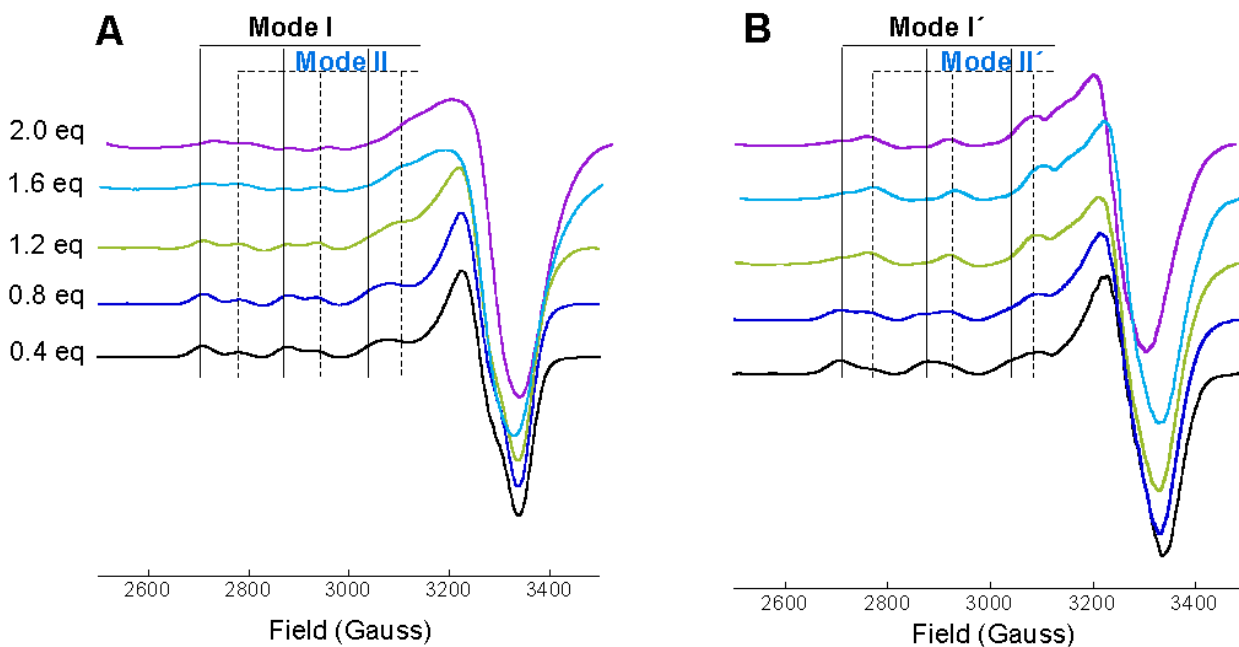


Figure S2. Titration of A β (1-16) 0.5 mM (**A**) and Ac-A β (1-16) 0.5 mM (**B**) with Cu(II), as followed by EPR at pH 7.5. All spectra were collected as described in the experimental section at 150 K. Solid and dotted lines indicate the signals associated to coordination modes I and II for A β (1-16), respectively. Note that the relative intensity of mode II signals increases with the number of Cu equivalents. A comparable effect is also observed in the acetylated form of the A β peptide, Ac-A β (1-16), although the modes are referred to as mode I' and II' (see Note 1).

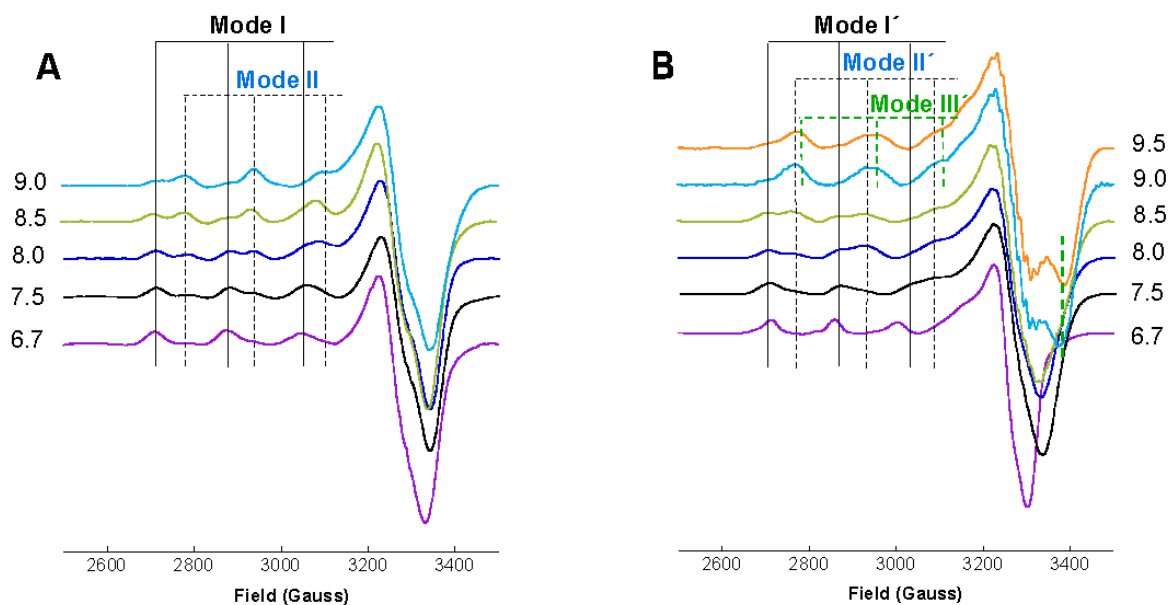


Figure S3. EPR spectra of Cu(II) bound to A β (1-16) (**A**) and to Ac-A β (1-16) (**B**) at different pH values and with 0.4 eq. of Cu(II), i.e. total concentration of peptide was 0.5 mM and total concentration of Cu(II) was 0.12 mM. All spectra were collected as described in the experimental section at 150 K. Solid and dotted lines indicate the signals associated to coordination modes I and II for A β (1-16), respectively (modes I' and II' for Ac-A β (1-16), see Note 1). Note that in both cases, the relative intensity of mode II signals increase with pH. In the case of the acetylated complex, at higher pH values, there is also evidence for the presence of mode III', a species with two deprotonated amide groups (dotted green lines in Figure S3B, see Note 1).

