

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**“Estudio espectroscópico de la coordinación de Cu(II) a
fragmentos del péptido amilina y de la proteína prion ”**

T E S I S

Que presenta:

MAGDA CAROLINA SÁNCHEZ LÓPEZ

Para obtener el grado de
DOCTORA EN CIENCIAS

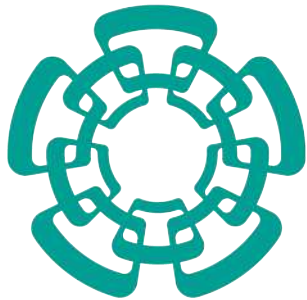
EN LA ESPECIALIDAD DE
CIENCIAS QUÍMICAS

Directora de la Tesis:

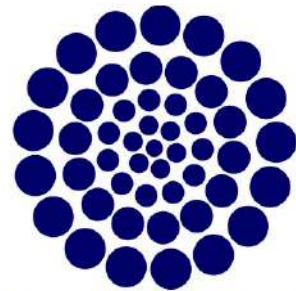
Dra. Liliana Quintanar Vera

Ciudad de México

Marzo, 2017



Cinvestav



CONACYT

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Química del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de la Dra. Liliana Quintanar Vera, con el apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través de la beca doctoral otorgada 245139, los proyectos de investigación básica 221134, 128255 y 128411, así como la beca mixta 2014-Mzo2015 movilidad en el extranjero (290842) de CONACYT.

Parte de esta tesis se llevó a cabo durante una estancia de investigación en el Laboratorio Max Planck de Biología Estructural, Química y Biofísica Molecular de Rosario, Instituto de Investigaciones para el Descubrimiento de Fármacos de Rosario, Argentina a cargo del Dr. Claudio O. Fernández.

Agradecimientos

A la **Dra. Liliana Quintanar Vera**. Muchas gracias por haberme guiado durante el desarrollo de este trabajo. Por ser parte de su grupo de investigación, por compartir su experiencia y conocimientos y ayudar a mi formación. Por permitirme compartir el trabajo doctoral en diferentes foros nacionales e internacionales. Por el apoyo brindado durante estos años. Por enseñarme lo divertida, apasionante y sobre todo lo interesante que resulta ser la investigación de la química bioinorgánica.

Al **Dr. Claudio O. Fernández**. Gracias por darme la oportunidad de realizar una estancia de investigación bajo su mando en el Laboratorio Max Planck de Biología Estructural, Química y Biofísica Molecular de Rosario, Instituto de Investigaciones para el Descubrimiento de Fármacos de Rosario, Argentina. Por su amable hospitalidad en el instituto y por brindarme la oportunidad de explorar nuevas herramientas en la investigación de la química bioinorgánica.

Al **Dr. Andres Binolfi**. Agradezco mucho a Andres por todo el conocimiento compartido durante seis meses de mi estancia en Argentina. Por el apoyo en la discusión no sólo del artículo, sino también de este trabajo. Asimismo a **Marco C. Miotto** por su gran ayuda durante el desarrollo de mi estancia.

Al **Dr. Jorge Martín del Campo** así como a **Rodrigo Cortés-Mejía**. Gracias por su colaboración en la parte de los cálculos de estructura electrónica, que sin duda, fueron de gran aporte para la discusión de los datos experimentales.

Al **Dr. Aarón Rojas Aguilar** así como a **Octavio Cruz-Vásquez**. Gracias por su colaboración en los estudios de calorimetría, los cuales complementaron parte de este trabajo.

A la **Dra. Lina Rivillas Acevedo**. Gracias por su disposición, asesoramiento y discusión al inicio de mi doctorado

A los sinodales:

Dra. María de Jesús Rosales Hoz

Dr. Alberto Vela Amieva

Dr. Felipe de Jesús González Bravo

Dr. José Federico del Río Portilla

Dr. Alejandro José Vila

Muchas gracias por su tiempo y dedicación en la revisión de la tesis, y por sus invaluable aportaciones que ayudaron a enriquecer, sin duda, mucho este trabajo.

Agradezco la colaboración a los auxiliares de investigación **Atenea Villegas Vargas** por su apoyo en el laboratorio, y a **Geiser Cuéllar Rivera** por su apoyo en la espectrometría de masas.

Gracias a los bibliotecarios **Alicia Hernández Monroy, Gonzalo Trejo Santamaría, Belem García Villegas** y **Alejandra Rodríguez García** por el apoyo brindado durante mi estancia en el departamento de química.

Asimismo, agradezco al personal técnico **Gabina Dionisio Cadena (principalmente)** y a **Alex Estrella Cuéllar** y **Antonio Gómez Pérez**.

De igual forma, agradezco a **Noemi Munguía Delgado** por apoyo secretarial y a **Gloria León Maturano** por apoyo secretarial por la Coordinación Académica.

Agradezco extensivamente a mis compañeros de laboratorio: **Triny, Yan, Toño, Esaú, Luis Alberto, Marypaz, Atenea, Gabi, Luis Blancas, Maru** por compartir conocimiento, discusiones y sobre todo amistad.

Gracias a mis compañeros de generación **Ely, Triny, Aldo, Miguel y Peter**, que sin duda se convirtieron en amigos y ya son parte de mi familia. A los anexados **Tavo, Gabo, Denhy, Anita, May, Claus**, con los que también compartí momentos importantes.

Agradezco a las personas que hicieron mi estancia en Rosario, Argentina una experiencia amena, satisfactoria, pero sobre todo alegre **Andres Binolfi, Marco Miotto, Caterina Masaracchia, Ariel Valiente, María Chesta, Timo Strohaecker, Pablo Santa Cruz**.

Agradecimientos Especiales

Quiero hacer un agradecimiento muy especial y enorme a mi tía **Laura** y a **Memes**, los cuales me han apoyado incondicionalmente hoy y siempre, y que en esta etapa de mi vida fueron participes muy importantes durante todo mi proceso doctoral, de verdad muchas gracias por todo. A **Irari** y a **Mextli** por compartir su espacio, sus padres y sobre todo su alegría a la vida.

A mi hermosa mami **Estela** que siempre me ha apoyado en todo y ha creído y confiado en mí, y me ha apapachado y dado ánimos en todo momento. A mi papá **Pedro** por su apoyo y confianza. A mi hermano **Isra** por haber influido positivamente en mí de pequeña.

A mi lindo **Peter**, por apoyarme en todo, por ser amigo, novio, cómplice y equipo en mi vida. Por hacerme sentir feliz cada día y estar a mi lado, incluso cuando físicamente se está lejos. Gracias por hacerme sonreír siempre.

A todas aquellas personas que hacen grande mi vida y son, han sido y serán parte importante en esta y otras etapas de mi vida, es decir, gracias a toda mi **familia** (especialmente a mi primo **Alonso**) y a todos mis **amigos** (especialmente a **Mony** y a **Jess**).

Publicaciones y participación en congresos nacionales e internacionales

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesis dieron como resultado las siguientes publicaciones:

Copper Coordination Features of Human Islet Amyloid Polypeptide: The Type 2 Diabetes Peptide. **Sánchez-López, C.**, Cortés-Mejía, R., Miotto, M. C., Binolfi, A., Fernández, C. O., Del Campo, J. M., Quintanar, L. *Inor. Chem.* 2016, 55, 10727-10740.

Structural Basis for the Inhibition of Truncated Islet Amyloid Polypeptide Aggregation by Cu(II): Insights into the Bioinorganic Chemistry of Type II Diabetes. Rivillas-Acevedo, L.; **Sánchez-López, C.**; Amero, C.; Quintanar, L. *Inorg. Chem.* 2015, 54, 3788-3796.

Biophysical and morphological studies on the dual interaction of non-octarepeat prion protein peptides with copper and nucleic acids. Chaves, J. A.; **Sánchez-López, C.**; Gomes, M. P.; Sisnande, T.; Macedo, B.; de Oliveira, V. E.; Braga, C. A.; Rangel, L. P.; Silva, J. L.; Quintanar, L.; Cordeiro, Y. J. *Biol. Inorg. Chem.* 2014, 19, 839-851.

Parte de este trabajo ha sido presentado en los siguientes foros:

- Primer Congreso Latinoamericano de Enfermedades Priónicas (Latin Prion). Puebla, México. 25-27 de enero de 2012.
Modalidad: Cartel
- Taller-Congreso: 2nd Penn State Bioinorganic Workshop. Pennsylvania, E.U.A. 31 de mayo-9 de junio de 2012.
Modalidad: Cartel
- Congreso: 6° Encuentro de Química Inorgánica (EQI). Puebla, México. 25-28 de junio de 2013.
Modalidad: Cartel
- Simposio: Impacto de la Química de Coordinación en 100 años. Distrito Federal, México. 3-4 de diciembre de 2013.
Modalidad: Cartel

•Congreso y Taller: Cuarto Congreso de la Rama de Físicoquímica, Estructura y Diseño de Proteínas. 3rd USA-Mexico Workshop in Biological Chemistry: Protein Folding, Dynamics and Function. Guanajuato, México. 5-9 de noviembre de 2013.

Modalidad: Oral

•Congreso: Gordon Research Conferences, Metals in Biology (GRC). Ventura CA, E.U.A. 26-31 de enero de 2014.

Modalidad: Cartel

•Seminarios: Gordon Research Seminars, Bioinorganic Chemistry (GRS). Ventura CA, E.U.A. 30 de enero al 02 de febrero de 2014.

Modalidad: Cartel

•Congreso: IV Latin American Meeting on Biological Inorganic Chemistry (IV LABIC), V Argentinean Workshop on Bioinorganic Chemistry. Chascomús, Argentina. 5-8 de agosto de 2014.

Modalidad: Oral y Cartel

•Congreso: Segundo Congreso Latinoamericano de Enfermedades Priónicas (Latin Prion) Puebla, México. 24-26 de septiembre de 2014.

Modalidad: Oral

•Seminarios: Gordon Research Seminars, Bioinorganic Chemistry (GRS). Ventura CA, E.U.A. 29 de enero al 01 de febrero de 2015.

Modalidad: Cartel

•Congreso: 17th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (ICBIC). Beijing, China. 20-24 de julio de 2015.

Modalidad: Cartel

•Congreso: 5° Congreso de la Rama de Físicoquímica, Estructura y Diseño de Proteínas de la SMB y 4th International Workshop Frontiers in Protein Folding, Evolution and Function. Oaxaca, México. 3-7 de noviembre de 2015.

Modalidad: Cartel

• Congreso: V Latin American Meeting on Biological Inorganic Chemistry (V LABIC). Santiago de Querétaro, México. 18-22 de octubre de 2016.

Modalidad: Poster y Poster Blitz

Contenido

Índice	i
Resumen	v
Abstract	viii
Abreviaturas	xi
Introducción	xiii
Capítulo 1. Interacción del Cu(II) con el péptido amilina o hIAPP: coordinación y efecto en su agregación amiloide	1
Antecedentes	1
Diabetes Tipo 2 y hIAPP.....	1
Zinc y hIAPP.....	3
Cobre y hIAPP.....	4
Coordinación de Cu(II) a hIAPP	7
Objetivos	9
Resultados y Análisis	10
Coordinación de Cu(II) a hIAPP.....	10
Direccionalidad en el sitio de coordinación.....	10
Coordinación de Cu(II) al fragmento hIAPP(18-22)	14
hIAPP(18-22) como modelo de unión a Cu(II)	14
Papel de la His18 en la coordinación de Cu(II) a hIAPP y su efecto inhibitorio en la agregación.....	18
Identificación de las amidas del enlace peptídico involucradas en la unión de Cu(II) a hIAPP(18-22)	22
Evaluando el papel de los grupos hidroxilo de los residuos de serina 19 y serina20 en la unión de Cu(II) a hIAPP(18-22)	24
Evaluando el papel de las asparaginas 21 y 22 en la unión de Cu(II) a hIAPP(18-22)..	26
Identificación de la segunda especie en la unión de Cu(II) a hIAPP(18-22)	28
Cálculos de estructura electrónica del complejo Cu-hIAPP(18-22).....	30



Modelos de coordinación Cu(II)-hIAPP.....	31
Cu(II) unido a los agregados de hIAPP.....	32
Discusión y Conclusiones.....	35
Perspectivas.....	40
Referencias.....	41
Capítulo 2. Coordinación de Cu(II) al fragmento hPrP(92-115) de la proteína prion humana.	
Rol de las metioninas en la unión a dos sitios de coordinación.....	44
Antecedentes.....	44
Proteína prion y enfermedades priónicas.....	44
Unión de Cu(II) a la PrP ^C	46
Objetivos.....	52
Resultados y Análisis	53
Características espectroscópicas de Cu(II) unido a His96 y 111 en el fragmento hPrP(92-115).....	53
Dependencia de pH en la coordinación de Cu(II) a hPrP(92-115).....	56
Espectroscopia de CD como herramienta para estimar los porcentajes de unión de Cu(II) a cada sitio: His96 e His111).....	62
Papel de los residuos de Met109 y 112 en la coordinación de Cu(II) a hPrP(92-115).64	
Efecto de Met109 y 112 en los porcentajes de unión de Cu(II) a cada sitio: His96 e His111.....	72
Efecto de la unión de Cu(II) en la afinidad a hPrP(92-115)	75
Discusión y Conclusiones.....	77
Perspectivas.....	83
Referencias.....	84

Capítulo 3. Coordinación de Cu(II) a los fragmentos C1 y C2 de los cortes α- y β-proteolíticos de la proteína prion humana.....	87
Antecedentes.....	87
Cortes proteolíticos de la PrPC.....	87
Corte α -proteolítico.....	88
Corte β -proteolítico.....	89
Objetivos.....	91
Resultados y Análisis	92
hPrP(111-115): un modelo para el fragmento C1 del corte α -proteolítico.....	92
Modelos de coordinación Cu(II)-hPrP(111-115).....	100
hPrP(90-115): un modelo para el fragmento C2 del corte β -proteolítico	102
Propuestas de modelos de coordinación de Cu(II) al fragmento hPrP(90-115)	110
Discusión y Conclusiones.....	111
Perspectivas.....	116
Referencias.....	117
Capítulo 4. Interacciones alostéricas de la Proteína Prion: Cu(II) y ácidos nucleicos.....	119
Antecedentes.....	119
Interacciones alostéricas de la PrP ^C	119
Objetivos.....	122
Resultados y Análisis	121
Coordinación de Cu(II) a la His111 en los fragmentos 106-126 y 109-149.....	123
Fragmento hPrP(106-126).....	123
Fragmento hPrP(109-149).....	125
Interacción ion metálico-ácido nucleico-proteína prion.....	131
Discusión y Conclusiones.....	135
Perspectivas.....	140
Referencias.....	141



Conclusiones Generales.....	143
Parte experimental.....	148
Síntesis de péptidos.....	148
Preparación de las muestras.....	151
Métodos espectroscópicos	153
Referencias.....	155
Tablas suplementarias.....	156
Apéndice I. Cálculos para equilibrios de protonación.....	160
Apéndice II. Cálculo de distancias a partir de contribuciones paramagnéticas por RMN.....	163
Anexo. Artículos	

Resumen

El cobre es un metal esencial que cataliza reacciones importantes en los sistemas biológicos, asimismo ha sido implicado en la agregación amiloide de proteínas asociadas a enfermedades degenerativas y neurodegenerativas. Un ejemplo es el péptido amilina (o hIAPP), el cual es el componente principal de los depósitos amiloides presentes en el páncreas de pacientes con Diabetes Tipo 2. Estudios recientes han propuesto que el cobre inhibe el proceso de formación amiloide de hIAPP, aunque no se conoce el mecanismo ni los detalles estructurales de la interacción cobre-hIAPP. Otro ejemplo es la proteína prion humana (hPrP), cuya conversión a su forma anormal es el evento clave en la propagación de las enfermedades priónicas. La hPrP tiene varios sitios de unión a cobre, y se ha propuesto que esta interacción es importante en transducción de señales y para el transporte mismo de cobre.

En el presente trabajo se estudió la interacción de Cu(II) con fragmentos peptídicos de la amilina y la proteína prion. Por medio de técnicas espectroscópicas de absorción electrónica, dicroísmo circular, resonancia paramagnética electrónica y resonancia magnética nuclear, se elucidaron los detalles de la coordinación de Cu(II) al péptido de amilina y a diferentes sitios de unión de la proteína prion. Los resultados abonan a entender la participación del ion metálico en la agregación amiloide y/o en la posible función de la proteína.

En el caso de la amilina (o hIAPP) se encontró que el sitio de anclaje al metal es la His18 y que la coordinación del metal involucra a las amidas desprotonadas de la cadena peptídica que le siguen en la secuencia del motivo HSSNN, hacia el C-terminal. La esfera de coordinación la complementan la cadena lateral del residuo de serina o carbonilos de la cadena peptídica. En particular, el grupo hidroxilo de la serina en posición 20 juega un papel importante en estabilizar al quelato. El Cu(II) se ancla a la histidina y favorece diferentes conjuntos de ensambles conformacionales derivados de los modos de coordinación que adopta. Los modos de coordinación propuestos para el complejo Cu(II)-hIAPP explican el efecto inhibitorio del metal en la agregación amiloide del péptido, ya que los residuos involucrados en la esfera de coordinación son también importantes en la agregación amiloide.

El estudio de la unión de Cu(II) a los sitios de His96 e His111 en fragmentos de la proteína prion humana permite entender los factores que modulan la afinidad relativa del metal a cada sitio y cómo se impactan estos sitios de unión por el procesamiento proteolítico de la proteína. Del estudio del fragmento 92-115, se deriva que la Met109, aunque no se une directamente al metal, juega un papel importante para estabilizar el complejo Cu(II)-His111 y determina la preferencia del metal para unirse a este sitio, posiblemente debido a un efecto en la segunda esfera de coordinación. Por otro lado, se diseñaron y estudiaron fragmentos peptídicos para modelar los sitios de unión a cobre que prevalecen anclados a la membrana neuronal después del procesamiento proteolítico de la hPrP. El corte β -proteolítico de la hPrP resulta en una proteína truncada (fragmento C2) que contiene a ambos sitios, His96 e His111, con el extremo NH₂- terminal libre, el cual participa en la coordinación de Cu(II) en el sitio de His96 y juega un papel importante en favorecer la unión del metal a este sitio sobre el de His111. También se encontró que el corte α -proteolítico de la hPrP tiene un impacto importante en las propiedades de coordinación a Cu(II) de la proteína, ya que elimina el sitio de His96, dejando a un sitio de His111 con el extremo NH₂- terminal libre (fragmento C1). Este estudio demuestra que este sitio de unión es muy diferente del sitio de His111 original que presenta la proteína intacta. Así, la conclusión general es que el procesamiento proteolítico de la hPrP impacta sus propiedades de coordinación a cobre, las cuales son dependientes de la concentración del metal. Los modos de coordinación elucidados tienen relevancia fisiológica, ya que la proteína prion anclada a las membranas neuronales está expuesta a fluctuaciones importantes de cobre. Por último, se estudiaron las interacciones alostéricas de la proteína prion mediadas por Cu(II) y ácidos nucleicos. Se encontró que algunos fragmentos de la hPrP pueden formar complejos ternarios Cu(II)-ácido nucleico-peptido. Se determinó que la estabilidad del complejo de His111 compite con la formación del complejo ternario con el ácido nucleico. Además, se encontró que la región C-terminal del fragmento 109-149 participa en la formación de los complejos ternarios. El estudio de estas interacciones alostéricas sirven de base para evaluar su posible influencia en la conversión de la hPrP a su isoforma anormal, evento clave en la etiología de las enfermedades priónicas.

En general, la unión de Cu(II) a los péptidos estudiados en este trabajo ayuda a identificar los diferentes factores que impactan la coordinación de Cu(II) a péptidos con residuos de histidina como sitios de anclaje al metal. Entre dichos factores se encuentran: la naturaleza de los residuos en la vecindad de la His, el pK_a de las amidas vecinas al sitio de anclaje y la presencia de otros sitios de anclaje como el NH_2 - libre del amino terminal. Finalmente, este trabajo proporciona detalles estructurales de la coordinación Cu(II) con el péptido amilina y la proteína prion, abonando a la comprensión del papel que juega este metal en la agregación amiloide del péptido amilina y la etiología de la diabetes tipo 2, y en la función de la proteína prion y la química bioinorgánica de las enfermedades priónicas.

Abstract

Copper is an essential metal ion that catalyzes important reactions in biological systems, it has also been implicated in the amyloid aggregation of proteins associated with degenerative and neurodegenerative diseases. One example is the amylin peptide (or hIAPP), which is the major component of amyloid deposits found in pancreas of patients suffering type 2 diabetes. Recent studies have proposed that copper inhibits hIAPP amyloid fibrillogenesis, although the mechanism and the structural details of the copper-hIAPP interaction are not known. Another example is the human prion protein (hPrP), whose conversion to the abnormal form is the key event in the propagation of the prion diseases. hPrP has several copper binding sites, and it has been proposed that this interaction is important in signal transduction and copper transport.

In the present work the interaction of Cu(II) with peptide fragments of the amylin and the prion protein was studied. Through an array of spectroscopic techniques including electronic absorption, circular dichroism, electron paramagnetic resonance and nuclear magnetic resonance, the details of the coordination of Cu(II) to the amylin peptide and different binding sites of the prion protein were elucidated. The results contribute to the understanding of the role of the metal ion in amyloid aggregation and/or the possible function of the protein.

In the case of amylin (or hIAPP), it was found that the metal anchoring site is His18, and that the metal coordination involves deprotonated amides of the backbone that follow in the sequence of the HSSNN motif, towards the C-terminal. The coordination sphere is completed by serine residues or backbone carbonyls. In particular, the hydroxyl group of serine 20 plays an important role in stabilizing the chelate. Cu(II) is anchored to histidine and favors different sets of conformational ensembles derived from the coordination modes that it adopts. The proposed coordination modes for the Cu(II)-hIAPP complex explain the inhibitory effect of the metal on the amyloid aggregation of the peptide, as the residues involved in the coordination sphere are also important in amyloid aggregation.

The study of Cu(II) binding to the His96 and His111 sites on human prion protein fragments helps understand the factors that modulate the relative affinity of the metal to each site,

and how these binding sites are impacted by the proteolytic processing of the protein. From studying fragment 92-115, it derives that Met109, although is not directly bound to the metal, plays an important role in stabilizing the Cu(II)-His111 complex and determines the preference of the metal for this binding site, possibly due to a second sphere coordination effect. On the other hand, peptide fragments that model the copper binding sites that prevail anchored to the neuronal membrane after the proteolytic processing of hPrP were designed and studied. The β -cleavage of hPrP results in a truncated protein (C2 fragment) containing both sites, His96 and His111, with the free NH₂-terminal group, which participates in the coordination of Cu(II) at the His96 site and plays an important role in favoring metal binding to this site over the His111 site. It was also found that the α -cleavage of hPrP has a significant impact on the copper coordination properties of the protein, because it removes the His96 site, leaving a His111 site with the free NH₂-terminal group (fragment C1). This study demonstrates that this binding site is very different from the original His111 site present on the intact protein. Thus, the general conclusion is that the proteolytic processing of hPrP impacts the coordination properties to copper, which are dependent on the metal concentration. The elucidated coordination modes have physiological relevance, because the prion protein anchored to the neural membranes is exposed to important copper fluctuations. Finally, allosteric interactions of the prion protein mediated by Cu(II) and nucleic acids were studied. It was found that some fragments of hPrP can form Cu(II)-nucleic-acid-peptide ternary complexes. It was determined that the stability of the His111 complex competes with the formation of the ternary complex with the nucleic acid. Moreover, it was found that the C-terminal region of the 109-149 fragment is involved in the formation of the ternary complexes. The study of these allosteric interactions serves as a basis to evaluate their potential role in the conversion of hPrP to its abnormal isoform, for a key event in the etiology of prion diseases.

In general, the binding of Cu(II) to the peptides studied in this work helps to identify the different factors that impact the coordination of Cu(II) to peptides with histidine residues as metal anchoring sites. These factors include: the nature of the residues in the vicinity of the His, the pK_a of the amides adjacent to the anchoring site, and the presence of other metal anchoring groups, such as a free NH₂-terminal group. Finally, this work provides structural

details of the Cu(II) coordination to the amylin peptide and the prion protein, contributing to the understanding of the role of this metal in the amyloid aggregation of the amylin peptide and the etiology of type 2 diabetes, and on the function of the prion protein and the bioinorganic chemistry of prion diseases.

Abreviaturas

Aminoácidos:

Aminoácidos con su grupo funcional resaltado en azul oscuro, nombre, código de tres letras y código de una sola letra.



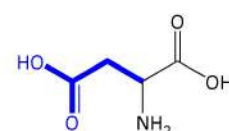
Alanina
Ala (A)



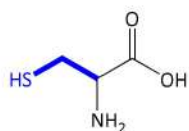
Arginina
Arg (R)



Asparagina
Asn (N)



Ácido aspártico
Asp (D)



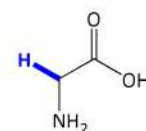
Cisteína
Cys (C)



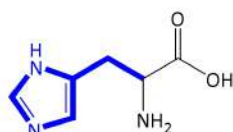
Ácido glutámico
Glu (E)



Glutamina
Gln (Q)



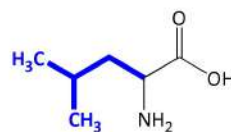
Glicina
Gly (G)



Histidina
His (H)



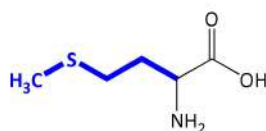
Isoleucina
Ile (I)



Leucina
Leu (L)



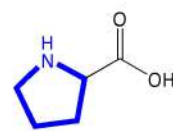
Lisina
Lys (K)



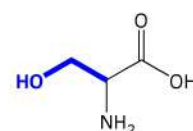
Metionina
Met (M)



Fenilalanina
Phe (F)



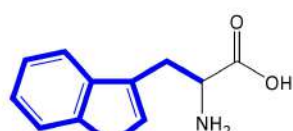
Prolina
Pro (P)



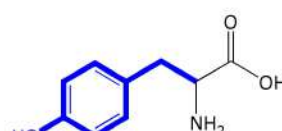
Serina
Ser (S)



Treonina
Thr (T)



Triptófano
Trp (W)



Tirosina
Tyr (Y)



Valina
Val (V)



CD	Circular Dichroism , dicroísmo circular
CJ	Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob
DT2	Diabetes Tipo 2
EPR	Electron Paramagnetic Resonance , resonancia paramagnética electrónica
ESI-TOF-MS	Electrospray Ionization Time-of-flight mass spectrometry , espectrometría de masas por tiempo de vuelo y electrospray
hIAPP	Human Islet Amyloid Polypeptide , polipéptido humano amiloide de los islotes
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation , correlación vía múltiples enlaces
HPLC	High Performance Liquid Chromatography , cromatografía líquida de alta resolución
hPrP	Human Prion Protein , proteína prion humana
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence , coherencia cuántica múltiple heteronuclear
ITC	Isothermal Titration Calorimetry , calorimetría de titulación isotérmica
LMCT	Ligand to Metal Charge Transfer , transferencia de carga ligando-metal
NMDA	N-metil-D-aspartato
OR	Octarepeat (4 repeticiones de 8 residuos, 60-91 de la secuencia de la PrP)
PrP ^C	Proteína prion celular
PrP ^{Sc}	Proteína prion anormal
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de carbono 13
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de protón
ROS	Reactive Oxygen Species , especies reactivas de oxígeno
rPrP	Proteína prion de ratón
ThT	Thioflavin T , tioflavina T
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy , espectroscopia de correlación total

Introducción

El estudio de metales de transición en sistemas biológicos generalmente se ha enfocado a su participación como cofactores de enzimas con funciones importantes como la transferencia de electrones, el transporte y/o la activación de oxígeno. Sin embargo, los metales de transición también están implicados en procesos de señalización celular y modulación de respuestas celulares importantes.¹ Particularmente el cobre es uno de los metales esenciales y más abundantes en los organismos eucariontes.² Su capacidad para adoptar dos estados de oxidación en condiciones fisiológicas, la forma reducida como Cu(I) y su forma oxidada como Cu(II), lo hace partícipe en muchos procesos fisiológicos. Por otro lado, el cobre ha sido implicado en procesos de agregación amiloide de proteínas asociadas a enfermedades degenerativas. Enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson y las enfermedades priónicas, y enfermedades degenerativas como la diabetes tipo 2, han sido ampliamente estudiadas debido a que forman este tipo de agregados proteicos. Asimismo, el desbalance homeostático de metales de transición, entre ellos el cobre, ha sido asociado en la patogénesis de estas enfermedades. Incluso, en varios casos se ha demostrado que los metales se encuentran en concentraciones relativamente altas en los agregados proteicos. Es importante resaltar, que las proteínas implicadas en estas enfermedades presentan sitios de unión a cobre en regiones no estructuradas o intrínsecamente desordenadas. Ejemplos claros incluyen: el péptido β -amiloide en Alzheimer, la proteína α -sinucleína en Parkinson, la proteína prion en las enfermedades priónicas y el péptido amilina en diabetes tipo 2. Y aunque no se conoce la función fisiológica de estas proteínas, en algunos casos está claro que una de sus funciones podría estar relacionada con el transporte a o tráfico de metales. Un ejemplo claro de esto es el de la proteína prion, la cual une cobre *in vivo* y se le ha propuesto como un sensor y transportador de cobre.^{3, 4} Así, la proteína prion debe poseer en su estructura residuos que anclen al metal y que ayuden a estabilizar complejos metálicos en diferentes ambientes redox, concentraciones del ion metálico y niveles de acidez a los que se expone.

El estudio de la coordinación del cobre con estas proteínas es importante ya que sienta las bases para comprender el papel que juega la interacción cobre-proteína en la función de la

proteína, y/o en el mecanismo de agregación amiloide asociado a estas proteínas. Así, en esta tesis se emprendió un estudio espectroscópico de la unión de Cu(II) a dos sistemas: el péptido amilina (o hIAPP) implicado en la enfermedad de diabetes tipo 2; la proteína prion implicada en las enfermedades priónicas. En este estudio se utilizan fragmentos peptídicos de cada sistema para modelar los sitios de unión a cobre; esta estrategia ha resultado exitosa ya que los sitios de coordinación se encuentran en regiones no estructuradas de la proteína.

En el capítulo 1 se estudia la unión de Cu(II) al péptido amilina (hIAPP human islet amyloid polypeptide) y el impacto de dicha interacción en su agregación amiloide. Mediante el diseño y estudio de diversos fragmentos de la hIAPP, se elucidaron los detalles estructurales del sitio de coordinación. En el capítulo 2 se estudia la coordinación de Cu(II) a los sitios de histidinas 96 y 111 de la proteína prion, y se evalúa el papel de los residuos de metioninas en la unión del metal. Este estudio es relevante para entender cómo se une el cobre a la proteína completa; sin embargo, la proteína prion sufre cortes proteolíticos como modificaciones postraduccionales que deben impactar los sitios de unión a cobre. Por tanto, en el capítulo 3 se estudian péptidos que modelan los sitios de coordinación a cobre que prevalecen al procesamiento proteolítico de la proteína prion. Finalmente, en el capítulo 4 se explora el efecto de otros ligantes, como los oligonucleótidos, en la interacción de Cu(II) con fragmentos que incluyen el sitio de la His111 y una región hidrofóbica que es clave en la conversión de la proteína prion celular a la isoforma anormal.

En todos los sistemas estudiados, se trata de péptidos en los que el grupo imidazol de una histidina es el sitio de anclaje para la coordinación a Cu(II), y se revela, cómo el entorno químico alrededor de la histidina determina la esfera de coordinación del complejo.

Este trabajo de tesis contribuye al entendimiento de la química bioinorgánica del papel que juega el cobre en la diabetes tipo 2 y las enfermedades priónicas.

Referencias

1. Chang, C. J. Searching for harmony in transition-metal signaling. *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11*, 744-7.
2. Bertini, I.; Cavallaro, G.; McGreevy, K. S. Cellular copper management—a draft user's guide. *Coord. Chem. Rev.* **2010**, *254*, 506-524.
3. Brown, D. R.; Qin, K.; Herms, J. W.; Madlung, A.; Manson, J.; Strome, R.; Fraser, P. E.; Kruck, T.; Bohlen, A. v.; Schulz-Schaeffer, W.; Giese, A.; Westaway, D.; Kretzschmar, H. The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature* **1997**, *390*, 684-687.
4. Millhauser, G. L. Copper and the Prion Protein: Methods, Structures, Function, and Disease. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2007**, *58*, 299-320.



Cinvestav

Capítulo 1.

Interacción del Cu(II) con el péptido amilina o hIAPP: coordinación y efecto en su agregación amiloide

Capítulo 1.

Interacción del Cu(II) con el péptido amilina o hIAPP: coordinación y efecto en su agregación amiloide

Antecedentes

Diabetes Tipo 2 y IAPP

La Diabetes Tipo 2 (DT2) es un problema que afecta a más de 415 millones de personas en el mundo. México se posiciona en el lugar número 6 en la lista de países con mayor incidencia de esta enfermedad, con 11.5 millones de personas con Diabetes en el año 2015. Nuestro país ocupa también el segundo lugar a nivel mundial en porcentaje de diabéticos por población total,¹ por lo que esta enfermedad es un problema de salud pública. Es bien conocido que en esta enfermedad ocurre una disminución en la habilidad de la insulina para estimular el metabolismo de la glucosa, es decir, el cuerpo no responde a ella, lo cual hace que la glucosa no sea aprovechada como energía y por tanto los niveles de glucosa en sangre se vean aumentados.^{1,2}

La DT2 también se caracteriza por la disfunción secretora, pérdida de masa y destrucción de las células- β pancreáticas³ formando depósitos amiloides en sitios extracelulares y por tanto afectando la función del islote.⁴ Algunas especies de mamíferos incluido el humano, (macacos, felinos, canguros, etc) son propensas a formar estos depósitos amiloides en los islotes pancreáticos y estas mismas especies son susceptibles a desarrollar Diabetes Tipo 2.⁵

La amilina o hIAPP es el principal componente de los depósitos amiloides formados en los islotes pancreáticos. Estos depósitos están presentes en el páncreas de más del 90% de pacientes *post-mortem* que sufrieron Diabetes Tipo 2. El grado de deposición amiloide está asociado con la severidad de la enfermedad.^{4,6}

hIAPP es un péptido de 37 residuos con un enlace disulfuro entre los residuos de cisteína 2 y 7 y amidado en el extremo C-terminal (Figura 1.1.1). El hIAPP es sintetizado y co-secretado junto con la insulina (relación hIAPP:insulina 1:100) en las células- β de los islotes de Langerhans dentro del páncreas a partir del precursor pro-IAPP de 89 residuos, el cual por la acción de enzimas pro-hormonas convertasas PC2 y PC3, libera el hIAPP en los gránulos

secretores.⁶⁻⁸ Se han atribuido diferentes funciones fisiológicas al péptido hIAPP, entre las que se encuentran: regulación del metabolismo de la glucosa, debido a que se encuentra almacenado junto con la insulina; supresión en la ingesta de alimentos; como molécula paracrina en los islotes y como una hormona con efectos en el sistema nervioso central.^{5, 7}

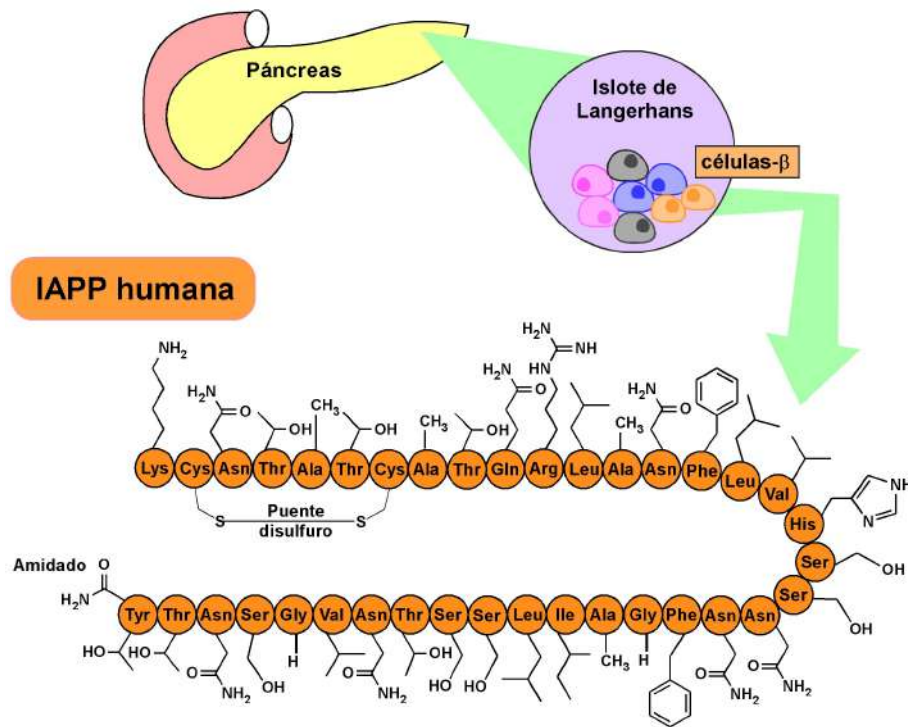


Figura 1.1.1 IAPP humana co-secretada del páncreas a partir de las células- β . La secuencia del péptido se muestra en círculos naranjas con abreviaturas de los aminoácidos con su respectivo grupo funcional.

La toxicidad del hIAPP sobre las células- β radica en la vía de formación de fibras amiloides por el péptido. Varios estudios han sugerido que las especies tóxicas a las células son las protofibras y los oligómeros formados en el curso de la amiloidosis y no así las fibras maduras que forman el depósito amiloide.^{7, 9} La habilidad del hIAPP para formar fibras amiloides radica principalmente en el tipo de residuos presentes en su secuencia. La región que comprende los residuos 20-29 (SNNFGAILSS) es clave para la agregación amiloide;^{7, 8} también las regiones 8-20 y 30-37 pueden formar fibras. En contraste, el IAPP de roedor no forma fibras amiloides; de hecho, no se han encontrado depósitos amiloides en los islotes de estos mamíferos. La incapacidad de la IAPP de roedor para formar fibras amiloides reside en su secuencia.⁵ Comparando las secuencias del hIAPP con respecto a la de roedor en la región 20-29, la secuencia del IAPP de roedor presenta tres residuos de prolina (SNNLGPVLPP), los

cuales bloquean la formación de hojas- β , previniendo el plegamiento del péptido y ensamble en fibras amiloides.^{4, 8, 10}

El mecanismo de agregación en la formación de fibras amiloides del péptido hIAPP puede estar influenciado por diferentes factores:

- Genéticos, como la mutación en el residuo de serina 20 por glicina (que acelera la agregación amiloide) asociada con el riesgo de aparición temprana de la enfermedad de Diabetes Tipo 2.¹¹
- Presencia de proteínas: insulina (inhibe el proceso de formación amiloide de la IAPP),¹² amiloide-P del suero (SAP), apolipoproteína E y proteoglicano de heparan-sulfato, estas tres últimas también presentes en placas seniles de enfermos de Alzheimer.^{4, 6}
- Alteración en el procesamiento de la proteína precursora proIAPP, la cual puede servir de “semilla” para la agregación del péptido IAPP.^{4, 6}
- Iones metálicos como zinc y cobre, los cuales retrasan la formación de la fibra amiloide.^{13, 14}

La participación de estos iones metálicos se ha explorado no solo como factor que influye en la agregación amiloide del hIAPP, sino también en muchas proteínas amiloidogénicas como β -amiloide, α -sinucleína y proteína prion.¹⁵⁻¹⁷

Zinc y IAPP

El zinc es de particular interés debido a que su concentración en el páncreas y células- β es de las más altas en el cuerpo además de que su deficiencia está asociada a la enfermedad de Diabetes Tipo 2.^{18, 19} El zinc es encontrado en los gránulos secretores en concentraciones milimolares (20 mM),²⁰ mientras que en el espacio extracelular, donde ocurre la amiloidosis, se encuentra en concentración micromolar (15-25 μ M).²¹ Se ha reportado que en los pacientes diabéticos los niveles de Zn en sangre y suero se ven disminuidos.²²

Ensayos *in vitro* han demostrado que el Zn(II) inhibe significativamente la fibrilogénesis amiloide de hIAPP a concentraciones similares a las encontradas en el ambiente extracelular,¹³ además de que promueve la formación de oligómeros prefibrilares y afecta la morfología y densidad de los agregados.²³ Usando ensayos de cinéticas de agregación

monitoreada por Fluorescencia de la tioflavina T (ThT), se ha visto que el Zn puede inhibir la formación de fibras a pH fisiológico, incrementando el tiempo de nucleación para la formación de la fibra. Por RMN se ha confirmado la coordinación del Zn a la histidina 18, la cual afecta la conformación del péptido alrededor de dicho residuo.¹³ La afinidad del ion metálico al péptido IAPP es del mismo orden de magnitud que las concentraciones de zinc existentes en el espacio extracelular con una $K_a = 0.89 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ($K_d = 1.12 \text{ } \mu\text{M}$)²⁴ (Figura 1.1.2).

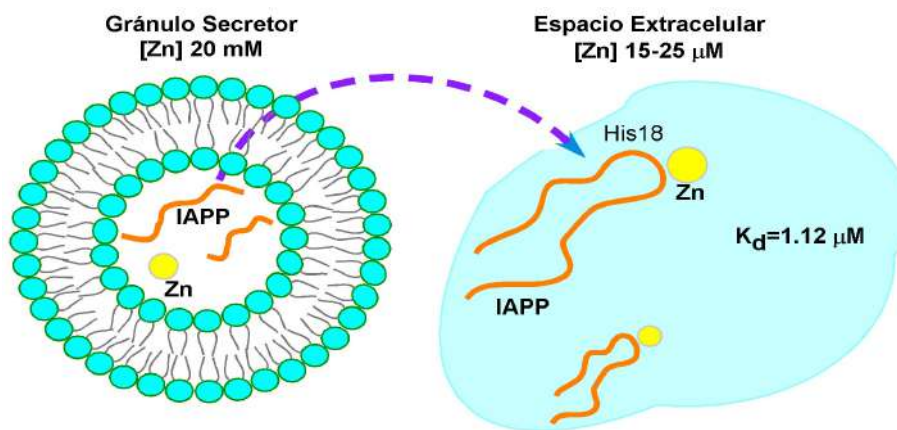


Figura 1.1.2. Esquema de las concentraciones de Zn en el gránulo secretor y en el espacio extracelular de las células-β. La flecha indica como el Zn(II) al unirse a la IAPP cambia la conformación del péptido alrededor de la His18.

Cobre y IAPP

El estudio del efecto del cobre en la agregación amiloide del péptido hIAPP es de particular interés debido a que los niveles de cobre en suero en pacientes diabéticos son más altos en comparación con personas sanas.^{19, 22, 25-27} De hecho se ha propuesto que el desbalance o pérdida de homeostasis de este ion metálico puede jugar un papel importante en la enfermedad de Diabetes Tipo 2.²⁸

Al igual que el ion zinc, el cobre también inhibe el proceso de formación amiloide de hIAPP, además de que cambia la morfología final de los agregados.¹⁴ Estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio demostraron que el Cu(II) retrasa la formación de fibras de los fragmentos 15-22 y 15-29 del péptido hIAPP; además de que la morfología de los agregados se ve afectada por la presencia del ion metálico.²⁹ Estas secuencias de péptidos incluyen la parte amiloidogénica de hIAPP, además del posible sitio de unión al ión metálico. Dicho

efecto se puede caracterizar siguiendo cinéticas de formación de fibras por ensayo de fluorescencia de la ThT (tioflavina T), en el cual un incremento en la intensidad de la fluorescencia a una longitud de onda de emisión de 485 nm, resultado de una inmovilización rotacional de la ThT,³⁰ es indicativo de formación de fibras.³¹ Una traza de este proceso de agregación es generalmente sigmoïdal (Figura 1.1.3).

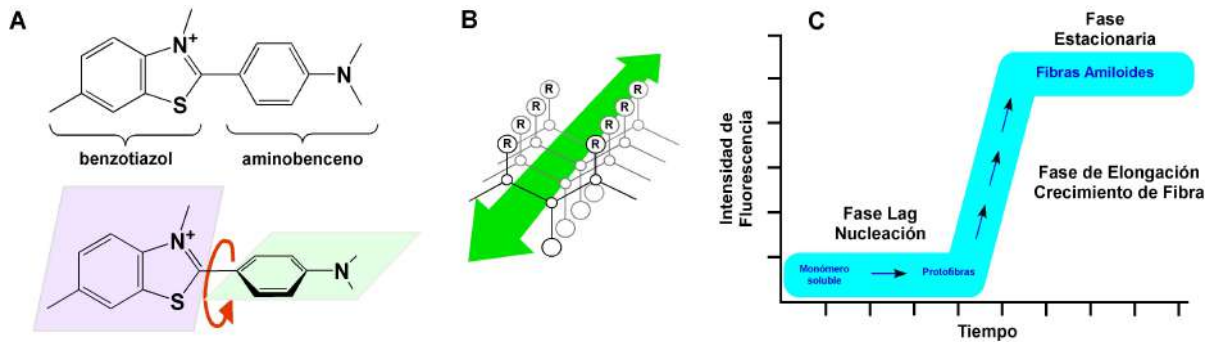


Figura 1.1.3 (A) Estructura molecular de la Tioflavina T (ThT), abajo la flecha roja representa el giro entre los anillos de benzotiazol y aminobenceno cuando la ThT esta en solución. (B) Esta rotación se ve impedida cuando la ThT interactúa con las fibras amiloides en la región señalada con la flecha verde. (C) Modelo de la agregación amiloide, comenzando en monómero soluble, pasando por protofibras, crecimiento de fibras y finalmente formación de fibras amiloides.³² (A) y (B) adaptación de ref³⁰

En el ensayo de ThT de los fragmentos hIAPP(15-22) y hIAPP(15-29) se monitoreó la intensidad de fluorescencia con respecto al tiempo y se observó que la presencia de Cu(II) retrasa la formación de las fibras.

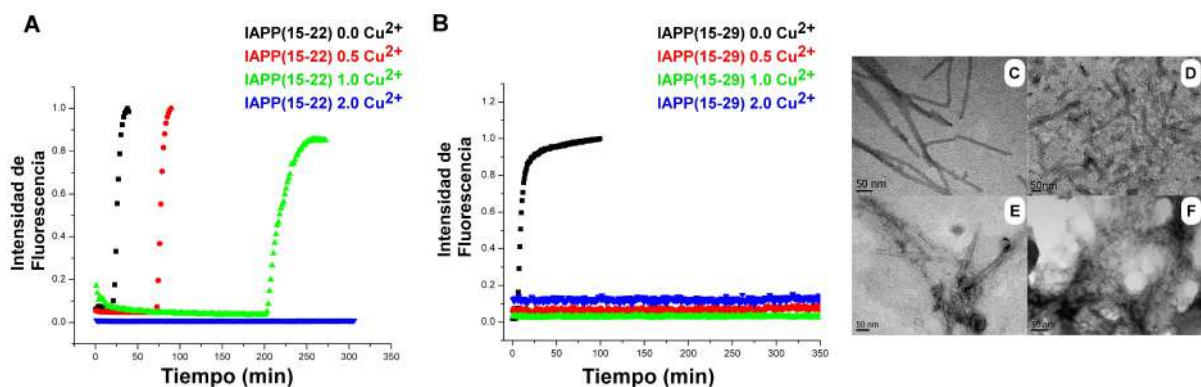


Figura 1.1.4 Efecto del Cu(II) en la agregación amiloide del péptido IAPP(15-22) (A) y IAPP(15-29) (B) seguido por fluorescencia de ThT. Imágenes de las fibras amiloides formadas al final de la cinética de agregación de la IAPP(15-22) por TEM en ausencia (C) y presencia de Cu(II): 0.5eq (D), 1.0eq (E) y 2.0eq (F). Figura adaptada con permiso de la ACS de la referencia²⁹.

El análisis por microscopía electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés) de los agregados en el punto final de las cinéticas de agregación (Figura 1.1.4 (C), (D), (E) y (F)) muestra que en ausencia de Cu(II) las fibras amiloides se encuentran bien estructuradas y largas (C), como típicamente se puede encontrar a las fibras. Sin embargo en los agregados formados en presencia de 0.5 y 1.0 eq Cu(II) hay menor cantidad de fibras y son más cortas (D) y (E). Para la condición de 2.0 eq Cu(II) las fibras son aun más cortas y delgadas y en su mayoría lo que se observa son agregados no-fibrilares. Con estos resultados se demostró que el ión Cu(II) retrasa o inhibe el proceso de formación de la fibra amiloide del péptido hIAPP(15-22) y plantea la posibilidad de que la vía de agregación amiloide de hIAPP en presencia del ión metálico sigue un camino diferente que en ausencia de éste.²⁹

La unión de Cu(II) a hIAPP no sólo puede afectar la vía amiloidogénica sino también otros procesos que puede sufrir el péptido, y es que la unión específica del ion metálico Cu(II) a la hIAPP inhibe la acción proteolítica de IDE (Insulin-Degrading Enzyme, enzima degradadora de insulina), enzima responsable en la degradación de IAPP. Este efecto puede ser porque la coordinación específica del ion metálico al péptido induce cambios conformacionales que impiden su hidrólisis enzimática.^{33, 34}

Diversos estudios han intentando evaluar el papel que juega el cobre en la citotoxicidad de hIAPP. Por un lado se plantea que en presencia del ion metálico se forman especies oligoméricas que son tóxicas para la célula³⁴⁻³⁷ y por otra parte la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) pueden contribuir a incrementar el estrés oxidativo.^{37, 38} Recientemente, Lee y colaboradores demostraron que los oligómeros de hIAPP que contienen Cu(II) forman agregados tóxicos con conformación *random-coil*.³⁹ Por otro lado, también se ha propuesto el papel del ion cobre como un modulador benéfico en la citotoxicidad por hIAPP gracias a la habilidad del cobre a “frenar” las transiciones conformacionales hacia una estructura secundaria propensa a fibrilar y su propiedad de coordinar a hIAPP, disminuyendo la producción de ROS por cobre libre. En otras palabras, se propone que la formación del complejo Cu(II)-hIAPP puede proteger a las células, estabilizando al péptido hIAPP en su forma monomérica no tóxica.⁴⁰

Así, el papel que juega el ion Cu(II) y su interacción con hIAPP no se ha determinado por completo debido a estas discrepancias en su rol benéfico o tóxico, por lo que se necesita un

mayor entendimiento de los detalles estructurales de la coordinación Cu(II)-hIAPP que ayuden a conocer el impacto que tendría el metal en la agregación, toxicidad e incluso en la etiología de la Diabetes Tipo 2.

Coordinación de Cu(II) a IAPP

El estudio de la coordinación específica de cobre a IAPP humana ha sido poco explorada, algunos autores han propuesto la región donde se localiza la His18 como sitio de unión cobre-péptido (Figura 1.1.5 (A)): a) estudios por espectroscopia Raman muestran como posible sitio de enlace dicho residuo de histidina;³⁶ b) Sinopoli y colaboradores en 2014 prueban por análisis de proteólisis enzimática de la IAPP en presencia de cobre que el sitio de unión del ion metálico al péptido se da en la región que contiene la His18³⁴ y más aun, recientemente se reportó c) por espectrometría de masas LAESI-MS IMS (**L**aser **A**blation **E**lectrospray **I**onization-**M**ass **S**pectrometry, **I**on **M**obility **S**eparation, por sus siglas en inglés) la formación de un aducto de Cu(II) con IAPP humana dentro de los residuos que contienen a la histidina en fase gas.⁴¹

Por otro lado, existe un estudio de la coordinación de Cu(II) a la IAPP de roedor, tomando importancia por el hecho de que este péptido posee la propiedad de no ser amiloidogénico, como se mencionó anteriormente. Kállay y colaboradores⁴² demostraron espectroscópicamente y con simulaciones por DFT (**D**ensity **F**unctional **T**heory, por sus siglas en inglés) que el ion cobre se une al péptido IAPP de roedor a pesar de la carencia de la His18 y se ancla al residuo de asparagina 22 en la secuencia 17-29 (-RSSNNLGPVLP-) en condiciones de pH básico, con participación de amidas desprotonadas y una molécula de agua (Figura 1.1.5 B), aunque en condiciones de pH fisiológico (~7.5) el complejo tiende a precipitar.

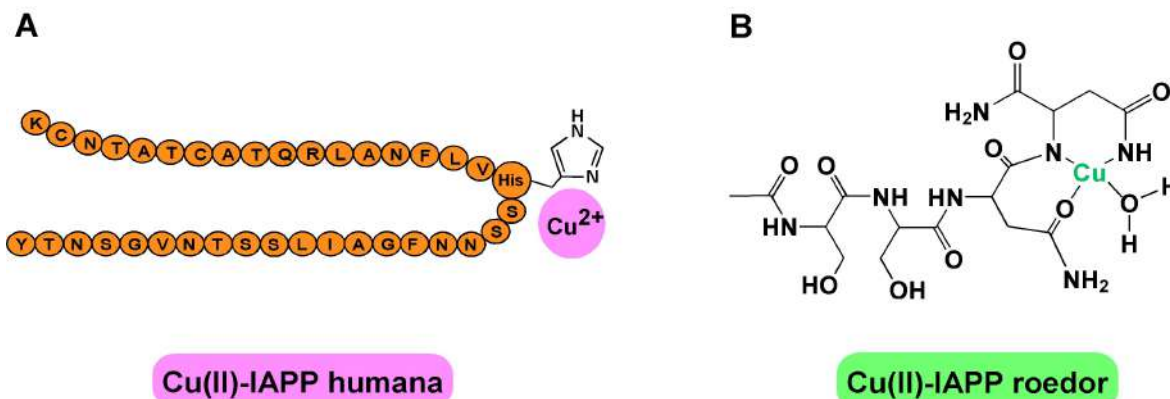


Figura 1.1.5. (A) Representación esquemática de la unión de Cu(II) a la IAPP humana resaltando el residuo de His18 con su grupo lateral imidazol unido a Cu^{2+} . (B) Modo de coordinación de Cu(II) al sitio de IAPP de roedor del complejo $[\text{CuH}_2\text{L}]$.

El presente capítulo trata de explicar el efecto de la unión de Cu(II) a la hIAPP en su agregación, además de establecer las bases estructurales de la coordinación Cu(II)-hIAPP y conocer el sitio específico de unión y los residuos involucrados en la coordinación del metal-péptido. Para ello se han empleado fragmentos peptídicos sintetizados químicamente y técnicas espectroscópicas para la elucidación estructural del complejo.

Objetivo General

Elucidar los detalles estructurales del sitio de coordinación a Cu(II) en la hIAPP y entender el impacto en su agregación amiloide.

Objetivos específicos

- Elucidar la secuencia mínima necesaria para reproducir el sitio de coordinación.
- Evaluar el papel del residuo His18 en la coordinación al sitio y su impacto en la agregación.
- Evaluar la identidad de las amidas desprotonadas coordinantes al ion metálico y los residuos participantes en la esfera de coordinación.

Resultados y Análisis

Coordinación de Cu(II) a la hIAPP

Direccionalidad en el sitio de coordinación

Existe evidencia que el residuo de His18 es el sitio de anclaje para la unión de Cu(II) a hIAPP.^{29, 41} El grupo funcional imidazol de la histidina es probablemente el sitio más común en la unión de Cu(II) a péptidos.⁴³ Este residuo puede exhibir diferencias significativas en su comportamiento de coordinación en función a su ubicación, residuos vecinos,⁴⁴ y heteroátomos pertenecientes a la cadena peptídica como amidas desprotonadas que se encuentran antes (hacia el N-terminal) o después (hacia el C-terminal) de la histidina en la secuencia.

Para entender la unión de Cu(II) a hIAPP y la direccionalidad de su esfera de coordinación, se estudió la interacción cobre-péptido de diferentes fragmentos peptídicos de hIAPP, los cuales incluyen en su secuencia al residuo de His18 (Tabla 1.2.1). El antecedente de que el fragmento más largo hIAPP(15-22) constituido por ocho residuos sitúa al residuo de His en el centro, sirve de punto de partida para el estudio de la coordinación Cu(II)-hIAPP. Así, se pueden proponer dos fragmentos cortos: uno que incluye los residuos anteriores al residuo de His18, es decir, hIAPP(15-18) y otro que incluye los residuos posteriores a His18, es decir, hIAPP(18-22).

La unión de Cu(II) a cada péptido fue evaluada por espectroscopia de dicroísmo circular (CD por sus siglas en inglés) en la región UV/Vis y resonancia paramagnética electrónica (EPR por sus siglas en inglés).

Tabla 1.2.1 Secuencias de péptidos 15-22, 15-18 y 18-22

Péptido	Secuencia
hIAPP(15-22)	FLVHSSNN
hIAPP(15-18)	FLVH
hIAPP(18-22)	HSSNN

En la Figura 1.2.1 se presentan las titulaciones con Cu(II) de los fragmentos seguidas por CD a pH 7.5. En todos los casos se forman complejos con relación estequiométrica 1:1. Para el complejo Cu(II)-hIAPP(15-18) (A) las señales son de baja intensidad, además que se recorren en energía con respecto al complejo formado con el fragmento largo 15-22 (B). En cambio para el complejo hIAPP(18-22) (C) las señales son más intensas y se asemejan al complejo formado de Cu(II)-hIAPP(15-22).

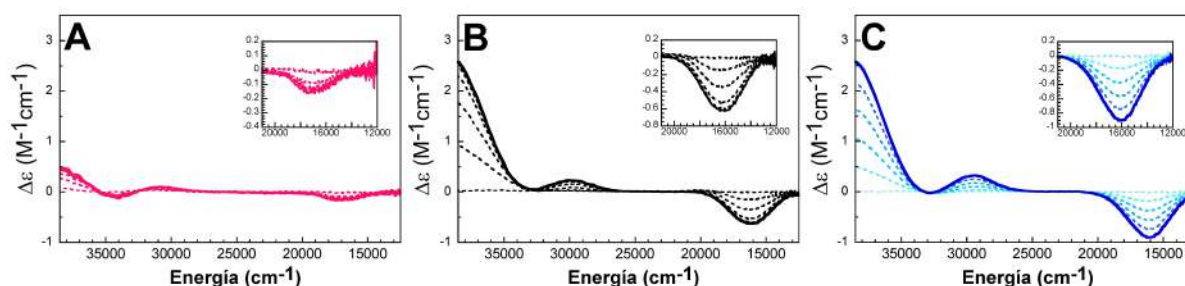


Figura 1.2.1. Espectros de CD colectados después de la adición de 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 eq Cu(II) (líneas punteadas) y 1.0 Cu(II) (línea continua) a los péptidos (A) hIAPP(15-18) (rosa), (B) hIAPP(15-22) (negro) y (C) hIAPP(18-22) (azul) a pH 7.5.

En la Figura 1.2.2 (A) se comparan los espectros de CD a pH 7.5 de los complejos Cu(II)-hIAPP(15-22), Cu(II)-hIAPP(15-18) y Cu(II)-hIAPP(18-22). Claramente se pueden ver similitudes entre los espectros de los complejos del fragmento largo hIAPP(15-22) (negro) y el fragmento corto hIAPP(18-22) (azul). Más aún, los parámetros de EPR (B) de estos dos complejos son muy similares y en ambos casos los valores g_{\parallel} y A_{\parallel} correlacionan para complejos con modo de coordinación ecuatorial 3N1O. Por otro lado, en el caso del fragmento hIAPP(15-18), el espectro de CD del complejo Cu(II)-hIAPP(15-18) (rosa) es muy diferente con respecto de Cu(II)-hIAPP(15-22) y los valores g_{\parallel} y A_{\parallel} en el espectro de EPR correlacionan para una coordinación ecuatorial 4N.

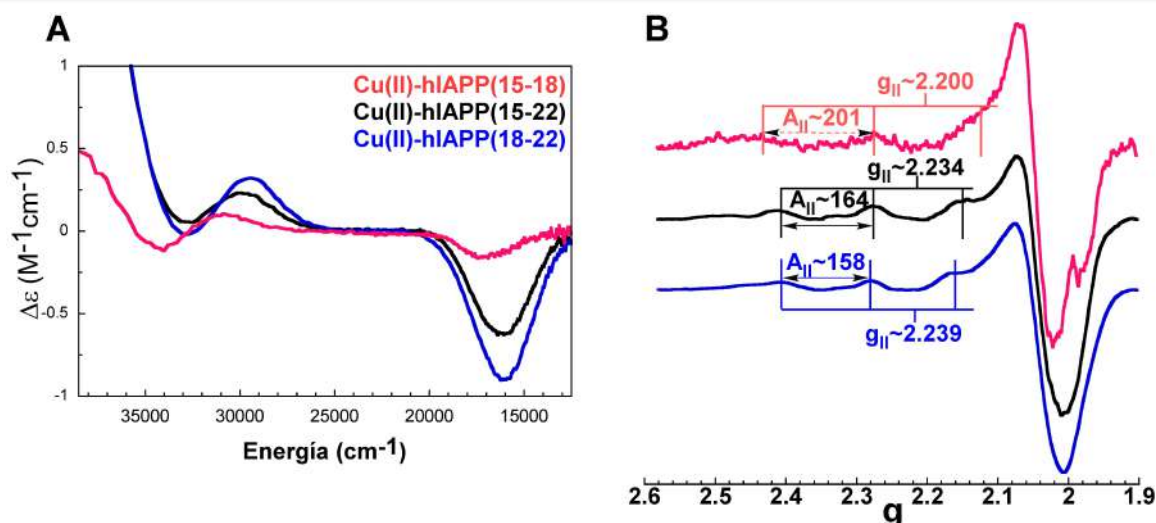


Figura 1.2.2. Espectros de CD (A) y EPR (B) de los complejos Cu(II)-hIAPP(15-22) (negro), Cu(II)-hIAPP(15-18) (rosa) y Cu(II)-hIAPP(18-22) (azul). A_{II} en unidades $\times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$.

Así, todos estos datos indican que el complejo de Cu(II) formado con el fragmento corto hIAPP(18-22) tiene el mismo ambiente de coordinación del complejo en el fragmento largo hIAPP(15-22), mientras que la unión de Cu(II) a hIAPP(15-18) da lugar a un complejo muy diferente. A partir de estos resultados se puede concluir que la coordinación de Cu(II) al fragmento hIAPP(15-22) involucra la participación de los residuos posteriores a la His18 en la secuencia de hIAPP, y que el fragmento hIAPP(18-22) contiene la secuencia necesaria para reproducir el sitio de coordinación al ión metálico del fragmento largo.

Con el fin de evaluar si efectivamente la unión del ion Cu(II) a la hIAPP ocurre hacia el C-terminal, involucrando residuos que le siguen en la secuencia a la His18, se estudió el fragmento hIAPP(15-22 S19P). En este péptido, el residuo de Prolina (P) en la posición 19 previene la desprotonación de la amida del enlace peptídico que le sigue a la His18, y por tanto previene la coordinación del ion metálico hacia el C-terminal. Así mismo, el giro de la prolina inducido en la cadena peptídica, sirve como “punto de quiebre” para la coordinación del Cu(II) hacia el C-terminal,^{45, 46} forzando al metal a coordinarse hacia el N-terminal.

Se tituló una solución de péptido hIAPP(15-22 S19P) con Cu(II) a pH 7.5 y se siguió por CD. Como se muestra en la Figura 1.2.3 B, todas las señales se saturaron a 1.0 eq Cu(II) indicando una estequiometría 1:1 Cu(II):Péptido. El espectro a 1.0 eq de Cu(II) muestra dos transiciones de campo ligando (d-d): una banda negativa a $16\,580 \text{ cm}^{-1}$ ($\Delta\epsilon = -0.21 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y una positiva

a $19\,300\text{ cm}^{-1}$ ($\Delta\varepsilon = 0.15\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). También se observan bandas de transferencia de carga en la región por arriba de $32\,000\text{ cm}^{-1}$ que corresponden a transiciones de transferencia de carga del imidazol de la His18 al Cu(II). Así, claramente el espectro de CD del complejo Cu(II)-hIAPP(15-22 S19P) muestra grandes diferencias con respecto al espectro del fragmento hIAPP(15-22). Consistentemente, el espectro de EPR del complejo Cu(II)-hIAPP(15-22 S19P) (Figura 1.2.3 (C) espectro gris) presenta valores g_{\parallel} y A_{\parallel} 2.233 y $176 \times 10^{-4}\text{ cm}^{-1}$ respectivamente, los cuales son diferentes con respecto a lo observado para el péptido 15-22. Por lo tanto, el bloqueo de la amida del enlace peptídico de la Ser19 previene la coordinación hacia el C-terminal y el complejo Cu(II)-péptido tiene un ambiente de coordinación diferente. Esto es consistente con la noción de que la coordinación de Cu(II) a hIAPP(15-22) involucra residuos que siguen en la secuencia a la His18.

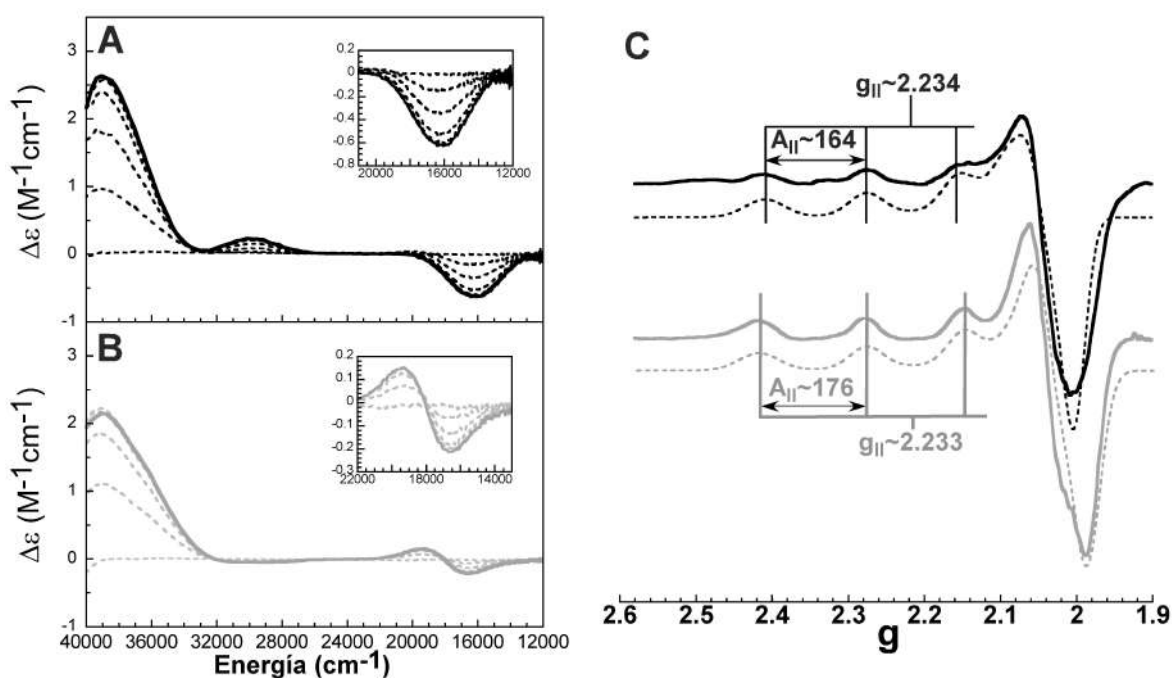


Figura 1.2.3 Titulación de hIAPP(15-22) (negro) (A) y hIAPP(15-22 S19P) (gris) (B) con Cu(II) seguida por CD a pH 7.5, después de la adición de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 (líneas punteadas) y 1.0 eq (líneas continuas). (C) Espectros de EPR de los complejos hIAPP(15-22) (negro) y hIAPP(15-22 S19P) (gris) después de la adición de 1.0 eq Cu(II). Las líneas punteadas corresponden al espectro simulado usando los parámetros listados en Tabla 1.2.2. A_{\parallel} en unidades $\times 10^{-4}\text{ cm}^{-1}$.

Una comparación a este modelo es el recientemente reportado por Rowinska-Zyrek⁴⁷ en donde estudia la coordinación de Cu(II) al fragmento hIAPP(1-19). Este péptido carece de Ser20, residuo clave para estabilizar la coordinación con respecto a C-terminal. Las

características espectroscópicas determinadas por CD son similares a lo observado en nuestra variante Cu(II)-hIAPP(15-22 S19P).

Tabla 1.2.2 Parámetros de EPR de la simulación de los complejos Cu(II)-hIAPP(15-22) y Cu(II)-hIAPP(15-22 S19P).

	Cu(II)-hIAPP (15-22)	Cu(II)-hIAPP (15-22 S19P)
g_x	2.058	2.045
g_y	2.085	2.065
g_z	2.234	2.233
g_z (segunda especie)	2.28	-
A_x	4	5
A_y	20	13
A_z	164	173
A_z (segunda especie)	182	-
Ancho de banda x	25	35
Ancho de banda y	25	30
Ancho de banda z	35	35

A y Ancho de banda están dadas en $\times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$

Coordinación de Cu(II) al fragmento hIAPP(18-22)

hIAPP(18-22) como modelo de unión a Cu(II)

Con la noción de que la coordinación del ion Cu(II) a hIAPP(15-22) ocurre hacia el C-terminal a partir del residuo de His18, el fragmento hIAPP(18-22) podría ser un buen modelo para el estudio de coordinación del ion metálico a la hIAPP.

El Cu(II) unido al fragmento hIAPP(18-22) fue estudiado por titulación del péptido a pH 7.5 seguido por CD. Las señales saturan a 1.0 eq de Cu(II) por lo que la estequiometría correspondiente es 1:1 como en el caso del péptido más largo hIAPP(15-22) (Figura 1.2.4). El espectro de CD del complejo Cu(II)-hIAPP(18-22) muestra un banda d-d negativa a $16\,050 \text{ cm}^{-1}$ ($\Delta\epsilon = -0.89 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y tres transiciones correspondientes a bandas de transferencia de carga (LMCT): una banda positiva a $29\,460 \text{ cm}^{-1}$ ($\Delta\epsilon = 0.32 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) que puede ser asignada a una banda LMCT de la amida desprotonada N^- del enlace peptídico al Cu(II); una banda negativa a $32\,700 \text{ cm}^{-1}$ con muy baja intensidad ($\Delta\epsilon = -0.02 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y una positiva a $38\,840 \text{ cm}^{-1}$ con alta intensidad ($\Delta\epsilon = 2.60 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) correspondientes a LMCT π_1 y π_2 del imidazol de

la His18 al Cu(II). Claramente el espectro de CD del complejo Cu(II)-hiAPP(18-22) es prácticamente idéntico al del complejo de Cu(II)-hiAPP(15-22). Más aun, sus espectros de EPR muestran señales muy similares con valores: $A_{\parallel} = 158 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ y $g_{\parallel} = 2.239$ para el complejo de Cu(II)-hiAPP(18-22), y $A_{\parallel} = 164 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ y $g_{\parallel} = 2.234$ para el complejo de Cu(II)-hiAPP(15-22) (Figura 1.2.4 C). Estos parámetros de EPR corresponden a un modo de coordinación ecuatorial con tres nitrógenos y un oxígeno, de acuerdo a las correlaciones de Peisach-Blumberg.⁴⁸ En ambos casos, una cantidad menor al 10% de una segunda especie esta presente como se puede apreciar en los espectros de EPR.

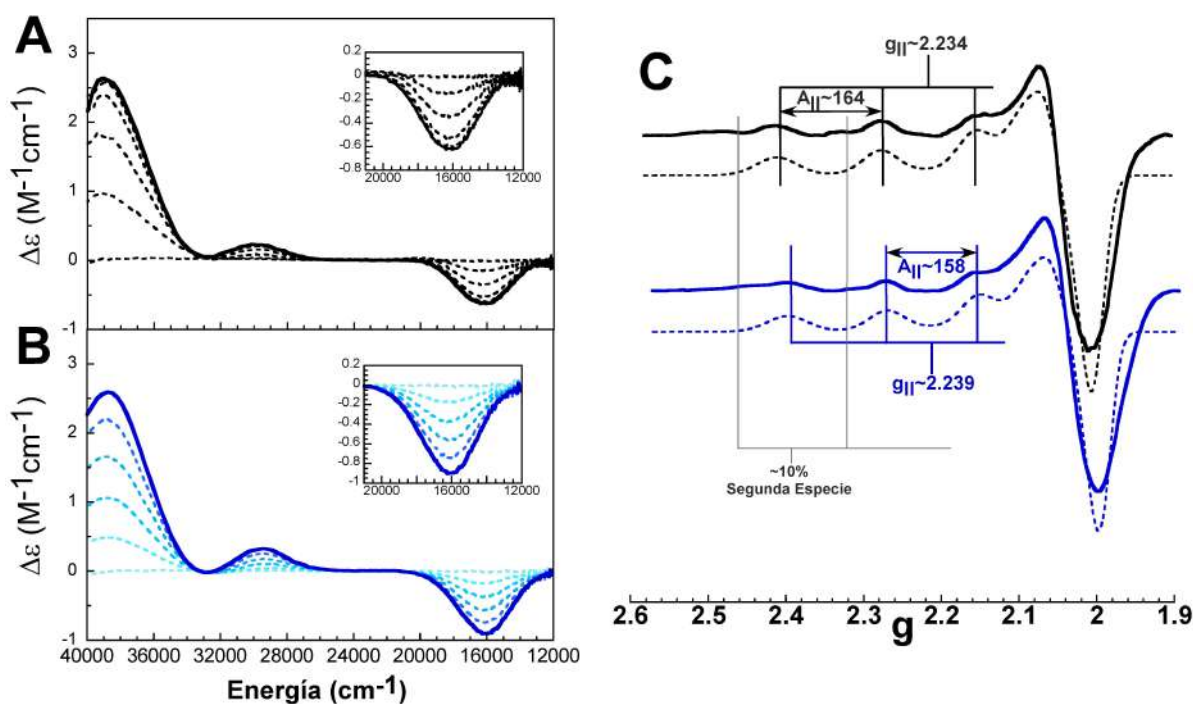


Figura 1.2.4 Titulación de hiAPP(15-22) (negro) (A) y hiAPP(18-22) (azul) (B) con Cu(II) seguida por CD a pH 7.5. (C) Espectros de EPR de los complejos Cu(II)-hiAPP(15-22) (negro) y Cu(II)-hiAPP(18-22) (azul) después de la adición de 1.0 eq Cu(II). Las líneas punteadas corresponden al espectro simulado usando los parámetros listados en Tabla 1.2.3. A_{\parallel} en unidades $\times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$.

Tabla 1.2.3 Parámetros de EPR de la simulación de los complejos Cu(II)-hIAPP(15-22) y Cu(II)-hIAPP(18-22).

	Cu(II)-hIAPP (15-22)	Cu(II)-hIAPP (18-22)
g_x	2.058	2.055
g_y	2.085	2.087
g_z	2.234	2.239
g_z (segunda especie)	2.28	2.28
A_x	4	14
A_y	20	21
A_z	164	158
A_z (segunda especie)	182	168
Ancho de banda x	25	20
Ancho de banda y	25	25
Ancho de banda z	35	35

A y Ancho de banda están dadas en $\times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$

La formación del complejo metálico es a menudo dependiente de pH, por lo que se hizo un estudio por CD de los complejos Cu(II)-hIAPP(15-22) y Cu(II)-hIAPP(18-22) con 1.0 eq Cu(II) a diferentes valores de pH. Siguiendo los cambios en los espectros de CD a diferentes energías, llega a ser evidente que la intensidad de las señales es dependiente de pH, exhibiendo un comportamiento sigmoideo, indicativo de equilibrio de protonación. Los valores de pK_a asociados a los dos equilibrios de protonación son determinados a partir de los mejores ajustes de los datos derivados de al menos tres experimentos (para el cálculo del pK_a , referirse al Apéndice I). En la Figura 1.2.5 se muestran los espectros de CD de los complejos Cu(II)-hIAPP(15-22) (negro) y Cu(II)-hIAPP(18-22) (azul) obtenidos a partir de un barrido a diferentes condiciones de pH, así como los ajustes a diferentes energías: 16 234 cm^{-1} (traza gris y azul claro, escala izquierda en el eje Y) y 30 303 cm^{-1} (traza negra y azul fuerte, escala derecha en el eje Y). Los valores de pK_a para el complejo Cu(II)-hIAPP(15-22) son 6.23 ± 0.13 y 9.40 ± 0.4 , mientras que para el complejo Cu(II)-hIAPP(18-22) son 6.28 ± 0.01 y 8.27 ± 0.16 .

Estos resultados indican que a valores de pH fisiológico, es decir 7.4-7.5, existe mayoritariamente una sola especie, que es la especie con modo de coordinación 3N1O. Por tanto, la segunda especie detectada por EPR corresponde a la forma protonada de cada complejo, asociada a los valores de pK_a : Cu(II)-hIAPP(18-22) ($pK_a 6.28 \pm 0.01$) y Cu(II)-hIAPP(15-22) ($pK_a 6.23 \pm 0.13$).

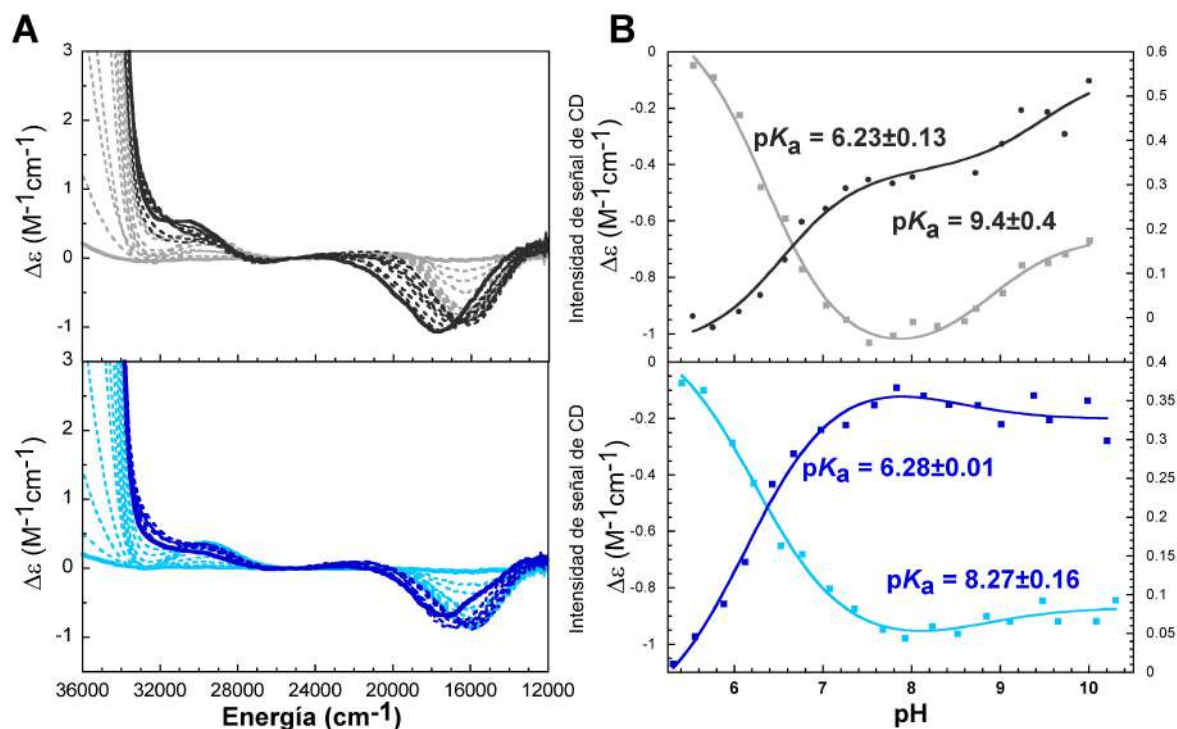


Figura 1.2.5 (A) Espectros de CD de los complejos Cu(II)-hIAPP(15-22) (negro) y Cu(II)-hIAPP(18-22) (azul) obtenidos a partir de un barrido a diferentes condiciones de pH. (B) Trazas para los cambios de intensidad de las señales de CD a 16,234 cm^{-1} (traza gris y azul claro, escala izquierda en el eje Y) y 30,303 cm^{-1} (traza negra y azul fuerte, escala derecha en el eje Y). Los valores de pK_a se determinaron por ajuste de un modelo de dos equilibrios de protonación.

En términos generales, estos resultados indican que el péptido hIAPP(18-22) en un modelo adecuado que reproduce las características de coordinación del péptido más largo hIAPP(15-22). Estos resultados son consistentes con lo reportado recientemente por Li y colaboradores⁴¹ que demuestran por espectrometría de masas LAESI-IMS-MS (Laser Ablation Electrospray Ionization Ion Mobility Separation Mass Spectrometry, por sus siglas en inglés) que el ion Cu(II) exhibe una fuerte asociación con estos residuos -HSSNN- (18-22) de la hIAPP.

Papel de la His18 en la coordinación de Cu(II) a hIAPP y su efecto inhibitorio en la agregación

Con la finalidad de entender el papel que juega la His18 en la coordinación del ión metálico y en la agregación de la hIAPP, se estudió la variante hIAPP(15-22 H18A) en la cual se sustituye el residuo de histidina 18 por alanina, es decir, se suprime el grupo funcional imidazol de la histidina.

En el ensayo de agregación de la variante hIAPP(15-22 H18A) (Figura 1.2.6 A), la adición del ion Cu(II) retrasa la formación de fibras, pero en menor medida en comparación con el péptido hIAPP(15-22). De hecho, con 2.0 eq de Cu(II) aún hay formación de fibras y no se abate el fenómeno de fibrilación como en hIAPP(15-22). Una comparación de los espectros de CD y EPR de los complejos Cu(II)-hIAPP(15-22) y Cu(II)-hIAPP(15-22 H18A) (Figura 1.2.6 B y C), muestran cambios sustanciales. Para el espectro de CD, la banda d-d se desplaza de 16 200 cm^{-1} a 17 100 cm^{-1} y es de menor intensidad, la banda alrededor de 29 800 cm^{-1} se desplaza a más alta energía y el resto de las transiciones muestran mucho menor intensidad. En el caso del espectro de EPR las diferencias son mayores, pasando de valores $g_{\parallel} = 2.234$ y $A_{\parallel} = 164$ para Cu(II)-IAPP(15-22) a valores de 2.221 y $201 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ para la variante Cu(II)-IAPP(15-22 H18A). Por tanto, se puede decir que la naturaleza del complejo Cu(II)-hIAPP(15-22) cambia drásticamente por la sustitución de la His18. Además, el hecho de que disminuya significativamente el efecto inhibitorio del Cu(II) en la formación amiloide, indica que la His18 es el residuo primario de anclaje del Cu(II) hacia el péptido hIAPP(15-22).

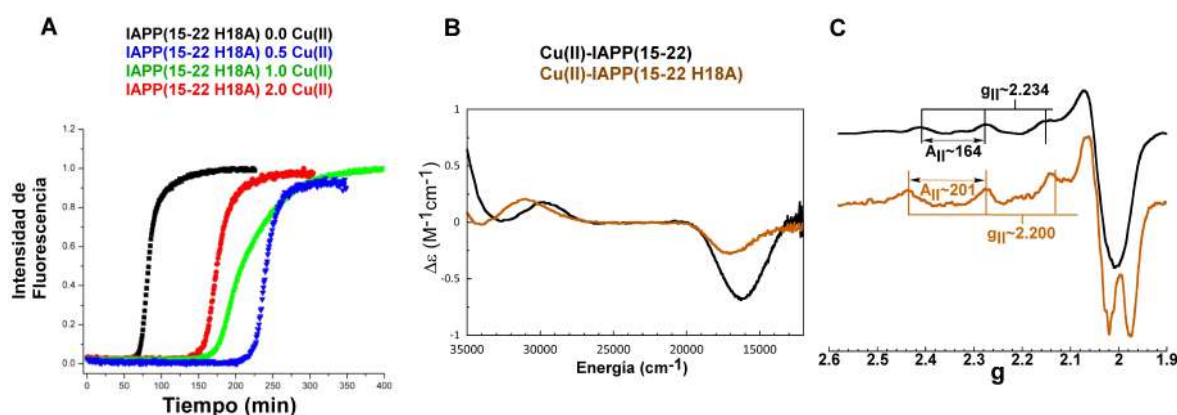


Figura 1.2.6. Efecto del Cu(II) en la agregación amiloide de la variante IAPP(15-22 H18A) (A). Espectros de CD (B) y EPR (C) de los complejos Cu(II)-IAPP(15-22) (negro) y variante Cu(II)-IAPP(15-22 H18A) (café). A_{\parallel} en unidades $\times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$.

Como ya se demostró en el fragmento largo hIAPP(15-22), la His18 es el sitio de anclaje en la coordinación del ion Cu(II) al péptido hIAPP. Para obtener una mejor descripción estructural del complejo, se ha caracterizado la interacción Cu(II)-hIAPP(18-22) por espectroscopia de RMN.

Las señales para cada H y C fueron asignadas a partir de experimentos ^1H - ^1H TOCSY, ^1H - ^{13}C HSQC y ^1H - ^{13}C HMBC. La Figura 1.2.7 A muestra los espectros ^1H - ^{13}C HSQC superpuestos en la región alifática del péptido hIAPP(18-22) en ausencia (azul) y presencia (rojo) de 0.2 eq Cu(II). El efecto paramagnético del ion Cu(II) causa ensanchamiento en las señales debido al incremento en la relajación de los núcleos.⁴⁹ A partir de los datos presentados en la Figura 1.2.7, resulta evidente que las señales más afectadas son las correspondientes a los $\text{H}\beta$ - $\text{C}\beta$ y $\text{H}\alpha$ - $\text{C}\alpha$ de la His18, los cuales desaparecen por completo después de la adición de Cu(II), indicando que la His18 es el principal sitio de anclaje para Cu(II). Adicional a esto, en el espectro de RMN 1D ^{13}C las señales de CO, $\text{C}_{\text{aromaticos}}$, $\text{C}\alpha$ y $\text{C}\beta$ del residuo de His18 desaparecen completamente mientras otras señales disminuyen en intensidad (Figura 1.2.7).

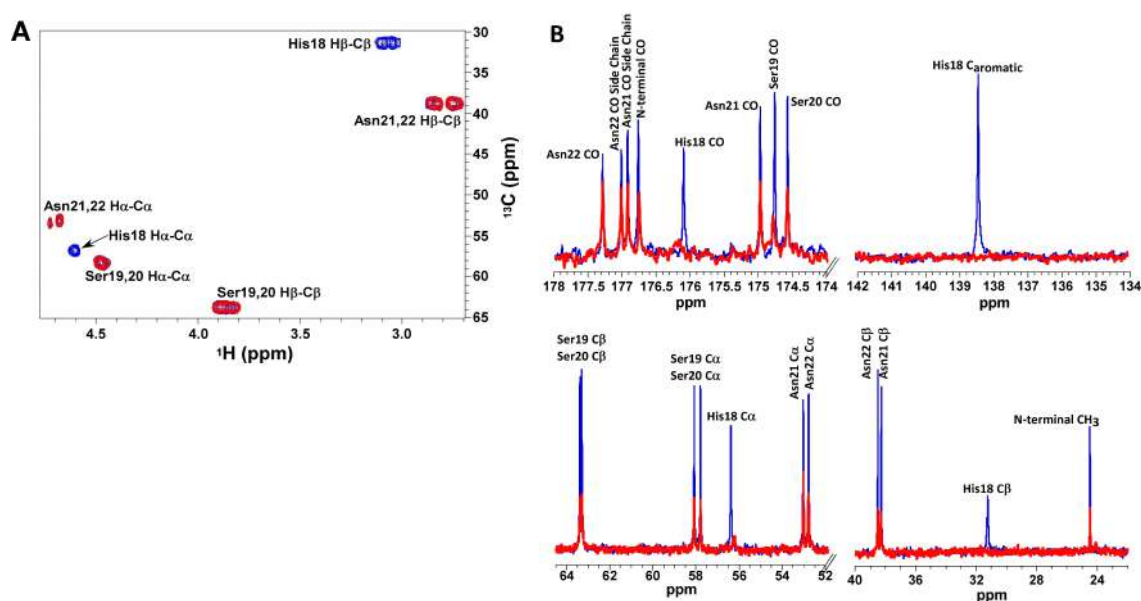


Figura 1.2.7 Espectros superpuestos de RMN 2D ^1H - ^{13}C (A) y de RMN 1D ^{13}C (B) del fragmento hIAPP(18-22) en ausencia (azul) y presencia de 0.2 eq Cu(II) (rojo).

Los grupos imidazol de las histidinas pueden coordinar cobre a través del N1 o N3 del anillo de imidazol. Con el objeto de determinar a qué nitrógeno de la histidina está coordinado el ion Cu(II) en el complejo Cu(II)-hIAPP(18-22), mediante RMN, se calculó la distancia Cu(II)-núcleo utilizando la aproximación de Solomon-Bloembergen para determinar la contribución a la relajación longitudinal de los protones H ϵ y H δ del anillo de imidazol de la His18 por el ion Cu(II)⁵⁰ (Figura 1.2.8). En este tipo de complejos, el intercambio rápido del péptido entre sus formas libres y unidas al metal, y la interacción dipolar (a través del espacio) directa entre el electrón desapareado y los núcleos cercanos, modulan sus propiedades de relajación.^{50, 51} Este modelo también asume que otras contribuciones a la relajación paramagnética, como son las interacciones de contacto y la relajación de tipo Spin-Curie no son significativas, lo cual se sustenta en la baja (casi nula) anisotropía del tensor de susceptibilidad magnética del ion Cu(II) en este tipo de complejos.⁵² Además de que la relajación de tipo Curie solo se vuelve importante cuando los tiempos de relajación electrónica son mucho más rápidos que los tiempos de reorientación de la molécula.^{51, 52} Así, en nuestro sistema ambos tiempos son comparables, tiempo de correlación electrónica de Cu(II): 1×10^{-9} segundos⁵³; tiempo de reorientación molecular para los péptidos utilizados: $\sim 0.5-2 \times 10^{-9}$ segundos. De hecho, la contribución de tipo Curie para un sistema de estas características sería menor al 1%.⁵¹ Asimismo, esta estrategia también asume que la localización de la densidad electrónica es puntual y se encuentra sobre el ion Cu(II), es decir donde no existe deslocalización del espín en el sistema conjugado del anillo imidazol. Esta aproximación es validada por el método de cálculo de las distancias, que implica la resolución simultánea de la ecuación de Solomon-Bloembergen y la contribución a la relajación por el intercambio entre las formas libres y unidas del péptido.⁵⁰ Por lo que, sí al fijar la distancia Cu(II)-H ϵ del anillo imidazol hubiera deslocalización electrónica, entonces se obtendrían valores menores a los esperados para el protón H δ , que en este caso coincide con la distancia esperada con el electrón cuando su densidad está localizada en el metal.⁵⁴

Por experimentos de recuperación de la inversión (Figura 1.2.8 B) se calcula T_1 (tiempo que tarda la magnetización en regresar al equilibrio) (ver Apéndice II) de H ϵ (azul claro) y H δ (azul oscuro) para el péptido libre, y para las especies unidas a Cu(II) después de la adición de 0.02 eq Cu(II) H ϵ (naranja) y H δ (rojo). La Figura 1.2.8 A muestra los espectros de RMN 1D de

^1H en donde se presentan ambos protones $\text{H}\epsilon$ y $\text{H}\delta$ y su efecto de ensanchamiento después de la adición de Cu(II).

El cálculo del incremento en la rapidez de relajación nuclear longitudinal debido al acoplamiento dipolar con el electrón desapareado del Cu(II), R_{1M} , da la información acerca de la distancia entre los núcleos y el ion metálico.⁵³ R_{1M} depende de la fracción molar libre del péptido y la fracción molar unida al Cu(II), además del tiempo de correlación de intercambio τ ($\tau = 1/k_{\text{off}}$, calculada usando una distancia de 0.3 nm de Cu(II) a $\text{H}\epsilon$ ⁵⁰ de His18, obteniendo un valor de 5.2 ms). Para el cálculo de las distancias Cu(II)-núcleo referirse al Apéndice II. La Tabla 1.2.4 muestra los parámetros T_1 , R_{1b} , R_{1p} , R_{1M} y las distancias de los protones $\text{H}\epsilon$ y $\text{H}\delta$ al ion Cu(II). La Figura 1.2.8 C compara las dos posibles uniones de Cu(II) a N1 o N3, donde resulta evidente que, en ambos modos de unión, la distancia del Cu(II) a $\text{H}\epsilon$ es de 0.3 nm, mientras que la distancia a $\text{H}\delta$ varía, dependiendo de si el Cu(II) está unido a N1 o N3. Así, a partir de nuestros datos, determinamos que la distancia de $\text{H}\delta$ a Cu(II) es de 0.506 nm, lo que indica que el Cu(II) se encuentra unido al N1 del anillo de imidazol de la histidina en el complejo.

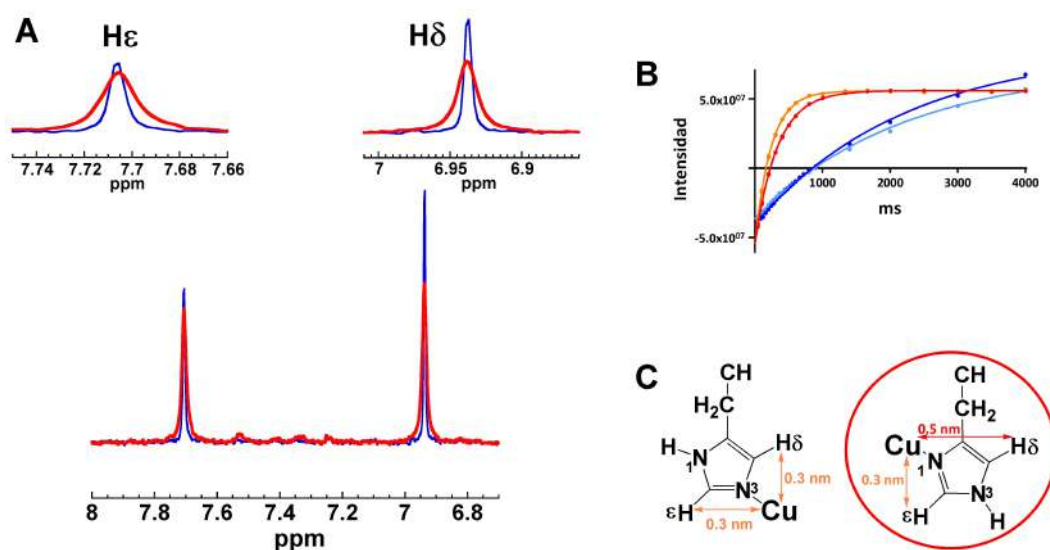


Figura 1.2.8 (A) Comparación de espectros de RMN 1D ^1H del fragmento hiAPP(18-22) en ausencia (azul) y presencia de 0.02 eq Cu(II) (rojo). (B) Ajustes de rapidez de relajación por experimentos de 1D-IR de los protones $\text{H}\epsilon$ y $\text{H}\delta$ del imidazol de la His18. Las especies libres corresponden a $\text{H}\epsilon$ (azul claro) y $\text{H}\delta$ (azul oscuro), las especies unidas a 0.02 eq Cu(II) corresponden a $\text{H}\epsilon$ (naranja) y $\text{H}\delta$ (rojo). (C) Esquema que representa las dos posibilidades de unión de Cu(II) a N1 o N3 del imidazol y las distancias para cada caso.

