



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**Estudio de la coordinación de Cu(II) a las proteínas alfa- y beta-
sinucleínas: un punto de vista bioinorgánico en la enfermedad
de Parkinson.**

Tesis que presenta:

Esaú Emmanuel Rodríguez Méndez

Para Obtener el Grado de

Doctor en Ciencias

En la Especialidad de

Ciencias Químicas

Directora de Tesis: Dra. Liliana Quintanar Vera

Ciudad de México

24 de febrero 2021

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio 3 del Departamento de Química del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), bajo la dirección de la Dra. Liliana Quintanar Vera y con el apoyo económico de una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para la realización de este trabajo.

A la Dra. Liliana Quintanar Vera por su apoyo y sus invaluable discusiones en toda mi estancia en su laboratorio. Gracias por enseñarme a hacer ciencia.

A los doctores Claudio O. Fernández y Andrés Binolfi por su invaluable colaboración en este trabajo, sus aportaciones me inspiran a trabajar más en la ciencia.

A los miembros del jurado, por su tiempo en la revisión y sus comentarios a este trabajo.

A las doctoras Lina Rivillas y Lidia Guadalupe por su apoyo incondicional en el laboratorio y en todo momento.

A mis compañeros del grupo de investigación del laboratorio 3, de los cuales aprendí a diario: Luis Blancas, Yanahi Posadas, José Antonio, Carolina, Trinidad y Maripaz.

Al IQ Geiser Cuellar por la obtención de los espectros de Masas y por el entrenamiento en el uso del equipo de Masas.

A Alicia Hernández, Belem García, Alejandra Rodríguez y Gonzalo Trejo por el excelente servicio bibliotecario, oportuno y eficaz.

A Gabina Dionisio y a la Q. Atenea Vargas por su enorme apoyo en el laboratorio.

A todo el personal del Departamento de Química.

DEDICATORIA

Para ti **Luz Yunuhan**

“Esposa, amiga, novia, hija, hermana, sobrina, tía, ingeniera química y una luz
infinita en este mundo. Gracias por tantos bellos recuerdos”

Descansa en paz.

1989-2021



PUBLICACIONES

Se generaron las siguientes publicaciones en revistas indexadas a nivel internacional con arbitraje estricto, durante todo el trabajo doctoral:

- ***Role of N-terminal methionine residues in the redox activity of copper bound to alpha-synuclein.*** Esaú E. Rodríguez, Trinidad Arcos-López, Lidia G. Trujano-Ortiz, Claudio O. Fernández, Felipe J. González, Alberto Vela, Liliana Quintanar. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2016, 21, 5, 691–702.
- ***Site-Specific Copper-Catalyzed Oxidation of α -Synuclein: Tightening the Link between Metal Binding and Protein Oxidative Damage in Parkinson's Disease.*** Marco C. Miotto, Esaú E. Rodríguez, Ariel A. Valiente-Gabioud, Valentina Torres-Monserrat, Andrés Binolfi, Liliana Quintanar, Markus Zweckstetter, Christian Griesinger, and Claudio O. Fernández. *Inorganic Chemistry.*, 2014, 53 (9), pp 4350–4358
- ***Bioinorganic Chemistry of Parkinson's Disease: Structural Determinants for the Copper-Mediated Amyloid Formation of Alpha-Synuclein.*** Andrés Binolfi, Esaú E. Rodríguez, Daniela Valensin, Nicola D'Amelio, Emiliano Ippoliti, Gonzalo Obal, Rosario Duran, Alessandra Magistrato, Otto Pritsch, Markus Zweckstetter, Gianni Valensin, Paolo Carloni, Liliana Quintanar, Christian Griesinger, and Claudio O. Fernández. *Inorganic Chemistry.*, 2010, 49 (22), pp 10668–10679

Presentaciones en congresos en forma oral

- ✓ Noviembre 2012. XXIX Congreso Nacional de Bioquímica de la Sociedad Mexicana de Bioquímica. Presentación Oral: **"Estudio de los sitios de unión a Cu(II) en la proteína alfa-sinucleína y su actividad redox: implicaciones en la enfermedad de Parkinson"**

- ✓ Junio 2011. V Encuentro de Química Inorgánica. *CUCEI, Universidad de Guadalajara*. Presentación de los trabajos en modalidad oral: "La Química Bio-Inorgánica de la Enfermedad de Parkinson" y cartel: **"Estudio espectroscópico de la coordinación del Cu(II) al sitio de histidina de las proteínas alfa- y beta-Sinucleína."**

- ✓ Marzo 2011. 3er Congreso de la Rama de Fisicoquímica, Estructura y Diseño de Proteínas de la Sociedad Mexicana de Bioquímica. Torre de Ingeniería, UNAM. Presentación oral: **"Estudio espectroscópico de la coordinación del Cu(II) al sitio de histidina de las proteínas α - y β -sinucleínas"**

- ✓ Diciembre 2008. 5th Latin American IBRO Annual School of NeuroSciences. Córdoba y Rosario, Argentina. Presentación oral: **"Estudio espectroscópico de la coordinación del Cu(II) a las proteínas α - y β -sinucleínas"**

- ✓ Noviembre 2008. IX Taller "Jóvenes en la Investigación". Departamento de Química. Cinvestav-IPN. Presentación oral: **"Estudio espectroscópico de la coordinación del Cu(II) a las proteínas alfa-sinucleína"**

Presentaciones en congresos en forma de cartel

- ✓ Noviembre, 2017. 6o Congreso de la Rama de Fisicoquímica, Estructura y Diseño de Proteínas. Cartel: *Spectroscopic and redox studies of Cu(II) complexes at the N-terminal of alpha and beta synuclein proteins*. UJED. Durango, México.
- ✓ Octubre 2016. *V Latin American Meeting on Biological Inorganic Chemistry*. Cartel: *Role of N-terminal methionine residues in the redox activity of copper bound to alpha-synuclein: Spectroscopic and kinetic studies*. Querétaro, México
- ✓ Noviembre 2015. Quinto Congreso de la Rama de Fisicoquímica, Estructura y Diseño de Proteínas de la Sociedad Mexicana de Bioquímica. Cartel: *“Copper-catalyzed methionine oxidation at the N-terminal region of alpha-Synuclein: Spectroscopic studies”*. Oaxaca, México
- ✓ Noviembre 2013. Cuarto Congreso de la Rama de Fisicoquímica, Estructura y Diseño de Proteínas y 3rd USA-Mexico Workshop in Biological Chemistry: Protein Folding, Dynamics and Function. Cartel: *“Redox chemistry of the high affinity copper binding site in alpha- Synuclein: Role of Methionine”*. Ciudad de México, México.
- ✓ Agosto 2010. 240 Boston Fall American Chemical Society Meeting. Cartel: *“Electron Paramagnetic Studies Of The Highest Affinity Cu(II) Binding Site In Alpha Synuclein”*. Boston, Massachusetts, Estados Unidos.
- ✓ Octubre 2009. 2do Congreso de la Rama de Fisicoquímica, Estructura y Diseño de Proteínas de la Sociedad Mexicana de Bioquímica. Cartel: *“Estudio Espectroscópico del sitio de alta afinidad por Cu(II) a la proteína alfa-sinucleína”*. UAM-Cuajimalpa, Ciudad de México.