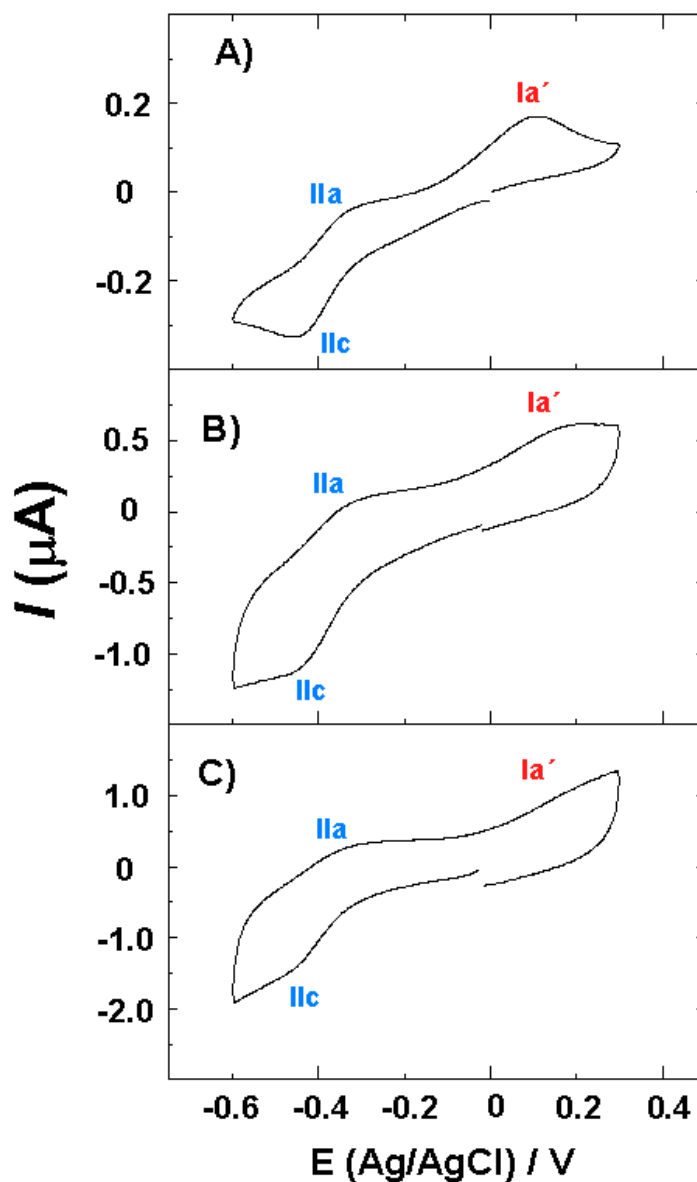


Figure S4. Cyclic Voltammetry of the Cu(II)-A β (1-16) complex at different scan rates: 5 mV/s (A); 100 mV/s (B); and 200 mV/s (C). Total peptide concentration was 1.2 mM with 0.3 mM Cu(II). The intensity of the peak Ia' decreases drastically upon increasing the scan rate, reflecting that the intermediate Cu(I) complex formed upon reduction of mode II (peak Ilc) does not have enough time to be transformed into a significant amount of the rearranged linear bis-His Cu(I) complex structure. Although protonation reactions are fast, the geometric rearrangement

associated to this process must be slow relative to the scan rates used in this experiment. These results are in agreement with the mechanism proposed in Figure 3.

Table S1. Reduction potentials reported for the Cu(II)-A β complex.^a

Experimental or Theoretical conditions	Reduction potential vs. NHE	Ref.
A β (1-42) in PBS buffer pH 7.3	770 mV	Huang, X., et al, <i>J. Biol. Chem.</i> 1999 , 274, 37111–37116.
A β (1-16) in 50 mM TRIS buffer, 0.1 M NaCl, pH 7.4	90 mV	Guilloreau, L., et al, <i>Chem. Bio. Chem</i> 2007 , 8, 1317 – 1325.
A β (1-16), (1-28), (1-40) and (1-42), in 10 mM phosphate buffer, 0.1 M Na ₂ SO ₄ pH 7.4	277 mV	Jiang, D., et al, <i>Biochemistry</i> 2007 , 46, 9270-9282.
A β (1-16) in 25 mM PIPES buffer, 0.2 M KCl, pH 6.7	300 mV	Balland, V., et al., <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 2010 , 107, 17113-17118.
Theoretical Study: A β (1-16) Mode I (as shown in Figure 1A with His6 and His13)	280 mV	Alí-Torres, J., et al., <i>J. Phys. Chem. B</i> 2014 , 118, 4840-4850.
Theoretical Study: A truncated model for Mode I	300 mV	Azimi, S. and Rauk, A. <i>Int. J. Alzh. Dis.</i> 2011 , ID 539762
Theoretical Study: A β (1-16) Mode II (as shown in Figure 1A with His6)	-370 mV to -810 mV (depending on geometry optimization)	Alí-Torres, J., et al., <i>J. Phys. Chem. B</i> 2014 , 118, 4840-4850.

^aNote that the studies reporting 770 and 90 mV fall out of the converged value of ~300 mV for mode I, thus these two references were not included in the main text of the manuscript.