Tabla 1.2.4 Parámetros de los experimentos de RMN 1D-IR de los protones H ϵ y H δ .

	T ₁ libre	T ₁ unido	R _{1b} libre	R _{1b} unido	R _{1p}	R _{1M}	Distancia(nm)
H ϵ	2.2	0.334	0.455	2.994	2.549	379.568	0.506
H δ	2.2	0.239	0.455	4.184	3.739	7324.373	0.3 (fija)

Identificación de las amidas del enlace peptídico involucradas en la unión de Cu(II) a hIAPP(18-22)

Con el fin de caracterizar el papel de los grupos amida del enlace peptídico en la coordinación de Cu(II) a hIAPP(18-22) se sintetizaron dos variantes: hIAPP(18-22 S19Sar) y hIAPP(18-22 S20Sar), donde Sar corresponde al aminoácido sarcosina, es decir, a la N-metilglicina. En estos péptidos, la amida del enlace peptídico esta bloqueada por el grupo metilo en la posición de cada sarcosina (esquema en la Figura 1.2.9). En la Figura 1.2.9 se muestran las comparaciones de los espectros de absorción, CD y EPR de los complejos con estas variantes y aquellos del complejo Cu(II)-hIAPP(18-22).

El espectro de absorción en la región UV/Vis del complejo Cu(II)-hIAPP(18-22) (negro) muestra una banda d-d a $\sim 16\,300\text{ cm}^{-1}$ ($\epsilon = 91\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$), mientras que esta transición es desplazada a $\sim 14\,400\text{ cm}^{-1}$ ($\epsilon = 36\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) para el complejo de Cu(II)-hIAPP(18-22 S20Sar) (azul oscuro). Por otro lado, el espectro de absorción del complejo Cu(II)-hIAPP(18-22 S19Sar) (azul claro) muestra una intensidad mucho menor en la transición de campo ligando, por lo que no es posible determinar su energía.

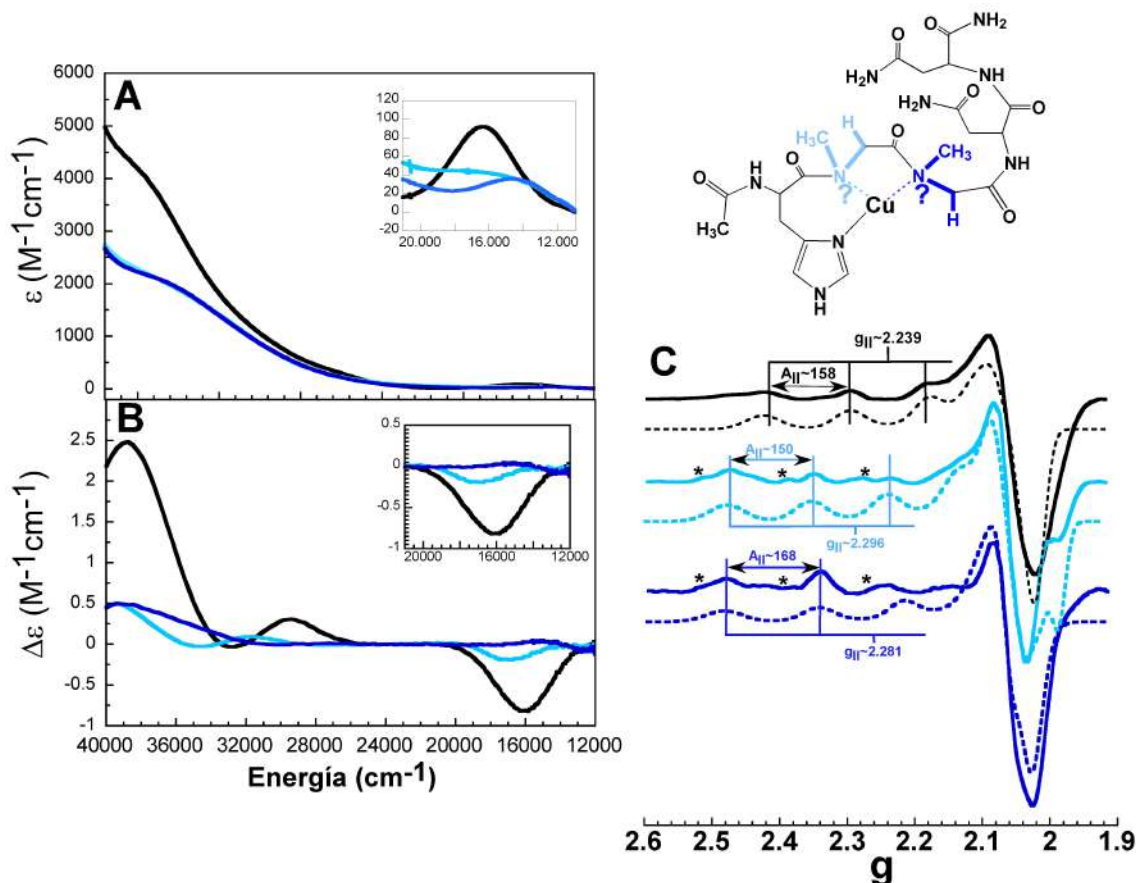


Figura 1.2.9 Espectros de (A) absorción electrónica y (B) CD en la región UV/Vis y (C) espectros de EPR de los complejos Cu(II)-hIAPP(18-22) (negro), Cu(II)-hIAPP(18-22 S19Sar) (azul claro) y Cu(II)-hIAPP(18-22 S20Sar) (azul oscuro) con 1.0 eq Cu(II) a pH 7.5. Las líneas punteadas corresponden al espectro simulado usando los parámetros listados en Tabla 1.2.5. El esquema en la parte superior derecha representa a las variantes con sarcosinas. A_{\parallel} en unidades $\times 10^{-4}$ cm⁻¹.

Las sustituciones de serinas por sarcosinas también tienen efectos drásticos en los espectros de CD, donde las señales de ambos complejos Cu(II)-hIAPP(18-22 S19Sar) y Cu(II)-hIAPP(18-22 S20Sar) tienen muy baja intensidad y sus transiciones son difíciles de identificar. Este decremento en intensidad en la señal en CD puede indicar que la quiralidad de los complejos formados ha cambiado (como en el caso de la formación de complejos con Cu(II) completamente diferentes) y/o la afinidad del péptido por Cu(II) ha disminuido en gran medida (debido a que el Cu(II) no unido al péptido, es decir, Cu(II) en solución, no contribuye a la intensidad de señal en el CD). Consistentemente, los espectros de EPR para estas variantes indican la presencia de Cu(II) en solución (denotadas en los espectros de EPR como asteriscos) y de la formación del complejo con valores de g_{\parallel} y A_{\parallel} que son muy diferentes de aquellos del complejo Cu(II)-hIAPP(18-22). En ambos casos, la sustitución de Ser por Sar

da lugar a complejos con modos de coordinación ecuatorial más ricos en oxígenos (2N2O/1N3O). En general, estos resultados indican que los grupos amida del enlace peptídico de la Ser19 y Ser20 participan en la esfera de coordinación del complejo Cu(II)-hIAPP(18-22).

Tabla 1.2.5 Parámetros de EPR de la simulación de los complejos Cu(II)-hIAPP(18-22) y sus variantes S19Sar y S20Sar.

	Cu(II)-hIAPP (18-22)	Cu(II)-hIAPP (18-22 S19Sar)	Cu(II)-hIAPP (18-22 S20Sar)
g_x	2.055	2.075	2.070
g_y	2.087	2.020	2.065
g_z	2.239	2.296	2.281
g_z (segunda especie)	2.28	-	-
A_x	14	5	4
A_y	21	30	10
A_z	158	150	168
A_z (segunda especie)	168	-	-
Ancho de banda x	20	25	20
Ancho de banda y	25	20	40
Ancho de banda z	35	35	35

A y Ancho de banda están dadas en $\times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$

Evaluando el papel de los grupos hidroxilo de los residuos de serina 19 y serina20 en la unión de Cu(II) a hIAPP(18-22)

La participación de los grupos hidroxilo de Ser19 y Ser20 en la unión de Cu(II) fue evaluada por reemplazo de cada serina por alanina, sintetizando las variantes hIAPP(18-22 S19A) y hIAPP(18-22 S20A). En estas variantes, la cadena lateral de la serina $-\text{CH}_2\text{-OH}$ se substituye por un $-\text{CH}_3$ (esquema en la Figura 1.2.10). Los espectros de absorción electrónica y CD en la región UV/Vis del la variante Cu(II)-hIAPP(18-22 S19A) (línea naranja) son prácticamente idénticos a aquellos del complejo Cu(II)-hIAPP(18-22) (línea negra). En contraste, se observaron cambios significativos para el complejo Cu(II)-hIAPP(18-22 S20A) (línea roja). Específicamente, la banda de campo ligando para el complejo Cu(II)-hIAPP(18-22 S20A) (línea roja) esta desplazada a menor energía en el espectro de absorción (Figura 1.2.10 A) comparada con la del complejo Cu(II)-hIAPP(18-22) (línea negra), mientras que la intensidad

de todas las transiciones de CD decrecen significativamente (Figura 1.2.10 B). Consistentemente, los espectros de EPR del complejo Cu(II)-hiAPP(18-22) (espectro negro) y la variante Cu(II)-hiAPP(18-22 S19A) (espectro naranja) son prácticamente idénticos, mientras que la variante Cu(II)-hiAPP(18-22 S20A) (espectro rojo) da parámetros diferentes de EPR, ver Tabla 1.2.6. En conjunto, estos resultados indican que el grupo hidroxilo de la Ser19 no participa en la coordinación a Cu(II), mientras que aquel de la Ser20 sí participa en la unión del ión metálico.

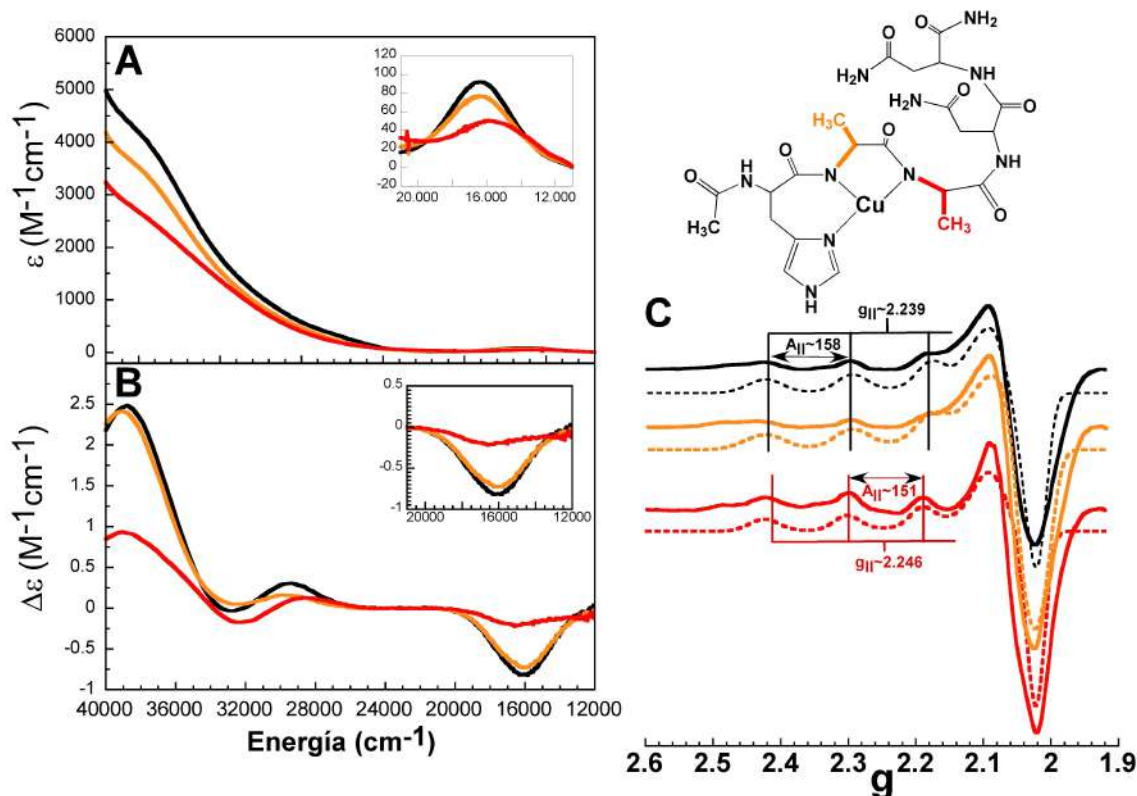


Figura 1.2.10 Espectros de (A) absorción electrónica en la región UV/Vis, (B) CD en la región UV/vis y (C) EPR de los complejos Cu(II)-hiAPP(18-22) (negro), Cu(II)-hiAPP(18-22 S19A) (naranja) y Cu(II)-hiAPP(18-22 S20A) (rojo) con 1.0 eq Cu(II) a pH 7.5. Las líneas punteadas corresponden al espectro simulado usando los parámetros listados en Tabla 1.2.6. El esquema en la parte superior derecha representa a las variantes con alaninas. A_{II} en unidades $\times 10^4 cm^{-1}$.

Tabla 1.2.6 Parámetros de EPR de la simulación de los complejos Cu(II)-hIAPP(18-22) y sus variantes S19A y S20A.

	Cu(II)-hIAPP (18-22)	Cu(II)-hIAPP (18-22 S19A)	Cu(II)-hIAPP (18-22 S20A)
g_x	2.055	2.052	2.049
g_y	2.087	2.090	2.075
g_z	2.239	2.240	2.246
g_z (segunda especie)	2.28	2.28	2.28
A_x	14	5	8
A_y	21	19	27
A_z	158	159	151
A_z (segunda especie)	168	168	170
Ancho de banda x	20	25	20
Ancho de banda y	25	35	25
Ancho de banda z	35	40	30

A y Ancho de banda están dadas en $\times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$

Evaluando el papel de las asparaginas 21 y 22 en la unión de Cu(II) a hIAPP(18-22)

Con la finalidad de evaluar el papel de los residuos de asparagina 21 y 22 en la coordinación a Cu(II), se prepararon las variantes Asn21Gln, Asn22Gln y Asn22Leu. En las primeras dos, el grupo R de la asparagina $-\text{CH}_2\text{-CO-NH}_2$ ha sido reemplazado por un grupo más largo $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO-NH}_2$, y en la variante Asn22Leu el grupo R de la asparagina 22 ha sido reemplazado con un grupo alifático $-\text{CH}_2\text{-CH}((\text{CH}_3)_2)$ como se muestra en el esquema de la Figura 1.2.11. En general los espectros de absorción electrónica y CD en la región UV/Vis del complejo Cu(II)-hIAPP(18-22) y la variante Asn21Gln son prácticamente idénticos (Figura 1.2.11 A y B), mientras que sus espectros de EPR presentan parámetros muy similares (Figura 1.2.11 C), claramente indicando que la Asn21 no participa en la coordinación de Cu(II) al péptido. Por otra parte, los espectros de absorción electrónica y CD en la región UV/Vis de la variante Cu(II)-hIAPP(18-22 N22Q) (líneas verdes) y la variante Cu(II)-hIAPP(18-22 N22L) (líneas moradas) muestran un decremento en la intensidad de sus bandas d-d a $16\,200 \text{ cm}^{-1}$ y a $39\,030 \text{ cm}^{-1}$, mientras que un pequeño desplazamiento es evidente en las transiciones LMCT con respecto al complejo Cu(II)-hIAPP(18-22) (línea negra). Al igual que en las espectroscopias de absorción, los espectros de EPR de las variantes con sustitución en asparagina 22 muestran cambios más pronunciados en sus valores de g_{\parallel} y A_{\parallel} para la variante Asn22Leu (Figura 1.2.11 C). En conclusión, estos resultados sugieren que la

asparagina 22 puede jugar un papel en la coordinación de Cu(II) a hIAPP(18-22); sin embargo, los efectos de su sustitución por un residuo no-coordinante en las características espectroscópicas del complejo son pequeños, comparados con las observadas para las sustituciones de Ser a Sar o Ala. Por tanto, se propone que el papel de Asn22 en la coordinación de Cu(II) a hIAPP(18-22) puede ser como ligante axial o como parte de la segunda esfera de coordinación. De hecho, en el espectro de ^{13}C RMN, (Figura 1.2.7), la señal del $\text{C}\alpha$ de la Asn22 se ve más afectada que la correspondiente a la Asn21. Se propone entonces una interacción de la Asn22 como ligante axial o como parte de la segunda esfera de coordinación.

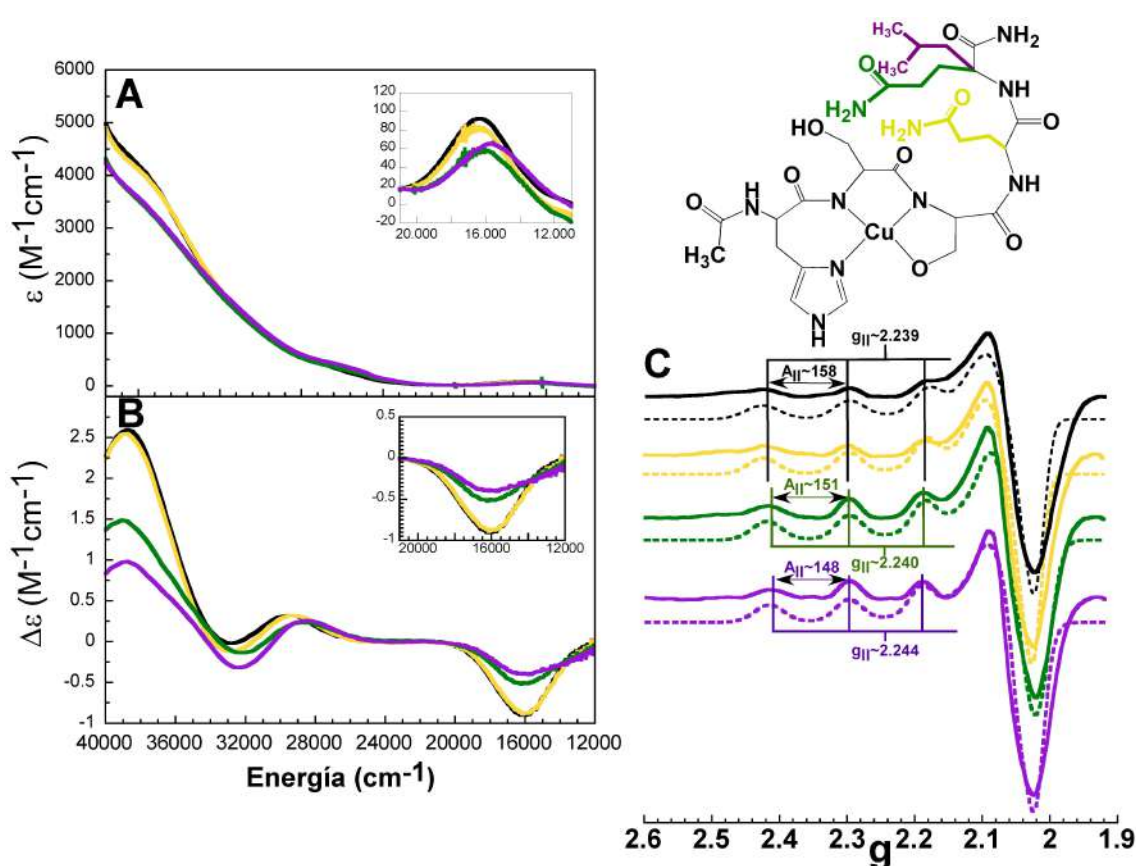


Figura 1.2.11 Espectros de (A) absorción electrónica en la región UV/Vis, (B) CD en la región UV/vis y (C) EPR de los complejos Cu(II)-hIAPP(18-22) (negro), Cu(II)-hIAPP(18-22 N21Q) (amarillo), Cu(II)-hIAPP(18-22 N22Q) (verde) y Cu(II)-hIAPP(18-22 N22L) (morado) con 1.0 eq Cu(II) a pH 7.5. Las líneas punteadas corresponden al espectro simulado usando los parámetros listados en Tabla 1.2.7. El esquema en la parte superior derecha representa a las variantes con glutaminas y leucina. A_{\parallel} en unidades $\times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$.

Tabla 1.2.7 Parámetros de EPR de la simulación de los complejos Cu(II)-hIAPP(18-22) y sus variantes N21Q, N22Q y N22L.

	Cu(II)-hIAPP (18-22)	Cu(II)-hIAPP (18-22 N21Q)	Cu(II)-hIAPP (18-22 N22Q)	Cu(II)-hIAPP (18-22 N22L)
g_x	2.055	2.055	2.042	2.055
g_y	2.087	2.087	2.080	2.080
g_z	2.239	2.239	2.240	2.244
g_z (segunda especie)	2.28	2.30	2.30	2.30
A_x	14	14	5	5
A_y	21	19	18	28
A_z	158	156	151	146
A_z (segunda especie)	168	146	146	150
Ancho de banda x	20	20	30	20
Ancho de banda y	25	25	45	45
Ancho de banda z	35	30	30	30

A_z y Ancho de banda están dadas en $\times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$

Identificación de la segunda especie en la unión de Cu(II) a hIAPP(18-22)

Con el fin de conocer la naturaleza de la segunda especie presente en la coordinación de Cu(II) a hIAPP(18-22), se analizaron los espectros de EPR del complejo Cu(II)-hIAPP(18-22) y de todas las variantes S19Sar, S20Sar, S19A, S20A, N21Q, N22Q y N22L. En la Figura 1.2.12 se presenta una comparación de la región paralela de los espectros de EPR del complejo y las variantes.

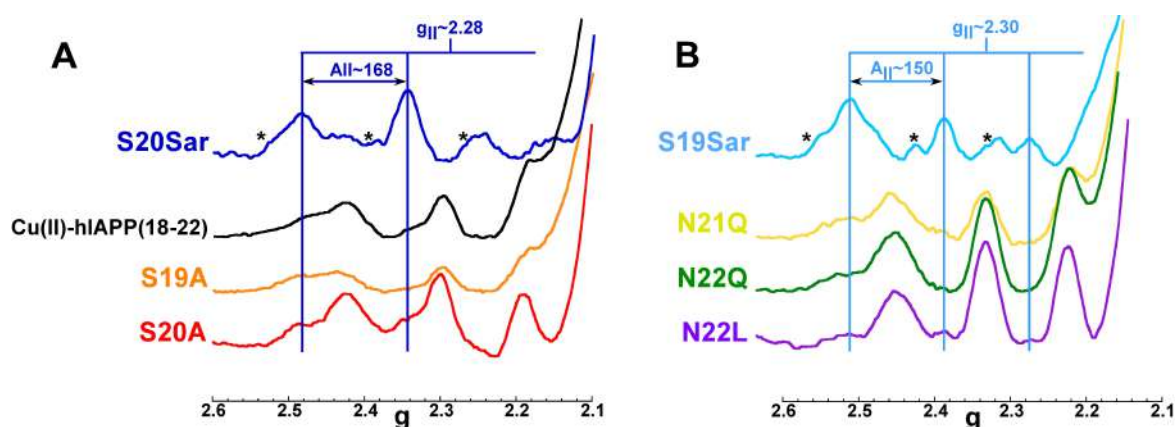
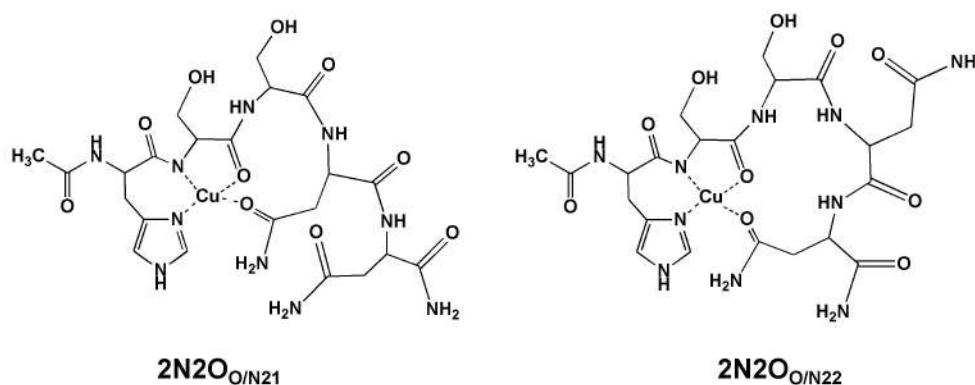


Figura 1.2.12 Espectros de EPR en la región paralela del complejo de Cu(II)-hIAPP(18-22) y sus variantes. (A) comparación de la especie principal en la variante S20Sar vs segunda especie en Cu(II)hIAPP(18-22), S19A y S20A y (B) comparación de la especie principal en la variante S19Sar vs segunda especie en N21Q, N22Q y N22L. $A_{||}$ en unidades $\times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$.

El bloqueo del nitrógeno de amida del enlace peptídico como en el caso de las variantes de sarcosinas favorece la formación de la segunda especie. Así, comparando los valores de g_{\parallel} y A_{\parallel} específicamente de la especie principal de la variante S20Sar y de la segunda especie del complejo de Cu(II)-hIAPP(18-22) espectros azul oscuro y negro respectivamente (Figura 1.2.12 (A)), se puede ver de que se trata de la misma especie debido a que los valores $A_{\parallel} = 168 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ y $g_{\parallel} = 2.28$ son iguales. Esto confirma lo ya planteado anteriormente de que este pequeño porcentaje de segunda especie pertenece a la forma protonada del complejo, con modo de coordinación 2N2O. El bloqueo del nitrógeno de amida del enlace peptídico de la Ser20 obliga a que el Cu(II) sólo se una al nitrógeno del imidazol, al nitrógeno de la primera amida desprotonada del enlace peptídico de la Ser19 y a dos átomos de oxígeno. El porcentaje de esa segunda especie presente a pH 7.5 correspondería al ~6%, debido al valor de pK_a del complejo de 6.28, el cual está cercano a 7.5 y que correspondería al equilibrio de protonación $2N2O \rightarrow 3N1O$.

La comparación de los espectros de EPR de todas las variantes permite analizar que en todos los complejos hay presencia de la segunda especie, específicamente la comparación del complejo Cu(II)-hIAPP(18-22) con la variante de S20Sar y las variantes S19A y S20A. Para los cuatro espectros los valores de g_{\parallel} y A_{\parallel} son idénticos, lo cual hace posible conocer la naturaleza de la segunda especie. En esta segunda especie, con modo de coordinación 2N2O, no hay participación a las cadenas laterales de las serinas 19 y 20 en la coordinación a Cu(II). En la Figura 1.2.12 B se comparan las variantes S19Sar, N21Q, N22Q y N22L; las últimas tres presentan también una segunda especie, pero con naturaleza diferente a la del complejo Cu(II)-hIAPP(18-22) debido a que los valores de g_{\parallel} y A_{\parallel} son diferentes. Sin embargo, entre ellos prevalece el mismo comportamiento, por lo que también nos permite concluir que estos dos residuos de asparagina 21 y 22 sí tienen participación en la formación de la segunda especie. Así, para ambos complejos con sarcosinas el bloqueo de la amida del enlace peptídico favorece la formación de una especie idéntica a la segunda especie que prevalece en el complejo Cu(II)-hIAPP(18-22), y que a pesar de su formación, parece ser poco afín debido a la presencia de cobre no unido al péptido (cobre en solución indicado como asteriscos en las variantes de S19Sar y S20Sar en la Figura 1.2.12).

En general, el análisis de las variantes del complejo Cu(II)-hIAPP(18-22) permitió conocer la formación de una segunda especie con modo de coordinación 2N2O en donde el nitrógeno del imidazol de la His18, el nitrógeno de amida desprotonada de Ser19 y dos átomos de oxígeno (de la cadena peptídica o de las cadenas laterales de los últimos residuos de asparaginas) están participando en su esfera de coordinación (Esquema 1.2.1).



Esquema 1.2.1 Modelos de coordinación 2N2O propuestos para la formación de la segunda especie presente en el complejo Cu(II)-hIAPP(18-22).

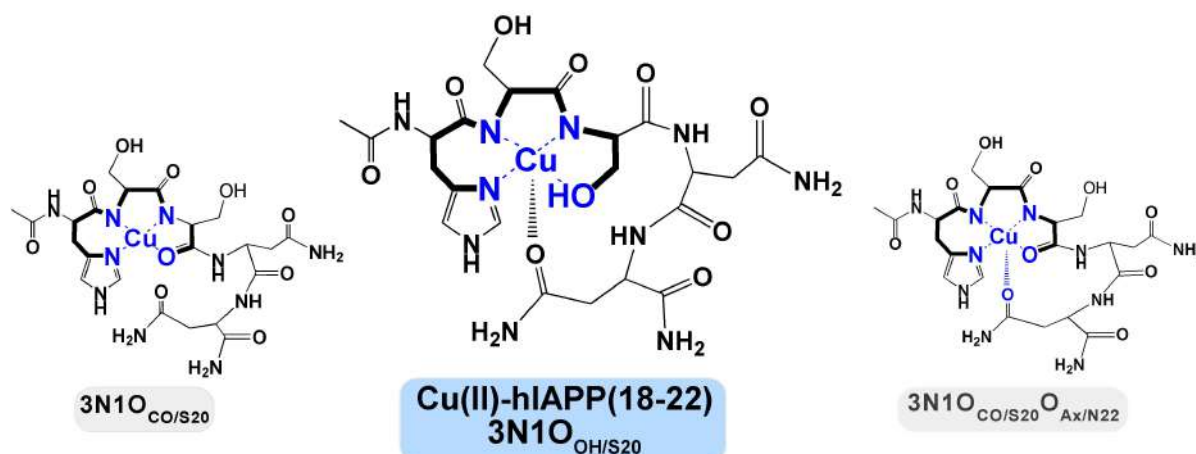
Cálculos de estructura electrónica del complejo Cu-hIAPP(18-22)

En colaboración con el Dr. Jorge Martín del Campo y el estudiante Rodrigo Cortés-Mejía del Departamento de Física y Química Teórica de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) se hicieron estudios teóricos de la coordinación del Cu(II) al péptido hIAPP(18-22). Se evaluaron diferentes modelos del complejo Cu(II)-hIAPP(18-22) por Dinámica Molecular Born-Oppenheimer y cálculos de estructura electrónica, y se encontró que los dos modelos más estables correspondían a aquellos complejos formados con N1 del imidazol de la His18, 2 amidas desprotonadas del enlace peptídico y un átomo de oxígeno provisto por el -OH de la cadena lateral de la Ser20 o por el carbonilo del enlace peptídico del mismo residuo, con energías relativas de 0.0 y 3.4 kcal/mol respectivamente. Esta observación es consistente con los resultados experimentales que revelan el papel del -OH de Ser20 en la coordinación del ión Cu(II) a hIAPP(18-22). El cálculo de los parámetros de EPR para estos modelos, nos permitió concluir que el modelo que provee una mejor descripción de valor g_{\parallel} es aquel en donde el oxígeno proviene del carbonilo, etiquetado como 3N1O_{CO/S20}, mientras el modelo con el grupo

hidroxilo, etiquetado como $3N1O_{OH/S20}$, ajusta mejor para el valor de A_{\parallel} . Así, podemos decir que ambos modos de coordinación $3N1O_{OH/S20}$ y $3N1O_{CO/S20}$, pueden co-existir, aunque los experimentos de CD indican claramente que el modo de coordinación más poblado es $3N1O_{OH/S20}$. Asimismo, estos cálculos también plantearon la posibilidad de que la asparagina 22 jugará un papel importante como componente axial en la formación del complejo. Para mayor detalle sobre los cálculos de estructura electrónica, consultar la ref ⁵⁵.

Modelos de coordinación Cu(II)-hIAPP

A partir de los estudios espectroscópicos y del uso de variantes en el estudio de la coordinación de Cu(II) a fragmentos peptídicos de la hIAPP, se puede aseverar que la secuencia mínima necesaria para reproducir el sitio de unión al ion metálico incluye los residuos –HSSNN-. El ion Cu(II) se coordina a partir del N1 de anillo de imidazol del residuo de His18, dos amidas desprotonadas del enlace peptídico de la Ser19 y Ser20, y un átomo de oxígeno proveniente del grupo hidroxilo de la Ser20 o del carbonilo del enlace peptídico del mismo residuo, complementando la coordinación en el plano ecuatorial. Asimismo, en el caso de participación de ligandos axiales, se ha propuesto que la cadena lateral del residuo de Asn22 esté participando en la esfera de coordinación del ion metálico, Esquema 1.2.2



Esquema 1.2.2. Modelos de coordinación propuestos para la formación del complejo Cu(II)-hIAPP(18-22).

Los estudios de cálculos de estructura electrónica han apoyado estas propuestas, donde plantean la posible coexistencia de las dos especies del ligando basado en oxígeno (-OH o carbonilo). Estos estudios igualmente validan la participación del ligando axial de Asn22 y descartan la posible participación de moléculas de agua en la esfera de coordinación. ⁵⁵

Cu(II) unido a los agregados de hIAPP

El modo por el cual el ion Cu(II) se une a los agregados amiloides de la hIAPP nos puede dar información acerca del mecanismo por el cual el Cu(II) inhibe el proceso de formación amiloide. Por tanto, se caracterizó por EPR al complejo formado entre la fibra amiloide y el ion metálico. Para ello se prepararon dos tipos de muestras de fibras amiloides de hIAPP: fibras crecidas en ausencia del ion metálico a las cuales se les adicionó 0.5 eq Cu(II); y fibras crecidas en presencia de 0.5 eq Cu(II).

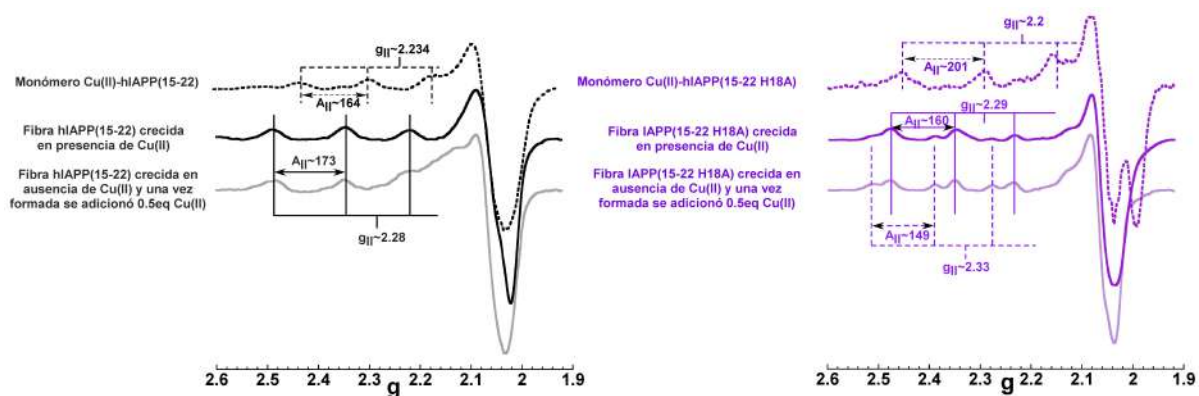


Figura 1.2.13 Espectros de EPR de los complejos de Cu(II)-hIAPP(15-22) en su forma monomérica (línea negra punteada) y unido a las fibras (negro y gris) y de los complejos de la variante Cu(II)-hIAPP(15-22 H18A) en su forma monomérica (línea morada punteada) y unido a las fibras (morado y morado claro). $A_{||}$ en unidades $\times 10^4 \text{ cm}^{-1}$.

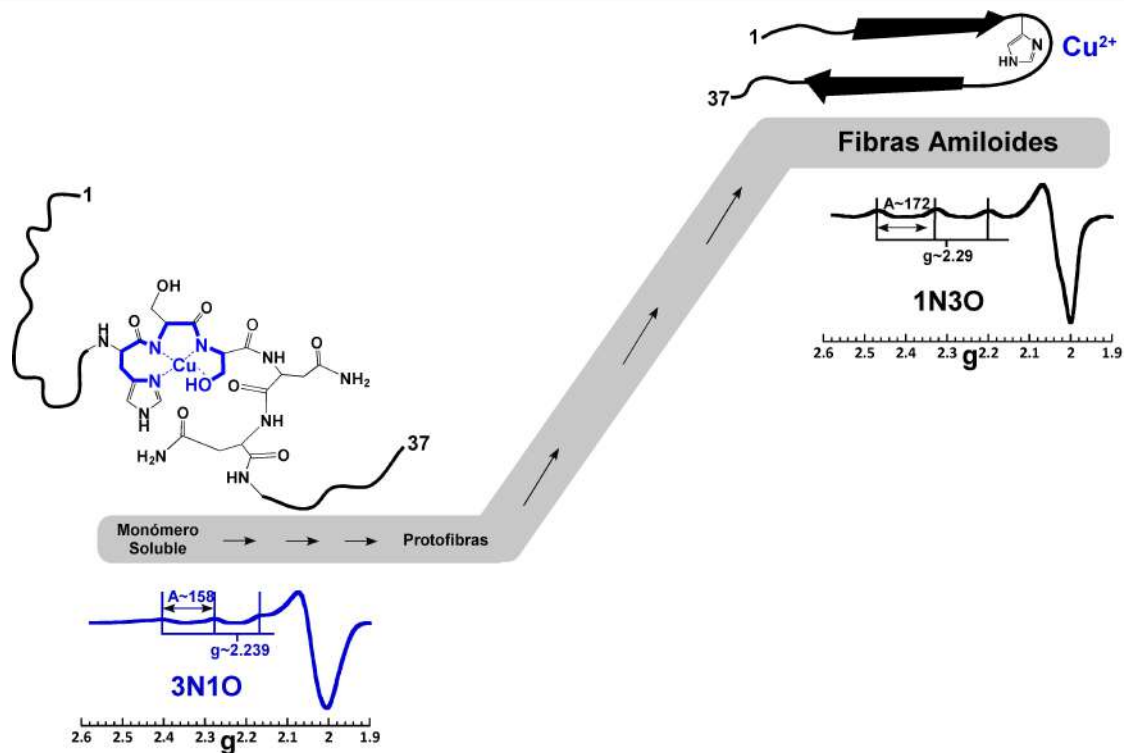
La Figura 1.2.13 muestra el espectro de EPR de las fibras de hIAPP(15-22) crecidas en presencia de 0.5 eq de Cu(II) (espectro negro). Los parámetros $g_{||}$ y $A_{||}$ con valores de 2.28 y $173 \times 10^4 \text{ cm}^{-1}$ correlacionan para un modo de coordinación ecuatorial rico en oxígenos 1N3O o 4O. Asimismo, cuando la fibra crece en ausencia del ion metálico y una vez formada se le adiciona 0.5 eq de Cu(II) (espectro gris) presenta los mismos parámetros de EPR. Evidentemente, para ambos espectros, el modo de coordinación que adopta el cobre unido a las fibras amiloides es muy diferente con respecto al complejo formado en solución por el péptido hIAPP(15-22) monomérico (espectro negro punteado), lo que implica que la conformación de hoja-beta necesaria para la formación de la fibra no es compatible con la conformación del complejo en la unión cobre-péptido.

Los resultados obtenidos con las fibras crecidas en presencia de cobre sugieren que aunque el Cu(II) se unió inicialmente a la forma monomérica del péptido, una vez formada la fibra, el modo de coordinación del ión metálico a la hIAPP cambió drásticamente, dando como

resultado un diferente ambiente de coordinación. Así, cambios conformacionales involucrados en la formación de la fibra forzarán al ion metálico a adoptar un modo de coordinación que difiere al que adopta en solución.

Por otra parte, los espectros de EPR de las fibras de la variante hIAPP(15-22 H18A) crecidas en presencia de Cu(II) muestran dos juegos de señales. Para una especie, los valores de g_{\parallel} 2.29 y A_{\parallel} $160 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ corresponden a un modo de coordinación ecuatorial 1N3O mientras que para la otra los parámetros correlacionan para un modo de coordinación de 4O. Evidentemente ninguna de estas dos especies corresponden al observado en el complejo monomérico en solución de la variante H18A (espectro morado punteado). Así, al igual que en el péptido hIAPP(15-22), la forma de coordinación cambia con respecto al complejo monomérico, dando paso a un complejo con diferente conformación debido a la competencia en la formación de la fibra.

En general, la coordinación de Cu(II) al péptido hIAPP tiene un importante impacto en el proceso de fibrilación del mismo. Por técnicas como RMN y difracción de rayos-X^{56,57} se han propuesto estructuras de la fibra amiloide de la hIAPP, en la cual el sitio de anclaje (His18) al ion metálico esta localizado en medio de la región hidrofóbica del péptido que participa en la formación de la hoja-beta (Esquema 1.2.3). Por tanto, el sitio de unión a Cu(II), como lo hemos caracterizado en la forma monomérica del péptido, no está disponible en la hIAPP-fibrilar, forzando al Cu(II) a coordinarse de manera diferente que en el complejo en solución.



Esquema 1.2.3. Modelo de agregación amiloide de la hIAPP en presencia de Cu(II). El complejo monomérico soluble al inicio del proceso presenta un modo de coordinación 3N1O. La formación de la fibra final en presencia de Cu(II) forma un complejo distinto al inicial, con un modo de coordinación más rico en oxígenos. La presencia del ion metálico retrasa el proceso de agregación amiloide del péptido hIAPP.

Discusión y Conclusiones

Estos estudios espectroscópicos han elucidado la formación del complejo Cu(II)-hIAPP con un modo de coordinación 3N1O a pH fisiológico y cada uno de los residuos involucrados en la esfera de coordinación. Se encontró que el ion metálico se une a residuos claves para la formación de hojas- β en la vía amiloide.

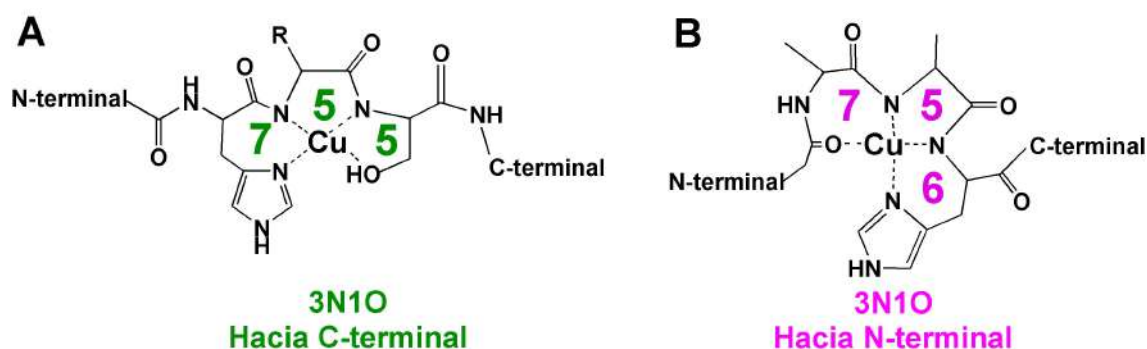
Primeramente, el Cu(II) se coordina a la His18, y es el principal residuo de anclaje para el ion metálico, uniéndose al N1 de anillo de imidazol como se comprobó por RMN. Este residuo no está conservado en todas las especies, de hecho, una arginina reemplaza a la histidina incluso en aquellas especies susceptibles a desarrollar Diabetes Tipo 2. Sin embargo, la carencia de histidina no previene que el Cu(II) se una a IAPP como Kallay y colaboradores⁴² han demostrado en el modelo de roedor, donde el ion metálico está anclado a la asparagina 22 y unido con respecto a N-terminal en la secuencia –RSSNN- en condiciones básicas con la participación de amidas desprotonadas y una molécula de agua.

El residuo de His18 ha sido ya establecido como sitio de anclaje para la coordinación de Cu(II) al péptido hIAPP. Diversos estudios han demostrado que el Cu(II) protege a la hIAPP de la degradación causada por algunas enzimas, de tal forma que la región que comprende la His18 no es afectada por la proteólisis.^{33, 34} En adición a esto, se ha sugerido que la His18 esta involucrada en la unión de hIAPP a otros centros metálicos como Zn(II) o Ni(II), afectando la agregación del péptido y cambiando su conformación local cercano a este residuo.^{13, 24, 32}

Una vez anclado a la His18, la preferencia de coordinación de Cu(II) hacia el C-terminal, usando a las amidas desprotonadas que siguen a la His18 en la secuencia, fue comprobada con la inserción de un residuo de prolina en posición 19. Este residuo participa como un “punto de quiebre”^{45, 46} en la coordinación del ión metálico, forzando su coordinación hacia la región N-terminal y formando un complejo Cu(II)-péptido con una ambiente de coordinación totalmente diferente.

La esfera de coordinación alrededor de Cu(II) en nuestro péptido modelo 18-22 (–HSSNN-) está completado con dos amidas desprotonadas de las serinas 19 y 20 que le siguen a la histidina en la secuencia y un átomo de oxígeno del grupo hidroxilo de la Ser20. Esta

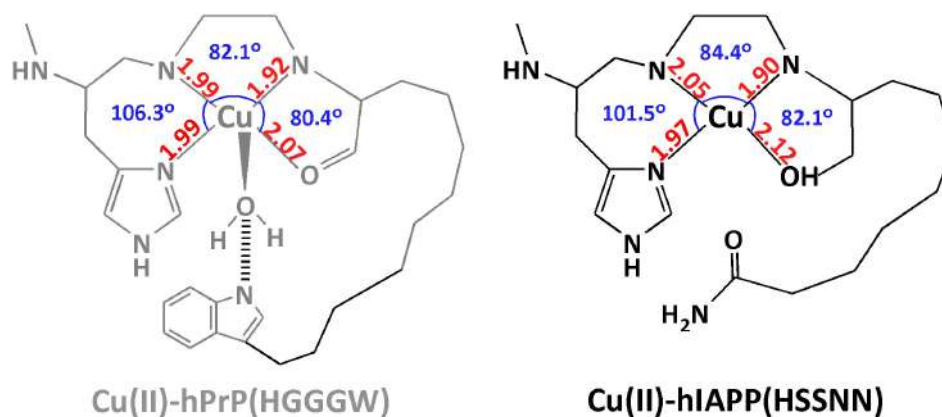
coordinación hacia el C-terminal es poco común, comparada con la unión hacia N-terminal, la cual forma un anillo de 6-miembros más estable con el anillo del imidazol y la amida del enlace peptídico, mientras que para la unión hacia el C-terminal da un anillo de 7-miembros. Muchos factores dictan esta preferencia de coordinación, incluyendo la naturaleza de las cadenas laterales cercanas al residuo de His, la estabilidad relativa de los anillos formados en el quelato, y el número de amidas desprotonadas involucradas en la unión al ión metálico.⁵⁸ Así, en un complejo 3N1O con dos amidas desprotonadas, Cu(II) unido a las amidas con respecto a N-terminal proporciona un quelato con anillos de 6-, 5- y 7-miembros, el cual puede ser menos estable que el quelato resultante de la unión con respecto a C-terminal dando anillos de 7-, 5- y 5-miembros (Esquema 1.3.1).



Esquema 1.3.1. Ejemplos de modelos de coordinación en complejos 3N1O. Cu(II) unido a las amidas desprotonadas hacia el extremo (A) C-terminal y el (B) N-terminal.

Un ejemplo para este tipo de coordinación con respecto al C-terminal es presentado en la región “*octarepeat*” de la proteína prion humana hPrP-(–PHGGWSQ)₄, donde el residuo de prolina previene la coordinación con respecto a N-terminal y entonces el ión metálico se une a la histidina, amidas desprotonadas de las siguientes dos glicinas y un carbonilo del enlace peptídico (Cu(II)-hPrP(HGGGW)). Para el caso de la hIAPP, la presencia de residuos hidrofóbicos voluminosos que le anteceden a la histidina puede ser la causa de la coordinación de Cu(II) hacia C-terminal. Una comparación de las distancias y ángulos de enlace de la estructura cristalina del complejo del “*octarepeat*” Cu(II)-hPrP(HGGGW)⁵⁹ con las obtenidas en el modelo del complejo Cu(II)-hIAPP(18-22) obtenido a partir de cálculos de estructura electrónica⁵⁵ nos da información sobre las características estructurales de la

coordinación de Cu(II) hacia el C-terminal. En ambos casos, las distancias entre el ion metálico central y los heteroátomos coordinados directamente a él son muy parecidas, además que los ángulos diedros se comportan de manera similar. Prácticamente la esfera de coordinación es idéntica en los dos casos, difiriendo únicamente en la naturaleza del átomo de oxígeno enlazado (Esquema 1.3.2).



Esquema 1.3.2. Comparación de las distancias y ángulos de enlace entre los complejos formados con Cu(II) y péptidos de la hPrP (izquierda) (datos tomados de la Cambridge Crystallographic Data Centre)⁵⁹ y hIAPP (derecha).

Es bien conocido que las amidas del enlace peptídico pueden ser desprotonadas en presencia de Cu(II), ya que el ión metálico causa un decremento en el pK_a de las amidas, facilitando así, la formación del enlace de coordinación entre el Cu(II) y las amidas desprotonadas.^{43, 60} Se probó esta formación de enlace Cu-N_{amida} con la sustitución de Ser19 y 20 por sarcosinas, demostrando que los nitrógenos de amida directamente se coordinan a Cu(II). La contribución del grupo hidroxilo de Ser20 en la esfera de coordinación es importante debido a que provee los ligantes necesarios para formar un quelato estable con dos anillos de 5-miembros. Interesantemente, la mutación Ser20Gly en el gen que codifica para la hIAPP es encontrada en ciertas poblaciones asiáticas, y está asociada a un incremento en el riesgo de desarrollo de Diabetes Tipo 2. La mutación Ser20Gly acelera la agregación amiloide de la hIAPP in vitro,^{11, 61, 62} aunque la vía por la cual lo hace, es aún desconocida. Esta mutación impactaría significativamente en la habilidad del péptido a coordinar Cu(II), ocasionando una disminución en la afinidad del ion metálico hacia la hIAPP. Por tanto, considerando que el ion Cu(II) afectaría la conformación del péptido e inhibiría su

agregación amiloide, tiene sentido que la mutación Ser20Gly cause un incremento en la agregación amiloide.

Estos cambios conformacionales que sufren los péptidos son dictados por el tipo de residuos presentes en su secuencia, por ejemplo, se ha demostrado que la cadena lateral de la asparagina interviene en la habilidad de hIAPP a formar fibras.⁶³ La contribución de estos residuos de asparagina a la coordinación a Cu(II) también juega un papel importante debido a que la asparagina 22 se encuentra como ligando axial o como parte de una segunda esfera de coordinación, por lo que este residuo contribuiría al efecto inhibitorio por parte del ion Cu(II) en la agregación amiloide. Más aún, si este residuo de Asn22 alcanza a completar la esfera de coordinación del centro metálico, se necesitaría un cambio de conformación mayor en el péptido y por tanto favorecería un conjunto de conformaciones del péptido potencialmente diferentes.

La formación de más de un modo de coordinación en el sitio de His18 puede dar la diversidad de confórmeros. Para el caso de la especie principal, la existencia de otros modos de coordinación con la participación del grupo hidroxilo de la Ser20, del carbonilo de la Ser20 del enlace peptídico y de la Asn22 imponen diferentes arreglos conformacionales de los enlaces peptídicos y en las cadenas laterales, permitiendo la estabilización de diferentes confórmeros que puedan ser distintos a los asociados a la hIAPP sin la unión del metal. De hecho estudios recientes han demostrado por espectrometría de masas y dinámicas moleculares que la unión de Cu(II) a hIAPP favorece la formación de confórmeros y oligómeros que difieren al observado para la hIAPP libre.³⁹

Los cambios en el plegamiento del péptido hIAPP inducidos por el metal pudieran impactar en la propiedad de este péptido. En este contexto, la noción de que la coordinación del Cu(II) a hIAPP de lugar a la formación de diferentes modos de coordinación, pudiera entonces favorecer conjuntos diferentes de ensamblajes conformacionales. Todo esto se debería entonces a que la unión del metal involucra residuos clave para la formación de estructuras tipo hojas- β , por lo que cada confórmero presentaría una barrera energética alta para formar fibras, y eso explicaría el efecto inhibitorio por parte del Cu(II) en la agregación de la hIAPP (Figura 1.3.1).

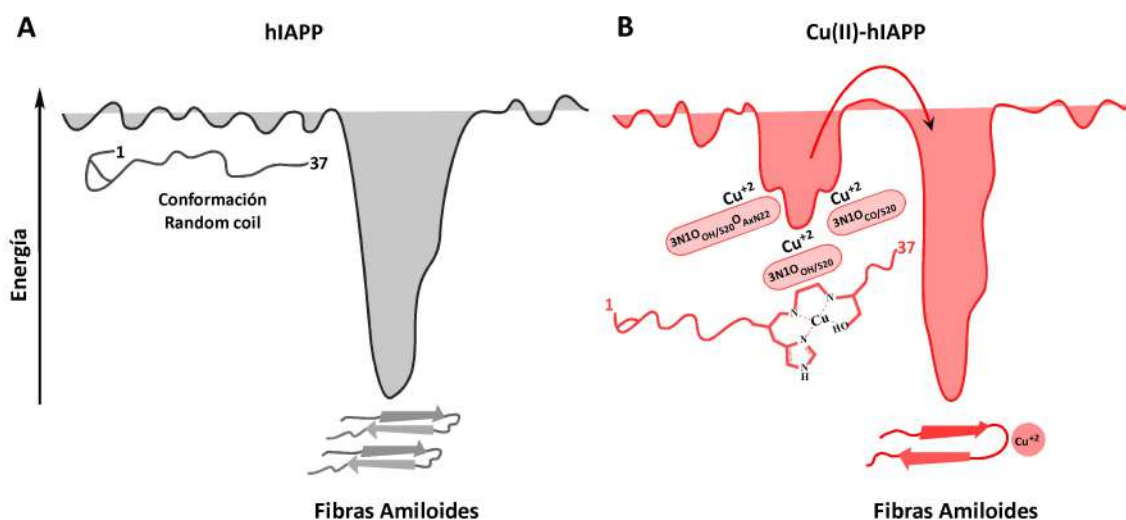


Figura 1.3.1. Péptidos intrínsecamente desordenados como la hIAPP en su conformación flexible *random coil* (A). Conversión de la hIAPP a estructuras de hojas- β facilitando la formación de fibras amiloides altamente estables. La unión de Cu(II) a hIAPP pudiera estabilizar un conjunto de conformémeros con una barrera de energía más alta (flecha roja) para su conversión de hojas- β y agregación amiloide (B).

En resumen, este estudio ha demostrado los principios estructurales en la unión de Cu(II) a hIAPP y ha identificado los residuos que están involucrados en la esfera de coordinación alrededor del ión metálico en una región clave para los cambios de conformación y formación de fibras amiloides. Junto con el sitio de anclaje del N1 del anillo de imidazol de la His18, las amidas desprotonadas del enlace peptídico de las Ser19 y Ser20 y el oxígeno de la Ser20, completan la coordinación ecuatorial del Cu(II) al péptido hIAPP(18-22). Por otro lado, también se pudo establecer la participación de la Asn22, proponiendo a su cadena lateral como ligante axial en la coordinación al ion metálico o bien como parte de su segunda esfera de coordinación.

El estudio a su vez permitió plantear un escenario donde el ion metálico Cu(II) unido a hIAPP permite la existencia de más de un modo de coordinación, lo cual favorecería entonces diferentes ensambles conformacionales inducidos por Cu(II) con una barrera energética alta para formar fibras amiloides, lo que explicaría el efecto inhibitorio por parte del ion metálico en la agregación del péptido hIAPP.

Perspectivas

A partir de los resultados y conclusiones a los que se llegaron en este trabajo se pueden plantear perspectivas a corto y mediano plazo, a fin de entender el papel que juegan los iones metálicos en la coordinación, agregación e incluso función del péptido de la Diabetes Tipo 2, hIAPP. Primeramente se plantea estudiar la participación del ion metálico Cu(II) con la variante S20G (mutación natural presente en ciertas poblaciones asiáticas que desarrollan tempranamente DT2) y su papel en la agregación. Por otro lado, expandir este estudio al caso de la coordinación específica de Zn(II) a la hIAPP y su efecto en la agregación sería de gran interés, debido a su importancia biológica y almacenamiento en las células- β presentes en los islotes del páncreas. Una vez entendido el papel de ambos iones metálicos por separado, sería relevante estudiar la competencia entre ellos, Zn(II) vs Cu(II) en la unión al péptido hIAPP. Así, se podría responder la incógnita sobre el papel que puede jugar la desregulación en la homeostasis de estos metales en la enfermedad.

Referencias

1. International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas*. 7 ed.; 2015.
2. Kahn, C. R. Insulin Action, Diabetogenesis, and the Cause of Type II Diabetes. *Diabetes* **1994**, 43, 1066-1084.
3. Rhodes, C. J. Type 2 Diabetes—a Matter of β -Cell Life and Death? *Science* **2005**, 307, 380-384.
4. Jaikaran, E. T. A. S.; Clark, A. Islet amyloid and type 2 diabetes from molecular misfolding to islet pathophysiology. *Biochimica et Biophysica Acta* **2001**, 1537, 179-203.
5. Young, A. *Amylin: Physiology and Pharmacology*. 1 ed.; Elsevier Academic Press Inc.: USA, 2005; Vol. 52.
6. Marzban, L.; Park, K.; Verchere, C. B. Islet amyloid polypeptide and type 2 diabetes. *Experimental Gerontology* **2003**, 38, 347-351.
7. Westermark, P.; Andersson, A.; Westermark, G. T. Islet amyloid polypeptide, islet amyloid, and diabetes mellitus. *Physiological reviews* **2011**, 91, 795-826.
8. Cao, P.; Marek, P.; Noor, H.; Patsalo, V.; Tu, L.-H.; Wang, H.; Abedini, A.; Raleigh, D. P. Islet amyloid: from fundamental biophysics to mechanisms of cytotoxicity. *FEBS letters* **2013**, 587, 1106-1118.
9. Lorenzo, A.; Razzaboni, B.; Weir, G. C.; Yankner, B. A. Pancreatic islet cell toxicity of amylin associated with type-2 diabetes mellitus. *Nature* **1994**, 368, 756-760.
10. Westermark, P.; Engström, U.; Johnson, K. H.; Westermark, G. T.; Betsholtz, C. Islet amyloid polypeptide: Pinpointing amino acid residues linked to amyloid fibril formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, 87, 5036-5040.
11. Cao, P.; Tu, L.-H.; Abedini, A.; Levsh, O.; Akter, R.; Patsalo, V.; Schmidt, A. M.; Raleigh, D. P. Sensitivity of amyloid formation by human islet amyloid polypeptide to mutations at residue 20. *Journal of molecular biology* **2012**, 421, 282-295.
12. Jaikaran, E. T. A. S.; Nilsson, M. R.; Clark, A. Pancreatic β -cell granule peptides form heteromolecular complexes which inhibit islet amyloid polypeptide fibril formation. *Biochemical Journal* **2004**, 377, 709-716.
13. Brender, J. R.; Hartman, K.; Nanga, R. P. R.; Popovych, N.; Bea, R. d. I. S.; Vivekanandan, S.; Marsh, E. N. G.; Ramamoorthy, A. Role of Zinc in Human Islet Amyloid Polypeptide Aggregation. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 8973-8983.
14. Ward, B.; Walker, K.; Exley, C. Copper(II) inhibits the formation of amylin amyloid in vitro. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2008**, 102, 371-375.
15. Binolfi, A.; Lamberto, G. R.; Duran, R.; Quintanar, L.; Bertocini, C. W.; Souza, J. M.; Cerveñansky, C.; Zweckstetter, M.; Griesinger, C.; Fernández, C. O. Site-Specific Interactions of Cu(II) with α and β -Synuclein: Bridging the Molecular Gap between Metal Binding and Aggregation. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 11801-11812.
16. Hureau, C. Coordination of redox active metal ions to the amyloid precursor protein and to amyloid- β peptides involved in Alzheimer disease. Part 1: An overview. *Coord. Chem. Rev.* **2012**, 256, 2164-2174.
17. Younan, N. D.; Klewpatinond, M.; Davies, P.; Ruban, A. V.; Brown, D. R.; Viles, J. H. Copper(II)-induced secondary structure changes and reduced folding stability of the prion protein. *Journal of molecular biology* **2011**, 410, 369-382.
18. Watt, N. T.; Taylor, D. R.; Gillott, A.; Thomas, D. A.; Perera, W. S.; Hooper, N. M. Reactive oxygen species-mediated beta-cleavage of the prion protein in the cellular response to oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 35914-35921.
19. Zargar, A. H.; Shah, N. A.; Masoodi, S. R.; Laway, B. A.; Dar, F. A.; Khan, A. R.; Sofi, F. A.; Wani, A. I. Copper, zinc, and magnesium levels in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Postgraduate Medicine Journal* **1998**, 74, 665-668.
20. Hutton, J. C. The insulin secretory granule. *Diabetologia* **1989**, 32, 271-281.
21. Aspinwall, C. A.; Brooks, S. A.; Kennedy, R. T.; Lakey, J. R. T. Effects of Intravesicular H⁺ and Extracellular H⁺ and Zn²⁺ on Insulin Secretation in Pancreatic Beta Cells. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 31308-31314.
22. Kazi, T. G.; Afridi, H. I.; Kazi, N.; Jamali, M. K.; Arain, M. B.; Jalbani, N.; Kandhro, G. A. Copper, chromium, manganese, iron, nickel, and zinc levels in biological samples of diabetes mellitus patients. *Biological trace element research* **2008**, 122, 1-18.

23. Brender, J. R.; Krishnamoorthy, J.; Messina, G. M. L.; Deb, A.; Vivekanandan, S.; Rosa, C. L.; Penner-Hahna, J. E.; Ramamoorthy, A. Zinc stabilization of prefibrillar oligomers of human islet amyloid polypeptide. *Chemical Communications* **2013**, 49, 3339-3341.
24. Salamekh, S.; Brender, J. R.; Hyung, S.-J.; Nanga, R. P. R.; Vivekanandan, S.; Ruotolo, B. T.; Ramamoorthy, A. A Two-Site Mechanism for the Inhibition of IAPP Amyloidogenesis by Zinc. *Journal of molecular biology* **2011**, 410, 294-306.
25. Tanaka, A.; Kaneto, H.; Miyatsuka, T.; Yamamoto, K.; Yoshiuchi, K.; Yamasaki, Y.; Shimomura, I.; Matsuoka, T.-A.; Matsuhisa, M. Role of Copper Ion in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes. *Endocrine Journal* **2009**, 56, 699-706.
26. Flores, C. R.; Puga, M. P.; Wrobel, K.; Sevilla, M. E. G.; Wrobel, K. Trace elements status in diabetes mellitus type 2: Possible role of the interaction between molybdenum and copper in the progress of typical complications. *Diabetes Research and Clinical Practice* **2011**, 91, 333-341.
27. Naka, T.; Kaneto, H.; Katakami, N.; Matsuoka, T.-a.; Harada, A.; Yamasaki, Y.; Matsuhisa, M.; Shimomura, I. Association of serum copper levels and glycemic control in patients with type 2 diabetes. *Endocrine Journal* **2013**, 60, 393-396.
28. Uriu-Adams, J. Y.; Keen, C. L. Copper, oxidative stress, and human health. *Molecular aspects of medicine* **2005**, 26, 268-298.
29. Rivillas-Acevedo, L.; Sánchez-López, C.; Amero, C.; Quintanar, L. Structural Basis for the Inhibition of Truncated Islet Amyloid Polypeptide Aggregation by Cu(II): Insights into the Bioinorganic Chemistry of Type II Diabetes. *Inorg. Chem.* **2015**, 54, 3788-3796.
30. Biancalana, M.; Koide, S. Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochimica et Biophysica Acta* **2010**, 1804, 1405-1412.
31. LeVine, H. Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease b-amyloid peptides: Detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Science* **1993**, 2, 404-410.
32. DeToma, A. S.; Salamekh, S.; Ramamoorthy, A.; Lim, M. H. Misfolded proteins in Alzheimer's disease and type II diabetes. *Chemical Society Reviews* **2012**, 41, 608-621.
33. Bellia, F.; Grasso, G. The role of copper(II) and zinc(II) in the degradation of human and murine IAPP by insulin-degrading enzyme. *Journal of Mass Spectrometry* **2014**, 49, 274-279.
34. Sinopoli, A.; Magri, A.; Milardi, D.; Pappalardo, M.; Pucci, P.; Flagiello, A.; Titman, J. J.; Nicoletti, V. G.; Caruso, G.; Pappalardo, G.; Grasso, G. The role of copper (II) in the aggregation of human amylin. *Metallomics* **2014**, 6, 1841-1852.
35. Hu, J.; Yu, Y.-P.; Cui, W.; Fang, C.-L.; Wu, W.-H.; Zhao, Y.-F.; Li, Y.-M. Cyclen-hybrid compound captures copper to protect INS-1 cells from islet amyloid polypeptide cytotoxicity by inhibiting and lysing effects. *Chemical Communications* **2010**, 46, 8023-8025.
36. Yu, Y.-P.; Lei, P.; Hu, J.; Wu, W.-H.; Zhao, Y.-F.; Li, Y.-M. Copper induced cytotoxicity: reactive oxygen species or islet amyloid polypeptide oligomer formation. *Chemical Communications* **2010**, 46, 6909-6911.
37. Ma, L.; Li, X.; Wang, Y.; Zheng, W.; Chen, T. Cu(II) inhibits hIAPP fibrillation and promotes hIAPP-induced beta cell apoptosis through induction of ROS-mediated mitochondrial dysfunction. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2014**, 140, 143-152.
38. Masad, A.; Hayes, L.; Tabner, B. J.; Turnbull, S.; Cooper, L. J.; Fullwood, N. J.; German, M. J.; Kametani, F.; El-Agnaf, O. M. A.; Allsop, D. Copper-mediated formation of hydrogen peroxide from the amylin peptide: A novel mechanism for degeneration of islet cells in type-2 diabetes mellitus?. *FEBS letters* **2007**, 581, 3489-3493.
39. Lee, S. J. C.; Choi, T. S.; Lee, J. W.; Lee, H. J.; Mun, D.-G.; Akashi, S.; Lee, S.-W.; Lim, M. H.; Kim, H. I. Structure and assembly mechanisms of toxic human islet amyloid polypeptide oligomers associated with copper. *Chemical Science* **2016**, 7, 5398-5406.
40. Lee, E. C.; Ha, E.; Singh, S.; Legesse, L.; Ahmad, S.; Karnaukhova, E.; Donaldson, R. P.; Jeremic, A. M. Copper(II)-human amylin complex protects pancreatic cells from amylin toxicity. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2013**, 15, 12558-12571.
41. Li, H.; Ha, E.; Donaldson, R. P.; Jeremic, A. M.; Vertes, A. Rapid Assessment of Human Amylin Aggregation and Its Inhibition by Copper(II) Ions by Laser Ablation Electrospray Ionization Mass Spectrometry with Ion Mobility Separation. *Analytical Chemistry* **2015**, 87, 9829-9837.
42. Kállay, C.; Dávid, Á.; Timári, S.; Nagy, E. M.; Sanna, D.; Garribba, E.; Micera, G.; Bona, P. D.; Pappalardo, G.; Rizzarelli, E.; Sóvágó, I. Copper(II) complexes of rat amylin fragments. *Dalton Transactions* **2011**, 40, 9711-9721.

43. Sóvágó, I.; Kállay, C.; Várnagy, K. Peptides as complexing agents: Factors influencing the structure and thermodynamic stability of peptide complexes. *Coord. Chem. Rev.* **2012**, 256, 2225-2233.
44. Sóvágó, I.; Várnagy, K.; Lihi, N.; Grenács, Á. Coordinating properties of peptides containing histidyl residues. *Coord. Chem. Rev.* **2016**,
45. Bataille, M.; Formicka-Kozłowska, G.; Kozłowski, H.; Pettit, L. D.; Steel, I. The L-proline residues as a 'break-point' in the coordination of metal-peptide systems. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1984**, 231-232.
46. Pettit, L. D.; Steel, I.; Formicka-Kozłowska, G.; Tatarowski, T.; Bataille, M. The L-Proline Residues as a Break-point in Metal-Peptide System. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* **1985**, 535-539.
47. Rowinska-Zyrek, M. Coordination of Zn(2+) and Cu(2+) to the membrane disrupting fragment of amylin. *Dalton Transactions* **2016**, 45, 8099-8106.
48. Peisach, J.; Blumberg, W. E. Structural implications derived from the analysis of electron paramagnetic resonance spectra of natural and artificial copper proteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1974**, 165, 691-708.
49. Bertini, I.; Luchinat, C.; Parigi, G.; Pierattelli, R. NMR spectroscopy of paramagnetic metalloproteins. *ChemBioChem* **2005**, 6, 1536-1549.
50. Gaggelli, E.; Kozłowski, H.; Valensin, D.; Valensin, G. NMR studies on Cu(II)-peptide complexes: exchange kinetics and determination of structures in solution. *Molecular BioSystems* **2005**, 1, 79-84.
51. Clore, G. M.; Iwahara, J. Theory, Practice, and Applications of Paramagnetic Relaxation Enhancement for the Characterization of Transient Low-Population States of Biological Macromolecules and Their Complexes. *Chem Rev* **2009**, 109, 4108-4139.
52. Otting, G. Protein NMR using paramagnetic ions. *Annu. Rev. Biophys.* **2010**, 39, 387-405.
53. Bertini, I.; Luchinat, C. *Coord. Chem. Rev.* **1996**, 150, 1-292.
54. Gaggelli, E.; Bernardi, F.; Molteni, E.; Pogni, R.; Valensin, D.; Valensin, G.; Remelli, M.; Luczkowski, M.; Kozłowski, H. Interaction Of The Human Prion PrP(106-126) Sequence With Copper(II), Manganese(II), And Zinc(II)- NMR and EPR Studies. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 996-1006.
55. Sánchez-López, C.; Cortés-Mejía, R.; Miotto, M. C.; Binolfi, A.; Fernández, C. O.; Del Campo, J. M.; Quintanar, L. Copper Coordination Features of Human Islet Amyloid Polypeptide: The Type 2 Diabetes Peptide. *Inorganic Chemistry* **2016**, 55, 10727-10740.
56. Luca, S.; Yau, W.-M.; Leapman, R.; Tycko, R. Peptide Conformation and Supramolecular Organization in Amylin Fibrils: Constraints from Solid-State NMR. *Biochemistry* **2007**, 46, 13505-13522.
57. Wiltzius, J. J.; Sievers, S. A.; Sawaya, M. R.; Cascio, D.; Popov, D.; Riek, C.; Eisenberg, D. Atomic structure of the cross-beta spine of islet amyloid polypeptide (amylin). *Protein Science* **2008**, 17, 1467-1474.
58. Quintanar, L.; Rivillas-Acevedo, L.; Grande-Aztatzi, R.; Gómez-Castro, C. Z.; Arcos-López, T.; Vela, A. Copper coordination to the prion protein: Insights from theoretical studies. *Coord. Chem. Rev.* **2013**, 257, 429-444.
59. Burns, C. S.; Aronoff-Spencer, E.; Dunham, C. M.; Lario, P.; Avdievich, N. I.; Antholine, W. E.; Olmstead, M. M.; Vrielink, A.; Gerfen, G. J.; Peisach, J.; Scott, W. G.; Millhauser, G. L. Molecular Features of the Copper Binding Sites in the Octarepeat Domain of the Prion Protein. *Biochemistry* **2002**, 41, 3991-4001.
60. Sigel, H.; Martin, R. B. Coordinating Properties of the Amide Bond. Stability and Structure of Metal Ion Complexes of Peptides and Related Ligands. *Chemical Reviews* **1982**, 82, 385-426.
61. Sakagashira, S.; Hiddinga, H. J.; Tateishi, K.; Sanke, T.; Hanabusa, T.; Nanjo, K.; Eberhardt, N. L. S20G Mutant Amylin Exhibits Increased in Vitro Amyloidogenicity and Increased Intracellular Cytotoxicity Compared to Wild-Type Amylin. *The American Journal of Pathology* **2000**, 157, 2101-2109.
62. Xu, W.; Jiang, P.; Mu, Y. Conformation Preorganization: Effects of S20G Mutation on the Structure of Human Islet Amyloid Polypeptide Segment. *J. Phys. Chem B* **2009**, 113, 7308-7314.
63. Koo, B. W.; Hebda, J. A.; Miranker, A. D. Amide inequivalence in the fibrillar assembly of islet amyloid polypeptide. *Protein Engineering, Design and Selection* **2008**, 21, 147-154.



Capítulo 2.

Coordinación de Cu(II) al fragmento hPrP(92-115) de la proteína prion humana. Papel de las metioninas en la unión a dos sitios de coordinación

Capítulo 2.

Coordinación de Cu(II) al fragmento hPrP(92-115) de la proteína prion humana. Papel de las metioninas en la unión a dos sitios de coordinación

Antecedentes

Proteína Prion y enfermedades priónicas

Las enfermedades priónicas son un conjunto de enfermedades neurodegenerativas causadas por la conversión de la proteína prion celular (PrP^C) a la isoforma anormal PrP^{Sc} (proteína “*scrapie*”).¹ Estas enfermedades priónicas pueden tener tres diferentes orígenes: genéticos (Enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, Insomnio Familiar Fatal, Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJ) Familiar) infecciosos (Creutzfeldt-Jakob infeccioso, Encefalopatía espongiforme transmisible) o esporádicos (Creutzfeldt-Jakob esporádico, Insomnio Esporádico Fatal).^{1, 2} Estas enfermedades afectan tanto a humanos como a animales mamíferos (oveja, cabra, lémur, gato, visón, cérvido, ganado vacuno, niala, kudú).³ Algunas de las manifestaciones clínicas incluyen demencia, dificultad de coordinación de los movimientos, insomnio, paraplejía, parestesias (sensación anormal de los sentidos) y comportamiento desviado. La característica principal de estas enfermedades es la degeneración espongiforme de partes del cerebro por pérdida de células nerviosas y formación de placas amiloides.²

La transformación de PrP^C a PrP^{Sc} se lleva a cabo a partir del proceso en el cual una porción de su estructura secundaria cambia significativamente sin perder su secuencia primaria de aminoácidos. Específicamente, la estructura de la PrP^C cambia de tener cerca de 40% de α -hélices y pocas hojas- β , a tener 30% de α -hélice y 45% en hojas- β en la isoforma P^{Sc}.¹ Este cambio conformacional es el que favorece la formación de agregados amiloides. A pesar de que se ha establecido a la proteína prion como la única involucrada en la etiología de esta enfermedad, poco se sabe acerca de la causa que origina su conversión. Sin embargo, la vía por la cual la forma aberrante de la proteína se propaga debe involucrar un proceso de

moldeo en el que la PrP^{Sc} ya existente dirige el cambio conformacional de la PrP^C “normal” a una PrP^{Sc} nueva con la misma conformación, es decir, involucrará un proceso de plantilla.¹ La PrP^C es una glicoproteína monomérica compuesta por 253 aminoácidos que está anclada por un puente glicosilfosfatidilinositol (GPI) a la membrana extracelular. Su estructura secundaria es predominantemente α -hélice en el dominio C-terminal (residuos 126-231, región globular),^{4, 5} mientras que su región N-terminal carece de estructura (residuos 23-126)⁶ (Figura 2.1.1). Esta última región aloja el dominio de los octapéptidos (cuatro repeticiones de 8 residuos, 60-91) además del centro hidrofóbico ya cercano a la región globular (115-133). Los residuos de asparaginas 181 y 197 son sitios de glicosilación y las cisteínas 179 y 214 forman un enlace disulfuro. La PrP^C esta altamente expresada en el sistema nervioso, se sintetiza en el retículo endoplásmico, transita el aparato de Golgi y se libera a la superficie celular en donde reside en balsas lipídicas.⁷

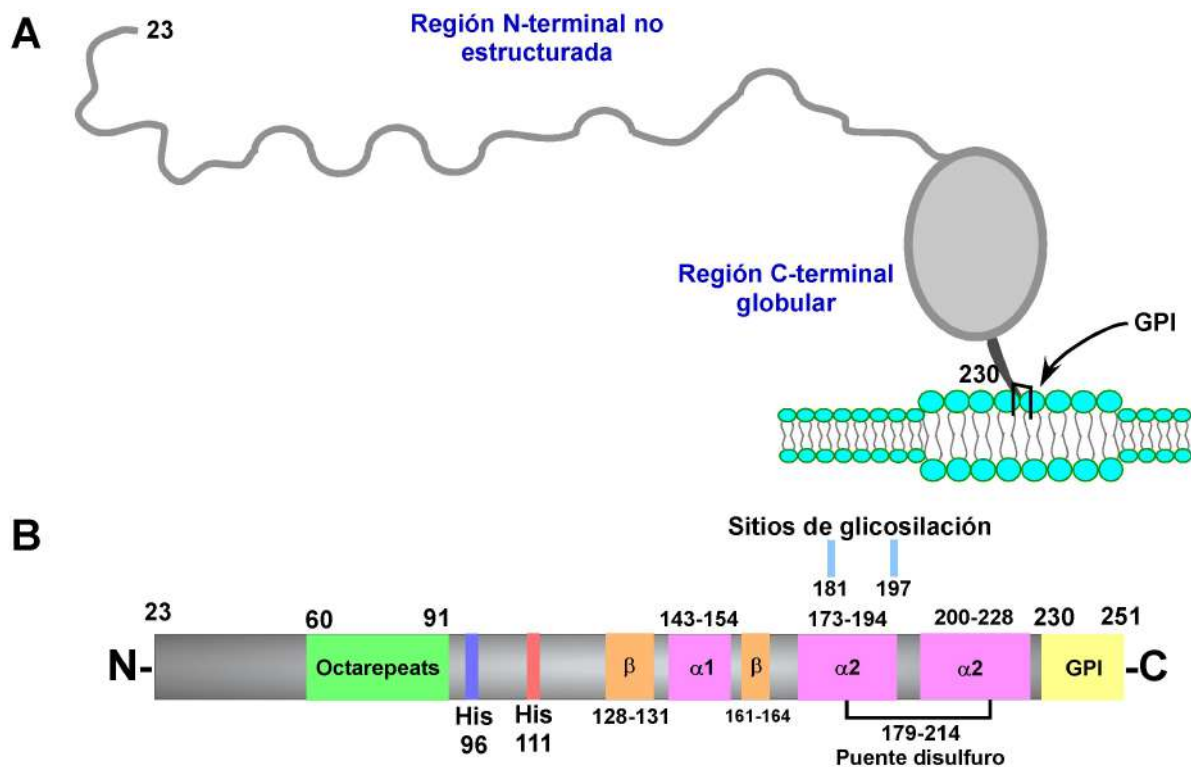


Figura 2.1.1 A) Representación esquemática de la PrP^C. B) regiones claves en la estructura de la PrP^C, región de los octarepeats, sitios de His96 y 111, hojas- β y α -hélices, sitios de glicosilación y puente GPI; la numeración representa el número de residuo en la secuencia de PrP^C humana.

La función de la PrP^C no se ha establecido totalmente; sin embargo, se le ha asociado al desarrollo neuronal, adhesión celular, eventos apoptóticos y señalamiento celular en el

Sistema Nervioso Central,⁸ además de que puede interactuar con diferentes proteínas neuronales o proteínas de la matriz extracelular.⁹ Esta interacción de la PrP^C no sólo se da entre proteínas, sino también con otros ligantes como glicosaminoglicanos, ácidos nucleicos y algunos iones metálicos.⁸

De particular interés entre los iones metálicos, se encuentra el ion cobre ya que se ha demostrado que la PrP^C une este ion metálico *in vivo*.¹⁰ Por tanto, se propone a la PrP^C como reguladora en la homeostasis del cobre¹¹ o como un agente antioxidante cuya función depende del metal.¹² La función fisiológico del ion cobre como ligante de la PrP^C se ha estudiado exhaustivamente debido a que las concentraciones extracelulares de cobre fluctúan durante la sinapsis, y se ha demostrado que cuando hay altos niveles de Cu(II) extracelulares, se induce la endocitosis de la PrP^C a los orgánulos intracelulares como una posible vía de señalización para activar la defensa antioxidante.⁸

Otros metales como el zinc, níquel, y manganeso han sido explorados en su unión a la PrP^C.¹³ El caso de Zn(II) es importante debido a que también promueve endocitosis de la proteína, además de que se encuentra disponible en altas concentraciones en el espacio sináptico, facilitando su unión a la PrP^C y alterando la distribución de Cu(II) en la unión a la proteína.¹⁴

Unión de Cu(II) a la PrP^C

Estudios recientes han establecido que la PrP^C humana puede unir seis iones de Cu(II) en la región amino terminal: cuatro iones se unen en la región que abarca los residuos 60-91 que contiene las cuatro repeticiones del octapéptido altamente conservado, PHGGGWGQ, y los otros dos iones se unen a las histidinas 96 y 111.¹⁵⁻¹⁷

El sitio de coordinación a Cu(II) más estudiado y entendido es el que comprende al octapéptido, el cual une selectivamente Cu(II) con diferentes modos de coordinación en función del pH y la concentración relativa de cobre.¹⁸ A bajas concentraciones de Cu(II), las cuatro histidinas: His61, His69, His77 y His85 forman un complejo con un solo átomo de Cu(II), mientras que a concentraciones elevadas del ion cada histidina coordina su propio átomo de Cu(II), quedando también la posibilidad de coordinación con dos átomos de Cu(II) con las cuatro histidinas (Figura 2.1.2).

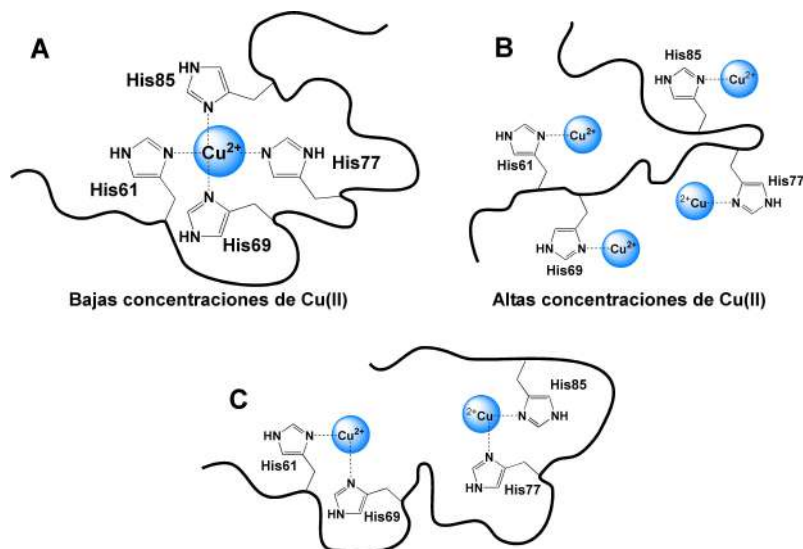


Figura 2.1.2. Modelos de coordinación de Cu(II) en la región del octarepeat. A) A bajas concentraciones de Cu(II); B) Altas concentraciones de Cu(II) y C) Otra posibilidad de coordinación.

Para caracterizar el sitio de unión se hicieron estudios por cristalografía de rayos-X, EPR de onda continua y de pulsos,^{19, 20} cálculos de estructura electrónica y dinámicas moleculares^{21, 22} y se demostró que a pH fisiológico el sitio de enlace involucra los residuos –HGGGW– donde el cobre está coordinado al imidazol de la histidina, a dos amidas desprotonadas y a un grupo carbonilo de las glicinas adyacentes a la histidina respecto al C-terminal. La estructura cristalina del complejo Cu(II)-HGGGW además revela la presencia de una molécula de agua en posición axial,¹⁹ (Figura 2.1.3) la cual forma una red por enlace de hidrógeno con el grupo NH del indol de la cadena lateral del triptófano.

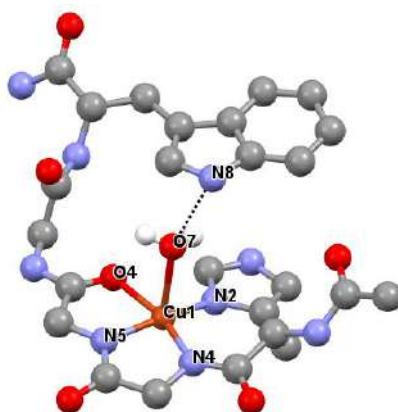


Figura 2.1.3. Estructura cristalina del complejo Cu(II)-HGGGW tomada de la CCDC (Cambridge Crystallographic Data Centre).¹⁹

pK_a de 7.5, pasando de una coordinación 3N1O, con la participación del nitrógeno de imidazol de la His111, dos amidas desprotonadas de la cadena peptídica y un átomo de oxígeno del grupo carbonilo de la cadena hacia el N-terminal, a una coordinación de 4N, con desprotonación de una amida de la cadena peptídica y subsecuente coordinación al metal (Figura 2.1.5). Con el uso de variantes de metioninas, se demostró que estos residuos no participan en la coordinación ecuatorial. Sin embargo, las metioninas podrían participar como ligantes débiles próximos a la esfera de coordinación del ion metálico, consistente con el estudio de Remelli y colaboradores que demostraron que el Cu(II) pierde afinidad por el sitio al prescindir de las metioninas.³¹ La Figura 2.1.5 muestra el equilibrio de protonación en la coordinación ecuatorial del Cu(II) al sitio de la His111, el cual estaría presente en condiciones fisiológicas de pH.

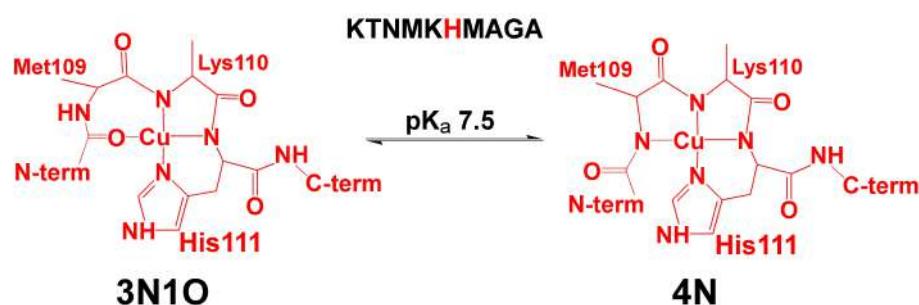


Figura 2.1.5. Equilibrio de protonación del complejo de Cu(II)-hPrP(106-15). Adaptado de ²⁷

A pesar del gran número de estudios acerca de la unión de Cu(II) a los sitios de His96 e His111, existe aún controversia acerca de la coordinación del ion metálico en fragmentos más largos que contengan ambos sitios o más aún con la proteína completa. Mientras que algunos autores proponen al sitio de His96 como el sitio relevante de unión a Cu(II) en la región 92-126,²⁶ otros estudios han indicado una preferencia del ion Cu(II) por unirse al sitio de la His111.^{16, 30, 32-35} Por otro lado, también se ha reportado que el Cu(II) se une a cada histidina con la misma afinidad³⁶ o incluso que la afinidad por el sitio depende en el valor de pH o la longitud del fragmento peptídico. Finalmente, también se propone la formación de un complejo con Cu(II) involucrando la coordinación por ambos residuos de histidina³⁷ o la formación de un complejo con dos fragmentos actuando como un ligante bidentado.³⁸ Así, la Tabla 2.1.1 resume las propuestas y conclusiones sobre los sitios de coordinación de Cu(II) a His96 y 111 en diferentes fragmentos peptídicos.

Tabla 2.1.1 Comparación de los sitios de coordinación de Cu(II) a His96 y 111 en diferentes fragmentos peptídicos.

Fragmento peptídico	Sitios de coordinación	Sitio de mayor afinidad por Cu(II)	*Notas	Referencia
hPrP(90-231)	His96 y 111	His96	Unión inicial a la His96 y después al OR	<i>Biochemistry</i> , 2003 ²⁶
hPrP(91-115)	His96 y 111	Ambos sitios	Ambas histidinas unen un solo Cu(II)	<i>JBC</i> , 2004 ³⁷
hPrP(91-115)	His96 y 111	His111	Sitios independientes de unión a Cu(II)	<i>J.Mol.Biol.</i> , 2005 ¹⁵
mPrP(23-231)	OR, His96 y 111	OR	También estudian 90-115 y concluyen que el sitio de mayor afinidad es His111	<i>J. Biol. Chem.</i> , 2005 ¹⁶
hPrP(91-115)	His96 y 111	Ambos sitios	Complejo 1:2 Cu(II):péptido; c/péptido con sus 2 imidazoles coordinando al Cu(II)	<i>Biochem. J.</i> , 2006 ³⁸
hPrP(91-126)	His96 y 111	His111	Únicamente unión de la His111, sin participación de la His96	<i>Inorg. Chem.</i> , 2007 ³⁰
hPrP(91-120)	His96 y 111	His111	Sitios independientes de unión a Cu(II)	<i>Chem. Eur. J.</i> , 2007 ³⁹
hPrP(91-115)	His96 y 111	His111: para ambos péptidos	La cola hidrofóbica (residuos 115-126) aumenta la afinidad del sitio H111	<i>Biochem. J.</i> , 2007 ⁴⁰
hPrP(84-114)	His85, 96, 111	H111>H96>H85	Sitios independientes de unión a Cu(II)	<i>Chem. Eur. J.</i> , 2007 ³²
rPrP(23-231)	OR, His95 y 110	His95	Unión de Cu(II) inicialmente a His95 e His111 antes que a OR	<i>J. Biol. Chem.</i> , 2008 ¹⁷
hPrP(92-113)	His96 y 111	His111	Sitios independientes de unión a Cu(II)	<i>New J. Chem.</i> , 2009 ³³
rPrP(23-231)	OR, His95 y 110	His95 y 110	La región que envuelve las His95 y 110 presenta la mayor afinidad por Cu(II)	<i>Biochemistry</i> , 2009 ³⁵
rPrP(90-114)	His95 y 110	Ambos sitios	Cu(II) se une a cada His con igual afinidad	<i>Curr. Protein Pept. Sci.</i> , 2009 ³⁶
hPrP(76-114)	His77, 85, 96 y 111	H111>96>>77~85	Sitios independientes de unión a Cu(II) a valores de pH fisiológico	<i>Inorg. Chem.</i> , 2009 ³⁴
rPrP(23-126)	OR, His95 y 110	His95 y 110	Coordinación inicial de Cu(II) a los sitios de His95 y 110 y posterior unión a OR	<i>J.Mol.Biol.</i> , 2011 ⁴¹
rPrP(23-231)	OR, His95 y 110	OR	La afinidad de OR es independiente de H95 y 111, pero 96 y 111 requieren a OR	<i>Biochemistry</i> , 2011 ⁴²
rPrP(23-231)	N-term, OR, H95 y 110	His95 y 110	La región que envuelve las His95 y 110 presenta la mayor afinidad por Cu(II)	<i>Biochemistry</i> , 2014 ⁴³
hPrP(60-114)	OR, His96 y 111	OR (ligermante) > His96 y 111	A pH fisiológico hay una ligera preferencia de unión a OR	<i>Chem. Eur. J.</i> , 2015 ⁴⁴

*OR = octarepeat

Esta comparación en la preferencia de unión del ion metálico Cu(II) a los sitios de His96 y 111 deja evidencia de cómo influye la longitud de la cadena peptídica, la naturaleza de ella (secuencia humana vs ratón) y las condiciones en las que se estimó la afinidad por los sitios.

La participación de los residuos cercanos a estos sitios de unión a Cu(II), particularmente los residuos de metioninas, toma importancia debido a la influencia que pueden tener en la proteína: A) en su función y B) en la etiología de la enfermedad por prion.

Como se mencionó anteriormente, la proteína prion puede funcionar como una proteína transportadora de cobre,⁴⁵ por lo cual deberá poseer en su estructura molecular residuos que ayuden a estabilizar complejos a ciertos valores de pH, concentraciones de ion metálico e incluso en ambientes reductores u oxidantes. Así, si la PrP^C transita del espacio extracelular al interior de la célula, necesitará estabilizar ambos estados de oxidación del ion cobre (2+ y 1+) debido a la naturaleza del medio en el que se encuentra. Recientemente se propuso que las metioninas y las histidinas son los residuos claves en estabilizar la forma reducida del ion Cu(I), el cual estará favorecido en un ambiente con alta concentración de protones y reductores biológicos.²⁸ Por otro lado, la región que incluye residuos de metioninas se ha identificado como clave para la eficiencia en la propagación de la enfermedad priónica, además de que se han asociado dichos residuos como factores clave en la barrera entre especies para la conversión de la PrP^C a su forma infecciosa PrP^{Sc}.²⁷

Otra característica importante en la naturaleza patogénica de la PrP es la modificación post-traducciona que sufre la proteína, específicamente la escisión llamada “corte β -proteolítico”. Este corte proteolítico se encuentra cercano a la región del octarepeat, entre los residuos 89-90, partiendo a la proteína en dos fragmentos: N2 (23-89) y C2 (90-231).⁴⁶ Este fragmento con respecto a C-terminal ha sido localizado en tejidos post-mortem en cerebros con enfermedad de CJ,⁴⁷ y se ha propuesto que su formación puede involucrar la formación de especies reactivas de oxígeno en presencia de cobre.⁴⁸

El presente capítulo se propone caracterizar la unión de Cu(II) a las histidinas 96 y 111 en el fragmento 92-115 de la proteína prion humana en función de la concentración de protones y relación Cu(II):péptido. También se propone evaluar el papel de las metioninas 109 y 112 en la interacción Cu(II)-péptido. Para ello, usaremos fragmentos peptídicos sintetizados químicamente y técnicas espectroscópicas para estudiar su unión a Cu(II).