ÍNDICE

ABREVIATURAS -----	1
RESUMEN -----	3
ABSTRACT -----	4
INTRODUCCIÓN -----	5
ANTECEDENTES -----	7
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA -----	31
HIPÓTESIS -----	32
OBJETIVOS -----	33
CAPÍTULO 1. Los sitios de unión a Cu²⁺ en la proteína alfa-sinucleína -----	34
1.1 Identificación de sitios de coordinación a Cu ²⁺ en la proteína AS	
1.2 Evaluación del papel de la Histidina 50 en la unión de Cu ²⁺ a la AS	
1.3 Evaluación del papel del extremo N-terminal en la unión de Cu ²⁺ a la AS	
CAPÍTULO 2. Elucidación estructural del sitio de unión a Cu²⁺ en el extremo N-terminal de la AS -----	58
3.1 Efecto del pH en el sitio de unión a cobre en el extremo N-terminal de la AS.	
3.2 Evaluando el papel del Asp2 en el sitio 1 de la AS.	
3.3 El agua como posible ligante ecuatorial en el sitio 1.	
3.4. Modelo de coordinación de Cu ²⁺ en el sitio 1.	
3.5. Evaluación de la acetilación en el sitio 1 de la AS.	
CAPÍTULO 3. Evaluación del papel de las metioninas en la estructura y reactividad del sitio 1 de la proteína AS -----	75
3.1. Evaluación del papel de las metioninas del extremo N-terminal de la AS en la coordinación a Cu ²⁺ .	
3.2. Evaluación del papel de las metioninas 1 y 5 en la reducción del complejo Cu ²⁺ -AS (1-6).	
3.3 Estimación de los potenciales de reducción, de los complejos de los fragmentos derivados del AS (1-6)-Cu(II/I) a pH 7.5	
3.4 Análisis de la rapidez de reacción de las reducciones usando la ecuación de Marcus.	
3.5 Reactividad del complejo AS (1-6)-Cu ¹⁺ y sus variantes con oxígeno.	
3.6 Análisis de las especies oxidadas por HPLC-Espectrometría de Masas.	

3.7 Mecanismo de la oxidación del AS (1-6) catalizado por $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^{1+}$	
3.8 Voltametría cíclica del complejo AS (1-6) y sus derivados.	
CAPÍTULO 4. Los sitios de unión a Cu^{2+} en la proteína beta-sinucleína	-----103
4.1 Identificación de sitios de coordinación a Cu^{2+} en la proteína BS	
4.2 Evaluación del papel de la Histidina 65 en la unión de Cu^{2+} a la BS	
4.3 Coordinación en el extremo N de Cu^{2+} a la BS y comparación a la AS	
4.4 Cinética de reducción del complejo Cu^{2+} -BS(1-15) y comparación con el Cu^{2+} -AS(1-15) y Cu^{2+} -AS(1-6)	
CAPÍTULO 5. Estudio de los sitios de unión a cobre asociados a las histidinas en las proteínas AS y BS	-----114
5.1 Elucidación estructural del sitio de la His50 en la AS	
5.2 Elucidación estructural del sitio de la His65 en la BS	
5.3 Comparación de los sitios de histidinas.	
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	-----124
MATERIALES Y MÉTODOS	-----127
M1. Proteínas recombinantes.	
M2. Síntesis de Péptidos.	
M3. Purificación de Péptidos.	
M4. Absorción electrónica.	
M5. Dicroísmo circular.	
M6. Espectrometría de masas.	
M7. Resonancia paramagnética electrónica.	
M8. Preparación de las muestras.	
ANEXOS	-----136
A1. Gráficas Peisach-Blumberg.	
A2. Caracterización de péptidos sintéticos.	
REFERENCIAS	-----138

ABREVIATURAS

ϵ	Coefficiente de extinción molar
β A	Proteína beta amiloide
A	Acoplamiento hiperfino paralelo
AA	Ácido ascórbico
acAS	Proteína alfa-sinucleína acetilada en el N-terminal
acBS	Proteína beta-sinucleína acetilada en el N-terminal
acAS (1-6)	Fragmento AS (1-6) acetilado en el N-terminal
AS	Proteína alfa-sinucleína
ASH50A	Proteína alfa-sinucleína con una alanina en la posición 50, reemplazando al residuo original de histidina.
AS (1-3)	Fragmento de la proteína alfa-sinucleína ¹ MDV ³
AS (1-6)	Fragmento de la proteína alfa-sinucleína ¹ MDVFMK ⁶
AS (1-6) D2A	Fragmento AS (1-6) de la proteína alfa-sinucleína, con una alanina en la posición 2, reemplazando al residuo original aspártico.
AS (1-6) M1I	Fragmento AS (1-6) de la proteína alfa-sinucleína, con una isoleucina en la posición 1, reemplazando al residuo original metionina.
AS (1-6) M5I	Fragmento AS (1-6) de la proteína alfa-sinucleína, con una isoleucina en la posición 5, reemplazando al residuo original metionina.
AS (1-15)	Fragmento de la proteína alfa-sinucleína ¹ MDVFMKGLSKAKEGV ¹⁵
BS	Proteína beta-sinucleína
BS (1-15)	Fragmento de la proteína beta-sinucleína ¹ MDVFMKGLSMAKEGV ¹⁵
CD	Dicroísmo circular
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EP	Enfermedad de Parkinson
EPR	Resonancia paramagnética electrónica
HPLC	High performance liquid chromatography
HSQC	Heteronuclear single quantum correlation
K _d	Constante de disociación
m/z	Relación masa carga