Objetivo General

Estudiar la coordinación del Cu(II) a los sitios de His96 y 111 en el fragmento peptídico hPrP(92-115) y la influencia de los residuos de Met109 y 112 en la unión por cada sitio.

Objetivos específicos

- Elucidar la coordinación de Cu(II) a los sitios de las His96 e His111 en el fragmento hPrP(92-115) de la proteína prion humana a diferentes condiciones de pH y relación Cu(II):péptido.
- Evaluar el papel de las Met109 y 112 en la coordinación de Cu(II) de cada uno de los sitios y su afinidad relativa por cada sitio.
- Evaluar la dependencia de pH y relación Cu(II):péptido en presencia y ausencia de los residuos de metioninas.

Resultados y Análisis

Características espectroscópicas de Cu(II) unido a His96 y 111 en el fragmento hPrP(92-115)

La coordinación de Cu(II) a los sitios de His96 y 111 de la hPrP presenta características propias en la unión Cu(II)-péptido. Datos espectroscópicos de los complejos formados a partir de los fragmentos peptídicos cortos hPrP(92-96) y hPrP(106-115) servirán de ayuda como antecedente comparativo para elucidar los sitios de unión de Cu(II) en el fragmento largo hPrP(92-115), el cual incluye en su secuencia a dos sitios de histidina 96 y 111.

Para poder comparar las características espectroscópicas del complejo con el fragmento largo Cu(II)-hPrP(92-115) y los fragmentos cortos hPrP(92-96) y hPrP(106-115), se ocupan variantes que incluyen en la secuencia larga una sola histidina:

- Cu(II)-hPrP(92-115 H111A) en la cual sólo esta presente la His96
- Cu(II)-hPrP(92-115 H96A) en la cual sólo esta presente la His111.

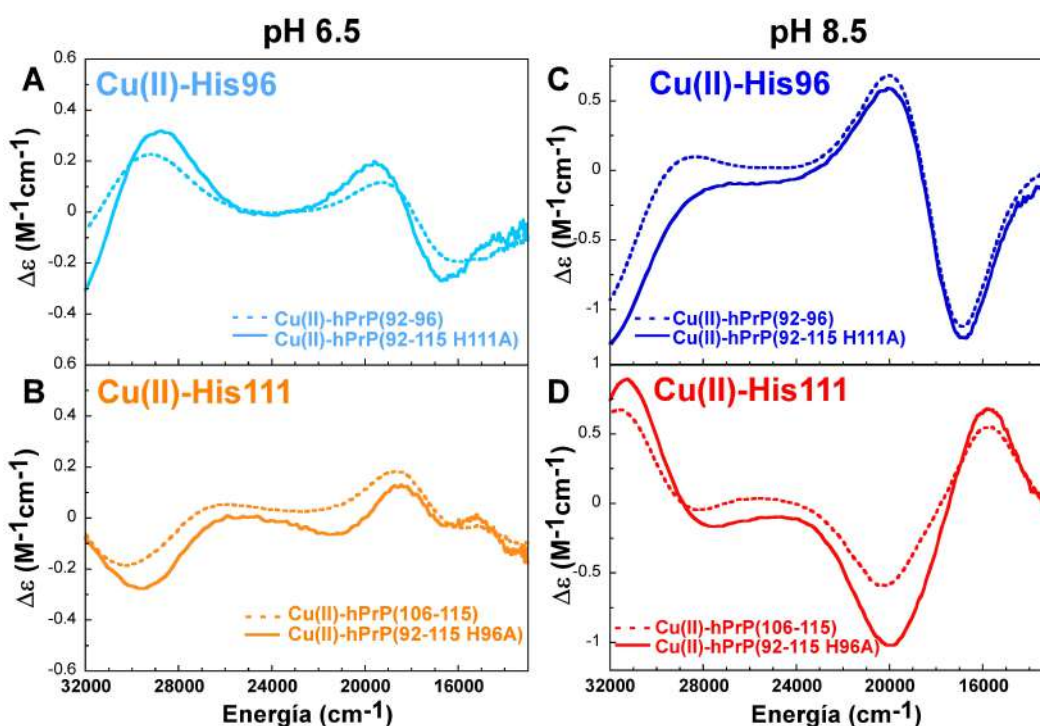


Figura 2.2.1. Comparación de espectros de CD a pH 6.5 y 8.5 de los complejos con 1.0 eq Cu(II) que incluyen a los sitios de His96 y 111.

Así, la comparación de los espectros de CD de los complejos en donde únicamente esta presente la His96 involucra los fragmentos hPrP(92-96) vs Cu(II)-hPrP(92-115 H111A),

mientras que para la His111 involucra los fragmentos hPrP(106-115) vs Cu(II)-hPrP(92-115 H96A). La Figura 2.2.1 muestra las comparaciones de los espectros de CD de los fragmentos cortos contra los fragmentos largos a pH por debajo (6.5) y por arriba (8.5) de su valor de pK_a , favoreciendo la forma protonada y desprotonada del complejo. La presencia de más residuos en el fragmento no influye en la coordinación del Cu(II) al sitio de cada una de las histidinas por separado.

Una comparación entre las variantes de histidina con los fragmentos largos a pH 6.5 y 8.5 se muestra en la Figura 2.2.2. El espectro de CD azul representa Cu(II) coordinado al sitio de la His96, es decir al complejo Cu(II)-hPrP(92-115 H111A), mientras que el espectro de CD rojo representa Cu(II) coordinado a la His111, es decir al complejo Cu(II)-hPrP(92-115 H96A). Las características espectroscópicas de cada sitio son muy distintas, y es fácil notar que los espectros azules y rojos lucen como imágenes especulares, por lo que el ambiente de coordinación en la unión de Cu(II) a His96 (azul) *versus* His111 (rojo) es diferente.

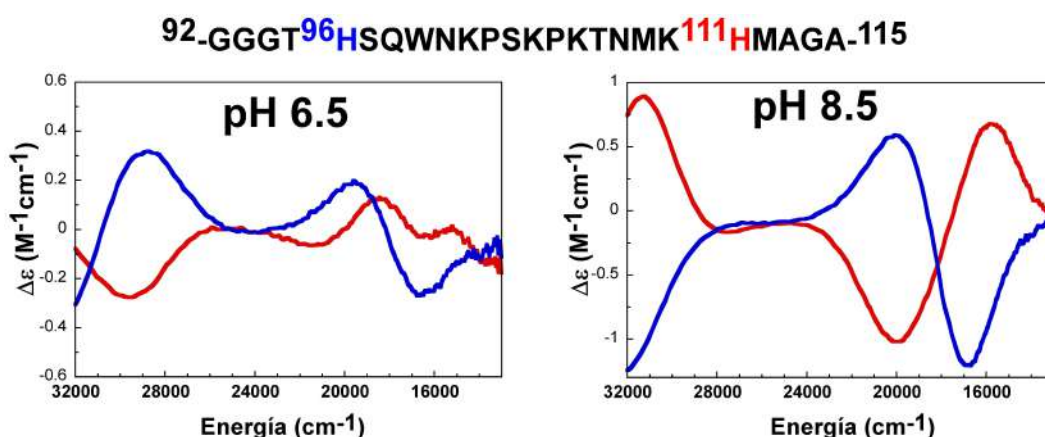


Figura 2.2.2. Espectros de CD a pH 6.5 y 8.5 con 1.0 eq Cu(II) de los complejos Cu(II)-hPrP(92-115 H111A) (azul) y Cu(II)-hPrP(92-115 H96A) (rojo).

Para elucidar el modo de coordinación de los sitios de His96 y 111, se analizaron los complejos de los fragmentos largos: Cu(II)-hPrP(92-115 H111A) y Cu(II)-hPrP(92-115 H96A) por espectroscopia de EPR. La Tabla 2.2.1 muestra los valores de g_{\parallel} y A_{\parallel} determinados a partir del análisis de los espectros colectados a valores de pH 6.5 y 8.5.

Tabla 2.2.1 Parámetros de EPR de los complejos Cu(II)-hPrP(92-115 H111A) y Cu(II)- hPrP(92-115 H96A)

Complejo	pH 6.5		pH 8.5	
	g_{\parallel}	A_{\parallel}	g_{\parallel}	A_{\parallel}
Cu(II)-hPrP(92-115 H111A)	2.230	180	2.202	202
Cu(II)-hPrP(92-115 H96A)	2.233	189	2.203	192
Modo de Coordinación	3N1O		4N	

* $\times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$

Todos las señales muestran $g_{\parallel} > g_{\perp} > 2.0023$ y un valor de acoplamiento hiperfino paralelo alto (A_{\parallel}), lo cual es indicativo de una geometría cuadrada plana de Cu(II) con un estado basal $d_{x^2-y^2}$.⁴⁹ Los valores de g_{\parallel} y A_{\parallel} para los complejos a pH 6.5 corresponden a un modo de coordinación ecuatorial de 3 nitrógenos y 1 oxígeno, de acuerdo a las correlaciones de Peisach-Blumberg,⁵⁰ mientras que para el valor de pH 8.5, el modo de coordinación cambia a 4 nitrógenos. Este cambio de coordinación ecuatorial esta asociado a la desprotonación de una amida de la cadena peptídica, como se vio para sus análogos cortos Cu(II)-hPrP(92-96) y Cu(II)-hPrP(106-115).^{24, 27} A pesar de que la espectroscopia de EPR nos ayudó a elucidar el modo de coordinación asociado a cada sitio, los valores de g_{\parallel} y A_{\parallel} al ser prácticamente idénticos a cada condición de pH, no ayuda a distinguir cada sitio por separado.

En contraste con estos experimentos de EPR, las características espectroscópicas provistas por CD nos permitirá discernir cada sitio de unión a Cu(II) en cada condición de pH.

Dependencia del pH en la coordinación de Cu(II) a hPrP(92-115)

A fin de conocer el comportamiento del fragmento largo hPrP(92-115) en presencia del ion metálico Cu(II), se tituló una solución del péptido con Cu(II) cada 0.2 equivalentes y se siguió por CD. Todas las señales saturaron a 2.0 eq Cu(II), indicando una estequiometría 2:1 Cu(II):péptido, (Figura 2.2.3) confirmando la presencia de los dos sitios de unión en el péptido, His96 y 111.

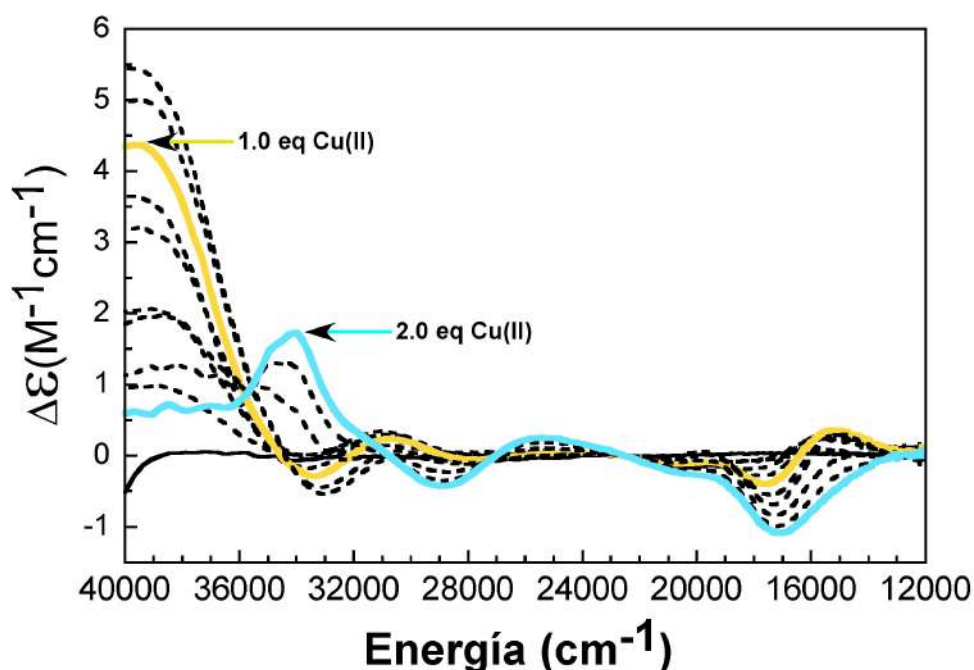


Figura 2.2.3. Titulación con Cu(II) del fragmento hPrP(92-115) a pH 8.5 seguida por CD. Líneas continuas representan 0.0 (negra), 1.0 (amarilla) y 2.0 (azul) eq Cu(II), las líneas punteadas indican los puntos intermedios de la titulación.

Las señales del espectro de CD a 1.0 eq Cu(II) mostraron tres transiciones de campo ligando (d-d) una banda positiva a $15\ 100\ \text{cm}^{-1}$ ($\Delta\epsilon = 0.35\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y dos negativas a $17\ 500\ \text{cm}^{-1}$ ($\Delta\epsilon = -0.40\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y a $20\ 600\ \text{cm}^{-1}$ ($\Delta\epsilon = -0.1\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). También se observan tres transiciones de bandas de transferencia de carga LMCT: una banda positiva a $30\ 700\ \text{cm}^{-1}$ ($\Delta\epsilon = 0.23\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) que puede ser asignada a una banda LMCT de la amida desprotonada N⁻ del enlace peptídico al Cu(II); una banda negativa a $33\ 400\ \text{cm}^{-1}$ ($\Delta\epsilon = -0.28\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) correspondiente a LMCT π_1 del imidazol de las histidinas al Cu(II) y una positiva a $39\ 400\ \text{cm}^{-1}$ con alta intensidad ($\Delta\epsilon = 4.38\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) correspondiente a LMCT π_2 del imidazol de las histidinas al Cu(II). En el caso del espectro a 2.0 eq Cu(II) las señales se recorrieron con respecto a la de

1.0 eq Cu(II) y únicamente presentó una sola transición de campo ligando (d-d) negativa a $17\ 100\ \text{cm}^{-1}$ ($\Delta\varepsilon = -1.00\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y tres transiciones de bandas de transferencia de carga LMCT: una positiva a $25\ 300\ \text{cm}^{-1}$ ($\Delta\varepsilon = 0.25\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$); una negativa a $28\ 900\ \text{cm}^{-1}$ ($\Delta\varepsilon = -0.4\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) posiblemente de la transferencia de carga de la amida desprotonada N^- del enlace peptídico al Cu(II) y otra positiva a $34\ 000\ \text{cm}^{-1}$ ($\Delta\varepsilon = 1.6\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) correspondiente a LMCT π_1 del imidazol de las histidinas al Cu(II).

El análisis de estas señales en los espectros de CD nos permitió conocer la naturaleza de los ligandos unidos al centro metálico. Bandas de transferencia de carga asociadas a la interacción del metal con amidas desprotonadas y grupos imidazol eran de esperarse ya que los sitios de unión a Cu(II), His96 y 111, son análogos a los correspondientes fragmentos cortos. En ambos casos, su esfera de coordinación involucra la participación de la cadena lateral del imidazol de la histidina y amidas desprotonadas de la cadena peptídica.

El modo de coordinación del complejo Cu(II)-hPrP(92-115) también tendría que ser entonces dependiente del pH, al igual que los sitios por separados. La Figura 2.2.4 compara los espectros de EPR del complejo Cu(II)-hPrP(92-115) y de los complejos de las variantes de Cu(II)-hPrP(92-115 H111A) y Cu(II)-hPrP(92-115 H96A). Los espectros de EPR del complejo con 2.0 eq Cu(II) arrojaron valores de $g_{\parallel} = 2.230$ y $A_{\parallel} = 175 \times 10^{-4}\ \text{cm}^{-1}$ a pH 6.5, y $g_{\parallel} = 2.205$ y $A_{\parallel} = 197 \times 10^{-4}\ \text{cm}^{-1}$ a pH 8.5, correspondientes a los modos de coordinación 3N1O y 4N, respectivamente (espectros negros en Figura 2.2.4).

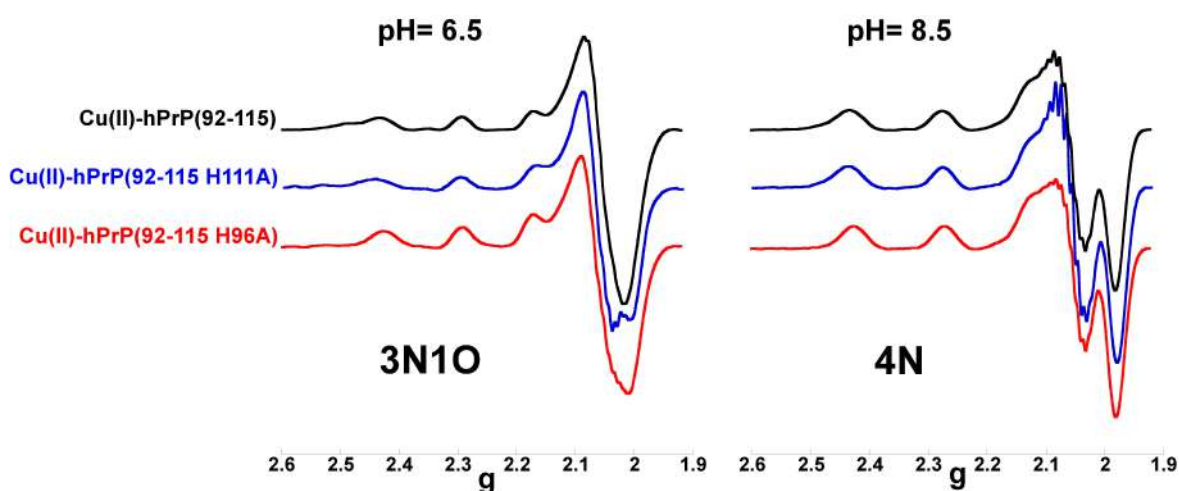
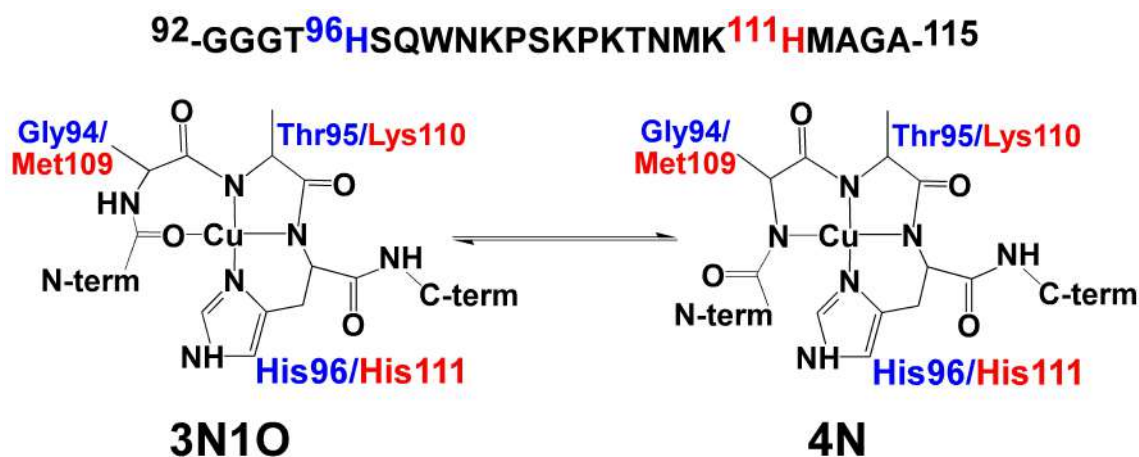


Figura 2.2.4. Espectros de EPR a pH 6.5 y 8.5 de los complejos Cu(II)-hPrP(92-115) (negro), (Cu(II)-hPrP(92-115 H111A) (azul) y Cu(II)-hPrP(92-115 H96A) (rojo).

A partir de estos datos espectroscópicos, se pudo proponer el modelo de coordinación de ambos sitios en el fragmento largo como se representa en el esquema 2.2.1., donde el equilibrio de protonación corresponde a un cambio en la coordinación ecuatorial del Cu(II), de 3N1O a 4N.



Esquema 2.2.1. Equilibrio de protonación para los complejos Cu(II)-hPrP(92-115 H111A) (residuos resaltados en azul) y Cu(II)-hPrP(92-115 H96A) (residuos resaltados en rojo).

La unión de Cu(II) a cada uno de los sitios en el fragmento largo dependerá entonces del equilibrio de protonación, y así mismo a la razón molar Cu(II):péptido, por lo que se hizo necesario evaluar la formación del complejo en ambos sitios a diferentes valores de pH y concentración del ión metálico.

Para determinar la dependencia de pH del complejo formado, soluciones con diferentes relaciones Cu(II):hPrP(92-115) fueron tituladas por pH en un rango de 5.5 a 10, y se siguieron por CD (Figura 2.2.5).

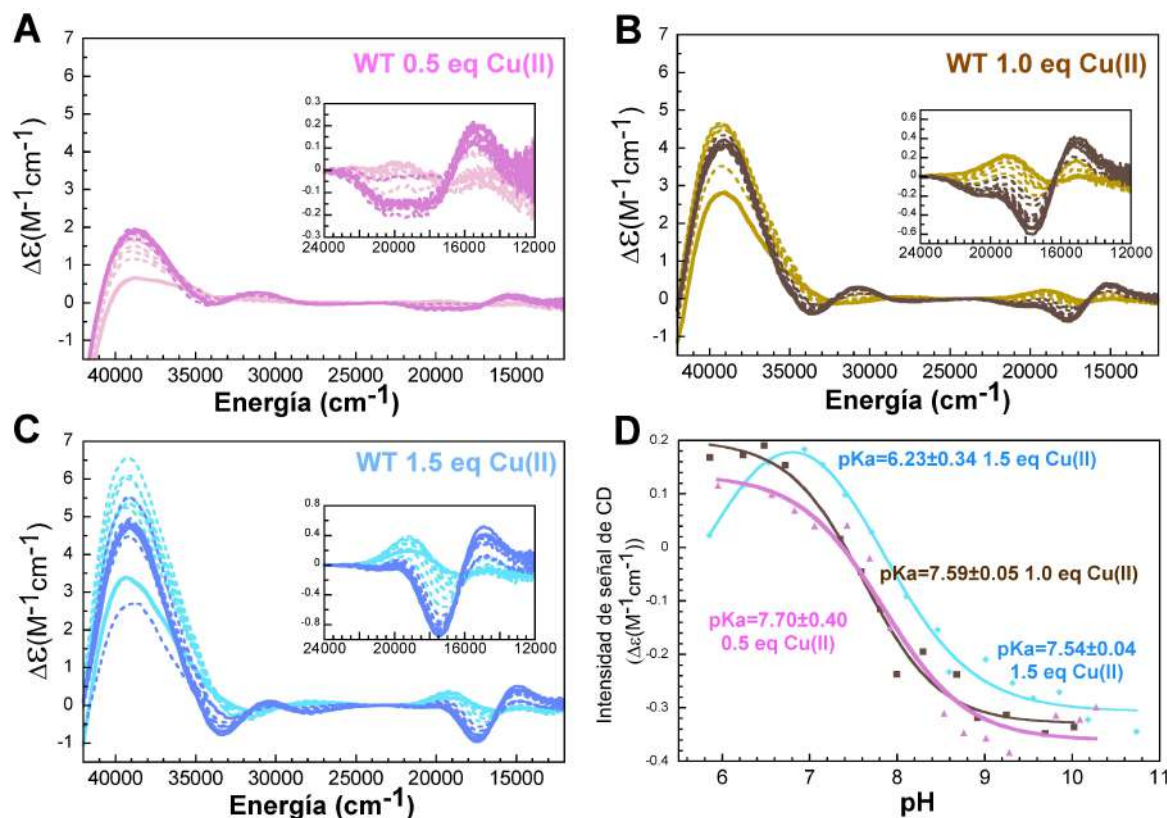


Figura 2.2.5. A) B) y C) Espectros de CD del complejo Cu(II)-hPrP(92-115) obtenidos a partir de un barrido a diferentes condiciones de pH y diferentes equivalentes de Cu(II). D) Trazas de las intensidades de las señales de CD en función del pH a cada condición de equivalentes de Cu(II). Los valores de pK_a se determinaron por ajuste de un modelo de uno y dos equilibrios de protonación.

El cálculo de los valores de pK_a para cada especie se determinó a partir del cambio en las intensidades de las señales de CD a diferentes valores de energía (cm^{-1}) debido a su dependencia con el pH. Las señales mostraron un comportamiento sigmoideo, indicativo de un equilibrio de protonación, por lo que se pudo aplicar el modelo de ajuste que asume uno o dos eventos de protonación (ver Apéndice I). En la Figura 2.2.5 D, se muestran las trazas representativas para los cambios en la intensidad de las señales de CD para cada especie de los espectros (A), (B) y (C) y su respectivo cálculo de pK_a .

Para el caso del complejo con 0.5 equivalentes de Cu(II) se siguió la señal a $19\,685\text{ cm}^{-1}$ (traza rosa) el cual mostró un solo equilibrio de protonación con un valor de pK_a de 7.70 ± 0.40 . Así mismo para el complejo con 1.0 equivalente de Cu(II) se monitoreó la intensidad a $19\,011\text{ cm}^{-1}$ (traza café) obteniendo un valor de pK_a de 7.59 ± 0.05 y para el complejo con 1.5 equivalentes de Cu(II) a $19\,011\text{ cm}^{-1}$ (traza azul) se determinaron dos equilibrios de

protonación 6.23 ± 0.34 y 7.54 ± 0.04 . La determinación del pK_a para cada especie se hizo a partir de señales a diferentes valores de energía y por duplicado.

En general, la coordinación de Cu(II) al péptido hPrP(92-115) que incluye los dos sitios de unión, presentó un equilibrio de pH dependiente de la relación Cu(II):péptido.

El cambio en los valores de pK_a asociados al complejo a diferentes equivalentes de Cu(II) nos llevó a indagar acerca del modo de coordinación de las especies formadas, por lo que fue necesario elucidar por EPR a los complejos formados con diferente relación Cu(II):péptido a pH 6.5 y 8.5. La Tabla 2.2.2 presenta los valores de g_{\parallel} y A_{\parallel} para los complejos formados con el péptido hPrP(92-115) a diferentes equivalentes de Cu(II).

Tabla 2.2.2 Parámetros de EPR del complejo Cu(II)-hPrP(92-115) a diferentes equivalentes de Cu(II)

Cu(II)-hPrP(92-115)	pH 6.5		pH 8.5	
	g_{\parallel}	A_{\parallel}^*	g_{\parallel}	A_{\parallel}^*
0.5 eq Cu(II)	2.235	168	2.202	198
1.0 eq Cu(II)	2.232	176	2.202	197
1.5 eq Cu(II)	2.237	171	2.204	199
2.0 eq Cu(II)	2.230	175	2.205	197
Modo de Coordinación	3N1O		4N	

* $\times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$

Analizando los valores de g_{\parallel} y A_{\parallel} para cada uno de los complejos formados resulta evidente que la concentración del ion Cu(II) no cambió la forma en que se coordina el metal a los sitios que contiene el complejo Cu(II)-hPrP(92-115), por lo que el modelo de unión de Cu(II) a cada sitio sigue siendo el mismo.

Para el caso de los complejos de los sitios por separado, se estudiaron también sus equilibrios de protonación, y se determinaron sus valores de pK_a a 1.0 eq Cu(II) (Figura 2.2.6). El complejo que contiene a la His111, es decir, Cu(II)-hPrP(92-115 H96A), presentó únicamente un solo equilibrio de protonación con un valor de pK_a de 7.44 ± 0.02 determinado a partir de las señales a $20\,080 \text{ cm}^{-1}$ (traza naranja) y $15\,873 \text{ cm}^{-1}$ (traza rojo). Este valor de pK_a es similar al del complejo con ambos sitios Cu(II)-hPrP(92-115) en la condición de 1.0 eq Cu(II). Por otro lado el complejo Cu(II)-hPrP(92-115 H111A), el cual

contiene solo el sitio de His96, exhibe dos valores de pK_a con valores de 6.88 ± 0.46 y 7.88 ± 0.15 determinados a partir de las señales a $20\ 080\ \text{cm}^{-1}$ (traza azul claro) y $35\ 971\ \text{cm}^{-1}$ (traza azul oscuro) y que son parecidos a los del complejo Cu(II)-hPrP(92-115) con 1.5 eq Cu(II). El valor de pK_a bajo de 6.88 es distintivo de ocupación del sitio de His96, debido a que corresponde al ya reportado en el fragmento corto 92-96.^{23, 25} Así, la presencia de dos valores de pK_a en el complejo es el sello distintivo del sitio de la His96.

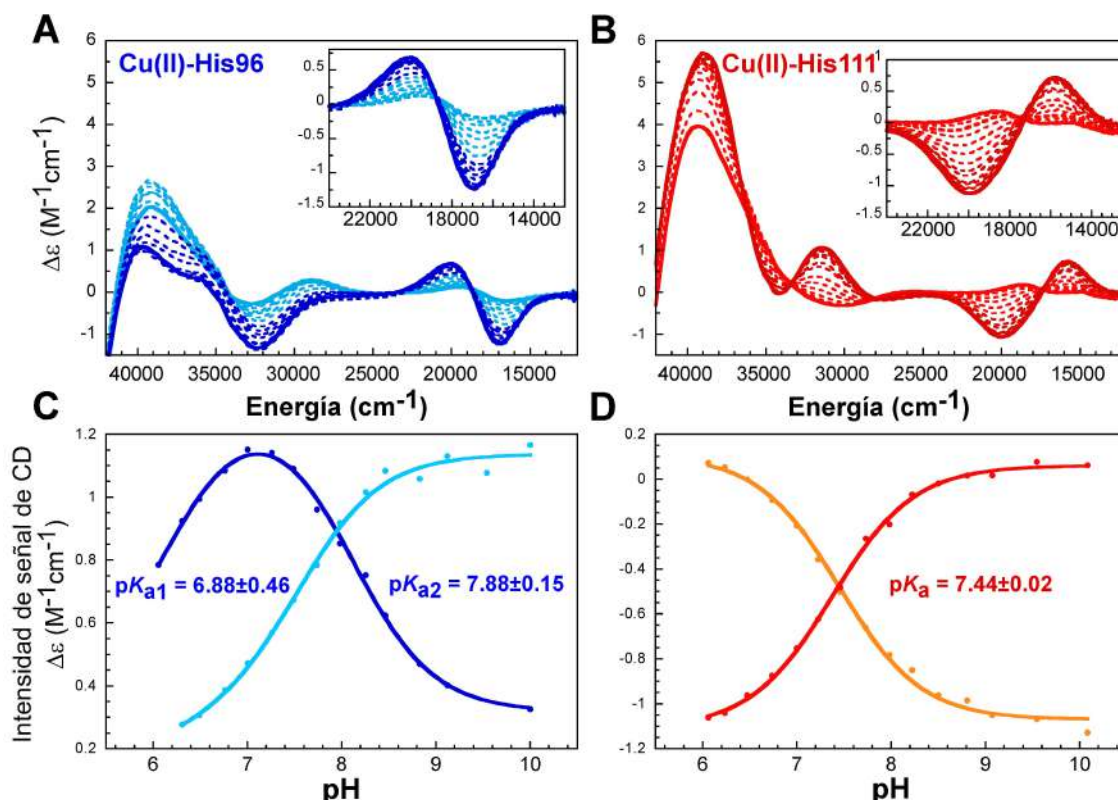


Figura 2.2.6. Espectros de CD de los complejos A) Cu(II)-hPrP(92-115 H111A) y B) Cu(II)-hPrP(92-115 H96A) obtenidos a partir de un barrido a diferentes condiciones de pH. D) Trazas de las intensidades de la señales de CD en función del pH (ver texto). Los valores de pK_a se determinaron por ajuste de un modelo de uno y dos equilibrios de protonación.

Las comparaciones de los equilibrios de protonación entre los complejos con los sitios independientes y el péptido largo hPrP(92-115), sugiere que la participación de cada sitio en la unión por Cu(II) depende de la relación metal-ligante.

En general, la coordinación del Cu(II) a las variantes de histidina en el fragmento largo hPrP(92-115) no cambió en comparación con los péptidos cortos: hPrP(92-96) y hPrP(106-115) y sus características espectroscópicas fueron muy similares. Más aun, alrededor del pH

fisiológico, la unión de Cu(II) al sitio de la His96 mostró dos valores de pK_a , mientras que la unión al sitio de la His111 únicamente presentó un valor de pK_a , como en los péptidos cortos. En ambos casos, el equilibrio alrededor de pH 7.5 incluye dos especies con coordinación ecuatorial 3N1O y 4N.

Espectroscopia de CD como herramienta para estimar los porcentajes de unión de Cu(II) a cada sitio: His96 e His111

Debido a que los espectros de CD de los complejos con Cu(II) unido a cada sitio de histidina por separado son muy diferentes entre sí, se pudieron usar para calcular el espectro del complejo con los dos sitios. Es decir, el espectro del complejo Cu(II)-hPrP(92-115) se concibe como una combinación lineal de los espectros de CD de los complejos con las variantes Cu(II)-hPrP(92-115 H111A) y Cu(II)-hPrP(92-115 H96A). De esta forma, es posible estimar la ocupación relativa por Cu(II) en cada sitio en el fragmento que incluye a las dos histidinas.

La Figura 2.2.7. muestra las comparaciones de los espectros de CD del complejo Cu(II)-hPrP(92-115) (espectro negro) con Cu(II)-hPrP(92-115 H111A) (espectro azul) y Cu(II)-hPrP(92-115 H96A) (espectro rojo) y una combinación lineal para el porcentaje de ocupación a las histidinas (traza morada) a pH 6.5, 7.5 y 8.5 y a diferentes equivalentes de Cu(II) (0.5, 1.0, 1.5 y 2.0).

A baja concentración de Cu(II), 0.5 eq Cu(II) o incluso 1.0 eq Cu(II), el ion metálico se une preferentemente a la His111 a los tres valores de pH. Así, un 55-65% de Cu(II) está unido al sitio de la His111, sin embargo cuando la condición cambia a 1.5 eq Cu(II) la ocupación por el sitio se ve disminuido, y ahora el sitio de la His96 es favorecido, alcanzando un 60% de ocupación a todos los pH. Finalmente, en presencia de 2.0 eq Cu(II), ambos sitios están poblados con el mismo porcentaje de ocupación 50:50. En ninguna condición analizada, se observó evidencia de la formación de un complejo bis-histidina. Esto debido a que si comparamos el espectro del complejo que contiene a los dos sitios Cu(II)-hPrP(92-115) (espectro negro) a todas las concentraciones de Cu(II) y a todos los pH evaluados, con los espectros de CD de diferentes combinaciones lineales de las variantes de histidinas, éstos se

superponen, sugiriendo que los iones Cu(II) se unen de manera independiente a los sitios de His96 e His111.

Por lo anterior podemos decir que a bajas concentraciones de Cu(II), la His111 es el sitio predominante de la unión de Cu(II). Sin embargo, cuando la concentración del ion metálico aumenta, el Cu(II) se une preferencialmente a His96, por lo que la afinidad relativa por His96 aparentemente depende de la ocupación de Cu(II) en His111.

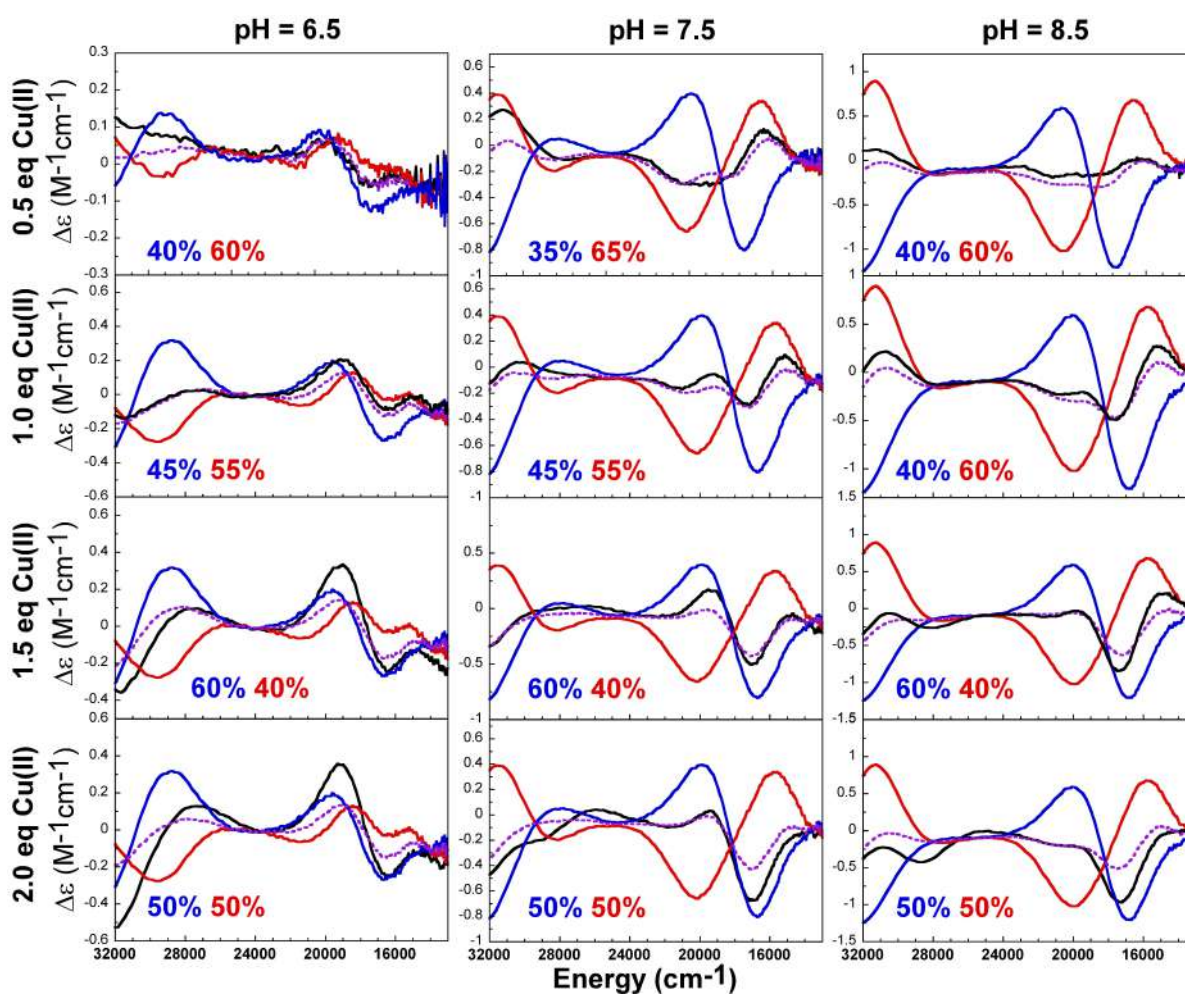


Figura 2.2.7. Comparación de los espectros de CD del complejo Cu(II)-hPrP(92-115) con los complejos Cu(II)-hPrP(92-115 H111A) y Cu(II)-hPrP(92-115 H96A). Se hizo una combinación lineal (línea morada) de los espectros de CD de Cu(II)-hPrP(92-115 H111A) (línea azul) y Cu(II)-hPrP(92-115 H96A) (línea roja) para compararla con los espectros de Cu(II)-hPrP(92-115) (línea negra) a pH 6.5, 7.5 y 8.5 y diferentes equivalentes de Cu(II). Los porcentajes listados en cada condición, significan la ocupación de Cu(II) en cada sitio de unión, His96 (letras azules) e His111(letras rojas).

Papel de los residuos de Met109 y 112 en la coordinación de Cu(II) a hPrP(92-115)

Con el fin de evaluar el papel de las dos metioninas presentes en la secuencia del fragmento hPrP(92-115), se sintetizaron las variantes hPrP(92-115 M112I), hPrP(92-115 M109I) y hPrP(92-115 M109I/M112I), donde se reemplazó el residuo de metionina por el residuo de isoleucina, el cual en su cadena lateral no contiene el grupo funcional tioéter como en el caso de la metionina. Estas variantes peptídicas fueron tituladas con Cu(II) a pH 7.5, se siguieron por CD y todas sus señales saturaron a 2.0 eq Cu(II), (Figura 2.2.8) indicando que hay dos sitios de coordinación para Cu(II) como en el caso del fragmento hPrP(92-115).

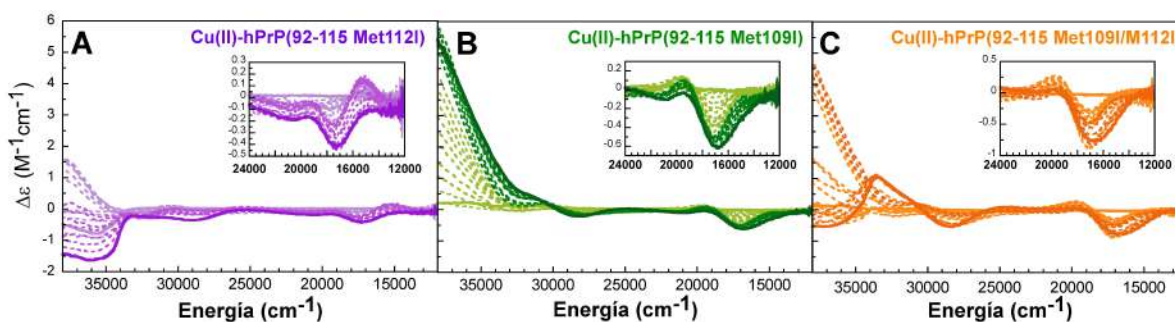


Figura 2.2.8. Titulaciones con Cu(II) seguidas por CD de las variantes de metioninas a pH 7.5: A) Cu(II)-hPrP(92-115 M112I) y B) Cu(II)-hPrP(92-115 M109I) y C) Cu(II)-hPrP(92-115 M109I/M112I)

Estos datos espectroscópicos de las tres variantes de metionina reflejaron dos cosas: i) las tres variantes presentaron dos sitios de unión por Cu(II) al igual que el fragmento hPrP(92-115) y ii) la ausencia de los residuos de metioninas pareció cambiar el ambiente de coordinación del ion metálico. Así entonces, se propuso estudiar con más detalle la unión Cu(II):péptido en ausencia de una o las dos metioninas en función de los equivalentes de Cu(II) y pH.

La caracterización inicial por pH se hizo a diferentes equivalentes de Cu(II). Se titularon soluciones de los complejos de las variantes Cu(II)-hPrP(92-115 M112I) y Cu(II)-hPrP(92-115 M109I) y de la doble variante Cu(II)-hPrP(92-115 M109I/M112I) en un rango de pH de 5.5 a 10 y se siguió por CD, con 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 eq Cu(II).

En la Figura 2.2.9 se muestran los espectros de CD para el complejo de Cu(II)-hPrP(92-115 M112I) obtenidos a partir de un barrido a diferentes condiciones de pH y a diferentes equivalentes de Cu(II). Al igual que en el complejo Cu(II)-hPrP(92-115), se determinaron los equilibrios de protonación para cada condición de equivalentes de Cu(II) y la Tabla 2.2.3 resume los valores de pK_a y los compara con los valores del complejo Cu(II)-hPrP(92-115).

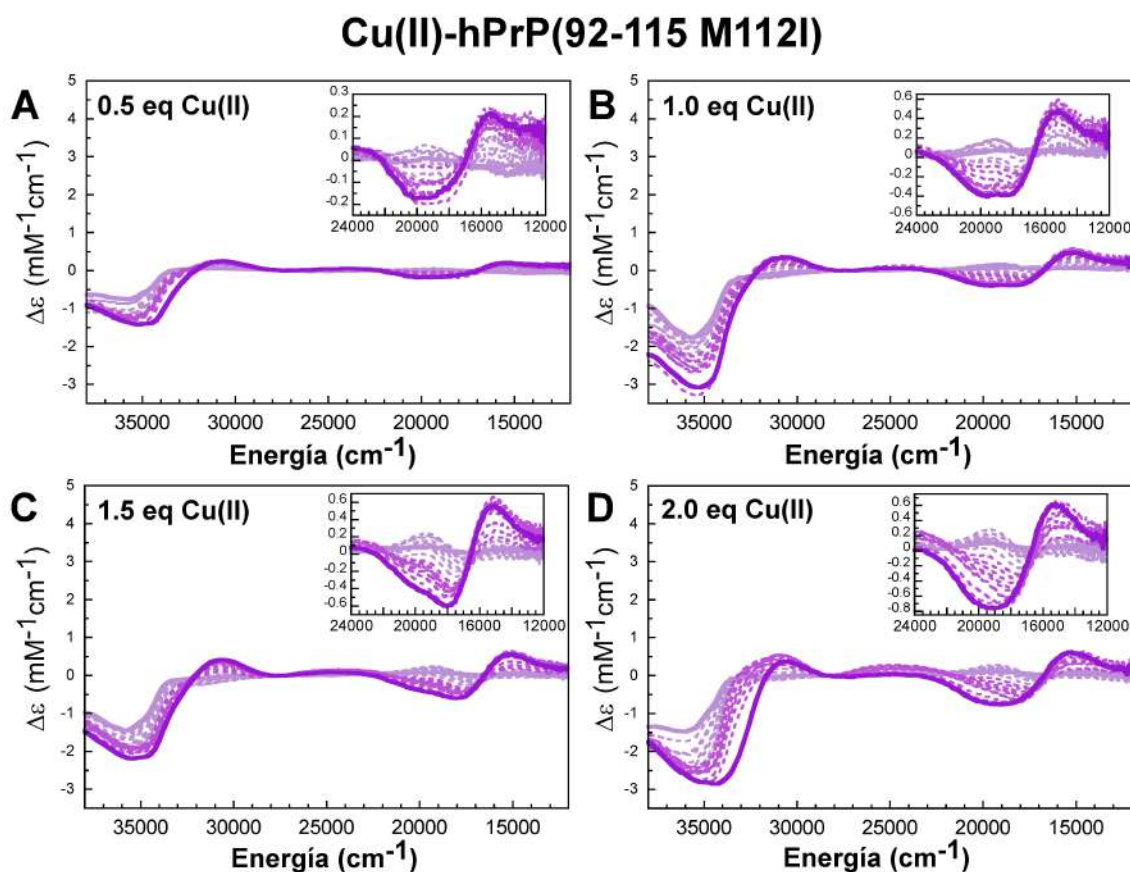


Figura 2.2.9. Espectros de CD del complejo Cu(II)-hPrP(92-115 M112I) obtenidos a partir de un barrido a diferentes condiciones de pH y a 0.5 A), 1.0 B), 1.5 C) y 2.0 D) equivalentes de Cu(II). La línea morada clara corresponde a la condición de pH 5.5 y la línea morada oscura a pH 10.0, mientras que las líneas punteadas corresponden a los valores de pH intermedios. El recuadro a cada condición amplía la región de bandas de campo ligando (24 000 - 12 000 cm^{-1}).

Los valores de pK_a fueron determinados a partir del ajuste del cambio en las intensidades de las señales de CD a diferentes valores de energía y en función del pH (ver Apéndice I). A cada condición, se promediaron al menos 4 valores de pK_a determinados a diferentes energías y de 2 experimentos independientes. La Tabla 2.2.3 resume los promedios de los valores y sus desviaciones estándar. Así por ejemplo, en la condición de 0.5 eq Cu(II) se siguió el cambio de intensidad de las señales a 2 energías: 19 455 cm^{-1} y 30 675 cm^{-1} ; para 1.0 eq Cu(II): 15

106 cm^{-1} y 30 675 cm^{-1} ; para 1.5 eq Cu(II): 15 152 cm^{-1} y 30 488 cm^{-1} ; y para 2.0 eq Cu(II): 14 881 cm^{-1} y 24 752 cm^{-1} . Así, debido a los resultados que arrojaron estos experimentos, pudimos decir que también el complejo variante que carece de Met112 es dependiente del pH, y más aún, del número de equivalentes del ion metálico Cu(II).

Tabla 2.2.3 Valores de pK_a de los complejos Cu(II)-hPrP(92-115) y la variante Cu(II)-hPrP(92-115 M112I) a diferentes equivalentes de Cu(II).

Eq de Cu(II)	Valores de pK_a	
	Cu(II)-hPrP(92-115)	Cu(II)-hPrP(92-115 M112I)
0.5	7.70 \pm 0.40	7.69 \pm 0.24
1.0	7.59 \pm 0.05	7.89 \pm 0.05
1.5	6.23 \pm 0.34 & 7.54 \pm 0.04	5.95 \pm 0.61 & 7.76 \pm 0.08
2.0	5.84 \pm 0.50 & 8.70 \pm 0.90	7.59 \pm 0.72 & 9.24 \pm 0.18

La comparación de los valores de pK_a entre el complejo base y la variante M112I nos dio información acerca de sus equilibrios de protonación, que a su vez refleja la ocupación por Cu(II) en los sitios de His96 y 111. Comparando los espectros de las titulaciones por pH en la condición de 0.5 y 1.0 eq Cu(II), del complejo base Cu(II)-hPrP(92-115) en la Figura 2.2.5 A y B con los del complejo carente de metionina Cu(II)-hPrP(92-115 M112I) en la Figura 2.2.9 A y B se observó similitud de comportamiento, el cual, de acuerdo con lo elucidado en la ocupación por Cu(II) en los sitios de His96 y 111, el Cu(II) tendría una ligera tendencia hacia el sitio de la His111.

En contraste, en la condición de 1.5 y 2.0 eq Cu(II) ambos complejos presentan dos equilibrios de protonación, lo cual es característico de coordinación del ion metálico al sitio de His96.

Por otro lado, también se determinaron los equilibrios de protonación del complejo de la otra variante de metionina en donde ahora el complejo carece de M109, sustituyéndola por el residuo de isoleucina. La Figura 2.2.10 muestra los espectros de CD del complejo Cu(II)-hPrP(92-115 M109I) en un barrido de pH a diferentes equivalentes de Cu(II) y la Tabla 2.2.4 resume los valores de pK_a y los compara con los valores del complejo Cu(II)-hPrP(92-115).

Cu(II)-hPrP(92-115 M109I)

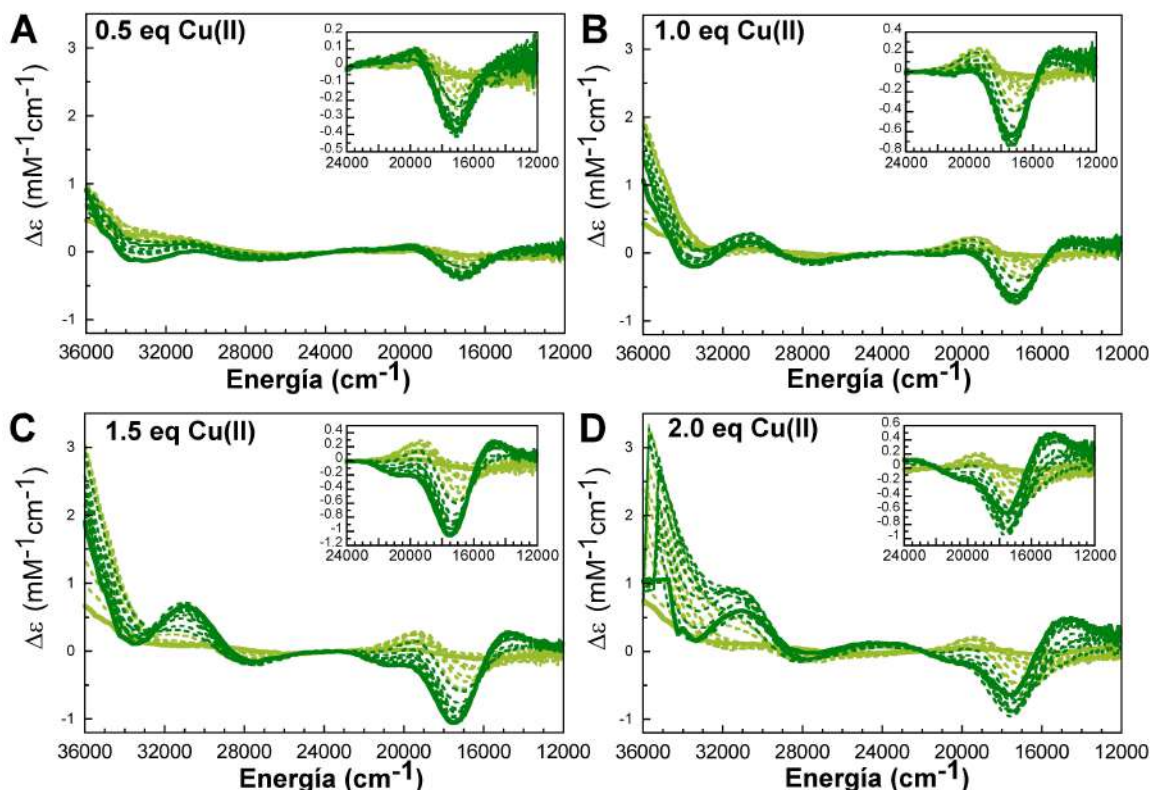


Figura 2.2.10. Espectros de CD del complejo Cu(II)-hPrP(92-115 M109I) obtenidos a partir de un barrido a diferentes condiciones de pH y a 0.5 A), 1.0 B), 1.5 C) y 2.0 D) equivalentes de Cu(II). La línea verde clara corresponde a la condición de pH 5.5 y la línea verde oscura a pH 10.0, mientras que las líneas punteadas corresponden a los valores de pH intermedios. El recuadro a cada condición amplía la región de bandas de campo ligando (24 000 - 12 000 cm^{-1}).

Tabla 2.2.4 Valores de pK_a de los complejos Cu(II)-hPrP(92-115) y la variante Cu(II)-hPrP(92-115 M109I) a diferentes equivalentes de Cu(II).

Eq de Cu(II)	Valores de pK_a	
	Cu(II)-hPrP(92-115)	Cu(II)-hPrP(92-115 M109I)
0.5	7.70 ± 0.40	6.37 ± 0.13 & 7.86 ± 0.16
1.0	7.59 ± 0.05	6.04 ± 0.05 & 7.76 ± 0.15
1.5	6.23 ± 0.34 & 7.54 ± 0.04	6.19 ± 0.13 & 7.90 ± 0.15
2.0	5.84 ± 0.50 & 8.70 ± 0.90	6.73 ± 0.51 & 9.27 ± 0.20

Al igual que en los otros casos, los valores de pK_a fueron determinados a partir del ajuste del cambio en las intensidades de las señales de CD a diferentes valores de energía y en función del pH (ver Apéndice I). Así, a 0.5 eq Cu(II) se determinó a: $14\,970\text{ cm}^{-1}$ y $35\,461\text{ cm}^{-1}$; para

1.0 eq Cu(II): 19 841 cm^{-1} y 27 322 cm^{-1} ; para 1.5 eq Cu(II): 19 455 cm^{-1} y 35 461 cm^{-1} ; y para 2.0 eq Cu(II): 31 250 cm^{-1} y 35 971 cm^{-1} . Los complejos formados en ausencia de la metionina 109 presentan dos equilibrios de protonación a todas las concentraciones de Cu(II). En contraste, el complejo base exhibe dos equilibrios de protonación únicamente a concentraciones altas de Cu(II), condición en la que se ocupa el sitio de la His96. Una comparación de los espectros de CD del barrido a diferentes condiciones de pH entre la variante Cu(II)-hPrP(92-115 M109I) con 1.0 eq Cu(II) (Figura 2.2.10 B) y el complejo de Cu(II)-hPrP(92-115) con 1.5 eq Cu(II) (Figura 2.2.5 B) y sus valores de pK_a asociados mostró un comportamiento similar para ambos péptidos. Estas observaciones sugieren que la falta de Met109 en la secuencia favorece la ocupación del Cu(II) hacia el sitio de His96.

Finalmente, también se determinaron los equilibrios de protonación para la doble variante de metionina, la cual carece de residuos de metionina en su secuencia. Los espectros de CD para el complejo de Cu(II)-hPrP(92-115 M109I/M112I) obtenidos a partir de un barrido a diferentes condiciones de pH y a diferentes equivalentes de Cu(II) se muestran en la Figura 2.2.11 y los valores de pK_a determinados a partir de las mismas se presentan en la Tabla 2.2.5.

Cu(II)-hPrP(92-115 M109I/M112I)

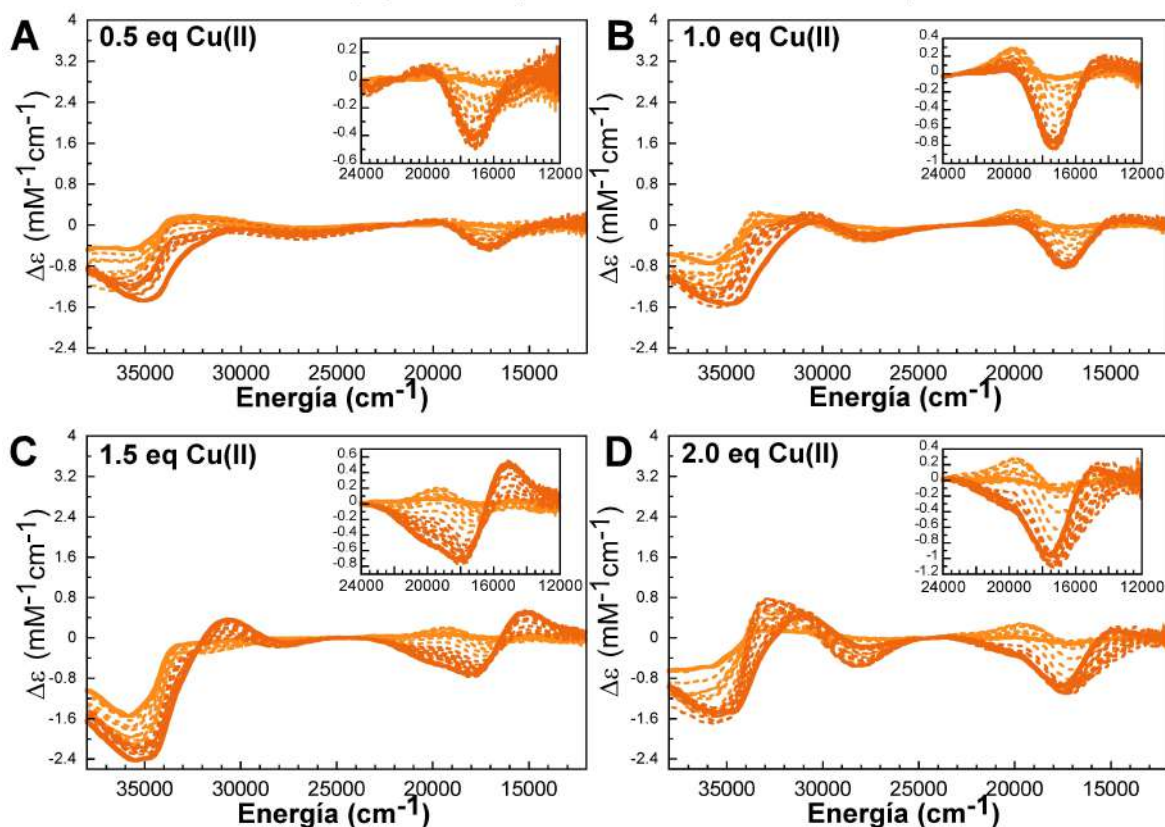


Figura 2.2.11. Espectros de CD del complejo Cu(II)-hPrP(92-115 M109I/M112I) obtenidos a partir de un barrido a diferentes condiciones de pH y a 0.5 A), 1.0 B), 1.5 C) y 2.0 D) equivalentes de Cu(II). La línea naranja clara corresponde a la condición de pH 5.5 y la línea naranja oscuro a pH 10.0, mientras que las líneas punteadas corresponden a los valores de pH intermedios. El recuadro a cada condición amplía la región de bandas de campo ligando (24 000 - 12 000 cm^{-1}).

Tabla 2.2.5 Valores de pK_a de los complejos Cu(II)-hPrP(92-115) y la doble variante Cu(II)-hPrP(92-115 M109I/M112I) a diferentes equivalentes de Cu(II).

Eq de Cu(II)	Valores de pK_a	
	Cu(II)-hPrP(92-115)	Cu(II)-hPrP(92-115 M109I/M112I)
0.5	7.70 ± 0.40	6.84 ± 0.08 & 8.10 ± 0.18
1.0	7.59 ± 0.05	6.12 ± 0.21 & 8.01 ± 0.38
1.5	6.23 ± 0.34 & 7.54 ± 0.04	6.52 ± 0.13 & 7.63 ± 0.16
2.0	5.84 ± 0.50 & 8.70 ± 0.90	6.87 ± 0.02 & 9.25 ± 0.14

Para la determinación de los valores de pK_a , se usaron las intensidades de señal a las energías: $16\,667\text{ cm}^{-1}$ y $14\,620\text{ cm}^{-1}$ para el complejo con 0.5 eq Cu(II); $17\,301\text{ cm}^{-1}$ y $33\,557$

cm^{-1} para 1.0 eq Cu(II); 15 060 cm^{-1} y 20 161 cm^{-1} para 1.5 eq Cu(II), y 27 933 cm^{-1} y 30 675 cm^{-1} para 2.0 eq Cu(II).

Como en el caso de la variante de M109I, los complejos con el péptido hPrP(92-115 M109I/M112I) presentaron dos equilibrios de protonación, independientemente de la concentración de Cu(II). A 1.0 eq Cu(II), el complejo Cu(II)-hPrP(92-115 M109I/M112I) mostró un comportamiento similar al de la variante sin Met109, Cu(II)-hPrP(92-115 M109I), y al del complejo base Cu(II)-hPrP(92-115) a 1.5 eq de Cu(II). Estas observaciones sugieren que los péptidos con la sustitución M109I tienen una tendencia a tener mayor porcentaje de Cu(II) unido al sitio de la His96.

A partir de los datos de las variantes de metioninas podemos concluir que: i) en todos los casos, hay dos sitios de coordinación por Cu(II); ii) el ambiente de coordinación alrededor del metal se alteró por la ausencia de alguna de las metioninas; iii) la presencia o ausencia de las metioninas, en conjunto con la relación Cu(II):péptido y el pH, influyen en el grado de ocupación del ion metálico a cada sitio de histidina del fragmento peptídico. Sin embargo, aun no sabemos si estas modificaciones en la secuencia cambiarían significativamente o no la esfera de coordinación del Cu(II) y si el modo de coordinación permanecerá como lo conocemos en el péptido base. Por tanto, procedimos a estudiar a los complejos por espectroscopia de EPR y determinar el modo de coordinación de las especies en las mismas condiciones de pH y concentración de Cu(II) utilizadas para estudiar el péptido base Cu(II)-hPrP(92-115).

En la Tabla 2.2.6 se listan los valores g_{\parallel} y A_{\parallel} que fueron determinados a partir de los espectros de EPR de los complejos Cu(II)-hPrP(92-115), Cu(II)-hPrP(92-115 M112I), Cu(II)-hPrP(92-115 M109I) y Cu(II)-hPrP(92-115 M109I/M112I) en las condiciones de 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 eq Cu(II), respectivamente, y a pH 6.5 y 8.5.

Tabla 2.2.6 Valores g_{\parallel} y A_{\parallel}^* de complejos Cu(II)-hPrP(92-115), Cu(II)-hPrP(92-115 M112I), Cu(II)-hPrP(92-115 M109I) y Cu(II)-hPrP(92-115 M109I/M112I) con 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 eq de Cu(II) a pH 6.5 y 8.5 Los modos de coordinación fueron determinados a partir de las correlaciones de Peisach-Blumberg.^{50, 51}

	0.5 eq de Cu(II)				1.0 eq de Cu(II)			
	pH 6.5		pH 8.5		pH 6.5		pH 8.5	
	g_{\parallel}	A_{\parallel}^*	g_{\parallel}	A_{\parallel}^*	g_{\parallel}	A_{\parallel}^*	g_{\parallel}	A_{\parallel}^*
Cu(II)-hPrP(92-115)	2.235	168	2.202	198	2.232	176	2.202	197
Cu(II)-hPrP(92-115 M112I)	2.227	186	2.216	194	2.231	181	2.209	195
Cu(II)-hPrP(92-115 M109I)	2.240	170	2.207	199	2.236	170	2.207	197
Cu(II)-hPrP(92-115 M109IM112I)	2.233	171	2.205	196	2.233	175	2.207	195
Modo de coordinación	3N10		4N		3N10		4N	
	1.5 eq de Cu(II)				2.0 eq de Cu(II)			
	pH 6.5		pH 8.5		pH 6.5		pH 8.5	
	g_{\parallel}	A_{\parallel}^*	g_{\parallel}	A_{\parallel}^*	g_{\parallel}	A_{\parallel}^*	g_{\parallel}	A_{\parallel}^*
Cu(II)-hPrP(92-115)	2.237	171	2.204	199	2.230	175	2.205	197
Cu(II)-hPrP(92-115 M112I)	2.232	174	2.211	193	2.237	168	2.210	190
Cu(II)-hPrP(92-115 M109I)	2.229	178	2.207	197	2.233	173	2.203	199
Cu(II)-hPrP(92-115 M109IM112I)	2.233	162	2.214	186	2.2304	179	2.211	195
Modo de coordinación	3N10		4N		3N10		4N	

* $\times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$

Se graficaron los valores g_{\parallel} y A_{\parallel} de cada uno de los complejos de las variantes de metioninas que se encuentran en la Tabla 2.2.6 y se compararon con el complejo base que tiene en su secuencia las dos metioninas. En todos los casos, los parámetros de EPR indican un modo de coordinación ecuatorial 3N10 a pH 6.5 en todas las condiciones de concentración de Cu(II). Asimismo, en la condición de pH 8.5, el modo de coordinación en todos los complejos es 4N.

En algunos casos, se observan pequeñas variaciones en los parámetros de los complejos de las variantes de metioninas, con respecto al del complejo Cu(II)-hPrP(92-115). Notoriamente, el efecto es más evidente a pH 6.5 sin importar el número de equivalentes de Cu(II), lo cual puede deberse a dos situaciones: 1) que el pH de trabajo es cercano a unos de los valores de pK_a del complejo (como en el caso del Cu(II)-(92-115 M109I/M112I); y 2) que a pH 6.5 la afinidad del cobre por el péptido puede disminuir por protonación parcial de la histidina. De hecho, resulta evidente la aparición de otro juego de señales en el espectro de EPR, que corresponden a Cu(II) en solución (juego de señales con asteriscos en la Figura 2.2.12).

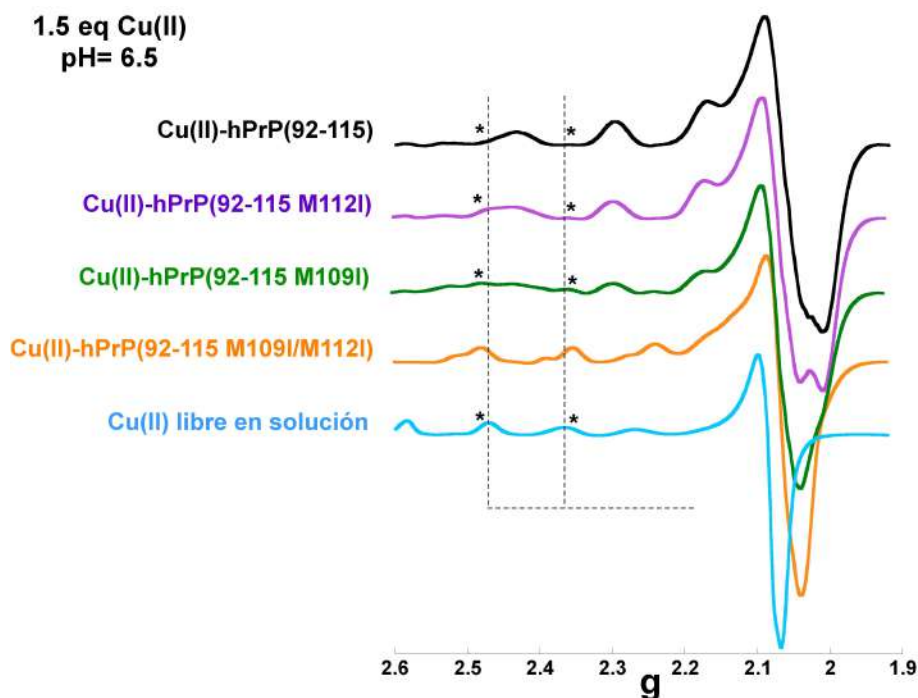


Figura 2.2.12. Comparación de los espectros de EPR de los complejos Cu(II)-hPrP(92-115) (negro), Cu(II)-hPrP(92-115 M112I) (morado), Cu(II)-hPrP(92-115 M109I) (verde) y Cu(II)-hPrP(92-115 M109I/M112I) (naranja) en la condición de 1.5 eq Cu(II) y pH 6.5 con el espectro de Cu(II) en solución (azul claro). Asteriscos y líneas verticales punteadas indican las señales asociadas a Cu(II) en solución.

En general, podemos concluir que la sustitución de las metioninas 109 y 112 por isoleucinas no afectó significativamente el equilibrio de protonación asociado a la conversión del modo de 3N1O a 4N. Estos resultados soportan la conclusión de que las cadenas laterales de las metioninas no participan en la coordinación ecuatorial de Cu(II) unido a hPrP(92-115).

Efecto de Met109 y 112 en los porcentajes de unión de Cu(II) a cada sitio: His96 e His111

Para evaluar el efecto de los residuos de metionina en los porcentajes de unión de Cu(II) a los sitios de His96 y 111, se aplicó la misma metodología, como en el caso del complejo Cu(II)-hPrP(92-115). La Figura 2.2.13 muestra los espectros de CD del complejo base Cu(II)-hPrP(92-115) y sus variantes de metionina Cu(II)-hPrP(92-115 M112I), Cu(II)-hPrP(92-115 M109I) y Cu(II)-hPrP(92-115 M109I/M112I), en la región de campo ligando (25 000 - 12 000 cm^{-1}), con 1.0 y 1.5 eq Cu(II) para pH 6.5 y 8.5. En cada recuadro se muestran los espectros de la complejos Cu(II)-hPrP(92-115 H111A) (correspondiente al complejo Cu(II)-H96, en azul)

y Cu(II)-hPrP(92-115 H96A) (correspondiente al complejo Cu(II)-H1111, en rojo), y el espectro resultante de la combinación lineal de éstos últimos, el cual refleja el porcentaje de ocupación de las histidinas indicado.

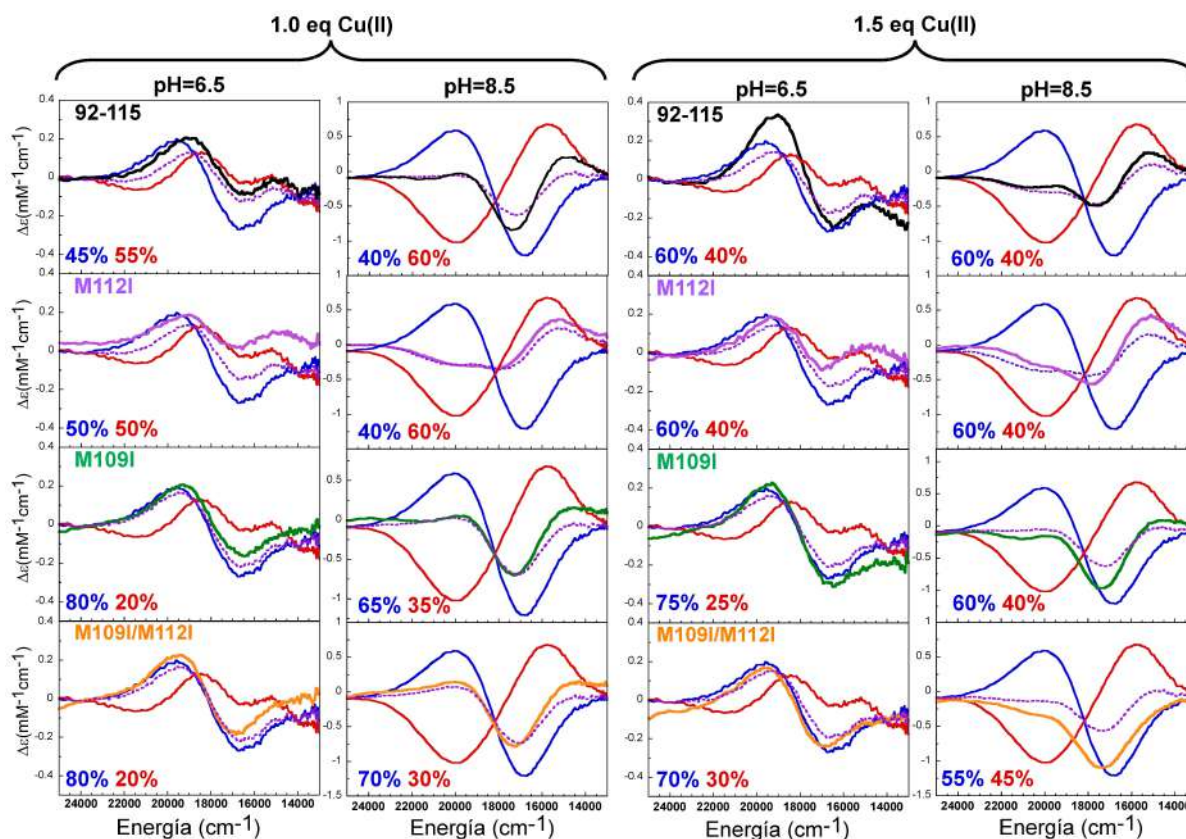


Figura 2.2.13. Comparación de los espectros de CD del complejo Cu(II)-hPrP(92-115) (línea negra), Cu(II)-hPrP(92-115 M112I) (línea morada continua), Cu(II)-hPrP(92-115 M109I) (línea verde) y Cu(II)-hPrP(92-115 M109I/M112I) (línea naranja) con los complejos Cu(II)-hPrP(92-115 H111A) (línea azul) y Cu(II)-hPrP(92-115 H96A) (línea roja) con 1.0 y 1.5 eq Cu(II) y a pH 6.5 y 8.5 y la combinación lineal (línea morada punteada) en cada caso. Los porcentajes listados en cada condición, significan la ocupación de Cu(II) en cada sitio de unión, His96 (letras azules) e His111 (letras rojas).

En la Tabla 2.2.7., se presentan los porcentajes de ocupación de Cu(II) a cada sitio de His96 y 111, a todas las relaciones Cu(II):péptido y valores de pH estudiados. Claramente, algunas sustituciones de los residuos de metionina ocasionan cambios en la proporción de unión de Cu(II) a cada sitio, como se discute a continuación.

Tabla 2.2.7 Porcentajes de Cu(II) unido a los sitios de His96 e His111 en los complejos Cu(II)-hPrP(92-115), Cu(II)-hPrP(92-115 M112I), Cu(II)-hPrP(92-115 M109I) y Cu(II)-hPrP(92-115 M109I/M112I) a 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 eq Cu(II) y pH 6.5 y 8.5.

Porcentaje de Cu(II) unido a H96 y H111									
Complejos	0.5 eq Cu(II)		1.0 eq Cu(II)		1.5 eq Cu(II)		2.0 eq Cu(II)		
	pH 6.5	pH 8.5	pH 6.5	pH 8.5	pH 6.5	pH 8.5	pH 6.5	pH 8.5	
	H96:H111	H96:H111	H96:H111	H96:H111	H96:H111	H96:H111	H96:H111	H96:H111	
	%	%	%	%	%	%	%	%	
hPrP(92-115)	40:60	40:60	45:55	40:60	60:40	60:40	50:50	50:50	
M112I	40:60	40:60	50:50	40:60	60:40	60:40	65:35	50:50	
M109I	80:20	70:30	80:20	65:35	75:25	60:40	70:30	50:50	
M109I/M112I	70:30	65:35	80:20	70:30	70:30	55:45	80:20	50:50	

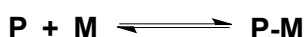
La sustitución de metionina 112 por isoleucina, prácticamente no tiene efecto alguno en las proporciones de Cu(II) unido a cada histidina, excepto a pH 6.5 con 2.0 eq Cu(II), donde se favorece la unión de Cu(II) a la His96. Sin embargo, en estas condiciones se observó por EPR la presencia de cobre en solución para todas las variantes, lo cual refleja un decremento de afinidad y explica el hecho de que a pH 6.5 no se observe la relación 50:50 que se esperaría al llenarse los dos sitios por completo con 2.0 eq Cu(II). En contraste, las sustituciones de M109I y la doble sustitución M109I/M112I, indujeron cambios notorios en la ocupación relativa de los sitios de His96 e His111, independientemente del pH y en todas las condiciones sub-estequiométricas (es decir, a 0.5, 1.0 y 1.5 eq Cu(II)). Es claro que la sustitución M109I induce una mayor ocupación del sitio de la His96 a todas las condiciones de eq de Cu(II) y valor de pH.

Estos resultados sugieren que la afinidad de Cu(II) por el sitio de la His111 es afectada por la ausencia de la M109, ocasionando un drástico desplazamiento hacia la ocupación de His96. Por tanto, podemos concluir que la M109, aunque no se coordine directamente al Cu(II), juega un papel importante en la afinidad relativa por el sitio de la His111.

Efecto de la unión de Cu(II) en la afinidad a hPrP(92-115)

En colaboración con el Dr. Aarón Rojas Aguilar y el estudiante Octavio Cruz Vásquez del Departamento de Química del Cinvestav, se hicieron estudios por Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC) para determinar la afinidad relativa de unión de Cu(II) a los péptidos hPrP(92-115) y sus variantes de histidinas y metioninas en la condición de pH 8.5.

A partir de este estudio se determinó la entalpía de reacción (Δ_rH) y la constante de asociación, K_a para el proceso:



Donde M es Cu(II); P corresponde a cualquiera de las variantes del fragmento hPrP(92-115); y P-M es el complejo de asociación entre el péptido correspondiente y el Cu(II). Para todos los casos la determinación de la K_a , es una medida directa de la afinidad por Cu(II).

Para los complejos Cu(II)-hPrP(92-115 H96A) y Cu(II)-hPrP(92-115 H111A), los datos termodinámicos se ajustaron a un modelo que asumía un solo sitio de unión a Cu(II). El valor de K_a para el complejo de Cu(II)-hPrP(92-115 H96A) fue $2.22 \pm 0.29 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ($\Delta_rH = -18.42 \pm 0.46 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, $n = 0.87 \pm 0.04$) mientras que para el complejo Cu(II)-hPrP(92-115 H111A) fue de $1.26 \pm 0.21 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ($\Delta_rH = -19.42 \pm 0.67 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, $n = 0.96 \pm 0.12$). Estos datos indican que el Cu(II) tiene preferencia por el sitio de His111. Por otro lado, los datos de los complejos con péptidos que contienen dos sitios de histidinas fueron ajustados usando un modelo que asume dos sitios independientes. Para el complejo base Cu(II)-hPrP(92-115), se obtuvo una K_a de $2.33 \pm 0.29 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ($\Delta_rH = -19.92 \pm 1.22 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, $n = 1.64 \pm 0.16$) reflejando un valor similar al obtenido para el sitio de la His111 en el complejo Cu(II)-hPrP(92-115 H96A). La sustitución M112I no parece tener un efecto en la afinidad por Cu(II), ya que el complejo Cu(II)-hPrP(92-115 M112I) presentó una K_a de $2.37 \pm 0.22 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ($\Delta_rH = -19.76 \pm 1.55 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, $n = 1.47 \pm 0.08$). En contraste, la sustitución M109I causa un decremento significativo en la afinidad de Cu(II) por el péptido, ya que el complejo Cu(II)-hPrP(92-115 M109I) presentó una K_a de $1.35 \pm 0.19 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ($\Delta_rH = -18.55 \pm 1.01 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, $n = 1.51 \pm 0.15$), mientras que el complejo sin metioninas Cu(II)-hPrP(92-115 M109I/M112I) tiene una K_a de $1.09 \pm 0.08 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ($\Delta_rH = -17.14 \pm 1.13 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, $n = 1.54 \pm 0.12$). Por tanto, podemos concluir que la ausencia de la Met109 causa un decremento en la afinidad relativa

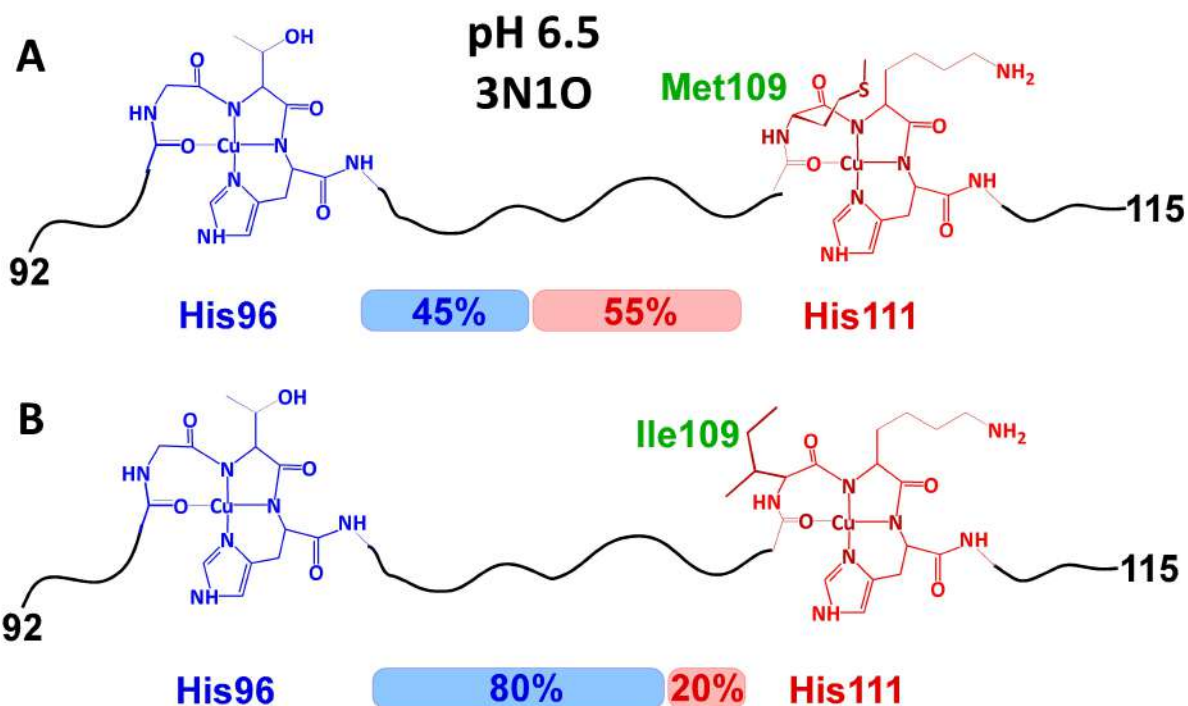
de Cu(II) por el sitio de la His111. El efecto es más pronunciado en el complejo de la variante Cu(II)-hPrP(92-115 M109I/M112I). Estos resultados son consistentes con lo observado por espectroscopia de CD, respecto al efecto de la sustitución M109I en la proporción relativa de ocupación de los sitios de His96 e His111.

Discusión y Conclusiones

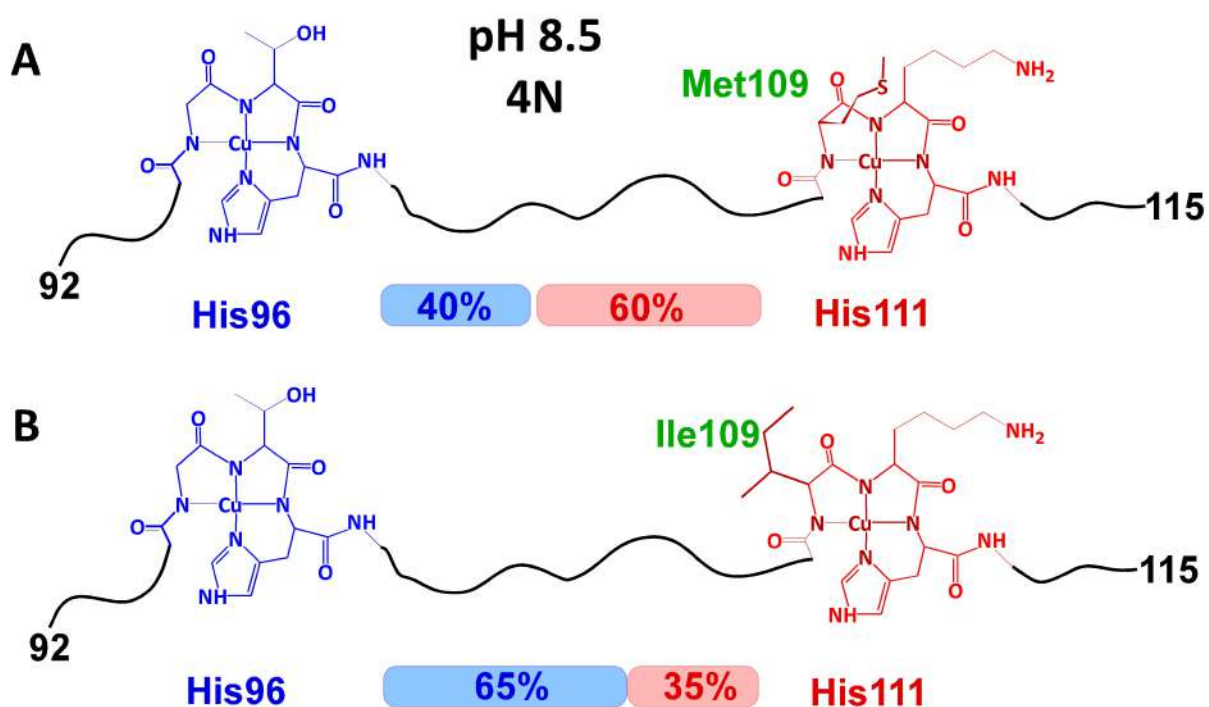
En este capítulo se ha elucidado la coordinación de Cu(II) a un fragmento de la proteína prion, hPrP(92-115), que incluye dos sitios de coordinación en su secuencia y el papel que juegan los residuos de metioninas en la formación del complejo de coordinación.

Los resultados demuestran que los sitios de coordinación a Cu(II) en el fragmento hPrP(92-115) son los mismos que los observados para los complejos individuales. Es decir, en ambos sitios, His96 e His111, se observa una dependencia con el pH, de tal forma que a pH fisiológico se tiene una mezcla de especies 3N1O y 4N. La unión del Cu(II) a este fragmento comienza con el anclaje del ion metálico al nitrógeno del imidazol del residuo de His96 o His111 de manera independiente. La esfera de coordinación en cada sitio se completa con la desprotonación y coordinación de nitrógenos de amida de la cadena peptídica. Sin embargo, pese a que los modos de coordinación ecuatorial son idénticos, la afinidad de Cu(II) por cada sitio es diferente.

Dado que la unión de Cu(II) a los dos sitios de His96 e His111 exhibe características espectroscópicas distintas (signos opuestos) en sus señales de CD, se aprovechó esta distinción para discernir la ocupación de cada sitio por Cu(II). Usando las variantes de histidina, Cu(II)-hPrP(92-115 H96A) y Cu(II)-hPrP(92-115 H111A) para modelar los dos sitios, encontramos que el sitio de la His111 presenta una afinidad más alta que el sitio de la His96. Además, nuestros datos indican que la Met109 juega un papel importante en la afinidad de unión por His111. Los esquemas 2.3.1 y 2.3.2 representan el porcentaje de unión de Cu(II) a las histidinas 96 y 111 en presencia y ausencia de la metionina 109 y sus modos de coordinación 3N1O a pH 6.5 y 4N a pH 8.5



Esquema 2.3.1. Representación esquemática del porcentaje de unión de Cu(II) a los sitios de His96 y 111 en presencia (A) y ausencia (B) de la Met109, a pH 6.5 y 1.0 eq Cu(II) favoreciendo el modo de coordinación 3N1O en el complejo hPrP(92-115). La línea continua negra representa los aminoácidos de la cadena peptídica.



Esquema 2.3.2. Representación esquemática del porcentaje de unión de Cu(II) a los sitios de His96 y 111 en presencia (A) y ausencia (B) de la Met109, a pH 8.5 y 1.0 eq Cu(II) favoreciendo el modo de coordinación 4N en el complejo hPrP(92-115). La línea continua negra representa los aminoácidos de la cadena peptídica.

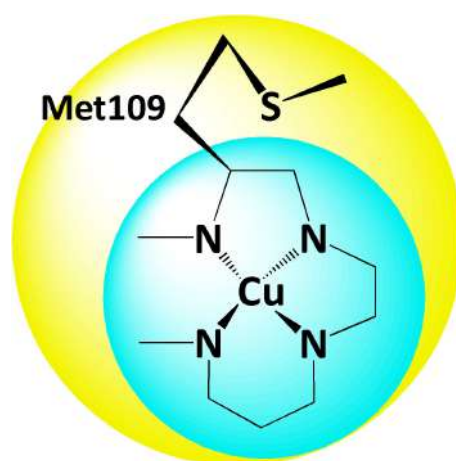
La coordinación del ion Cu(II) a la proteína prion ha sido bastante explorada, siendo la región del octarepeat la más estudiada y la que mayor variación presenta en función de la concentración de Cu(II).¹⁸ Inicialmente la región del octarepeat fue considerada como el único sitio de unión a Cu(II) y el de más alta afinidad.¹⁶ Sin embargo, en los últimos años el llamado “quinto sitio”, que incluye a la His96 y 111, ha llegado a ser importante debido a que exhibe una afinidad incluso mayor que aquella del octarepeat.^{17, 32, 35, 43} Muchos autores han propuesto a la His96 e His111 como sitios independientes de coordinación a Cu(II).^{15, 32, 33, 36, 38-41} En este estudio nosotros corroboramos que estos sitios son independientes y que la ocupación de Cu(II) en ambos sitios ocurre de manera simultánea. De hecho, no observamos evidencia de la formación de algún complejo bis-histidina.

Este estudio también demostró que, aunque son sitios de unión independientes, existe cierta cooperatividad en la unión del ion cobre a los sitios de His96 e His111. Es decir, la afinidad relativa de Cu(II) por His96 depende de la ocupación del sitio de la His111. Esto posiblemente se deba a que la coordinación de Cu(II) al sitio de la His111 puede impactar la conformación del péptido de tal manera que afecta la unión de Cu(II) a la His96.

El papel de las metioninas 109 y 112 en la unión de Cu(II) a hPrP(92-115), también fue evaluado, y se observó que los modos de coordinación 3N1O y 4N que se forman en cada sitio, no se ven afectados por estos residuos. Las únicas diferencias observadas en los espectros de CD de los complejos de cobre con las variantes de metionina se deben a los cambios en la ocupación relativa de los dos sitios. Específicamente, la sustitución Met109I ocasiona una pérdida de afinidad por Cu(II) del sitio de la His111, la cual fue corroborada por los estudios de ITC. De este estudio se desprende que la M109 juega un papel clave en la afinidad por el sitio de His111.

Se ha sugerido que la M109 pudiera jugar un papel como un ligando axial al ion metálico Cu(II) o como parte de una segunda esfera de coordinación. Estudios por cálculos de estructura electrónica del sitio de His111 han demostrado la cercanía del grupo tioéter de la M109 al centro metálico a una distancia $\sim 4.7 \text{ \AA}$.²⁷ Sin embargo, estudios más recientes confirmaron por espectroscopia de absorción de rayos-X que no hay participación de grupos tioéter en la coordinación de Cu(II) en el fragmento hPrP(106-115)²⁸ que incluye a la His111 y a los residuos de metionina, concluyendo que la M109 no es un ligante axial para Cu(II).

Así, el efecto de la Met109 en la afinidad de Cu(II) por His111 podría deberse a efectos de segunda esfera de coordinación, la cual a su vez dependería de la disposición de los ligantes en la primera esfera de coordinación del metal.⁵² (Esquema 2.3.3) Es probable que el grupo tioéter de la Met109 contribuya a formar una red de solvatación con moléculas de agua que ayudará a estabilizar al complejo. Un ejemplo de este comportamiento lo exhibe precisamente el fragmento del octarepeat HGGGW unido a Cu(II), cuya estructura cristalina demuestra que el triptófano, aunque no está coordinado directamente al Cu(II), forma un puente de hidrógeno con la molécula de agua que está coordinada en posición axial al centro metálico; esa red de puentes de hidrógeno ayuda a estabilizar al complejo.¹⁹



Esquema 2.3.3. Representación esquemática de las esferas de coordinación del Cu(II). En azul se presenta la primera esfera de coordinación con los 4N unidos a Cu(II); en amarillo se presenta la propuesta de la segunda esfera de coordinación involucrando al residuo de Met109.

El estudio del fragmento que incluye a los dos sitios de histidinas, hPrP(92-115), llega a ser relevante debido a que forma parte de uno de los dos fragmentos que se liberan después de un corte proteolítico que sufre la hPrP, llamado “corte β -proteolítico”. Se ha propuesto que este corte se debe a la acción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en presencia del ion Cu(II) y que es parte de un mecanismo de la proteína prion para proteger a la célula de daño por estrés oxidativo.^{47, 53, 54} Este corte proteolítico en la PrP humana libera a los fragmentos N2 y C2, los cuales comprenden los residuos del 23-89 y 90-231, respectivamente.^{9, 46} Los residuos 92-115 de la proteína prion quedan justo al inicio del fragmento C2, por lo que

His96 e His111 serían los únicos sitios de anclaje para Cu(II) en el extremo N-terminal de la proteína truncada.

Tabla 2.3.1 Alineamientos de secuencia de la proteína prion de diferentes especies en el fragmento 92-115. En amarillo se resaltan los residuos de metioninas 109 y 112.

Especie	Secuencia
Humano	GGGTHSQWN KPSKPKTN M KH M AGA
Ratón	GGTHNQWN KPSKPKTN L KH V AGA
Rata	GGTHNQWN KPSKPKTN L KH V AGA
Oveja	GG SHSRWN KPSKPKTN M KH V AGA
Cabra	GG SHSQWN KPSKPKTN M KH V AGA
Bovino	GG THGQWN KPSKPKTN M KH V AGA
Cerdo	GGSHGQWN KPSKPKTN M KH M AGA
Jirafa	GG THGQWN KPSKPKTN M KH M AGA
Conejo	GGTHNQWG KPSKPKTS M KH V AGA

La Tabla 2.3.1 compara alineamientos de secuencias del fragmento 92-115 para diferentes mamíferos. A partir de este alineamiento de secuencias, es claro que la Met112 no está conservada, mientras que la Met109 presenta variaciones sólo en los roedores. De hecho, el residuo de Met109 está altamente conservado entre las proteínas prion de mamíferos, con excepción del ratón.⁵⁵ Se ha propuesto entonces, que este residuo puede ser crucial para la actividad biológica de la proteína prion o en las enfermedades priónicas. De hecho, se ha reportado que los residuos de metioninas 109 y 112 podrían influir en la conversión de PrP^C a PrP^{Sc}.⁵⁶

El sitio de His111 en roedores no contiene metioninas. Dado que la preferencia de unión al sitio de la His111 fue dirigida en gran medida por la presencia de la Met109 en el fragmento de PrP humana, es de esperarse que la ausencia de este residuo en la secuencia de los roedores favorezca la unión del metal en el sitio de His96 (His95 en la secuencia de roedor), lo cual es consistente a un estudio con la proteína prion de roedor.¹⁷

La habilidad de hPrP a coordinar tanto Cu(II) como Cu(I) es una importante característica para cualquier actividad redox. Estudios por RMN^{57, 58} y por absorción de rayos-X³⁰ sugieren que en el fragmento 91-124, el Cu(I) se une a las dos histidinas, His96 e His111, y a los residuos de Met109 y Met112. También se ha demostrado que el potencial de reducción de estos complejos disminuye cuando se remueven la M109 o Met112.^{30, 59} Más aún,

recientemente Arcos-López y colaboradores reportaron la unión de Cu(I) a este sitio como altamente dependiente de pH, con la participación de los residuos de metioninas en el motivo MKHM que permite a PrP mantener Cu(I) anclado al sitio.²⁸ Adicionalmente, estos residuos de metioninas llegan a ser importantes debido a que pueden actuar como una defensa antioxidante en la PrP sacrificándose selectivamente por oxidación.²⁸ A la luz de este estudio, y los resultados encontrados en este trabajo, podemos concluir que la Met109 es un residuo crucial en la actividad fisiológica de la PrP^C, y particularmente en el transporte de cobre. Cuando la PrP^C se encuentra en el espacio extracelular, la Met109 asegura la preferencia del Cu(II) para unirse al sitio de la His111, mientras que, cuando la PrP^C sufre endocitosis y llega a un ambiente reductor y rico en protones, la Met109 en conjunto con la Met112, asegura la estabilización del Cu(I).

Perspectivas

En este trabajo se ha elucidado la coordinación de Cu(II) al fragmento 92-115 de la PrP^C humana, y hemos determinado que la Met109 juega un papel clave en la afinidad de Cu(II) por el sitio de la His111. Estudiar la coordinación del ión Cu(II) a un fragmento más largo que incluya a los dos sitios de His96 y 111, como el fragmento 90-126, permitirá evaluar el impacto de la unión de cobre a estos residuos en la agregación amiloide de dicho fragmento. Los residuos hidrofóbicos que siguen en la secuencia a los sitios de His96 y 111 están asociados a la conversión de la PrP^C a PrP^{Sc}. Sería interesante, entonces, entender cómo la distribución de Cu(II) en estos sitios pudiera impactar las propiedades amiloidogénicas y de agregación de la proteína.

Por otro lado, la evaluación de la actividad redox de los dos sitios de unión a Cu(II), como ya se hizo en el caso del fragmento corto que considera sólo un sitio de unión hPrP(106-115), lo cual ayudaría a comprender el papel del ion metálico en las propiedades de oxidación de la proteína cuando están presentes los dos sitios, y mas aún, en la participación del metal como mediador en la escisión proteolítica que sufre PrP^C en esta región.

Estos estudios ayudarán a responder algunas incógnitas acerca de las características funcionales y/o patológicas de la proteína prion, y entender la química bioinorgánica detrás de la interacción Cu(II)-Proteína Prion.

Referencias

1. Prusiner, S. B. Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 13363-13383.
2. Prusiner, S. B. Neurodegenerative Diseases and Prions. *N. Engl. J. Med.* **2001**, 344, 1516-1526.
3. Imran, M.; Mahmood, S. An overview of animal prion diseases. *Viol. J.* **2011**, 8, 493-501.
4. Zahn, R.; Liu, A.; Lührs, T.; Riek, R.; Schroetter, C. v.; García, F. L.; Billeter, M.; Calzolari, L.; Wider, G.; Wüthrich, K. NMR solution structure of the human prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 145-150.
5. Haire, L. F.; Whyte, S. M.; Vasisht, N.; Gill, A. C.; Verma, C.; Dodson, E. J.; Dodson, G. G.; Bayley, P. M. The crystal structure of the globular domain of sheep prion protein. *Journal of molecular biology* **2004**, 336, 1175-1183.
6. Donne, D. G.; Viles, J. H.; Groth, D.; Mehlhorn, I.; James, T. L.; Cohen, F. E.; Prusiner, S. B.; Wright, P. E.; Dyson, H. J. Structure of the recombinant full-length hamster prion protein PrP(29–231): The N terminus is highly flexible. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 13452-13457.
7. Uchiyama, K.; Muramatsu, N.; Yano, M.; Usui, T.; Miyata, H.; Sakaguchi, S. Prions disturb post-Golgi trafficking of membrane proteins. *Nat. Commun.* **2013**, 4, 1846-1859.
8. Linden, R.; Martins, V. R.; Prado, M. A. M.; Cammarota, M.; Izquierdo, I.; Brentani, R. R. Physiology of the Prion Protein. *Physiol. Rev.* **2008**, 88, 673-728.
9. Liang, J.; Kong, Q. alpha-Cleavage of cellular prion protein. *Prion* **2012**, 6, 453-460.
10. Brown, D. R.; Qin, K.; Herms, J. W.; Madlung, A.; Manson, J.; Strome, R.; Fraser, P. E.; Kruck, T.; Bohlen, A. v.; Schulz-Schaeffer, W.; Giese, A.; Westaway, D.; Kretzschmar, H. The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature* **1997**, 390, 684-687.
11. Millhauser, G. L. Copper and the Prion Protein: Methods, Structures, Function, and Disease. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2007**, 58, 299-320.
12. Nadal, R. C.; Abdelraheim, S. R.; Brazier, M. W.; Rigby, S. E.; Brown, D. R.; Viles, J. H. Prion protein does not redox-silence Cu²⁺, but is a sacrificial quencher of hydroxyl radicals. *Free radical biology & medicine* **2007**, 42, 79-89.
13. Lehmann, S. Metals ions and prion diseases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, 6, 187-192.
14. Walter, E. D.; Stevens, D. J.; Visconte, M. P.; Millhauser, G. L. The prion protein is a combined zinc and copper binding protein: Zn²⁺ alters the distribution of Cu²⁺ coordination modes. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 15440-15441.
15. Jones, C. E.; Klewpatinond, M.; Abdelraheim, S. R.; Brown, D. R.; Viles, J. H. Probing copper²⁺ binding to the prion protein using diamagnetic nickel²⁺ and ¹H NMR: the unstructured N terminus facilitates the coordination of six copper²⁺ ions at physiological concentrations. *Journal of molecular biology* **2005**, 346, 1393-1407.
16. Thompsett, A. R.; Abdelraheim, S. R.; Daniels, M.; Brown, D. R. High affinity binding between copper and full-length prion protein identified by two different techniques. *The Journal of biological chemistry* **2005**, 280, 42750-42758.
17. Klewpatinond, M.; Davies, P.; Bowen, S.; Brown, D. R.; Viles, J. H. Deconvoluting the Cu²⁺ binding modes of full-length prion protein. *The Journal of biological chemistry* **2008**, 283, 1870-1881.
18. Chattopadhyay, M.; Walter, E. D.; Newell, D. J.; Jackson, P. J.; Aronoff-Spencer, E.; Peisach, J.; Gerfen, G. J.; Bennett, B.; Antholine, W. E.; Millhauser, G. L. The Octarepeat Domain of the Prion Protein Binds Cu(II) with Three Distinct Coordination Modes at pH 7.4. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 12647-12656.
19. Burns, C. S.; Aronoff-Spencer, E.; Dunham, C. M.; Lario, P.; Avdievich, N. I.; Antholine, W. E.; Olmstead, M. M.; Vrielink, A.; Gerfen, G. J.; Peisach, J.; Scott, W. G.; Millhauser, G. L. Molecular Features of the Copper Binding Sites in the Octarepeat Domain of the Prion Protein. *Biochemistry* **2002**, 41, 3991-4001.
20. Aronoff-Spencer, E.; Burns, C. S.; Avdievich, N. I.; Gerfen, G. J.; Peisach, J.; Antholine, W. E.; Ball, H. L.; Cohen, F. E.; Prusiner, S. B.; Millhauser, G. L. Identification of the Cu²⁺ Binding Sites in the N-Terminal Domain of the Prion Protein by EPR and CD Spectroscopy. *Biochemistry* **2000**, 39, 13760-13771.
21. Barry, S. D.; Rickard, G. A.; Pushie, M. J.; Rauk, A. The affinity of HGGG, GHGG, GGHG, and GGGH peptides for copper(II) and the structures of their complexes — An ab initio study. *Can. J. Chem.* **2009**, 87, 942-953.
22. Pandey, K. K.; Snyder, J. P.; Liotta, D. C.; Musaev, D. G. Computational Studies of Transition Metal Selectivity of Octapeptide Repeat Region of Prion Protein (PrP). *J. Phys. Chem. B* **2010**, 114, 1127-1135.
23. Hureau, C.; Charlet, L.; Dorlet, P.; Gonnet, F.; Spadini, L.; Anxolabéhère-Mallart, E.; Girerd, J. J. A spectroscopic and voltammetric study of the pH-dependent Cu(II) coordination to the peptide GGGTH:

relevance to the fifth Cu(II) site in the prion protein. *Journal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry* **2006**, 11, 735-744.

24. Hureau, C.; Mathé, C.; Faller, P.; Mattioli, T. A.; Dorlet, P. Folding of the prion peptide GGGTHSQW around the copper(II) ion: identifying the oxygen donor ligand at neutral pH and probing the proximity of the tryptophan residue to the copper ion. *Journal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry* **2008**, 13, 1055-1064.

25. Grande-Aztatzi, R.; Rivillas-Acevedo, L.; Quintanar, L.; Vela, A. Structural models for Cu(II) bound to the fragment 92-96 of the human prion protein. *J. Phys. Chem. B* **2013**, 117, 789-799.

26. Burns, C. S.; Aronoff-Spencer, E.; Legname, G.; Prusiner, S. B.; Antholine, W. E.; Gerfen, G. J.; Peisach, J.; Millhauser, G. L. Copper Coordination in the Full-Length, Recombinant Prion Protein. *Biochemistry* **2003**, 42, 6794-6803.

27. Rivillas-Acevedo, L.; Grande-Aztatzi, R.; Lomelí, I.; García, J. E.; Barrios, E.; Teloxa, S.; Vela, A.; Quintanar, L. Spectroscopic and electronic structure studies of copper(II) binding to His111 in the human prion protein fragment 106-115: evaluating the role of protons and methionine residues. *Inorganic chemistry* **2011**, 50, 1956-1972.

28. Arcos-López, T.; Qayyum, M.; Rivillas-Acevedo, L.; Miotto, M. C.; Grande-Aztatzi, R.; Fernández, C. O.; Hedman, B.; Hodgson, K. O.; Vela, A.; Solomon, E. I.; Quintanar, L. Spectroscopic and Theoretical Study of Cu(II) Binding to His111 in the Human Prion Protein Fragment 106-115. *Inorganic chemistry* **2016**, 55, 2909-2922.

29. Jobling, M. F.; Huang, X.; Stewart, L. R.; Barnham, K. J.; Curtain, C.; Volitakis, I.; Perugini, M.; White, A. R.; Cherny, R. A.; Masters, C. L.; Barrow, C. J.; Collins, S. J.; Bush, A. I.; Cappai, R. Copper and Zinc Binding Modulates the Aggregation and Neurotoxic Properties of the Prion Peptide PrP106-126. *Biochemistry* **2001**, 40, 8073-8084.

30. Shearer, J.; Soh, P. The Copper(II) adduct of the unstructured region of the amyloidogenic fragment derived from the human prion protein is redox-active at physiological pH. *Inorganic chemistry* **2007**, 46, 710-719.

31. Remelli, M.; Valensin, D.; Toso, L.; Gralka, E.; Guerrini, R.; Marzola, E.; Kozłowski, H. Thermodynamic and spectroscopic investigation on the role of Met residues in Cu(II) binding to the non-octarepeat site of the human prion protein. *Metallomics : integrated biometal science* **2012**, 4, 794-806.

32. Osz, K.; Nagy, Z.; Pappalardo, G.; Di Natale, G.; Sanna, D.; Micera, G.; Rizzarelli, E.; Sóvágó, I. Copper(II) interaction with prion peptide fragments encompassing histidine residues within and outside the octarepeat domain: speciation, stability constants and binding details. *Chemistry* **2007**, 13, 7129-7143.

33. Remelli, M.; Valensin, D.; Bacco, D.; Gralka, E.; Guerrini, R.; Migliorini, C.; Kozłowski, H. The complex-formation behaviour of His residues in the fifth Cu²⁺ binding site of human prion protein: a close look. *New Journal of Chemistry* **2009**, 33, 2300-2310.

34. DiNatale, G.; Ösz, K.; Nagy, Z.; Sanna, D.; Micera, G.; Pappalardo, G.; Sóvágó, I.; Rizzarelli, E. Interaction of Copper(II) with the Prion Peptide Fragment HuPrP(76-114) Encompassing Four Histidyl Residues within and outside the Octarepeat Domain. *Inorganic chemistry* **2009**, 48, 4239-4250.

35. Nadal, R. C.; Davies, P.; Brown, D. R.; Viles, J. H. Evaluation of copper²⁺ affinities for the prion protein. *Biochemistry* **2009**, 48, 8929-8931.

36. Walter, E. D.; Stevens, D. J.; Spevacek, A. R.; Visconte, M. P.; Rossi, A. D.; Millhauser, G. L. Copper Binding Extrinsic to the Octarepeat Region in the Prion Protein. *Current Protein and Peptide Science* **2009**, 10, 529-535.

37. Jones, C. E.; Abdelraheim, S. R.; Brown, D. R.; Viles, J. H. Preferential Cu²⁺ coordination by His96 and His111 induces beta-sheet formation in the unstructured amyloidogenic region of the prion protein. *The Journal of biological chemistry* **2004**, 279, 32018-32027.

38. Wells, M. A.; Jelinska, C.; Hosszu, L. L.; Craven, C. J.; Clarke, A. R.; Collinge, J.; Waltho, J. P.; Jackson, G. S. Multiple forms of copper (II) co-ordination occur throughout the disordered N-terminal region of the prion protein at pH 7.4. *The Biochemical journal* **2006**, 400, 501-510.

39. Berti, F.; Gaggelli, E.; Guerrini, R.; Janicka, A.; Kozłowski, H.; Legowska, A.; Miecznikowska, H.; Migliorini, C.; Pogni, R.; Remelli, M.; Rolka, K.; Valensin, D.; Valensin, G. Structural and dynamic characterization of copper(II) binding of the human prion protein outside the octarepeat region. *Chem. Eur.J.* **2007**, 13, 1991-2001.

40. Klewpatinond, M.; Viles, J. H. Fragment length influences affinity for Cu²⁺ and Ni²⁺ binding to His96 or His111 of the prion protein and spectroscopic evidence for a multiple histidine binding only at low pH. *The Biochemical journal* **2007**, 404, 393-402.

41. Younan, N. D.; Klewpatinond, M.; Davies, P.; Ruban, A. V.; Brown, D. R.; Viles, J. H. Copper(II)-induced secondary structure changes and reduced folding stability of the prion protein. *Journal of molecular biology* **2011**, *410*, 369-382.
42. Davies, P.; McHugh, P. C.; Hammond, V. J.; Marken, F.; Brown, D. R. Contribution of individual histidines to prion protein copper binding. *Biochemistry* **2011**, *50*, 10781-10791.
43. Stanyon, H. F.; Patel, K.; Begum, N.; Viles, J. H. Copper(II) sequentially loads onto the N-terminal amino group of the cellular prion protein before the individual octarepeats. *Biochemistry* **2014**, *53*, 3934-3939.
44. Di Natale, G.; Turi, I.; Pappalardo, G.; Sóvágó, I.; Rizzarelli, E. Cross-Talk Between the Octarepeat Domain and the Fifth Binding Site of Prion Protein Driven by the Interaction of Copper(II) with the N-terminus. *Chemistry* **2015**, *21*, 4071-4084.
45. Pauly, P. C.; Harris, D. A. Copper stimulates endocytosis of the prion protein. *The Journal of biological chemistry* **1998**, *273*, 33107-33110.
46. Mangé, A.; Béranger, F.; Peoc'h, K.; Onodera, T.; Frobert, Y.; Lehmann, S. Alpha- and beta- cleavages of the amino-terminus of the cellular prion protein. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* **2004**, *96*, 125-132.
47. Haigh, C. L.; Marom, S. Y.; Collins, S. J. Copper, endoproteolytic processing of the prion protein and cell signalling. *Front. Biosci.* **2010**, *15*, 1086-1104.
48. McDonald, A. J.; Dibble, J. P.; Evans, E. G. B.; Millhauser, G. L. A New Paradigm for Enzymatic Control of alpha-Cleavage and beta-Cleavage of the Prion Protein. *The Journal of biological chemistry* **2013**, *289*, 803-813.
49. Hanson, G.; Berliner, L. *High Resolution EPR. Applications to metalloenzymes and metals in medicine*. 2009; Vol. 28.
50. Peisach, J.; Blumberg, W. E. Structural implications derived from the analysis of electron paramagnetic resonance spectra of natural and artificial copper proteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1974**, *165*, 691-708.
51. Sakaguchi, U.; Addison, A. W. Spectroscopic and redox studies of some copper(II) complexes with biomimetic donor atoms: implications for protein copper centres. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1979**, 600-608.
52. Raikhshtat, M. M.; Zhogina, V. V. Energetics of the first and second coordination spheres of transition metal ions. *J. Struct. Chem.* **1995**, *36*, 333-337.
53. McMahan, H. E.; Mangé, A.; Nishida, N.; Créminon, C.; Casanova, D.; Lehmann, S. Cleavage of the amino terminus of the prion protein by reactive oxygen species. *The Journal of biological chemistry* **2001**, *276*, 2286-2291.
54. Watt, N. T.; Taylor, D. R.; Gillott, A.; Thomas, D. A.; Perera, W. S.; Hooper, N. M. Reactive oxygen species-mediated beta-cleavage of the prion protein in the cellular response to oxidative stress. *The Journal of biological chemistry* **2005**, *280*, 35914-35921.
55. Wopfner, F.; Weidenhöfer, G.; Schneider, R.; Brunn, A. v.; Gilch, S.; Schwarz, T. F.; Werner, T.; Schätzl, H. M. Analysis of 27 Mammalian and 9 Avian PrPs Reveals High Conservation of Flexible Regions of the Prion Protein. *Journal of molecular biology* **1999**, *289*, 1163-1178.
56. Moore, R.-A.; Vorberg, I.; Priola, S.-A. Species barriers in prion diseases-brief review. *Arch. Virol. Suppl.* **2005**, *19*, 187-202.
57. Badrick, A. C.; Jones, C. E. The amyloidogenic region of the human prion protein contains a high affinity (Met)₂(His)₂ Cu(I) binding site. *Journal of inorganic biochemistry* **2009**, *103*, 1169-1175.
58. Valensin, D.; Padula, E. M.; Hecel, A.; Luczkowski, M.; Kozłowski, H. Specific binding modes of Cu(I) and Ag(I) with neurotoxic domain of the human prion protein. *Journal of inorganic biochemistry* **2016**, *155*, 26-35.
59. Shearer, J.; Soh, P.; Lentz, S. Both Met(109) and Met(112) are utilized for Cu(II) coordination by the amyloidogenic fragment of the human prion protein at physiological pH. *Journal of inorganic biochemistry* **2008**, *102*, 2103-2113.



Capítulo 3.

**Coordinación de Cu(II) a los fragmentos C1 y C2 de los cortes α - y β -
proteolíticos de la proteína prion humana**

Capítulo 3.

Coordinación de Cu(II) a los fragmentos C1 y C2 de los cortes α - y β - proteolíticos de la proteína prion humana

Antecedentes

Cortes proteolíticos de la PrP^C

La proteína prion celular se encuentra localizada en la parte externa de la membrana celular, unida a balsas lipídicas por un puente glicosilfosfatidilinositol (GPI).¹ Esta localización sugiere una función para la PrP^C como transductora de señales del ambiente externo de la célula hacia su interior. Se ha propuesto que esta característica propia de la PrP^C no sólo se debe a la compleja interacción entre las numerosas vías de señalización, sino también como una función de las modificaciones postraduccionales específicas que pueda sufrir la proteína.² Una de ellas es el procesamiento proteolítico, el cual incluye el corte α -proteolítico dentro del dominio neurotóxico de la PrP^C, el corte β -proteolítico en la región del residuo 90 y la pérdida o desprendimiento de la proteína con respecto a la membrana plasmática (Figura 3.1.1). A continuación se describen los detalles de cada corte postraducciona.

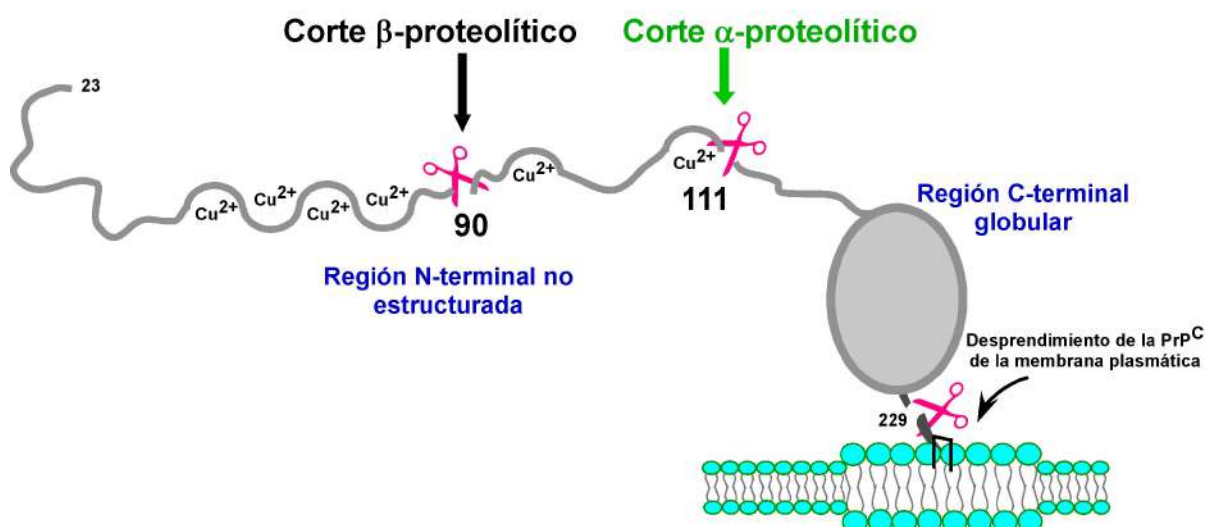


Figura 3.1.1 Representación esquemática de la PrP^C con sus regiones claves: región del octarepeat, sitios de His96 y 111, y puente GPI, y los lugares en donde se dan los cortes α -, β - proteolíticos y el desprendimiento de PrP^C con respecto a la membrana, representando el corte una tijera rosa. La numeración representa el número de residuo en la secuencia humana.

Corte α -proteolítico

El sitio del corte α -proteolítico fue identificado en las posiciones Lys110/His111 o His111/Met112 en la secuencia humana.^{1, 3-6} Esta incisión produce dos fragmentos: N1, correspondiente a los residuos 23-110 del N-terminal y C2, que incluye a los residuos 111-231 del C-terminal (Figura 3.1.2).

Corte α -proteolítico

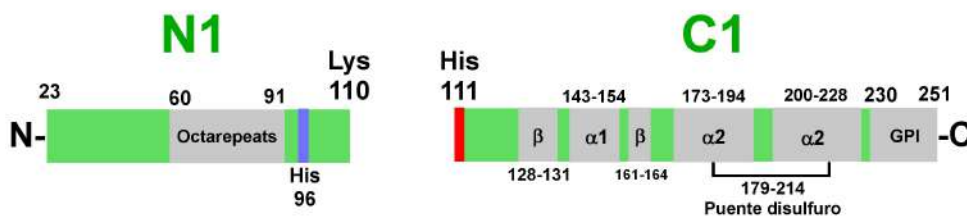


Figura 3.1.2 Representación esquemática del corte α -proteolítico de la PrP^C y sus fragmentos N- y C-terminal.

El corte α -proteolítico es el principal evento de procesamiento proteolítico de la PrP^C, acumulando fragmento C1 en la membrana plasmática y aportando de un 5 hasta un 50% del total de los niveles de PrP^C (dependiendo del tipo de célula o región del cerebro).¹ Estudios recientes han demostrado que dicho procesamiento puede llevarse a cabo, incluso, sin que la proteína esté anclada a la membrana lipídica.⁷ Muchos estudios han reportado diferentes proteasas responsables de la generación del corte α -proteolítico, entre las que se encuentra la familia de las ADAM (A-desintegrin-and-metalloproteinase por sus siglas en inglés), las cuales están unidas a membrana y son dependientes de zinc.^{1, 3} Se ha sugerido que ADAM10, ADAM17, ADAM9 y ADAM8 son las principales enzimas responsables del corte α -proteolítico.³ Por otro lado, existe evidencia de que el Cu(II) afecta este tipo de modificación postraduccional. McDonald y colaboradores demostraron que la unión directa de iones Cu(II) a la PrP^C suprime la actividad de la metaloproteasa ADAM8, debido a que evita que el sustrato entre al sitio activo de la enzima.⁸ Un estudio realizado en relación a la transducción de señal influenciado por Cu(II), demostró paralelamente que la exposición de Cu(II) incrementa selectivamente el corte α -proteolítico de la PrP^C,² por lo que la generación de dicho corte no sólo se restringe a proteasas.

El corte α -proteolítico irrumpe la región 106-126, la cual es clave para la conversión de PrP^C a PrP^{Sc}.^{3,9} Así, los fragmentos N1 y C1, productos del procesamiento proteolítico han sido bastante estudiados debido a su actividad biológica. Para N1 se ha sugerido una función neuroprotectora, debido a que bloquea vías de señalización neurotóxica, protegiendo a la célula contra especies oligoméricas tóxicas.¹ Otra propuesta de modulación por N1 es la que ha sugerido Black y colaboradores, quienes proponen que, junto con los iones cobre, el fragmento N1 puede alterar la actividad de los receptores NMDA (*N-metil-D-aspartato*) por unión directa N1-NMDA y modificando así su función.¹⁰ Por otra parte el fragmento C1, debido a que pierde el dominio neurotóxico, no es capaz de plegarse en la isoforma patógena, por lo que lo que no es un sustrato para la conversión de PrP^C a PrP^{Sc}.³

Corte β -proteolítico

El corte β -proteolítico está localizado principalmente entre los residuos de Trp89 y Gly90, en la secuencia de la proteína prion humana. Este corte produce un fragmento N-terminal llamado N2, que corresponde a los residuos 23-89, y un fragmento hacia el C-terminal, C2, que incluye a los residuos 90-231 del C-terminal (Figura 3.1.3).

Corte β -proteolítico

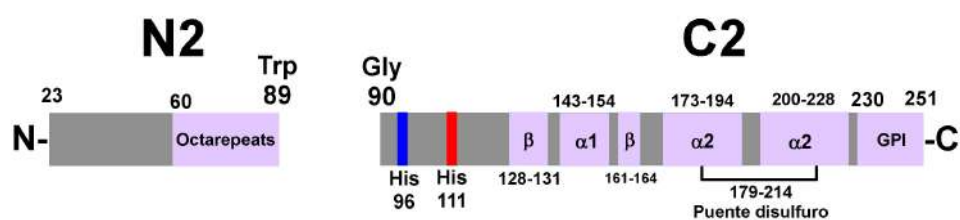


Figura 3.1.3. Representación esquemática del corte β -proteolítico de la PrP^C y sus fragmentos N- y C-terminal.

Este evento proteolítico ocurre, principalmente, en la superficie celular,¹¹ y puede ser mediado por condiciones de estrés oxidativo.¹² Diferentes estudios han demostrado que el corte β -proteolítico es inducido por especies reactivas de oxígeno (ROS) en presencia de

Cu(II),^{8, 12, 13} aunque también puede ser generado por vía enzimática. McDonald y colaboradores demostraron que la metaloproteasa ADAM8 puede actuar sobre PrP^C haciendo un corte β -proteolítico, el cual puede ser suprimido en presencia de iones Zn(II) debido a su unión al dominio del octarepeat.⁸

El corte β -proteolítico ha sido asociado a una condición patogénica, y se han detectado niveles altos del fragmento C2 en los cerebros post-mortem de pacientes con la enfermedad priónica humana de Creutzfeldt-Jakob^{3, 9, 13} Sin embargo, a pesar de esta categorización, se ha propuesto que el corte β -proteolítico es un mecanismo por el cual la PrP^C protege a la célula del estrés oxidativo.¹

En general, el procesamiento proteolítico de la proteína prion humana produce distintos fragmentos en distintas proporciones y estructuras moleculares, las cuales, cambian el paradigma que tenemos en relación a la unión de iones metálicos a la PrP^C. Estos cortes proteolíticos claramente pueden impactar en la función de la proteína, en su interacción con iones metálicos y/o en la etiología de la enfermedad. La forma en que los cortes α - y β -proteolíticos impactan la unión de iones Cu(II) a la proteína prion no ha sido evaluada.

En el presente trabajo se propone estudiar la coordinación de Cu(II) a péptidos modelo de los fragmentos C1 y C2. Este trabajo ayudará a entender cómo se une el metal a la proteína prion una vez que ha sufrido estas modificaciones postraduccionales. Estudios espectroscópicos por absorción electrónica en la región UV/Vis, Dicroísmo Circular, Resonancia Paramagnética Electrónica y Resonancia Magnética Nuclear, ayudarán a elucidar los complejos formados para cada caso.

Objetivo General

Entender cómo impactan los cortes α - y β -proteolíticos de la proteína prion humana a su interacción con el ion Cu(II).

Objetivos específicos

- Estudiar por espectroscopia de absorción electrónica, CD, EPR y RMN los complejos de Cu(II) con los fragmentos peptídicos C1 (hPrP(111-115)) y C2 (hPrP(90-115)) de la proteína prion humana.
- Comparar el estudio de los complejos de coordinación con sus análogos acetilados para entender el papel del grupo NH₂- terminal en la formación del complejo.

Resultados y Análisis

hPrP(111-115): un modelo para el fragmento C1 del corte α -proteolítico

Se sintetizó el péptido hPrP(111-115) con secuencia $\text{NH}_2\text{-HMAGA}$, el cual considera los cinco primeros residuos que quedan con su grupo amino libre $-\text{NH}_2$ cuando se genera el fragmento C1, resultado del corte α -proteolítico que sufre la proteína prion. Este péptido corto sirve de modelo en el estudio de la coordinación del ion metálico Cu(II) a dicho fragmento. El estudio espectroscópico de la unión del Cu(II) al péptido hPrP(111-115) se llevó a cabo por absorción electrónica y CD en la región UV/Vis, EPR y RMN.

Se tituló una solución del péptido hPrP(111-115), en una concentración de 0.7 mM y a pH 7.5, con una sal de Cu(II). La titulación se siguió cada 0.1 equivalentes hasta saturación, usando tres técnicas espectroscópicas: absorción electrónica y CD en la región UV/Vis y EPR. Los espectros de la titulación con Cu(II) por espectroscopia de absorción electrónica en la región UV/Vis mostraron la aparición de bandas d-d a bajas energías ($\sim 15\,600\text{ cm}^{-1}$ (640 nm)) así como bandas de transferencia de carga a mayor energía (Figura 3.2.1).

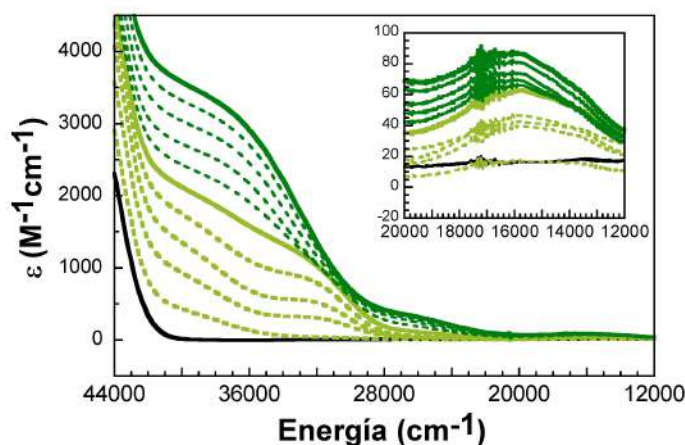


Figura 3.2.1. Titulación con Cu(II) del fragmento hPrP(111-115) a pH 7.5 seguida por Absorción electrónica en la región UV/Vis. Líneas continuas representan 0.0 (negra), 0.5 (verde claro) y 1.0 (verde oscuro) eq Cu(II), las líneas punteadas indican los puntos intermedios de la titulación.

El estudio espectroscópico por CD nos aportó la mayor información de interacción metal-péptido. En el rango de 0.1-0.5 eq Cu(II) los espectros de CD del complejo Cu(II)-hPrP(111-115) muestran el crecimiento de un juego de señales, mientras que a partir de 0.6 eq hasta 1.0 eq Cu(II) algunas de ellas desaparecen y/o disminuyen (Figura 3.2.2).

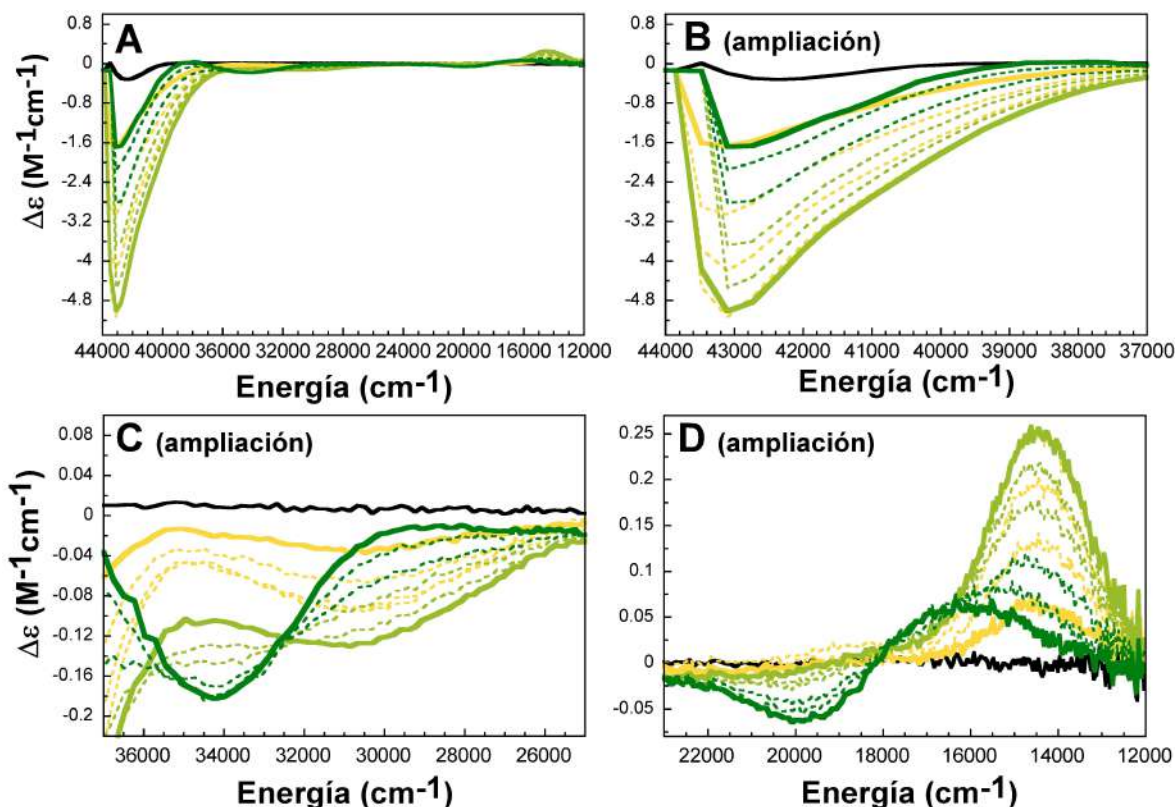


Figura 3.2.2. A) Titulación con Cu(II) del fragmento hPrP(111-115) a pH 7.5 seguida por CD. B), C) y D) son ampliaciones de diferentes zonas de los espectros de CD que muestran la aparición y desaparición de las señales. Líneas continuas representan 0.0 (negra), 0.1 (amarillo), 0.5 (verde claro) y 1.0 (verde oscuro) eq Cu(II), las líneas punteadas indican los puntos intermedios de la titulación.

Al inicio de la titulación, se observa una banda intensa negativa a $43\,000\text{ cm}^{-1}$, la cual puede ser asignada como una banda de transferencia de carga del ligando al metal (LMCT) del N-terminal NH_2 a Cu(II). Esta señal crece hasta los 0.5 eq alcanzando una intensidad de $\Delta\epsilon = -4.95\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, y a partir de 0.6 eq la señal decrece hasta un $\Delta\epsilon = -1.66\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 1.0 eq Cu(II), sin desaparecer por completo. Por otro lado, en la región de $37\,000$ a $26\,000\text{ cm}^{-1}$ aparecen dos bandas negativas de baja intensidad: a $34\,100\text{ cm}^{-1}$ y a $30\,600\text{ cm}^{-1}$. La señal de mayor energía surge únicamente después de los 0.6 eq Cu(II) y alcanza un máximo de $\Delta\epsilon = -0.18\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 1.0 eq Cu(II), mientras que la de $30\,600\text{ cm}^{-1}$ crece de 0.1 eq Cu(II) a 0.5 eq Cu(II), y después de 0.6 eq pierde intensidad, hasta que a 1.0 eq desaparece por completo. Estas señales pueden ser asignadas a bandas LMCT de la amida desprotonada N^- del enlace peptídico al Cu(II) y a π_1 del imidazol de histidina al Cu(II). En la región de más baja energía, las señales del espectro de CD mostraron tres transiciones de campo ligando (d-d): dos

bandas positivas a $14\,400\text{ cm}^{-1}$ y a $16\,200\text{ cm}^{-1}$, y una negativa a $19\,500\text{ cm}^{-1}$. La señal a $14\,400\text{ cm}^{-1}$ aparece a 0.1 eq y aumenta conforme el número de equivalentes, sin embargo después de 0.6 eq disminuye en intensidad y se recorre a mayor energía dando lugar a una señal a $16\,200\text{ cm}^{-1}$. La señal negativa de $19\,500\text{ cm}^{-1}$, surge a partir de los 0.6 eq de Cu(II) y alcanza un $\Delta\epsilon = -0.06\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 1.0 eq Cu(II). Para todos los casos, las señales de los espectros de CD mostraron un cambio después de los 0.5 eq de Cu(II), lo cual indicaría que la formación del complejo depende de la concentración de Cu(II).

El análisis de los espectros de CD a diferentes equivalentes de Cu(II) permitió plantear dos posibles formas de coordinación del Cu(II) al péptido hPrP(111-115):

- i) Un complejo con relación estequiométrica 1:2 Cu(II):péptido, que se forma a bajos equivalentes de metal y se denomina Cu(II)-(hPrP(111-115))₂.
- ii) Un complejo con relación estequiométrica 1:1 Cu(II):péptido, Cu(II)-hPrP(111-115), que se forma a partir de la adición de más de 0.5 equivalentes de Cu(II).

En el estudio de la unión de iones metálicos como el Cu(II) a péptidos sintéticos se ha visto que esta interacción generalmente depende del pH. Así, se determinaron los valores de pK_a para los complejos formados a bajos y altos equivalentes de Cu(II), mediante titulaciones potenciométricas seguidas por CD, en un rango de pH de 4.5 a 10.0.

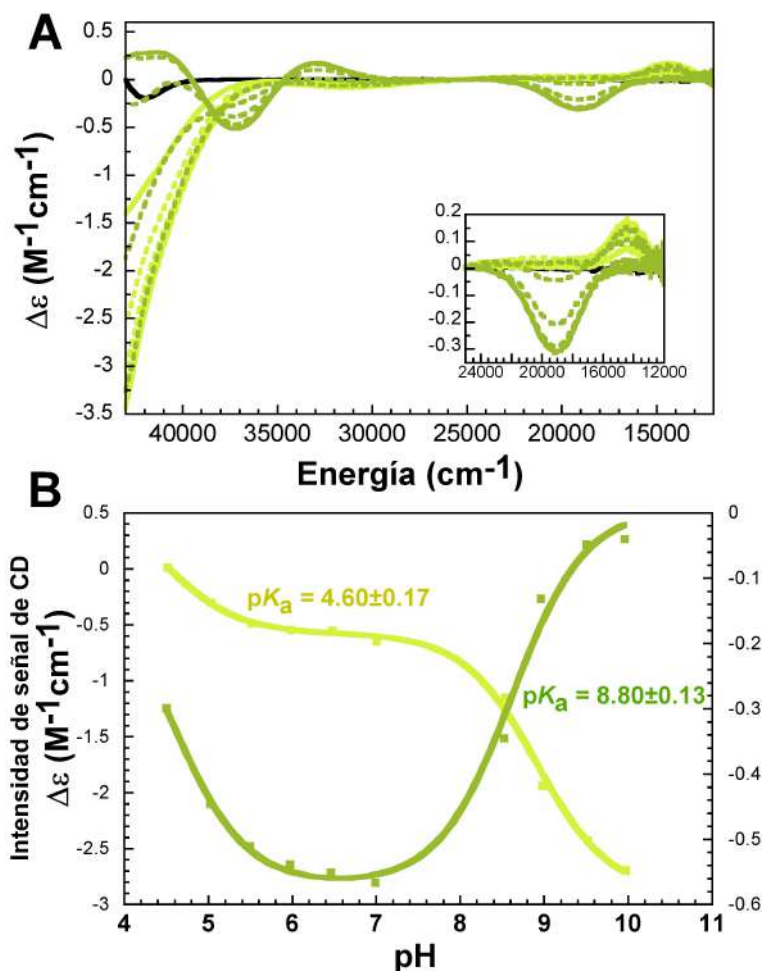


Figura 3.2.3. Espectros de CD del complejo Cu(II)-hPrP(111-115) con 0.2 eq Cu(II) obtenidos a partir de un barrido a diferentes condiciones de pH. B) Trazas para los cambios de intensidad de las señales de CD en función del pH para el cálculo de pK_a a $37\ 037\ \text{cm}^{-1}$ (traza verde clara, escala izquierda en el eje Y) y $42\ 373\ \text{cm}^{-1}$ (traza verde oscura, escala derecha en el eje Y).

La Figura 3.2.3 A muestra la titulación de pH del complejo formado con 0.2 eq Cu(II) y B) las trazas representativas de las intensidades de las señales de CD en función del pH a dos energías, a $42\ 373\ \text{cm}^{-1}$ y a $37\ 037\ \text{cm}^{-1}$. A partir de estos datos, se determinó que el complejo presenta dos equilibrios de protonación con valores de pK_a : 4.60 ± 0.17 y 8.80 ± 0.13 (ver Apéndice I). Cabe mencionar que el comportamiento de los espectros de CD a valores de pH por arriba de su segundo pK_a se asemejan a aquellos espectros del complejo con un número de equivalentes de Cu(II) superior a 0.6 eq Cu(II).

Por otro lado, la Figura 3.2.4 A muestra la titulación potenciométrica del complejo con 0.8 eq Cu(II). Las trazas en función del pH a $37\ 037\ \text{cm}^{-1}$ y a $32\ 895\ \text{cm}^{-1}$ permitieron determinar la presencia de dos equilibrios de protonación con valores de pK_a de 6.98 ± 0.12 y 8.43 ± 0.04 .

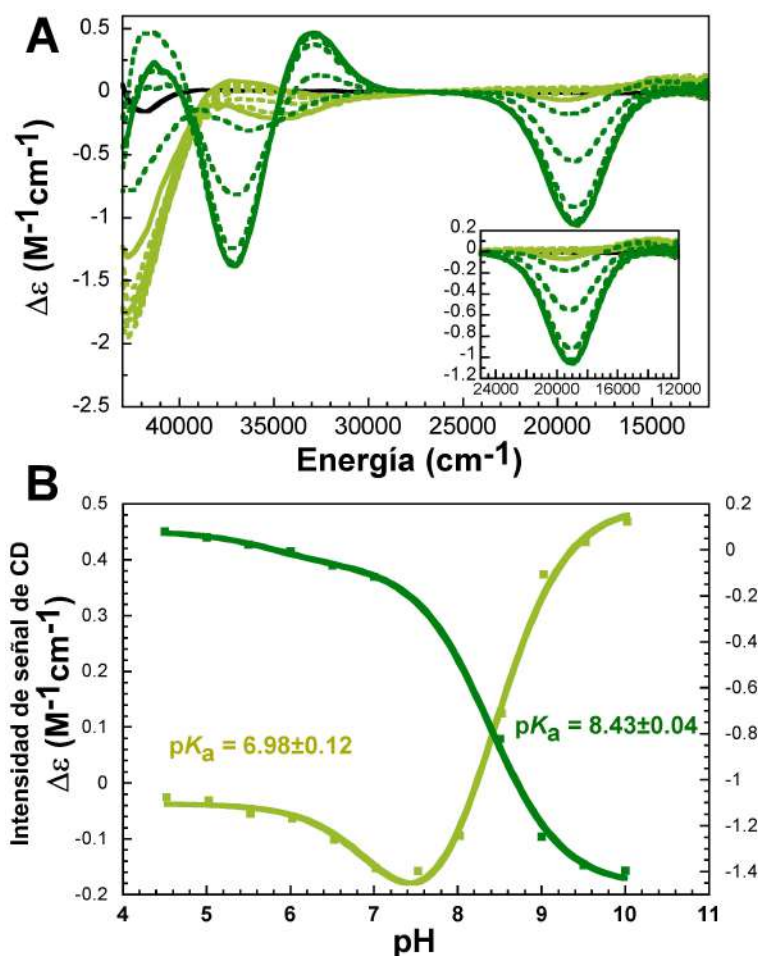


Figura 3.2.4. Espectros de CD del complejo Cu(II)-hPrP(111-115) con 0.8 eq Cu(II) obtenidos a partir de un barrido a diferentes condiciones de pH. B) Trazas para los cambios de intensidad de las señales de CD en función del pH para el cálculo de pK_a a $37\,037\,cm^{-1}$ (traza verde oscura, escala izquierda en el eje Y) y $32\,895\,cm^{-1}$ (traza verde clara, escala derecha en el eje Y).

El primer equilibrio de protonación del complejo formado con 0.8 eq Cu(II) presenta un valor de pK_a dos unidades mayor al del complejo con 0.2 eq Cu(II), mientras que el segundo valor de pK_a tiene un valor muy similar en ambos complejos. A partir de estos datos se concluyó que el modo de coordinación de Cu(II) al péptido hPrP(111-115) es dependiente de la concentración del ion metálico y del valor del pH.

Con el fin de elucidar el modo de coordinación de los complejos a pH 7.5 y diferentes equivalentes de Cu(II), se estudiaron por espectroscopia de EPR los complejos de 0.1 a 1.0 eq de Cu(II). La Figura 3.2.5 muestra la titulación con Cu(II) seguida por EPR a pH 7.5.

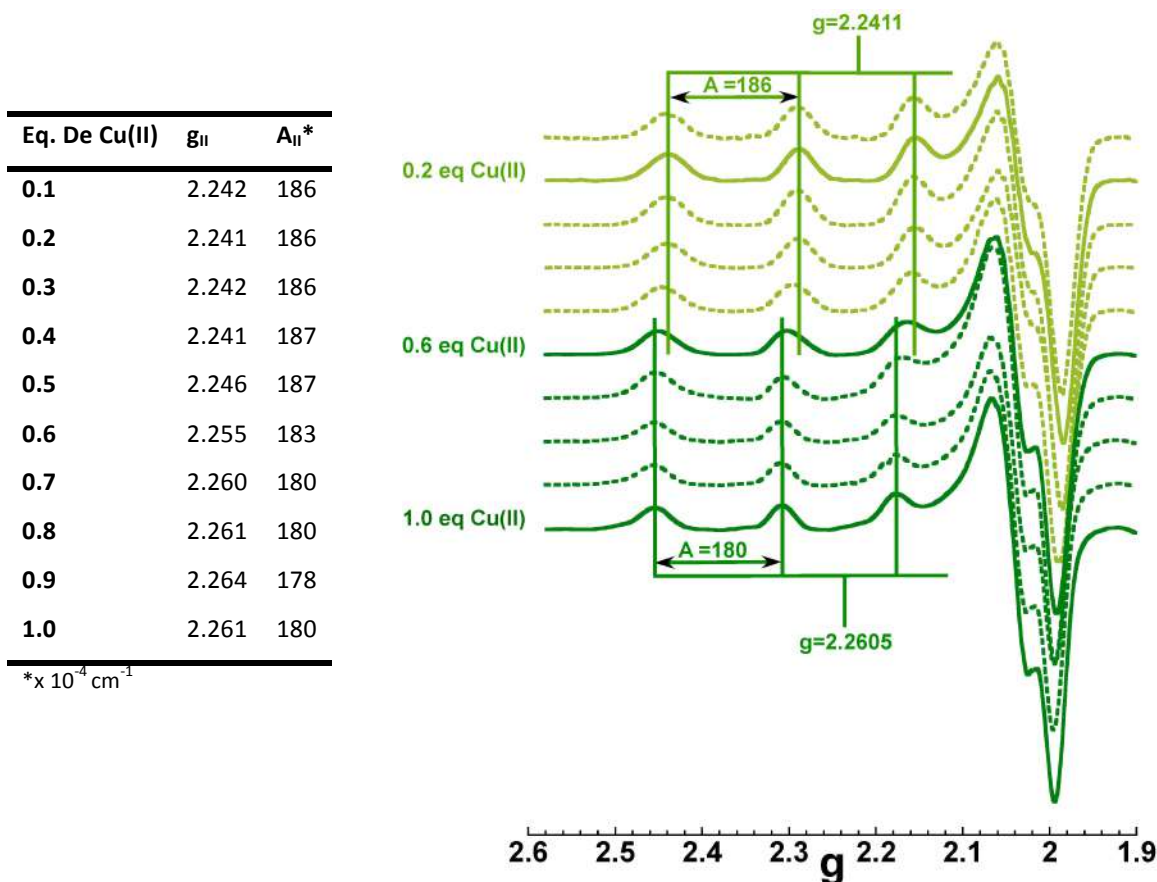


Figura 3.2.5. Titulación con Cu(II) del fragmento hPrP(111-115) a pH 7.5 seguida por EPR. A la derecha los parámetros de EPR $g_{||}$ y $A_{||}$ de cada espectro de EPR en la titulación.

En todos los casos, las señales muestran $g_{||} > g_{\perp} > 2.0023$ y un valor de acoplamiento hiperfino paralelo alto ($A_{||}$), lo cual es indicativo de una geometría cuadrada plana de Cu(II) con un estado basal $d_{x^2-y^2}$.¹⁴ De acuerdo a las correlaciones de Peisach-Blumberg,¹⁵ los valores de $g_{||}$ y $A_{||}$ para los complejos con bajos equivalentes de Cu(II) corresponden a un modo de coordinación ecuatorial rico en nitrógenos (4N), mientras que a altos equivalentes de Cu(II) se forma un modo de coordinación ecuatorial más rico en oxígenos, que oscila entre 3N1O y 2N2O.

Otra de las espectroscopias que nos ayudó a obtener información estructural de la coordinación del Cu(II) al fragmento C1 del corte α -proteolítico fue la resonancia magnética nuclear (RMN). Se asignaron las señales para cada H y C de todos los residuos de la secuencia HMAGA a partir de experimentos ^1H - ^1H TOCSY, ^1H - ^{13}C HSQC y ^1H - ^{13}C HMBC. La Figura 3.2.6 muestra los espectros de RMN ^{13}C superpuestos del péptido hPrP(111-115) en ausencia (negro) y presencia (verde) de 0.01 eq Cu(II). El efecto paramagnético del ión Cu(II) causa ensanchamiento en las señales debido al incremento en la relajación de los núcleos.¹⁶ A partir de estos datos, se observó que las señales más afectadas por la presencia del ion metálico fueron aquellas pertenecientes a los carbonos del residuo de His111, indicando a este residuo como sitio de anclaje para Cu(II).

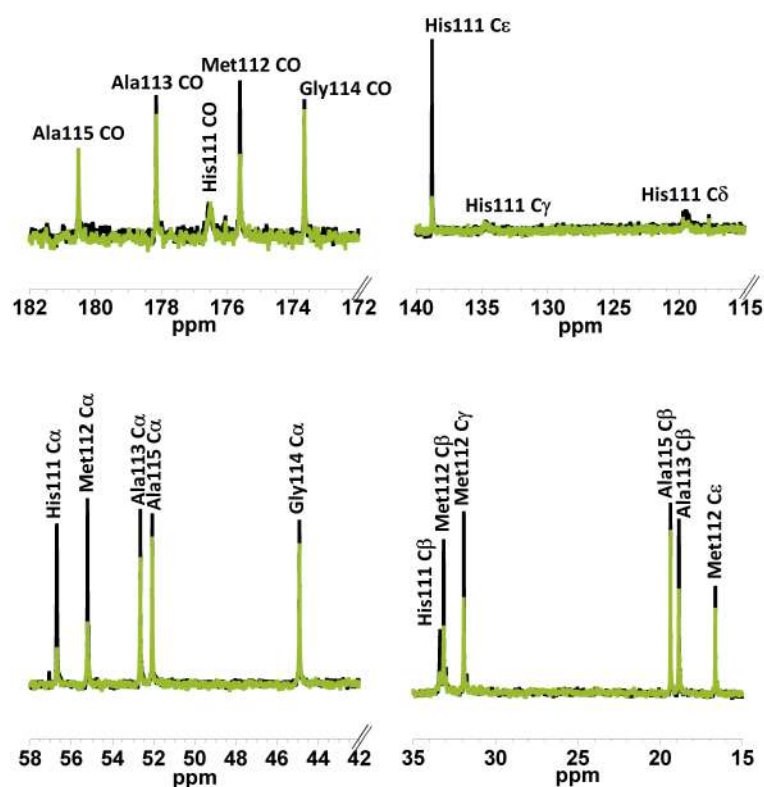


Figura 3.2.6 Espectros superpuestos de RMN 1D ^{13}C del fragmento hPrP(111-115) en ausencia (negro) y presencia de 0.01 eq Cu(II) (verde).

La coordinación de Cu(II) a los grupos imidazol de las histidinas puede ser a través del N1 o N3 de su anillo de imidazol. Por RMN, fue posible determinar a qué nitrógeno, N1 o N3, de la histidina está coordinado el ion Cu(II) en el complejo Cu(II)-péptido a pH 7.5 (Figura 3.2.7), para mayor información referirse al Capítulo 1. Sección *Papel de la His18 en la coordinación de Cu(II) a hIAPP y su efecto inhibitorio en la agregación.*

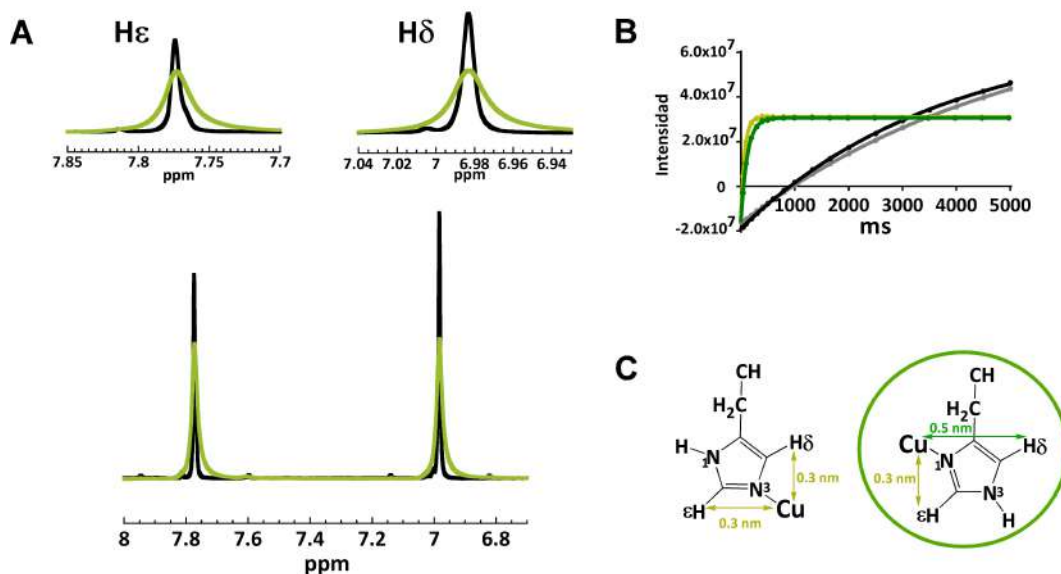


Figura 3.2.7 (A) Comparación de espectros de RMN 1D ^1H del fragmento hPrP(111-115) en ausencia (negro) y presencia de 0.02 eq Cu(II) (verde). (B) Ajustes de rapidez de relajación por experimentos de 1D-IR de los protones $\text{H}\epsilon$ y $\text{H}\delta$ del imidazol de la His18. Las especies libres corresponden a $\text{H}\epsilon$ (gris) y $\text{H}\delta$ (negro), las especies unidas a 0.01 eq Cu(II) corresponden a $\text{H}\epsilon$ (verde claro) y $\text{H}\delta$ (verde oscuro). (C) Esquema que representa las dos posibilidades de unión de Cu(II) a N1 o N3 del imidazol y las distancias para cada caso.

La Figura 3.2.7 A muestra los espectros de RMN 1D de ^1H en donde se presentan los protones $\text{H}\epsilon$ y $\text{H}\delta$ y su efecto de ensanchamiento después de la adición de Cu(II). La medición de la relajación provee información de la interacción entre el núcleo resonante y el electrón desapareado.¹⁷ Así, por experimentos de recuperación de la inversión de la magnetización (Figura 3.2.7 B) se calcula T_1 (tiempo que tarda la magnetización en regresar al equilibrio; ver Apéndice II) de $\text{H}\epsilon$ (gris) y $\text{H}\delta$ (negro) para el péptido libre, y para las especies unidas a Cu(II) después de la adición de 0.01 eq Cu(II) $\text{H}\epsilon$ (verde claro) y $\text{H}\delta$ (verde oscuro).

Tabla 3.2.1 Parámetros de los experimentos de RMN 1D-IR de los protones $\text{H}\epsilon$ y $\text{H}\delta$.

	T_1 libre	T_1 unido	R_{1b} libre	R_{1b} unido	R_{1p}	R_{1M}	Distancia(nm)
$\text{H}\epsilon$	5.545	0.461	0.180	2.169	1.99	8660.69	0.46
$\text{H}\delta$	3.947	0.520	0.253	1.923	1.67	932.87	0.3 (fija)

El cálculo del incremento en la rapidez de relajación nuclear longitudinal debido al acoplamiento dipolar con el electrón desapareado del Cu(II), R_{1M} , proporciona información

acerca de la distancia entre los núcleos y el ion metálico.¹⁷ R_{1M} depende de la fracción molar libre del péptido y la fracción molar unida al Cu(II), además del tiempo de correlación de intercambio τ ($\tau = 1/k_{off}$, calculada usando una distancia de 0.3 nm de Cu(II) a H ϵ ¹⁸ de His111, se obtiene un valor de 4.9 ms). Para el cálculo de las distancias núcleo-metal referirse al Apéndice II. La Tabla 3.2.1 muestra los parámetros T_1 , R_{1b} , R_{1p} , R_{1M} y las distancias de los protones H ϵ y H δ al ion Cu(II). La Figura 3.2.7 C compara las dos posibles uniones de Cu(II) a N1 o N3, donde resulta evidente que, en ambos modos de unión, la distancia del Cu(II) a H ϵ es de 0.3 nm, mientras que la distancia a H δ varía, dependiendo de si el Cu(II) esta unido a N1 o N3. Así, a partir de nuestros datos, determinamos la distancia de H δ a Cu(II) la cual fue de 0.46 nm, lo que indica que el Cu(II) se encuentra unido al N1 del anillo de imidazol de la His111 en nuestro complejo.

Modelos de coordinación Cu(II)-hPrP(111-115)

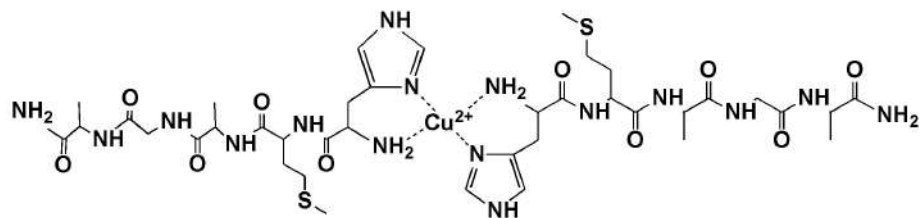
A partir de los resultados obtenidos en los estudios espectroscópicos de la interacción Cu(II)-hPrP(111-115), se pueden proponer modelos de coordinación del ion metálico al fragmento C1, que es el resultado del corte α -proteolítico de la PrP^C.

Como se vio por espectroscopia de CD, la formación del complejo de coordinación depende de la concentración en la que esté presente el ion metálico. A bajas concentraciones de Cu(II), se forma un complejo 1:2 Cu(II):Péptido donde el Cu(II) está coordinado a dos moléculas de hPrP(111-115) por los N1 de los imidazoles de las His111 y los dos grupos NH₂- del N-terminal. Con estos ligandos el complejo tendría un modo de coordinación 4N como lo indican los datos de EPR y formaría un quelato análogo al complejo de histamina.¹⁹⁻²¹ (ver sección de Discusión y conclusiones)

Por otro lado, a concentraciones estequiométricas Cu(II):Péptido, el panorama es diferente, ya que se forma un complejo 1:1, en donde permanece la coordinación del Cu(II) al NH₂- del N-terminal, pero además surge la participación de nitrógenos de amidas desprotonadas de la cadena peptídica. Así, sin descartar la posible participación del imidazol de la histidina en este complejo, se pueden proponer modelos de coordinación con Cu(II) unido a la histidina,

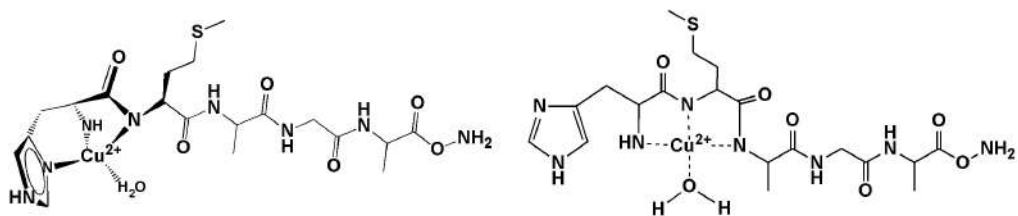
al NH_2^- , amidas desprotonadas de la cadena peptídica, oxígenos de los carbonilos de la cadena peptídica y/o moléculas de agua (Esquema 3.2.1).

A



Cu(II)-(hPrP(111-115))₂

B



Con participación del imidazol

Sin participación del imidazol

Cu(II)-hPrP(111-115)

Esquema 3.2.1 Propuestas de modelos de coordinación de Cu(II) unido al péptido hPrP(111-115). A) A bajas concentraciones de Cu(II) 1:2 Cu(II):Péptido. B) A concentraciones estequiométricas 1:1 Cu(II):Péptido.

hPrP(90-115): un modelo para el fragmento C2 del corte β -proteolítico

Se estudió la interacción del ion metálico Cu(II) con un modelo del fragmento C2, el cual es producto del corte β -proteolítico, entre los residuos 89 y 90 de la proteína prion humana. El fragmento C2, incluye a los dos sitios de histidinas que unen Cu(II), His96 e His111, y un grupo NH₂- libre en su extremo N-terminal. Por tanto, se sintetizó el péptido hPrP(90-115) con secuencia: NH₂-GQGGGTHSQWNKPSKPKTNMKHMAGA, como modelo del fragmento C2. Además, se sintetizaron dos variantes, hPrP(90-115 H96A) y hPrP(90-115 H111A), en las que se sustituyeron los residuos de histidinas por residuos de alaninas, para poder discernir las contribuciones de cada histidina a la coordinación de Cu(II) a este fragmento. Es importante señalar que, a diferencia de los fragmentos estudiados en el capítulo 2, los péptidos estudiados aquí tienen su extremo N-terminal libre.

Se tituló una solución que contenía el péptido hPrP(90-115) a pH 7.5, en un rango de 0.2 a 3.0 eq de Cu(II). La Figura 3.2.8 A muestra los espectros de la titulación, mientras que los recuadros B), C) y D) muestran comparaciones de espectros a diferentes etapas de la titulación. Al inicio de la titulación aparece una banda d-d negativa a 17 440 cm⁻¹ de baja intensidad ($\Delta\epsilon = -0.09 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y 2 bandas de transferencia de carga: una positiva a 31 600 cm⁻¹ ($\Delta\epsilon = 0.23 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) asociada a una LMCT π_1 del imidazol de las histidinas al Cu(II) y una negativa a 35 980 cm⁻¹ con mayor intensidad ($\Delta\epsilon = -0.48 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) que puede ser asignada a una banda LMCT de la amida desprotonada N⁻ del enlace peptídico al Cu(II). Al llegar a los 0.6 eq de Cu(II) se observó un corrimiento de la banda d-d a energías más altas y un aumento en su intensidad ($\Delta\epsilon = -0.24 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$); también se observó el crecimiento de una señal positiva a 39 400 cm⁻¹ ($\Delta\epsilon = 1.00 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) asociada a una banda LMCT π_2 del imidazol de las histidinas al Cu(II). Después de la adición de 1.0 eq Cu(II), se observa un incremento en la intensidad en las bandas LMCT asociadas a π_2 y π_1 del imidazol de las histidinas al Cu(II), mientras que la LMCT asociada a la amida desprotonada N⁻ del enlace peptídico al Cu(II) se desplaza a 34 900 cm⁻¹ y la banda d-d se desdobra en dos señales: una positiva a 15 470 cm⁻¹ con $\Delta\epsilon = 0.17 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y una negativa a 19 800 cm⁻¹ con $\Delta\epsilon = -0.45 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Al adicionar más de 1.0 eq Cu(II), algunas bandas LMCT disminuyen en intensidad hasta desaparecer por

completo a los 2.0 eq de Cu(II), posiblemente debido al aumento en el voltaje del detector. Asimismo, no se observan cambios significativos en los espectros más allá de 2.0 eq de Cu(II).

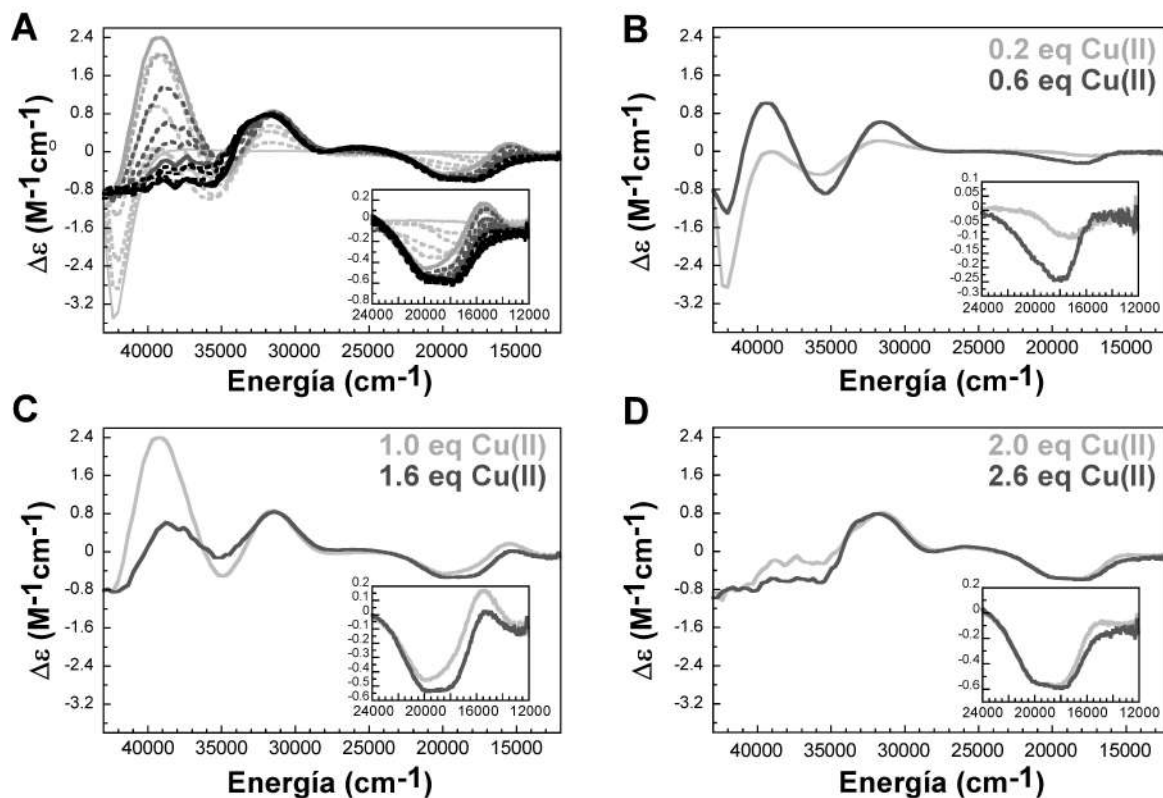


Figura 3.2.8. A) Titulación con Cu(II) del fragmento hPrP(90-115) a pH 7.5 seguida por CD cada 0.2 eq Cu(II) hasta 3.0 eq Cu(II) (línea continua negra). Espectros de CD por separado a la condición de B) 0.2 (gris claro) y 0.6 (gris oscuro) eq Cu(II); C) 1.0 (gris claro) y 1.6 (gris oscuro) eq Cu(II); y D) 2.0 eq Cu(II) (gris claro) y 2.6 (gris oscuro) eq Cu(II).

Estos resultados claramente indican que la coordinación de Cu(II) al péptido hPrP(90-115) depende de la concentración del ion metálico. Y aunque esta titulación no nos permite determinar qué complejos de coordinación se forman, queda clara la participación de los grupos funcionales NH_2^- , His96 e His111, así como amidas desprotonadas de la cadena peptídica.

Se realizó una titulación por pH del complejo Cu(II)-hPrP(90-115) a 0.5 y 1.5 equivalentes de Cu(II), en un rango de pH de pH 5.0 hasta 10.0 (Figura 3.2.9).

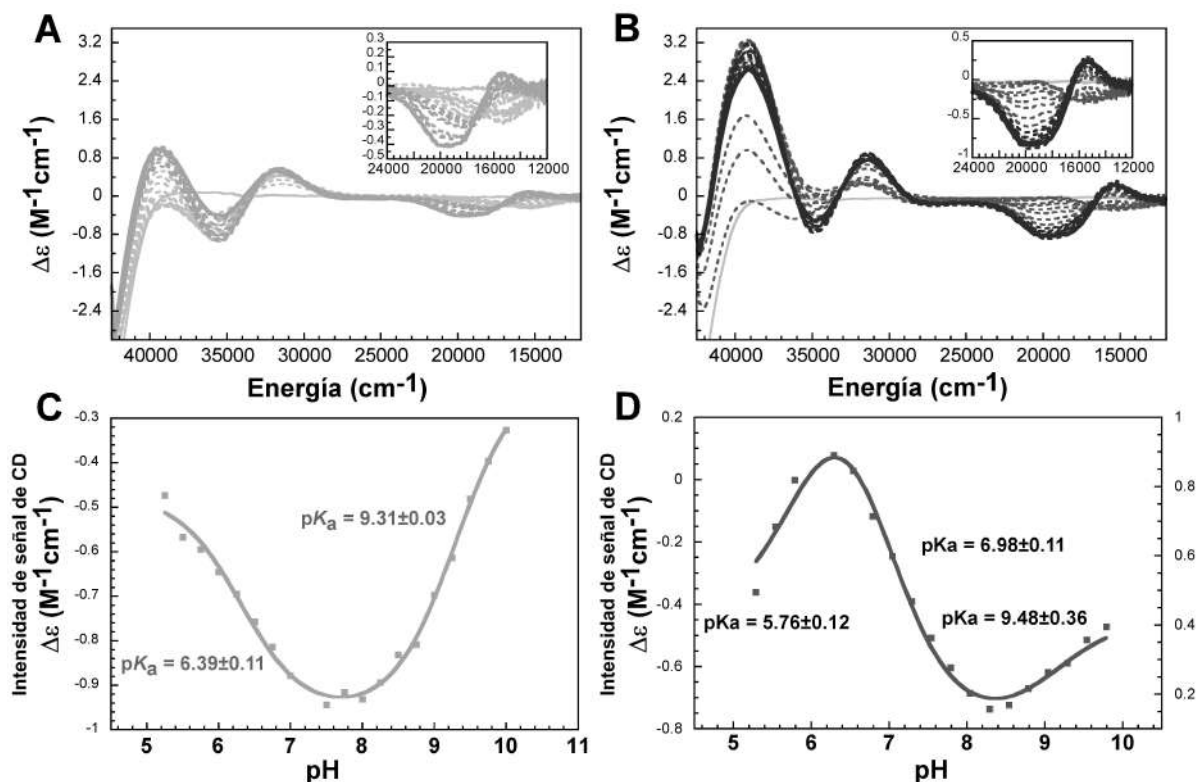


Figura 3.2.9. Espectros de CD del complejo Cu(II)-hPrP(90-115) con 0.5 eq Cu(II) (A) y 1.5 eq Cu(II) (B) obtenidos a partir de un barrido a diferentes condiciones de pH. (C) y (D) Trazas de las intensidades de las señales de CD en función del pH para el cálculo de pK_a a $36\ 232\ \text{cm}^{-1}$ (traza gris clara) y $34\ 722\ \text{cm}^{-1}$ (traza gris oscuro).

A partir de estos datos se determinaron los equilibrios de protonación para cada concentración de Cu(II), usando el cambio en las intensidades de las señales de CD a diferentes valores de energía (Figuras 3.2.9 C y D; ver Apéndice I). Así, a bajas concentraciones de Cu(II), el complejo presentó dos equilibrios de protonación, con valores de pK_a de 6.39 ± 0.11 y 9.31 ± 0.03 . Por otro lado, el complejo con 1.5 eq Cu(II) presentó tres equilibrios de protonación con valores de pK_a de 5.76 ± 0.12 , 6.98 ± 0.11 y 9.48 ± 0.36 .

Se hizo una comparación de la región d-d de los espectros de CD para los complejos formados a 0.5 y 1.5 eq de Cu(II) a valores de pH 5.5, 7.5 y 9.5 (Figura 3.2.10). A pH 5.5, pareciera formarse el mismo complejo Cu(II)-hPrP(90-115) a ambos equivalentes de Cu(II). A pH 9.5 se observa el mismo comportamiento, es decir, la forma desprotonada del complejo es la misma en ambas concentración de Cu(II). Sin embargo, a pH 7.5 los espectros son completamente diferentes, reflejando la diferencia en pK_a de las especies: el complejo a 0.5 eq Cu(II) tiene un pK_a de 6.4, mientras que el complejo con 1.5 eq Cu(II) tiene un pK_a de 7.

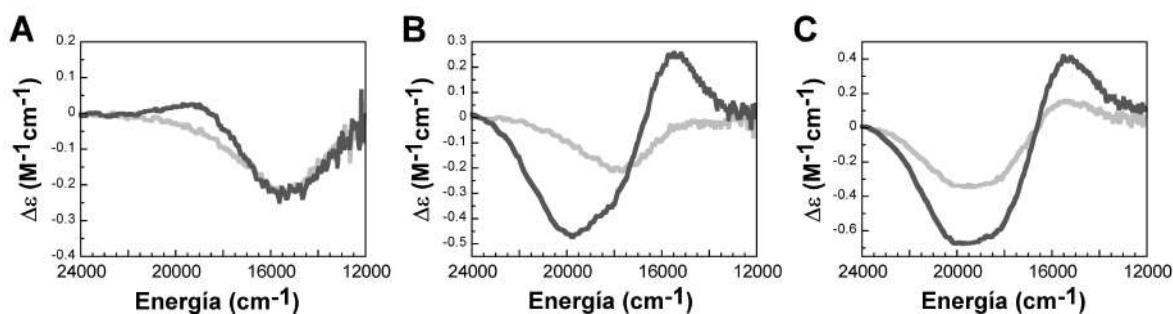


Figura 3.2.10. Comparación de los espectros de CD del complejo Cu(II)-hPrP(90-115) con 0.5 (espectros grises) y 1.5 (espectros negros) equivalentes de Cu(II) a pH 5.5 A), 7.5 B) y 9.5 C).

Los complejos también fueron estudiados por espectroscopia de EPR, sin embargo sólo se observaron cambios sutiles en los parámetros de EPR. La Figura 3.2.11 muestra una titulación con Cu(II) del péptido hPrP(90-115) cada 0.5 eq Cu(II) y sus valores de g_{\parallel} y A_{\parallel} a pH 7.5. Para todas las condiciones los parámetros correlacionan para un ambiente de coordinación rico en nitrógenos,¹⁵ con modos 3N1O o 4N.

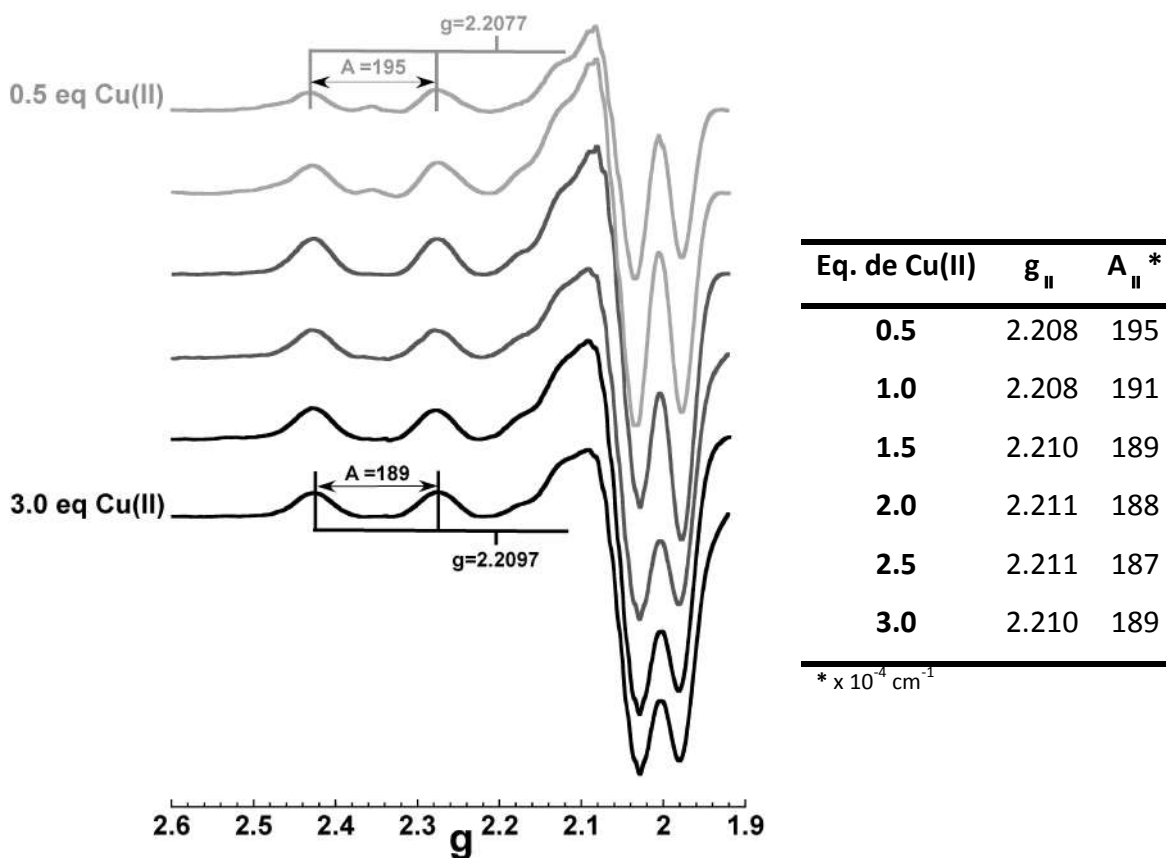


Figura 3.2.11. Titulación con Cu(II) del fragmento hPrP(90-115) a pH 7.5 seguida por EPR. A la derecha los parámetros de EPR g_{\parallel} y A_{\parallel} de cada espectro de EPR en la titulación.

Con el fin de discernir las especies observadas en la titulación del péptido hPrP(90-115) con Cu(II), se estudiaron los complejos de las variantes de His96A e His111A. En el péptido hPrP(90-115 H96A), únicamente se tienen dos sitios de anclaje: la His111 y el NH₂- del N-terminal del péptido. Así, se hizo una titulación del péptido hPrP(90-115 H96A) con Cu(II) a pH 7.5 y se siguió por espectroscopia de CD (Figura 3.2.12). Todas las señales crecieron gradualmente y se saturaron a partir de 1.6 eq de Cu(II).

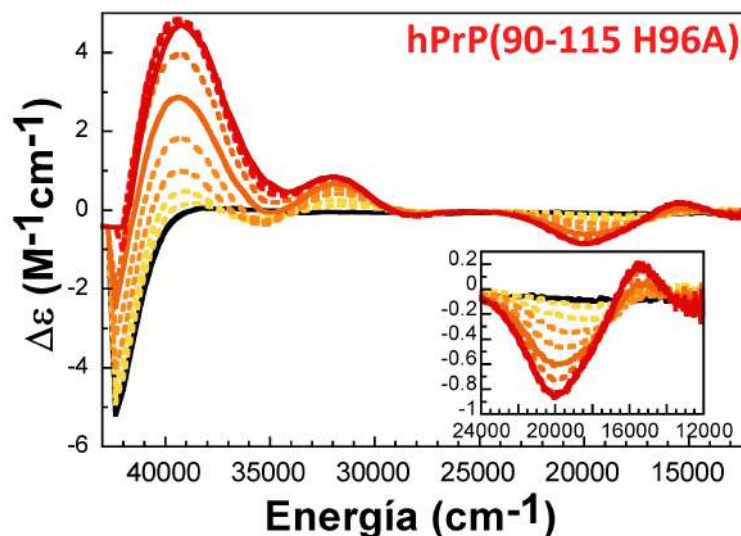


Figura 3.2.12. Titulación con Cu(II) de la variante hPrP(90-115 H96A) a pH 7.5 seguida por CD. Líneas continuas representan 0.0 (negra), 1.0 (naranja) y 2.0 (rojo) eq Cu(II), las líneas punteadas indican los puntos intermedios de la titulación.

Estos resultados indican que el Cu(II) se une al péptido hPrP(90-115 H96A) por el nitrógeno del imidazol de la His111, amidas desprotonadas de la cadena peptídica y probablemente por el NH₂- terminal. Para éste último, los datos de CD no proveen evidencia contundente sobre la participación del grupo NH₂- como ligante, ya que la banda asociada a la LMCT NH₂- a Cu(II) queda enmascarada con la banda intensa a 42 000 cm⁻¹ del péptido mismo. Sin embargo este grupo amino terminal es considerado generalmente como el sitio de anclaje más común en la coordinación metal-péptido.¹⁹

Por otra parte también se estudió la variante hPrP(90-115 H111A) la cual contiene a la His96 y al grupo NH₂- terminal como posibles sitios de anclaje a Cu(II). Su titulación con Cu(II) se siguió por espectroscopia de CD (Figura 3.2.13), observándose una sola banda d-d negativa, y bandas LMCT de baja intensidad (en un rango de $\Delta\varepsilon = 0.94 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a $-1.18 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Las

energías de las LMCT observadas sugieren la participación de la His96 y amidas desprotonadas de la cadena peptídica. Todas las señales se saturan a 2.0 eq de Cu(II).

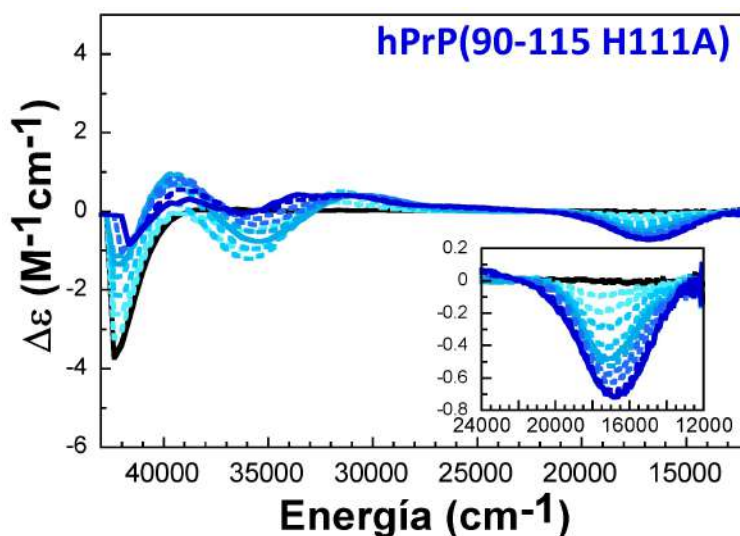


Figura 3.2.13. Titulación con Cu(II) de la variante hPrP(90-115 H111A) a pH 7.5 seguida por CD. Líneas continuas representan 0.0 (negra), 1.0 (azul claro) y 2.0 (azul oscuro) eq Cu(II), las líneas punteadas indican los puntos intermedios de la titulación.

Con el fin de obtener mayor información acerca de la coordinación de Cu(II) al fragmento hPrP(90-115), y el papel del grupo NH_2^- del N-terminal en la unión al metal, se compararon los espectros de CD de los complejos de coordinación de las variantes H96A y H111A con su grupo N-terminal libre Cu(II)-(NH₂-90-115 H96A) y Cu(II)-(NH₂-90-115 H111A) con aquellos estudiados en el Capítulo 2, donde los péptidos estaban en su forma acetilada, Cu(II)-(Ac-92-115 H96A) y Cu(II)-(Ac-92-115 H111A) (Figura 3.2.14). Claramente, las comparaciones indican que, a todas las condiciones de concentración de Cu(II), el espectro de CD del complejo Cu(II)-(NH₂-90-115 H111A) es muy diferente al de su análogo acetilado, Cu(II)-(Ac-92-115 H111A). Estos resultados indican que el grupo NH_2^- libre del péptido NH₂-90-115 H111A participa en la coordinación de Cu(II) al sitio de la His96 en este sistema. En contraste, los espectros de CD de los complejos Cu(II)-(NH₂-90-115 H96A) y Cu(II)-(Ac-92-115 H96A), son prácticamente idénticos, indicando que el grupo NH_2^- no participa en la unión al metal en el complejo Cu(II)-(NH₂-90-115 H96A), siendo entonces la His111 el único sitio importante de anclaje en este sistema.

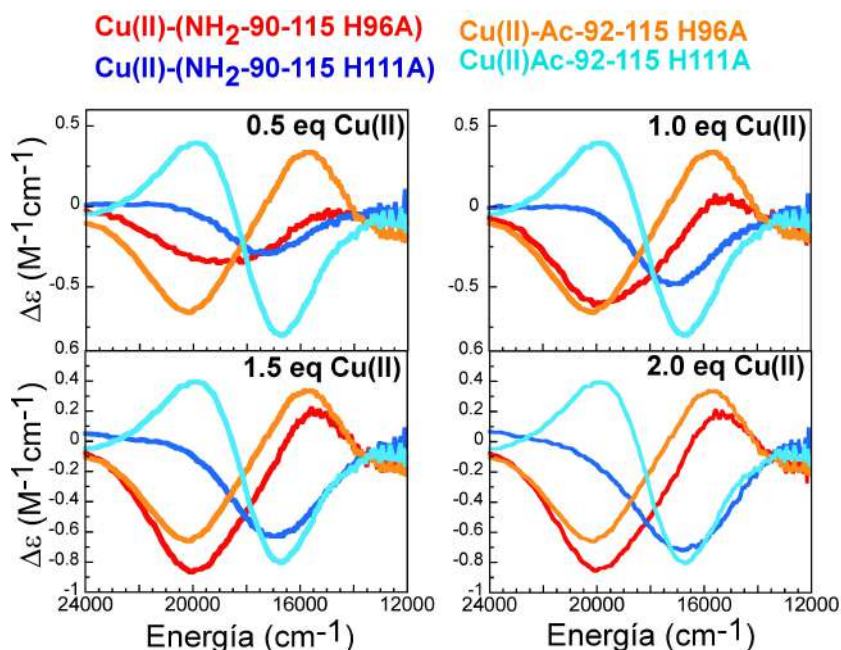


Figura 3.2.14. Comparación de los espectros de CD en la región de 24 000- 12 000 cm^{-1} de los complejos Cu(II)-(NH₂-90-115 H96A) (espectro rojo) y Cu(II)-(NH₂-90-115 H111A) (espectro azul oscuro) contra Cu(II)-(Ac-92-115 H96A) (espectro naranja) y Cu(II)-(Ac-92-115 H111A) (espectro azul claro) a 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 equivalentes de Cu(II).

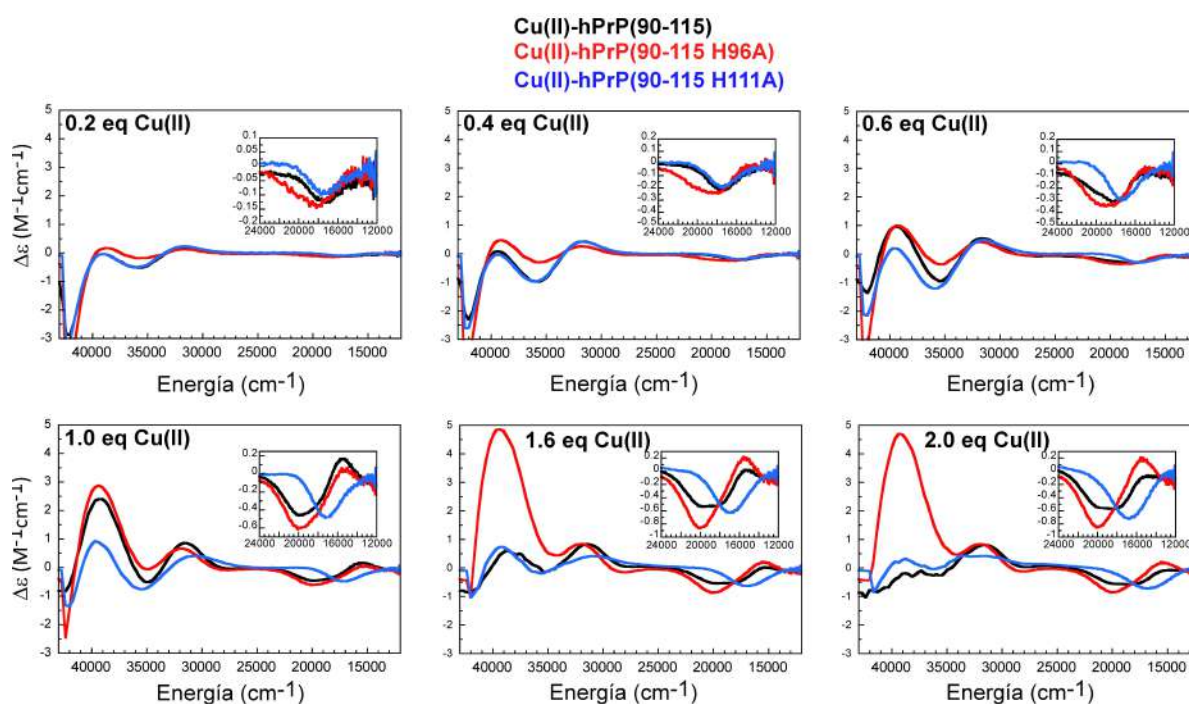


Figura 3.2.15. Comparación de los espectros de CD del complejo Cu(II)-hPrP(90-115) (negro) con los complejos de las variantes Cu(II)-hPrP(90-115 H96A) (rojo) y Cu(II)-hPrP(90-115 H111A) (rojo) a diferentes equivalentes de Cu(II).

Finalmente, se analizaron los espectros de CD del complejo Cu(II)-hPrP(90-115) a diferentes equivalentes de Cu(II), y fueron comparados con sus variantes H96A y H111A (Figura 3.2.15). A bajas concentraciones de Cu(II), 0.2 y 0.4 eq el espectro del complejo Cu(II)-hPrP(90-115) es idéntico al del complejo Cu(II)-hPrP(90-115 H111A), es decir, el metal prefiere unirse al sitio de la His96 y al grupo NH₂- terminal. Sin embargo, a 1.0 eq Cu(II), el espectro del complejo Cu(II)-hPrP(90-115) se asemeja al del complejo Cu(II)-hPrP(90-115 H96A), lo cual indica una preferencia por el sitio de la His111. Finalmente, a mayores concentraciones de Cu(II), los espectros de CD reflejan la presencia de una mezcla de especies, con contribuciones de Cu(II) coordinado a ambos sitios de unión: His111 e His96/NH₂-terminal. De hecho, es posible simular el espectro de CD del complejo Cu(II)-hPrP(90-115) a 2.0 eq de Cu(II) a partir de una combinación lineal 1:1 de los espectros de los complejos (Figura 3.2.16).