<i>MALDI-TOF</i>	Desorción/ionización láser asistida por matriz, con tiempo de vuelo
<i>MES</i>	Ácido 2-N-Morfolino-etano-sulfónico
<i>MOPS</i>	Ácido 3-N-Morfolino-propano-sulfónico
<i>mV</i>	milivolts
<i>NAC</i>	Componente no amiloide
<i>RMN</i>	Resonancia magnética nuclear
<i>ROS</i>	Especies reactivas de oxígeno
<i>ThT</i>	Tioflavina-T
<i>UV-Vis</i>	Ultravioleta-visible

RESUMEN

La enfermedad de Parkinson es la segunda enfermedad neurodegenerativa de mayor incidencia en la población adulta mayor. La agregación amiloide de la proteína alfa-sinucleína (AS) en la *substantia nigra pars compacta* es una característica fundamental en esta enfermedad. La AS es una proteína presináptica, ampliamente expresada en diversos mamíferos. Aunque el proceso de agregación de la AS ha sido estudiado, se sabe que la participación de iones metálicos divalentes en este proceso acelera su conversión a la forma agregada, siendo el más importante el Cu. La beta-sinucleína (BS) es una proteína homóloga a la AS, que también une cobre, pero no forma agregados. En esta tesis se estudiaron los sitios de unión a Cu^{2+} en las proteínas AS y BS por diversos métodos espectroscópicos, como dicroísmo circular, absorción electrónica en la región UV-Vis y resonancia paramagnética electrónica. También se evaluó la química redox de los complejos AS-Cu y su implicación en el estrés oxidativo mediante técnicas electroquímicas, absorción electrónica y HPLC acoplado a espectrometría de masas. Se encontró que el Cu^{2+} se une específicamente al N-terminal de la AS, y se elucidó la secuencia peptídica mínima necesaria para reproducir el sitio de coordinación, la cual también está presente en la BS. La acetilación del N-terminal impacta la coordinación de Cu^{2+} en este sitio. Los procesos termodinámicos y cinéticos de reducción de los complejos AS-Cu y BS-Cu son dependientes de la presencia de las metioninas; particularmente, en la AS la metionina 1 tiene un papel más importante que la metionina 5. En los estudios de reactividad, los complejos cobre-AS reducidos fueron enfrentados a oxígeno, y las cinéticas de reoxidación indican que la metionina 5 es importante para este proceso. La caracterización de los productos de la reoxidación demostró la presencia de fragmentos peptídicos con oxidación en las metioninas, mostrando que la metionina 1 es más susceptible a la oxidación que la metionina 5. Finalmente, se caracterizó el segundo sitio de coordinación de cobre en las proteínas AS y BS, el cual involucra al único residuo de Histidina en cada proteína y a los grupos amida de los residuos que lo preceden en sus secuencias. Este trabajo ayuda a entender la coordinación de cobre a las proteínas AS y BS, así como sus procesos redox. El estudio de la oxidación del complejo AS-Cu¹⁺ que resulta en la oxidación de residuos de metionina es de suma importancia, ya que este tipo de modificación en la AS ha sido observado en los cuerpos de Lewy, característicos en la enfermedad de Parkinson.

ABSTRACT

Parkinson's disease is the second neurodegenerative disease with the highest incidence in the elderly population. Amyloid aggregation of the alpha-synuclein (AS) protein in the *substantia nigra pars compacta* is a fundamental feature in this disease. AS is a presynaptic protein, widely expressed by mammals. Although the AS aggregation process has been studied, it is known that the participation of divalent metal ions in this process accelerates its conversion to the aggregated form, the most important being Cu. Beta-synuclein (BS) is a protein homologous to AS, which also binds copper, but does not form aggregates. In this thesis, the Cu²⁺ binding sites in the AS and BS proteins were studied by various spectroscopic methods, such as circular dichroism, electronic absorption in the UV-Vis region and electronic paramagnetic resonance. The redox chemistry of the AS-Cu complexes and their involvement in oxidative stress were also evaluated using electrochemical techniques, electronic absorption and HPLC coupled to mass spectrometry. Cu²⁺ was found to bind specifically to the N-terminus of AS, and the minimal peptide sequence necessary to reproduce the coordination site was elucidated, which is also present in BS. Acetylation of the N-terminal impacts the coordination of Cu²⁺ at this site. The thermodynamic and kinetic processes of reduction of the AS-Cu and BS-Cu complexes are dependent on the presence of methionine; particularly, in AS, methionine 1 has a more important role than methionine 5. In reactivity studies, reduced copper-AS complexes were confronted with oxygen, and the reoxidation kinetics indicate that methionine 5 is important for this process. The characterization of the reoxidation products demonstrated the presence of peptide fragments with oxidation in methionine, showing that methionine 1 is more susceptible to oxidation than methionine 5. Finally, the second copper coordination site in the proteins was characterized in AS and BS, which involves the only histidine residue in each protein and the amide groups of the residues that precede it in their sequences. This work helps to understand the coordination of copper to the AS and BS proteins, as well as their redox processes. The study of the oxidation of the AS-Cu¹⁺ complex that results in the oxidation of methionine residues is of utmost importance, since this type of modification in AS has been observed in Lewy bodies, characteristic of Parkinson's disease.

INTRODUCCIÓN

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), las enfermedades cardiovasculares, el cáncer y las enfermedades neurodegenerativas son las causas principales de mortandad en países desarrollados. Las enfermedades neurodegenerativas son un grupo de desórdenes neurológicos caracterizados por una serie de síntomas frecuentemente progresivos y poco tratables. Estas enfermedades y otras, como el Parkinson, Alzheimer, diabetes mellitus tipo 2 o la enfermedad de Huntington, tienen como factor común que las bases moleculares están asociadas al plegamiento anómalo de ciertas proteínas¹.

Por otro lado, metales como el Mn, Cu, Zn y Fe son esenciales², porque desempeñan diversas funciones fisiológicas, como el mantenimiento de la estructura celular, regulación de la expresión génica, la neurotransmisión, transferencia de electrones, transporte de oxígeno, entre otras. Sin embargo, el transporte y homeostasis de metales deben estar debidamente controlados, ya que se ha observado que tanto su acumulación como su deficiencia conduce a la aparición de distintos desórdenes. Asimismo, se ha propuesto que los metales juegan un papel en la etiología de ciertas enfermedades neurodegenerativas, por ejemplo, en el caso de la enfermedad de Alzheimer se ha sugerido que metales como Cu y Zn participan en la formación de placas amiloides³. Diversos estudios de meta-análisis han revelado que existe un desbalance homeostático de metales como el Cu en diversos desórdenes neurodegenerativos como la esclerosis lateral amiotrófica, la enfermedad de Huntington⁴, el Parkinson⁵ y el Alzheimer⁶.

La enfermedad de Parkinson es la segunda enfermedad neurodegenerativa de mayor incidencia en la población adulta mayor de 60 años. En México se estima una prevalencia de 50 casos de EP por cada 100,000 habitantes por año, de acuerdo con el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, donde es la cuarta causa de consulta⁷. Aunque la etiología de esta enfermedad aún no se comprende, se sabe que es una enfermedad multifactorial. Una característica fundamental es la agregación amiloide de una proteína ampliamente expresada en el tejido nervioso y que se encuentra en la región afectada en el cerebro (*substantia nigra pars compacta*), llamada alfa-sinucleína⁸.

En estudios previos se ha demostrado que algunos iones metálicos divalentes se unen a la alfa-sinucleína induciendo su agregación amiloide⁹. También, se determinó que el Cu^{2+} es el ion más efectivo en acelerar dicho cambio conformacional, uniéndose a la proteína alfa-sinucleína en diversos sitios^{9, 10}.

En esta tesis se elucidaron los detalles de la coordinación del ion Cu^{2+} a la proteína alfa-sinucleína, en especial en la región del extremo N-terminal, mediante el uso de diferentes técnicas espectroscópicas, incluyendo resonancia paramagnética electrónica, dicroísmo circular electrónico y absorción electrónica en la región UV-Visible. Nuestros resultados contribuyen a entender, desde un punto de vista bioinorgánico, la química de coordinación y el comportamiento redox de la interacción de cobre con las proteínas alfa- y beta-sinucleína.

ANTECEDENTES

Enfermedad de Parkinson.

La enfermedad de Parkinson (EP) es la enfermedad neurodegenerativa más frecuente después del Alzheimer (EA) en personas mayores de 60 años, teniendo una incidencia a nivel mundial del 2 al 3%, en la población adulta mayor de 65 años¹¹. La prevalencia y la incidencia aumentan casi exponencialmente con la edad y aún más después de los 80 años. Esta tendencia tiene importantes implicaciones para la salud pública; con un envejecimiento de la población y el aumento de la esperanza de vida en todo el mundo, el número de personas con Parkinson se estima que se duplique en 2030¹². En México se estiman 50 casos de EP por cada 100,000 habitantes por año, de acuerdo con el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía⁷.

La EP fue inicialmente descrita en 1817, por James Parkinson como una enfermedad caracterizada por diversos síntomas motores. Posteriormente, en la mitad del siglo XIX, Jean-Martin Charcot refinó las características que distinguían a la EP de otras enfermedades que involucraban los mismos síntomas de movimiento¹³. Clínicamente, se define por la presencia de alteraciones motoras como: temblor en reposo, rigidez muscular, bradicinesia e inestabilidad postural. Además, se presentan características no motoras durante el curso de la enfermedad, como el deterioro cognitivo, depresión, déficit olfativo, psicosis y trastornos del sueño¹³. Incluso las características motoras de los síntomas en pacientes con EP son muy heterogéneas, lo que ha provocado que existan intentos de clasificar a la EP en algunos subtipos basados en los diversos síntomas predominantes tanto motores como los no motores que presentan los pacientes¹⁴⁻¹⁶

La característica fundamental en la EP es la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la *substantia nigra pars compacta* (SNpc), la cual es la región media del cerebro (Figura 1). El área más profundamente afectada en la SNpc es típicamente el nivel ventrolateral, que contiene las neuronas que se proyectan al putamen dorsal del estriado¹⁷. Diversos estudios clínico-patológicos han demostrado que la pérdida neuronal dopaminérgica en la SNpc de

moderada a severa es probablemente la causa de las características motoras, bradicinesia y rigidez en la EP¹⁸. Hallazgos recientes confirman que la pérdida moderada de neuronas en la SNpc también se presenta en las primeras etapas de la EP¹⁹.

La pérdida neuronal, que es característica en la EP, también ocurre en otras regiones del cerebro, incluyendo el *locus ceruleus*, el núcleo basal de Meynert, la amígdala y el hipotálamo, con lo cual se distingue de otras enfermedades parecidas a la EP²⁰. Esta pérdida produce un decremento en los niveles de dopamina en el *corpus striatum*, generando un desbalance en los circuitos del ganglio basal lo cual conduce a la aparición de los síntomas motores en esta enfermedad.

Otro signo distintivo de la EP es la patología de Lewy. Esta patología, consiste en la presencia de agregados anormales de la proteína AS²¹, llamados cuerpos de Lewy, además de neuritas de Lewy (neuritas anormales de las neuronas afectadas, que contienen material granular y filamentos de AS). La agregación de proteínas con plegamiento anómalo es un común denominador en diversas enfermedades neurodegenerativas. Cada enfermedad neurodegenerativa tiene como característica una proteína abundante encontrada en forma de inclusiones proteicas o agregada en las regiones afectadas en el cerebro²². Existen más de 30 enfermedades asociadas al mal plegamiento de proteínas, podemos mencionar a las proteínas tau y beta-amiloide en la enfermedad de Alzheimer, el polipéptido islote amiloide en la diabetes mellitus tipo 2 y la huntingtina en la enfermedad de Huntington, entre muchas otras.

En un estudio se encontró que la proporción de neuronas que contienen cuerpos de Lewi en la EP es relativamente constante aproximadamente entre 3-4% y que es independiente del estadio de la enfermedad. Por lo tanto, se ha sugerido que los cuerpos de Lewi se forman continuamente durante el curso de la enfermedad y desaparecen cuando la neurona afectada muere²³. El componente mayoritario de los cuerpos de Lewy es una proteína llamada alfa-sinucleína²¹, aunque también en los cuerpos de inclusión se han encontrado componentes del sistema 26S ubiquitina-proteosoma así como chaperonas moleculares, lípidos y otras proteínas como la parkina, la proteína 14-3-3 y la sinfilina-1²⁴

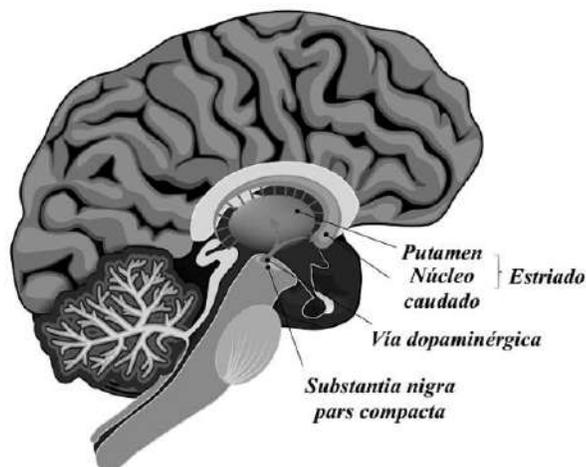


Figura 1. Representación del cerebro, donde se indica la región afectada (*substantia nigra pars compacta*) en personas con la EP.