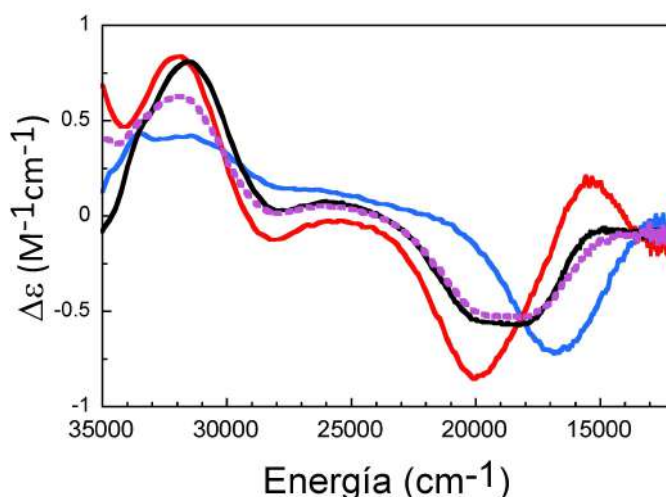
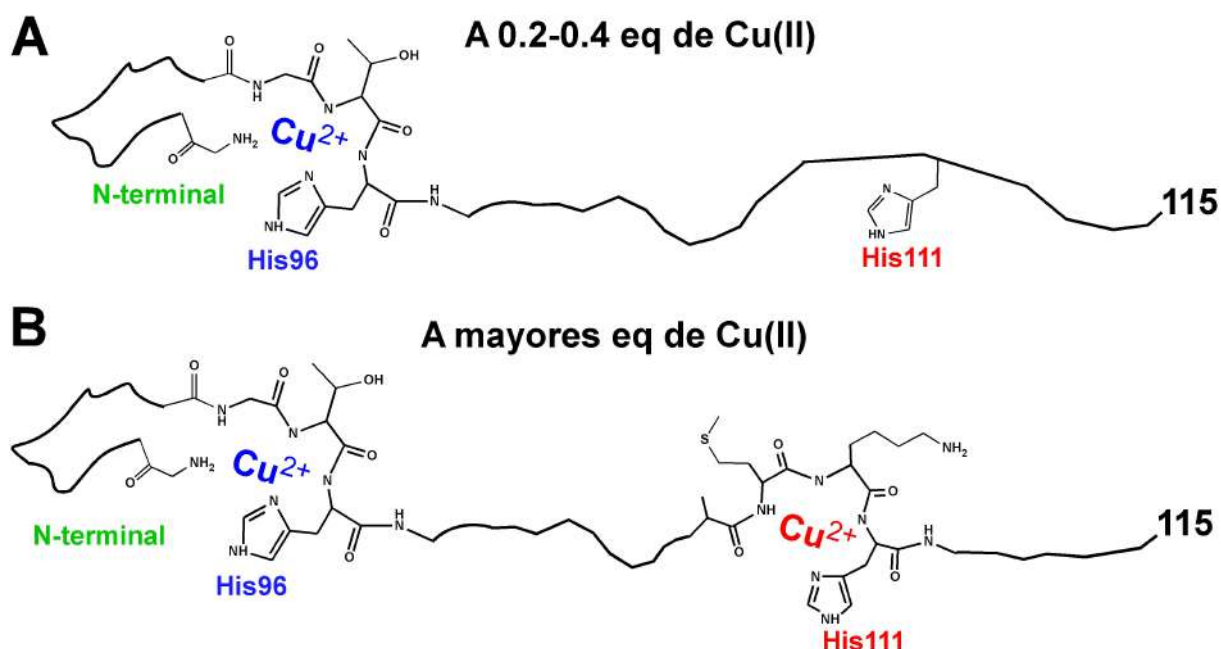


Figura 3.2.16. Comparación de los espectros de CD del complejo Cu(II)-hPrP(90-115) con los complejos Cu(II)-hPrP(90-115 H111A) y Cu(II)-hPrP(90-115 H96A). Se hizo una combinación lineal (línea punteada morada) de los espectros de CD de Cu(II)-hPrP(90-115 H111A) (línea azul) y Cu(II)-hPrP(90-115 H96A) (línea roja) para compararla con el espectro de Cu(II)-hPrP(90-115) (línea negra) a 2.0 eq de Cu(II).

Propuestas de modelos de coordinación de Cu(II) al fragmento hPrP(90-115)

Como se vio a lo largo de esta sección, la coordinación el ion metálico Cu(II) al fragmento C2 del corte β -proteolítico depende de la concentración de Cu(II) presente en el medio, por lo que el Esquema 3.2.2 representa la preferencia de coordinación del Cu(II) por cada uno de los sitios de unión presentes en el péptido hPrP(90-115), en función de la relación Cu(II)-péptido. Estas propuestas surgen a partir de los estudios espectroscópicos de los complejos tanto del presente capítulo, como de los resultados del capítulo 2 de esta tesis.

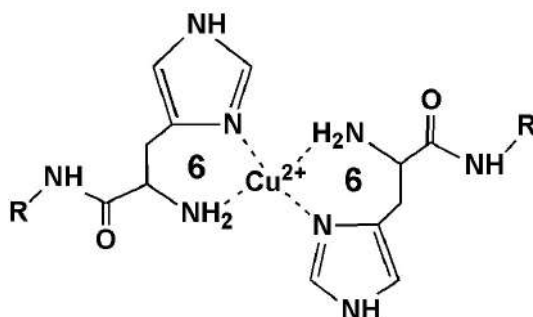


Esquema 3.2.2 Propuestas de modelos de coordinación de Cu(II) unido al péptido hPrP(90-115). A) A bajas concentraciones de Cu(II) 0.2-0.4 eq de Cu(II) y B) a mayores equivalentes de Cu(II).

Discusión y Conclusiones

En el presente capítulo se ha estudiado la coordinación del ion Cu(II) a péptidos que modelan los fragmentos que se producen a partir de los cortes α - y β -proteolíticos que sufre la proteína prion humana. Se encontró que el modo de coordinación del ion metálico a cada fragmento depende en gran medida de la concentración de Cu(II) presente en el medio. Esta propiedad tiene relevancia fisiológica, ya que la proteína prion anclada en la superficie extracelular de las membranas neuronales está expuesta a fluctuaciones importantes en la concentración de cobre. Así, los complejos de coordinación caracterizados en este estudio pueden ser formados en condiciones fisiológicas, cuando la PrP^C sufre cada uno de estos cortes proteolíticos.

La coordinación de Cu(II) al fragmento modelo C1 (corte α -proteolítico) representado con el péptido hPrP(111-115) forma dos diferentes complejos, dependiendo de la cantidad del ion metálico presente en el medio de reacción. A bajas concentraciones de Cu(II), este fragmento forma un complejo Cu(II)-(hPrP(111-115))₂, donde dos moléculas del péptido se unen al ion metálico, usando sus grupos NH₂- terminal libre y los nitrógenos N1 de los imidazoles de His111. En este modo de coordinación, se forman dos anillos quelatos de 6 miembros. Esta coordinación es similar a la observada en el complejo de cobre con histamina (Esquema 3.3.1), y favorece la estabilidad termodinámica del complejo bis-histidina.¹⁹ De acuerdo a estudios de difracción de rayos-X de este complejo,²² el Cu(II) se posiciona en el centro enlazado por dos anillos quelatos de histamina en posición *trans* en el plano ecuatorial. Aunado a esto, se ha reportado que el exceso del ligante previene la desprotonación de las amidas del enlace peptídico favoreciendo este tipo de coordinación.²³



Esquema 3.3.1 Modelo de coordinación tipo *Histamina*.

El estudio de la coordinación de Cu(II) a este tipo de compuestos, ha incluido a péptidos modelos del tipo $\text{NH}_2\text{-HisXYZ}\dots$ ^{19, 24-26} Así, por ejemplo, Jankowska y colaboradores²⁶ estudiaron la coordinación de Cu(II) al decapeptido Neurokinina A (S5A) con secuencia $\text{NH}_2\text{-HKTDAFVGLM}$, y observaron una coordinación del tipo histamina $2x[\text{NH}_2^-, \text{N}_{\text{im}}]$ a pH 7.4. El comportamiento espectroscópico de dicho complejo mostró parámetros de EPR de $g_{\parallel} = 2.233$ y $A_{\parallel} = 189 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$, además de una banda de campo ligando a $14\ 100 \text{ cm}^{-1}$ en su espectro de CD. Todos estos rasgos espectroscópicos son muy similares a los observados en el presente estudio del complejo $\text{Cu(II)-(hPrP(111-115))}_2$ formado a bajas concentraciones de Cu(II).

Por otro lado, al trabajar en una relación estequiométrica 1:1, Cu(II):péptido, la coordinación de Cu(II) al péptido hPrP(111-115) involucra nitrógenos de amida de la cadena peptídica, el NH_2^- terminal y átomos de oxígeno que completan la esfera de coordinación al metal. La interacción $\text{Cu(II)-N}^-(\text{amida})$ tiene lugar debido a que la presencia del ion metálico promueve la desprotonación de la amida del enlace peptídico, bajando el valor de pK_a de sus hidrógenos y facilitando la formación de un enlace de coordinación Cu-N altamente covalente.^{19, 27, 28} Así, se propuso que la coordinación del Cu(II) a relación 1:1 Cu(II):péptido involucraría al NH_2^- terminal, a la primera amida desprotonada de la cadena peptídica perteneciente al residuo de His111, átomos de oxígenos provenientes de moléculas de agua y/o de carbonilos y probablemente el grupo imidazol de la His111. Esto último debido a que el anillo de imidazol, por su rigidez, quedaría bastante impedido para participar en un enlace de coordinación, al mismo tiempo que la amida desprotonada. Esto se ilustra en un estudio con un dipéptido que contiene el NH_2^- libre del N-terminal y el residuo de histidina en posición 1 ($\text{NH}_2\text{-His-Gly}$).²¹ En este estudio, los autores proponen la coordinación de Cu(II) únicamente al nitrógeno de la amida desprotonada, al NH_2^- y a oxígenos de carbonilos. Así, la participación del imidazol se restringe debido a la planaridad del anillo, el cual dificulta su coordinación al metal, incluso en una posición axial, convirtiéndolo en un ligante débil o incluso, no coordinante.

La coordinación de Cu(II) al fragmento modelo C2 del corte β -proteolítico también presentó dependencia en la unión Cu(II)-péptido con respecto al número de equivalentes del ion metálico. Los dos modos de coordinación predominantes en este fragmento consisten de:

un sitio de His96 con el grupo NH₂⁻, y el sitio de la His111 como la conocemos en los fragmentos estudiados anteriormente (Capítulo 2). En presencia de bajos equivalentes de Cu(II), se favorece la coordinación del metal en el sitio del NH₂⁻ terminal y la His96; mientras el sitio de la His111 es favorecido al alcanzar una relación 1:1 Cu(II):péptido. Resulta interesante comparar lo encontrado en este estudio con otros fragmentos peptídicos que incluyen histidinas en su secuencia y el grupo amino terminal libre (NH₂⁻). Un ejemplo es el péptido angiotensina II (AT2) con secuencia NH₂-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe, que posee el grupo NH₂⁻ terminal y un residuo de histidina en la posición 6, en una disposición similar a la del fragmento C2. A valores de pH por debajo de 8.0, el Cu(II) se coordina al AT2 únicamente al sitio de la histidina²⁹ y amidas desprotonadas de la cadena peptídica; sin embargo, a valores de pH por arriba de 8 y 9, la coordinación se da únicamente en el sitio del NH₂⁻ terminal. En contraste con nuestro estudio de la variante hPrP(90-115 H111A) a pH 7.5 indica que el ion metálico se une tanto a la His96 en la posición 6 de su secuencia, como también al grupo NH₂⁻ terminal. Este modo de coordinación requiere de un cambio conformacional de la cadena peptídica que permita la participación de ambos grupos en la esfera de coordinación del metal. Es probable que la formación de este quelato no sea posible en el caso del péptido AT2 debido a la naturaleza de sus residuos que se encuentran entre el grupo NH₂⁻ y la His.

El presente estudio ayuda a entender cómo el Cu(II) se coordina a la proteína prion humana después de sufrir los cortes α - y β -proteolíticos, dos modificaciones postraduccionales que generan fragmentos de la proteína que pueden ser fisiológicamente relevantes para su función y/o para la etiología de las enfermedades crónicas.

El corte α -proteolítico provee dos fragmentos N1 (23-110) y C1 (111-254), que pueden coordinar al ion Cu(II). El fragmento N1 puede coordinar Cu(II) en la región del octarepeat³⁰ y en el sitio de la His96;³¹ mientras que el C1, como se demostró en este trabajo, coordina Cu(II) en los sitios del NH₂⁻ terminal y la His111. Aun no queda claro si existe una conexión directa entre la interacción de Cu(II) con la proteína y su corte α -proteolítico. Sin embargo, un estudio ha reportado que el corte α -proteolítico de la proteína prion humana incrementa en presencia del ion Cu(II),² aunque el mecanismo implicado aun se desconoce. Una posible explicación es que el cobre, al unirse a la PrP^C, podría modular su microambiente o

conformación, alterando la composición de la balsa lipídica de la que emerge PrP^C.¹³ Por otro lado, se han identificado las proteasas responsables del corte α -proteolítico de la proteína prion humana, las cuales a pesar de ser metaloproteasas (ADAM)¹ no dependen de Cu(II), sino de Zn(II). Un estudio realizado por McDonald y colaboradores ha propuesto que la unión directa de Cu(II) a PrP^C suprime el corte α -proteolítico realizado por metaloproteasas, debido a que impide que el sustrato polipeptídico entre en el sitio activo de la enzima.⁸

La PrP^C después de sufrir el corte α -proteolítico, deja al fragmento C1 anclado a la membrana celular, el cual sigue teniendo la capacidad de unir iones Cu(II) por sus grupos NH₂-terminal e His111. El péptido modelo estudiado en el presente trabajo, ayudó a entender los diferentes modos de coordinación de Cu(II) al fragmento C1, los cuales podrían tener un impacto en la función de la PrP^C. Varios reportes han planteado que la PrP^C unida a Cu(II) puede sufrir internalización celular e iniciar vías de señalización,^{13, 32} o incluso influir en la actividad de receptores de NMDA (*N-metil-D-aspartato*).¹⁰ Por lo tanto, la PrP^C después de sufrir el corte α -proteolítico, y dejando al fragmento C1, seguiría conservando sitios de unión a Cu(II), y más aún, manteniendo en su secuencia un residuo de metionina (Met112) que podría estabilizar la forma reducida del metal. Finalmente, la unión de Cu(II) al fragmento C1 mostró variaciones en los modos de coordinación dependientes de la concentración del ion metálico, las cuales podrían modular los cambios conformacionales asociados a la proteína prion en la región del C-terminal, e influir en su estructura y actividad.

A diferencia del corte α -proteolítico, la participación del cobre ha sido directamente asociada al corte β -proteolítico de la proteína prion humana.^{11, 12} Se ha reportado que la PrP^C sufre este corte y produce los fragmentos N2 y C2, a partir de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) promovida por la presencia de Cu(II) en una reacción tipo Fenton.^{11, 12} Así, cuando el cobre se une a la proteína, la reacción redox puede generar localmente ROS, que a su vez pudieran reaccionar en sitios específicos de la proteína, perjudicando la actividad o resultando en un corte,¹² aunque el mecanismo molecular por el cual se lleva a cabo aun se desconoce.

El corte β -proteolítico divide a la PrP^C en los fragmentos N2 (23-89) y C2 (90-254), y ambos conservan su capacidad para coordinar cobre. El fragmento N2 posee toda la región del octarepeat y une Cu(II) como ya se ha descrito para esa región, es decir, sus propiedades de coordinación al metal no se ven modificadas por el corte proteolítico. En contraste, el fragmento C2 contiene en su secuencia a los sitios de His96 e His111, además del grupo NH₂-terminal, el cual queda libre después de que se lleva a cabo el corte proteolítico. El presente estudio demuestra que la presencia del grupo NH₂-terminal libre impacta de manera importante las propiedades de coordinación de los sitios de His96 e His111, dando lugar a modos de coordinación diferentes a los previamente caracterizados.^{28, 33, 34}

Los resultados presentados en este estudio mostraron que el ion metálico Cu(II) se sigue uniendo a la proteína prion humana aún después de sufrir modificaciones de cortes α - y β -proteolíticos, aunque con diferentes modos de coordinación comparados con su forma intacta. En ambos cortes, se desprende la región del octarepeat, de tal forma que la unión del metal a los fragmentos de la PrP^C que permanecen anclados a la membrana neuronal involucra únicamente los sitios de las His96 e His111. El entendimiento del modo en el que se coordina el Cu(II) a la proteína prion humana en sus distintas formas ayudará a comprender mejor el papel que juega la unión de este metal en la función de la proteína y/o la etiología de las enfermedades priónicas.

Perspectivas

Aunque en el presente estudio se ha avanzado en elucidar cómo se coordina el Cu(II) a los fragmentos de la PrP^C que resulta de los cortes α - y β -proteolíticos, quedan aun varias interrogantes respecto a los modos de coordinación formados. Un estudio más detallado de la coordinación del Cu(II) a los fragmentos C1 y C2 ayudaría a discernir qué átomos específicamente están unidos al metal, incluyendo la identificación de las amidas de las cadena peptídica que participan en la esfera de coordinación, y la participación de moléculas de agua, entre otras. Asimismo, resulta relevante entender las propiedades redox de estos sitios, y evaluar si efectivamente pueden contribuir a la generación de ROS, como se ha propuesto en algunos casos. Para ello, sería importante estudiar la coordinación de cobre en su forma reducida, Cu(I), a estos fragmentos C1, y evaluar si estos sitios soportan ciclos redox del metal. El evaluar la capacidad de estos fragmentos para coordinar Cu(II) también abonaría a entender si la forma truncada de la proteína aun podría internalizarse al espacio intracelular manteniendo al cobre coordinado, transportando así al metal.

Finalmente, los péptidos modelo estudiados aquí, y variantes de ellos que contengan a la región hidrofóbica que es clave para la agregación amiloide, podrían ayudar a entender mejor la química-biológica inorgánica de la proteína prion y su interacción con el ion metálico cobre, para responder preguntas acerca de la función de la proteína o su papel en la etiología de la enfermedad.

Referencias

1. Altmepfen, H. C.; Puig, B.; Dohler, F.; Thurm, D. K.; Falker, C.; Krasemann, S.; Glatzel, M. Proteolytic processing of the prion protein in health and disease. *Am. J. Neurodegener. Dis.* **2012**, *1*, 15-31.
2. Haigh, C. L.; Lewis, V. A.; Vella, L. J.; Masters, C. L.; Hill, A. F.; Lawson, V. A.; Collins, S. J. PrPC-related signal transduction is influenced by copper, membrane integrity and the alpha cleavage site. *Cell Res* **2009**, *19*, 1062-1078.
3. Liang, J.; Kong, Q. alpha-Cleavage of cellular prion protein. *Prion* **2012**, *6*, 453-460.
4. Jiménez-Huete, A.; Lievens, P. M. J.; Vidal, R.; Piccardo, P.; Ghetti, B.; Tagliavini, F.; Frangione, B.; Prelli, F. Endogenous Proteolytic Cleavage of Normal and Disease-Associated Isoforms of the Human Prion Protein in Neural and Non-Neural Tissues. *Am. J. Pathol.* **1998**, *153*, 1561-1572.
5. Mangé, A.; Béranger, F.; Peoc'h, K.; Onodera, T.; Frobert, Y.; Lehmann, S. Alpha- and beta- cleavages of the amino-terminus of the cellular prion protein. *Biol Cell* **2004**, *96*, 125-132.
6. Chen, S. G.; Teplow, D. B.; Parchi, P.; Teller, J. K.; Gambetti, P.; Autilio-Gambetti, L. Truncated forms of the human prion protein in normal brain and in prion diseases. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 19173-19180.
7. Walmsley, A. R.; Watt, N. T.; Taylor, D. R.; Perera, W. S.; Hooper, N. M. alpha-cleavage of the prion protein occurs in a late compartment of the secretory pathway and is independent of lipid rafts. *Mol. Cell Neurosci.* **2009**, *40*, 242-8.
8. McDonald, A. J.; Dibble, J. P.; Evans, E. G. B.; Millhauser, G. L. A New Paradigm for Enzymatic Control of alpha-Cleavage and beta-Cleavage of the Prion Protein. *J. Biol. Chem.* **2013**, *289*, 803-813.
9. Altmepfen, H. C.; Prox, J.; Puig, B.; Dohler, F.; Falker, C.; Krasemann, S.; Glatzel, M. Roles of endoproteolytic alpha-cleavage and shedding of the prion protein in neurodegeneration. *FEBS J* **2013**, *280*, 4338-47.
10. Black, S. A.; Stys, P. K.; Zamponi, G. W.; Tsutsui, S. Cellular prion protein and NMDA receptor modulation: protecting against excitotoxicity. *Front. Cell Dev. Biol.* **2014**, *2*, 45.
11. Watt, N. T.; Taylor, D. R.; Gillott, A.; Thomas, D. A.; Perera, W. S.; Hooper, N. M. Reactive oxygen species-mediated beta-cleavage of the prion protein in the cellular response to oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 35914-35921.
12. McMahon, H. E.; Mangé, A.; Nishida, N.; Créminon, C.; Casanova, D.; Lehmann, S. Cleavage of the amino terminus of the prion protein by reactive oxygen species. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 2286-2291.
13. Haigh, C. L.; Marom, S. Y.; Collins, S. J. Copper, endoproteolytic processing of the prion protein and cell signalling. *Front. Biosci.* **2010**, *15*, 1086-1104.
14. Hanson, G.; Berliner, L. *High Resolution EPR. Applications to metalloenzymes and metals in medicine.* 2009; Vol. 28.
15. Peisach, J.; Blumberg, W. E. Structural implications derived from the analysis of electron paramagnetic resonance spectra of natural and artificial copper proteins. *Arch. Biochem Biophys.* **1974**, *165*, 691-708.
16. Bertini, I.; Luchinat, C.; Parigi, G.; Pierattelli, R. NMR spectroscopy of paramagnetic metalloproteins. *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1536-1549.
17. Bertini, I.; Luchinat, C. *Coord Chem Rev* **1996**, *150*, 1-292.
18. Gaggelli, E.; Kozłowski, H.; Valensin, D.; Valensin, G. NMR studies on Cu(II)-peptide complexes: exchange kinetics and determination of structures in solution. *Mol Biosyst* **2005**, *1*, 79-84.
19. Sóvágó, I.; Kállay, C.; Várnagy, K. Peptides as complexing agents: Factors influencing the structure and thermodynamic stability of peptide complexes. *Coord Chem Rev* **2012**, *256*, 2225-2233.
20. Kozłowski, H.; Bal, W.; Dyba, M.; Kowalik-Jankowska, T. Specific structure-stability relations in metallopeptides. *Coord Chem Rev* **1999**, *184*, 319-346.
21. Brookes, G.; Pettit, L. D. Thermodynamics of Formation of Complexes of Copper(II) and Nickel(II) Ions with Glycylhistidine P-Alanylhistidine and Histidylglycine. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1975**, 2112-2117.
22. Su, C.-C.; Chang, T.-Y. Bonding Properties of Cu(II)-N-Chromophores: Spectroscopy and Electronic Structures of Histamine Copper(II) Complexes. Molecular Structures of Bis (Histamine) Bis (Perchlorato) Copper (II) and Chloroethylenediaminehistamine-Copper(II) Chloride. *J. Coord. Chem.* **1994**, *31*, 79-92.
23. Sóvágó, I.; Farkas, E.; Gergely, A. Studies on Transition-metal-Peptide Complex_Part7_Copper(II) complexes of deipeptides containing L-histidine. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1982**, 2159-2163.

24. Migliorini, C.; Witkowska, D.; Valensin, D.; Kamysz, W.; Kozłowski, H. Competition between histamine-like and poly-imidazole coordination sites for Cu(2+) and Zn(2+) ions in zebra-fish peptide of prion-like protein. *Dalton Trans* **2010**, 39, 8663-70.
25. Pappalardo, G.; Impellizzeri, G.; Bonomo, R. P.; Campagna, T.; Grasso, G.; Saita, M. G. Copper(ii) and nickel(ii) binding modes in a histidine-containing model dodecapeptide. *New J. Chem.* **2002**, 26, 593-600.
26. Jankowska, E.; Blaszak, M.; Kowalik-Jankowska, T. Copper(II) complexes of neurokinin A with point mutation (S5A) and products of copper-catalyzed oxidation; role of serine residue in peptides containing neurokinin A sequence. *J Inorg Biochem* **2013**, 121, 1-9.
27. Sigel, H.; Martin, R. B. Coordinating Properties of the Amide Bond. Stability and Structure of Metal Ion Complexes of Peptides and Related Ligands. *Chem Rev* **1982**, 82, 385-426.
28. Rivillas-Acevedo, L.; Grande-Aztatzi, R.; Lomelí, I.; García, J. E.; Barrios, E.; Teloxa, S.; Vela, A.; Quintanar, L. Spectroscopic and electronic structure studies of copper(II) binding to His111 in the human prion protein fragment 106-115: evaluating the role of protons and methionine residues. *Inorg Chem* **2011**, 50, 1956-1972.
29. Brigitte Decock-Le Reverend; Ferid Liman; Livera, C.; Pettit, L. D.; Pyburn, S.; Kozłowski, H. A potentiometric and spectroscopic study of the interaction of Angiotensin II and some of its peptide fragments with copper(II). *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1988**, 887-894.
30. Chattopadhyay, M.; Walter, E. D.; Newell, D. J.; Jackson, P. J.; Aronoff-Spencer, E.; Peisach, J.; Gerfen, G. J.; Bennett, B.; Antholine, W. E.; Millhauser, G. L. The Octarepeat Domain of the Prion Protein Binds Cu(II) with Three Distinct Coordination Modes at pH 7.4. *J Am Chem Soc* **2005**, 127, 12647-12656.
31. Hureau, C.; Charlet, L.; Dorlet, P.; Gonnet, F.; Spadini, L.; Anxolabéhère-Mallart, E.; Girerd, J. J. A spectroscopic and voltammetric study of the pH-dependent Cu(II) coordination to the peptide GGGTH: relevance to the fifth Cu(II) site in the prion protein. *J Biol Inorg Chem* **2006**, 11, 735-744.
32. Ren, K.; Gao, C.; Zhang, J.; Wang, K.; Xu, Y.; Wang, S. B.; Wang, H.; Tian, C.; Shi, Q.; Dong, X. P. Flotillin-1 mediates PrPc endocytosis in the cultured cells during Cu(2+)(+) stimulation through molecular interaction. *Mol Neurobiol* **2013**, 48, 631-46.
33. Grande-Aztatzi, R.; Rivillas-Acevedo, L.; Quintanar, L.; Vela, A. Structural models for Cu(II) bound to the fragment 92-96 of the human prion protein. *J Phys Chem B* **2013**, 117, 789-799.
34. Arcos-López, T.; Qayyum, M.; Rivillas-Acevedo, L.; Miotto, M. C.; Grande-Aztatzi, R.; Fernández, C. O.; Hedman, B.; Hodgson, K. O.; Vela, A.; Solomon, E. I.; Quintanar, L. Spectroscopic and Theoretical Study of Cu(I) Binding to His111 in the Human Prion Protein Fragment 106-115. *Inorg Chem* **2016**, 55, 2909-2922.



Cinvestav

Capítulo 4.

Interacciones alostéricas de la Proteína Prion: Cu(II) y ácidos nucleicos

Capítulo 4.

Interacciones alostéricas de la Proteína Prion: Cu(II) y ácidos nucleicos

Antecedentes

Interacciones alostéricas de la PrP^C

La proteína prion es una proteína de membrana que se encuentra anclada a la superficie extracelular¹ (Figura 4.1.1), y está expresada principalmente en el sistema nervioso central, aunque su contenido varía entre las distintas zonas del cerebro. Sin embargo, también puede expresarse en diferentes órganos y tejidos como intestino, estómago, riñón, etc.² Como ya se vio en los capítulos anteriores, esta proteína está involucrada en las enfermedades priónicas neurodegenerativas, debido a su plegamiento anormal de PrP^C a PrP^{Sc}.¹ La función de la proteína prion esta aún en discusión, no obstante se le ha asociado principalmente en eventos de señalización celular.

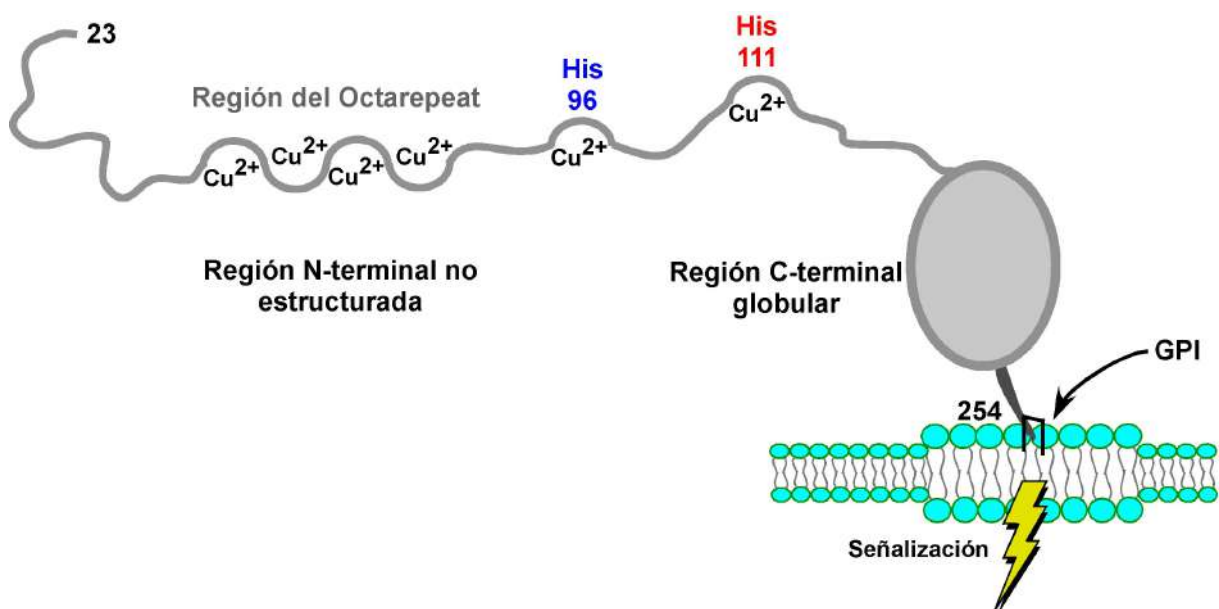


Figura 4.1.1 Representación esquemática de la PrP^C con sus regiones claves: región del octarepeat, sitios de His96 y 111, y puente GPI, rayo amarillo representa la vía de señalización; la numeración representa el número de residuo en la secuencia humana.

Así, la PrP^C interactúa con proteínas de la superficie celular, lo cual activa diferentes vías de señalización. Esto sugiere que PrP^C actúa como una plataforma dinámica, reuniendo diferentes proteínas en un ensamble macromolecular, permitiendo así una señalización extracelular para ser transferida al citosol.² Esta interacción de la proteína prion con los diferentes receptores proteicos contribuye a que pueda llevarse a cabo la endocitosis, de hecho se ha visto que el ion Cu(II) puede regular dicho proceso.^{3,4} Otra característica en esta vía de internalización, es que la proteína se enfrenta a diferentes ambientes de pH, como por ejemplo, las condiciones de acidificación en las vesículas endolíticas (~pH 5.5). Se ha propuesto que el pH no afecta de manera significativa la estructura tridimensional de la proteína, sin embargo, puede modificar su estabilidad y afinidad por la unión a sus receptores.^{5,6}

El estudio de la interacción del ion Cu(II) con la PrP^C y las modificaciones en la estructura de la proteína inducidas por metal, han sido bastante exploradas.^{7,8} Se ha reportado que Cu(II) unido en la región no-octarepeat es capaz de inducir interacción entre la región N-terminal y C-terminal de la proteína. Los sitios de coordinación a Cu(II) situados en los residuos de His96 y 111 se aproximan a los residuos que se encuentran en la región del C-terminal, Ile139 y Asp147. Asimismo, también se reportó una interacción de la región del octarepeat (60-90) con Cu(II) y los residuos 174-185.⁹ Adicional a esto, se ha visto que la PrP^C cargada con Cu(II) puede interactuar con derivados de heparán sulfato (polisacárido),¹⁰ y más aún, la unión de Cu(II) a PrP^C puede estar influenciada por el grado de glicosilación de la proteína.³ Recordemos que la proteína prion esta glicosilada en los residuos de asparaginas 181 y 197.¹¹ De igual forma, esta asociación de PrP^C con Cu(II) puede formar complejos con la proteína flotilina-1, una proteína asociada a membrana que participa en la vía de internalización, lo cual ayuda a que el proceso de endocitosis de la proteína prion se lleve a cabo y permita la señalización celular y/o incluso, el metabolismo de cobre.⁴

Por otro lado, otros ligantes que han sido explorados en la unión a PrP^C son los ácidos nucleicos. Estos ligantes han sido estudiados más por su relevancia en la conversión de la PrP^C a PrP^{Sc} que como ligantes involucrados en la función de la proteína. Ejemplos de ello se

encuentran en el estudio de la formación de complejos PrP-Ácidos Nucleicos. Algunos tipos de oligonucleótidos pueden tener actividad anti-scrapie; aptámeros de ARN pueden usarse para la detección de la PrP^{Sc} debido a su unión selectiva a la isoforma rica en hojas- β ; aptámeros de ADN pueden unir selectivamente a la forma normal PrP^C, los cuales pueden ser aplicados como herramientas terapéuticas; anticuerpos anti-ADN pueden capturar a PrP^{Sc}, lo cual sugiere el desarrollo de nuevas estrategias para el estudio, detección y tratamiento de enfermedades priónicas.^{12, 13} Por otra parte, estudios de RMN y SAXS (dispersión de rayos-X a bajos ángulos) han caracterizado estructuralmente la interacción de un oligonucleótido de doble cadena con la PrP^C.¹² Los resultados han demostrado interacción del dominio globular de la proteína prion con el ácido nucleico en la vecindad de los residuos de His96 y His111 (residuos que ya conocemos como sitios de unión a Cu(II) dependientes del pH) e His140. El estudio de la interacción proteína prion-ácido nucleico a nivel fisiológico ha planteado la posible unión de este ligante con la proteína a nivel del núcleo celular y citoplasma.¹³ Sin embargo, aun se sigue planteando la pregunta de su relevancia fisiológica.

La interacción de la proteína prion con ácidos nucleicos u otras macromoléculas puede presentarse en presencia de iones Cu(II). Considerando que la PrP^C une cobre *in vivo*,¹⁴ entonces surge la pregunta de si estas interacciones macromoleculares toman lugar o no cuando en la PrP^C está unida a cobre. Así, en el presente capítulo estudiamos la interacción del Cu(II) con dos fragmentos peptídicos de la proteína prion que incluyen los sitios de His111 e His140 en presencia de un oligonucleótido, evaluando si es posible formar complejos ternarios Cu(II)-PrP-ácido nucleico.

Objetivo General

Evaluar la formación de complejos ternarios entre fragmentos peptídicos de la proteína prion, el ion metálico Cu(II) y ácidos nucleicos.

Objetivos Específicos

- Elucidar los complejos de coordinación de los fragmentos peptídicos 106-126 y 109-149 con el ion Cu(II), usando espectroscopias de CD y EPR.
- Estudiar la interacción Cu(II)-ácido nucleico usando espectroscopias de CD y EPR.
- Evaluar la formación de los complejos ternarios Cu(II)-Péptido-Ácido nucleico en diferentes condiciones de pH.

Resultados y Análisis

Coordinación de Cu(II) a la His111 en los fragmentos 106-126 y 109-149

Fragmento hPrP(106-126)

Se estudió la coordinación de Cu(II) al péptido hPrP(106-126) KTNMKHMAGAAAAGAVVGLG el cual contiene al sitio de la His111 y a los residuos hidrofóbicos de la región 115-126. Una solución del péptido se tituló con Cu(II) a pH 7.5 (Figura 4.2.1). Todas las señales saturaron a 1.0 eq Cu(II), por lo que la estequiometría exhibida Cu(II):Péptido fue 1:1. Se comparó el comportamiento del complejo formado con el del fragmento más corto 106-115,¹⁵ y las características espectroscópicas fueron idénticas. Este resultado indica que la coordinación de Cu(II) al péptido hPrP(106-126) no involucra a los residuos hidrofóbicos en la esfera de coordinación del metal. Se hizo también el estudio por EPR a diferentes valores de pH (5.5, 6.5 7.5 y 8.5), y se determinaron los valores de g_{\parallel} y A_{\parallel} (Figura 4.2.2 y Tabla 4.2.1).

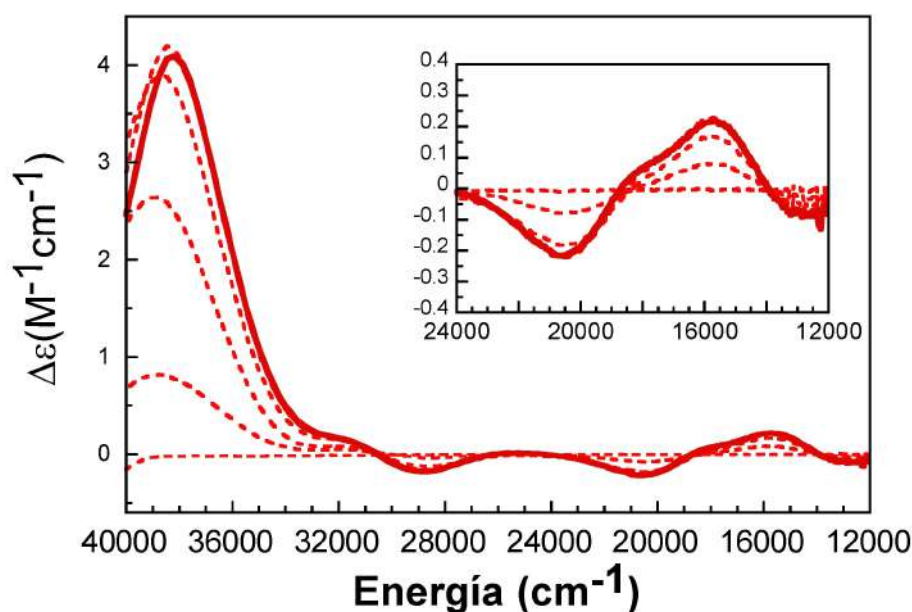
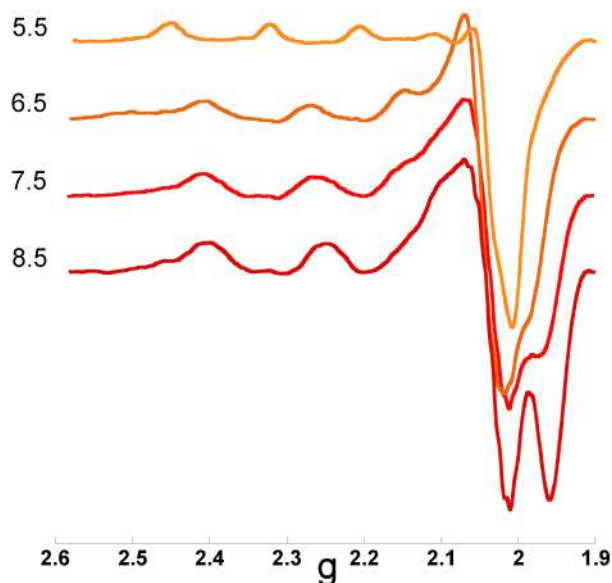


Figura 4.2.1. Titulación de Cu(II) del fragmento hPrP(106-126) a pH 7.5. Las líneas de color rojo punteadas corresponden a la condición de 0, 0.2, 0.4, 0.6 y 0.8 eq Cu(II), y la línea de color roja continua corresponde a 1.0 eq Cu(II).



Cu(II)-hPrP(106-126)			
pH	g_{\parallel}	A_{\parallel}^*	Modo de coordinación
5.5	2.290	160	2N2O
6.5	2.227	174	3N1O
7.5	2.222	176	3N1O/4N
8.5	2.200	192	4N

*x 10⁻⁴ cm⁻¹

Figura 4.2.2. y Tabla 4.2.1 Espectros de EPR del complejo Cu(II)-hPrP(106-126) a valores de pH 5.5, 6.5, 7.5 y 8.5 y sus valores g_{\parallel} y A_{\parallel} con los modos de coordinación para cada caso.

Los parámetros de EPR del complejo Cu(II)-hPrP(106-126) son idénticos a los del complejo Cu(II)-hPrP(106-115),¹⁵ y muestran una dependencia con el pH similar. Para evaluar esto, se hizo una titulación potenciométrica del complejo y se determinó su valor de pK_a a dos diferentes energías: 19 841 cm⁻¹ y 15 723 cm⁻¹ (Figura 4.2.3).

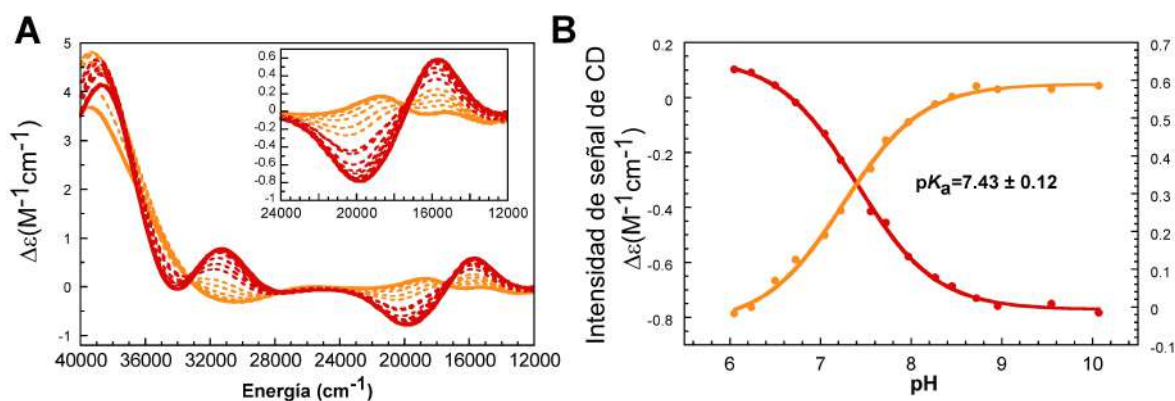
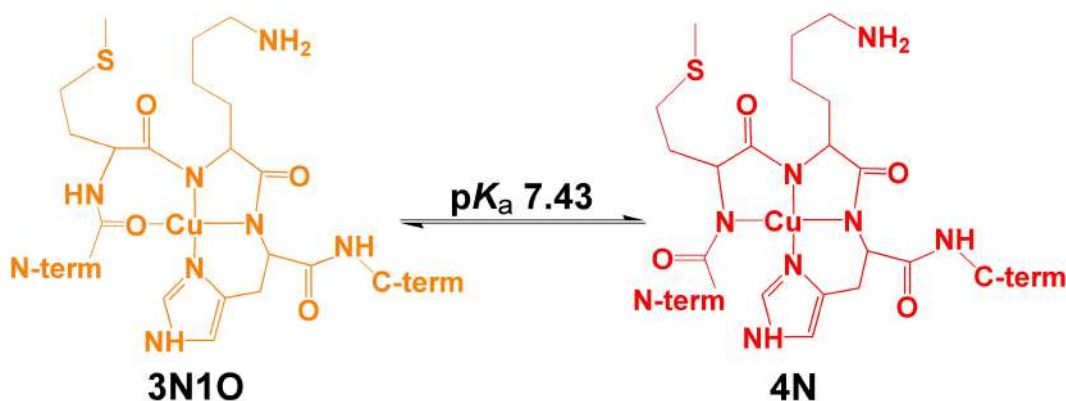


Figura 4.2.3. (A) Espectros de CD del complejo Cu(II)-hPrP(106-126) obtenidos a partir de un barrido a diferentes condiciones de pH. (B) Trazas de las intensidades de la señales de CD en función del pH para el cálculo de pK_a . Ver texto.

El valor de pK_a para el complejo Cu(II)-hPrP(106-126) fue de 7.43 ± 0.12 , prácticamente idéntico al de su análogo 106-115, presentando una mezcla de especies 3N1O y 4N a pH fisiológico (Esquema 4.2.1).



Esquema 4.2.1. Equilibrio de protonación del complejo Cu(II)-hPrP(106-126) con un pK_a de 7.43 pasando de un ambiente de coordinación 3N1O a 4N.

Fragmento hPrP(109-149)

Se estudió la coordinación de Cu(II) al fragmento 109-149 con secuencia MKHMAGAAAAGAVVGGGLGGWMLGSAMSRPMMHFGNDWEDRY, el cual integra al sitio de la His111 y a la región hidrofóbica que contiene un residuo de histidina más, His140. Esta histidina se encuentra justo en una curvatura de la estructura secundaria y en donde comienza la primera α -hélice de la región estructurada de la proteína.

La unión del ion Cu(II) al fragmento 109-149 se estudió por espectroscopia de CD y EPR. Debido a la baja solubilidad del péptido en las soluciones amortiguadoras ya utilizadas a lo largo del trabajo, se optó por utilizar una solución de urea. Cabe resaltar que la urea no compite con la formación del complejo Cu(II)-109-149 (Figura 4.2.4).

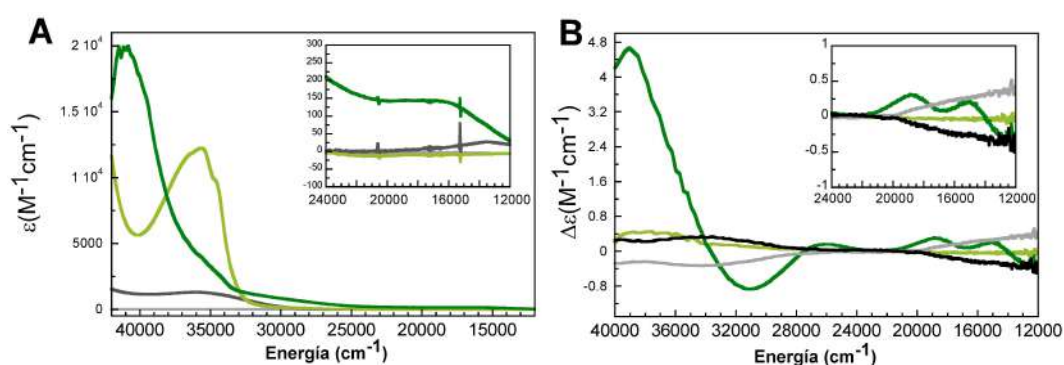


Figura 4.2.4. Espectros de (A) absorción electrónica y de CD en la región UV/Vis (B) del péptido hPrP(109-149) en ausencia (línea verde clara) y presencia de 0.8 eq Cu(II) (línea verde oscuro); y de urea 6M en ausencia (línea gris) y presencia de 0.8 eq Cu(II) (línea negra), a pH 7.5

Así, se tituló con Cu(II) una solución que contenía al péptido en urea, a pH 7.5 hasta la total saturación de señales (Figura 4.2.5). La estequiometría de unión fue 1:1 Cu(II):péptido, indicando que sólo hay un sitio de unión a Cu(II) a pesar de la presencia del otro residuo de histidina en la posición 140. No obstante, la comparación de los espectros de CD de este complejo Cu(II)-hPrP(109-149) con el complejo Cu(II)hPrP(106-126) a pH 7.5 presentan grandes diferencias en comportamiento.

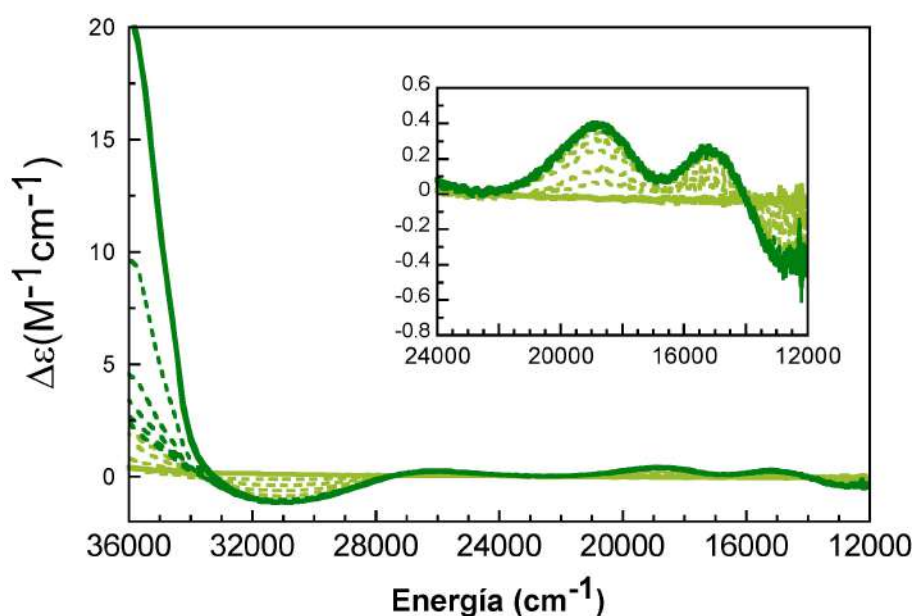


Figura 4.2.5. Titulación de Cu(II) del fragmento hPrP(109-149) a pH 7.5. Las líneas de color verde claro punteadas corresponden a la condición de 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 eq Cu(II); las líneas de color verde oscuro punteado a 1.2, 1.4, 1.6 y 1.8 eq Cu(II); y la línea de color verde oscuro continua corresponde a 2.0 eq Cu(II).

La Figura 4.2.6 compara los espectros de CD de los complejos Cu(II)-hPrP(109-149) y Cu(II)-hPrP(106-126) a pH 7.5, mostrando que no se está formando la misma especie a pesar de que en ambos fragmentos sólo hay un sitio de unión a Cu(II).

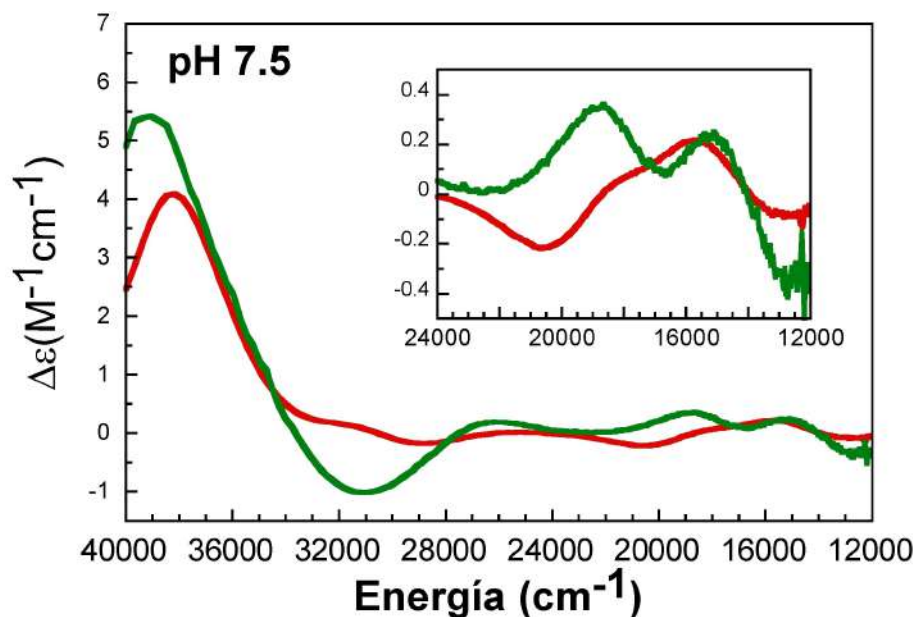


Figura 4.2.6. Comparación de espectros de CD de los complejos Cu(II)-hPrP(109-149) (línea verde) y Cu(II)-hPrP(106-126) (línea rojo) a pH 7.5.

Estas diferencias podrían ser atribuidas a que los dos complejos Cu(II)-hPrP(109-149) y Cu(II)-hPrP(106-126) tuvieran diferentes valores de pK_a . Como ya se vio anteriormente, el complejo Cu(II)-hPrP(106-126) tiene un pK_a de 7.43 asociado a especies 3N10 y 4N. En contraste, para el complejo Cu(II)-hPrP(109-149), el modo de coordinación no parece cambiar en el rango de pH de 6.5 a 8.5, a juzgar por los espectros de CD que no presentan cambios significativos (Figura 4.2.7).

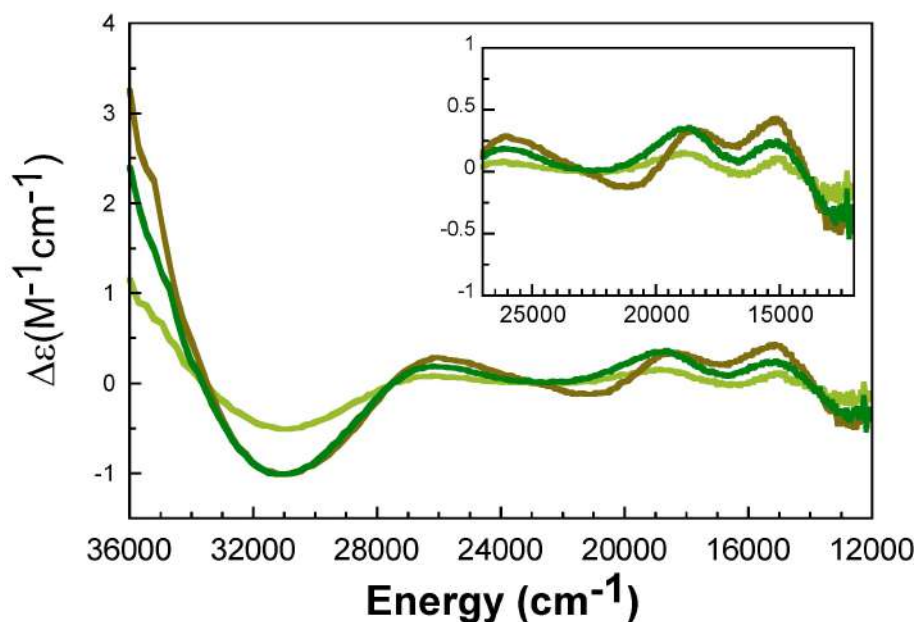


Figura 4.2.7 Espectros de CD del complejo Cu(II)-hPrP(109-149) a diferentes valores de pH: 6.5 (línea verde clara), 7.5 (línea verde oscura) y 8.5 (línea café).

Se intentó determinar el valor de pK_a para el complejo Cu(II)-hPrP(109-149), sin embargo no fue posible debido a la baja solubilidad del péptido, lo que nos hizo tomar una estrategia diferente para este estudio. Se sintetizó y estudió un péptido más corto, hPrP(109-112), que comienza con el residuo 109, incluye sitio de la His111, pero no contiene los residuos hidrofóbicos que causan problemas de solubilidad. Los espectros de CD a pH 7.5 de los complejos Cu(II)-hPrP(109-149) y Cu(II)-hPrP(109-112) se muestran en la Figura 4.2.8. Claramente, ambos complejos exhiben las mismas señales, indicando que el fragmento corto 109-112 reproduce el mismo ambiente de coordinación que el péptido largo.

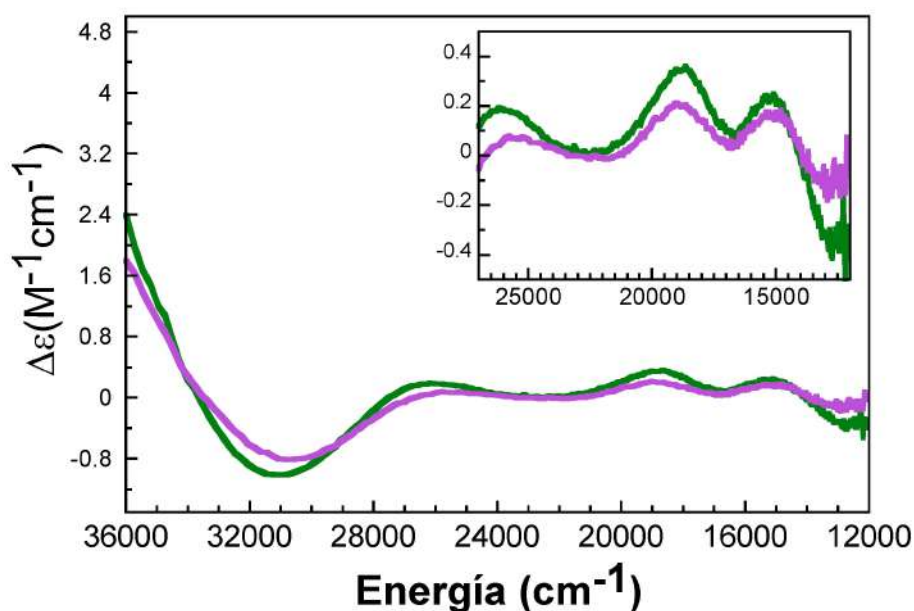


Figura 4.2.8. Comparación de espectros de CD de los complejos Cu(II)-hPrP(109-149) (línea verde) y Cu(II)-hPrP(109-112) (línea morado) a pH 7.5.

De este modo, se determinó que el pK_a del complejo Cu(II)-hPrP(109-112) es 8.97 ± 0.13 , a partir de la titulación por pH y las trazas del cambio de intensidad de señal de CD a 20 325 cm^{-1} y 30 864 cm^{-1} , Figura 4.2.9.

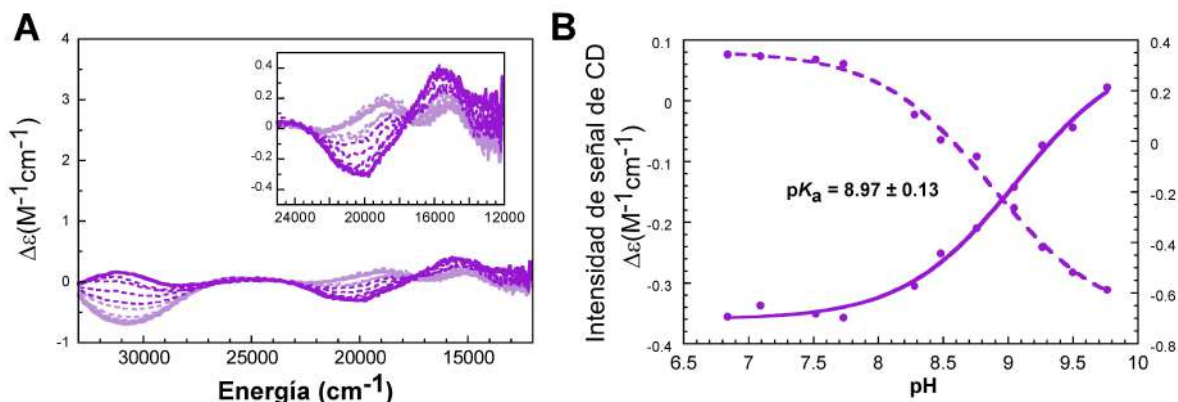


Figura 4.2.9. (A) Espectros de CD del complejo Cu(II)-hPrP(109-112) obtenidos a partir de un barrido a diferentes condiciones de pH. (B) Trazas para los cambios de intensidad de las señales de CD en función del pH para el cálculo de pK_a a $20\,325\text{ cm}^{-1}$ (traza morada punteada, escala izquierda en el eje Y) y $30\,864\text{ cm}^{-1}$ (traza morada continua, escala derecha en el eje Y).

El incremento en el valor de pK_a para el complejo Cu(II)-hPrP(109-112) con respecto a Cu(II)-hPrP(106-126), se debe a que la ausencia de los primeros tres residuos en el N-terminal (106-108 = KTN) desfavorece la desprotonación de la tercera amida del enlace peptídico. Consistentemente, los espectros de CD de los complejos Cu(II)-hPrP(109-112) y Cu(II)-hPrP(106-126) son idénticos a pH 6.5 (Figura 4.2.10), condición en la que se favorece la especie protonada en ambos complejos.

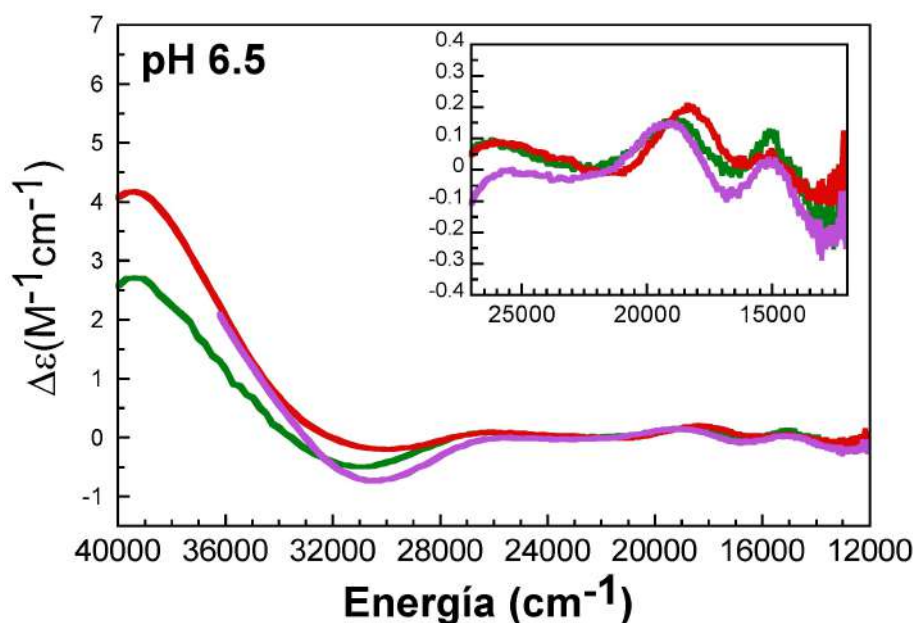
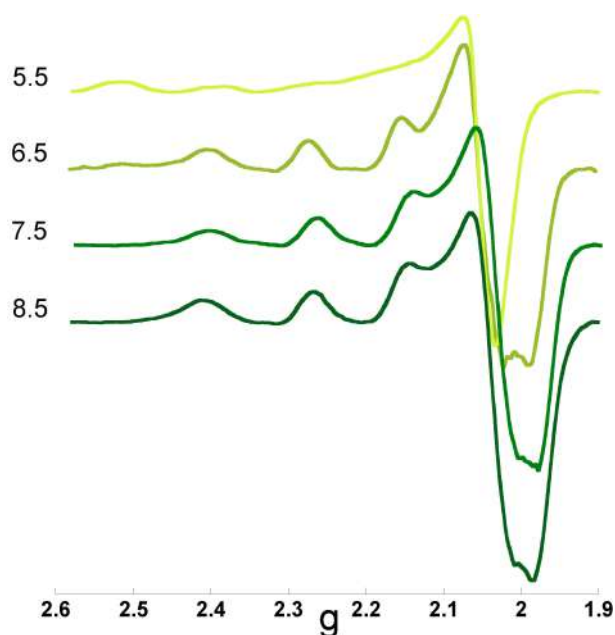


Figura 4.2.10 Comparación de espectros de CD de los complejos Cu(II)-hPrP(109-149) (línea verde), Cu(II)-hPrP(109-112) (línea morada) y Cu(II)-hPrP(106-126) (línea roja) a pH 6.5.



Cu(II)-hPrP(109-149)			
pH	g_{\parallel}	A_{\parallel}^*	Modo de coordinación
5.5	2.343	159	4O
6.5	2.230	167	3N1O
7.5	2.225	177	3N1O
8.5	2.225	177	3N1O

*x 10⁻⁴ cm⁻¹

Figura 4.2.11. y Tabla 4.2.2 Espectros de EPR del complejo Cu(II)-hPrP(109-149) a valores de pH 5.5, 6.5, 7.5 y 8.5 y sus valores g_{\parallel} y A_{\parallel} con los modos de coordinación para cada caso.

Los espectros de EPR del complejo Cu(II)-hPrP(109-149) a valores de pH 6.5, 7.5 y 8.5 (Figura 4.2.11.) y sus valores de g_{\parallel} y A_{\parallel} (Tabla 4.2.2) son casi idénticos, y corresponden a un modo de coordinación ecuatorial de 3N1O. Por otro lado, el espectro de EPR a pH 5.5 presentó un comportamiento diferente en sus señales y parámetros de EPR, indicativo de la formación de un complejo distinto al de aquellos a valores de pH más altos; sus valores de g_{\parallel} y A_{\parallel} corresponden a un modo de coordinación rico en oxígenos 4O.

Es importante mencionar que, a pesar de que los valores de g_{\parallel} y A_{\parallel} de los complejos Cu(II)-hPrP(109-149) y Cu(II)-hPrP(106-126) son muy similares a pH 7.5, la espectroscopia de CD ayudó a detectar la presencia de especies diferentes en estos dos péptidos. A pH 7.5, el complejo Cu(II)-hPrP(106-126) presenta una mezcla de especies 3N1O y 4N, mientras que el Cu(II)-hPrP(109-149) sólo forma la especie 3N1O.

En general, podemos decir que considerando el hecho de que hPrP(106-126) carece de His140, nuestros estudios espectroscópicos sugieren que el residuo de la His111 es el sitio de anclaje para la coordinación del ion metálico Cu(II) en el fragmento hPrP(109-149), mientras que la His140 no toma parte de la coordinación del Cu(II) a pH 7.5. Sin embargo, a pH bajo, 5.5, la coordinación del ion cobre podría involucrar sólo átomos de oxígeno, debido

a que el residuo de histidina a este valor de pH esta en su forma protonada, por tanto se deja atrás la coordinación a los nitrógenos de histidinas.

Interacción ion metálico-ácido nucleico-proteína prion

En esta sección se presenta el estudio de la interacción de fragmentos de la proteína prion con el ion metálico Cu(II), en presencia de otras moléculas como ácidos nucleicos. Primeramente se estudió la unión de Cu(II) a un oligonucleótido de doble cadena (E2DBS), que llamaremos a partir de ahora ácido nucleico. Este oligonucleótido se ha identificado como un ligante de alta afinidad para la proteína prion, debido a su alto contenido relativo de bases nitrogenadas (Guanina-Citosina y Adenina-Timina).^{12, 16}

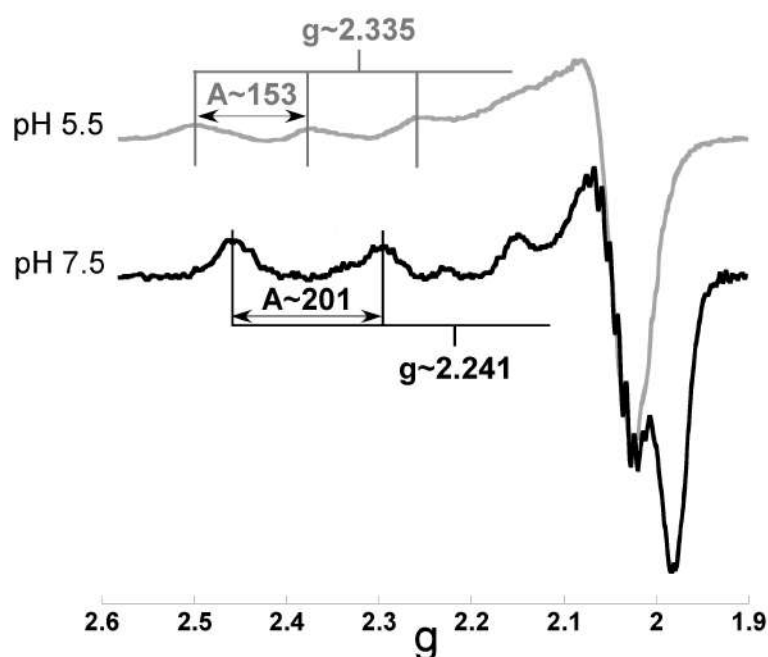


Figura 4.2.12. Espectros de EPR del complejo Cu(II)-Ácido nucleico a valores de pH 5.5 y 7.5, y sus valores g_{\parallel} y A_{\parallel} indicados en los espectros.

El complejo Cu(II)-Ácido nucleico a pH 7.5 tiene valores de $g_{\parallel} = 2.241$ y $A_{\parallel} = 201 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$, lo cual indica un ambiente de coordinación rico en nitrógenos, con un modo de coordinación de 4N. El espectro muestra desdoblamiento en la región perpendicular, que señalan un fuerte acoplamiento superhiperfino por la interacción del espín electrónico del

ión metálico con el espín nuclear de los átomos de nitrógeno en la vecindad. En contraste, a pH 5.5 se formó un complejo Cu(II)-Ácido nucleico diferente, con valores de g_{\parallel} y A_{\parallel} , que son indicativos de un menor contenido de nitrógenos en su ambiente de coordinación (modos 4O o 1N3O).

Una vez formado el complejo Cu(II)-Ácido nucleico, se adicionó el péptido hPrP(109-149) para alcanzar una relación molar final Cu(II):Ácido nucleico:Péptido de 1:1:1. A pH 7.5, el espectro de EPR mostró cambios drásticos al adicionar el péptido, presentando un nuevo juego de señales con valores de $g_{\parallel} = 2.299$ y $A_{\parallel} = 156 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$, los cuales no corresponden ni al complejo Cu(II)-Ácido nucleico ni a Cu(II)-hPrP(109-149) (Figura 4.2.13 A). Cabe señalar que las nuevas señales tampoco corresponden a Cu(II) en solución. Estos resultados sugieren la formación de un complejo ternario Cu(II)-Ácido nucleico-hPrP(109-149) a pH 7.5.

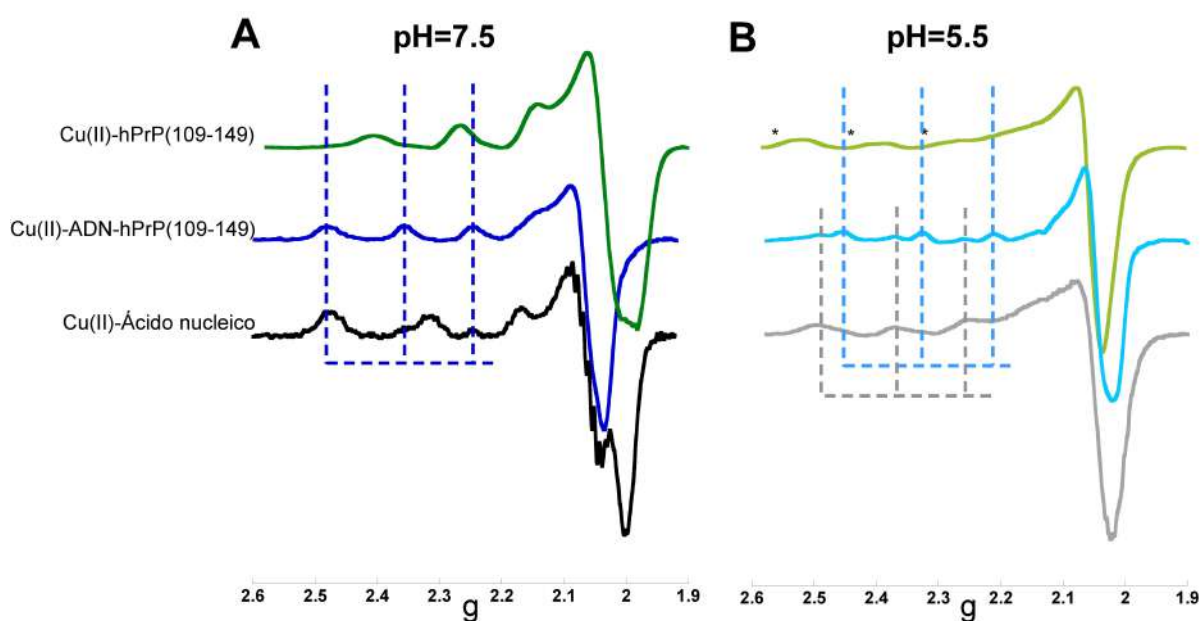


Figura 4.2.13. Espectros de EPR de los complejos Cu(II)-hPrP(109-149), Cu(II)-Ácido nucleico-hPrP(109-149) y Cu(II)-Ácido nucleico a valores de pH 7.5 y 5.5. Los asteriscos en el espectro verde claro indican señales de cobre en solución. Las líneas punteadas comparan las señales entre los espectros.

Asimismo, a pH 5.5, la adición del péptido al complejo Cu(II)-Ácido nucleico también causó cambios drásticos en el espectro de EPR, apareciendo señales asociadas a valores de $g_{\parallel} = 2.292$ y $A_{\parallel} = 156 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$, los cuales no coinciden con los parámetros asociados a los complejos Cu(II)-ADN y Cu(II)-hPrP(109-149). Además de estas nuevas señales, se observaron con baja intensidad señales residuales del complejo Cu(II)-Ácido nucleico (Figura

4.2.13 B, líneas grises punteadas). Estos resultados sugieren la formación de un complejo ternario Cu(II)-Ácido nucleico-hPrP(109-149) a pH 5.5.

A ambos valores de pH, los valores de g_{\parallel} y A_{\parallel} asociados a la formación de un complejo ternario Cu(II)-Ácido nucleico-hPrP(109-149) son idénticos, y corresponden a un modo de coordinación 2N2O, de acuerdo al gráfico Peisach-Blumberg.¹⁷

Una situación similar fue observada con la adición de hPrP(106-126) al complejo Cu(II)-Ácido nucleico a pH 7.5, observándose dos juegos de señales, una correspondiente a la formación de un complejo ternario con valores de $g_{\parallel} = 2.309$ y $A_{\parallel} = 140 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$, y otro al complejo Cu(II)-hPrP(106-126) (Figura 4.2.14 A). Estos resultados indican que, aunque también se forma un complejo ternario Cu(II)-Ácido nucleico-péptido con el fragmento hPrP(106-126), su estabilidad es más baja que la del complejo Cu(II)-péptido. Por el contrario, a pH 5.5, no se observó la formación de un complejo ternario. A este pH, la adición del péptido al complejo Cu(II)-Ácido nucleico dio lugar a un espectro de EPR con dos juegos de señales: las más intensas corresponden al complejo Cu(II)-hPrP(106-126), mientras que las de menor intensidad pertenecen al complejo Cu(II)-Ácido nucleico.

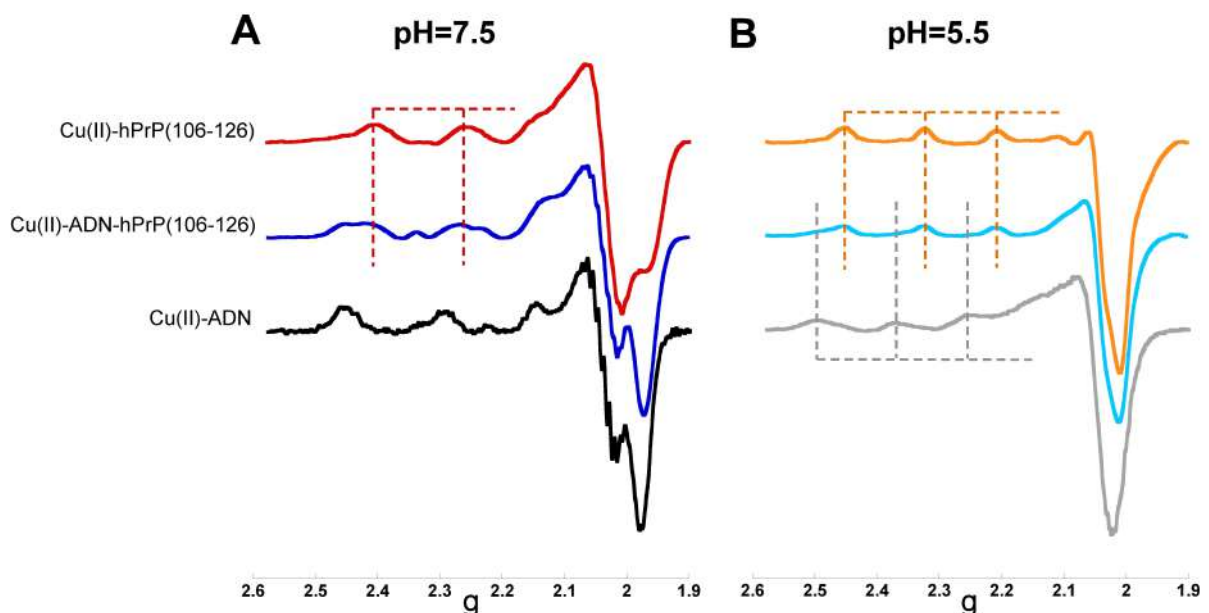


Figura 4.2.14 Espectros de EPR de los complejos Cu(II)-hPrP(106-126), Cu(II)-Ácido nucleico-hPrP(106-126) y Cu(II)-ADN a valores de pH 7.5 y 5.5. Las líneas punteadas comparan las señales entre los espectros.

La Figura 4.2.15 muestra una el gráfico Peisach-Blumberg de las correlaciones lineales de los complejos ternarios Cu(II)-Ácido nucleico-hPrP(109-149) y Cu(II)-Ácido nucleico-hPrP(106-126). Sus valores g_{\parallel} y A_{\parallel} difieren entre si, reflejando ambientes de coordinación diferentes. Estos resultados sugieren que la región C-terminal del fragmento 109-149 puede contribuir a la esfera de coordinación del complejo ternario. Más aún, a pH bajo (5.5) únicamente se formó el complejo ternario Cu(II)-Ácido nucleico-hPrP(109-149), mientras que no se observó evidencia de la formación de un complejo ternario con el péptido hPrP(106-126), reafirmando la noción de que los últimos residuos en la secuencia del fragmento largo 109-149 puede participar o favorecer la formación del un complejo ternario.

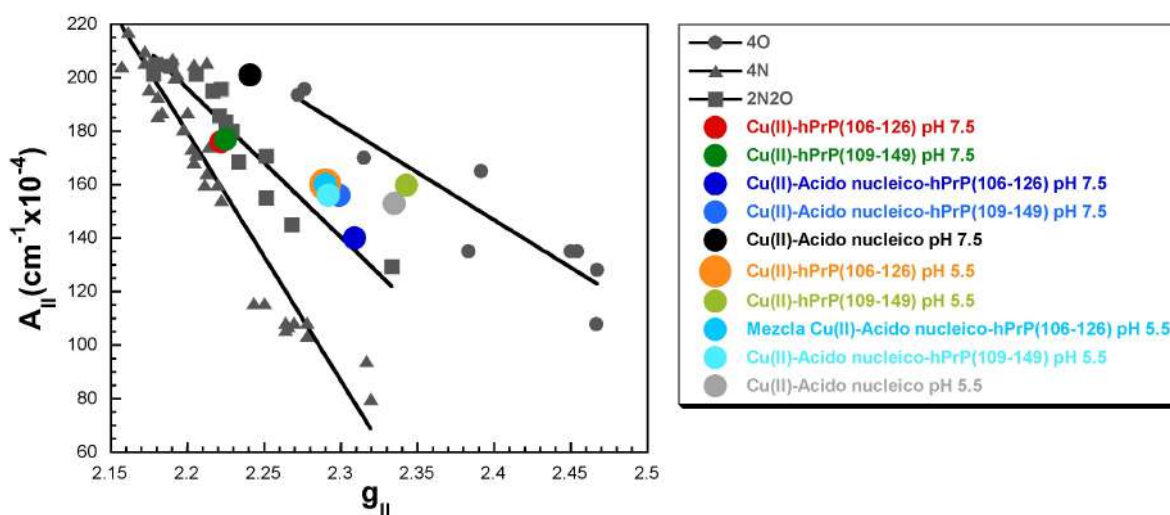


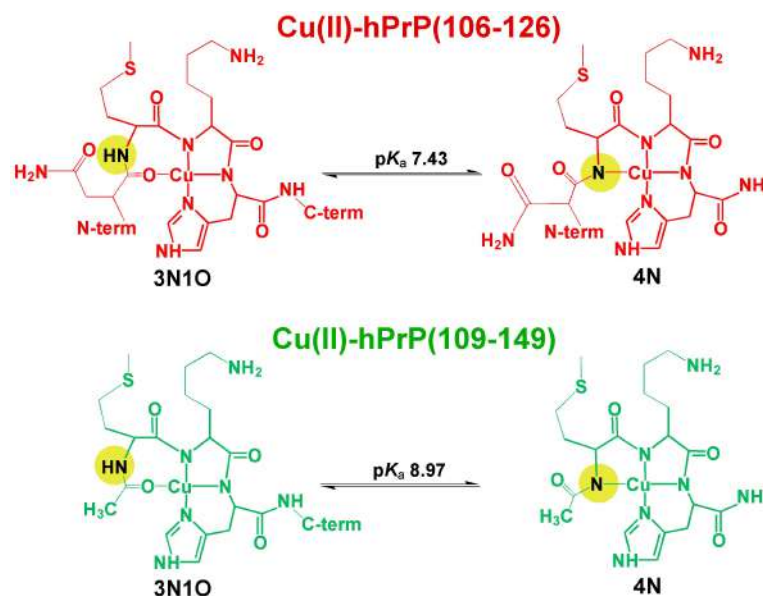
Figura 4.2.15. Gráfico Peisach-Blumberg de correlaciones lineales para los valores g_{\parallel} y A_{\parallel} de complejos 4N (triángulos), 2N2O (cuadrados) y 4O (círculos) tomados de^{17, 18} y de los complejos formados con los fragmentos hPrP(106-126), hPrP(109-149) y Ácido nucleico.

Discusión y Conclusiones

En este capítulo se presentó un estudio de la interacción de los fragmentos 106-126 y 109-149 de la proteína prion con el ion Cu(II) y ácidos nucleicos. Por espectroscopia de EPR se determinó la formación de complejos ternarios Cu(II)-Ácido nucleico-hPrP(109-149) y Cu(II)-Ácido nucleico-hPrP(106-126) a pH fisiológico de 7.5 mientras que a valores bajos de pH únicamente se observó la formación de un complejo ternario con el fragmento 109-149.

Resulta interesante comparar las propiedades de coordinación de cobre en los fragmentos hPrP(109-149) y hPrP(106-126) a pH neutro y ácido. A pH 6.5, ambos fragmentos unen Cu(II) en el sitio de la His111, formando un modo de coordinación 3N1O como el ya descrito para el fragmento 106-115.¹⁵ Estos resultados indican que la His140 presente en el fragmento 109-149 no participa en la coordinación a cobre en esta especie y son consistentes con lo reportado por Walter y colaboradores.¹⁹

Sin embargo, la gran diferencia entre los complejos 3N1O Cu(II)-hPrP(106-126) y Cu(II)-hPrP(109-149) es que este último tiene un pK_a más alto. El pK_a de 7.43 del complejo Cu(II)-hPrP(106-126) corresponde a la desprotonación del grupo amida de la Met109, residuo que se encuentra en el extremo N-terminal en el péptido hPrP(109-149) (Esquema 4.3.1). Este grupo funcional amida posee como sustituyente un grupo metilo, el cual, como grupo electrodonador, tiende a aumentar la basicidad de la amida, ocasionando un incremento en el pK_a en el complejo Cu(II)-hPrP(109-149) ($pK_a = 8.97$). Como consecuencia de este cambio de pK_a , a pH 7.5 el complejo Cu(II)-hPrP(109-149) presenta únicamente el modo de coordinación 3N1O, mientras que el complejo Cu(II)-hPrP(106-126) tiene también una contribución del modo 4N.

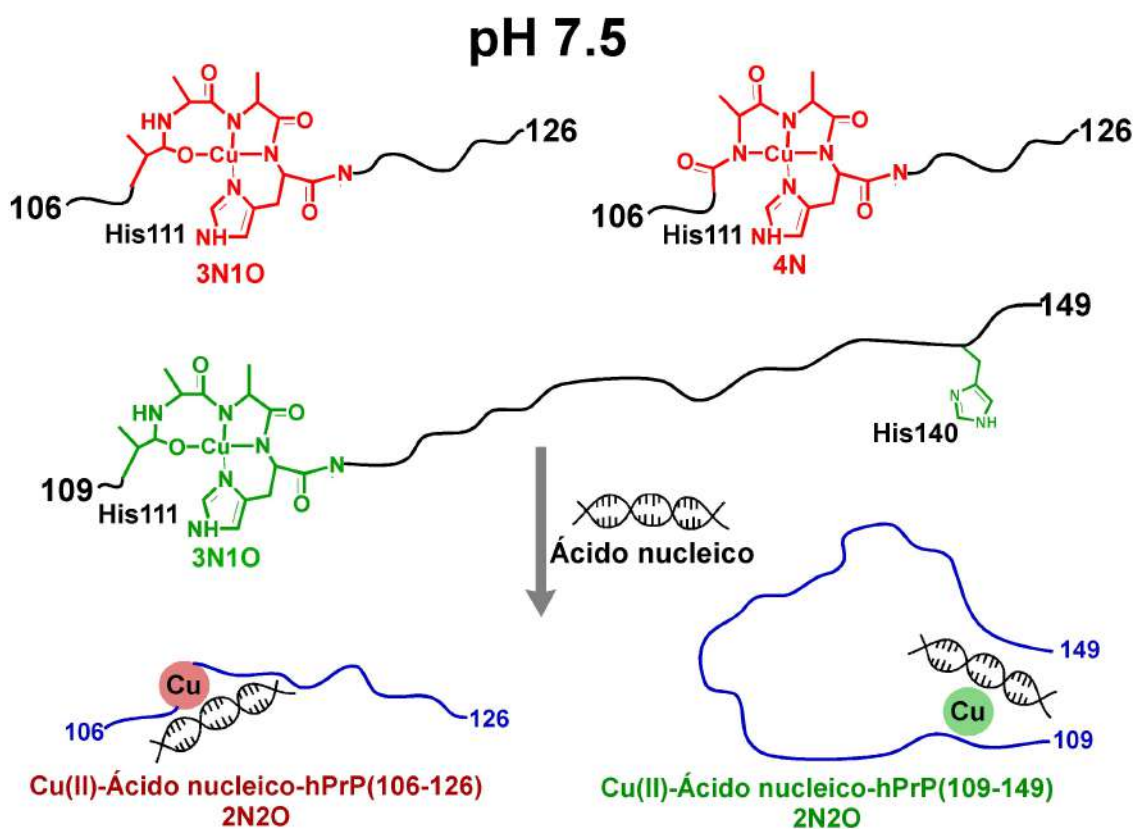


Esquema 4.3.1. Equilibrios de protonación de los complejos Cu(II)-hPrP(106-126) y Cu(II)-hPrP(109-149). Los círculos en amarillo resaltan la amida que se desprotona.

Por otro lado, a pH 5.5, los fragmentos hPrP(106-126) y hPrP(109-149) formaron complejos con Cu(II) de naturaleza distinta. Para el complejo Cu(II)-hPrP(106-126) el modo de coordinación ecuatorial fue 2N2O, mientras que para el complejo Cu(II)-hPrP(109-149) fue 4O. Los parámetros de EPR asociados al complejo Cu(II)-hPrP(109-149) son muy similares a lo reportado para la unión de Cu(II) a PrP(121-231) a bajos valores de pH,^{20, 21} donde el ambiente de coordinación no involucra la unión de residuos de histidina. Así, el modo de coordinación rico en oxígenos observado para el complejo Cu(II)-hPrP(109-149) pudiera involucrar ácidos carboxílicos de la región C-terminal (potencialmente Ácido aspártico-144 o 147, o Ácido glutámico-146) y/o incluso moléculas de agua.

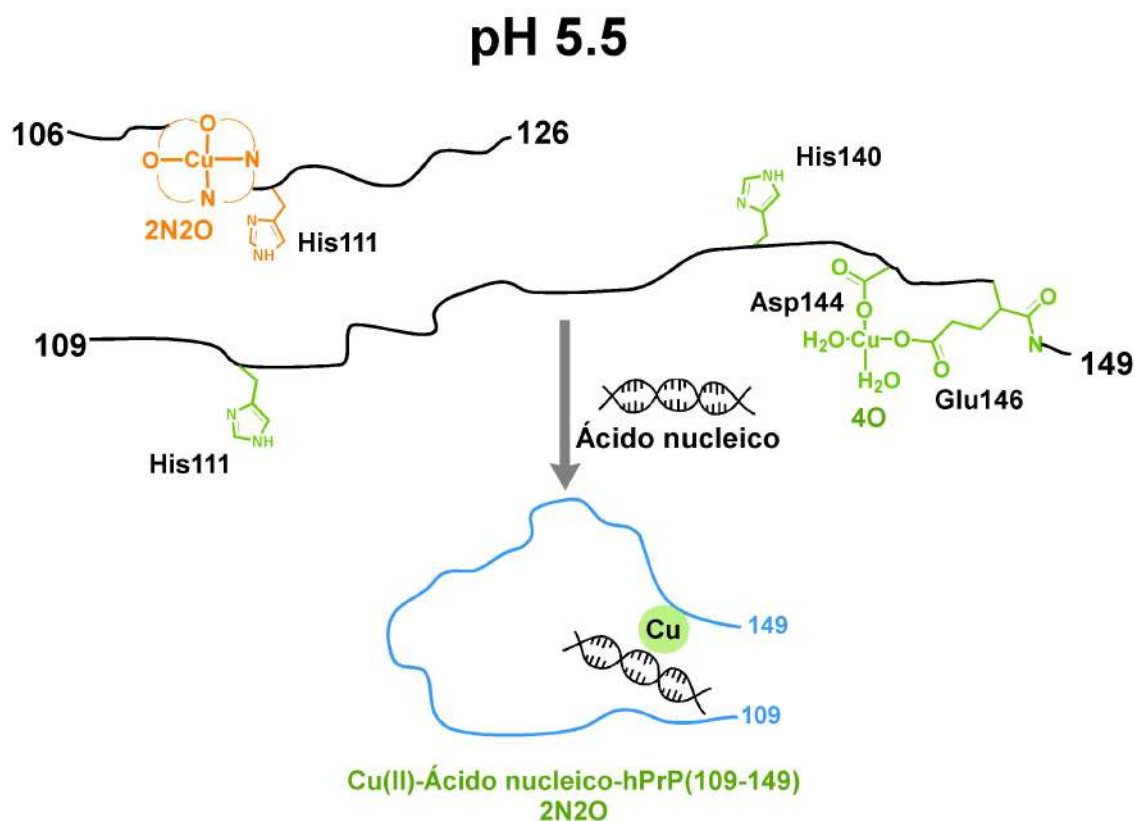
La interacción de la proteína prion con el ion metálico Cu(II) a diferentes valores de pH da información acerca del comportamiento del complejo en estas condiciones. Como ya se ha reportado, el Cu(II) se une extracelularmente a la proteína prion que está anclada a la membrana neuronal, y esta expuesta a un ambiente a pH 7.4. La unión de cobre puede inducir la internalización celular de la proteína,^{4, 22} y por tanto, los complejos Cu(II)-PrP formados serían endocitados y estarían expuestos a un ambiente reductor y con alta concentración de protones (pH 4-5) en los endosomas. En este trabajo demostramos que los péptidos 106-126 y 109-149 pueden formar complejos con Cu(II) aún a valores bajos de pH, y estos modos de coordinación serían relevantes en el ambiente ácido endosomal.

La formación de los complejos ternarios entre el ion Cu(II), el ácido nucleico y el fragmento peptídico fueron detectados por espectroscopia de EPR. Un complejo ternario Cu(II)-Ácido nucleico-hPrP(109-149) fue observado, tanto a pH 5.5 como 7.5, mientras que el fragmento hPrP(106-126) únicamente a pH 7.5 formó un complejo ternario. Los complejos ternarios Cu(II)-Ácido nucleico-hPrP(109-149) y Cu(II)-Ácido nucleico-hPrP(106-126) a pH 7.5 presentaron parámetros de EPR diferentes, indicando entonces que los residuos de la región C-terminal del fragmento largo hPrP(109-149) podrían contribuir a las propiedades de coordinación del ion metálico hacia el ácido nucleico (Esquema 4.3.2). En el caso de la formación del complejo ternario con el fragmento hPrP(106-126), se observó una segunda especie que corresponde al modo de coordinación 4N del complejo Cu(II)-péptido. Por tanto, concluimos que la gran estabilidad de este complejo Cu(II)-hPrP(106-126) compite con la formación del complejo ternario con ácido nucleico.



Esquema 4.3.2. Coordinación de Cu(II) a hPrP(106-126), hPrP(109-149) y Ácido nucleico, a pH 7.5.

Por otro lado, la condición de pH ácido (5.5) no favoreció en absoluto la formación del complejo ternario con el fragmento hPrP(106-126). En contraste, el fragmento hPrP(109-149) sí forma un complejo ternario a este pH, lo cual sugiere que la región C-terminal del 109-149 sea clave en la interacción con el ácido nucleico, y posiblemente proporcionaría los ligandos necesarios para la esfera de coordinación del ion metálico en el compuesto ternario (Esquema 4.3.3).



Esquema 4.3.3. Coordinación de Cu(II) a hPrP(106-126), hPrP(109-149) y ADN, a pH 5.5.

Los parámetros de EPR de los complejos ternarios Cu(II)-Ácido nucleico-hPrP(109-149) son casi idénticos a las dos condiciones de pH 7.5 y 5.5, lo cual sugiere que el ambiente de coordinación del ion Cu(II) es el mismo en ambos complejos. La comparación de estos complejos con los formados en el caso del fragmento 106-126 claramente sugiere que los residuos del C-terminal participan en la interacción con el ácido nucleico y la formación del complejo ternario. Por tanto, resulta evidente que el péptido 109-149 tendría que sufrir cambios conformacionales importantes para permitir estas interacciones. Por ejemplo, a pH neutro, inicialmente el Cu(II) se coordina al sitio de la His111 del péptido 109-149 con un modo de coordinación 3N1O, sin la participación del residuo de His140; pero al enfrentarse

al ligante de ADN se forma un complejo ternario que involucra al extremo C-terminal del péptido, causando cambios conformacionales en la cadena peptídica. Un estudio de la unión de Cu(II) a los sitios de His96/111, en la proteína prion completa, demostró que puede haber una interacción con los residuos Ile139-Asp147 de la región del C-terminal,⁹ lo cual indica que ese tipo de cambios conformacionales son posibles, incluso en ausencia de ácidos nucleicos.

Debido a la naturaleza ubicua de la proteína prion, ésta puede estar localizada en diferentes partes de la célula e interactuar tanto con iones metálicos como con ácidos nucleicos u otros ligantes.^{3, 13} Así, en este estudio, se elucidó la formación de los complejos ternarios a pH neutro y ácido: Cu(II)-Ácido nucleico-hPrP(109-149) (favorecido a pH ácido y neutro) Cu(II)-ADN-hPrP(106-126) (únicamente favorecido a pH neutro).

La unión inicial de Cu(II), a los sitios ya dictados por la naturaleza del péptido, provocan cambios conformacionales que alteran la estructura de la proteína y más aún, su afinidad por aceptar o no a otro ligante. Esta interacción sugiere entonces posibles eventos alostéricos mediados por Cu(II), donde ciertos dominios de PrP^C no estarían disponibles para interactuar con el ácido nucleico tras la unión de cobre. Este escenario, en general, podría modular las funciones fisiológicas y/o incluso aquellas relacionadas con la etiología de la enfermedad priónica.

En general, este estudio se enfocó en obtener información estructural acerca de las interacciones alostéricas de la proteína prion mediadas por Cu(II) y ligandos como ácidos nucleicos, lo cual servirá de base para descifrar la posible conversión estructural de PrP^C a PrP^{Sc} modulada por este tipo de ligandos.

Perspectivas

La participación de la proteína prion y su papel en la interacción dual con Cu(II) y ácidos nucleicos, dejó abierto un apartado en el estudio de las interacciones ion metálico-proteína-ácido nucleico. A partir de los resultados obtenidos en este trabajo, se proponen diferentes estrategias a futuro que ayuden a entender y comprender la participación de la proteína prion y el papel en su interacción dual con Cu(II) y ácidos nucleicos. Entender la naturaleza de los complejos que se forman a pH ácido y qué modificaciones sufren cuando la proteína prion sufre endocitosis, sería de gran interés. Si la interacción de la PrP con ácidos nucleicos sucede, es probable que sea al interior de la célula en un ambiente reductor. Por tanto, resultaría de gran interés estudiar la coordinación del ion cobre en su estado reducido a la proteína prion y su efecto en presencia de ácidos nucleicos. Estos estudios ayudarán a responder algunas de las preguntas acerca de la función de la proteína prion, debido a que, por un lado se le ha identificado como una proteína transportadora de Cu(II), mientras que por otro, su interacción con ácidos nucleicos ha sido motivo de interés para explicar el fenómeno de propagación de las enfermedades priónicas.

Referencias

1. Prusiner, S. B. Prions. *Proc Natl Acad Sci USA* **1998**, *95*, 13363-13383.
2. Linden, R.; Martins, V. R.; Prado, M. A. M.; Cammarota, M.; Izquierdo, I.; Brentani, R. R. Physiology of the Prion Protein. *Physiol Rev* **2008**, *88*, 673-728.
3. Linden, R.; Cordeiro, Y.; Lima, L. M. Allosteric function and dysfunction of the prion protein. *Cell Mol Life Sci* **2012**, *69*, 1105-24.
4. Ren, K.; Gao, C.; Zhang, J.; Wang, K.; Xu, Y.; Wang, S. B.; Wang, H.; Tian, C.; Shi, Q.; Dong, X. P. Flotillin-1 mediates PrPc endocytosis in the cultured cells during Cu(2)(+) stimulation through molecular interaction. *Mol Neurobiol* **2013**, *48*, 631-46.
5. Calzolari, L.; Zahn, R. Influence of pH on NMR structure and stability of the human prion protein globular domain. *J Biol Chem* **2003**, *278*, 35592-6.
6. Marques, A. F.; Cordeiro, Y.; Silva, J. L.; Lima, L. M. Enhanced prion protein stability coupled to DNA recognition and milieu acidification. *Biophys Chem* **2009**, *141*, 135-9.
7. Chattopadhyay, M.; Walter, E. D.; Newell, D. J.; Jackson, P. J.; Aronoff-Spencer, E.; Peisach, J.; Gerfen, G. J.; Bennett, B.; Antholine, W. E.; Millhauser, G. L. The Octarepeat Domain of the Prion Protein Binds Cu(II) with Three Distinct Coordination Modes at pH 7.4. *J Am Chem Soc* **2005**, *127*, 12647-12656.
8. Burns, C. S.; Aronoff-Spencer, E.; Legname, G.; Prusiner, S. B.; Antholine, W. E.; Gerfen, G. J.; Peisach, J.; Millhauser, G. L. Copper Coordination in the Full-Length, Recombinant Prion Protein. *Biochemistry* **2003**, *42*, 6794-6803.
9. Thakur, A. K.; Srivastava, A. K.; Srinivas, V.; Chary, K. V.; Rao, C. M. Copper alters aggregation behavior of prion protein and induces novel interactions between its N- and C-terminal regions. *J Biol Chem* **2011**, *286*, 38533-45.
10. Cheng, F.; Lindqvist, J.; Haigh, C. L.; Brown, D. R.; Mani, K. Copper-dependent co-internalization of the prion protein and glypican-1. *J Neurochem* **2006**, *98*, 1445-57.
11. Uchiyama, K.; Muramatsu, N.; Yano, M.; Usui, T.; Miyata, H.; Sakaguchi, S. Prions disturb post-Golgi trafficking of membrane proteins. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 1846-1859.
12. Lima, L. M. I. T. R.; Cordeiro, Y.; Tinoco, L. W.; Marques, A. F.; Oliveira, C. L. P.; Sampath, S.; Kodali, R.; Choi, G.; Foguel, D.; Torriani, I.; Caughey, B.; Silva, J. L. Structural Insights into the Interaction between Prion Protein and Nucleic Acid. *Biochemistry* **2006**, *45*, 9180-9187.
13. Silva, J. L.; Lima, L. M.; Foguel, D.; Cordeiro, Y. Intriguing nucleic-acid-binding features of mammalian prion protein. *Trends Biochem Sci* **2008**, *33*, 132-40.
14. Brown, D. R.; Qin, K.; Herms, J. W.; Madlung, A.; Manson, J.; Strome, R.; Fraser, P. E.; Kruck, T.; Bohlen, A. v.; Schulz-Schaeffer, W.; Giese, A.; Westaway, D.; Kretzschmar, H. The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature* **1997**, *390*, 684-687.
15. Rivillas-Acevedo, L.; Grande-Aztatzi, R.; Lomelí, I.; García, J. E.; Barrios, E.; Teloxa, S.; Vela, A.; Quintanar, L. Spectroscopic and electronic structure studies of copper(II) binding to His111 in the human prion protein fragment 106-115: evaluating the role of protons and methionine residues. *Inorg Chem* **2011**, *50*, 1956-1972.
16. Cordeiro, Y.; Machado, F.; Juliano, L.; Juliano, M. A.; Brentani, R. R.; Foguel, D.; Silva, J. L. DNA converts cellular prion protein into the beta-sheet conformation and inhibits prion peptide aggregation. *J Biol Chem* **2001**, *276*, 49400-9.
17. Peisach, J.; Blumberg, W. E. Structural implications derived from the analysis of electron paramagnetic resonance spectra of natural and artificial copper proteins. *Arch Biochem Biophys* **1974**, *165*, 691-708.
18. Sakaguchi, U.; Addison, A. W. Spectroscopic and redox studies of some copper(II) complexes with biomimetic donor atoms: implications for protein copper centres. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1979**, 600-608.
19. Walter, E. D.; Stevens, D. J.; Spevacek, A. R.; Visconte, M. P.; Rossi, A. D.; Millhauser, G. L. Copper Binding Extrinsic to the Octarepeat Region in the Prion Protein. *Curr Protein Pept Sci* **2009**, *10*, 529-535.
20. Cereghetti, G. M.; Schweiger, A.; Glockshuber, R.; Doorslaer, S. V. Electron Paramagnetic Resonance Evidence for binding of Cu²⁺ to the C-terminal domain of the murine prion protein. *Biophys. J.* **2001**, *81*, 516-525.

21. Doorslaer, S. V.; Cereghetti, G. M.; Glockshuber, R.; Schweige, A. Unraveling the Cu²⁺ Binding Sites in the C-Terminal Domain of the Murine Prion Protein: A Pulse EPR and ENDOR Study. *J. Phys. Chem. B* **2001**, 105, 1631-1639.
22. Pauly, P. C.; Harris, D. A. Copper stimulates endocytosis of the prion protein. *J Biol Chem* **1998**, 273, 33107-33110.



Cinvestav

Conclusiones Generales

Conclusiones Generales

En el presente trabajo se elucidó la coordinación de Cu(II) a diferentes fragmentos peptídicos de la amilina y de la proteína prion humana, usando un enfoque integral con diferentes técnicas espectroscópicas.

Mediante el estudio de la unión de Cu(II) al péptido amilina (o hIAPP), se encontró que el sitio de anclaje al metal es la His18 y que la coordinación del metal involucra a las amidas desprotonadas de la cadena peptídica que le siguen en la secuencia del motivo HSSNN. El grupo hidroxilo de la Ser20 juega un papel importante para completar la esfera de coordinación y estabilizar al quelato. Los modos de coordinación propuestos para el complejo Cu(II)-hIAPP explican el efecto inhibitorio del metal en la agregación amiloide del péptido, ya que residuos involucrados en la esfera de coordinación son también importantes en la agregación amiloide.

Por otro lado, el estudio de la unión de Cu(II) a los sitios de His96 e His111 en fragmentos de la proteína prion humana (hPrP) nos permite entender los factores que modulan la afinidad relativa del metal a cada sitio y cómo se impactan estos sitios de unión por el procesamiento proteolítico de la proteína. Encontramos que la Met109, aunque no se une directamente al metal, juega un papel importante para estabilizar el complejo Cu(II)-His111 y determina la preferencia del metal para unirse a este sitio, posiblemente debido a un efecto en la segunda esfera de coordinación. Por otro lado, el corte β -proteolítico de la hPrP resulta en una proteína truncada que contiene a ambos sitios, His96 e His111, con el extremo NH₂-terminal libre, el cual participa en la coordinación de Cu(II) en el sitio de His96 y juega un papel importante en favorecer la unión del metal a este sitio sobre el de His111. Finalmente, el corte α -proteolítico de la hPrP también tiene un impacto importante en las propiedades de coordinación a Cu(II) de la proteína, ya que elimina el sitio de His96, dejando a un sitio de His111 con el extremo NH₂-terminal libre. Éste estudio demuestra que el sitio de unión es muy diferente del sitio de His111 original que presenta la proteína intacta. Asimismo, se demostró que la proteína prion puede tener interacciones alostéricas mediadas por Cu(II) y otros ligantes como ácidos nucleicos, formando complejos ternarios Cu(II)-Ácido nucleico-

péptido. Se determinó que la estabilidad del complejo formado con el sitio de la His111 compite con la formación del complejo ternario.

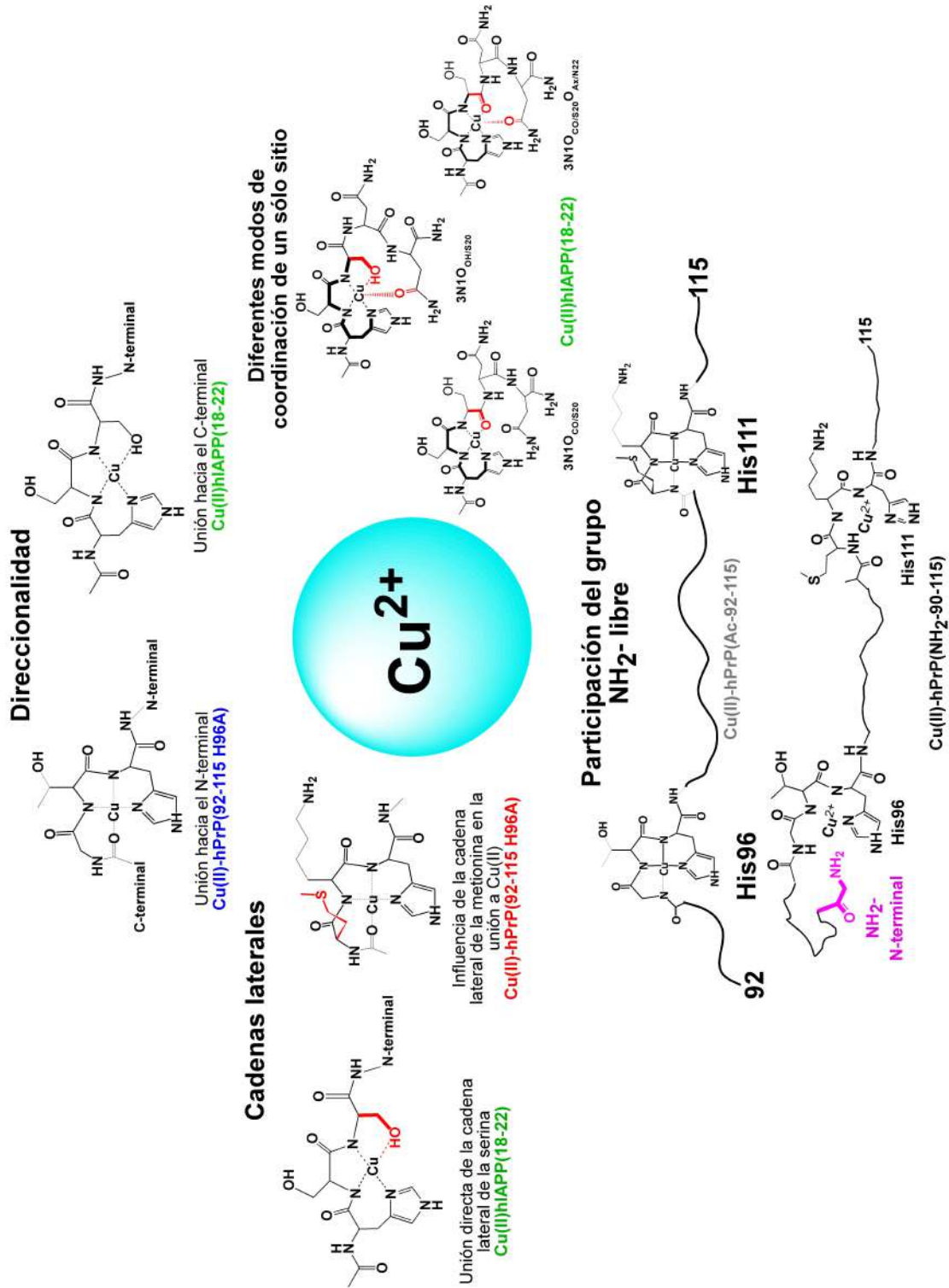
Es importante notar que todos los péptidos estudiados contienen al menos una histidina en su secuencia, que sirve como sitio de anclaje para Cu(II); mientras que su versatilidad para formar complejos estables proviene de su secuencia y tipo de heteroátomos presentes en la vecindad de la histidina. Se encontró que existen diferentes factores que influyen la química de coordinación de los complejos Cu(II)-péptidos:

- La direccionalidad de la unión del ion metálico una vez anclado al N1 del grupo imidazol del residuo de histidina está dictada por la posición del residuo de histidina en la secuencia. El tipo de residuos presentes antes o después de la histidina dirige la direccionalidad del complejo con respecto al N- o C-terminal. Ejemplos claros de este comportamiento, se comparan en el Esquema A, en donde el complejo de Cu(II)-hIAPP(18-22) está direccionado hacia el C-terminal, debido a que los residuos hidrofóbicos que le anteceden no favorecen la unión hacia el N-terminal. En contraste, la coordinación del metal en el complejo que contiene el sitio de His96 en el fragmento 92-115 está direccionada hacia el N-terminal, debido a que los residuos que le siguen a la histidina son muy voluminosos y desfavorecen la coordinación hacia el C-terminal.
- El entorno químico alrededor de la histidina es otro factor que modula la coordinación de cobre a los fragmentos peptídicos. Así, la participación de cadenas laterales coordinantes de los residuos en la vecindad en la primera y segunda esfera de coordinación del Cu(II) pueden influir en la interacción del metal e incluso en el porcentaje de unión del metal al sitio de coordinación. Por ejemplo, en el complejo Cu(II)-hIAPP(18-22) la cadena lateral del residuo de serina participa de manera directa en la unión a cobre, y juega un papel muy importante en la estabilización del complejo. Por otro lado, en el complejo de Cu(II) con la His111 del fragmento hPrP(92-115) la cadena lateral del residuo de metionina 109 tiene un impacto importante de la afinidad del cobre por el sitio, aunque no esté unida directamente al ion metálico; en este caso,

proponemos que se trata de un efecto en la segunda esfera de coordinación (Esquema A).

- La presencia de otros grupos coordinantes en la secuencia, como el NH₂- libre del N-terminal también tiene un impacto importante en las propiedades de coordinación y la afinidad relativa del cobre por los diferentes sitios de histidina en la proteína prion. Así, la comparación de los complejos formados con los péptidos hPrP(Ac-92-115) y hPrP(NH₂-90-115) ilustra cómo la participación del grupo NH₂- libre en el sitio de la His96 favorece la unión del cobre a este sitio, mientras que la forma acetilada del péptido, el metal prefiere coordinarse al sitio de la His111.
- La formación de diferentes modos de coordinación en un sitio puede dar lugar a diversidad de conformeros. Por ejemplo, el complejo Cu(II)-hIAPP(18-22) mostró diferentes modos de coordinación, los cuales imponen diferentes arreglos conformacionales debido a la participación de las cadenas laterales de los residuos en la vecindad y a los grupos funcionales de la cadena peptídica. El impacto del cobre en esta diversidad conformacional ayuda a entender el efecto inhibitorio del metal en la agregación amiloide de la hIAPP.

Esquema A. Factores que influyen en la coordinación de Cu(II) a fragmentos peptídicos con residuos de histidina como sitios de anclaje para el metal.



Esta tesis contribuye a entender cómo el cobre se coordina al péptido amilina o hIAPP implicado en diabetes tipo 2, y a fragmentos de la proteína prion humana. El estudio de la interacción del ion Cu(II) con estas proteínas abonan a la comprensión del papel que puede jugar este metal en su estructura, función y agregación amiloide. El comprender los procesos moleculares involucrados en la formación de agregados proteicos y cómo estos se ven afectados por la unión del cobre también ayuda a entender el papel del metal en la etiología de la enfermedad. Así, el estudio de la química bioinorgánica de Cu(II) es importante para ayudar a explicar fenómenos bioquímicos que involucran al metal de transición y su implicación en las enfermedades degenerativas como Diabetes Tipo 2 y neurodegenerativas como las enfermedades priónicas.



Cinvestav

Parte Experimental



Parte experimental

Síntesis de péptidos

Reactivos y disolventes

Los reactivos y disolventes utilizados para la síntesis de péptidos fueron:

Reactivos: aminoácidos con el grupo protector Fmoc en el grupo amino (Fmoc-alanina, Fmoc-sarcosina, Fmoc-asparagina(Trt), Fmoc-glicina, Fmoc-glutamina(Trt), Fmoc-histidina(Trt), Fmoc-isoleucina, Fmoc-leucina, Fmoc-lisina(Boc), Fmoc-metionina, Fmoc-prolina, Fmoc-serina(tBu), Fmoc-treonina(tBu), Fmoc-triptofano(Boc) y Fmoc-valina), resina rink amide MBHA, 1-hidroxibensotriazol (HOBt), 2-ciano-2-hidroxiiminoacetato de etilo (oxyma pure), N-N'-diisopropilcarbodiimida (DIC), diazabicycloundecano (DBU), 1,2-etanoditiol (EDT), triisopropilsilano (TIS), ninhidrina, fenol, etanol, cianuro de potasio (KCN) y amberlita MB-3.

Disolventes: diclorometano (DCM), N,N-dimetilformamida (DMF), N-metil-2-pirrolidona (NMP), 2-propanol (IPA), ácido trifluoroacético (TFA), piperidina, piridina, anhídrido acético, dimetilsulfóxido (DMSO), agua milli-q con resistividad de 18 MΩ/cm, dietiléter y acetonitrilo grado HPLC (ACN).

Metodología

La síntesis de péptidos se llevó a cabo mediante la síntesis en fase sólida y estrategia Fmoc:¹ A 300 mg de resina se les hizo un tratamiento con DCM a fin de aumentar su superficie de contacto. Una vez llevada a cabo esta acción, se procedió a remover el grupo Fmoc que contiene la resina, usando una solución desprotectora de piperidina al 30% y DBU 0.1% en DMF. La prueba irrefutable de desprotección la da el ensayo de ninhidrina,² la cual es una prueba colorimétrica que indica la presencia de aminas libres con una coloración azul intenso. Ya que se comprobó la total desprotección del grupo amina de la resina, se realizó el acoplamiento del primer aminoácido en la posición C-terminal del péptido a sintetizar. Se

trató por separado 5 eq del aminoácido y 5 eq de oxyma pure disolviendo en el volumen mínimo necesario de DMF (o mezcla 1:1 DCM:NMP) junto con 5 eq de DIC. Esta mezcla se adicionó a la resina y se agitó a temperatura ambiente por aproximadamente 6 horas. Una vez transcurrido el tiempo de reacción, se aplicaron ciclos de lavado de resina con DMF, IPA y DCM, y se hizo la prueba de ninhidrina para acoplamiento (la ausencia de aminas libres da lugar a una coloración amarilla). Se repitió el ciclo de desprotección y acoplamiento las veces necesarias para sintetizar el péptido deseado. La Figura A. muestra la propuesta del mecanismo de reacción en la formación del enlace peptídico.³

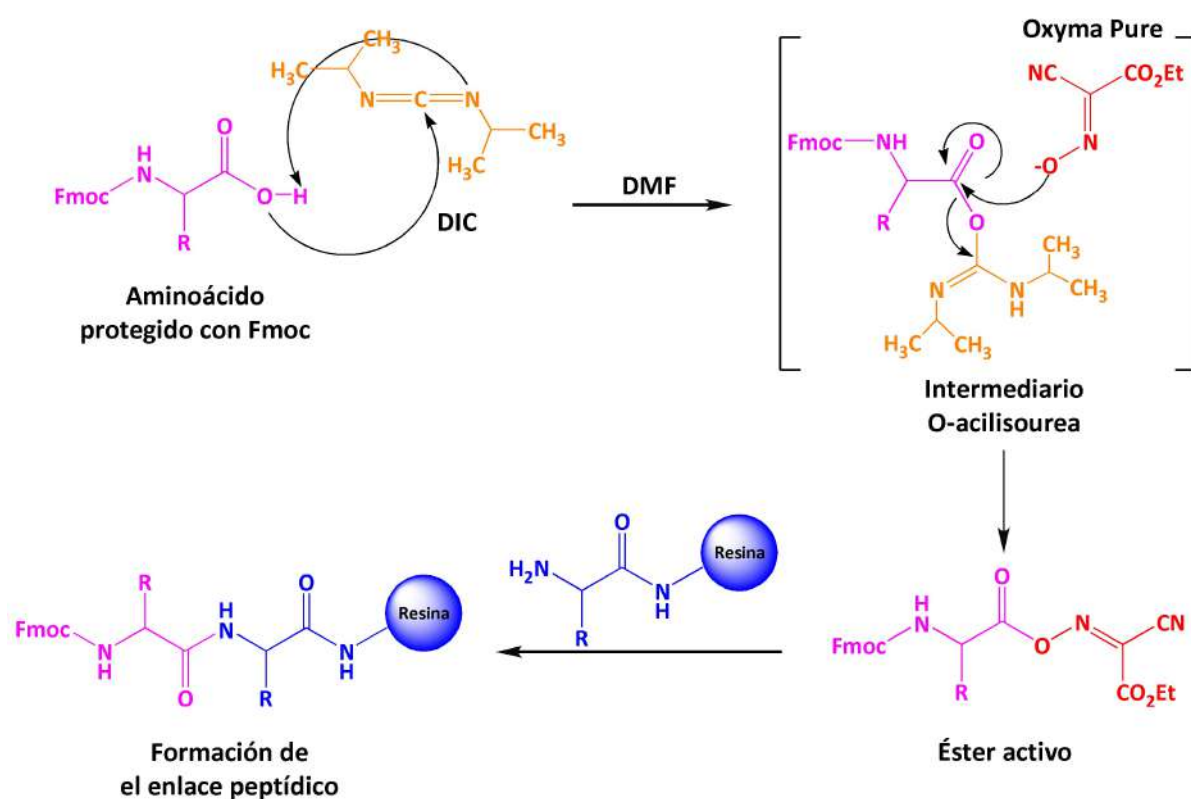


Figura A. Propuesta de mecanismo de formación del enlace peptídico (adaptado de ref³)

Una vez concluida la síntesis de la secuencia deseada, se procedió a la liberación del péptido de la resina. En los casos en el que los péptidos deban tener su grupo N-terminal libre, se dejó desprotegido el último aminoácido. Para el caso de péptidos en los que su N-terminal deba estar protegido por el grupo acetilo, se llevó a cabo la acetilación del último aminoácido. Para la acetilación se mezcló en proporción 1:1:1 anhídrido acético, piridina y DMF, y se adicionó a la resina con el péptido sintetizado, se agitó por 30 minutos a

temperatura ambiente (repetiendo estos pasos 3 veces más). Se hizo un ciclo de lavado de resina y prueba de ninhidrina con resultado de coloración amarilla en la solución y resinas transparentes. Para liberar el péptido de la resina, se aseguró que la resina con el péptido sintetizado estuviera completamente seca, se pesó y se preparó una solución con 95% TFA, 2.5% Agua y 2.5% TIS. Para el caso de los péptidos que contenían metioninas en su secuencia la solución fue 92.5% TFA, 2.5% Agua, 2.5% TIS y 2.5% EDT (el volumen total a preparar de la solución se calculó multiplicando el peso de la resina por 20 mL). Se adicionó esta solución a la resina y se agitó a temperatura ambiente por 2 horas. Una vez completado el tiempo de reacción, se filtró la solución y se enjuagó con TFA, se adicionó a la solución dietiléter frío en proporción 1:5 y se dejó reposar 30 minutos a -80° C, se centrifugó y se separó el sobrenadante. El proceso de lavado con éter frío se repitió dos veces más, separando el sobrenadante y finalmente el precipitado, que constituye el péptido liberado de la resina, se dejó secar por completo. La purificación de los péptidos se llevó a cabo mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR o HPLC por sus siglas en inglés) en fase reversa con una columna cromatográfica Semi-prep Waters® μ Bondapak C18 Prep Column, 125Å, 10 μ m, 7.9 mm X 300 mm. El gradiente de agua (Fase A) y ACN (Fase B) que se usó fue:

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	%A	%B	Curva
0	0.5	100	0	6
1	2.5	100	0	6
20	2.5	70	30	6
30	2.5	0	100	6
35	2.5	0	100	6
36	2.5	100	0	6
41	0.5	100	0	6

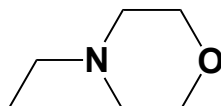
La absorbancia fue monitoreada a longitudes de onda de 214, 220 y 280 nm. Se colectaron los picos observados en el cromatograma con intensidad mayor a 0.5 unidades de absorbancia, y cada fracción fue analizada por espectrometría de masas. Se congelaron las muestras y se liofilizaron. Una vez que se tuvo el péptido puro, se analizó por espectrometría de masas y por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). En todos los casos, se obtuvo una pureza por arriba del 95%.

Preparación de las muestras

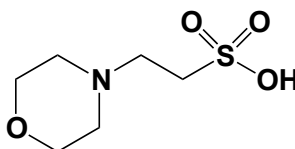
En la preparación de las muestras para estudios espectroscópicos se utilizaron como reactivos y disolventes:

Amortiguadores de pH (buffer):

Buffer NEM (N-etilmorfolina), $C_6H_{13}NO$ $pK_a = 7.77$.



Buffer MES (Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico), $C_6H_{13}NO_4S$, $pK_a = 6.27$.



Reactivos: Agua Milli-Q con resistividad de 18 MΩ/cm, glicerol, urea, DMSO, cloruro de sodio (NaCl), cloruro de cobre ($CuCl_2$), ácido clorhídrico (HCl) e hidróxido de sodio (NaOH).

Se determinaron los coeficientes de extinción molar para cada péptido en las mismas condiciones en las que se analizaron (ver tabla suplementaria S1). *Para algunos péptidos no es posible determinar dicho coeficiente. En estos casos se determina la concentración de la muestra a partir del peso del péptido en cuestión (con ayuda de una balanza nanoanalítica para tener un peso más exacto) y la disolución del mismo al volumen necesario para llegar a la concentración deseada. Las soluciones de péptidos se preparan a una concentración de 0.3 mM en una mezcla de soluciones amortiguadoras NEM 20 mM y buffer MES 20 mM con 50% glicerol, éste último con la finalidad de tener un adecuado glaseado para las muestras de EPR. Se comprobó por absorción electrónica y dicroísmo circular que la adición de glicerol no afecta la estructura de los complejos. *Las muestras del péptido hPrP(109-149) se prepararon a una concentración de 0.2 mM en urea 6 M y para algunas muestras del péptido hIAPP la preparación del stock se hace con DMSO.



Titulaciones de péptidos con Cu(II):

A las soluciones que contenían los péptidos debidamente cuantificados a determinado valor de pH se les adicionó 0.1 o 0.2 equivalentes de cobre, usando una solución stock de CuCl_2 25 o 20 mM. Las titulaciones fueron seguidas simultáneamente por Absorción electrónica y por Dicroísmo Circular (CD) en la región UV-Vis hasta saturar las señales que se observaban en los espectros. En cada caso se corrió como blanco la solución amortiguadora de trabajo.

Titulaciones de pH:

Los barridos a diferentes valores de pH se hicieron a partir de las soluciones que contenían al complejo formado Cu(II)-péptido variando el valor de pH cada 0.25 unidades por la adición de volúmenes necesarios (3-10 μL) de soluciones de NaOH y HCl de diferente molaridad, siguiendo estos cambios por CD.

Preparación de la muestra para Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC):

Las soluciones de los péptidos se prepararon a una concentración de 60 μM para los péptidos hPrP92-115(H96A) y hPrP92-115(H111A) y 30 μM para los péptidos hPrP92-115, hPrP92-115(M109I), hPrP92-115(M112I), hPrP92-115(M109I/M112I) en buffer NEM a pH 8.5. La solución titulante de Cu(II) se preparó a una concentración de 920 μM .

Anillado de oligonucleótidos (annealing):

Se prepararon por separado soluciones de los oligonucleótidos E2DBS-18 (banda sentido 5'-GTAACCGAAATCGGTTGA-3') y E2DBS18-fc (banda antisense 5'-TCAACCGATTTCGGTTAC-3') a una concentración 2 mM en Buffer NEM 5 mM y NaCl 250 mM y pH 7.5. Una vez disueltos en su totalidad, se mezclaron 1:1 y se colocaron a baño maría a punto de ebullición del agua por un periodo de 10 minutos. Posteriormente se trasladó el agua del baño junto con el recipiente que contenía los oligonucleótidos a un termo de 1 L y se cubrió; se dejó que la temperatura bajara lentamente (toda la noche) y una vez alcanzados los 25° C se retiró el tubo del baño de agua y se guardó a -20° C.

Métodos espectroscópicos

Condiciones experimentales

Espectrometría de masas. La caracterización inicial de cada péptido por su masa molecular y relación m/z fue determinada por espectrometría de masas en un Agilent ESI-TOF-MS con un volumen de inyección por muestra de 1 μ L, con un flujo de 0.4 mL/min en proporción 50:50 Agua:ACN. Las muestras fueron analizadas en un rango de 10 a 1500 m/z con polaridad positiva y fuente iónica de electrospray (ESI) bajo las condiciones: Fragmentor 200 V, Skimmer 60 V, OCT RF 250 V, gas temp 300° C, drying gas 8.0 L/min, nebulizer 40 psig, capillary 5000 V.

Absorción electrónica en la región UV/Vis. Los espectros de absorción fueron colectados a temperatura ambiente de 190 a 850 nm usando un espectrofotómetro Agilent 8453 con arreglo de diodos en celdas de cuarzo con paso óptico de 1.0 cm o 0.1 cm en el caso de la cuantificación por coeficiente de absorción molar.

Dicroísmo Circular en la región UV/Vis (CD). Los experimentos por CD se llevaron a cabo con un espectropolarímetro Jasco J-815 a temperatura ambiente en celda de cuarzo con paso óptico de 1.0 cm, de 200 a 800 nm con una velocidad de escaneo de 100 nm/min (200 nm/min en el caso de las titulaciones de pH) acumulando 2 espectros por corrida y un ancho de banda de 5 nm.

Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR). Los espectros de EPR fueron colectados usando un EPR de Banda-X Bruker EMX Plus equipado con el puente de microondas ER 041 XG, una cavidad ER 4102ST y un sistema de temperatura variable de nitrógeno ER4131VT. Todas las muestras fueron colectadas a una temperatura de 150 K en celdas de cuarzo de 4 mm con frecuencia de microonda de 9.4 GHz, poder de microonda de 10 mW, frecuencia de modulación de 100 kHz, amplitud de modulación de 5 G, tiempo constante de 327 msec, tiempo de conversión de 82 msec y de 6 a 12 repeticiones (scans) dependiendo de la



muestra. La simulación de los espectros de EPR se llevaron a cabo con XSophe Computer Simulation Software Suite Version 1.1.4.

Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC). Estos datos fueron colectados en el laboratorio 23 del Departamento de Química del Cinvestav en colaboración con el Dr. Aarón Rojas y el estudiante de doctorado Octavio Cruz. Los termogramas se colectaron con un Calorímetro Nano ITC en la versión de Standard Volume de TA Instruments a temperatura de 25° C. El número de inyecciones fue 32 de 3 μ L cada 200 segundos con un tiempo de 500 segundos entre inyecciones, a una velocidad de agitación de 250 rpm. Se utilizó el software Nano Analyze para tratar los datos obtenidos y todos los termogramas fueron corregidos por efecto de dilución del Cu(II) en el buffer.

Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Todos los datos de RMN fueron colectados por la sustentante de esta tesis durante una estancia de investigación realizada en el Max Planck Laboratory for Structural Biology, Chemistry and Molecular Biophysics of Rosario (MPLbioR), Universidad Nacional de Rosario, Rosario, Argentina y del Instituto de Investigaciones para el Descubrimiento de Fármacos de Rosario (IIDEFAR/CONICET-UNR) en Rosario, Argentina, en el grupo de investigación del Dr. Claudio O. Fernández junto con el Dr. Andrés Binolfi y el estudiante de doctorado Marco C. Miotto. Las muestras fueron preparadas en agua Milli-Q o en óxido de deuterio (según sea el caso) y buffer MES deuterado en tubos de 5 mm. El ajuste de pD se hace a partir de soluciones preparadas de NaOH y HCl en óxido de deuterio. Así también la solución de cobre se prepara con CuCl_2 en óxido de deuterio. Los espectros se colectaron en un RMN Bruker 600 MHz Avance II equipado con crio-sonda de triple resonancia con detección inversa $^1\text{H}(^{13}\text{C}/^{15}\text{N})$ a 298 K. La asignación de los protones y carbonos de los péptidos estudiados se hicieron por experimentos de 1D ^1H , $^1\text{H}-^1\text{H}$ TOCSY (con un tiempo de mezclado de 0.06 segundos), $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HMBC y $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HSQC. Los desplazamientos químicos fueron referenciados a DSS (Sal sódica del ácido 2,2,-dimetil-2-silapenta-5 sulfónico) como estándar interno. Para la adquisición, procesamiento y visualización de los espectros de RMN se uso TOPSPIN 3.2 (Bruker) y CcpNmr Analysis 2.4.2.⁴

Otros softwares empleados en el procesamiento de datos y presentación de imágenes:

KaleidaGraph™ versión 3.5.

Canvas versión 7.0.2.

Referencias

1. Jensen, K. J.; Shelton, P. T.; Pedersen, S. L. *Peptide synthesis and applications*. 2 ed.; Humana Press: New York, 2013; p 253.
2. Sarin, V. K., Kent, S. B. H., Tam, J. P., Merrifield, R.B. Quantitative Monitoring of Solid-Phase Peptide Synthesis by the Ninhydrin Reaction. *Anal. Biochem.* **1981**, *117*, 147-157.
3. Subirós-Funosas, R.; Khattab, S. N.; Nieto-Rodríguez, L.; El-Faham, A.; Albericio, F. Advances in Acylation Methodologies Enabled by Oxyma-Based Reagents. *Aldrichimica Acta* **2013**, *46*, 21-40.
4. Vranken, W. F.; Boucher, W.; Stevens, T. J.; Fogh, R. H.; Pajon, A.; Llinas, M.; Ulrich, E. L.; Markley, J. L.; Ionides, J.; Laue, E. D. The CCPN data model for NMR spectroscopy: development of a software pipeline. *Proteins* **2005**, *59*, 687-696.



Cinvestav

Tablas Suplementarias y Apéndices

Tablas Suplementarias

S1. Tabla de los péptidos sintetizados, su secuencia, fórmula mínima, peso molecular y caracterización por ESI-MS.

Péptidos de la proteína prion humana

Péptido	Secuencia	Formula mínima	Peso Molecular g/mol	m/z
hPrP(92-115)	Ac-GGGTHSQWNKPSKPKTNMKHMAGA-NH ₂	C ₁₁₀ H ₁₇₅ N ₃₇ O ₃₂ S ₂	2591.26	H ⁺ 2592.2693, Na ⁺ 2614.2513, 2H ⁺ 1296.6409
hPrP(92-115 H96A)	Ac-GGGTASQWNKPSKPKTNMKHMAGA-NH ₂	C ₁₀₇ H ₁₇₃ N ₃₅ O ₃₂ S ₂	2525.24	H ⁺ 2526.2475, Na ⁺ 2548.2287, 2H ⁺ 1263.6273, 2Na ⁺ 1285.6102
hPrP(92-115 H111A)	Ac-GGGTHSQWNKPSKPKTNMKAMAGA-NH ₂	C ₁₀₇ H ₁₇₃ N ₃₅ O ₃₂ S ₂	2525.24	H ⁺ 2526.2853, Na ⁺ 2548.2658, 2H ⁺ 1263.6467, 2Na ⁺ 1285.6299
hPrP(92-115 M109I)	Ac-GGGTHSQWNKPSKPKTNIKHMAGA-NH ₂	C ₁₁₁ H ₁₇₇ N ₃₇ O ₃₂ S	2573.31	H ⁺ 2574.3160, Na ⁺ 2596.2969, 2H ⁺ 1287.6605, 2Na ⁺ 1309.6437

hPrP(92-115 M112I)	Ac-GGGTHSQWNKPSKPKTNMKHIAGA-NH₂	C₁₁₁H₁₇₇N₃₇O₃₂S	2573.31	H⁺ 2574.3319, Na⁺ 2596.3148, 2H⁺1287.6685, 2Na⁺ 1309.6517
hPrP(92-115 M109I/M112I)	Ac-GGGTHSQWNKPSKPKTNIKHIAGA-NH₂	C₁₁₂H₁₇₉N₃₇O₃₂	2555.35	H⁺ 2556.3642, 2H⁺1278.6850,
hPrP(90-115)	GQGGGTHSQWNKPSKPKTNMKHMAGA-NH₂	C₁₁₅H₁₈₄N₄₀O₃₄S₂	2734.33	2H⁺1368.1756, 2H⁺1390.1578
hPrP(90-115 H96A)	GQGGGTASQWNKPSKPKTNMKHMAGA-NH₂	C₁₁₂H₁₈₂N₃₈O₃₄S₂	2668.31	H⁺ 2669.3140, Na⁺ 2691.2979, 2H⁺1335.1606, 2Na⁺ 1357.1428
hPrP(90-115 H111A)	GQGGGTHSQWNKPSKPKTNMKAMAGA-NH₂	C₁₁₂H₁₈₂N₃₈O₃₄S₂	2668.31	H⁺ 2669.3151, Na⁺ 2691.2984, 2H⁺1335.1610, 2Na⁺ 1357.1452
hPrP(111-115)	HMAGA-NH₂	C₁₉H₃₂N₈O₅S	484.22	H⁺ 485.228849
hPrP(106-126)	Ac-KTNMKHMAGAAAAGAVVGGGLG-NH₂	C₈₀H₁₃₈N₂₆O₂₄S₂	1911.98	2H⁺ 977.530120, 3H⁺ 652.020043,
hPrP(109-149)	Ac-MKHMAGAAAAGAVVGGGLGGWML GSAMSRPMMHFGNDWEDRY-NH₂	C₁₈₉H₂₈₆N₅₆O₅₂S₆	4365.98	-
hPrP(109-112)	Ac-MKHM-NH₂	C₂₄H₄₂N₈O₅S₂	586.27	H⁺ 587.2859, Na⁺ 609.2680

Péptidos de la IAPP humana

Péptido	Secuencia	Formula mínima	Peso Molecular g/mol	m/z
hiAPP(15-22)	Ac-FLVHSSNN-NH₂	C₄₂H₆₃N₁₃O₁₃	957.46	H⁺ 958.404711, Na⁺ 980.456133
hiAPP(15-22 H18A)	Ac-FLVASSNN-NH₂	C₃₉H₆₁N₁₁O₁₃	891.44	H⁺ 892.460958, Na⁺ 914.443166
hiAPP(15-22 S19P)	Ac-FLVHPSNN-NH₂	C₄₄H₆₅N₁₃O₁₂	967.48	H⁺ 968.489270, Na⁺ 990.472000
hiAPP(15-18)	Ac-FLVH-NH₂	C₂₄H₄₁N₇O₅	555.31	H⁺ 556.324231, Na⁺ 578.306177
hiAPP(18-22)	Ac-HSSNN-NH₂	C₂₂H₃₄N₁₀O₁₀	598.24	H⁺ 599.259702, Na⁺ 621.234787
hiAPP(18-22 S19Sar)	Ac-HSarSNN-NH₂	C₂₂H₃₄N₁₀O₉	582.25	H⁺ 583.261120, Na⁺ 605.240365
hiAPP(18-22 S20Sar)	Ac-HSSarNN-NH₂	C₂₂H₃₄N₁₀O₉	582.25	H⁺ 583.261452, Na⁺ 605.237748
hiAPP(18-22 S19A)	Ac-HASNN-NH₂	C₂₂H₃₄N₁₀O₉	582.25	H⁺ 583.257173, Na⁺ 605.237813
hiAPP(18-22 S20A)	Ac-HSANN-NH₂	C₂₂H₃₄N₁₀O₉	582.25	H⁺ 583.259056, Na⁺ 605.240125
hiAPP(18-22 N21Q)	Ac-HSSQN-NH₂	C₂₃H₃₆N₁₀O₁₀	612.26	H⁺ 613.268152, Na⁺ 635.248676
hiAPP(18-22 N22Q)	Ac-HSSNQ-NH₂	C₂₃H₃₆N₁₀O₁₀	612.26	H⁺ 613.269312, Na⁺ 635.250312
hiAPP(18-22 N22L)	Ac-HSSNL-NH₂	C₂₄H₃₉N₉O₉	597.28	H⁺ 598.293496, Na⁺ 620.273830

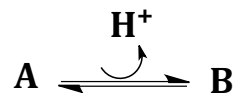
S2. Tabla de coeficientes de extinción molar a diferentes longitudes de onda. ($\text{Mm}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

Péptido	214 nm	221 nm	280 nm
hPrP(92-115)	48.189	40.166	4.180
hPrP(92-115 H96A)	41.521	34.902	3.912
hPrP(92-115 H111A)	45.389	39.711	4.278
hPrP(92-115 M109I)	47.719	40.811	4.330
hPrP(92-115 M112I)	45.550	40.097	4.135
hPrP(92-115 M109I/M112I)	44.036	38.577	4.019
		220 nm	
hPrP(90-115)	39.184	35.193	3.636
hPrP(90-115 H96A)	38.746	35.223	4.416
hPrP(90-115 H111A)	39.849	35.031	3.571
hPrP(111-115)	9.038	6.266	-
hIAPP(18-22)	7.067	4.845	-

Apéndice I

Cálculos para equilibrios de protonación

Para la reacción:



Donde A representa al complejo Cu(II)-péptido en su forma protonada (valores de pH bajos); mientras B representa al complejo Cu(II)-péptido en su forma desprotonada (valores de pH altos).

La constante de equilibrio para esta reacción se expresa como:

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

Sin embargo la concentración total del complejo Cu(II)-péptido esta dado por:

$$[\text{Complejo}]_{\text{Tot}} = [A] + [B] \dots \dots (1)$$

Expresando (1) en términos de [A] y [B]:

$$[\text{Complejo}]_{\text{Tot}} = [A] + \frac{K_a[A]}{[H^+]} \dots \dots (2)$$

$$[\text{Complejo}]_{\text{Tot}} = \frac{[B][H^+]}{K_a} + [B] \dots (7)$$

$$[\text{Complejo}]_{\text{Tot}} = [A] \left(1 + \frac{K_a}{[H^+]} \right) \dots (3)$$

$$[\text{Complejo}]_{\text{Tot}} = [B] \left(1 + \frac{[H^+]}{K_a} \right) \dots (8)$$

$$\frac{[A]}{[\text{Complejo}]_{\text{Tot}}} = \left(1 + \frac{K_a}{[H^+]} \right)^{-1} \dots \dots (4)$$

$$\frac{[B]}{[\text{Complejo}]_{\text{Tot}}} = \left(1 + \frac{[H^+]}{K_a} \right)^{-1} \dots (9)$$

$$\frac{[A]}{[\text{Complejo}]_{\text{Tot}}} = \left(\frac{[H^+] + K_a}{[H^+]} \right)^{-1} \dots \dots (5)$$

$$\frac{[B]}{[\text{Complejo}]_{\text{Tot}}} = \left(\frac{K_a + [H^+]}{K_a} \right)^{-1} (10)$$

$$\frac{[A]}{[\text{Complejo}]_{\text{Tot}}} = \frac{[H^+]}{[H^+] + K_a} \dots \dots (6)$$

$$\frac{[B]}{[\text{Complejo}]_{\text{Tot}}} = \frac{K_a}{K_a + [H^+]} \dots \dots (11)$$

Pero $[H^+] = 10^{-pH}$ y $K_a = 10^{-pKa}$, por lo tanto (6) y (11):

$$\frac{[A]}{[Complejo]_{Tot}} = \frac{10^{-pH}}{10^{-pH} + 10^{-pKa}}$$

$$= \chi_A \dots \dots (12)$$

$$\frac{[B]}{[Complejo]_{Tot}} = \frac{10^{-pKa}}{10^{-pKa} + 10^{-pH}}$$

$$= \chi_B \dots \dots (13)$$

Para un experimento de CD en donde se mide la intensidad de señal $\Delta\varepsilon$:

$$\Delta\varepsilon_{obs} = \Delta\varepsilon_A \chi_A + \Delta\varepsilon_B \chi_B \dots \dots (14)$$

Sustituyendo (12) y (13) en ecuación (14):

$$\Delta\varepsilon_{obs} = \Delta\varepsilon_A \left(\frac{10^{-pH}}{10^{-pH} + 10^{-pKa}} \right) + \Delta\varepsilon_B \left(\frac{10^{-pKa}}{10^{-pKa} + 10^{-pH}} \right) \dots \dots (15)$$

$$\Delta\varepsilon_{obs} = \frac{\Delta\varepsilon_A 10^{-pH} + \Delta\varepsilon_B 10^{-pKa}}{10^{-pH} + 10^{-pKa}} \dots \dots (16)$$

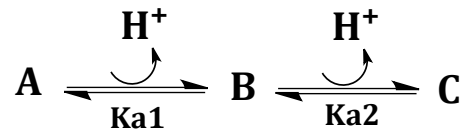
Expresando ecuación (16) en términos de concentración:

$$\Delta\varepsilon_{obs} = \frac{\Delta\varepsilon_{pHbajo} [H^+] + \Delta\varepsilon_{pHalto} K_a}{[H^+] + K_a} \dots \dots (17)$$

Las ecuaciones (16) y (17) representan el modelo del equilibrio de protonación, donde $\Delta\varepsilon_{obs}$ es la intensidad de señal de CD observable a cualquier valor de pH, K_a es la constante de equilibrio asociada al equilibrio de protonación del complejo Cu(II)-péptido, $\Delta\varepsilon_{pHbajo}$ es la intensidad de señal de CD asociada con la forma protonada del complejo, y $\Delta\varepsilon_{pHalto}$ es la intensidad de señal de CD asociada con la forma desprotonada.

Los datos experimentales que fueron obtenidos a partir de los estudios de las titulaciones potenciométricas realizados en este trabajo de tesis pudieron ser ajustados con el modelo anterior para un solo equilibrio de protonación y el software KaleidaGraph™ versión 3.5. De igual forma se trataron los datos para el ajuste a dos y tres equilibrios de protonación.

Modelo para dos eventos de protonación:

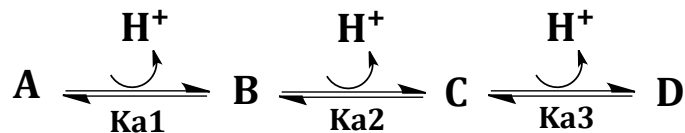


$$\Delta\varepsilon_{\text{obs}} = \frac{\Delta\varepsilon_A(10^{-2\text{pH}}) + \Delta\varepsilon_B(10^{-\text{pH}-\text{pKa1}}) + \Delta\varepsilon_C(10^{-\text{pKa1}-\text{pKa2}})}{10^{-2\text{pH}} + 10^{-\text{pKa1}-\text{pH}} + 10^{-\text{pKa1}-\text{pKa2}}}$$

$$\Delta\varepsilon_{\text{obs}} = \frac{\Delta\varepsilon_1 2[\text{H}^+] + \Delta\varepsilon_2 [\text{H}^+] \text{Ka1} + \Delta\varepsilon_3 \text{Ka1Ka2}}{2[\text{H}^+] + [\text{H}^+] \text{Ka1} + \text{Ka1Ka2}}$$

$\Delta\varepsilon_{\text{obs}}$ es la intensidad de señal de CD observable a cualquier valor de pH, K_{a1} y K_{a2} son las constantes de equilibrio asociadas a dos eventos de protonación del complejo Cu(II)-péptido, $\Delta\varepsilon_1$, $\Delta\varepsilon_2$ y $\Delta\varepsilon_3$ son las intensidades de la señal de las tres diferentes especies con diferentes estados de protonación.

Modelo para tres eventos de protonación:



$$\Delta\varepsilon_{\text{obs}} = \frac{\Delta\varepsilon_A(10^{-3\text{pH}}) + \Delta\varepsilon_B(10^{-2\text{pH}-\text{pKa1}}) + \Delta\varepsilon_C(10^{-\text{pH}-\text{pKa1}-\text{pKa2}}) + \Delta\varepsilon_D(10^{-\text{pKa1}-\text{pKa2}-\text{pKa3}})}{10^{-3\text{pH}} + 10^{-2\text{pH}-\text{pKa1}} + 10^{-\text{pH}-\text{pKa1}-\text{pKa2}} + 10^{-\text{pKa1}-\text{pKa2}-\text{pKa3}}}$$

$$\Delta\varepsilon_{\text{obs}} = \frac{\Delta\varepsilon_1 3[\text{H}^+] + \Delta\varepsilon_2 2[\text{H}^+] \text{Ka1} + \Delta\varepsilon_3 [\text{H}^+] \text{Ka1Ka2} + \Delta\varepsilon_4 \text{Ka1Ka2Ka3}}{3[\text{H}^+] + 2[\text{H}^+] \text{Ka1} + [\text{H}^+] \text{Ka1Ka2} + \text{Ka1Ka2Ka3}}$$

$\Delta\varepsilon_{\text{obs}}$ es la intensidad de señal de CD observable a cualquier valor de pH, K_{a1} y K_{a2} y K_{a3} son las constantes de equilibrio asociadas a tres eventos de protonación del complejo Cu(II)-péptido, $\Delta\varepsilon_1$, $\Delta\varepsilon_2$, $\Delta\varepsilon_3$ y $\Delta\varepsilon_4$ son las intensidades de la señal de las cuatro diferentes especies con diferentes estados de protonación.

Apéndice II

Cálculo de distancias a partir de contribuciones paramagnéticas por RMN

Se determinó la rapidez de relajación de contribuciones paramagnéticas del ion metálico Cu(II) a los espines nucleares de los protones H ϵ y H δ del imidazol del residuo de histidina.¹ La medición de la relajación da información acerca de la interacción entre el núcleo resonante y el electrón desapareado,² así, por experimentos de recuperación de la inversión, se calcula T₁ (tiempo que tarda la magnetización en regresar al equilibrio) de H ϵ y H δ para el péptido libre, y para las especies unidas a Cu(II).

T₁ se determinó por dos métodos: i) directamente con el software del equipo TopSpin® con el módulo T1/T2 de relajación; o bien ii) a partir del ajuste de tres parámetros de las intensidades de los picos con la ecuación exponencial:

$$I(t) = I_0 + B * \exp\left(-t/T_1\right)$$

Donde I representa las intensidades del pico, B es un parámetro variable que considera la magnetización no-ideal, y t es el intervalo del tiempo variable.³

El cálculo del incremento en la rapidez de relajación nuclear longitudinal debido al acoplamiento dipolar con el electrón desapareado del Cu(II), R_{1M}, da la información acerca de la distancia entre los núcleos y el ion metálico.² Así,:

$$R_{1M} = \frac{1}{\frac{(x_{\text{enlazado}} - [(R_{1\text{enlazado}} - R_{1\text{libre}}) * (1 - x_{\text{enlazado}})] * \tau)}{(R_{1\text{enlazado}} - R_{1\text{libre}}) * (1 - x_{\text{enlazado}})}}$$

Donde, R_{1M} es el tiempo de relajación longitudinal, τ es el tiempo de correlación de intercambio ($\tau = 1/k_{\text{off}}$, calculada usando una distancia de 0.3 nm de Cu(II) a H ϵ ¹) y 1 - x_{enlazado} es la fracción molar unida y enlazada, además de:

$$R_{1\text{libre}} = \frac{1}{T_{1\text{libre}}} \quad R_{1\text{enlazado}} = \frac{1}{T_{1\text{enlazado}}}$$

Así, para el cálculo de las distancias núcleo-metal:

$$r = \left(\frac{K_{\text{Tot}}}{R_{1M}} \right)^{1/6}$$

Donde la K_{Tot} :⁴

$$K_{\text{Tot}} = k_S + k_C$$

$$k_C = \frac{2}{5} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\omega_I^2 g_e^4 \mu_B^4 S^2 (S+1)^2}{(3kT)^2} \frac{3\tau_{\text{Curie}}}{1 + \omega_I^2 \tau_{\text{Curie}}^2}$$

$$k_S = \frac{2}{15} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \gamma_I^2 g_e^2 \mu_B^2 S(S+1) \left[\frac{\tau_c}{1 + (\omega_I - \omega_S)^2 \tau_c^2} + \frac{3\tau_c}{1 + \omega_I^2 \tau_c^2} + \frac{6\tau_c}{1 + (\omega_I + \omega_S)^2 \tau_c^2} \right]$$

Donde:

μ_0 = permeabilidad en el vacío ($4\pi \times 10^{-7} \text{ kg m s}^{-2} \text{ A}^{-2}$)

ω_I = frecuencia de Larmour nuclear ($\omega_S = 658.2\omega_I$)

ω_S = frecuencia de Larmour del electron ($\omega_I = \gamma_I B_0$)

$g_e = 2.0023$

μ_B = magnetón de Bohr ($9.2740 \times 10^{-24} \text{ J T}^{-1}$)

S = número cuántico de spin electrónico (1/2)

k = constante de Boltzmann ($1.3807 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$)

T = temperatura (298 K)

τ_{Curie} = tiempo de correlación efectiva entre el rotacional y de intercambio (1×10^{-10})

γ_I = razón magnetogírica del proton ($2.6752 \times 10^8 \text{ rad s}^{-1} \text{ T}^{-1}$)

τ_c = tiempo de correlación efectiva (1×10^{-10})

ν = frecuencia del espectrómetro ($6.13 \times 10^8 \text{ Hz}$)

Estas contribuciones paramagnéticas a la relajación nuclear son debidas a la interacción dipolar entre el momento magnético nuclear y el promedio del momento magnético electrónico inducido, con un tiempo de correlación dependiente en el tiempo de reorientación y el tiempo de vida nuclear.⁵

Referencias

1. Gaggelli, E.; Kozlowski, H.; Valensin, D.; Valensin, G. NMR studies on Cu(II)-peptide complexes: exchange kinetics and determination of structures in solution. *Mol. Biosyst.* **2005**, *1*, 79-84.
2. Bertini, I.; Luchinat, C. *Coord. Chem. Rev.* **1996**, *150*, 1-292.
3. Gaggelli, E.; Bernardi, F.; Molteni, E.; Pogni, R.; Valensin, D.; Valensin, G.; Remelli, M.; Luczkowski, M.; Kozlowski, H. Interaction Of The Human Prion PrP(106-126) Sequence With Copper(II), Manganese(II), And Zinc(II)- NMR and EPR Studies. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 996-1006.
4. Bertini, I.; Luchinat, C.; Parigi, G.; Ravera, E. *NMR of Paramagnetic Molecules. Applications to Metallobiomolecules and Models*. 2nd ed.; 2017.
5. Bertini, I.; Luchinat, C.; Parigi, G. In *NMR of Biomolecules: Towards Mechanistic Systems Biology*; First ed.; Bertini, I., McGreevy, K. S., Parigi, G., Ed.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2012; Chapter 8.



Cinvestav

Anexo

Artículos publicados

Copper Coordination Features of Human Islet Amyloid Polypeptide: The Type 2 Diabetes Peptide

Carolina Sánchez-López,[†] Rodrigo Cortés-Mejía,[‡] Marco C. Miotto,[§] Andres Binolfi,[§] Claudio O. Fernández,[§] Jorge M. del Campo,[‡] and Liliana Quintanar^{*,†}

[†]Departamento de Química, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (Cinvestav), Mexico City, Mexico

[‡]Departamento de Física y Química Teórica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City, Mexico

[§]Max Planck Laboratory for Structural Biology, Chemistry and Molecular Biophysics of Rosario (MPLbioR, UNR-MPIIbPC) and Instituto de Investigaciones para el Descubrimiento de Fármacos de Rosario (IIDEFAR, UNR-CONICET), Universidad Nacional de Rosario, Ocampo y Esmeralda, S2002LRK Rosario, Argentina

Supporting Information

ABSTRACT: Human islet amyloid polypeptide (hIAPP) is the major component of amyloid deposits found in pancreatic β -cells of patients with type 2 diabetes (T2D). Copper ions have an inhibitory effect on the amyloid aggregation of hIAPP, and they may play a role in the etiology of T2D. However, deeper knowledge of the structural details of the copper–hIAPP interaction is required to understand the molecular mechanisms involved. Here, we performed a spectroscopic study of Cu(II) binding to hIAPP and several variants, using electron paramagnetic resonance (EPR), nuclear magnetic resonance (NMR), electronic absorption, and circular dichroism (CD) in the UV–vis region in combination with Born–Oppenheimer molecular dynamics (BOMD) and density functional theory geometry optimizations. We find that Cu(II) binds to the imidazole N1 of His18, the deprotonated amides of Ser19 and Ser20, and an oxygen-based ligand provided by Ser20, either via its hydroxyl group or its backbone carbonyl, while Asn22 might also play a role as an axial ligand. Ser20 plays a crucial role in stabilizing Cu(II) coordination toward the C-terminal, providing a potential link between the S20G mutation associated with early onset of T2D, its impact in Cu binding properties, and hIAPP amyloid aggregation. Our study defines the nature of the coordination environment in the Cu(II)–hIAPP complex, revealing that the amino acid residues involved in metal ion binding are also key residues for the formation of β -sheet structures and amyloid fibrils. Cu(II) binding to hIAPP may lead to the coexistence of more than one coordination mode, which in turn could favor different sets of Cu-induced conformational ensembles. Cu-induced hIAPP conformers would display a higher energetic barrier to form amyloid fibrils, hence explaining the inhibitory effect of Cu ions in hIAPP aggregation. Overall, this study provides further structural insights into the bioinorganic chemistry of T2D.

INTRODUCTION

Human islet amyloid polypeptide (hIAPP) or amylin is an amyloidogenic C-terminally amidated peptide of 37 residues with sequence KCNTATCATQRLANFLVHSSNFG-AILSSTNVGSNTY-NH₂. It has a disulfide bridge between residues 2 and 7, and it is cosecreted with insulin by β -cells in the islets of Langerhans in the pancreas.¹ This peptide is the major component of amyloid deposits found in pancreatic islets affecting up to 80% of islets² in more than 90% of patients with type 2 diabetes.³

Type 2 diabetes is a multifactorial disease with genetic and environmental components, characterized by a decreased ability of insulin to stimulate glucose metabolism⁴ and a β -cell secretory dysfunction and/or decreased β -cell mass.⁵ Some mammalian species including humans, monkeys, felines

(domestic cat, lynx, cougars), and raccoons, are prone to form amyloid deposits in pancreatic islets, rendering them susceptible to type 2 diabetes. Remarkably, islet amyloid is not found in islets of rodents.⁶ Amyloid deposits are mostly present in extracellular sites in diabetic animals and may be extended to adjacent capillaries affecting islet function, which can be associated with the destruction and displacement of cells.² Moreover, it has been observed that patients with insulin resistance have higher plasma concentrations of hIAPP than healthy people.⁶ hIAPP is toxic to β -cells in vitro in its fibrillar form.⁷ Several studies suggest that the species with highest cytotoxicity are the protofibrils and oligomers, and not the

Received: August 12, 2016

Published: October 5, 2016

Table 1. Peptide Sequences and EPR Parameters^a for Their Complexes with Cu(II)

peptide	sequence	g_{\parallel}	A_{\parallel} ($\times 10^{-4}$ cm ⁻¹)	coordination mode
hIAPP(15–22)	Ac-FLVHSSNN-NH ₂	2.234	164	3N1O
hIAPP(18–22)	Ac-HSSNN-NH ₂	2.239	158	3N1O
hIAPP(15–22)S19P	Ac-FLVHPSNN-NH ₂	2.233	173	2N2O
hIAPP(18–22) S19Sar ^b	Ac-HSarSNN-NH ₂	2.296	150	2N2O/1N3O
hIAPP(18–22) S20Sar ^b	Ac-HSSarNN-NH ₂	2.281	168	2N2O/1N3O
hIAPP(18–22) S19A	Ac-HASNN-NH ₂	2.240	159	3N1O
hIAPP(18–22) S20A	Ac-HSANN-NH ₂	2.246	151	3N1O
hIAPP(18–22) N21Q	Ac-HSSQN-NH ₂	2.239	156	3N1O
hIAPP(18–22) N22Q	Ac-HSSNQ-NH ₂	2.240	151	3N1O
hIAPP(18–22) N22L	Ac-HSSNL-NH ₂	2.244	146	3N1O

^a g_{\parallel} and A_{\parallel} values were obtained from the simulation of each spectrum; a full list of EPR parameters is given in Table S1. ^bSar = sarcosine or *N*-methylglycine.

mature fibrils formed by hIAPP.¹ Amyloid aggregates of hIAPP can induce apoptosis of β -cells through various mechanisms, which include disruption of lipid membranes, permeabilization of cell membranes, oxidative stress, activation of calpain-2, and mitochondrial dysfunction, among others.⁸

The process of amyloid formation has been studied extensively, leading to the identification of many factors that may affect its aggregation pathway, including genetic factors such as the S20G mutation in hIAPP,⁹ seeding process of the fragments of the hIAPP precursor (proIAPP) and hIAPP glycation.² The ability of hIAPP to form amyloid fibrils resides largely in its primary sequence. The region comprising residues 20–29 (SNNFGAILSS) is key to amyloid formation,^{1,8} but the regions 8–20 and 30–37 also form fibers.² The inability of rodent IAPP to form fibrils is attributed to sequence differences in the 20–29 region (SNNLGPVLPP for rodent IAPP), where the presence of three proline residues is thought to block the β -sheet formation.¹⁰

The formation of hIAPP amyloid fibrils can also be impacted by other molecules, such as proteins, peptide hormones (like insulin), and metal ions.¹¹ The role of metal ions in diseases associated with protein aggregation processes has been studied extensively, particularly for the case of amyloidogenic proteins, such as amyloid- β , α -synuclein, and prion protein. An important role for metal ions, mainly copper and zinc, has been identified in the amyloid aggregation of these proteins.^{12–14} In the case of hIAPP, various studies have suggested that zinc deficiency is associated with type 2 diabetes.¹⁵ The role of Zn(II) in the aggregation of hIAPP has been extensively studied, and it has been demonstrated in vitro that this metal ion delays the fibril formation of hIAPP by anchoring to His18 and affecting the local conformation around this residue.^{16,17} Zinc promotes the formation of early aggregates and affects their morphology and density.¹⁸ The binding affinity of zinc for hIAPP is associated with a $K_d = 1.12$ μ M,¹⁹ which is the same order of magnitude as the concentrations of zinc found in the extracellular space (15–25 μ M).²⁰

On the other hand, the role of the copper ion in amyloid formation of hIAPP is of particular interest given that serum copper levels in diabetic patients are higher in comparison to healthy people.^{21–25} It has been proposed that the deregulation of copper homeostasis could play a role in T2D.²⁶ Cu(II) also inhibits hIAPP amyloid fibrillogenesis²⁷ by binding to His18 residue in hIAPP.^{17,28,29} Recent studies have shown that copper inhibits the proteolytic action of insulin-degrading enzyme (IDE), which is responsible for hIAPP degradation.³⁰ The

proposed mechanism involves specific coordination of the metal ion to hIAPP, which could induce conformational changes in the peptide, rendering it unavailable for enzymatic hydrolysis.³¹

The role of copper in the cytotoxicity of hIAPP has been explored by many groups in two aspects: (1) aggregation of the peptide and formation of oligomeric species in the presence of metal ion^{17,31–34} and (2) formation of reactive oxygen species (ROS) that could contribute to an increase of oxidative stress.^{31,34,35} Viability assays have demonstrated that copper induces the formation of oligomeric species, increasing the cytotoxicity of hIAPP,^{31,33,34} while other studies reveal cell apoptosis caused by copper–peptide complexes.^{33,34} Recent findings by Lee and co-workers¹⁷ showed that Cu(II)-containing oligomers of hIAPP form toxic aggregates with random coil conformations. On the other hand, experiments with catalase and electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy demonstrated that copper can stimulate the formation of H₂O₂ during amyloid formation, promoting progressive degeneration of β -cells.³⁵ It has been suggested that copper-induced formation of ROS can cause mitochondrial damage, leading to apoptosis.³⁴

Overall, it is clear that copper ions impact the amyloid aggregation properties of hIAPP and may play a role in its toxicity and in the etiology of type 2 diabetes. Understanding the mechanisms involved requires a deeper knowledge of the structural details of the interaction of copper with hIAPP. Our previous study showed that the interaction of copper with the region encompassing His18 and the residues that follow (18–22) competes with the formation of β -rich structures and delays the formation of hIAPP fibrils.²⁹ In the present work, we have performed a detailed spectroscopic study of Cu(II) binding to monomeric hIAPP, using EPR, nuclear magnetic resonance (NMR), electronic absorption and circular dichroism (CD) in the UV–vis region in combination with electronic structure calculations and Born–Oppenheimer molecular dynamics (BOMD). The construction of several variants of the hIAPP(18–22) peptide have allowed the evaluation of the role of each residue in copper binding. Our study defines the nature of the coordination environment around the metal ion in the Cu(II)–hIAPP complex, revealing that the amino acid residues involved in metal ion binding are also key residues for the formation of β -sheet structures and amyloid fibrils.

EXPERIMENTAL SECTION

Reagents. 9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) protected amino acids, Rink Amide MBHA resin, and ethyl (hydroxyimino)-

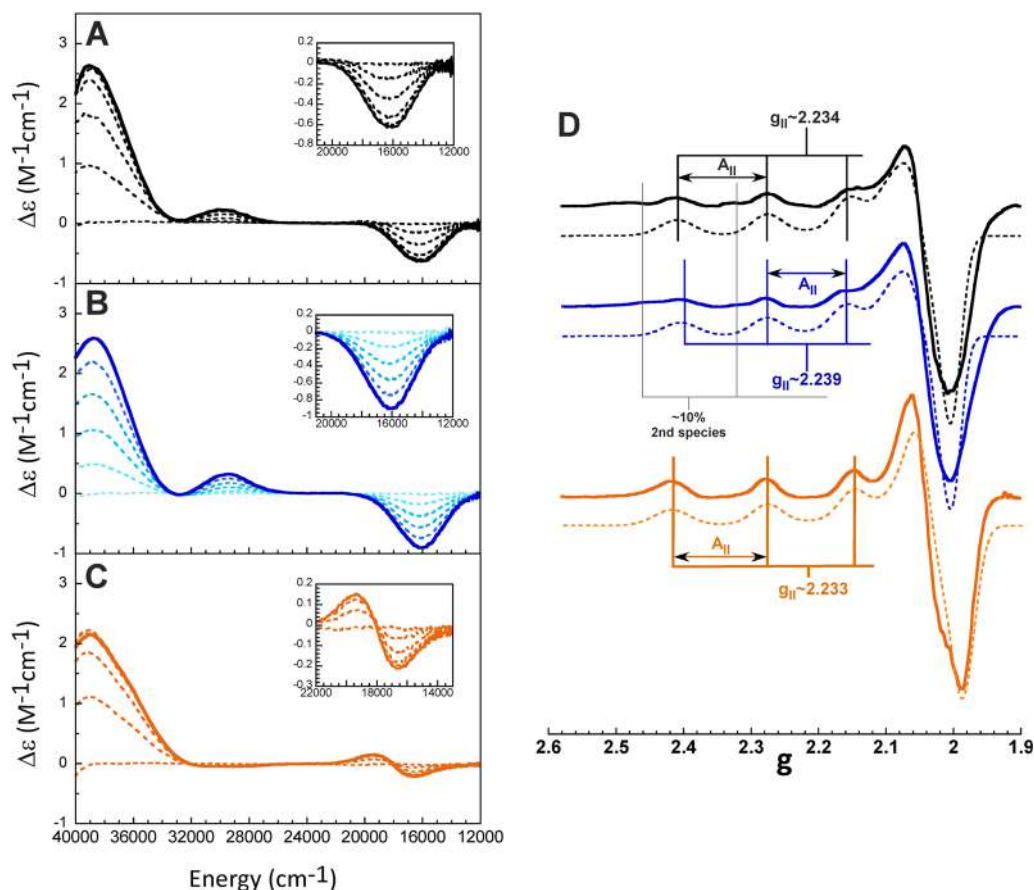


Figure 1. (A) Titration of hIAPP(15–22) (black) (A), hIAPP(18–22) (blue) (B), and hIAPP(15–22, S19P) (orange) (C) fragments with Cu(II) as followed by circular dichroism at pH 7.5. Spectra recorded after addition of 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 equiv (dashed light color lines) and 1.0 equiv of Cu(II) (continuous dark line) are shown. (D) EPR spectra of the Cu(II) complexes with hIAPP(15–22) (black), hIAPP(18–22) (blue), hIAPP(15–22, S19P) (orange), after addition of 1.0 equiv of metal ion. Dotted lines correspond to the simulated EPR spectra, using parameters listed in Table S1.

cyanoacetate (Oxyme Pure) for peptides synthesis were obtained from Novabiochem. The reagents and solvents were reagent grade from Sigma. HPLC-grade acetonitrile from Honeywell was used for peptide purification. Water was purified to a resistivity of 18 M Ω /cm using Millipore Gradient deionized system. Deuterium oxide and deuterated 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) buffer were purchased from Sigma.

Peptide Synthesis and Purification. The peptides listed in Table 1 were synthesized by solid-phase synthesis and Fmoc strategy, using Fmoc-Rink amide resin.^{36,37} All peptides were acetylated at the amino terminus, and the carboxylic terminal was amidated. Crude peptides were purified by HPLC using a semipreparative C18 reversed phase column. Peptide purity was determined by analytical HPLC and was found to be >95%. Electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) determined the molecular weight of each peptide, and all purified products presented the expected molecular mass.

Preparation of Peptide Samples. Peptide solutions were prepared in a mixture of 20 mM MES buffer and 20 mM *N*-ethylmorpholine (NEM) buffer. For the pH titrations, the pH was varied every 0.25 pH units by adding the necessary volume of NaOH or HCl solutions, and it was followed by CD spectroscopy. Peptide samples for EPR spectroscopy were prepared in the same buffer mixture with 50% glycerol to achieve adequate glassing. The addition of glycerol has no effect on the structure of the Cu(II)–peptide complexes, as evaluated by absorption and CD spectroscopy for all buffer solutions and pH values used in this study. Final peptide concentrations were on the order of 0.4 mM. The NMR experiments were performed on 5.0 mM (¹³C NMR) peptide samples dissolved in 100% deuterium oxide. For 1D-IR experiments the samples were

prepared in 100% deuterium oxide and 20 mM of deuterated MES buffer with a final concentration of 0.3 mM. In each case the pH was adjusted to 7.5 with NaOH in D₂O.

UV–Visible Absorption and Circular Dichroism (CD) Spectroscopy. Room temperature absorption spectra were recorded using an Agilent 8453 diode array spectrometer, and CD spectra were acquired on a Jasco J-815 CD spectropolarimeter at room temperature. A 1 cm path length quartz cell was used, and spectra were recorded between 230 and 830 nm sampling points every 2 nm and with a scanning speed of 100 nm/min.

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 frequency, 9.4 GHz; microwave power, 10.02 mW; modulation amplitude, 5 G; modulation frequency, 100 kHz; time constant, 327.68 ms; conversion time, 82 ms; and averaging over six scans. EPR spectra were recorded at 150 K using an ER4131VT variable temperature nitrogen system. EPR spectra were simulated with XSophe Computer Simulation Software Suite Version 1.1.4.

NMR Spectroscopy. NMR spectra were acquired on a Bruker 600 MHz Avance II equipped with cryogenically cooled triple resonance ¹H(¹³C/¹⁵N) TCI probe at 298 K. Proton and carbon resonances were assigned by 1D ¹H, ¹H–¹H TOCSY, ¹H–¹³C HMBBC, and ¹H–¹³C HSQC experiments. Chemical shifts were referenced to DSS as an internal standard. Proton spin–lattice relaxation rates were measured with a standard inversion recovery (1D-IR) Bruker pulse sequence. The *T*₁ values were determined by a three-parameter fit of peak intensities to the following equation:

$$I(t) = I_0[1 - (1 + B) \exp(-t/T_1)]$$

where B is a variable parameter that considers nonideal magnetization whose value is less than unity.^{38,39} The paramagnetic contributions of Cu(II) to the spin–lattice relaxation rate, R_{1p} , were calculated according to⁴⁰

$$R_{1p} = R_{1\text{obs}} - p_f R_{1\text{free}} = \frac{p_b}{R_{1b}^{-1} + \tau_M}$$

where f and b refer to the free and metal-bound states, respectively, the p 's are fractional populations of the peptide, $R_{1\text{free}}$ and R_{1b} are the spin–lattice relaxation rates in the two environments, and τ_M (the inverse of the off-rate kinetic constant) is the residence time of the peptide in the metal coordination sphere. R_{1b} ($1/T_{1b}$) is accounted for by the Solomon equation describing the dipole–dipole nuclear spin–electron spin interaction, here reported for systems with $S = 1/2$:^{40,41}

$$R_{1b} = \frac{1}{10} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{2\hbar^2 \gamma_I^2 \gamma_S^2}{r^6} \left\{ \frac{\tau_C}{1 + (\omega_I - \omega_S)^2 \tau_C^2} + \frac{3\tau_C}{1 + \omega_I^2 \tau_C^2} + \frac{6\tau_C}{1 + (\omega_I + \omega_S)^2 \tau_C^2} \right\}$$

where μ_0 is the permeability of the vacuum, γ_I and γ_S are the nuclear and electron magnetogyric ratios, respectively, \hbar is the reduced Planck constant, ω_I and ω_S are the nuclear and electron Larmor frequencies, respectively, r is the proton–metal distance, and τ_C is the effective correlation time.

Acquisition, processing, and visualization of the NMR spectra were performed using TOPSPIN 3.2 (Bruker) and CcpNmr Analysis 2.4.2.⁴²

Theoretical Studies. The gas phase models for the Cu(II)–hIAPP(18–22) complex were constructed with Molden⁴³ using the full peptide fragment 18–22 (total number of atoms was 75) and optimized with TeraChem,⁴⁴ using spin-unrestricted Kohn–Sham theory within the linear combination of Gaussian-type orbitals to solve the Kohn–Sham equations. For all models, a spin multiplicity of two was imposed, employing the PBE⁴⁵ exchange–correlation functional and DZVP⁴⁶ basis set as implemented in the deMon2k⁴⁷ code. Explicit solvation was included by adding four water molecules to each model and reoptimizing the structures. NVT BOMD were performed with spherical boundary conditions using TeraChem code default options, namely, a time step of 1 fs was used to integrate the equations of motion, the temperature was controlled at 300 K by rescaling at each step the velocities of the atoms. The BOMD simulation was carried out for 60 ps. From this time window, a local search for minimum energy conformers at 0 K was performed, which made it possible to identify the lowest energy conformers through this sampling. We then performed two regular BOMD simulations of 20 ps (releasing the spherical boundary conditions) for the lowest energy optimized model, rescaling the temperature every 50 integration steps. Afterward, the first 3 ps of the simulation were discarded, and the energy minima were reoptimized to be used as a starting point for a second BOMD simulation with total of time length of 20 ps. This procedure was used because the system remained with the same coordination pattern along the first BOMD simulation. Selected points from this last BOMD sampling were used for successive geometry optimizations and spectroscopic simulation.

EPR parameters for selected models were calculated employing the eprnmr module implemented in the 3.0.2 version of the ORCA⁴⁸ electronic structure code. For such calculations, the hybrid exchange–correlation functional PBE0^{49,50} was used; a DGAUSS basis set was used for main row atoms, and the Core Property basis⁵¹ was used for the copper atom. It is important to mention that a special grid and an integral accuracy of seven for copper (as reported in the Orca manual) were also used. In all cases the center of electric charge was used as a gauge origin and the orbital energy window used was (–1000,1000) hartree. Although the models already included four explicit water molecules, the COSMO implicit solvation, as implemented in ORCA,

was also used. Spin–orbit coupling was requested with SOCFlags 1,3,3,1.

RESULTS AND ANALYSIS

hIAPP(18–22) as a Model for Cu(II) Binding to

Monomeric hIAPP. Cu(II) coordination to hIAPP has been previously studied using the hIAPP(15–22) fragment. A titration of this peptide with Cu(II), followed by CD, shows the growth of signals associated with the hIAPP(15–22)–Cu(II) complex (Figure 1A), namely, a negative ligand field transition as 16 200 cm^{–1} ($\Delta\epsilon = -0.71 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), and three ligand-to-metal charge transfer (LMCT) bands: a positive band at 29 800 cm^{–1} ($\Delta\epsilon = 0.14 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), a negative band at 32 400 cm^{–1} with very low intensity ($\Delta\epsilon = -0.024 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), and a positive band at 39 000 cm^{–1} with high intensity ($\Delta\epsilon = 2.64 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). These LMCT bands have been assigned to the deprotonated backbone amide N[–], and the imidazole π_1 and π_2 to Cu(II) LMCT transitions, respectively.²⁹ Previous work supports the notion that this complex involves coordination to the C-terminal residues.²⁹ Here, we have studied Cu(II) binding to hIAPP(15–22 S19P), where the Pro residue at position 19 would prevent coordination of the metal ion toward the C-terminal. When a solution of hIAPP(15–22 S19P) was titrated with Cu(II) at pH 7.5, all CD signals were saturated at 1.0 equiv of Cu(II) indicating a 1:1 molar stoichiometry (Figure 1C). Two ligand field transitions become evident: a negative band at 16 580 cm^{–1} ($\Delta\epsilon = -0.21 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) and a positive band at 19 300 cm^{–1} ($\Delta\epsilon = 0.15 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), while LMCT bands are observed in the region above 32 000 cm^{–1}, possibly corresponding to imidazole to Cu(II) LMCT transitions. Clearly, the Cu(II)–hIAPP(15–22 S19P) complex displays a very different CD spectrum than that of the Cu(II)–hIAPP(15–22) complex (Figure 1A). Consistently, the EPR spectrum of the Cu(II)–hIAPP(15–22 S19P) complex displays very different A_{\parallel} and g_{\parallel} values, as compared to those associated with the Cu(II)–hIAPP(15–22) complex (Figure 1D and Table 1). Thus, by blocking the backbone amide of Ser19 and inducing a turn on the backbone with a Pro residue, coordination of Cu(II) toward the C-terminal is prevented, and a Cu(II)–peptide complex with a different coordination environment is formed. This is consistent with the notion that Cu(II) coordination to hIAPP(15–22) involves residues that follow His18 in the sequence. If this is the case, then the hIAPP(18–22) fragment would be a good model to study Cu(II) coordination to monomeric hIAPP. Cu(II) binding to the hIAPP(18–22) fragment was studied by titrating the peptide with Cu(II) at pH 7.5, followed by CD (Figure 1B). The CD signals are saturated at 1.0 equiv of Cu(II) indicating a 1:1 molar stoichiometry as in the case of the hIAPP(15–22) fragment (Figure 1A, black spectra). The CD spectrum of the Cu(II)–hIAPP(18–22) complex shows one d–d negative band at 16 050 cm^{–1} ($\Delta\epsilon = -0.89 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) and three transitions that correspond to LMCT bands: a positive band at 29 460 cm^{–1} ($\Delta\epsilon = 0.32 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) that corresponds to deprotonated backbone amide N[–] to Cu(II) LMCT, a negative band at 32 700 cm^{–1} with very low intensity ($\Delta\epsilon = -0.02 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), and a positive band at 38 840 cm^{–1} with high intensity ($\Delta\epsilon = 2.60 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), corresponding respectively to a π_1 and a π_2 to Cu(II) LMCT bands arising from the interaction of the His18 imidazole with the metal ion.^{52,53} Clearly, the CD spectrum of the Cu(II)–hIAPP(18–22) complex is practically identical to that of the Cu(II)–hIAPP(15–22) complex. Moreover, their EPR spectra display very similar A_{\parallel} and g_{\parallel} values: $A_{\parallel} = 158 \times$

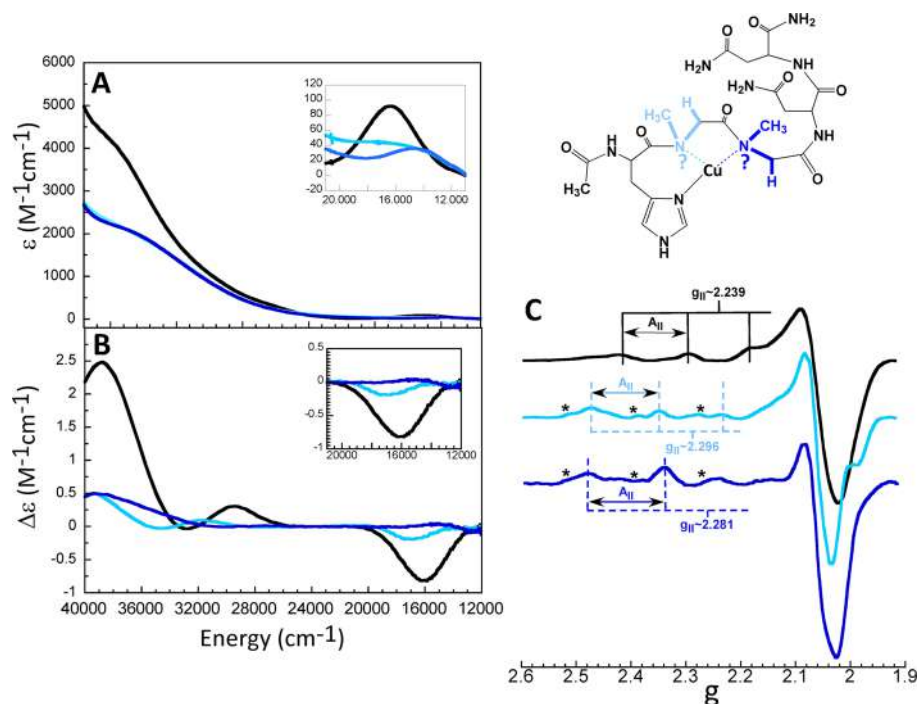


Figure 2. UV-vis absorption (A), CD (B), and EPR (C) spectra of Cu(II) complexes with hIAPP(18–22) (black), hIAPP (18–22, S19Sar) (light blue), and hIAPP (18–22, S20Sar) (dark blue) with 1.0 equiv of Cu(II) and pH 7.5. The asterisks in EPR spectra indicate the signals of Cu(II) in solution. The scheme at the upper right represents the variants with sarcosine where the N- from backbone amide is blocked with a methyl group.

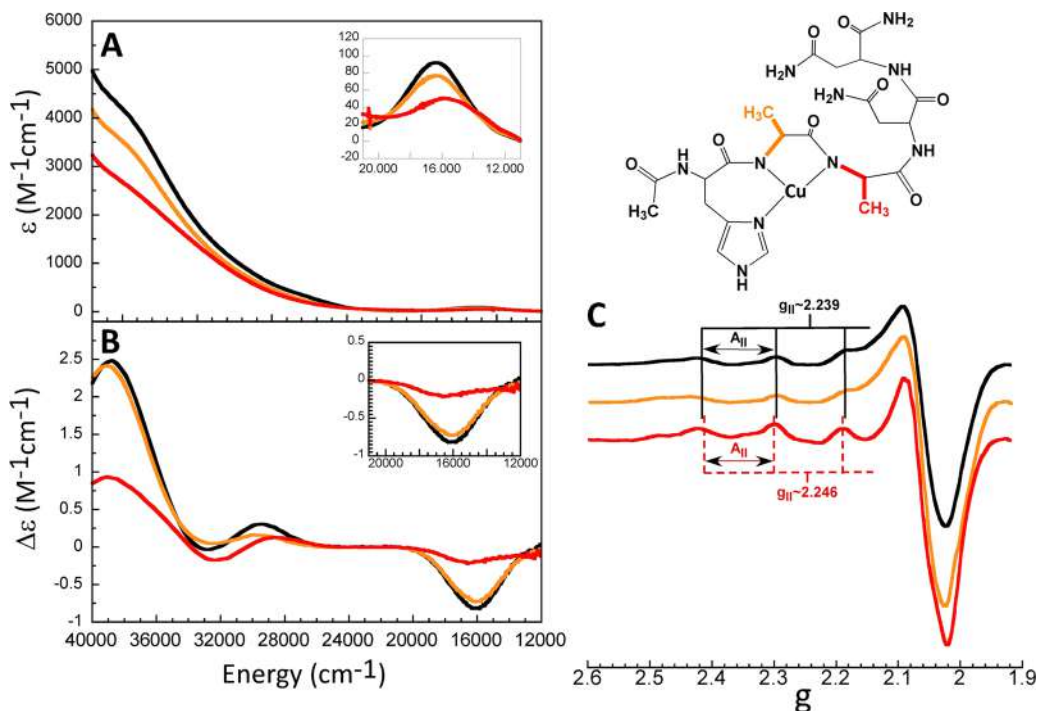


Figure 3. UV-vis absorption (A), CD (B), and EPR (C) spectra of Cu(II) complexes with hIAPP(18–22) (black), hIAPP (18–22, S19A) (orange), and hIAPP (18–22, S20A) (red) with 1.0 equiv of Cu(II) and pH 7.5. The scheme at the upper right represents the variants with alanine where the $-\text{CH}_2-\text{OH}$ group from serine has been replaced with $-\text{CH}_3$.

10^{-4} cm^{-1} and $g_{\parallel} = 2.239$ for the Cu(II)–hIAPP(18–22) complex, and $A_{\parallel} = 164 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ and $g_{\parallel} = 2.234$ for the Cu(II)–hIAPP(15–22) complex (Figure 1D, Tables 1 and S1), which correspond to an equatorial coordination mode with three nitrogens and one oxygen ligand, according to Peisach and Blumberg correlations.⁵⁴ In both cases, a small amount

(<10%) of a second species with $A_{\parallel} = 168 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ and $g_{\parallel} = 2.276$ also becomes evident in the EPR spectrum; given the pK_a values associated with the Cu(II)–hIAPP(18–22) (6.28 ± 0.01 , Figure S1) and the Cu(II)–hIAPP(15–22) complex (6.23 ± 0.13),²⁹ the second species likely corresponds to the protonated form of each complex.

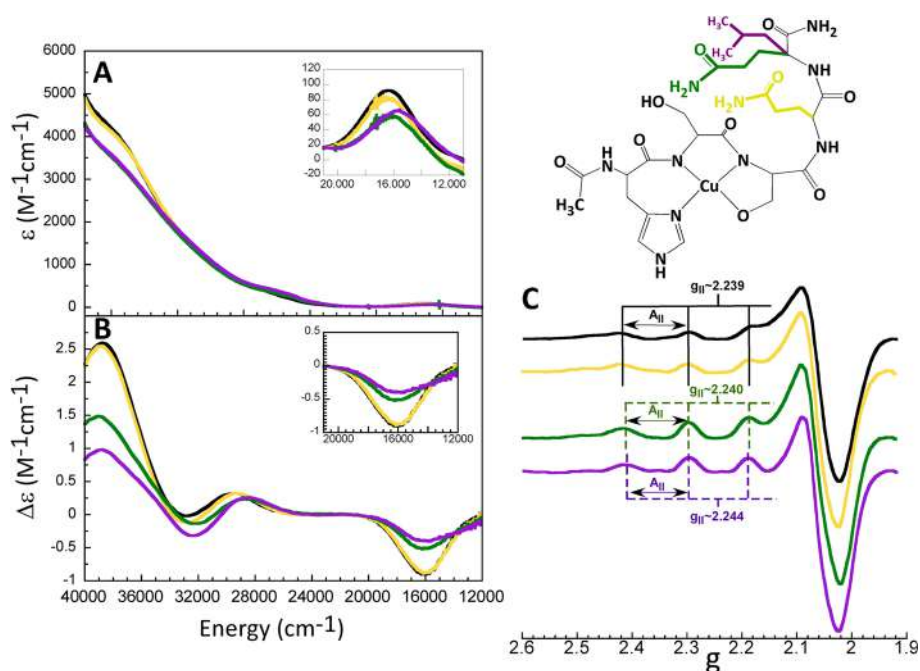


Figure 4. UV-vis absorption (A), CD (B), and EPR (C) spectra of Cu(II) complexes with hIAPP(18–22) (black), hIAPP (18–22, N21Q) (yellow), hIAPP (18–22, N22Q) (green), and hIAPP(18–22, N22L) (purple) with 1.0 equiv of Cu(II) and pH 7.5. The scheme at the upper right represents the variants with glutamine where the $-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}_2$ group from asparagine has been modified as $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}_2$ (yellow and green) and one variant with the R-group of leucine $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ (purple) in asparagine 22.

Overall, these results indicate that the hIAPP(18–22) peptide is an adequate model that reproduces the Cu(II) coordination features of the longer peptide hIAPP(15–22). Our findings are consistent with a study by Li and co-workers²⁸ showing by laser ablation electrospray ionization ion mobility separation mass spectrometry (LAESI-IMS-MS) that Cu(II) exhibits strong association with these residues -HSSNN- (18–22) of hIAPP.

Identifying the Backbone Amides Involved in Cu(II) Binding to hIAPP(18–22). In order to further characterize the role of backbone amide groups in the coordination of Cu(II) to hIAPP(18–22), two hIAPP(18–22) variants were synthesized: hIAPP(18–22 S19Sar) and hIAPP(18–22 S20Sar), where Sar corresponds to sarcosine, i.e., *N*-methylglycine. In these peptides, the backbone amide is blocked by the methyl group at the position of each sarcosine (scheme in Figure 2). The UV-vis electronic absorption (A), CD (B), and EPR (C) spectra of the Cu(II) complexes with these Ser to Sar variants are compared to those of the Cu(II)–hIAPP(18–22) complex in Figure 2. The UV-vis absorption spectrum of the Cu(II)–hIAPP(18–22) complex (black line) displays a ligand field band at $\sim 16\,300\text{ cm}^{-1}$ ($\epsilon = 91\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$), while this transition is shifted to $\sim 14\,400\text{ cm}^{-1}$ ($\epsilon = 36\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) for the Cu(II)–hIAPP(18–22 S20Sar) complex (dark blue line), and the absorption spectrum of the Cu(II)–hIAPP(18–22 S19Sar) complex (light blue line) has such low intensity that it is not possible to determine the energy for the ligand field transitions. The drastic effects of the Ser to Sar substitutions are also evident by CD (Figure 2B): the spectra for the Cu(II)–hIAPP(18–22 S19Sar) and Cu(II)–hIAPP(18–22 S20Sar) complexes have such low intensity that their transitions are hard to identify. The low intensity of the CD spectra for the Ser to Sar variants indicates that either the chirality of the complexes has changed (as in the case of the formation of a very different Cu(II) complex) and/or the

affinity of the peptide for Cu has decreased (since unbound Cu(II) would not contribute to CD intensity). Consistently, the EPR spectra for these variants indicate the presence of free Cu(II) in solution (indicated as asterisks in Figure 2C), and the formation of a Cu(II) complex with A_{\parallel} and g_{\parallel} values that are very different from those of the Cu(II)–hIAPP(18–22) complex (Figure 2C, Tables 1 and S1). In both cases, the Ser to Sar substitutions yielded Cu(II) complexes with more oxygen-rich equatorial coordination modes (2N2O/1N3O). Altogether, these results indicate that the backbone amide groups of Ser19 and Ser20 participate in the coordination sphere of the Cu(II)–hIAPP(18–22) complex.

Evaluating the Role of Hydroxyl Groups of Ser19 and Ser20. The participation of the hydroxyl groups of Ser19 and Ser20 in Cu(II) binding was evaluated by replacing Ser19 or Ser20 with Ala residues (Scheme in Figure 3). The UV-vis electronic absorption and CD spectra of Cu(II)–hIAPP(18–22 S19A) (Figure 3A,B, orange line) are practically identical to those of the Cu(II)–hIAPP(18–22) complex (black line), while significant changes are observed for the Cu(II)–hIAPP(18–22 S20A) complex (red line). Specifically, the ligand field band for the Cu(II)–hIAPP(18–22 S20A) complex (red line) is shifted to lower energy in the absorption spectrum (Figure 3A), as compared to that of the Cu(II)–hIAPP(18–22) complex (black line), while the CD intensity of all transitions is significantly decreased (Figure 3B). Consistently, the EPR spectra of the Cu(II)–hIAPP(18–22) complex (black spectrum) and Cu(II)–hIAPP(18–22 S19A) complex (orange spectrum, Figure 3C) are practically identical, while that for the Cu(II)–hIAPP(18–22 S20A) complex (red spectrum) displays different EPR parameters. Overall, these results indicate that the hydroxyl group from Ser19 is not participating in copper coordination, while that of Ser20 does contribute to Cu(II) binding at this site.