Proteína Alfa-Sinucleína

La **alfa-sinucleína (AS)** es una proteína pequeña de 140 aminoácidos (Figura 2), que se encuentra en el tejido nervioso de muchos seres vivos incluyendo el ser humano. La AS fue descrita en 1988 por primera vez en el órgano eléctrico del pez *Torpedo californica*, y después en el cerebro de ratas, dando así la primera evidencia de un rol presináptico^{25, 26}. La AS humana fue descrita por primera vez en 1994, al purificar proteínas que se localizaban en el cerebro²⁷.

La AS se localiza principalmente en las terminales presinápticas de neuronas dopaminérgicas²⁵. La AS también, ha sido localizada en otros tejidos. Aunque la función de la AS no está totalmente esclarecida, existe evidencia de que regula la exocitosis de neurotransmisores en la sinapsis, al funcionar como una proteína chaperona para los complejos SNARE (acrónimo derivado de su nombre en inglés, “*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*”). Este mecanismo involucra la unión de la AS a los fosfolípidos vía el N-terminal²⁸. Los complejos SNARE median la fusión de la membrana para permitir la exocitosis de la vesícula sináptica, después de lo cual se disocian rápidamente a un estado desplegado²⁹. Recientemente, se ha propuesto que la AS es una proteína capaz de sensor la curvatura de las membranas y de estabilizarlas al mismo tiempo³⁰.

³¹, y se ha añadido a la clase de proteínas anfipáticas denominadas por sus siglas en inglés (*amphipathic lipid-packaging sensor*, ALPS) que contienen en su estructura secundaria alfa hélices que detectan y generan la curvatura de la membrana^{32, 33}. Se sabe que estas proteínas están intrínsecamente desordenadas en solución, pero comienzan a doblar su hélice anfipática bajo condiciones fisicoquímicas específicas, un proceso que es fuertemente favorecido por un ambiente lipídico y cargado negativamente³⁴.

Además, se ha demostrado que en ratones *knockout* de AS a pesar de mantener una arquitectura cerebral intacta, mostraron una disminución de la dopamina estriatal y alteración de la liberación de dopamina, sugiriendo que la AS puede tener un papel como regulador de la neurotransmisión de la dopamina³⁵. Asimismo, la translocación de la AS al núcleo y la unión con histonas es tóxica en cultivo neuronal, en modelos de ratón y en *drosophila*, lo que sugiere un mecanismo de toxicidad en el desarrollo de la EP.

La estructura primaria de la AS (Figura 2) se puede dividir en tres regiones características: el extremo N-terminal (residuos 1-60); el componente hidrofóbico fibrilogénico (61-95) denominado “componente no-amiloide” (NAC por sus siglas en inglés)³⁶, y en el C-terminal (96 a 140) rica en prolinas y aminoácidos cargados negativamente como los ácidos glutámico y aspártico. La región extremo N-terminal contiene varias repeticiones imperfectas de un hexámero altamente conservado KTKEGV, lo que resulta en una periodicidad de su hidrofobicidad. Este tipo de secuencias son características de los dominios alfa-helicoidal de apolipoproteínas que se unen a lípidos^{37, 38}. Al localizarse en las terminales presinápticas, se ha estudiado la interacción de la AS con vesículas debido a su proximidad y se sabe que la naturaleza de esta interacción es dependiente de la composición de los lípidos y del tamaño de las vesículas. Las vesículas son de importancia ya que es un organelo donde se almacena la dopamina.

En células neuronales la AS se encuentra tanto en el citoplasma como en el núcleo y representa el 1% del total de las proteínas citosólicas encontradas en el tejido nervioso^{25, 39}. La AS es expresada abundantemente en el cerebro en los espacios presinápticos y al final de los axones, con niveles en el rango ~20 a 100 μM ⁴⁰. También se encuentra en los

sinaptosomas cerebrales con una concentración de 50 μM y en otros tejidos del corazón, músculo esquelético y páncreas en baja concentración³⁶. Incluso, la AS se ha medido en la sangre con una concentración $\sim 26200 \pm 3000$ ng/ml, específicamente localizándose dentro de los eritrocitos (99%) y el resto en el plasma^{41, 42}.

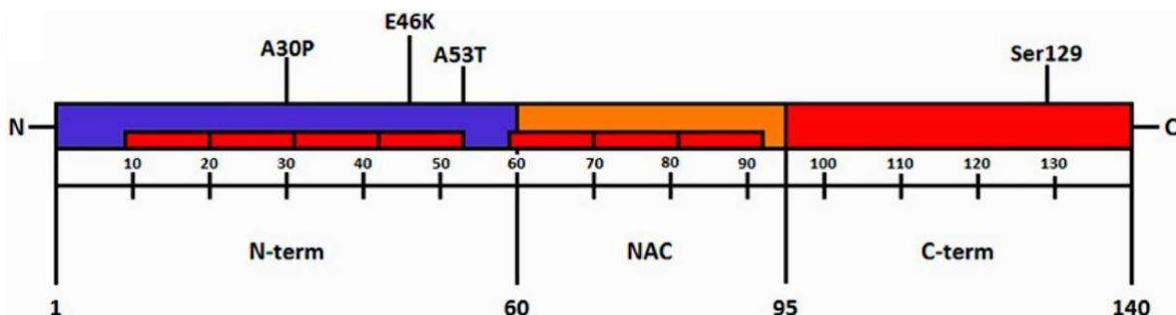


Figura 2. Regiones características de la estructura primaria de la AS humana. Se muestran también algunas de las mutaciones reportadas en la AS: A30P, E46K, A53T y Ser129.

También se ha demostrado que en el cerebro humano la AS sufre diversas modificaciones postraduccionales, como la fosforilación⁴³, ubiquitinación, nitración⁴⁴ y glicosilación. La AS; que se ha encontrado fosforilada en la serina 129 en los cuerpos de Lewi; representa más del 90% de la AS insoluble en cerebros de pacientes con demencia con cuerpos de Lewi, mientras que la fosforilación implica alrededor del 4% de AS normal⁴⁵. Incluso, la AS se puede fosforilar *in vitro* en varios residuos, incluidas las serinas 87 y 129 y tres residuos de tirosina en el C-terminal (tirosinas 125, 133 y 136)⁴⁶. De estos sitios fosforilados, el de la Ser129 es el único que se encuentra ampliamente en tejidos cerebrales de pacientes con EP y trastornos relacionados, lo que sugiere un papel para la fosforilación la patogénesis de la enfermedad⁴⁷.