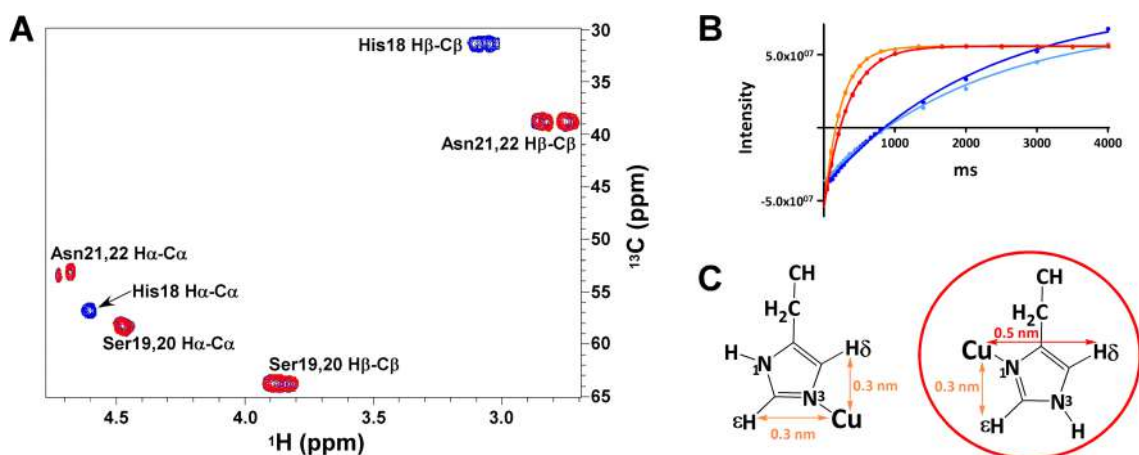


Figure 5. (A) Overlaid ^1H – ^{13}C HSQC spectra of hIAPP(18–22) in the absence (blue) and presence (red) of 0.2 equiv of Cu(II) in the aliphatic region. (B) Fits from proton spin–lattice relaxation rates by 1D-IR experiments of $\text{H}\epsilon$ and $\text{H}\delta$ of imidazole ring from His18 in the absence and presence of Cu(II). The free species correspond to $\text{H}\epsilon$ (light blue) and $\text{H}\delta$ (dark blue). The bound species to 0.02 equiv of Cu(II) correspond to $\text{H}\epsilon$ (orange) and $\text{H}\delta$ (red). Schema (C) represents the two possibilities of Cu(II) binding to N1 or N3 from imidazole and the distances in each case. Our results show that Cu(II) is binding to N1 represented by a red circle.

Evaluating the Role of Asparagines 21 and 22. In order to evaluate the role of Asn residues 21 and 22 in Cu(II) coordination, the N21Q, N22Q, and N22L variants of hIAPP(18–22) were prepared. In the first two, the R-group from asparagine, $-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}_2$, has been replaced by the longer group, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}_2$, and in the N22L variant the R-group of asparagine 22 has been replaced by an aliphatic group $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ as shown in the scheme of Figure 4. Overall, the UV–vis absorption and CD spectra of the Cu(II)–hIAPP(18–22) complex and the N21Q variant are practically identical (Figure 4A,B), while their EPR spectra display very similar EPR parameters (Figure 4C, Table 1), clearly indicating that Asn21 does not participate in Cu(II) coordination to the peptide. On the other hand, the absorption and CD spectra of the Cu(II)–hIAPP(18–22 N22Q) (green lines) and the Cu(II)–hIAPP(18–22 N22L) (purple lines) complexes display decreased intensity of their d–d band at $16\,200\text{ cm}^{-1}$ and LMCT π_2 transition at $39\,030\text{ cm}^{-1}$, while a small shift is evident at the LMCT transitions with respect to those of the Cu(II)–hIAPP(18–22) (black line). Consistently, the EPR spectra of the complexes with Asn22 substitutions show changes in their A_{\parallel} and g_{\parallel} values, most notably for the N22L variant (Figure 4C, Tables 1 and S1). Overall, these results suggest that Asn22 may play a role in Cu(II) coordination to hIAPP(18–22); however, the effects of its substitution for a noncoordinating residue in the spectroscopic features of the complex are mild, as compared to those observed upon the Ser to Sar or S20A substitutions. Thus, the role of Asn22 in Cu(II) binding to hIAPP(18–22) might be as an axial ligand or as part of the second sphere coordination shell.

Cu(II) Binding to hIAPP(18–22) as Probed by NMR. ^1H – ^{13}C nuclear magnetic resonance (NMR) signals were assigned using 1D ^1H , ^1H – ^1H TOCSY, ^1H – ^{13}C HSQC, and HMBC spectra. Figure 5A shows the overlaid aliphatic region of the ^1H – ^{13}C HSQC spectra of hIAPP(18–22) in the absence (blue) and presence (red) of 0.2 equiv of Cu(II). The paramagnetic effect of Cu(II) causes broadening of the signals due to relaxation enhancements,⁵⁵ and the most affected ones are the $\text{H}\beta\text{-C}\beta$ and $\text{H}\alpha\text{-C}\alpha$ of His18, which disappear completely upon addition of Cu(II), indicating that His18 is the main anchoring site for Cu(II). To gain further insight into

the structural features of Cu(II) binding to hIAPP(18–22), proton spin–lattice relaxation rates of the imidazole protons $\text{H}\epsilon$ and $\text{H}\delta$ were measured to determine to which nitrogen, N1 or N3 of His18 coordinates Cu(II).⁵⁶ Figure 5B displays the fits for T_1 of $\text{H}\epsilon$ (light blue) and $\text{H}\delta$ (dark blue) for the free peptide, and those for the bound species after addition of 0.02 equiv of Cu(II) ($\text{H}\epsilon$ (orange) and $\text{H}\delta$ (red)). The ^1H NMR spectra given in Figure S2 shows the broadening effect on both signals after addition of Cu(II). Table 2 shows the parameters

Table 2. Parameters from 1D-IR Experiment of the Protons $\text{H}\epsilon$ and $\text{H}\delta$ of His18

	T_1 free	T_1 bound	R_{1b} free	R_{1b} bound	R_{1p}	dist (nm)
$\text{H}\delta$	2.2	0.334	0.455	2.994	2.549	0.506
$\text{H}\epsilon$	2.2	0.239	0.455	4.184	3.739	0.3 (fixed)

T_1 , R_{1b} , R_{1p} , and the distance for the protons $\text{H}\epsilon$ and $\text{H}\delta$ to Cu(II) ion. $\tau_M = 1/k_{\text{off}}$ was calculated using a fixed distance of 0.3 nm from Cu(II) to $\text{H}\epsilon$ ⁵⁶ of His18, obtaining a value of 5.2 ms. A global correlation time τ_C of 0.4 ns was assumed.⁵⁷ Figure 5C compares the two possibilities of binding of Cu(II) to N1 or N3, where the distance of 0.3 nm from Cu(II) to $\text{H}\epsilon$ is fixed. These results clearly show that Cu(II) is binding to N1 of imidazole ring of His18.

Figure 6 shows the overlaid 1D ^{13}C NMR spectra of hIAPP(18–22) in the absence (blue) and presence (red) of 0.4 equiv of Cu(II). Upon addition of the metal ion, the signals for CO, $\text{C}_{\text{aromatic}}$, $\text{C}\alpha$, and $\text{C}\beta$ from His18 disappear completely, while all other signals display decreased intensity. The intensity of the signal of the Asn22 seems to be more affected than that of Asn21, consistent with the notion that Asn22 might be involved in Cu(II) coordination (vide supra).

Theoretical Studies of Cu(II) Binding to hIAPP(18–22).

On the basis of our spectroscopic results, it becomes clear that the three nitrogens in the equatorial coordination sphere of Cu bound to hIAPP(18–22) are provided by the imidazole nitrogen N1 of His18, the deprotonated amides of Ser19 and Ser20, and an oxygen-based ligand, which likely corresponds to the OH group of Ser20, while Asn22 might also play a role as an axial ligand. In order to shed light into the nature of the

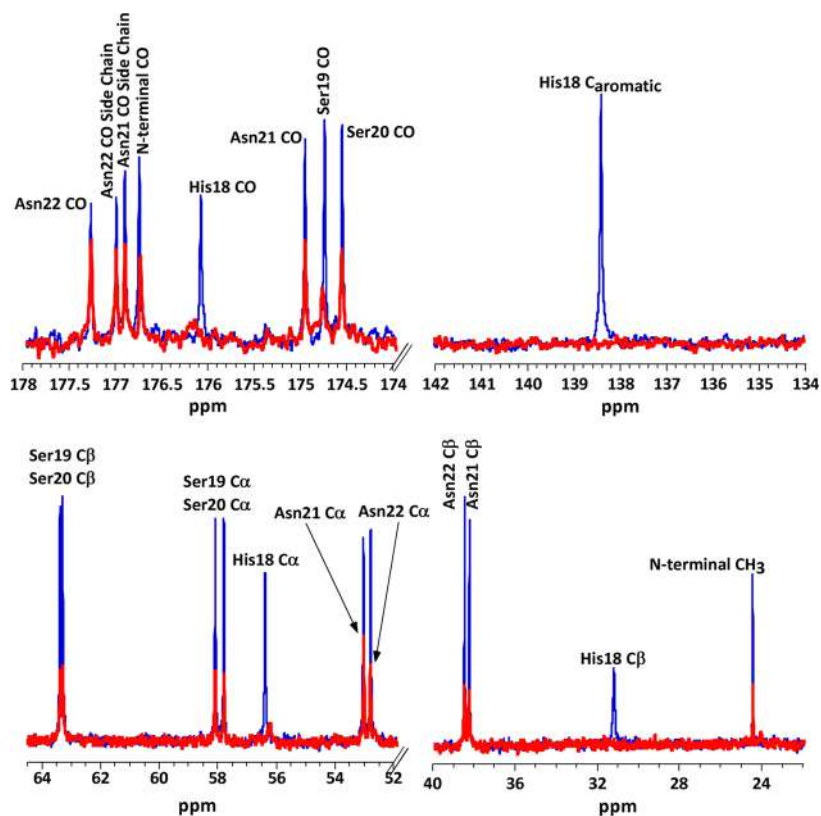


Figure 6. Overlaid 1D ^{13}C NMR spectra of hIAPP(18–22) in the absence (blue) and presence (red) of 0.4 equiv of Cu(II). CO, C_{aromatic} , C_{α} , and C_{β} from His18 disappear completely upon addition Cu(II). The arrows show each C_{α} from Asn21 and 22.

oxygen-based equatorial ligand and the role of Asn22 in Cu coordination, several models of the Cu(II)-hIAPP(18–22) complex were evaluated by electronic structure calculations and Born–Oppenheimer molecular dynamics. All models included a 3N1O equatorial coordination mode, where the three nitrogen ligands are provided by His18 and backbone amides of Ser19 and 20, as described above. Different possibilities for the equatorial oxygen-based ligand were evaluated, including the OH group from Ser20 (named $3\text{NO}_{\text{OH}/\text{S}20}$), the backbone carbonyl of Ser20 (named $3\text{NO}_{\text{CO}/\text{S}20}$), the backbone carbonyl of Asn22 (named $3\text{NO}_{\text{CO}/\text{N}22}$), or a water molecule. Furthermore, coordination of Cu(II) by the amino acid chain of Asn22 was also included for some models, where the CONH_2 moiety acts as an axial ligand, namely, $3\text{NO}_{\text{OH}/\text{S}20}\text{O}_{\text{axialCO}/\text{N}22}$ and $3\text{NO}_{\text{CO}/\text{S}20}\text{O}_{\text{axialCO}/\text{N}22}$. Solvation effects were included by geometry optimization of the models after adding four explicit water molecules. Figure 7 shows all geometry-optimized models; their structural and calculated EPR parameters are listed in Table S2, while selected parameters are listed in Table 3. It should be noted that a model with an equatorial water molecule could not be obtained, as the water ligand did not remain as part of the coordination shell upon geometry optimization. On the other hand, the model that includes the carbonyl group of Asn22 as an equatorial ligand has a relative energy of 38.7 kcal/mol, strongly suggesting that Asn22 would not participate as an equatorial ligand for Cu(II) in this complex.

The two most stable models correspond to those with no axial ligand, where the equatorial oxygen-based ligand is provided by either the OH group of Ser20 ($3\text{NO}_{\text{OH}/\text{S}20}$) or by the backbone carbonyl of Ser20 ($3\text{NO}_{\text{CO}/\text{S}20}$), with relative energies of 0.0 and 3.4 kcal/mol, respectively. This energetic

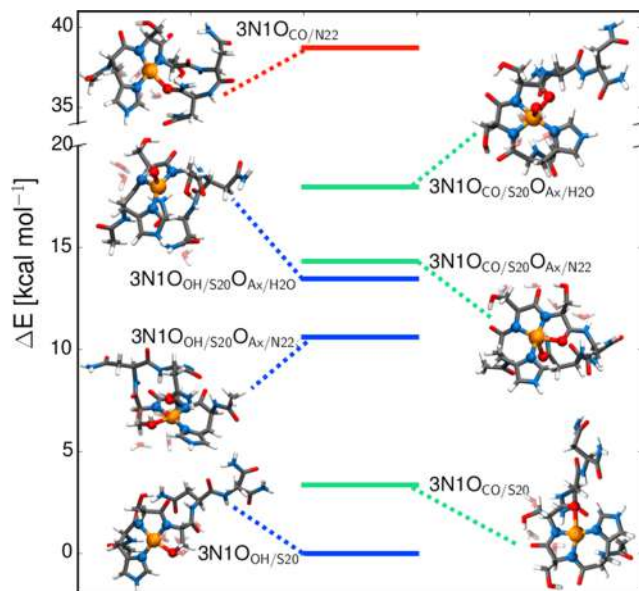


Figure 7. Optimized structural models for Cu(II) bound to the hIAPP(18–22) fragment.

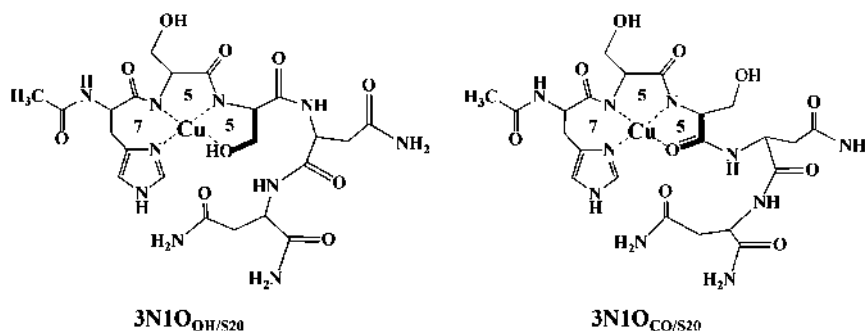
difference is very small, and in fact, a BOMD simulation with these two structures shows that their relative stabilities are very similar (Figure S3), and thus, both are plausible models for the equatorial coordination shell. Still, it should be noted that all models where the equatorial ligand is provided by the OH group of Ser20 are 3–5 kcal/mol more stable than the corresponding structures with the backbone carbonyl of Ser20 (Table 3). This observation is consistent with the experimental

Table 3. Relative Energies, Calculated EPR Parameters, and Bond Distances^a for Selected Models

model	exp	3NO _{OH/S20}	3NO _{OH/S20} O _{Ax/N22}	3NO _{OH/S20} O _{Ax/H2O}	3N1O _{CO/S20}	3NO _{CO/S20} O _{Ax/N22}	3NO _{CO/S20} O _{Ax/H2O}	3N1O _{CO/N22}
<i>E</i> _{rel} [kcal/mol]	N.A.	0.00	10.63	13.47	3.36	14.32	18.00	38.73
<i>g</i> _x	2.055	2.042	2.045	2.029	2.047	2.055	2.035	2.054
<i>g</i> _y	2.087	2.057	2.071	2.146	2.066	2.081	2.098	2.057
<i>g</i> _z	2.239	2.157	2.174	2.217	2.176	2.194	2.188	2.185
<i>A</i> _z (MHz)	474	−486	−424	417	−437	−477	−407	−519
Cu–N _{H18}	N.D.	1.97	1.95	1.96	1.95	2.01	1.98	2.01
Cu–N _{S19}	N.D.	2.05	2.03	2.16	1.99	2.04	2.03	2.00
Cu–N _{S20}	N.D.	1.90	1.91	1.92	1.91	1.93	1.95	2.01
Cu–O _{S20} ^b	N.D.	2.12	2.26	2.57	2.40	2.20	2.26	2.17
Cu–O _{Axial} ^c	N.D.		2.74	2.22		2.35	2.35	3.11

^aBond distances are given in Å. ^bCu–O_{S20} refers to equatorial Cu–O bond, which could be backbone CO or OH moiety from Ser20, depending on the model. ^cCu–O_{Axial} refers to axial Cu–O bond, which could be the amide CO moiety from Asn22 or an axial water, depending on the model.

Scheme 1. Two Proposed 3N1O Equatorial Coordination Modes for the Cu(II)–hIAPP Complex where the Oxygen-Based Ligand Is Provided by Either the Hydroxyl Group of Ser20 (3N1O_{OH/S20}) or the Backbone Carbonyl of the Same Residue (3N1O_{CO/S20})^a



^aIn both cases, Asn22 may act as an axial ligand (3NO_{S20}O_{Ax/N22}). These species may coexist, although the 3N1O_{OH/S20} structure is favored.

results that reveal an important role of the OH group of Ser20 in Cu(II) coordination to hIAPP(18–22). The calculated EPR parameters for these two complexes provide a reasonable description of the *g*_z and *A*_z values (Table 3), particularly for the hyperfine couplings, for which a difference between calculated and experimental values of ~5% is considered acceptable for this type of calculation.⁵⁸ Interestingly, the 3NO_{CO/S20} model provides a better description of the *g*_z value, while the 3NO_{OH/S20} model has a better match for the experimental *A*_z. These calculated EPR parameters are also consistent with the experimental results for the S20A variant. If we assume that both 3NO_{OH/S20} and 3NO_{CO/S20} are plausible models for the Cu(II)–hIAPP complex and may represent coexisting species; thus, the S20A variant would favor the 3NO_{CO/S20} species, which is predicted to have a higher *g*_z and a lower *A*_z value. This is precisely the trend observed experimentally for the S20A variant. Thus, it is plausible that these two coordination modes, 3NO_{OH/S20} and 3NO_{CO/S20}, could coexist; however, the drastic changes observed by CD for the S20A variant strongly suggest that the most populated coordination mode is 3NO_{OH/S20}.

Axial ligation by water molecules or by the CONH₂ moiety of Asn22 was also evaluated, using the two most stable equatorial coordination shells, 3NO_{OH/S20} and 3NO_{CO/S20}. The resulting structures with axial ligands are considerably higher in energy (about 10 kcal/mol for Asn22 and 13–15 kcal/mol for water) than the corresponding tetra-coordinated models with no axial ligation (Figure 7 and Table 3). The presence of a water molecule as an axial ligand improves significantly the description of the *g*_z value, but it lowers *A*_z to values that fall

outside the acceptable range for this parameter; moreover, it yields more distorted structures with very rhombic *g*_x and *g*_y values, as demonstrated by the 3NO_{OH/S20}O_{AxH2O} and 3NO_{CO/S20}O_{AxH2O} models in Table 3. EPR simulations of the experimental spectrum of the Cu(II)–hIAPP complex do not reflect such large rhombicity (Figure 1D, Tables 3 and S1). Thus, we conclude that axial ligation by a water molecule does not provide a good description of the Cu(II)–hIAPP complex. On the other hand, axial ligation by the CONH₂ moiety of Asn22 improves significantly the description of the *g*_z value, while keeping a good description of the Cu hyperfine coupling, as shown for the 3NO_{OH/S20}O_{Ax/N22} and 3NO_{CO/S20}O_{Ax/N22} models in Table 3. Particularly, the calculated EPR parameters for the 3NO_{CO/S20}O_{Ax/N22} structure are in excellent agreement with the experimental values. Thus, although the relative energy for this model is 11 kcal/mol higher than the corresponding model with no axial ligation, the possibility that Asn22 may play a role as an axial ligand cannot be discarded.

Overall, our electronic structure studies validate that the equatorial coordination shell in the Cu(II)–hIAPP complex involve the imidazole nitrogen N1 of His18, the deprotonated amides of Ser19 and Ser20, and an oxygen-based ligand that can be provided either by the OH group of Ser20 or its backbone carbonyl, possibly leading to two coexisting species (Scheme 1). Our calculations also help discard the participation of water molecules in the coordination shell and the possibility of Asn22 acting as an equatorial ligand, while the involvement of Asn22 as an axial ligand is plausible.

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

Copper Coordination to hIAPP. Our spectroscopic and theoretical studies have elucidated the coordination features of Cu(II) bound to hIAPP, confirming the involvement of His18 and the following residues toward the C-terminal region, and defining the residues HSSNN of hIAPP(18–22) as the minimal unit to model Cu binding to this peptide. Cu(II) coordinates to the N1 (oftentimes referred to as N δ) of His18, two deprotonated amides from Ser19 and Ser20 and one oxygen-based ligand provided by either the hydroxyl group or the backbone carbonyl of Ser20. For both of these two 3N1O coordination modes, a set of three chelate rings with seven, five, and five members is formed (Scheme 1); thus the impact of the chelate effect on the relative stability of these two species would be similar. Although we cannot discard the formation of the 3N1O coordination mode with the backbone carbonyl of Ser20, theoretical and spectroscopic results demonstrate that the binding mode with the hydroxyl group of Ser20 is favored, possibly due to the formation of a stronger Cu(II)–OH bond (Cu–O bond distance is 2.12 Å), as compared to a weaker and more distorted Cu(II)–O backbone carbonyl bond (with distance at 2.40 Å) (Table 3 and S2). In either case, it is clear that Ser20 plays a very important role in the overall stability of the complex, as it provides the backbone amide and the oxygen-based ligand needed to form the two five-membered rings in the 3N1O coordination mode.

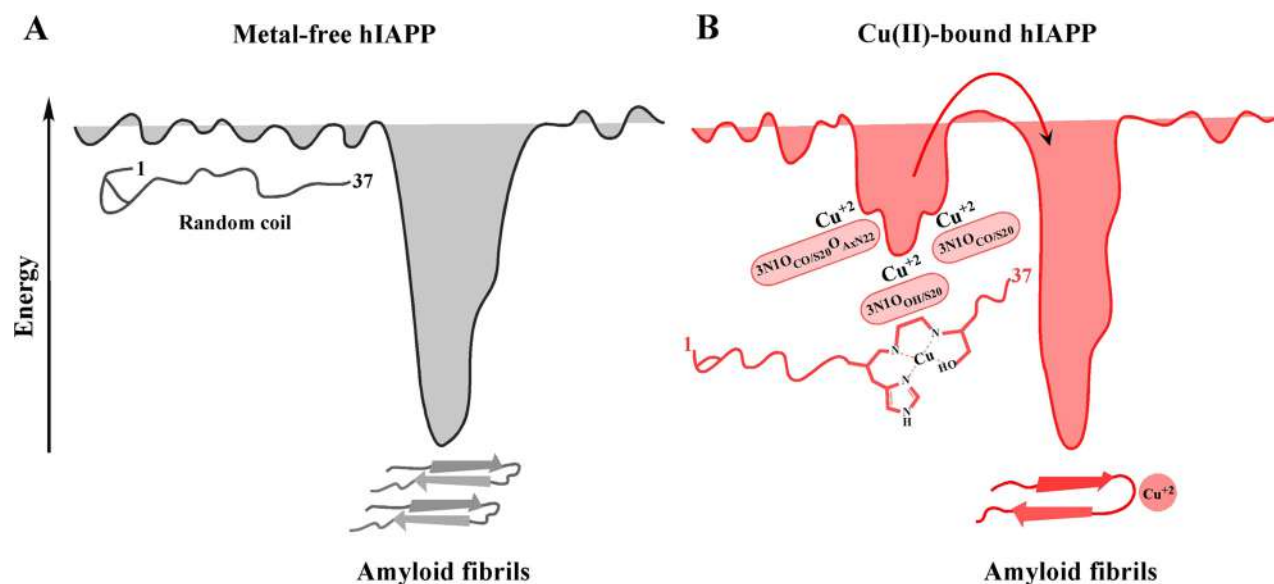
Initial Cu(II) binding toward the C-terminal region in His-containing peptides is less common, as compared to binding toward the N-terminal, because the latter forms a more stable six-membered ring with the imidazole group and the His backbone amide, while binding toward the C-terminal amide yields a seven-membered ring.³⁹ This has been the rationale used in a recent study by Magri et al, who erroneously concluded that copper coordination to hIAPP involves residues toward N-terminal domain.⁶⁰ However, several factors dictate this binding preference, including the nature of the side chains in the vicinity of the His residue, the relative stability of the ring patterns that are formed in the chelate, and the number of deprotonated amides involved in metal binding.⁶¹ Moreover, in a 3N1O complex with two deprotonated amides, Cu(II) binding toward the N-terminal amides yields a chelate with six-, five-, and seven-membered rings, which would be overall less stable than the resulting chelate from coordination toward the C-terminal amides, yielding a seven-, five-, and five-membered rings.⁶¹ One example of copper coordination toward the C-terminal region is the octarepeat region of the human prion protein, where the Pro residue in the metal ion binding motif –PHGGGWSQ– prevents coordination toward the N-terminal region.⁶² Remarkably, the spectroscopic features of this binding site, particularly the CD signals, are very similar to those observed in the hIAPP fragment studied here. In the case of hIAPP, the presence of bulky hydrophobic residues preceding His18 is likely the cause for Cu(II) coordination to occur toward the C-terminal region. Conversely, the insertion of a Pro in position 19 in our model peptide turned into a “break-point” in the metal ion coordination site,^{63,64} forcing Cu(II) coordination toward the N-terminal region, in a similar fashion as observed recently by Rowinska-Zyrek in the membrane disrupting fragment of hIAPP(1–19).⁶⁵ This fragment lacks Ser20, which is a key residue to stabilize Cu(II) coordination toward the C-terminal region; consistently, the spectroscopic features reported for the Cu(II) complex with the hIAPP(1–

19) fragment are remarkably similar to those observed here for the S19P variant. Overall, these observations and the fact that Ser to Sar substitutions have a significant impact on the spectroscopic features of the Cu(II)-hIAPP complex allow us to unequivocally conclude that Cu(II) coordination occurs toward the C-terminal, involving the deprotonated backbone amides of Ser19 and Ser20.

Copper Coordination Involves Key Residues for Aggregation. The coordination sphere around the metal ion in the Cu(II)-hIAPP complex involves key residues that play a very important role in hIAPP aggregation. His18 is the anchoring residue for Cu(II) coordination to the disordered peptide,²⁹ and at the same time, it is located right in the middle of the β -sheet structure in the hIAPP fibrils.^{66,67} Thus, Cu(II) binding to hIAPP inevitably competes with β -sheet formation,¹⁷ and it has an inhibitory effect in amyloid aggregation.²⁹ In this study we have also identified Ser20 as a key residue that stabilizes Cu(II) coordination to hIAPP, by providing the ligands needed to form a stable chelate with two five-membered rings. Interestingly, S20G is a natural mutation of hIAPP associated with early onset of type 2 diabetes in certain Asian populations, and it accelerates hIAPP amyloid aggregation *in vitro*.^{9,68,69} The impact of the S20G mutation in the folding of the peptide and the mechanism involved in its accelerated amyloid aggregation are unknown, although the less bulky Gly residue at position 20 might facilitate the formation of the β -sheet structure, as this residue is located at the loop turn in the fibril structure.⁶⁷ However, from what we now know about Cu(II) coordination to hIAPP, one would expect that the S20G natural mutation would impact significantly the ability of the peptide to coordinate Cu(II) ions, which in turn would affect its conformation and its ability to form amyloid fibrils. Given the inhibitory effect of Cu(II) coordination in hIAPP fibril formation, decreased Cu(II) binding to the S20G variant would result in increased amyloid aggregation, potentially explaining the early onset of type 2 diabetes in those patients.

It has been demonstrated that the amide side chains of the asparagine residues 21 and 22 can dictate specific interactions that contribute to the ability of hIAPP to form fibers.⁷⁰ Here, we found that these asparagines residues may also play a role in Cu(II) binding, particularly Asn22 as a potential axial ligand to copper. Although the relative energy of the coordination models that include this residue as an axial ligand are 10–14 kcal/mol higher than the most stable structure, the spectroscopic changes observed upon substitutions of Asn22 indicate a role for the amide side chain of this residue in Cu(II) coordination. Interestingly, the coordination mode that includes the backbone carbonyl of Ser20 as an equatorial ligand and the –CO–NH₂ moiety of Asn22 as an axial ligand (i.e., 3N_{CO/S20}O_{AX/N22}) is the structure that best reproduces the experimental EPR parameters. Thus, it is tempting to propose that this coordination mode might coexist with the modes shown in Scheme 1, even if it might be less populated. If so, the participation of Asn22 in Cu(II) coordination would further contribute to the inhibitory effect of this metal ion in hIAPP amyloid aggregation. Moreover, for Asn22 to reach into the metal ion coordination shell, a larger conformational change in the peptide would be needed, thus favoring a potentially different set of peptide conformations.

Copper Binding May Impact hIAPP Conformation. Human IAPP is an intrinsically disordered peptide with a flexible random coil fold that would be capable of adopting different conformations upon interaction with other molecules.

Scheme 2. Conformational Energy Landscapes for Metal-Free and Cu(II)-Bound hIAPP^a

^aIntrinsically disordered peptides such as hIAPP have flexible random coil conformations and thus, have a “flatter” conformational energy landscape (A). hIAPP conversion to beta-sheet structures facilitate the irreversible formation of highly stable amyloid fibrils (energy well in A). Metal ion binding to hIAPP would impact this conformational energy landscape, stabilizing a set of conformers that would encounter a higher energy barrier (red arrow) for their conversion to β -sheet structures and amyloid aggregation (B).

In the secretory granules, hIAPP is exposed to insulin and hormone peptides, as well as metal ions such as zinc and copper.¹¹ Because of this, it is reasonable to propose that the interaction of hIAPP with some of these physiologically relevant molecules might impact its conformation and hence modulate its aggregation properties. For instance, it has been proposed that the interaction of insulin with hIAPP inhibits its amyloid aggregation,¹¹ perhaps favoring a particular set of hIAPP conformers. In this context, the notion that Cu(II) binding to hIAPP might lead to different coexisting coordination modes that in turn could favor different sets of Cu-induced conformational ensembles is appealing (Scheme 2). Similar to the case of the amyloid- β peptide associated with Alzheimer's disease,⁷¹ our study points to a scenario where Cu(II) binding to hIAPP might lead to the coexistence of more than one coordination mode, namely, $3\text{N1O}_{\text{OH/S20}}$ and $3\text{N1O}_{\text{CO/S20}}$, and possibly a coordination mode where Asn22 would act as an axial ligand ($3\text{N1O}_{\text{CO/S20}}\text{O}_{\text{Asn22}}$). Since each of these species would impose different strains in the backbone peptide conformation, this dynamic coordination scenario would lead to the stabilization of different sets of hIAPP conformers that would be distinct from those associated with metal-free hIAPP (Scheme 2). Indeed, a recent mass spectrometry and molecular dynamics study has determined that Cu(II) binding to hIAPP favors the formation of conformers and oligomeric species that differ from those observed in metal-free hIAPP samples.¹⁷

Metal-induced changes in the folding of hIAPP would impact different properties of this peptide. For instance, many studies have demonstrated that Cu(II) binding to hIAPP protects it from enzymatic degradation by the insulin-degrading enzyme (IDE), particularly in the region around His18.^{30,31} In a similar fashion as Cu(II) ions, Zn(II) and Ni(II) binding to His18 of hIAPP inhibits its amyloid aggregation by changing its local conformation nearby this residue.^{11,16,19} In this regard, the effect of His-binding metal ions in hIAPP differs from the

scenario observed for the amyloid- β peptide. The His residues that anchor Cu(II) and Zn(II) ions to the amyloid- β peptide are located in the hydrophilic N-terminal region and do not compete with the formation of β -sheet structures and fibrils.⁷² In contrast, the anchoring His residue for metal ions in hIAPP is located in the middle of the hydrophobic region of the peptide that participates in β -sheet formation.⁶⁷ Thus, Cu(II) binding to hIAPP would favor a set of peptide conformers that would not be amenable for conversion into β -sheet structures, raising the energetic barrier toward amyloid fibril formation (Scheme 2). Cu-induced hIAPP conformers would not only be less likely to form amyloid structures, but could actually promote the formation of off-pathway aggregates that may be more toxic to cells.¹⁷

In summary, our study has revealed structural details of the Cu(II)-hIAPP complex, and it has identified the key residues involved in metal ion coordination. Beyond the anchoring His18 residue, Ser19 and Ser20 also play important roles by providing the deprotonated backbone amides that yield a 3N equatorial coordination mode. Most importantly, Ser20 plays the crucial role of stabilizing Cu(II) coordination toward the C-terminal region of hIAPP, as it provides the oxygen-based equatorial ligand, either via its hydroxyl group or its backbone carbonyl, that yields two 3N1O coordination modes with a stable set of chelate rings. Our finding that Ser20 plays an important role in Cu(II) coordination to hIAPP provides a potential link between the S20G mutation associated with early onset of type 2 diabetes, its impact in Cu binding properties, and hIAPP amyloid aggregation. On the other hand, our study points to a scenario where Cu(II) binding to hIAPP might lead to the coexistence of more than one coordination mode, which in turn could favor different sets of Cu-induced conformational ensembles. Because metal ion coordination involves residues that are key for the formation of β -sheet structures, such Cu-induced hIAPP conformers would display a higher energetic barrier to form amyloid fibrils, hence explaining the inhibitory

effect of Cu ions in hIAPP aggregation. Overall, this study provides further structural insights into the bioinorganic chemistry of type 2 diabetes.

■ ASSOCIATED CONTENT

■ Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.inorgchem.6b01963.

pH titration of hIAPP(18–22)–Cu(II) complex as followed by CD; 1D ¹NMR spectra of hIAPP(18–22) in the absence and presence of Cu(II); total energies of the model systems along the BOMD trajectory; EPR parameters from simulation of the complexes and structural parameters for the models from theoretical studies. Cartesian coordinates for all models are available upon request (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

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

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

This research was funded by the National Council for Science and Technology in Mexico (CONACYT) through Grant No. 221134 to L.Q., and graduate fellowships to C.S.L. and R.C.M. J.M.C. acknowledges DGTIC-UNAM Project SC16-1-IR-12 for the use of their computational resources and DGAPA-UNAM Grant IA-104516. The authors would also like to thank Dr. Lina Rivillas-Acevedo for the initial characterization of Cu(II)–hIAPP(15–22) complex, I. Q. Geiser Cuellar for assistance with the acquisition of ESI–MS data, and Q. Atenea Villegas and Q. F. I. Yanahi Posadas-Torrenera for assistance with peptide synthesis and purification.

■ REFERENCES

- (1) Westermark, P.; Andersson, A.; Westermark, G. T. Islet amyloid polypeptide, islet amyloid, and diabetes mellitus. *Physiol. Rev.* **2011**, *91*, 795–826.
- (2) Jaikaran, E. T. A. S.; Clark, A. Islet amyloid and type 2 diabetes from molecular misfolding to islet pathophysiology. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Basis Dis.* **2001**, *1537*, 179–203.
- (3) Marzban, L.; Park, K.; Verchere, C. B. Islet amyloid polypeptide and type 2 diabetes. *Exp. Gerontol.* **2003**, *38*, 347–351.
- (4) Kahn, C. R. Insulin Action, Diabetogenes, and the Cause of Type II Diabetes. *Diabetes* **1994**, *43*, 1066–1084.
- (5) Rhodes, C. J. Type 2 Diabetes—a Matter of β -Cell Life and Death? *Science* **2005**, *307*, 380–384.
- (6) Young, A. *Amylin: Physiology and Pharmacology*, 1st ed.; Elsevier Academic Press Inc.: Amsterdam, 2005; Vol. 52.
- (7) Lorenzo, A.; Razzaboni, B.; Weir, G. C.; Yankner, B. A. Pancreatic islet cell toxicity of amylin associated with type-2 diabetes mellitus. *Nature* **1994**, *368*, 756–760.
- (8) Cao, P.; Marek, P.; Noor, H.; Patsalo, V.; Tu, L.-H.; Wang, H.; Abedini, A.; Raleigh, D. P. Islet amyloid: from fundamental biophysics to mechanisms of cytotoxicity. *FEBS Lett.* **2013**, *587*, 1106–1118.
- (9) Cao, P.; Tu, L.-H.; Abedini, A.; Levsh, O.; Akter, R.; Patsalo, V.; Schmidt, A. M.; Raleigh, D. P. Sensitivity of amyloid formation by human islet amyloid polypeptide to mutations at residue 20. *J. Mol. Biol.* **2012**, *421*, 282–295.
- (10) Westermark, P.; Engström, U.; Johnson, K. H.; Westermark, G. T.; Betsholtz, C. Islet amyloid polypeptide: Pinpointing amino acid

residues linked to amyloid fibril formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1990**, *87*, 5036–5040.

- (11) DeToma, A. S.; Salamekh, S.; Ramamoorthy, A.; Lim, M. H. Misfolded proteins in Alzheimer's disease and type II diabetes. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 608–621.

- (12) Binolfi, A.; Lamberto, G. R.; Duran, R.; Quintanar, L.; Bertocini, C. W.; Souza, J. M.; Cerveñansky, C.; Zweckstetter, M.; Griesinger, C.; Fernández, C. O. Site-Specific Interactions of Cu(II) with α and β -Synuclein: Bridging the Molecular Gap between Metal Binding and Aggregation. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11801–11812.

- (13) Hureau, C. Coordination of redox active metal ions to the amyloid precursor protein and to amyloid- β peptides involved in Alzheimer disease. Part 1: An overview. *Coord. Chem. Rev.* **2012**, *256*, 2164–2174.

- (14) Younan, N. D.; Klewpatinond, M.; Davies, P.; Ruban, A. V.; Brown, D. R.; Viles, J. H. Copper(II)-induced secondary structure changes and reduced folding stability of the prion protein. *J. Mol. Biol.* **2011**, *410*, 369–82.

- (15) Taylor, C. G. Zinc, the pancreas, and diabetes: insights from rodent studies and future directions. *BioMetals* **2005**, *18*, 305–312.

- (16) Brender, J. R.; Hartman, K.; Nanga, R. P. R.; Popovych, N.; de la Salud Bea, R.; Vivekanandan, S.; Marsh, E. N. G.; Ramamoorthy, A. Role of Zinc in Human Islet Amyloid Polypeptide Aggregation. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 8973–8983.

- (17) Lee, S. J. C.; Choi, T. S.; Lee, J. W.; Lee, H. J.; Mun, D.-G.; Akashi, S.; Lee, S.-W.; Lim, M. H.; Kim, H. I. Structure and assembly mechanisms of toxic human islet amyloid polypeptide oligomers associated with copper. *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 5398–5406.

- (18) Brender, J. R.; Krishnamoorthy, J.; Messina, G. M. L.; Deb, A.; Vivekanandan, S.; La Rosa, C.; Penner-Hahn, J. E.; Ramamoorthy, A. Zinc stabilization of prefibrillar oligomers of human islet amyloid polypeptide. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 3339–3341.

- (19) Salamekh, S.; Brender, J. R.; Hyung, S.-J.; Nanga, R. P. R.; Vivekanandan, S.; Ruotolo, B. T.; Ramamoorthy, A. A Two-Site Mechanism for the Inhibition of IAPP Amyloidogenesis by Zinc. *J. Mol. Biol.* **2011**, *410*, 294–306.

- (20) Aspinwall, C. A.; Brooks, S. A.; Kennedy, R. T.; Lakey, J. R. T. Effects of Intravesicular H⁺ and Extracellular H⁺ and Zn²⁺ on Insulin Secretation in Pancreatic Beta Cells. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 31308–31314.

- (21) Zargar, A. H.; Shah, N. A.; Masoodi, S. R.; Laway, B. A.; Dar, F. A.; Khan, A. R.; Sofi, F. A.; Wani, A. I. Copper, zinc, and magnesium levels in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Postgrad. Med. J.* **1998**, *74*, 665–668.

- (22) Kazi, T. G.; Afridi, H. I.; Kazi, N.; Jamali, M. K.; Arain, M. B.; Jalbani, N.; Kandhro, G. A. Copper, chromium, manganese, iron, nickel, and zinc levels in biological samples of diabetes mellitus patients. *Biol. Trace Elem. Res.* **2008**, *122*, 1–18.

- (23) Tanaka, A.; Kaneto, H.; Miyatsuka, T.; Yamamoto, K.; Yoshiuchi, K.; Yamasaki, Y.; Shimomura, I.; Matsuoka, T.-A.; Matsuhisa, M. Role of Copper Ion in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes. *Endocr. J.* **2009**, *56*, 699–706.

- (24) Flores, C. R.; Puga, M. P.; Wrobel, K.; Garay Sevilla, M. E.; Wrobel, K. Trace elements status in diabetes mellitus type 2: Possible role of the interaction between molybdenum and copper in the progress of typical complications. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **2011**, *91*, 333–341.

- (25) Naka, T.; Kaneto, H.; Katakami, N.; Matsuoka, T.-a.; Harada, A.; Yamasaki, Y.; Matsuhisa, M.; Shimomura, I. Association of serum copper levels and glycemic control in patients with type 2 diabetes. *Endocr. J.* **2013**, *60*, 393–396.

- (26) Uriu-Adams, J. Y.; Keen, C. L. Copper, oxidative stress, and human health. *Mol. Aspects Med.* **2005**, *26*, 268–298.

- (27) Ward, B.; Walker, K.; Exley, C. Copper(II) inhibits the formation of amylin amyloid in vitro. *J. Inorg. Biochem.* **2008**, *102*, 371–375.

- (28) Li, H.; Ha, E.; Donaldson, R. P.; Jeremic, A. M.; Vertes, A. Rapid Assessment of Human Amylin Aggregation and Its Inhibition by Copper(II) Ions by Laser Ablation Electrospray Ionization Mass

Spectrometry with Ion Mobility Separation. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 9829–9837.

(29) Rivillas-Acevedo, L.; Sánchez-López, C.; Amero, C.; Quintanar, L. Structural Basis for the Inhibition of Truncated Islet Amyloid Polypeptide Aggregation by Cu(II): Insights into the Bioinorganic Chemistry of Type II Diabetes. *Inorg. Chem.* **2015**, *54*, 3788–3796.

(30) Bellia, F.; Grasso, G. The role of copper(II) and zinc(II) in the degradation of human and murine IAPP by insulin-degrading enzyme. *J. Mass Spectrom.* **2014**, *49*, 274–279.

(31) Sinopoli, A.; Magri, A.; Milardi, D.; Pappalardo, M.; Pucci, P.; Flagiello, A.; Titman, J. J.; Nicoletti, V. G.; Caruso, G.; Pappalardo, G.; Grasso, G. The role of copper (II) in the aggregation of human amylin. *Metallomics* **2014**, *6*, 1841–1852.

(32) Hu, J.; Yu, Y.-P.; Cui, W.; Fang, C.-L.; Wu, W.-H.; Zhao, Y.-F.; Li, Y.-M. Cyclen-hybrid compound captures copper to protect INS-1 cells from islet amyloid polypeptide cytotoxicity by inhibiting and lysing effects. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 8023–8025.

(33) Yu, Y.-P.; Lei, P.; Hu, J.; Wu, W.-H.; Zhao, Y.-F.; Li, Y.-M. Copper induced cytotoxicity: reactive oxygen species or islet amyloid polypeptide oligomer formation. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 6909–6911.

(34) Ma, L.; Li, X.; Wang, Y.; Zheng, W.; Chen, T. Cu(II) inhibits hIAPP fibrillation and promotes hIAPP-induced beta cell apoptosis through induction of ROS-mediated mitochondrial dysfunction. *J. Inorg. Biochem.* **2014**, *140*, 143–152.

(35) Masad, A.; Hayes, L.; Tabner, B. J.; Turnbull, S.; Cooper, L. J.; Fullwood, N. J.; German, M. J.; Kametani, F.; El-Agnaf, O. M. A.; Allsop, D. Copper-mediated formation of hydrogen peroxide from the amylin peptide: A novel mechanism for degeneration of islet cells in type-2 diabetes mellitus? *FEBS Lett.* **2007**, *581*, 3489–3493.

(36) Jensen, K. J.; Shelton, P. T.; Pedersen, S. L. *Peptide Synthesis and Applications*, 2nd ed.; Humana Press: New York, 2013; p 253.

(37) Subirós-Funosas, R.; Prohens, R.; Barbas, R.; El-Faham, A.; Albericio, F. Oxyma: an efficient additive for peptide synthesis to replace the benzotriazole-based HOBt and HOAt with a lower risk of explosion. *Chem. - Eur. J.* **2009**, *15*, 9394–9403.

(38) Gaggelli, E.; Bernardi, F.; Molteni, E.; Pogni, R.; Valensin, D.; Valensin, G.; Remelli, M.; Luczkowski, M.; Kozłowski, H. Interaction Of The Human Prion PrP(106–126) Sequence With Copper(II), Manganese(II), And Zinc(II): NMR and EPR Studies. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 996–1006.

(39) Huber, J. G.; Moulis, J.-M.; Gaillard, J. Use of ¹H Longitudinal Relaxation Times in the Solution Structure of Paramagnetic Proteins. Application to [4Fe-4S] Proteins. *Biochemistry* **1996**, *35*, 12705–12711.

(40) Bertini, I.; Luchinat, C. *Coord. Chem. Rev.* **1996**, *150*, 1–292.

(41) Solomon, I. Relaxation Processes in a System of Two Spins. *Phys. Rev.* **1955**, *99*, 559–565.

(42) Vranken, W. F.; Boucher, W.; Stevens, T. J.; Fogh, R. H.; Pajon, A.; Llinas, M.; Ulrich, E. L.; Markley, J. L.; Ionides, J.; Laue, E. D. The CCPN data model for NMR spectroscopy: development of a software pipeline. *Proteins: Struct., Funct., Genet.* **2005**, *59*, 687–696.

(43) Schaftenaar, G.; Noordik, J. H. Molden: a pre- and post-processing program for molecular and electronic structures. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **2000**, *14*, 123–134.

(44) Ufimtsev, I. S.; Martinez, T. J. Quantum Chemistry on Graphical Processing Units. 3. Analytical Energy Gradients, Geometry Optimization, and First Principles Molecular Dynamics. *J. Chem. Theory Comput.* **2009**, *5*, 2619–2628.

(45) Perdew, J. P.; Burke, K.; Ernzerhof, M. Generalized Gradient Approximation Made Simple. *Phys. Rev. Lett.* **1996**, *77*, 3865–3868.

(46) Godbout, N.; Salahub, D. R.; Andzelm, J.; Wimmer, E. Optimization of Gaussian-type basis sets for local spin density functional calculations. Part I. Boron through neon, optimization technique and validation. *Can. J. Chem.* **1992**, *70*, 560–571.

(47) Geudtner, G.; Calaminici, P.; Carmona-Espíndola, J.; del Campo, J. M.; Domínguez-Soria, V. D.; Moreno, R. F.; Gamboa, G. U.; Goursot, A.; Köster, A. M.; Reveles, J. U.; Mineva, T.; Vásquez-

Pérez, J. M.; Vela, A.; Zúñiga-Gutiérrez, B.; Salahub, D. R. deMon2k. *WIREs Comput. Mol. Sci.* **2012**, *2*, 548–555.

(48) Neese, F. The ORCA program system. *WIREs Comput. Mol. Sci.* **2012**, *2*, 73–78.

(49) Ernzerhof, M.; Scuseria, G. E. Assessment of the Perdew–Burke–Ernzerhof exchange–correlation functional. *J. Chem. Phys.* **1999**, *110*, 5029.

(50) Adamo, C.; Barone, V. Toward reliable density functional methods without adjustable parameters: The PBE0 model. *J. Chem. Phys.* **1999**, *110*, 6158–6170.

(51) The ORCA basis set CoreProp was used. This basis is based on the TurboMole DZ basis developed by Ahlrichs and co-workers and obtained from the basis set library under ftp.chemie.unikarlsruhe.de/pub/basen

(52) Daniele, P. G.; Prenesti, E.; Ostacoli, G. Ultraviolet-circular dichroism spectra for structural analysis of copper (II) complexes with aliphatic and aromatic ligands in aqueous solution. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1996**, 3269–3275.

(53) Bernarducci, E.; Schwindinger, W. F.; Hughey, J. L.; Krogh-Jespersen, K.; Schugar, H. J. Electronic Spectra of Copper(II)-Imidazole and Copper(II)-Pyrazole Chromophores. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 1686–1691.

(54) Peisach, J.; Blumberg, W. E. Structural implications derived from the analysis of electron paramagnetic resonance spectra of natural and artificial copper proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* **1974**, *165*, 691–708.

(55) Bertini, I.; Luchinat, C.; Parigi, G.; Pierattelli, R. NMR spectroscopy of paramagnetic metalloproteins. *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1536–1549.

(56) Gaggelli, E.; Kozłowski, H.; Valensin, D.; Valensin, G. NMR studies on Cu(II)-peptide complexes: exchange kinetics and determination of structures in solution. *Mol. Biosyst.* **2005**, *1*, 79–84.

(57) Binolfi, A.; Rodríguez, E. E.; Valensin, D.; D'Amelio, N.; Ippoliti, E.; Obal, G.; Duran, R.; Magistrato, A.; Pritsch, O.; Zwickstetter, M.; Valensin, G.; Carloni, P.; Quintanar, L.; Griesinger, C.; Fernández, C. O. Bioinorganic chemistry of Parkinson's disease: structural determinants for the copper-mediated amyloid formation of alpha-synuclein. *Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 10668–10679.

(58) Neese, F. Metal and ligand hyperfine couplings in transition metal complexes: The effect of spin–orbit coupling as studied by coupled perturbed Kohn–Sham theory. *J. Chem. Phys.* **2003**, *118*, 3939–3948.

(59) Barry, S. D.; Rickard, G. A.; Pushie, M. J.; Rauk, A. The affinity of HGGG, GHGG, GGHG, and GGGH peptides for copper(II) and the structures of their complexes — An ab initio study. *Can. J. Chem.* **2009**, *87*, 942–953.

(60) Magri, A.; La Mendola, D.; Nicoletti, V. G.; Pappalardo, G.; Rizzarelli, E. New Insight in Copper-Ion Binding to Human Islet Amyloid: The Contribution of Metal-Complex Speciation To Reveal the Polypeptide Toxicity. *Chem. - Eur. J.* **2016**, *22*, 13287–13300.

(61) Grande-Aztatzi, R.; Rivillas-Acevedo, L.; Quintanar, L.; Vela, A. Structural models for Cu(II) bound to the fragment 92–96 of the human prion protein. *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 789–799.

(62) Burns, C. S.; Aronoff-Spencer, E.; Dunham, C. M.; Lario, P.; Avdievich, N. I.; Antholine, W. E.; Olmstead, M. M.; Vrieland, A.; Gerfen, G. J.; Peisach, J.; Scott, W. G.; Millhauser, G. L. Molecular Features of the Copper Binding Sites in the Octarepeat Domain of the Prion Protein. *Biochemistry* **2002**, *41*, 3991–4001.

(63) Bataille, M.; Formicka-Kozłowska, G.; Kozłowski, H.; Pettit, L. D.; Steel, I. The L-proline residues as a break-point in the coordination of metal-peptide systems. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1984**, 231–232.

(64) Pettit, L. D.; Steel, I.; Formicka-Kozłowska, G.; Tatarowski, T.; Bataille, M. The L-Proline Residues as a Break-point in Metal-Peptide System. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1985**, 535–539.

(65) Rowinska-Zyrek, M. Coordination of Zn(2+) and Cu(2+) to the membrane disrupting fragment of amylin. *Dalton Trans.* **2016**, *45*, 8099–8106.

(66) Luca, S.; Yau, W.-M.; Leapman, R.; Tycko, R. Peptide Conformation and Supramolecular Organization in Amylin Fibrils:

Constraints from Solid-State NMR. *Biochemistry* **2007**, *46*, 13505–13522.

(67) Wiltzius, J. J.; Sievers, S. A.; Sawaya, M. R.; Cascio, D.; Popov, D.; Riek, C.; Eisenberg, D. Atomic structure of the cross-beta spine of islet amyloid polypeptide (amylin). *Protein Sci.* **2008**, *17*, 1467–1474.

(68) Sakagashira, S.; Hiddinga, H. J.; Tateishi, K.; Sanke, T.; Hanabusa, T.; Nanjo, K.; Eberhardt, N. L. S20G Mutant Amylin Exhibits Increased in Vitro Amyloidogenicity and Increased Intracellular Cytotoxicity Compared to Wild-Type Amylin. *Am. J. Pathol.* **2000**, *157*, 2101–2109.

(69) Xu, W.; Jiang, P.; Mu, Y. Conformation Preorganization: Effects of S20G Mutation on the Structure of Human Islet Amyloid Polypeptide Segment. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 7308–7314.

(70) Koo, B. W.; Hebda, J. A.; Miranker, A. D. Amide inequivalence in the fibrillar assembly of islet amyloid polypeptide. *Protein Eng., Des. Sel.* **2008**, *21*, 147–154.

(71) Faller, P.; Hureau, C.; La Penna, G. Metal ions and intrinsically disordered proteins and peptides: from Cu/Zn amyloid-beta to general principles. *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 2252–9.

(72) Nasica-Labouze, J.; Nguyen, P. H.; Sterpone, F.; Berthoumieu, O.; Buchete, N. V.; Cote, S.; De Simone, A.; Doig, A. J.; Faller, P.; Garcia, A.; Laio, A.; Li, M. S.; Melchionna, S.; Mousseau, N.; Mu, Y.; Paravastu, A.; Pasquali, S.; Rosenman, D. J.; Strodel, B.; Tarus, B.; Viles, J. H.; Zhang, T.; Wang, C.; Derreumaux, P. Amyloid beta Protein and Alzheimer's Disease: When Computer Simulations Complement Experimental Studies. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 3518–63.

Structural Basis for the Inhibition of Truncated Islet Amyloid Polypeptide Aggregation by Cu(II): Insights into the Bioinorganic Chemistry of Type II Diabetes

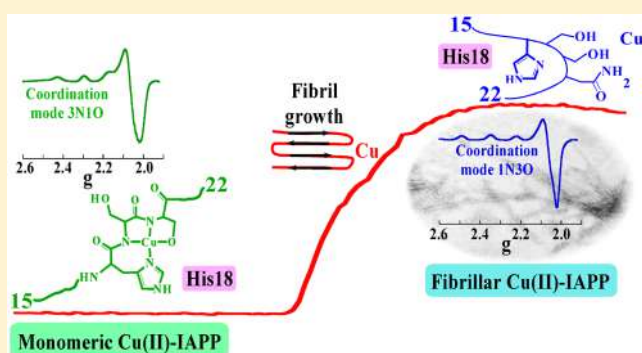
Lina Rivillas-Acevedo,^{*,†,‡} Carolina Sánchez-López,[†] Carlos Amero,[‡] and Liliana Quintanar^{*,†}

[†]Departamento de Química, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (Cinvestav), México, D.F., México

[‡]Centro de Investigaciones Químicas, Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos México

S Supporting Information

ABSTRACT: Type 2 diabetes (T2D) is one of the most common chronic diseases, affecting over 300 million people worldwide. One of the hallmarks of T2D is the presence of amyloid deposits of human islet amyloid polypeptide (IAPP) in the islets of Langerhans of pancreatic β -cells. Recent reports indicate that Cu(II) can inhibit the aggregation of human IAPP, although the mechanism for this inhibitory effect is not clear. In this study, different spectroscopic techniques and model fragments of IAPP were employed to shed light on the structural basis for the interaction of Cu(II) with human IAPP. Our results show that Cu(II) anchors to His18 and the subsequent amide groups toward the C-terminal, forming a complex with an equatorial coordination mode 3N1O at physiological pH. Cu(II) binding to truncated IAPP at the His18 region is the key event for its inhibitory effect in amyloid aggregation. Electron paramagnetic resonance studies indicate that the monomeric Cu(II)-IAPP(15–22) complex differs significantly from Cu(II) bound to mature IAPP(15–22) fibers, suggesting that copper binding to monomeric IAPP(15–22) competes with the conformation changes needed to form β -sheet structures, thus delaying fibril formation. A general mechanism is proposed for the inhibitory effect of copper and other imidazole-binding metal ions in IAPP amyloid formation, providing further insights into the bioinorganic chemistry of T2D.



INTRODUCTION

Type 2 diabetes (T2D) is one of the most common chronic diseases. It is a degenerative metabolic disease characterized by elevated blood glucose levels, abnormal insulin secretion, and insulin resistance.¹ One of the hallmarks of T2D is the presence of amyloid deposits of islet amyloid polypeptide (IAPP) in the islets of Langerhans of pancreatic β -cells.^{2,3} IAPP, also known as amylin, is a putative polypeptide hormone expressed mainly by the β -cells in humans, and it is stored with insulin in secretory granules.^{4,5} The release of IAPP from β -cells occurs in response to nutrient stimuli, as well as insulin.⁶ The ratio of IAPP/insulin concentrations is 1:10,⁷ while the clearance rates are slower for IAPP.⁸ However, the levels of amylin are elevated in conditions associated with insulin resistance, such as obesity⁹ and pregnancy.¹⁰ The physiological role of IAPP is not well-understood, but it has been proposed that the peptide is related to glucose metabolism¹¹ and that it participates in the regulation of food intake, body weight,¹² and renal filtration.¹³ Although the physiological activity of amylin is still unknown, clearly the peptide plays a fundamental role in the pathogenesis of T2D, since ~90% of patients with T2D at autopsy have

amyloid deposits, and its degree correlates with the severity of the disease.^{14,15}

IAPP sequence is highly conserved among mammals; however, only IAPP from humans, primates, and cats are able to form amyloid fibrils, whereas IAPP from rodents is not amyloidogenic.^{16,17} It is known that the region 20–29 is aggressively amyloidogenic, while fragments 30–37 and 8–20 are also prone to form amyloid fibers.¹⁸ The sequence differences between human and mouse IAPP are the substitution of His18 by Arg in mouse and the presence of three Pro residues within the region of 20–29.¹⁷ The substitution of His18 by Arg does not influence the amyloidogenicity of the fragment 8–20;¹⁸ however, the presence of Pro residues in the 20–29 region preclude the β -sheet conformation necessary for amyloid fibril formation, and it may be the cause of the lack of amyloidogenicity of rodent IAPP.¹⁷

The IAPP structure in solution is hard to establish by its aggressive propensity to aggregate, even at low concentrations.

Received: December 14, 2014

Published: March 31, 2015

However, NMR experiments have shown that hIAPP on sodium dodecyl sulfate micelles has an overall kinked helix motif.¹⁹ Moreover, some circular dichroism (CD) studies have reported that IAPP is natively disordered in solution,^{18,20} although absorption spectroscopy, two-dimensional (2D) infrared spectroscopy and NMR studies show an increase in the helical content prior to its conversion to the β -sheet and fibril conversion.^{20–22} In addition, fibrillization studies in the presence of lipids or in aqueous solutions of hexafluoroisopropanol have proved to accelerate the rate of IAPP fibrillization.^{23,24} Crystallographic studies of IAPP fused with maltose have shown that IAPP can adopt an α -helical structure at residues 8–18 and 22–27 and that molecules of IAPP dimerize accelerating the fibril formation.²⁵

In this context, the role of metal ions in the aggregation of IAPP has become a matter of investigation given that several metal ions have been linked to amyloid aggregation associated with other degenerative diseases, such as Alzheimer, Parkinson and prion diseases.^{26,27} The effect of zinc is particularly interesting since it is present in pancreatic β -cells at millimolar levels (granules) and micromolar concentrations (extracellular space),^{27,28} while clinical and epidemiological studies suggest Zn deficiency as a common symptom in T2D. On the other hand, in vitro assays show that Zn(II) significantly inhibits IAPP amyloid fibrillogenesis²⁷ by binding to His18²⁹ and/or by inhibiting the formation of a dimer that precedes the formation of amyloid fibrils.³⁰ Some studies show that copper levels are affected in diabetic patients,^{31,32} while others affirm that the levels of copper in serum are significantly higher in diabetic patients as compared to healthy individuals,^{32–35} suggesting a link between copper homeostasis and the etiology of T2D. Also, some studies indicate that copper levels affect glycemic control in T2D.³⁴

Amyloid-induced toxicity to β -cells is thought to be mediated by increased cellular free radical production,³⁶ while a role for Cu(II) in the production of reactive oxygen species (ROS) and IAPP amyloid aggregation has been proposed.^{35,37,38} However, a recent study revealed that Cu(II) and Ni(II) inhibit IAPP fibrillization and decrease the viability of INS-1 rat insulinoma cells.³⁹ Both metal ions have very similar binding characteristics, but Ni(II) is not able to catalyze ROS production; thus, the toxicity of Cu(II) was not ascribed to ROS formation but to the stabilization of toxic intermediate species.³⁹ Consistently, a recent study shows that the Cu(II)-IAPP complex produces hydrogen peroxide to a lesser extent than free Cu(II) in solution, suggesting a sacrificial protective role for IAPP in conditions of high copper concentration.⁴⁰

A potent inhibitory effect of Cu(II) in human IAPP and proIAPP amyloid aggregation has been reported,^{37,40–44} while CD studies show that copper induces a more compact conformation with no β -sheet folding.⁴⁵ However, the structural details of Cu(II) binding to IAPP remain unknown, impeding further understanding of the mechanism by which Cu(II) inhibits amyloid aggregation. In this study, we employed different spectroscopic techniques to shed light on the structural basis for the interaction of Cu(II) with different fragments of human IAPP. In particular, the effect of Cu(II) in the fibrillization rate and fiber morphology of the human IAPP fragments 15–29 and 15–22 was examined, while direct Cu(II) binding to IAPP(15–22) was investigated in detail. Our results clearly indicate that Cu(II) anchors to His18 in human IAPP fragments in a pH-dependent manner, involving Ser and Asn residues that follow His18 in the sequence, with an equatorial

coordination mode 3N1O at physiological pH. Electron paramagnetic resonance (EPR) studies of Cu(II) bound to IAPP(15–22) mature fibrils indicate that Cu(II) coordinated to the monomers competes with the conformation needed to start the formation of β -sheet structure delaying the fibril formation.

■ EXPERIMENTAL SECTION

Reagents. All chemicals were reagent grade and used without further purification. 9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) protected amino acids and resins were obtained from Novabiochem (Merck). Water was purified to a resistivity of 18 M Ω /cm using a Millipore deionizing system.

Peptide Synthesis and Purification. The following peptides were synthesized by solid-phase synthesis and Fmoc strategy, as previously described:^{46,47} FLVHSSNNFGAILSS (IAPP(15–29)), FLVHSSNN (IAPP(15–22)), FLVH (IAPP(15–18)), FLVASSNN (IAPP(15–22H18A)), HSSNN (IAPP(18–22)). All peptides were acetylated at the amino terminus, and the carboxylic terminal was amidated. Crude peptides were purified to >95% by reversed-phase high-performance liquid chromatography and characterized by electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS), as previously described.⁴⁸

Preparation of Peptide Samples. Lyophilized peptides were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) to prepare a 15 mM stable stock. Peptide solutions were prepared in a mixture of 20 mM 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) buffer and 20 mM *N*-ethylmorpholine (NEM) buffer. Final concentration for spectroscopic studies was 0.3 mM. For pH titrations, the pH was varied every 0.25 pH units by adding the necessary volume of NaOH or HCl solutions, and it was followed by CD spectroscopy. Peptide samples for EPR spectroscopy were prepared in the same buffer mixture 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 CD spectroscopy. Fiber samples for EPR were prepared by spinning down aggregates and resuspending pellets in 200 μ L of NEM/MES buffer with 50% glycerol.

Thioflavin T Fluorescence Assay. The kinetics of IAPP(15–22) and IAPP(15–29) fragments amyloid formation were monitored by the Thioflavin T (ThT) assay, as an increase in fluorescence emission at 485 nm occurs when the amyloid-specific dye ThT binds to an amyloid fiber. The assay was performed using a Cary Eclipse fluorimeter, at an excitation wavelength of 440 nm. The peptides were diluted in the previously described mixture of buffers at pH 7.5 to a final concentration of 10 μ M IAPP(15–29) or 100 μ M IAPP(15–22), 25 μ M ThT, and the appropriate amount of CuCl₂ to have 0.0, 0.5, 1.0, and 2.0 equiv of Cu(II). Fluorescence emission at 485 nm was monitored over time at 37 °C and constant agitation.

Transmission Electron Microscopy. After the ThT assay, the solutions of IAPP were decanted for a couple of days at 4 °C to obtain the aggregates in a pellet. Then, the pellet was washed with deionized water to remove the ThT as much as possible, and it was decanted for another 2 d at 4 °C. The pellet was gently resuspended in 100 μ L of water, and 10 μ L of this suspension was loaded onto Formvar-coated copper grids for 1 min, washed twice with 5 μ L of MQ water, and then negatively stained with 2% uranyl acetate for 1 min. Samples were imaged with a JEOL 1400 EX transmission electron microscope.

Electronic Absorption and Circular Dichroism Spectroscopy. Room-temperature absorption and CD spectra in the UV–visible region were recorded using an Agilent 8453 diode array spectrometer and a Jasco J-815 CD spectropolarimeter, respectively, using 1 cm path length quartz cells.

Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy. X-band (9.4 GHz) EPR spectra were collected using an EMX Plus Bruker System, with an ER 041 XG microwave bridge and an ER 4102ST cavity. EPR spectra were recorded at 150 K using an ER4131VT variable-temperature nitrogen system. The samples were run using microwave power, 10 mW; modulation amplitude, 5 G; modulation frequency, 100 kHz; time constant, 327 ms; conversion time, 82 ms; and averaging over 6–12 scans.

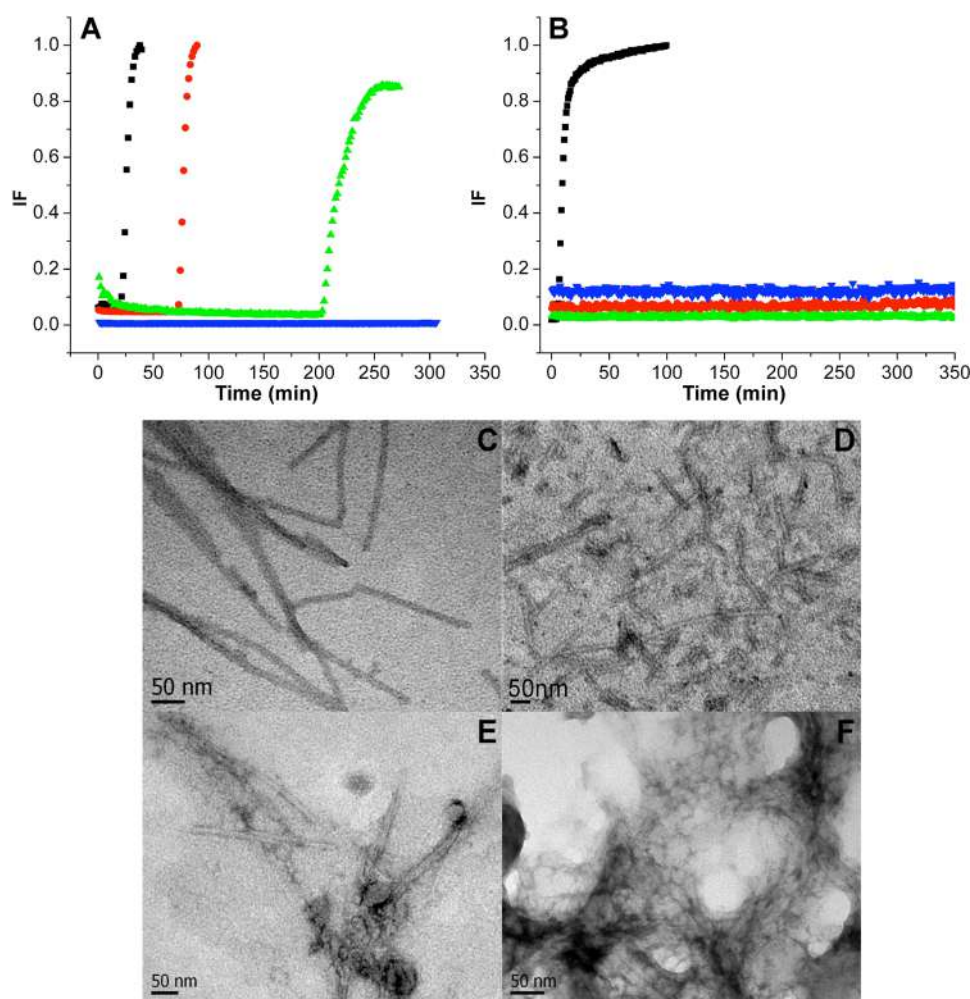


Figure 1. Cu(II) effects in the amyloid aggregation of IAPP(15–22) (A) and IAPP(15–29) (B), followed by ThT fluorescence, in the absence of Cu(II) (black), and presence of 0.5 equiv (red), 1.0 equiv (green), and 2.0 equiv (blue) of Cu(II). TEM images of the IAPP(15–22) amyloid fibrils grown in the absence of Cu(II) (C), and in the presence of 0.5 equiv (D), 1.0 equiv (E), and 2.0 equiv (F) of Cu(II).

Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. All NMR spectra were recorded at 25 °C on a Varian 700 MHz VNMR-S spectrometer equipped with a cryogenically cooled triple resonance pulse field gradient probe. 2D ^1H – ^1H total correlation spectroscopy (TOCSY) data were collected on a 0.5 mM solution of IAPP(15–22) in MES at pH 7.5 and 15% D_2O , in the absence and presence of 0.3 equiv of Cu(II). Spectra were processed with NMRPipe and analyzed using CARA.

RESULTS AND DISCUSSION

Cu(II) Effect on IAPP Fibrillization. To characterize the effect of Cu(II) in the amyloid aggregation of human IAPP(15–29) and IAPP(15–22) fragments, the kinetics of fibril formation at pH 7.5 were measured in the presence of 0.0, 0.5, 1.0, and 2.0 equiv of Cu(II), as monitored by ThT fluorescence assay. The concentrations of peptides used were 10 and 100 μM , for IAPP(15–29) and IAPP(15–22), respectively. In these assays, an increase in ThT fluorescence intensity at emission $\lambda = 485$ nm is indicative of the formation of rigid amyloid-like structures capable of ThT binding. Figure 1A shows that the fibrillization of IAPP(15–22) is slower in the presence of Cu(II). The lag time for aggregation of IAPP(15–22) is 25 min, and it increases to 129 and 274 min in the presence of 0.5 and 1.0 equiv of Cu(II), respectively. Finally, no changes in the ThT fluorescence are observed in the presence

of 2.0 equiv of Cu(II) (Figure 1A) in the time frame of these experiments. These results indicate that Cu(II) delays and/or inhibits the formation of amyloid fibers of IAPP(15–22). The effect of Cu is even more pronounced for the longer fragment IAPP(15–29), as shown in Figure 1B. IAPP(15–29) has a shorter lag time for fibrillization (8.9 min) than IAPP(15–22), even at a 10 \times lower peptide concentration, which is consistent with having a longer sequence that includes hydrophobic residues. In the presence of Cu(II), IAPP(15–29) does not show any increase in ThT fluorescence, indicating that, under the conditions of this experiment, the peptide does not form amyloid fibrils in the presence of Cu(II) (Figure 1B).

The fibers of IAPP(15–22) were imaged by TEM at the end point of the ThT assay. Figure 1C shows that the IAPP(15–22) fibers are long and well-structured; in the presence of 0.5 equiv of Cu(II) the amount of fibers decreases, and the fibers look shorter (Figure 1D). When the fibers are grown with 1.0 equiv of Cu(II), they are shorter and apparently thinner than the fibers grown without Cu(II), while less-structured non-fibrillar aggregates are observed (Figure 1E). In the presence of 2.0 equiv of Cu(II) the TEM image shows mostly disordered aggregates and very few short and thin fibrils (Figure 1F). Altogether, these results show that Cu(II) delays the formation of amyloid fibrils of IAPP, possibly by promoting a different

aggregation pathway that yields fewer and shorter fibrils, as well as aggregates with nonfibrillar morphology.

Cu(II) Binding to IAPP(15–22). To gain insight into the mechanism by which Cu(II) affects the aggregation of IAPP, the direct interaction of this metal ion with IAPP(15–22) was investigated. CD spectroscopy is a useful tool to probe copper-protein interactions, as it allows the characterization of electronic transitions associated with the resulting chiral complexes. Here, a 0.3 mM solution of IAPP(15–22) was titrated with Cu(II) at pH 7.5, followed by electronic absorption and CD spectroscopy (Figure 2). Upon addition

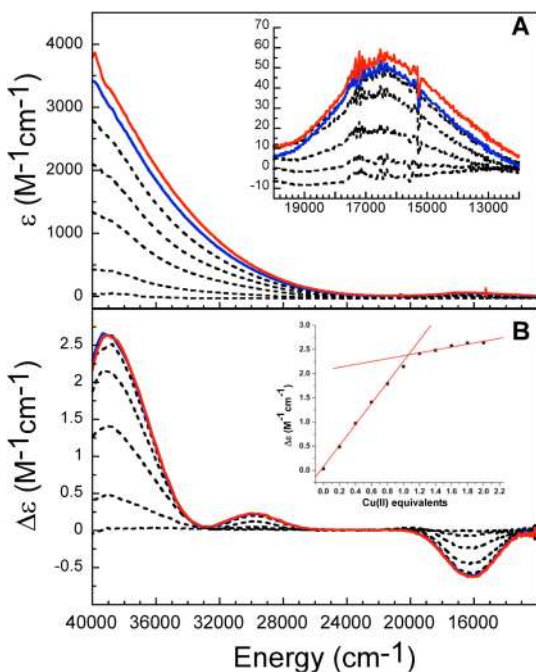


Figure 2. Titration of IAPP(15–22) with Cu(II) followed by UV-vis absorption (A) and CD spectroscopy (B) at pH 7.5. Dotted lines correspond to the addition of 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 eq of Cu(II), and the solid blue and red lines correspond to the addition of 1.0 and 2.0 eq of Cu(II), respectively. (A, inset) Enlarged lower-energy region for the d–d region of the UV-vis spectrum (A). (B, inset) CD signal intensity at 39 062 cm^{-1} plotted as a function of the number of equivalents of Cu(II), clearly showing a 1:1 stoichiometry for the Cu-peptide complex.

of the metal ion, several signals arise in the UV-visible region, indicating coordination to the peptide. All CD signals saturate at 1 equiv of Cu(II), suggesting a 1:1 molar stoichiometry for the Cu(II)-peptide complex. The presence of a 1:1 Cu-peptide adduct was confirmed by mass spectrometry, while no evidence for dimeric species was found (Supporting Information, Figure S1). The CD spectrum of the Cu(II)-IAPP(15–22) complex (Figure 2 and Supporting Information, Figure S1) has two negative bands centered around 16 200 cm^{-1} (617 nm; $\Delta\epsilon = -0.71 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), and 32 400 cm^{-1} (309 nm; $\Delta\epsilon = -0.024 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$); and a couple of positive signals around 29 800 cm^{-1} (335 nm; $\Delta\epsilon = 0.14 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), and at 39 000 cm^{-1} (256 nm, $\Delta\epsilon = 2.64 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Supporting Information, Table S1). On the basis of their energies and intensity, the electronic transition at 16 200 cm^{-1} can be assigned as a d–d band, while all others correspond to ligand-to-metal charge transfer (LMCT) transitions. In particular, transitions at 32 400 and 39 000 cm^{-1} can be assigned as π_1 and π_2 LMCT that

originate from imidazole His binding to Cu(II),⁴⁹ while the signal at 29 800 cm^{-1} is a LMCT indicative of coordination of deprotonated amide groups.⁴⁹ Finally, once the CD signals associated with the Cu(II)-IAPP(15–22) complex were identified, their growth as a function of Cu concentration was used to estimate a dissociation constant (K_d) for this complex. Assuming only one binding site, a fit of the titration data yielded a K_d of $12.3 \pm 2.7 \mu\text{M}$ for the Cu(II)-IAPP(15–22) complex (Supporting Information, Figure S2).

Often, Cu(II) coordination to peptides is pH-dependent; therefore, the CD spectrum of the Cu(II)-IAPP(15–22) complex was collected at different pH values (Figure 3).

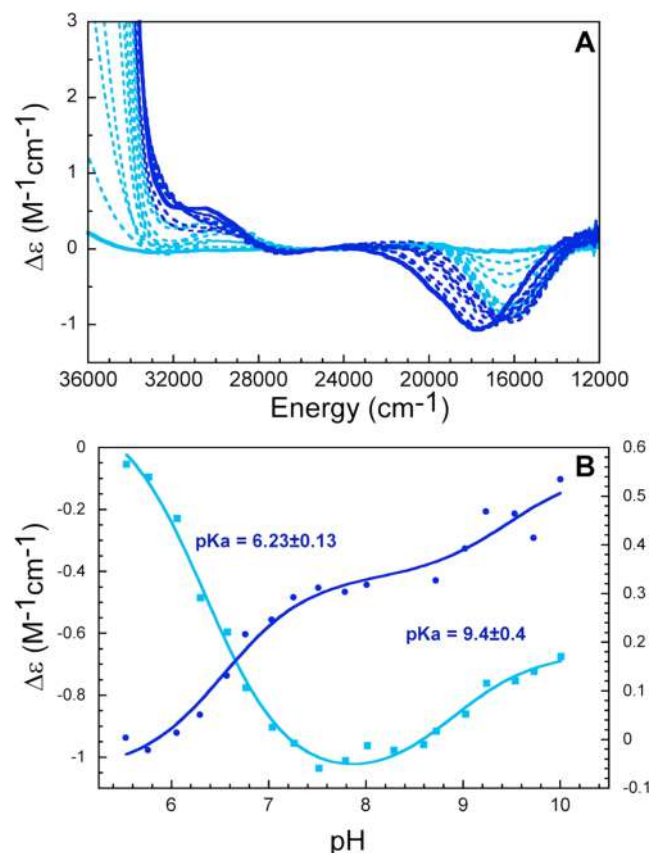


Figure 3. pH titration of the Cu(II)-IAPP(15–22) complex (A), as followed by CD. The Cu(II)-IAPP complex solution was titrated from pH ≈ 5.7 (continuous bold light line) to pH ≈ 10 (continuous bold dark line); spectra for intermediate pH values are shown in dashed lines. The traces for the CD signal intensity changes at 16 234 cm^{-1} (light blue and left Y-axis scale) and 30 303 cm^{-1} (dark blue and right Y-axis scale) (B) were fitted to the model described in the text (solid lines) to determine the associated pK_a values.

Following the CD spectral changes at different energies, it becomes evident that the signal intensity is dependent on pH, and the signal displays a sigmoidal behavior, which is indicative of protonation equilibria. The experimental data can be fit with the following model:

$$\Delta\epsilon_{\text{obs}} = \frac{(\Delta\epsilon_1 2[\text{H}^+] + \Delta\epsilon_2 [\text{H}^+] K_{a1} + \Delta\epsilon_3 K_{a1} K_{a2})}{(2[\text{H}^+] + [\text{H}^+] K_{a1} + K_{a1} K_{a2})} \quad (1)$$

where $\Delta\epsilon_{\text{obs}}$ is the observed CD signal intensity at any given pH, K_{a1} and K_{a2} are equilibrium constants associated with two protonation events of the Cu(II)-IAPP complex, and $\Delta\epsilon_1$, $\Delta\epsilon_2$,

and $\Delta\epsilon_3$ are the CD signal intensities of the three different species with different protonation states. The pK_a values associated with the two protonation equilibria, as determined by the best fit of experimental data from at least duplicated experiments, are 6.23 ± 0.13 and 9.42 ± 0.4 . These results indicate that at physiological pH (7.4), only one species of the Cu(II)-IAPP(15–22) complex is present.

Cu(II) coordination to IAPP(15–22) at pH 6.0, 6.5, 7.5, 8.5, and 9.5 was also studied by X-band EPR (Figure 4 and

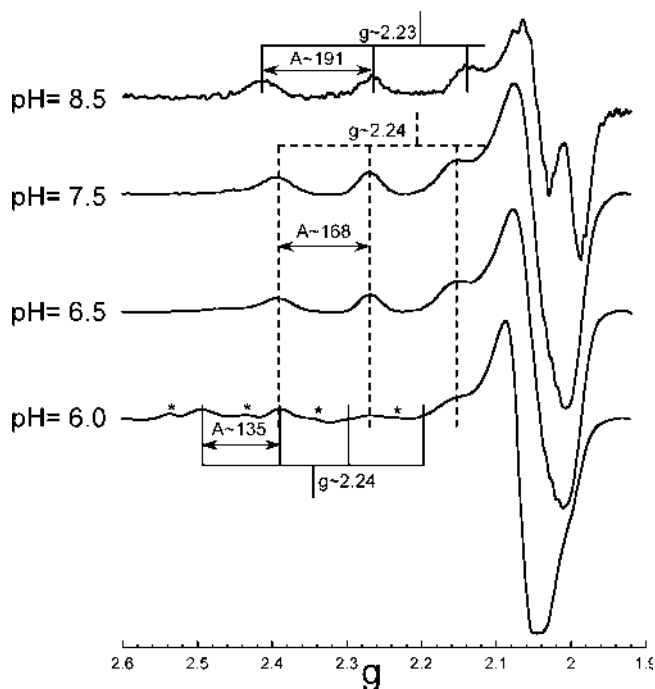


Figure 4. EPR spectra of the Cu(II)-IAPP(15–22) complexes at different pH values. All spectra were collected as described in the experimental section at 150 K. Asterisks indicate signals associated with free Cu(II) in solution.

Supporting Information, Table S2) to get further insight into the protonation equilibria observed by CD. In all cases, the complexes show EPR signals with $g_{II} > g_{I} > 2.00$ and a large parallel copper hyperfine splitting (A_{II}), which is indicative of a $d_{x^2-y^2}$ ground state. At pH 7.5, only one Cu(II)-IAPP(15–22) complex is observed with g_{II} and A_{II} values of 2.236 and $168 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$, falling in a range associated with complexes with an equatorial coordination mode with three nitrogen-based and one oxygen-based ligands (Table S2), according to Peisach–Blumberg correlations.⁵⁰ Note that this type of correlation is only informative of the equatorial coordination shell, and thus, the possibility of the presence of a fifth axial ligand in this complex cannot be evaluated by these correlations.

In contrast, at pH 6.0, three species are observed: (i) signals associated with free Cu(II) in solution; (ii) a species with $g_{II} = 2.374$ and $A_{II} = 135 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ that correlates to an equatorial coordination shell with one nitrogen and three oxygen-based ligands (1N3O); and (iii) a species with $g_{II} = 2.237$ and $A_{II} = 167 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ that correlates to an equatorial coordination shell of 3N1O, and it actually corresponds to the species found at pH 7.5 (Figure 4 and Supporting Information, Table S2). The 1N3O complex must be Cu(II) bound to His18, where the oxygen-based ligands could be provided by the solvent or the peptide. Thus, the pK_a of 6.23 can be associated with the

concerted deprotonation of two backbone amides to transform the 1N3O complex into the 3N1O complex, which is the actual chiral complex detected by CD. IAPP is stored in β -cell granules at $\text{pH} \approx 5.5$, and it is released into the extracellular compartment where the pH is 7.4. Thus, the 1N3O and 3N1O complexes are physiologically relevant species.

Finally, EPR data collected at pH 8.5 and 9.5 reveal the presence of another species with $g_{II} = 2.223$ and $A_{II} = 220 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ that correlates to an equatorial coordination mode with four nitrogen-based ligands (4N), according to Peisach–Blumberg correlations (Figure 4 and Table S2). Thus, the pK_a of 9.2 can be ascribed to the deprotonation of a backbone amide in the 3N1O complex to lead to a 4N complex. However, the 4N species would not be relevant under physiological conditions.

His18 is a Key Residue for Cu(II) Binding to IAPP(15–22) and Its Effect on Aggregation. To evaluate the role of His18 in Cu(II) binding to IAPP(15–22), the IAPP(15–22)H18A variant was prepared. A comparison of the CD spectra of the Cu(II) complexes at pH 7.5 (Figure 5A) shows changes upon the H18A substitution: the transition at $16\,200 \text{ cm}^{-1}$ is shifted to $17\,100 \text{ cm}^{-1}$ and is less intense ($585 \text{ nm } \Delta\epsilon = -0.23 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$); the band around $29\,800 \text{ cm}^{-1}$ is shifted to higher energy, while all the transitions show significantly decreased intensity (Supporting Information, Table S1). All these differences indicate that the nature of the Cu(II)-IAPP(15–22) complex has been drastically affected upon the H18A substitution. The EPR spectra show even more dramatic differences (Figure 5B): the g_{II} and A_{II} values for the Cu(II)-IAPP(15–22)H18A complex are 2.221 and $201 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$, which are widely different from those obtained for the Cu(II)-IAPP(15–22) complex, and fall in a range associated with an equatorial coordination with four nitrogen-based ligands (Supporting Information, Table S2). In fact, these parameters are similar to those obtained in a recent study of rat IAPP, which lacks residue His18.⁴⁷ Finally, the decreased intensity of the CD and EPR spectra of the Cu(II)-IAPP(15–22)H18A complex suggests a diminished affinity for Cu(II). Overall, these results indicate that His18 is the primary anchoring residue for Cu(II) binding to IAPP(15–22) and that the absence of His18 leads to the formation of a completely different Cu(II)-IAPP complex.

We next evaluated the effect of Cu(II) ions in the aggregation of IAPP(15–22)H18A (Supporting Information, Figure S3). Addition of Cu(II) delays the formation of IAPP(15–22)H18A amyloid fibers but to a lesser extent as compared to wild type IAPP(15–22). In fact, while addition of 2 equiv of Cu(II) completely abates fibrillization of IAPP(15–22), it does not prevent formation of amyloid fibrils with IAPP(15–22)H18A (Figure S3). A recent spectroscopic study has shown that Cu(II) binds to rat IAPP(17–22) fragment, even in the absence of anchoring groups like His18, potentially coordinating to Ser and Asn residues in positions 19 to 22.⁴⁷ Thus, Cu(II) binding to these residues must be responsible for the weak effect of this metal ion in the aggregation of IAPP(15–22)H18A. In summary, our results indicate that the H18A substitution diminishes the affinity of the peptide for Cu(II), leading to a completely different Cu(II)-IAPP complex, and diminishing significantly the inhibitory effect of Cu(II) in IAPP amyloid formation.

Identifying Other Key Residues for Cu(II) Binding to IAPP(15–22). When Cu binds to His-containing peptides, its coordination shell can be completed by deprotonated backbone

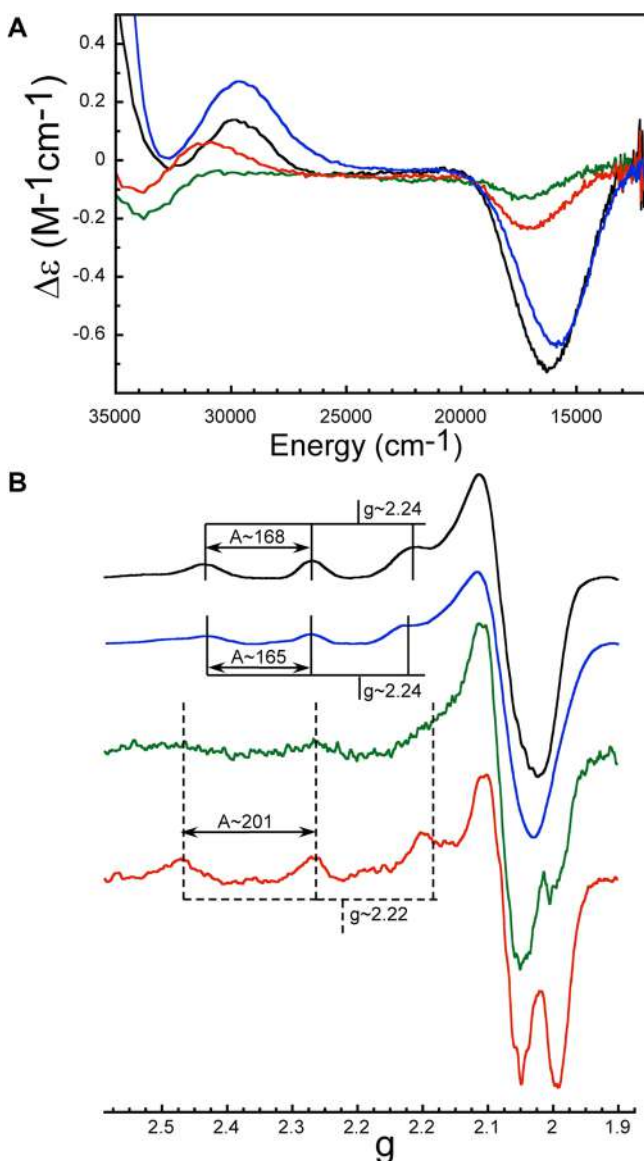


Figure 5. CD (A) and EPR spectra (B) of Cu(II) complexes with human IAPP fragments: 15–22 (black), 18–22 (blue), 15–18 (green), and 15–22H18A (red). All spectra were collected after the addition of 1.0 equiv of Cu(II) at pH 7.5.

amide groups and/or amino acid residues in the vicinity.⁴⁶ To evaluate the role of the residues that precede and follow His18 in the sequence in Cu(II) binding to IAPP(15–22), the shorter fragments IAPP(18–22) and IAPP(15–18) were prepared. The CD spectra of the Cu(II) complexes with these variants are compared at pH 7.5 in Figure 5A, clearly showing the similarities between the IAPP(18–22) and IAPP(15–22) Cu(II) complexes (Supporting Information, Table S1). Moreover, the EPR parameters for these two complexes are very similar, and in both cases, their parallel g and A values correlate well for complexes with a 3N1O equatorial coordination mode (Figure 5B and Supporting Information, Table S2). In contrast, the CD spectrum of the Cu(II)-IAPP(15–18) complex (Figure 5B) is strikingly different from that of Cu(II)-IAPP(15–22), showing two negative signals around 17 250 cm^{-1} (580 nm; $\Delta\epsilon = -0.13 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) and 33 900 cm^{-1} (295 nm; $\Delta\epsilon = -0.19 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Table S1). Furthermore, EPR indicates the differences between the two complexes are dramatic, as the

EPR parameters of the Cu(II)-IAPP(15–18) complex fall in a range associated with a 4N equatorial coordination (Table S2) at pH 7.5.

Overall, these data indicate that the Cu(II) complex formed with IAPP(18–22) has the same coordination environment as the Cu(II)-IAPP(15–22) complex. This conclusion is further supported by an analysis of the titration data of the Cu(II)-IAPP(18–22) complex, which yields a very similar K_d value ($7.1 \pm 1.5 \mu\text{M}$) to that of the Cu(II)-IAPP(15–22) complex (Supporting Information, Figure S2). It becomes evident then, that the residues following His18 are key for Cu(II) binding to IAPP, while residues preceding His18 are not required for Cu(II) coordination. To further test this notion, 2D ^1H - ^1H TOCSY NMR data were collected on the IAPP(15–22) peptide (Figure 6). Signal assignment was adjusted to our

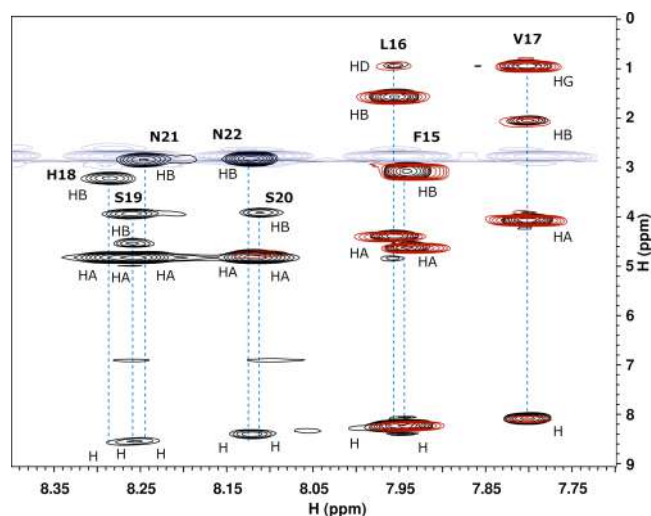


Figure 6. Overlaid 2D ^1H - ^1H TOCSY NMR spectra of IAPP(15–22) in the absence (black) and presence (red) of 0.3 equiv of Cu(II). Signals labeled as H correspond to backbone amide protons for each residue, while HA, HB, HG, and HD correspond to α , β , γ , and δ protons, respectively, the latter being only relevant for Leu and Val residues. Blue signals correspond to noise from residual DMSO in the peptide solution.

conditions from the BMRB-18795 assignment.⁵¹ ^1H - ^1H TOCSY allows the observation of cross peaks for the backbone amide groups of each residue (denoted as H in Figure 6), as well as the protons placed at positions α , β , γ , and δ with respect to the backbone carbonyl group (denoted as HA, HB, HG, and HD, respectively, in Figure 6). Upon addition of 0.3 equiv of Cu(II), the signals from residues His18, Ser19, Ser20, Asn21, and Asn22 disappear completely, while those of residues Phe15, Leu16, and Val17 are not affected at all (Figure 6). Since Cu(II) is a paramagnetic ion, its binding to the peptide would cause a decrease in intensity of the signals of the residues in the vicinity of its binding site; this is due to the paramagnetic relaxation enhancement (PRE) effect.⁵² Thus, the data shown in Figure 6 strongly support the conclusion that Cu(II) binding to the IAPP(15–22) occurs toward the C-terminal of the peptide, involving residues His18, Ser19, Ser20, Asn21, and Asn22, while the residues preceding the His18 are not involved in Cu(II) binding at all. Although it might be surprising that Cu(II) coordination to a His-containing peptide would occur toward the C-terminal forming a seven-membered ring with the first deprotonated amide, note that the final complex with a

3N1O equatorial coordination mode would form a set of 7,5,5-membered rings (Supporting Information, Figure S4). Such a chelate would be overall more stable than the set of 6,5,7-membered rings that would be formed for a 3N1O complex toward the N-terminal, considering the participation of two deprotonated amide groups and a backbone carbonyl.⁵³

Altogether, our spectroscopic data indicate that (i) Cu(II) binds to His18 and the residues toward the C-terminal domain; (ii) Cu(II) coordination involves deprotonated backbone amide groups; and (iii) the equatorial coordination shell involves three nitrogens and one oxygen-based ligand, at physiological pH. Thus, two plausible coordination models for the Cu(II)-IAPP(15–22) complex at pH 7.5 can be proposed, with Cu(II) binding to His18 and the deprotonated amides of Ser19 and Ser20. To complete the 3N1O equatorial coordination mode, the oxygen-based ligand could be a backbone carbonyl, the hydroxyl group of Ser 20, or a water molecule. The proposed structures are shown in Supporting Information, Figure S4, although further studies are needed to probe the specific role of Ser and Asn residues that follow His18 in the Cu(II) coordination shell.

Cu(II) Bound to IAPP Aggregates. Once a good description for Cu(II) coordination to monomeric IAPP has been achieved, the characterization of how Cu(II) binds to IAPP aggregates should shed light on the mechanism for Cu-mediated inhibition of IAPP amyloid formation. Thus, the EPR spectra of fibers of IAPP(15–22) grown in the presence of 0.5 equiv of Cu(II) at pH 7.5 were collected (Figure 7). The g_{II} and

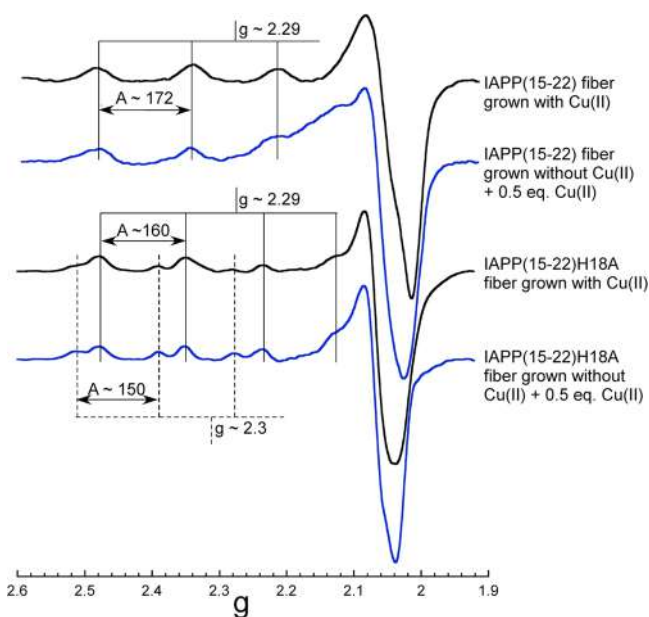


Figure 7. EPR spectra for Cu(II) bound to IAPP(15–22) and IAPP(15–22)H18A fibers at pH 7.5. Spectra in black correspond to fibers grown in the presence of 0.5 equiv of Cu(II), while spectra in blue correspond to fibers grown in the absence of metal ion; however, 0.5 equiv of Cu(II) was added once the mature fiber was formed.

A_{II} of Cu(II) present in the IAPP(15–22) fibers are 2.286 and $172 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$; these parameters fall in the range of values associated with 1N3O or 4O equatorial coordination. Clearly, this equatorial coordination is very different from that observed for the Cu(II)-IAPP complex in solution (Table 1). This implies that, even though Cu(II) was initially bound to IAPP(15–22) as characterized for the monomeric peptide in

Table 1. Electron Paramagnetic Resonance Parameters of Monomeric and Fibrillar Cu(II)-IAPP Complexes at pH 7.5

complex	g_{II}	A_{II}^a	coordination mode
monomeric Cu(II)-IAPP(15–22)	2.236	168	3N0
IAPP(15–22) fibers grown with Cu(II)	2.286	172	N3O
IAPP(15–22) fibers + Cu added	2.285	172	N3O
	2.319 ^b	166 ^b	4O ^b
monomeric Cu(II)-IAPP(15–22)H18A	2.221	201	4N
IAPP(15–22)H18A fibers grown with Cu(II) ^c	2.291	160	N3O
	2.336	148	4O
IAPP(15–22)H18A fibers + Cu added ^c	2.292	158	N3O
	2.333	151	4O

^a($\text{cm}^{-1} \times 10^{-4}$). ^bA very small amount of a second species is observed, which does not correspond to free Cu(II) in solution (Supporting Information, Figure S5). ^cTwo different species are observed.

solution, upon aggregation the mode of Cu(II) binding to the peptide changes drastically, leading to a different coordination environment. This would imply that the conformational changes involved in fiber formation forces the metal ion to adopt a coordination mode in the peptide that is very different from the one it would adopt in solution. Consistently, when 0.5 equiv of Cu(II) was added to fibers of IAPP(15–22) grown in the absence of metal ion, the EPR spectrum was dominated by a species with a $g_{II} = 2.285$ and $A_{II} = 172 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$, which is practically identical to that observed for the fibers grown in the presence of Cu(II) (Figure 7, Table 1), and it is drastically different from the species observed for the monomeric Cu(II)-IAPP(15–22) complex in solution.

On the other hand, the EPR spectrum of IAPP(15–22)H18A fibers, grown in the presence of Cu(II), shows two species at pH 7.5, one of them with g_{II} and A_{II} values that correspond to a 1N3O equatorial coordination, while the second species corresponds to a 4O equatorial coordination (Figure 7, Table 1). In addition, identical EPR spectra were observed when 0.5 equiv of Cu(II) were added to IAPP(15–22)H18A fibers grown in the absence of metal ions. Evidently, none of these two species correspond to that observed in the Cu(II)-IAPP(15–22)H18A soluble complex at pH 7.5, which displays a 4N equatorial coordination (Supporting Information, Table S2), and they do not correspond to free Cu(II) in solution either (Supporting Information, Figure S5). All these results suggest that Cu(II) coordination to these peptides is different in solution than in the aggregated form. Thus, the fibrillization of IAPP(15–22) has an important impact in metal ion coordination: the Cu(II) binding site in IAPP as characterized in solution is no longer available or accessible to the metal ion in the amyloid fibril. Instead, Cu(II) binds to IAPP fibers yielding coordination modes that are less nitrogen-rich, with 1N3O or 4O equatorial coordination modes.

Mechanism for the Inhibitory Effect of Cu(II) in IAPP Amyloid Aggregation. Our results clearly show that Cu(II) exerts an important effect in the aggregation of IAPP, as manifested by a significant delay in fibrillization and changes in the morphology of the aggregates. A detailed spectroscopic study of Cu(II) binding to IAPP shows that the anchoring residue for this interaction is His18 and that Ser and Asn residues that follow His18 in the sequence (i.e., residues 19–22) also play an important role in Cu binding, while residues preceding His18 are not required for Cu(II) coordination. Cu(II) binding to His18 as characterized in solution is the key

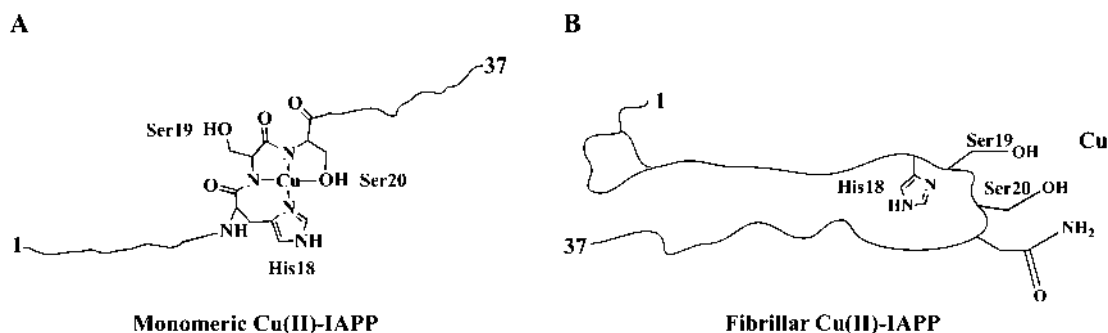


Figure 8. Schematic representation of the conformational change of the peptide bound to Cu(II), from monomeric complex (A) to fibril formation (B). The conformation in (B) is drawn based on the crystal structure of a fibril fragment of IAPP (3FTH).⁵⁵

event that is associated with the effect of this metal ion in IAPP(15–22) fibrillization, as the H18A substitution diminishes the Cu(II) effect. Thus, Cu(II) binds to IAPP(15–22) fragment in a key region for its conversion into amyloid fibers. In fact, fibrillization of IAPP(15–22) forces Cu(II) to adopt a drastically different coordination mode than the original complex in monomeric solution, strongly suggesting that the conformation imposed by copper in the monomeric Cu(II)-IAPP(15–22) complex competes with the conformational changes that are necessary in the aggregation pathway leading to amyloid fibers. Models for IAPP amyloid fibrils have been derived recently by EPR,⁵⁴ crystallography,⁵⁵ and solid-state NMR.⁵⁶ In the latter two models, the His18 residue is located in the inner part of the β -sheet structure, while residues Ser19, Ser20, Asn21, and Asn22 form a loop between two β -sheets. This conformation clearly explains the fibrillization delay caused by copper, since the formation of the β -sheet would compete with the conformation that Cu(II) would impose in the peptide backbone upon binding to His18 and residues 19–22 that follow in the sequence (Figure 8).

From our work it derives that any metal ion anchoring at His18 would have an inhibitory effect in a similar fashion to copper ions. In fact, His18 could be an anchoring residue for Zn(II) and Ni(II) ions, both of them described as inhibitors of IAPP amyloid aggregation. Moreover, a recent study reports the inhibitory effect of a ruthenium complex,⁵⁷ which clearly could be binding to His18. Thus, the mechanism described in Figure 8 is certainly a general mechanism for the inhibitory effects of metal ions with imidazole binding properties.

Mature IAPP is stored in the β -cell granules of the pancreas at low pH, and it is normally released into the extracellular compartment, where pH is 7.4.⁵⁸ Thus, the spectroscopic characterization of the monomeric Cu(II)-IAPP(15–22) species presented here would be relevant in physiological conditions. Moreover, it is plausible to propose that the inhibitory effect of Cu(II) and Zn(II) ions in IAPP amyloid aggregation via anchoring at His18 could be a mechanism to modulate IAPP conformations and prevent the formation of IAPP fibers. The potential loss of Cu homeostasis in diabetic patients would certainly affect these interactions, particularly when IAPP is released into the extracellular space. On the other hand, it has been proposed that Cu(II)-IAPP complexes could stabilize cytotoxic oligomers that trigger apoptosis³⁹ or small aggregates that increase IAPP cytotoxicity by generating ROS³⁸ causing mitochondria disruption,³⁷ although the molecular details of these processes remain to be investigated. Understanding the physiological relevance of the interaction of Cu(II) with IAPP and how these interactions may play a role in

pancreatic degeneration associated with T2D are crucial steps to find therapeutic strategies for this disease.

CONCLUSIONS

Human IAPP is found in the pancreatic islets of patients with T2D as amyloid deposits, and it is thought to play a central role in the disease. Cu(II) inhibits the amyloid aggregation of IAPP, and it induces the formation of small aggregates. Our study shows that Cu(II) binding to IAPP(15–22) at the His18 region is the key event for its inhibitory effect in amyloid aggregation. The residues following His18 are important for Cu(II) binding to IAPP, while residues preceding His18 are not required for Cu(II) coordination. At physiological pH (7.4), Cu(II) anchors to His18 and the subsequent amide groups toward the C-terminal, forming a complex with an equatorial coordination mode 3N1O. Our EPR studies indicate that Cu binding to monomeric IAPP(15–22) in this fashion competes with the conformational changes needed to form β -sheet structures, thus delaying fibril formation. From our work it derives that any metal ion anchoring at His18 would have an inhibitory effect in a similar fashion to copper ions, providing a general mechanism for the inhibitory effects of metal ions with imidazole binding properties. This study sheds light on the structural basis for the interaction of Cu(II) ions with IAPP and their inhibitory effect in its amyloid aggregation providing further insights into the bioinorganic chemistry of T2D.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

Electronic transitions for the Cu(II)-IAPP complexes (tabulated data), mass spectrometry analysis of the Cu(II)-IAPP(15–22) complex, estimation of the K_d values for the Cu(II)-IAPP complexes, EPR parameters for Cu(II)-IAPP complexes (tabulated data), the effect of Cu(II) in the amyloid aggregation of IAPP(15–22)H18A, comparison of EPR spectra for Cu(II)-fiber complexes and free Cu(II) in solution, and proposed Cu(II)-IAPP(15–22) equatorial coordination models (illustrated structures). This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*Phone: +52-55-57473723. E-mail: lilianaq@cinvestav.mx. (L.Q.)

*E-mail: lrvillas@uaem.mx. (L.R.-A.)

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was funded by CONACYT (Grant Nos. 128255 and 221134). L.R.-A. and C.S.-L. thank CONACYT for postdoctoral and Ph.D. fellowships, respectively. The authors would also like to thank Sirenia González Posos (Microscopy Unit, LaNSE, Cinvestav), I.Q. Geiser Cuellar, for assistance with the acquisition of ESI-MS data, and LANEM facilities at CIQ-UAEM where the RMN data were collected.

REFERENCES

- (1) Olefsky, J. M. *Endocrinology*; De Groot, L. J., Ed.; Saunders: London, U.K., 1989; Vol. 2, pp 1369–1399.
- (2) Opie, E. L. *J. Exp. Med.* **1901**, *5*, 527–540.
- (3) Westermark, G. T.; Wernstedt, C.; Wilander, E.; Sletten, K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1986**, *140*, 827–831.
- (4) Westermark, P.; Wilander, E.; Westermark, G. T.; Jonhson, K. H. *Diabetologia* **1987**, *30*, 887–892.
- (5) Lukinius, A.; Wilander, E.; Westermark, G. T.; Engstroem, U.; Westermark, P. *Diabetologia* **1989**, *32*, 240–244.
- (6) Butler, P. C.; Chou, J.; Carter, W. B.; Wang, Y. N.; Chang, D.; Chang, J. K.; Rizza, R. A. *Diabetes* **1990**, *39*, 634–638.
- (7) Hanabusa, T.; Kubo, K.; Oki, C.; Nakano, Y.; Okai, K.; Sanke, T.; Nanjo, K. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **1992**, *15*, 89–96.
- (8) Leckstrom, A.; Bjorklund, K.; Permert, J.; Larsson, R.; Westermark, P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *239*, 265–268.
- (9) Enoki, S.; Mitsukawa, T.; Takemura, J.; Nakazato, M.; Aburaya, J.; Toshimori, H.; Matsukawa, S. *Horm. Metab. Res.* **1992**, *15*, 97–102.
- (10) Kautzky-Willer, A.; Tohomaseh, K.; Ludvik, B.; Nowotny, P.; Rabensteiner, D.; Waldhausl, W.; Pacini, G.; Prager, R. *Diabetes* **1997**, *46*, 607–614.
- (11) Degano, P.; Silvestre, R. A.; Salas, M.; Peiro, E.; Marco, J. *Regul. Pept.* **1993**, *43*, 23–31.
- (12) Chance, W. T.; Balasubramaniam, A.; Stallion, A.; Fischer, J. E. *Brain Res.* **1993**, *607*, 185–188.
- (13) Harris, P. J.; Cooper, M. E.; Hiranyachattada, S.; Berka, J.; Jennifer, L.; Kelly, D. J.; Nobes, M.; Wookey, P. J. *Am. J. Pathol.* **1997**, *272*, F13–F21.
- (14) Kahn, S. E.; Andrikopoulos, S.; Verchere, C. B. *Diabetes* **1999**, *48*, 241–253.
- (15) Marzban, L.; Park, K.; Verchere, C. B. *Exp. Gerontol.* **2003**, *38*, 347–351.
- (16) Betsholtz, C.; Christmansson, L.; Engstroem, U.; Frederik, S.; Viveka, J.; Kenneth, H.; Westermark, P. *FEBS Lett.* **1989**, *251*, 261–264.
- (17) Westermark, P.; Engstroem, U.; Johnson, K. H.; Westermark, G. T.; Betsholtz, C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1990**, *87*, 5036–5040.
- (18) Jaikaran, E.; Clark, A. *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1537*, 179–203.
- (19) Nanga, R. P. R.; Brender, J. R.; Vivekanandan, S.; Ramamoorthy, A. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1808*, 2337–2342.
- (20) Kaye, R.; Bernhagen, J.; Greenfield, N.; Sweimeh, K.; Brunner, H.; Voelter, W.; Kapurniotou, A. *J. Mol. Biol.* **1999**, *287*, 781–796.
- (21) Yonemoto, I.; Kroon, G. J.; Dyson, H.; Balch, W. E.; Kelly, J. W. *Biochemistry* **2008**, *47*, 9900–9910.
- (22) Goldsbury, C.; Goldie, K.; Pellaud, J.; Seelig, J.; Frey, P.; Muller, S.; Kistler, J.; Cooper, G.; Aebi, U. *J. Struct. Biol.* **2000**, *130*, 352–362.
- (23) Jayasinghe, S. A.; Langen, R. *Biochemistry* **2005**, *44*, 12113–12119.
- (24) Apostolidou, M.; Jayasinghe, S. A.; Langen, R. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 17205–17210.
- (25) Wiltzius, J. J. W.; Sievers, S. A.; Sawaya, M. R.; Eisenberg, D. *Protein Sci.* **2009**, *18*, 1521–1530.
- (26) DeToma, A. S.; Salamekh, S.; Ramamoorthy, A.; Hee Lim, M. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 608–621.
- (27) Brender, J. R.; Hartman, K.; Nanga, R. P. R.; Popovych, N.; Bea, R. d. I. S.; Vivekanandan, S.; Marsh, E. N. G.; Ramamoorthy, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 8973–8983.
- (28) Hutton, J. C. *Diabetologia* **1989**, *32*, 271–281.
- (29) Brender, J. R.; Krishnamoorthy, J.; Messina, G. M. L.; Deb, A.; Vivekanandan, S.; La Rosa, C.; Penner-Hahn, J. E.; Ramamoorthy, A. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 3339–3341.
- (30) Salamekh, S.; Brender, J. R.; Hyung, S.-J.; Nanga, R. P. R.; Vivekanandan, S.; Brandon T. Ruotolo, B. T.; Ramamoorthy, A. *J. Mol. Biol.* **2011**, *410*, 294–306.
- (31) Zargar, A. H.; Shah, N. A.; Masoodi, S. R.; Laway, B. A.; Dar, F. A.; Khan, A. R.; Sofi, F. A.; Wani, A. I. *Postgrad. Med. J.* **1998**, *74*, 665–668.
- (32) Rodríguez Flores, C.; Preciado Puga, M.; Wrobel, K.; Garay Sevilla, M. E.; Wrobel, K. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **2011**, *91*, 333–341.
- (33) Tanaka, A.; Kaneto, H.; Miyatsuka, K.; Yamamoto, K.; Yoshiuchi, K.; Yamasaki, Y.; Shimomura, I.; Matsuoka, T.; Matsuhisa, M. *Endocr. J.* **2009**, *56*, 699–706.
- (34) Naka, T.; Kaneto, H.; Katakami, N.; Matsuoka, T.; Harada, A.; Yamasaki, Y.; Matsuhisa, M.; Shimomura, I. *Endocr. J.* **2013**, *60*, 393–396.
- (35) Kazi, T. G.; Afridi, H. I.; Kazi, N.; Jamali, M. K.; Arain, M. B.; Jalbani, N.; Kandhro, G. A. *Biol. Trace Elem. Res.* **2008**, *122*, 1–18.
- (36) Janciauskiene, S.; Ahren, B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *267*, 619–625.
- (37) Ma, L.; Li, X.; Wang, Y.; Zheng, W.; Chen, T. *J. Inorg. Biochem.* **2014**, *140*, 143–152.
- (38) Masad, A.; Hayes, L.; Tabner, B. J.; Turnbull, S.; Cooper, L. J.; Fullwood, N. J.; German, M. J.; Kametani, F.; El-Agnaf, O. M.; Allsop, D. *FEBS Lett.* **2007**, *581*, 3489–3493.
- (39) Yu, Y.-P.; Lei, P.; Hu, J.; Wu, W.-H.; Zhao, Y.-F.; Li, Y.-M. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 6909–6911.
- (40) Lee, E. C.; Ha, E.; Singh, S.; Legesse, L.; Ahmad, S.; Karnaukhova, E.; Donaldson, R. P.; Jeremic, A. M. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 12558–12571.
- (41) Bellia, F.; Grasso, G. *J. Mass Spectrom.* **2014**, *49*, 274–279.
- (42) Exley, C.; Mold, M.; Shardlow, E.; Shuker, B.; Ikpe, B.; Wu, L.; Fraser, P. E. *J. Diabetes Res. Clin. Metab.* **2012**, *1*, 1–6.
- (43) Mirhashemi, S. M.; Shahabaddin, M.-E. *Pak. J. Biol. Sci.* **2011**, *14*, 288–292.
- (44) Ward, B.; Walker, K.; Exley, C. *J. Inorg. Biochem.* **2008**, *102*, 371–375.
- (45) Sinopoli, A.; Magri, A.; Milardi, D.; Pappalardo, M.; Pucci, P.; Flagiello, A.; Titman, J. J.; Nicoletti, V. G.; Caruso, G.; Pappalardo, G.; Grasso, G. *Metallomics* **2014**, *6*, 1841–1852.
- (46) Sigel, H.; Martin, R. B. *Chem. Rev.* **1982**, *82*, 385–426.
- (47) Kállay, C.; Dávid, A.; Timári, S.; Nagy, E. M.; Sanna, D.; Garribba, E.; Micera, G.; De Bona, P.; Pappalardo, G.; Rizzarelli, E.; Sóvágó, I. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2011**, *40*, 9711–9721.
- (48) Rivillas-Acevedo, L.; Grande-Aztatzi, R.; Lomelí, I.; García, J. E.; Barrios, E.; Teloxa, S.; Vela, A.; Quintanar, L. *Inorg. Chem.* **2011**, *50*, 1956–1972.
- (49) Daniele, P. G.; Prenesti, E.; Ostacoli, G. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1996**, 3269–3275.
- (50) Peisach, J.; Blumberg, W. E. *Arch. Biochem. Biophys.* **1974**, *165*, 691–708.
- (51) Alexandrescu, A. T. *PLoS One* **2013**, *8*, 1–8.
- (52) Clore, G. M.; Iwahara, J. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 4108–4139.
- (53) Quintanar, L.; Rivillas-Acevedo, L.; Grande-Aztatzi, R.; Gomez-Castro, C. Z.; Arcos-Lopez, T.; Vela, A. *Coord. Chem. Rev.* **2013**, *257*, 429–444.
- (54) Bedrood, S.; Li, Y.; Isas, J. M.; Hegde, B. G.; Baxa, U.; Haworth, I. S.; Langen, R. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 5235–5241.
- (55) Wiltzius, J. J. W.; Sievers, S. A.; Sawaya, M. R.; Cascio, D.; Popov, D.; Riek, C.; Eisenberg, D. *Protein Sci.* **2008**, *17*, 1467–1474.
- (56) Cao, P.; Abedini, A.; Raleigh, D. P. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2013**, *23*, 82–89.
- (57) He, L.; Wang, X.; Zhao, C.; Wang, H.; Du, W. *Metallomics* **2013**, *5*, 1599–1603.
- (58) Kemtemourian, L.; Domenech, E.; Doux, J. P. F.; Koorengel, M. C.; Killian, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 15598–15604.

Biophysical and morphological studies on the dual interaction of non-octarepeat prion protein peptides with copper and nucleic acids

Juliana A. P. Chaves · Carolina Sanchez-López · Mariana P. B. Gomes ·
Tháyna Sisnande · Bruno Macedo · Vanessa End de Oliveira · Carolina A. C. Braga ·
Luciana P. Rangel · Jerson L. Silva · Liliana Quintanar · Yraima Cordeiro

Received: 16 November 2013 / Accepted: 28 January 2014 / Published online: 21 February 2014
© SBIC 2014

Abstract Conversion of prion protein (PrP) to an altered conformer, the scrapie PrP (PrP^{Sc}), is a critical step in the development of transmissible spongiform encephalopathies. Both Cu(II) and nucleic acid molecules have been implicated in this conversion. Full-length PrP can bind up to six copper ions; four Cu(II) binding sites are located in the octarepeat domain (residues 60–91), and His-96 and His-111 coordinate two additional copper ions. Experimental evidence shows that PrP binds different molecules, resulting in diverse cellular signaling events. However, there is little information

about the interaction of macromolecular ligands with Cu(II)-bound PrP. Both RNA and DNA sequences can bind PrP, and this interaction results in reciprocal conformational changes. Here, we investigated the interaction of Cu(II) and nucleic acids with amyloidogenic non-octarepeat PrP peptide models (comprising human PrP residues 106–126 and hamster PrP residues 109–149) that retain His-111 as the copper-anchoring residue. The effect of Cu(II) and DNA or RNA sequences in the aggregation, conformation, and toxicity of PrP domains was investigated at low and neutral pH. Circular dichroism and EPR spectroscopy data indicate that interaction of the PrP peptides with Cu(II) and DNA occurs at pH 7. This dual interaction induces conformational changes in the peptides, modulating their aggregation, and affecting the morphology of the aggregated species, resulting in different cytotoxic effects. These results provide new insights into the role of Cu(II) and nucleic acid sequences in the structural conversion and aggregation of PrP, which are both critical events related to prion pathogenesis.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00775-014-1115-8) contains supplementary material, which is available to authorized users.

J. A. P. Chaves · M. P. B. Gomes · T. Sisnande · B. Macedo ·
Y. Cordeiro (✉)
Faculdade de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde,
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Av. Carlos Chagas
Filho 373, Bloco B, Subsolo, Sala 17, Rio de Janeiro,
RJ 21941-902, Brazil
e-mail: yraima@pharma.ufrj.br

C. Sanchez-López · L. Quintanar
Departamento de Química, Centro de Investigación y de
Estudios Avanzados, 07360 Mexico, D.F., Mexico

V. E. de Oliveira
Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal
Fluminense, Campus Universitário de Rio das Ostras,
Rio das Ostras, RJ 28890-000, Brazil

C. A. C. Braga · L. P. Rangel · J. L. Silva
Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de
Janeiro, Rio de Janeiro, RJ 21941-590, Brazil

J. L. Silva · Y. Cordeiro
Instituto Nacional de Biologia Estrutural e Bioimagem,
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
Rio de Janeiro 21941-590, RJ, Brazil

Keywords Copper · Prion protein · Nucleic acid · EPR ·
Toxicity · Spectroscopy

Abbreviations

CD	Circular dichroism
dsDNA	Double-stranded DNA
EPR	Electron paramagnetic resonance
LS	Light scattering
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)ethanesulfonic acid
PBS	Phosphate-buffered saline
PrP	Prion protein
PrP ^C	Cellular prion protein
PrP ^{Sc}	Scrapie prion protein
rPrP	Recombinant prion protein
TEM	Transmission electron microscopy

Introduction

A misfolded form of the prion protein (PrP), the scrapie PrP (PrP^{Sc}), is implicated in the occurrence of the neurodegenerative diseases called transmissible spongiform encephalopathies (TSEs). Although the cellular PrP (PrP^C) is innocuous to animals, PrP^{Sc} is infectious and is found aggregated in the central nervous system [1]. A specific function has not been yet attributed to PrP^C, but it may participate in neuronal development, cell adhesion, apoptotic events, and cellular signaling in the central nervous system [2]. Most importantly, PrP binds copper ions *in vivo* [3, 4], and it is proposed that this protein regulates copper homeostasis [5, 6].

Mature PrP has a flexible N-terminal domain (residues 23–125) and a globular C-terminal domain (residues 128–231) [7]. Spectroscopic studies have revealed that PrP has six copper binding sites in its N-terminal region [6]. Four copper binding sites are located in the octarepeat domain (comprising residues 60–91 of the full-length PrP) [4, 6], and two histidine residues outside the octarepeat, His-96 and His-111, are the anchoring residues for two additional copper ions [8–10]. Although much is known about the copper-binding properties of PrP, there is little information about the interaction of copper with PrP when the protein is bound to other cellular ligands.

Several macromolecular ligands have been described to bind PrP and trigger both its aggregation and its conversion into β -sheet-rich species; these ligands include nucleic acid molecules, both DNA and RNA sequences [11–16]. Moreover, binding of nucleic acids by PrP results in conformational changes in either the protein or the nucleic acid molecule, or both [16, 17]. Abnormal protein interactions with nucleic acids have also been described in other neurodegenerative diseases. The knowledge that PrP binds copper ions *in vivo* [3] raises the question of how interactions with nucleic acids occur with copper-loaded PrP.

The present work aims to evaluate the effects of copper and nucleic acid sequences in the aggregation profile, conformation, and cytotoxicity of non-octarepeat PrP domains at low and neutral pH. It is well known that both ligands independently interact with PrP [6, 18, 19]; however, evaluation of binding of nucleic acids to copper-loaded PrP and vice versa has not been reported. We investigated the interaction of Cu(II) with two peptides corresponding to the non-octarepeat PrP regions, human PrP^{106–126} and hamster PrP^{109–149}, comprising residues 106–126 and 109–149 of mammalian PrPs, respectively. These peptides were chosen as models, as they aggregate at different pH values, possess only one copper binding site, and have been reported to bind nucleic acids. Therefore, they are simpler models (in comparison with full-length

PrP) to initially investigate the interaction of PrP with two different ligands (copper and nucleic acids). PrP^{106–126} aggregates at neutral pH, and it is highly neurotoxic in its aggregated form [20, 21]. Aggregation of PrP^{106–126} can be modulated by divalent cations such as copper and zinc ions, and His-111 might participate in these interactions [22–25]. PrP^{109–149} encompasses a loop and part of the first α -helix of the native full-length PrP [26, 27], and it immediately aggregates when diluted in aqueous solution at low pH, which makes it a good model for screening anti-aggregating compounds [12, 28, 29]. Both PrP peptides bind DNA molecules with high affinity. Whereas PrP^{106–126} forms amyloid-like structures when bound to plasmid or synthetic double-stranded DNA (dsDNA) [30, 31], small dsDNA molecules inhibit aggregation of PrP^{109–149} at pH 5.0 [12].

We have characterized copper binding by these peptides at a range of pH values using spectroscopic techniques, including electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy, circular dichroism (CD) spectroscopy, and light scattering (LS) measurements. We selected oligonucleotide sequences (DNA and RNA) previously characterized by our group as ligands of either recombinant full-length PrP or PrP^{109–149} [12, 32–34] to provide further insight into how the structural conversion mediated by nucleic acids occurs in a copper-bound form of the protein. Aggregation and conformational changes of PrP^{109–149} and PrP^{106–126} were monitored in the presence of both ligands, copper and nucleic acids, by spectroscopic techniques and microscopy. Additionally, cell viability assays provided information regarding the effect of nucleic acids and Cu(II) on PrP^{106–126} cytotoxicity toward mammalian cells, since this peptide is highly neurotoxic when aggregated at neutral pH [20].

Materials and methods

Materials

All reagents were of analytical grade and were acquired from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) unless otherwise specified. Oligonucleotides were purchased as single strands from Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, USA) and were annealed under high-stringency conditions [10 mM tris(hydroxymethyl)aminomethane buffer, 250 mM NaCl, pH 7.2]. Annealing was confirmed by polyacrylamide gel electrophoresis. The following sequences were investigated (only 5′–3′ consensus strands are shown): D44 (5′-GTA ACC GAA ATC GGT TGA-3′) and D67 (5′-AAA GGA CGC GCG CGC GCG TTA-3′). R67 is the single-stranded RNA sequence corresponding to D67 [34]. Spectroscopic characterization of Cu(II) binding

to annealed DNA was performed at 0.2 mM concentration in 5 mM *N*-ethylmorpholine buffer containing 250 mM NaCl.

Peptides

The PrP^{106–126} peptide, with sequence 106-KTNMKHMA GAAAGAVVGGLG-126, (theoretical pI, 10.0; molecular mass, 1,912.2 Da; hydrophobicity, 52 %) was synthesized in the solid phase using 9-fluorenylmethoxycarbonyl chemistry, and was purified by reversed-phase high-performance liquid chromatography to greater than 90 % purity. The PrP^{109–149} peptide, with sequence 109-MKHMAGAAAAGAVVGGLGGWMLGMSRPM MHFGNDWEDRY-149 (theoretical pI, 6.7; molecular mass, 4,326 Da; hydrophobicity, 51 %), was synthesized in the solid phase, and was purified by reversed-phase high-performance liquid chromatography by GeneMed Synthesis (San Antonio, TX, USA) to greater than 90 % purity. Both peptides were *N*-acetylated and *C*-amidated to prevent nonspecific coordination to Cu(II). Alignment of residues 106–149 (comprising both peptides studied here) from mouse, hamster, and human PrP evidences the high homology found in this region (Fig. S1). Stock solutions of PrP^{106–126} were prepared at 1 mM in 100 % dimethyl sulfoxide. For spectroscopic measurements, PrP^{106–126} was diluted in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4 to a final concentration of 20 μ M. For the aggregation measurements, PrP^{109–149} was diluted from an unfolded condition (in 6 M urea containing 10 mM sodium dodecyl sulfate) in 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) buffer at pH 5.0 without denaturants. For investigation of Cu(II) binding to the peptides by CD and EPR spectroscopy, PrP^{109–149} was dissolved at 0.2 mM in 6 M urea and PrP^{106–126} was dissolved at 0.3 mM in 10 mM *N*-ethylmorpholine buffer containing 100 mM NaCl.

Circular dichroism spectroscopy

CD spectra were collected using a J-815 spectropolarimeter (JASCO, Tokyo, Japan). Spectra were collected with adequate subtraction of the baseline spectrum with three scans each. CD spectra were collected from 230 to 830 nm using a quartz cuvette with 1-cm path length to study metal ion binding.

Electron paramagnetic resonance spectroscopy

X-band EPR spectra were collected using a Bruker EMX Plus system with an ER 041 XG microwave bridge and an ER 4102ST cavity. The following conditions were used: microwave frequency, 9.4 GHz; microwave power, 10 mW; modulation amplitude, 5 G; modulation frequency,

100 kHz; time constant, 327 ms; conversion time, 82 ms; and averaging over six scans. EPR spectra were recorded at 150 K using an ER4131VT variable-temperature nitrogen system.

Light scattering measurements

Static LS was recorded with an FP6300 spectrofluorimeter (JASCO, Tokyo, Japan). The LS was measured at 90° by illuminating samples at 320 nm or 450 nm and collecting the resulting scattered light either from 300 to 340 nm or from 430 to 470 nm, respectively.

Turbidity assay

Aggregation of unbound PrP^{106–126} or PrP^{106–126} in the presence of Cu(II) and/or D67 (molar ratios 1:1; 1:1:1) in PBS at pH 7.4 was monitored by spectrophotometry by acquiring absorbance values at 400 nm for up to 21 days.

Transmission electron microscopy

Samples were diluted in MES buffer (50 mM, pH 5.0) for PrP^{109–149} (freshly aggregated) or in PBS (pH 7.4) for PrP^{106–126} (aggregated for 21 days). Twenty microliters of each sample was applied to a carbon-coated copper grid, and after 5 min the grid was washed with Milli-Q water. Samples were stained with 2 % uranyl acetate, and images were collected with a JEOL (Boston, MA, USA) 1200 microscope at 80 kV.

Raman spectroscopy

Fourier transform Raman spectroscopy measurements were performed using a Bruker RFS 100 instrument and a neodymium-doped yttrium aluminum garnet laser, operating at 1,064 nm in the near-infrared with a charge-coupled device detector cooled with liquid nitrogen. Good signal-to-noise ratios were obtained with 1,000–2,000 total scans using a range of laser powers on the sample, from 100 to 300 mW, and a spectral resolution of 4 cm^{-1} . To prevent peptide degradation, spectra were obtained initially at the lowest laser power in this range, and this power was then progressively increased to produce an improved spectral response. The measurements were obtained with the PrP^{109–149} samples at 1 mM incubated with either Cu(II) or D67 (1:1 molar ratio) in sealed Duran® tubes; all spectra were obtained in situ with at least two acquisitions at each sampling position, demonstrating the reproducibility and consistency of data acquisition as well as ensuring sample integrity. The signal of the buffer (10 mM MES, pH 5.0) was subtracted from the respective spectra using the GRAMS® spectroscopy software suite program.

Murine neuroblastoma cell (Neuro-2a) cell viability assay

Neuro-2a cell culture and the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) reduction assay were performed as described previously [34]. Briefly, cells were incubated with free PrP^{106–126}, DNA, or Cu(II), or with the peptide combined with DNA, Cu(II), or both (fresh samples or after 7, 14, or 21 days' incubation). After 72 h, formazan was quantified by reading the optical density at 570 nm in a 96-well plate reader (Spectramax M5, Molecular Devices). Mean values and standard deviations were calculated from triplicates of independent experiments.

Statistics

Statistical analyses were performed using the programs SigmaPlot (version 10.0) or GraphPad Prism. One-way analysis of variance Tukey tests were applied to determine significant differences between the individual treatments. Unless otherwise specified, all experiments were performed in triplicate and the error bars indicate the standard error of the mean.

Results

Spectroscopic investigation of Cu(II) binding to peptides PrP^{106–126} and PrP^{109–149}

We initially investigated Cu(II) binding by PrP^{109–149}, using CD and EPR spectroscopy, and compared it with the Cu(II) binding properties of PrP^{106–126}. Titration of PrP^{109–149} with Cu(II) at pH 7.5 followed by CD spectroscopy clearly indicated that PrP^{109–149} binds Cu(II) in a 1:1 molar ratio (Fig. 1a), in a fashion similar to that of the shorter fragments PrP^{106–115} and PrP^{106–126}, which do not contain His-140 [10] (Fig. S2a). However, a comparison of the CD spectra of the Cu(II) complexes with PrP^{109–149} and PrP^{106–126} at pH 7.5 reveals some differences (Fig. 1b) that can be ascribed to the fact that the two complexes display different pK_a values. Cu(II) binding to His-111 in PrP^{106–115} and PrP^{106–126} is pH-dependent, with a pK_a of 7.5 that is ascribed to the backbone amide of Met-109 (Fig. S2b); consequently, a mixture of two species with different coordination modes (3N1O and 4N) is observed at pH 7.5 [10]. In contrast, the CD spectrum of the Cu(II) complex with PrP^{109–149} shows no significant changes between pH 8.5 and 6.5 (Fig. 1c). This is because truncation of the first three amino acid residues in the N-terminal causes an increase in the pK_a of the amide of Met-109 to yield a pK_a of 8.9, as shown for the PrP^{109–112} fragment (Fig. S2c).

Consistently, the CD spectra of the Cu(II) complexes with PrP^{109–149} and PrP^{106–126} are identical at pH 6.5 (Fig. 1d). In both spectra, ligand-to-metal charge transfer transitions can be resolved at 31,000 and 39,400 cm⁻¹, which are indicative of amide and imidazole coordination to Cu(II) [35–37].

X-band EPR spectroscopy shows that Cu(II) bound to PrP^{106–126} and PrP^{109–149} at all pH values investigated displays $g_{\parallel} > g_{\infty} > 2.00$ and a large parallel copper hyperfine splitting (A_{\parallel}), indicative of a $d_{x^2-y^2}$ ground state (Fig. 2). Consistent with the CD data, the EPR spectra of the Cu(II)–PrP^{109–149} complex at pH 8.5 and 7.5 are practically identical (Fig. S3), with $g_{\parallel} = 2.225$ and $A_{\parallel} = 177 \times 10^{-4}$ cm⁻¹; these values fall in a range associated with a 3N1O equatorial coordination mode, according to Peisach–Blumberg correlations (Fig. S4) [38, 39]. A comparison of the EPR spectra for the Cu(II) complexes with PrP^{109–149} and PrP^{106–126} at pH 7.5 shows similar EPR signals and parameters (Table 1, Fig. 2, spectra a), with the preponderant species being a 3N1O complex; some differences are evident in the perpendicular region of the spectra, indicative of the presence of 4N species for the Cu(II)–PrP^{106–126} complex, as discussed above. Overall, considering the fact that PrP^{106–126} lacks His-140, our CD and EPR results suggest that His-111 is the anchoring Cu(II) binding site in PrP^{109–149}, whereas His-140 does not take part in the metal ion coordination at pH 7.5.

A different scenario is observed at pH 5.5, where no CD signals could be associated with the formation of a chiral Cu(II)–peptide complex for both PrP^{109–149} and PrP^{106–126} (Fig. 1d). However, the EPR spectra of these peptides in the presence of 1Eq Cu(II) at pH 5.5 display signals that are different from those for free Cu(II) in solution (Fig. 2, spectra b), indicating the formation of distinct Cu(II)–peptide complexes. The Cu(II)–PrP^{106–126} complex displays $g_{\parallel} = 2.290$ and $A_{\parallel} = 160 \times 10^{-4}$ cm⁻¹ (Fig. 2, Table 1), which fall close to the values associated with a 2N2O equatorial coordination mode (Fig. S4). In contrast, the Cu(II)–PrP^{109–149} complex displays $g_{\parallel} = 2.343$ and $A_{\parallel} = 159 \times 10^{-4}$ cm⁻¹ (Fig. 2, Table 1), indicative of a 4O equatorial coordination mode (Fig. S4). The EPR parameters associated with this species are remarkably similar to those associated with Cu(II) bound to murine PrP^{121–231} at low pH (3–6), where a 4O coordination environment that does not involve any histidine coordination was assigned, as determined by pulsed EPR spectroscopy [11, 40]. Thus, the low pH and oxygen-rich Cu(II) coordination mode observed in PrP^{109–149} could involve carboxylic acids from the C-terminal region (potentially Asp-144 and Asp-147 or Glu-146) and/or water molecules, and it does not involve histidine coordination.

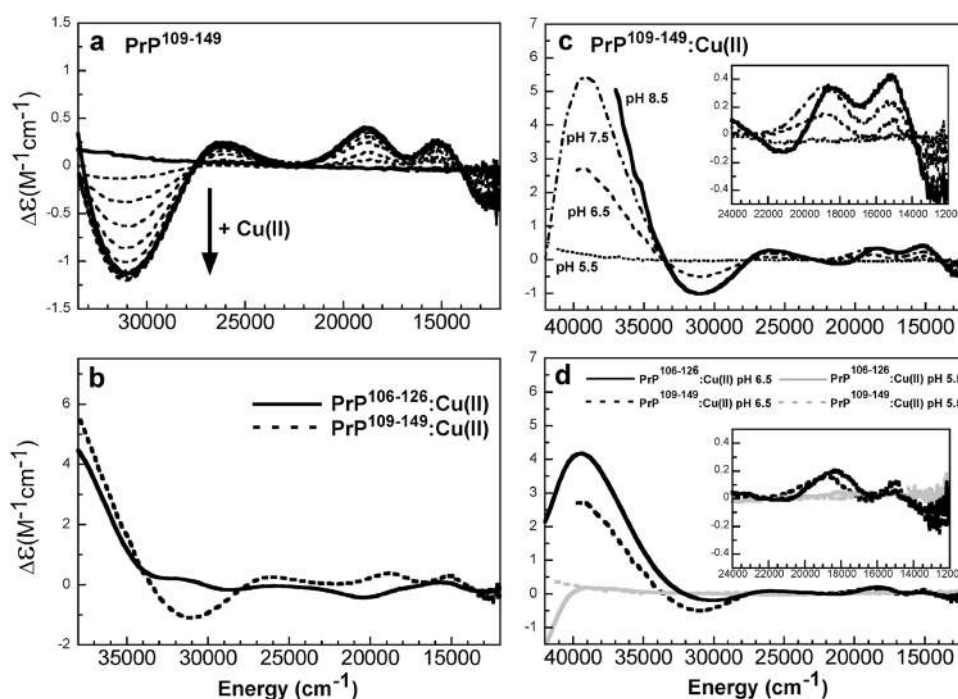


Fig. 1 Circular dichroism (CD) measurements reveal Cu(II) binding to prion protein (PrP) peptides comprising residues 106–126 (PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶) and 109–149 (PrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹) at different pH values. **a** Titration of PrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹ with Cu(II), as followed by CD spectroscopy at pH 7.5. The CD spectra recorded after the addition of 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.2, 1.4, 1.6, and 1.8 Eq of Cu(II) are displayed as *dashed lines*, whereas those for 1.0 and 2.0 Eq of Cu(II) are shown as *solid lines*. **b** CD spectra of Cu(II) bound to PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ at pH 7.5 (*solid line*), compared with the Cu(II) complex with PrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹ (*dashed line*).

c CD spectra of the Cu(II)–PrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹ complex with 1 Eq of Cu(II) at different pH values: 5.5 (*dotted line*), 6.5 (*dashed line*), 7.5 (*dash-dot-dash line*), and 8.5 (*solid line*). **d** CD spectra of Cu(II) bound to PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ at pH 6.5 (*solid black line*) and pH 5.5 (*solid gray line*), compared with the Cu(II) complex with PrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹ at pH 6.5 (*dashed black line*) and pH 5.5 (*dashed gray line*). The insets in **c** and **d** show the energy region (14,000–22,000 cm⁻¹) where the ligand field transitions appear

Spectroscopic investigation of Cu(II) and DNA binding to PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ and PrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹

We next asked if DNA-bound Cu(II) would still display peptide binding properties. We used 18-mer and 21-mer dsDNA sequences (D44 and D67), previously identified to interact with recombinant PrP (rPrP) and to induce its aggregation into cytotoxic species [12, 34]. EPR experiments showed that at pH 7.5, a Cu(II)–DNA complex is formed, with g_{\parallel} and A_{\parallel} values that are indicative of a nitrogen-rich coordination environment (Table 1); copper–nitrogen superhyperfine interactions are evidenced by the fine structure in the perpendicular region of the spectrum (Fig. 2, spectra a). In contrast, at pH 5.5, a different Cu(II)–DNA complex is formed, with g_{\parallel} and A_{\parallel} values that are associated with a less nitrogen-rich coordination environment, likely 4O or 1N3O (Table 1, Fig. S4).

At pH 7.5, addition of PrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹ to the Cu(II)–DNA complex to reach a final 1:1:1 molar ratio caused drastic changes in the EPR spectrum, resulting in a new set of signals with $g_{\parallel} = 2.299$ and $A_{\parallel} = 156 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ that do not correspond to those associated with the Cu(II)–DNA or Cu(II)–PrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹ complexes (Fig. 2, spectra a,

Table 1). These signals are also different from those that arise from free Cu(II) in solution, strongly suggesting the formation of a Cu(II)–DNA–PrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹ ternary complex at pH 7.5. A similar scenario is observed on addition of PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ to Cu(II)–DNA, where a new set of signals with $g_{\parallel} = 2.309$ and $A_{\parallel} = 140 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ arise (Fig. 2, spectra a, Table 1), suggesting the formation of a Cu(II)–DNA–PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ ternary complex. It should be noted, however, that residual signals associated with the Cu(II)–PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ complex are also observed (Fig. 2, spectra a), revealing a lower relative stability of the Cu(II)–DNA–PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ ternary complex with respect to the Cu(II)–peptide complex. This is probably because the latter presents two species (vide supra), 3N1O and 4N, where the 4N coordination mode provides higher stability to the Cu(II)–peptide complex, and thus competes with DNA binding. Consistently, the EPR parameters associated with the residual Cu(II)–PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ complex in the Cu(II)–DNA–PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ mixture correspond to the characteristic signals of the 4N coordination mode (with $g_{\parallel} = 2.225$ and $A_{\parallel} = 189 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$).

At pH 5.5, addition of PrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹ to the Cu(II)–DNA complex to reach a final 1:1:1 molar ratio also caused

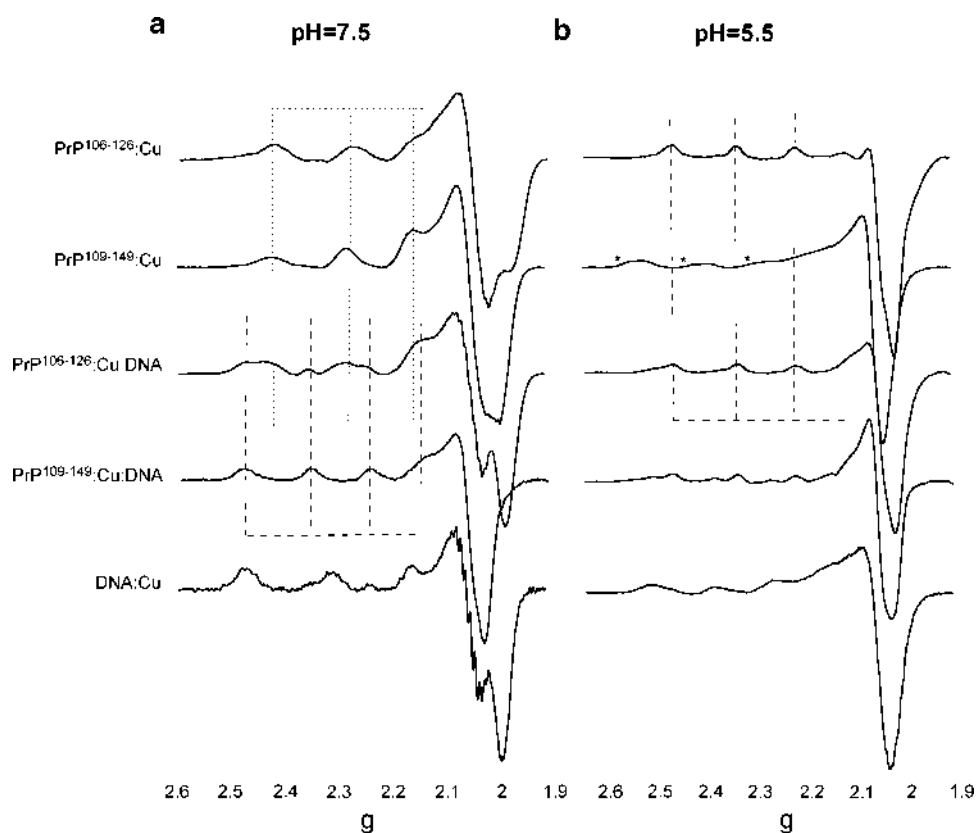


Fig. 2 Cu(II) binds to PrP^{106–126}, PrP^{109–149}, and DNA, forming a Cu(II)–DNA–peptide ternary complex, as revealed by electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy. Comparison of EPR spectra of 1 Eq Cu(II) with PrP^{106–126}, PrP^{109–149}, DNA and

PrP^{106–126}, DNA and PrP^{109–149}, and DNA at pH 7.5 (a) and pH 5.5 (b). The signals associated with free Cu(II) in solution are indicated with an *asterisk*

Table 1 Electron paramagnetic resonance parameters for Cu(II)–DNA, Cu(II)–peptide, and ternary complexes at pH 7.5 and 5.5

	pH 7.5			pH 5.5		
	g_{\parallel}	A_{\parallel}		g_{\parallel}	A_{\parallel}	
		10^{-4} cm^{-1}	MHz		10^{-4} cm^{-1}	MHz
Cu(II)–PrP ^{106–126}	2.222	176	529	2.290	160	481
Cu(II)–PrP ^{109–149}	2.225	177	530	2.343	159	479
Cu(II)–DNA–PrP ^{106–126}	2.309	140	421	2.290	160	481
Cu(II)–DNA–PrP ^{109–149}	2.299	156	467	2.292	156	469
Cu(II)–DNA	2.241	201	603	2.335	153	458

The g_{\parallel} and A_{\parallel} values in *bold* can be assigned to the ternary complexes PrP prion protein

drastic changes in the EPR spectrum, resulting in signals with $g_{\parallel} = 2.292$ and $A_{\parallel} = 156 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ that can be associated with the formation of a ternary complex, as they do not correspond to those for Cu(II)–DNA or Cu(II)–peptide complexes (Fig. 2, spectra b, Table 1); a small amount of residual signals for the Cu(II)–DNA complex is also observed. In contrast, the most intense set of EPR signals in the spectrum of the Cu(II)–DNA–PrP^{106–126} mixture corresponds to the Cu(II)–PrP^{106–126} complex

(Fig. 2, spectra b, Table 1), whereas a small amount of the Cu(II)–DNA complex is also observed. These results clearly indicate that at low pH only PrP^{109–149} is capable of forming a ternary complex with Cu(II) and DNA, and there was no evidence for the formation of a ternary complex with PrP^{106–126}.

It should be noted that the EPR parameters for the Cu(II)–DNA–PrP^{109–149} ternary complexes at pH 5.5 and 7.5 are almost identical (Table 1) and indicative of a 2N2O

coordination mode according to Peisach-Blumberg correlations (Fig. S4) [38, 39]. The fact that the ternary complex at low pH could be formed with PrP^{109–149} and not with PrP^{106–126} suggests that the C-terminal region of PrP^{109–149} is key for the formation of the ternary complex at low pH and/or it participates in the metal coordination shell. Moreover, the hyperfine splitting A_{\parallel} associated with the ternary complex with PrP^{106–126} at pH 7.5 is different from that of the PrP^{109–149} ternary complex, indicating differences in the nature of the ligands in each case, and thus suggesting that the C-terminal region of PrP^{109–149} may participate in the coordination of the ternary complex or contribute to its coordination properties.

Fourier transform Raman spectroscopy measurements were performed in situ to provide further evidence for the formation of the Cu(II)–DNA–PrP^{109–149} ternary complex at pH 5.0 (Fig. S5). Raman spectra were obtained for unbound peptide and the Cu(II)–PrP^{109–149} complex, both before and after the addition of 1 Eq dsDNA (D67) (Fig. S5). Analysis of the Raman spectra shows that the band at approximately 1,650 cm⁻¹, assigned to the $\nu(\text{CO})$ mode, becomes narrower (amide I) on addition of copper to PrP^{109–149}; the same behavior is observed for the bands at 1,450 and 1,159 cm⁻¹. This profile indicates an increased local symmetry related to a decrease in hydrogen bonding, which may be caused by copper coordination. On the addition of DNA, the band broadening is more evident, attributed to NH₂ and NH deformation modes [41]. The band at 716 cm⁻¹ was not observed after addition of Cu(II) and DNA; changes in this band are attributed to modifications in hydrogen interaction forces and the hydrophobic character derived from protein unfolding [42]. DNA backbone bands (approximately 830 and 1,093 cm⁻¹) [42] were not observed under the conditions applied. These data suggest that a ternary complex is formed at pH 5.0 and that metal coordination is affected by changes in the PrP^{109–149} structure caused by the formation of a ternary complex.

Altogether, these results provide strong evidence for the formation of ternary complexes of PrP^{109–149} and PrP^{106–126} with Cu(II) and DNA at neutral pH, whereas at low pH a ternary complex is only formed with PrP^{109–149}. Further spectroscopic investigation is needed to identify the nature of the coordinating ligands in these complexes.

Effect of Cu(II) and DNA on the aggregation properties of PrP peptides

PrP-derived peptides are alternative models to study and understand PrP aggregation [12, 29]. In the present study, we investigated aggregation of human PrP^{106–126} and hamster PrP^{109–149}. Although derived from different species, the peptides share the same amino acid sequence in the region 109–126 (Fig. S1). Our EPR and CD results

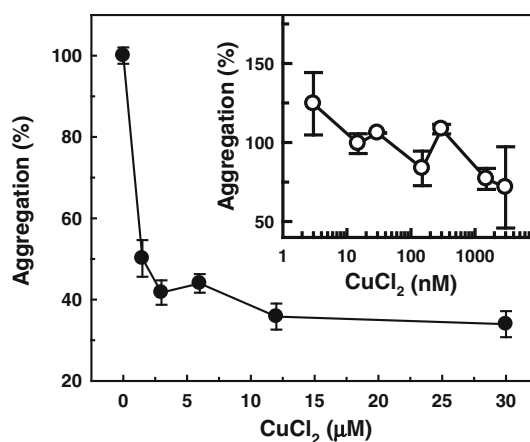


Fig. 3 Cu(II) inhibits PrP^{109–149} aggregation. The peptide was diluted to 3 μM in 50 mM 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) buffer at pH 5.0, and the light scattering (LS) value at 450 nm was followed over time. *Inset* aggregation was followed in the presence of CuCl₂ up to 3.0 μM. The maximum LS value obtained from each kinetic trace was corrected assuming 100 % as the LS value obtained in the absence of copper ions or urea and 0 % aggregation as the LS value obtained when the peptide was diluted in 6 M urea. *Error bars* indicate the standard error of the mean

strongly suggest that these PrP peptides interact with DNA and copper, forming a ternary complex. Thus, we evaluated whether these ligands would modulate aggregation of these PrP peptides.

PrP^{109–149} aggregates on dilution in aqueous solution at low pH [12, 29]; its aggregation at neutral pH is highly reduced. Addition of Cu(II) significantly inhibited the aggregation of PrP^{109–149} in a concentration-dependent manner at pH 5.0, as observed by static LS (Fig. 3). Other divalent ions, such as zinc, manganese, and magnesium ions, did not inhibit PrP^{109–149} aggregation significantly (Fig. S6a). Previous data with the rPrP also showed that Cu(II) inhibits amyloid fibril formation, whereas Mn(II) has no significant effect [43]. The inhibitory effect of CuCl₂ is due to specific Cu(II) binding, as the addition of the Cu(II) and Cu(I) chelators EDTA and 2,9-dimethyl-4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline [44] prevents the anti-aggregating effect of copper when added simultaneously with CuCl₂ in the solution. The addition of CuSO₄ leads to the same inhibitory profile as CuCl₂ (Fig. S6b).

Our LS data show that PrP^{109–149} aggregation is specifically inhibited by Cu(II) at pH 5.0 (Fig. 3). Although it has been shown that PrP domains lose their affinity for Cu(II) at pH < 6.0 [4, 10], our characterization of the interaction of PrP^{109–149} with Cu(II) by EPR spectroscopy (Fig. 2) strongly suggests that this PrP domain binds copper ions at these pH values.

We next verified how the Cu(II)–PrP^{109–149} complex would behave in the presence of nucleic acids. We asked whether both ligands—Cu(II) and DNA—would affect the PrP structure and aggregation, as these molecules are able

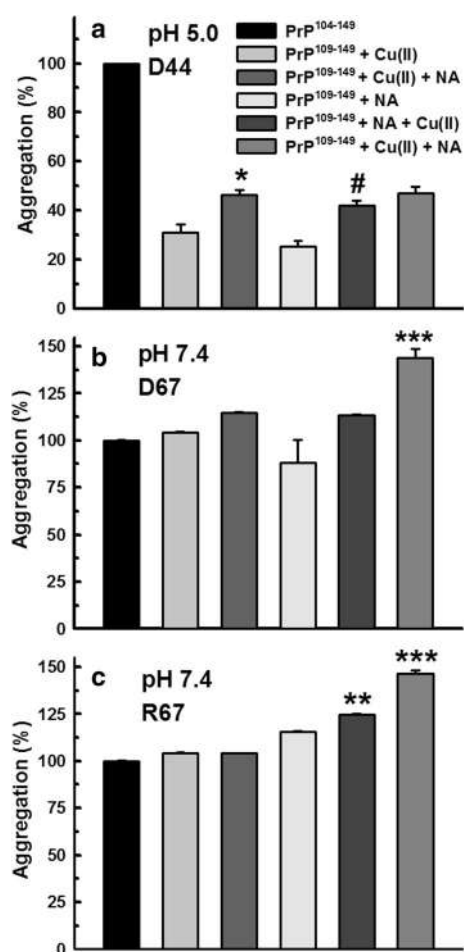


Fig. 4 Modulation of PrP^{109–149} aggregation at different pH values by Cu(II) and nucleic acids. Aggregation of PrP^{109–149} was followed by LS at 320 nm after dilution to a final concentration of 3 μ M at pH 5.0 (a) or pH 7.4 (b, c). LS values of free peptide, or in the presence of 1 Eq Cu(II), with D44 (a), D67 (b), or R67 (c) were monitored. a all conditions were significantly different from the control (black bar) ($P < 0.05$). * $P < 0.05$ compared with bar 2 (PrP^{109–149} + Cu(II)), # $P < 0.05$ compared with the bar 4 (PrP^{109–149} + NA). b only PrP^{109–149} plus previously incubated Cu(II) and D67 was different from the control. c bars 5 (PrP^{109–149} + NA + Cu(II)) and 6 (PrP^{109–149} + Cu(II) + NA) were significantly different from the control (bar 1, PrP^{109–149}). ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. The 100 % aggregation value relates to the maximum LS value obtained during PrP^{109–149} aggregation kinetics in the absence of ligands

to interact with PrP in the cellular environment [3, 45–47]. Aggregation of PrP^{109–149} in the presence of dsDNA sequences D44 and D67 and Cu(II) at a 1:1 ligand-to-peptide molar ratio was monitored by LS at pH 5.0 and 7.4 (Fig. 4). At pH 5.0, both Cu(II) and DNA (D44) were able to significantly inhibit PrP^{109–149} aggregation (Fig. 4, plot a). However, the extent of inhibition was lower when Cu(II) and DNA were present at the same time, regardless of the order in which they were added to the solution (Fig. 4, plot a, asterisk, number sign). This result can be explained by the fact that Cu(II) binds to DNA under these conditions. Our spectroscopic results have demonstrated

the formation of a Cu(II)–DNA–PrP^{109–149} ternary complex at low pH, and a small amount of the Cu(II)–DNA complex is also formed. The latter may reduce the availability of Cu(II) and DNA to bind PrP^{109–149} or it could be a Cu(II)–DNA complex with a lesser effect on peptide aggregation compared with the free forms of the ligands. Alternatively, at the copper-to-phosphate molar ratio used, DNA duplex stability induced by nonspecific Cu(II) binding [48, 49] could modify DNA interactions with PrP^{109–149}, thus leading to a different aggregation profile.

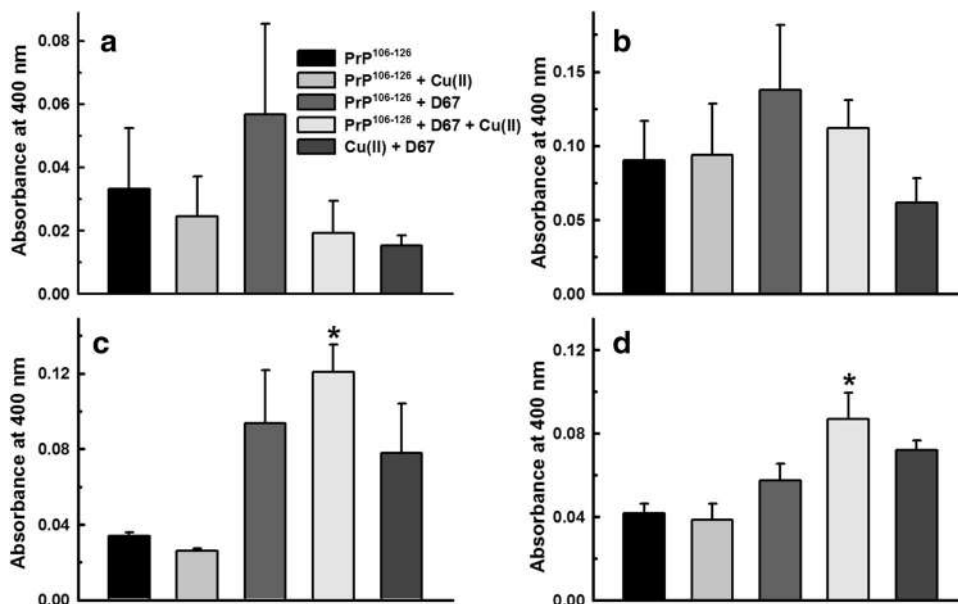
At pH 7.4, PrP^{109–149} aggregation was much less intense in comparison with that at pH 5.0 (Fig. S7). Incubation with either DNA (D67) or Cu(II) did not alter the original LS values (Fig. 4, plot b). The only significant effect seen at pH 7.4 was a small increase in aggregation when PrP^{109–149} was diluted in a solution containing Cu(II) and D67 (Fig. 4, plot b, three asterisks). There was no significant increase in LS values with control samples containing Cu(II) and D67 only (data not shown). These data suggest that the significant aggregation observed when PrP^{109–149} was incubated with the Cu(II)–D67 complex is not due to DNA aggregation induced by Cu(II).

RNA molecules can also modulate PrP aggregation. Incubation of PrP with RNA molecules led to misfolding and aggregation, generating species toxic to cultured Neuro-2a cells [14, 16]. Here we used a small synthetic RNA molecule, which corresponds to the D67 ribonucleic sequence, R67 [34], to modulate PrP^{109–149} aggregation in the presence of Cu(II) (Fig. 4, plot c). At neutral pH, R67 alone was not able to modulate PrP^{109–149} aggregation; however, with sequential addition of Cu(II), or when PrP^{109–149} was diluted in a solution containing Cu(II) and R67, aggregation was enhanced, as was observed for D67. It seems that complexes formed by nucleic acids (DNA and RNA) with Cu(II) are able to modulate (stimulating at neutral pH, and inhibiting at acidic pH) aggregation of this particular PrP domain.

Neurotoxic peptide PrP^{106–126} aggregates in solution at neutral pH [22]. We thus monitored PrP^{106–126} aggregation in the presence of Cu(II) and/or DNA for 21 days by turbidity assay at pH 7.4. PrP^{106–126} aggregation was significantly enhanced only by co-incubation with Cu(II) and D67 from the 14th day onwards (Fig. 5). High turbidity was observed for the D67 and Cu(II) solution on the 14th and 21st incubation days (Fig. 5, plots c, d). This result suggests that a DNA supramolecular structure may be formed under this condition. At low pH we did not observe PrP^{106–126} aggregation, and neither Cu(II) or DNA was capable of inducing peptide aggregation at pH 5 (data not shown), consistent with the fact that at this pH there is no evidence for the formation of a ternary complex.

Overall, our results indicate that the formation of a Cu(II)–DNA–peptide ternary complex at neutral pH induces aggregation of both PrP^{109–149} and PrP^{106–126}.

Fig. 5 Aggregation of PrP^{106–126} modulated by Cu(II) and/or DNA at pH 7.4. Aggregation of PrP^{106–126} in phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4) was monitored by turbidity at 400 nm for 21 days. The Cu(II)–DNA peptide molar ratio of was 1:1:1. *a* absorbance values on the first day, *b* absorbance values on the seventh day, *c* absorbance values on the 14th day, *d* absorbance values on the 21st day. Statistics: Bonferroni's multiple comparison test (**P* < 0.05)



Morphology of the aggregated species formed in the presence of Cu(II) and DNA determined by transmission electron microscopy

Transmission electron microscopy (TEM) analysis of peptides PrP^{109–149} and PrP^{106–126} in their aggregated forms or after incubation with Cu(II), DNA (D67), or both ligands together provided information about the morphology of the resultant species (Fig. 6). PrP^{109–149} aggregates formed at pH 5.0 are mainly amorphous (Fig. 6a), as previously reported [34]. In the presence of CuCl₂, a reduction in the size of these aggregates was observed (Fig. 6b). Either DNA only or DNA and Cu(II) together led to a reduction in aggregation (Fig. 6c, d), which is consistent with the LS data (Fig. 4). Notably, the presence of smaller oligomeric species (indicated by arrows in Fig. 6d) was observed when PrP^{109–149} was incubated with both copper and DNA.

The neurotoxic peptide PrP^{106–126} displayed a different morphology on interaction with Cu(II), DNA, or RNA after 21 days of incubation at pH 7.4 (Fig. 6e–j). Unbound PrP^{106–126} presented a fibrillar architecture on the 21st incubation day, as expected [22] (Fig. 6e). After incubation with either DNA (D67) (Fig. 6f) or RNA (R67) (Fig. 6g), the aggregation was reduced, and mainly amorphous aggregates were observed. In the presence of Cu(II) only, PrP^{106–126} seemed to be fragmented in a heterogeneous population, with aggregates of various sizes, as well as much less structured oligomeric species (Fig. 6h). Dual interaction with Cu(II) and nucleic acids (D67 or R67) seemed to increase peptide aggregation (Fig. 6i, j), as the oligomeric species were found occupying all the microscopy grid. However, one cannot rule out the presence of nucleic acid clusters induced by copper that might

contribute to the increased observed aggregation (Fig. 6i, j). These results show that the effects of Cu(II) and DNA sequences are different for PrP^{109–149} and PrP^{106–126}, which might be related to the different propensities for aggregation of each peptide, and to different interactions with Cu(II) and nucleic acids. For instance, the interaction of Cu(II) with residues from the C-terminal domain of PrP^{109–149} at low pH could stabilize this peptide, preventing its aggregation into higher molecular weight species.

Cellular viability evaluation of PrP^{106–126} complexes with Cu(II) and/or DNA

Cell viability assays were performed to provide insight into the toxicity of the Cu(II)–DNA–PrP^{106–126} complexes (Fig. 7). Only PrP^{106–126} was investigated for cell viability changes, as PrP^{109–149} is not cytotoxic when aggregated at pH 5.0 or 7.4 or in the presence of the ligands investigated (not shown). Our TEM analysis evidenced the presence of lower molecular weight species in the presence of DNA or RNA, in comparison with unbound aggregated PrP^{106–126} (Fig. 6f, g). However, Cu(II) and nucleic acid together increased peptide aggregation (Fig. 6i, j). It is proposed that oligomeric species, rather than mature fibrils, are the main toxic species in protein-aggregating diseases [50, 51]. Therefore, evaluation of the cytotoxicity of these different species is of value. We treated murine neuroblastoma cells (Neuro-2a) with free PrP^{106–126}, Cu(II)–PrP^{106–126}, DNA–PrP^{106–126}, and the three molecules combined (forming a ternary complex at pH 7.5), and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction was evaluated as described previously [34]. For PrP^{106–126} we observed that after 14 or 21 days of the aggregation

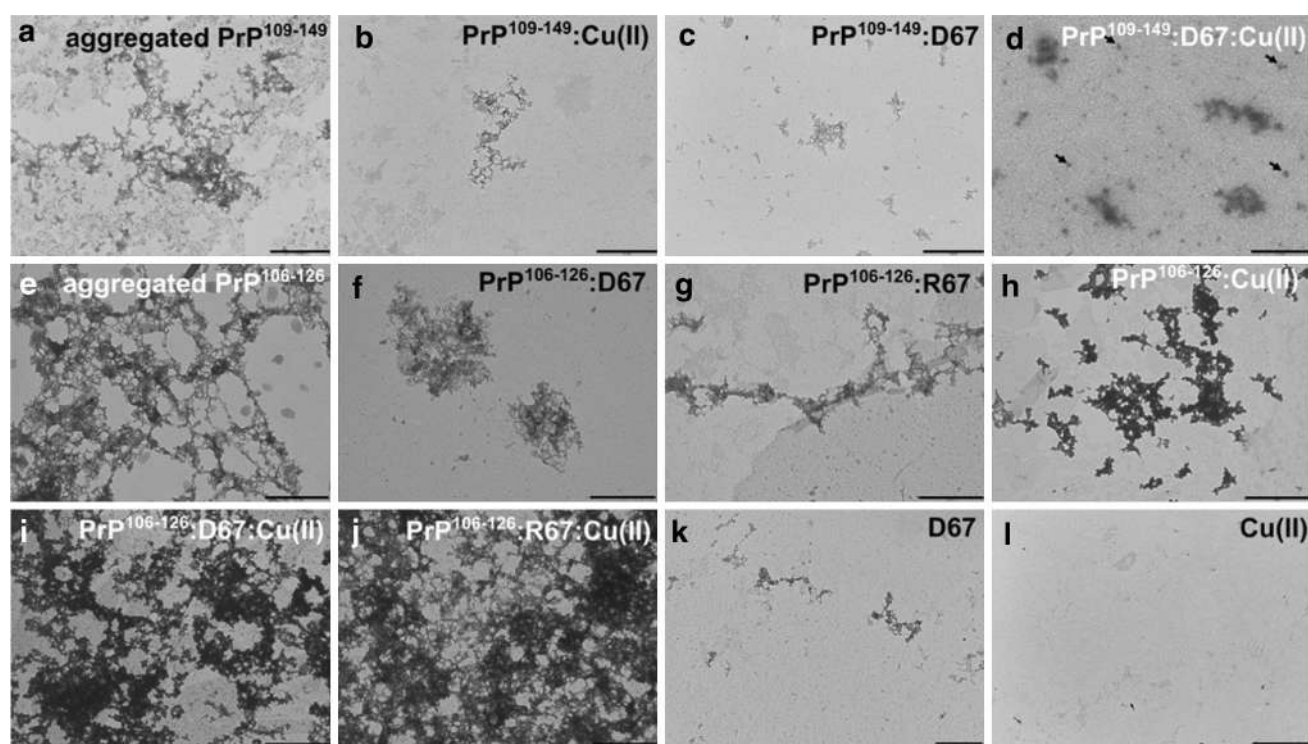


Fig. 6 Transmission electron microscopy analysis evidences different morphologies of the aggregated PrP peptides formed in the presence of Cu(II) and DNA. The PrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹ concentration was 10 μM (a–d) and the PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ concentration was 25 μM (e–j). Samples were prepared in MES buffer, pH 5.0 (a–d, k, l) or in PBS,

pH 7.4 (e–j). Peptides were incubated with either Cu(II) and/or nucleic acid (D67 or R67) at equimolar concentrations. In all cases, Cu(II) was provided as CuCl₂. Scale bars a 0.25 μm, b, d, f, h, i, k 1.0 μm, c, l 2.0 μm, e, g, j 0.5 μm

protocol, the aggregated species formed reduced the viability of Neuro-2a cells in culture (Fig. 7c, d). Incubation of the peptide with either D67 or R67 did not increase its cytotoxicity. However, when Cu(II) was added (in the presence or absence of nucleic acids), there was a significant reduction of cell viability for fresh aggregates and those incubated for up to 21 days (Fig. 7). Free Cu(II) and nucleic acids were not toxic to Neuro-2a cells at the concentrations investigated (not shown). These data indicate that interaction of PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ with Cu(II) causes cellular dysfunction, and that further binding to nucleic acids does not alter the cytotoxic properties of the Cu(II)–PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ complexes.

Discussion

In this work we evaluated the combined effect of copper ions and nucleic acids in the aggregation and conformation of PrP peptides comprising residues 106–126 and 109–149 (PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ and PrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹) at different pH values. Structural changes in PrP, mainly in the N-terminal domain and the beginning of helix 1 [52, 53], are fundamental steps in prion disease pathogenesis, and both Cu(II) and nucleic

acid molecules have been shown to induce rPrP conformational changes [4, 11, 12, 19, 54]. Moreover, Cu(II) can induce PrP^C cellular internalization [55], indicating that copper-loaded PrP is present in different cellular environments, with different proton concentrations. It was reported that copper binding through the N-terminal region of PrP, but outside the octarepeat domain, led to an interaction of the C-terminal region with the copper-bound N-terminus of this protein [54]. This result suggests possible allosteric events mediated by copper, implying that certain PrP domains are not available for interaction with other ligands on Cu(II) binding. This scenario would lead to modulation of PrP physiological functions and/or could be related to the pathogenesis of TSEs.

We initially investigated if PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ and PrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹ would coordinate Cu(II) at neutral and acidic pH. At pH 7.5, Cu(II) binding to PrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹ and PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ leads to complexes where His-111 is the main copper-anchoring residue, as described before [10], and His-140 does not take part in the coordination (Fig. 8). We found that Cu(II) binding at this site has no significant effect in peptide aggregation at neutral pH for both peptides (Figs. 4, 5). Previous studies reported that Cu(II) induces fibril formation by human PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ [22] at neutral pH. It is plausible

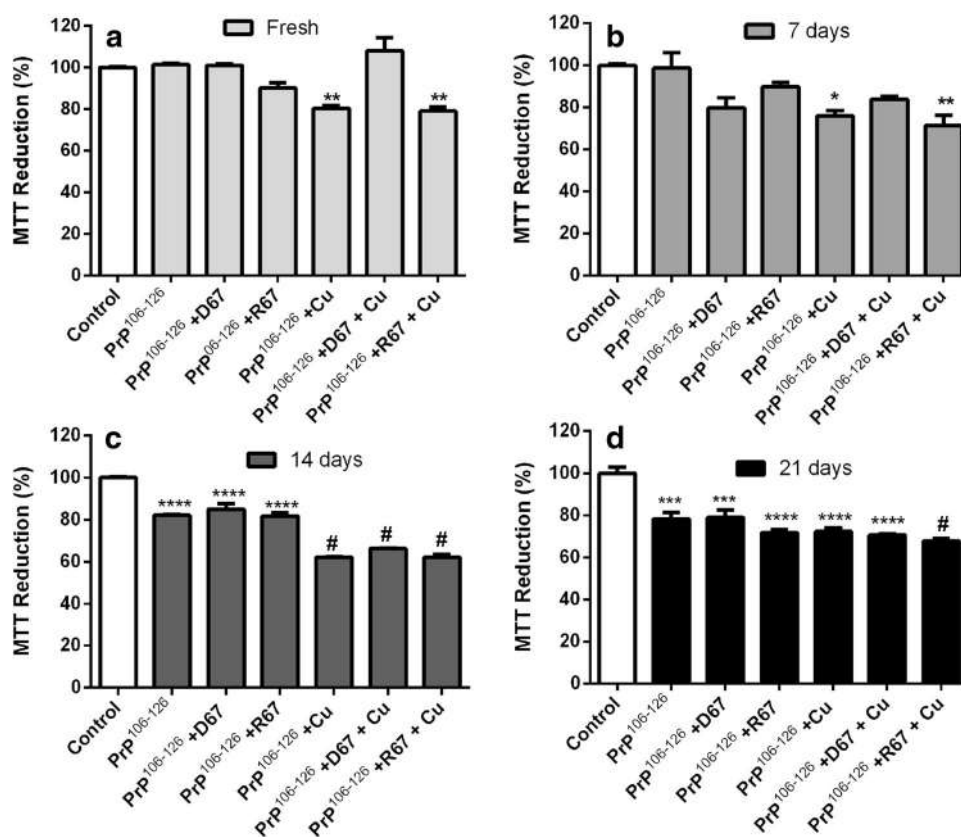


Fig. 7 Cu(II) binding increases the cytotoxicity of PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶. PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ at 25 μM was incubated with Cu(II), DNA, RNA, or both Cu(II) and nucleic acids in PBS, pH 7.4 at equimolar ratios. Fresh samples (a) or samples preincubated for 7 days (b), 14 days (c), and 21 days (d) were added at a final concentration of 5 μM to each well containing a monolayer of Neuro-2a cells. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction was evaluated

as described in “Materials and methods.” The data are expressed as the percentage of MTT reduction in relation to the control (cell medium). Error bars represent standard deviations of at least three independent measurements, each one in triplicate. Statistics in relation to the control bar: **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001, *****P* < 0.0001. Statistic in relation to free PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶: #*P* < 0.05

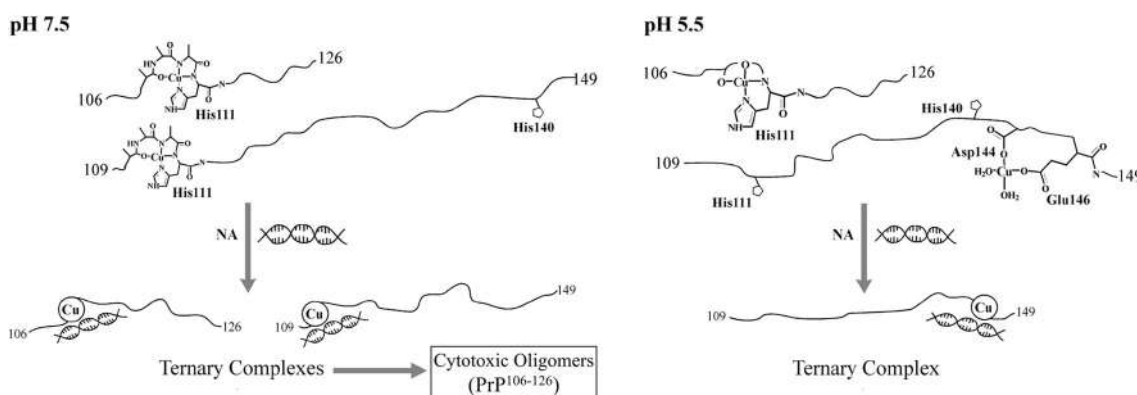


Fig. 8 The main effects caused by Cu(II) and DNA binding to the PrP peptides. *Left* binding of Cu(II) to PrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹ or PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ at pH 7.5. Addition of nucleic acid (NA) leads to the formation of ternary complexes [Cu(II)–NA–peptide]. Only oligomeric complexes formed

with PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ are cytotoxic. *Right* binding of Cu(II) to PrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹ or PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ at pH 5.5. Addition of NA leads to the formation of a ternary complex only for PrP¹⁰⁹⁻¹⁴⁹ at pH 5.5, and it is not cytotoxic

that we observed no significant effect of Cu(II) by turbidity assays at pH 7.4 because of the low sensitivity of the technique; however, morphological analysis evidenced the

presence of a heterogeneous PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ aggregate population in the presence of Cu(II) (Fig. 6h), and which might contain fibrillar species.

In contrast, an inhibitory effect of Cu(II) was observed in the aggregation of PrP^{109–149} at pH 5.0. Cu(II) binding to PrP^{109–149} at low pH leads to the formation of a distinct oxygen-rich Cu(II)–PrP^{109–149} complex that involves carboxylic acids from the C-terminal region (potentially Asp-144 and Asp-147 or Glu-146) and/or water molecules (Fig. 8). The formation of this complex requires residues at the C-terminal region, and thus it is not formed in PrP^{106–126}. This species is responsible for the significant inhibitory effect of Cu(II) in the aggregation of PrP^{109–149}. It is plausible to propose that Cu(II) binding at the C-terminal region of PrP^{109–149} could cause conformational changes that may interfere with the intermolecular hydrophobic interactions involved in its aggregation pathway. As mentioned above, Cu(II) can induce PrP^C cellular internalization by endocytosis [55], indicating that copper-loaded PrP is present in endosomes where proton concentrations are high. Thus, the low-pH Cu(II)–PrP^{109–149} complex identified in this study could be a relevant species that is formed at the endosomal level and it could play an important inhibitory role in PrP aggregation.

Voltammetric measurements strongly suggested that PrP remains copper-bound in diverse cellular environments [56]; also, rPrP exposes different binding sites for heparin, depending on the solution pH [57]. These results indicate that rPrP might suffer conformational changes depending on its cellular location, thus interacting differently with copper, nucleic acids, and/or other identified ligands. In this study, strong evidence for the formation of Cu(II)–DNA–PrP^{109–149} (at neutral and acidic pH) and Cu(II)–DNA–PrP^{106–126} (at neutral pH) ternary complexes has been provided by EPR and Raman spectroscopy. Although further spectroscopic investigation is needed to identify the nature of the coordinating ligands in these complexes, our results suggest that they may favor the formation of oligomeric and cytotoxic structures (Fig. 8). Both Cu(II) binding and DNA binding by PrP^{109–149} reduced its aggregation to ordered oligomers, as seen by LS and TEM at pH 5.0. The presence of both Cu(II) and DNA did not inhibit aggregation to the same extent as the ligands alone, probably owing to an interaction of Cu(II) with DNA. The morphologies of the PrP^{109–149} species generated on incubation with Cu(II), DNA, or Cu(II) and DNA were different. Specifically, smaller oligomeric species were formed when both Cu(II) and DNA were added to the peptide solution.

The formation of toxic oligomers is a hallmark of neurodegenerative processes [50, 58]. Interaction of recombinant full-length PrP with DNA (D67 and D44 sequences) and RNA led to cytotoxic species. A previous report showed that recombinant PrP^{90–231} oligomerizes into

species that are toxic to SK-N-SH cells on addition of Cu(II) at pH 5.0 [59], excluding the role of the octarepeat domain in this process. Herein, we found that mainly Cu(II) binding by PrP^{106–126}, in the region encompassing His-111 is associated with the formation of cytotoxic oligomeric species. Indeed, cell viability assays showed that addition of the RNA sequence (R67) and Cu(II) to PrP^{106–126} induces higher cytotoxicity (on the 21st incubation day, only), which might result from the different morphology of the PrP^{106–126} aggregates formed in the presence of both ligands. The cell-death mechanism remains to be investigated, although preliminary results with recombinant full-length murine PrP indicate that DNA–rPrP complexes induce cellular apoptosis [34].

In conclusion, this study provides strong evidence for the formation of Cu(II)–nucleic acid–PrP peptide ternary complexes, which lead to the formation of oligomeric species with different morphologies and cytotoxicity profiles that might be relevant for the pathogenesis of TSEs (Fig. 8). The nucleic acids used in this study have previously been shown to interact with either recombinant full-length PrP or PrP^{109–149} [12, 32, 34]. Liu et al. [60] performed a pioneer study where it was revealed by CD measurements that the conformation of full-length ovine PrP is affected by both RNA and Cu(II). Although our work has the limitation of analyzing only isolated PrP domains, it is the first report that characterizes the biophysics, morphology, and cytotoxicity of this dual interaction. Moreover, one could infer that such interactions may also occur in full-length PrP, as suggested by the results obtained for ovine PrP [60]. Conformational changes induced by both nucleic acid and copper would lead to aggregated species that could be deleterious to the cell. Our study also underscores the importance of obtaining structural information about PrP–ligand complexes to help elucidate PrP function and conversion to PrP^{Sc} [61], which in turn can aid the development of new therapeutic strategies for TSEs.

Acknowledgments The authors thank Icaro A. Marques for help with protein purification, Trinidad Arcos-Lopez and Jose Luis Esquivel for help with PrP^{109–112} synthesis and initial characterization, and Luis Mauricio T. R. Lima and Lina Rivillas-Acevedo for helpful discussions. We are very grateful to the Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer (Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro) and the Laboratório de Biologia Estrutural (Instituto Nacional de Metrologia, Rio de Janeiro) for use of the TEM facility. This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Biologia Estrutural e Bioimagem, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (grant 128255 to L.Q. and fellowship to C. S.-L.).

References

- Prusiner SB (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95:13363–13383
- Linden R, Martins VR, Prado MA, Cammarota M, Izquierdo I, Brentani RR (2008) *Physiol Rev* 88:673–728
- Brown DR, Qin K, Herms JW, Madlung A, Manson J, Strome R, Fraser PE, Kruck T, von Bohlen A, Schulz-Schaeffer W, Giese A, Westaway D, Kretschmar H (1997) *Nature* 390:684–687
- Viles JH, Cohen FE, Prusiner SB, Goodin DB, Wright PE, Dyson HJ (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* 96:2042–2047
- Brown DR (2009) *Dalton Trans* 4069–4076. doi:10.1039/b822135a:4069-4076
- Millhauser GL (2007) *Annu Rev Phys Chem* 58:299–320
- Riek R, Hornemann S, Wider G, Billeter M, Glockshuber R, Wuthrich K (1996) *Nature* 382:180–182
- Burns CS, Aronoff-Spencer E, Legname G, Prusiner SB, Antholine WE, Gerfen GJ, Peisach J, Millhauser GL (2003) *Biochemistry* 42:6794–6803
- Jones CE, Abdelraheim SR, Brown DR, Viles JH (2004) *J Biol Chem* 279:32018–32027
- Rivillas-Acevedo L, Grande-Aztatzi R, Lomeli I, Garcia JE, Barrios E, Teloxa S, Vela A, Quintanar L (2011) *Inorg Chem* 50:1956–1972
- Qin K, Yang DS, Yang Y, Chishti MA, Meng LJ, Kretschmar HA, Yip CM, Fraser PE, Westaway D (2000) *J Biol Chem* 275:19121–19131
- Cordeiro Y, Machado F, Juliano L, Juliano MA, Brentani RR, Foguel D, Silva JL (2001) *J Biol Chem* 276:49400–49409
- Nandi PK, Leclerc E, Nicole JC, Takahashi M (2002) *J Mol Biol* 322:153–161
- Deleault NR, Lucassen RW, Supattapone S (2003) *Nature* 425:717–720
- Gomes MP, Cordeiro Y, Silva JL (2008) *Prion* 2:64–66
- Gomes MP, Millen TA, Ferreira PS, e Silva NL, Vieira TC, Almeida MS, Silva JL, Cordeiro Y (2008) *J Biol Chem* 283:19616–19625
- Cavaliere P, Pagano B, Granata V, Prigent S, Rezaei H, Giancola C, Zagari A (2013) *Nucleic Acids Res* 41:327–339
- Silva JL, Lima LM, Foguel D, Cordeiro Y (2008) *Trends Biochem Sci* 33:132–140
- Silva JL, Gomes MP, Vieira TC, Cordeiro Y (2010) *Front Biosci (Landmark Ed)* 15:132–150
- Forloni G, Angeretti N, Chiesa R, Monzani E, Salmona M, Bugiani O, Tagliavini F (1993) *Nature* 362:543–546
- Thellung S, Florio T, Corsaro A, Arena S, Merlini M, Salmona M, Tagliavini F, Bugiani O, Forloni G, Schettini G (2000) *Int J Dev Neurosci* 18:481–492
- Jobling MF, Huang X, Stewart LR, Barnham KJ, Curtain C, Volitakis I, Perugini M, White AR, Cherny RA, Masters CL, Barrow CJ, Collins SJ, Bush AI, Cappai R (2001) *Biochemistry* 40:8073–8084
- Turi I, Kallay C, Szikszai D, Pappalardo G, Di Natale G, De Bona P, Rizzarelli E, Sovago I (2010) *J Inorg Biochem* 104:885–891
- Valensin D, Gajda K, Gralka E, Valensin G, Kamysz W, Kozlowski H (2010) *J Inorg Biochem* 104:71–78
- Gaggelli E, Bernardi F, Molteni E, Pogni R, Valensin D, Valensin G, Remelli M, Luczkowski M, Kozlowski H (2005) *J Am Chem Soc* 127:996–1006
- Zhang H, Kaneko K, Nguyen JT, Livshits TL, Baldwin MA, Cohen FE, James TL, Prusiner SB (1995) *J Mol Biol* 250:514–526
- Liu H, Farr-Jones S, Ulyanov NB, Llinas M, Marqusee S, Groth D, Cohen FE, Prusiner SB, James TL (1999) *Biochemistry* 38:5362–5377
- Cordeiro Y, Lima LM, Gomes MP, Foguel D, Silva JL (2004) *J Biol Chem* 279:5346–5352
- Macedo B, Kaschula CH, Hunter R, Chaves JA, van der Merwe JD, Silva JL, Egan TJ, Cordeiro Y (2010) *Eur J Med Chem* 45:5468–5473
- Nandi PK (1997) *Arch Virol* 142:2537–2545
- Nandi PK (1998) *Arch Virol* 143:1251–1263
- Lima LM, Cordeiro Y, Tinoco LW, Marques AF, Oliveira CL, Sampath S, Kodali R, Choi G, Foguel D, Torriani I, Caughey B, Silva JL (2006) *Biochemistry* 45:9180–9187
- Marques AF, Cordeiro Y, Silva JL, Lima LM (2009) *Biophys Chem* 141:135–139
- Macedo B, Millen TA, Braga CA, Gomes MP, Ferreira PS, Kraineva J, Winter R, Silva JL, Cordeiro Y (2012) *Biochemistry* 51:5402–5413
- Daniele PG, Prenesti E, Ostacoli G (1996) *J Chem Soc Dalton Trans* 3269–3275. doi:10.1039/DT9960003269:3269-3275
- Fawcett TG, Bernarducci EE, Krogh-Jespersen K, Schugar HJ (1980) *J Am Chem Soc* 102:2598–2604
- Bernarducci E, Schwindinger WF, Hughey JL, Krogh-Jespersen K, Schugar HJ (1981) *J Am Chem Soc* 103:1686–1691
- Peisach J, Blumberg WE (1974) *Arch Biochem Biophys* 165:691–708
- Sakaguchi U, Addison AW (1979) *J Chem Soc Dalton Trans* 600 608. doi:10.1039/DT9790000600:600-608
- Van Doorslaer S, Cereghetti GM, Glockshuber R, Schweiger A (2001) *J Phys Chem B* 105:1631–1639
- Miura T, Satoh T, Hori-i A, Takeuchi H (1998) *J Raman Spectrosc* 29:41–47
- Thomas GJ (1999) *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 28:1–27
- Bocharova OV, Breydo L, Salnikov VV, Baskakov IV (2005) *Biochemistry* 44:6776–6787
- Lowe J, Vieyra A, Catty P, Guillaing F, Mintz E, Cuillel M (2004) *J Biol Chem* 279:25986–25994
- Mange A, Crozet C, Lehmann S, Beranger F (2004) *J Cell Sci* 117:2411–2416
- Yin S, Fan X, Yu S, Li C, Sy MS (2008) *J Biol Chem* 283:25446–25454
- Strom A, Wang GS, Picketts DJ, Reimer R, Stuke AW, Scott FW (2011) *Eur J Cell Biol* 90:414–419
- Tajmir-Riahi HA, Naoui M, Ahmad R (1993) *Biopolymers* 33:1819–1827
- Andrushchenko V, van de Sande JH, Wieser H (2003) *Biopolymers* 72:374–390
- Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, Morgan TE, Rozovsky I, Trommer B, Viola KL, Wals P, Zhang C, Finch CE, Krafft GA, Klein WL (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95:6448–6453
- Reixach N, Deechongkit S, Jiang X, Kelly JW, Buxbaum JN (2004) *Proc Natl Acad Sci USA* 101:2817–2822
- Huang Z, Prusiner SB, Cohen FE (1996) *Fold Des* 1:13–19
- Gong B, Ramos A, Vazquez-Fernandez E, Silva CJ, Alonso J, Liu Z, Requena JR (2011) *Biochemistry* 50:4963–4972
- Thakur AK, Srivastava AK, Srinivas V, Chary KV, Rao CM (2011) *J Biol Chem* 286:38533–38545
- Quaglio E, Chiesa R, Harris DA (2001) *J Biol Chem* 276:11432–11438
- Liu C, Zhang Y (2011) *Adv Protein Chem Struct Biol* 84:1–40
- Vieira TC, Reynaldo DP, Gomes MP, Almeida MS, Cordeiro Y, Silva JL (2011) *J Am Chem Soc* 133:334–344
- Harrison CF, Barnham KJ, Hill AF (2007) *J Neurochem* 103:1709–1720
- Wu D, Zhang W, Luo Q, Luo K, Huang L, Wang W, Huang T, Chen R, Lin Y, Pang D, Xiao G (2010) *J Cell Biochem* 111:627–633
- Liu M, Yu S, Yang J, Yin X, Zhao D (2007) *Mol Cell Biochem* 294:197–203
- Surewicz WK, Apostol MI (2011) *Top Curr Chem* 305:135–167