Más recientemente, se ha tratado se utilizar algunas de estas modificaciones postraduccionales (fosforilación en la Y125, nitración en la Y39 y glicosilación) para usarlas como posibles biomarcadores y así de alguna forma realizar un diagnóstico temprano de la EP midiendo las modificaciones de la AS en sangre humana⁴⁸.

La familia de las sinucleínas.

La AS pertenece a la familia de las sinucleínas⁴⁹. Las sinucleínas son proteínas que se conocen como: α -sinucleína (alfa-sinucleína, AS), β -sinucleína (beta-sinucleína, BS), γ -sinucleína (gamma-sinucleína, GS) y synoretina³⁹. Las sinucleínas tienen en común un dominio altamente conservado de unión a lípidos y sólo se han encontrado en vertebrados. Las proteínas AS y BS se encuentran en el tejido nervioso²⁷, donde se han observado principalmente en las terminales presinápticas, mientras que la proteína GS se encuentra principalmente en el sistema nervioso periférico y la retina. Incluso la AS se ha encontrado en sangre⁴⁹. Las funciones celulares normales no se han determinado para ninguna de las sinucleínas, aunque algunos datos sugieren un papel en la regulación de la estabilidad de la membrana y otras funciones relacionadas. La BS tiene 134 aminoácidos mientras que la GS tiene 127 aminoácidos.

En términos de homología, la BS comparte un 90% de homología con el extremo N-terminal de la AS y 33% con el C-terminal, mientras que la GS comparte un 78% y 6% de homología en el extremo N-terminal y C-terminal, respectivamente con respecto a la AS. En la Figura 3, se muestra un alineamiento de secuencias con las secuencias humanas de las AS (P37840), BS (Q16143) y GS (076070) obtenidas de la base de datos UniProt.

N-terminal region	α	1 :	MDVFMKGLSKAKEGVVFAAEKTKQGVAEAACTKEGVL :	38
	β	1 :	MDVFMKGLSMAKEGVVFAAEKTKQGVTEAAEKTKEGVL :	38
	γ	1 :	MDVFKKGFSTIAKEGVVCAVEKTKQGVTEAAEKTKEGVM :	38
Amyloid-forming region	α	39 :	YVGSKTREGVVHGVATVAEKTKEQVTVVGGAVVTGVTAVAQKTVEGAGSIAAATGFVKKDQLG :	101
	β	39 :	YVGSKTREGVVQGVASVAEKTKEQASHLGGAVFSG-----AGNIAAATGLVKKREFFP :	90
	γ	39 :	YVCAKTRENVVOSVTSVAEKTKEQANAVSEAVVSSVNTVATKTVEBAENIAVTSQVVRKEDLR :	101
C-terminal region	α	102 :	---KNEEGAPQEGILEMPV---DPDNEAYEMPSSEGYQ :	140
	β	91 :	TDLKPEEVA-QEAAEPLIEPLMEPEGESYEDFPQEEYQ :	134
	γ	102 :	PSAPQQEGVASKEKEEVAEEAQSGD----- :	127

Figura 3. Alineamiento de las tres sinucleínas humanas, obtenidas de UniProt. Se resalta en negro los aminoácidos altamente conservados y en gris con similar conservación.

Beta-sinucleína.

La beta-sinucleína es la proteína con mayor homología a la AS, sobre todo en la región del N-terminal. Es una proteína de 137 residuos que no contiene en su estructura la región del NAC que se observa en la AS. Se ha caracterizado como un regulador natural de los efectos amiloidogénicos y tóxicos de la agregación de la AS y en condiciones de la EP, su concentración se encuentra disminuida en comparación con la AS⁵⁰.

Este comportamiento entre la AS y BS tan diferente ha sido estudiado usando RMN y cálculos de dinámica molecular encontrando que la propensión de agregación estriba en los contactos residuales entre las regiones del C- y el N-terminal⁵¹. Por otra parte, recientemente se ha reconsiderado el papel de la BS en la EP, ya que se encontró que la BS interactúa con algunos metabolitos de la dopamina, inhibiendo el proceso de agregación, pero favoreciendo la aparición de otros intermediarios más tóxicos⁵².

Mutaciones familiares de la AS

Las mutaciones en el gen de la AS causan la variedad de la EP familiar, que incluyen a seis mutaciones puntuales (A30P, E46K, H50Q, G51D, A53T y A53E-PARK1). Las primeras mutaciones puntuales como la A53T encontrada en la familia italo-americana y la A30P encontrada en la familia alemana; han demostrado que estas mutaciones conducen a alteraciones motoras y neuronales semejantes a la EP^{53, 54}. La mutación E46K; que fue encontrada en la familia española; se asocia a la demencia con cuerpos de Lewy, la cual es una variante de sinucleopatía con síntomas parkinsonianos⁵⁵. Además, recientemente las nuevas mutaciones encontradas como la H50Q donde se demuestran que está relacionada con el deterioro motor y cognitivo⁵⁶ y la G51D con una forma rápida y progresiva de EP de inicio temprano, con marcados signos piramidales y frecuentes síntomas psiquiátricos⁵⁷.

AS: un ejemplo de proteínas intrínsecamente desordenadas.

La AS también pertenece a una clase de proteínas llamadas intrínsecamente desordenadas. La AS puede adoptar diferentes conformaciones. Cuando la AS interacciona

con la membrana celular; se forman 2 regiones alfa-hélices³⁷. En solución acuosa, al ser una proteína intrínsecamente desordenada, presenta estructura secundaria de “*random coil*”⁵⁸; mientras que, cuando adopta una estructura rica en hojas beta plegadas, puede formar fibras amiloides. Se ha propuesto que la proteína AS puede adoptar una forma tetramérica con 2 alfa-hélices cuando es sobre expresada en *E. coli* o aislada de cultivos neuronales^{59, 60}. Sin embargo, experimentos “in-cell NMR” (resonancia magnética nuclear en célula) han demostrado que la forma nativa in vivo de la AS es un monómero intrínsecamente desordenado⁶¹. Las formas anteriores se resumen en la Figura 4.

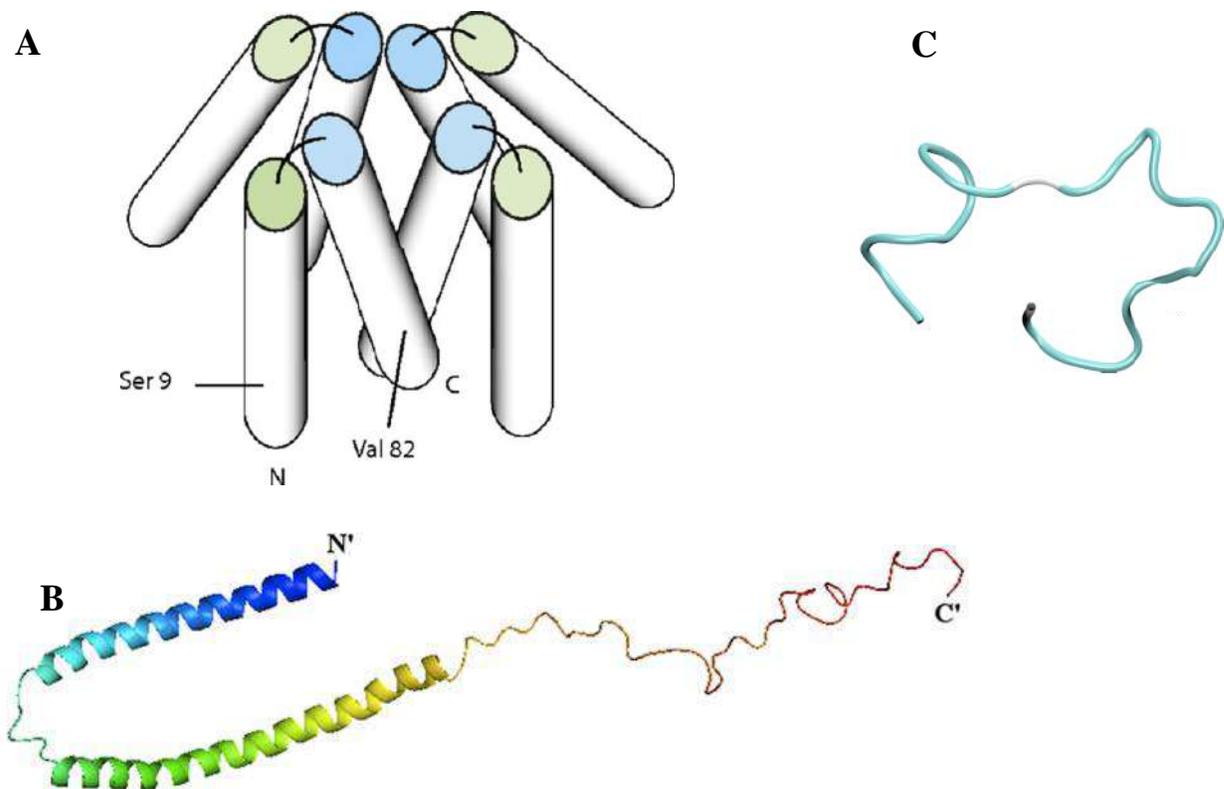


Figura 4. Estructura secundaria de la AS: (A) Tetrámero, (B) Monómero con 2 alfa-hélices (C) Intrínsecamente desordenada. Figura adaptada.

Aunque la etiología de la EP es multifactorial, se sabe que uno de los eventos cruciales es la agregación de la AS, lo cual conduce a que la proteína adquiera estructura secundaria tipo amiloide, rica en estructura hoja beta y encontrada en los cuerpos de Lewy.

Plegamiento y agregación de la AS.

Las proteínas adquieren su estructura secundaria mediante un proceso denominado plegamiento, es decir, su cadena polipeptídica adquiere una determinada conformación tridimensional estable para desempeñar su función biológica⁶². Esta conformación, desde el punto de vista termodinámico es la conformación de mínima energía libre de Gibbs. Sin embargo, este estado nativo es estable en un rango de condiciones reducidas. Cuando una proteína pierde su estructura tridimensional nativa también pierde su función. Para entender esto existe una descripción termodinámica que nos permite bosquejar los diferentes estados en los cuales una proteína puede transitar⁶³: el denominado en inglés “*energy landscape perspective*”. En esta perspectiva se presentan las diferentes conformaciones que puede adoptar una proteína desde su estado nativo, hasta diversos de menor energía y por lo tanto más estables que la propia estructura nativa.

En la Figura 5, se muestra el paisaje energético del plegamiento y agregación de proteínas. La superficie en azul claro muestra la multitud de conformaciones del estado nativo a través de contactos intramoleculares y el área en azul oscuro las que transitan hacia agregados amorfos o fibras amiloides a través de contactos intermoleculares. Ambas partes de la superficie de energía se superponen. La formación de agregados puede ocurrir a partir de intermedios poblados durante el plegamiento *de novo* o por desestabilización del estado nativo y normalmente se previene mediante chaperones moleculares. Los oligómeros tóxicos celulares pueden aparecer como intermediarios fuera de la ruta de la formación de fibras amiloides.

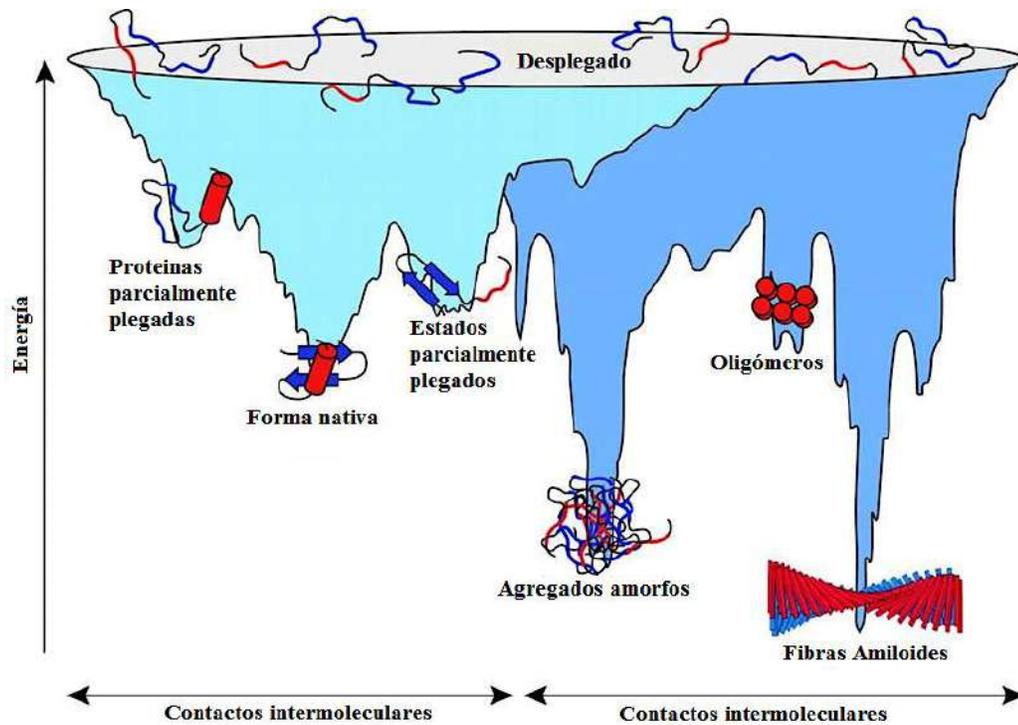


Figura 5. Paisaje energético del plegamiento y agregación de proteínas y sus diferentes especies. Figura adaptada de la referencia⁶⁴

Además, existen ciertas proteínas que poseen regiones con estructura desordenada, y que incluso carecen de estructura ordenada en el estado nativo. Estas proteínas constituyen una familia única a la cual se le han dado distintos nombres: “nativamente desplegadas”, “intrínsecamente desordenadas” o “naturalmente no estructuradas”²². La proteína AS pertenece a esta familia de proteínas. Además, se ha demostrado mediante diversos experimentos que la AS aislada de cerebros que provienen de humanos, ratas y ratones existe en esta forma. Asimismo, la AS que se ha logrado sobre expresar y purificar de *E. coli*, así como en líneas celulares de mamífero (HEK293, HeLa y SH-SY5Y), se presenta como una proteína monomérica no estructurada^{65, 66}.

El término **agregación** puede ser descrito como la aglomeración de proteínas que sucede como resultado de un cambio conformacional a nivel estructura secundaria. Este conglomerado puede ser amorfo u ordenado, como es el caso de las fibras con alto contenido de hojas beta plegadas. Por lo general, los agregados se forman de manera irreversible, porque la barrera energética para regresar al estado nativo es muy alta o porque el

conglomerado es una conformación mucho más estable y de menor energía que el estado nativo⁶⁷.

En la Figura 6 se ilustra cómo, en algunos casos, las proteínas en estado nativo pueden formar un intermediario. Si estos intermediarios interactúan entre sí pueden formar polímeros de pequeñas repeticiones denominados oligómeros. Los oligómeros son especies que sirven de núcleos para la formación irreversible de fibras amiloides. Dependiendo de las condiciones del medio y de la naturaleza de los intermediarios, se pueden formar de manera irreversible los llamados “agregados amorfos”.

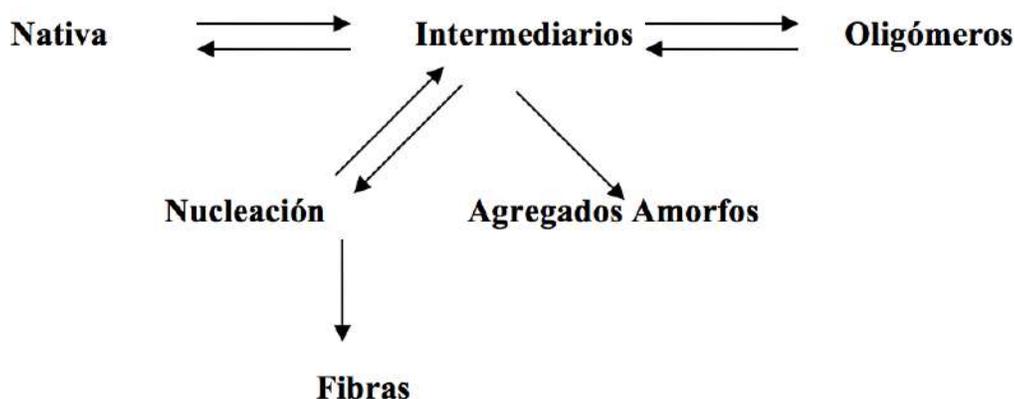


Figura 6. Agregación de proteínas y sus diferentes especies.

La detección de las fibras amiloides, se hace mediante diferentes técnicas, por ejemplo, dicroísmo circular⁶⁸, resonancia magnética nuclear^{69, 70}, fluorescencia y espectroscopía de infrarrojo⁷¹. Desde el punto de vista histórico y experimental, la técnica de fluorescencia fue de las primeras para el estudio de la agregación de proteínas. Para ello se utiliza una molécula llamada Thioflavina T (ThT) (Figura 7), donde el enlace entre los anillos de benzotiazol y aminobenceno permite un movimiento de torsión uno con respecto al otro. Éste compuesto interactúa con las fibras amiloides aumentando su fluorescencia a una longitud de excitación y de emisión de 450 y 480 nm respectivamente⁷². La interacción de ThT con las proteínas amiloides también puede depender de la morfología de las fibrillas, ya que se ha visto que la unión puede resultar lenta al tener una accesibilidad reducida en conjuntos fibrilares grandes⁷³.

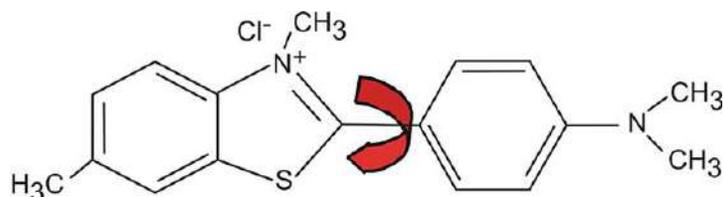


Figura 7. Estructura molecular de la Thioflavina T.

En la Figura 8, se observa cómo la intensidad de fluorescencia del ThT (en rosa) aumenta conforme la conversión a fibras, en la cual se pueden distinguir las siguientes etapas: una fase lag inicial (donde se muestra la proteína en su forma nativa en solución, seguida por una fase de crecimiento exponencial (en la cual se observan la formación de diversas especies como los oligómeros) y finalmente una meseta o fase de saturación, donde se tiene la proteína en su forma fibrilar o de fibra madura⁷⁴. Desde el punto de vista cinético los intermediarios son de corta vida, mientras que las especies de la fase lag y meseta son de mayor estabilidad siguiendo un modelo sigmoideal. El proceso de formación amiloide requiere 2 pasos, la nucleación primaria de los monómeros en solución y la posterior elongación hasta la formación de las fibras⁷⁴.

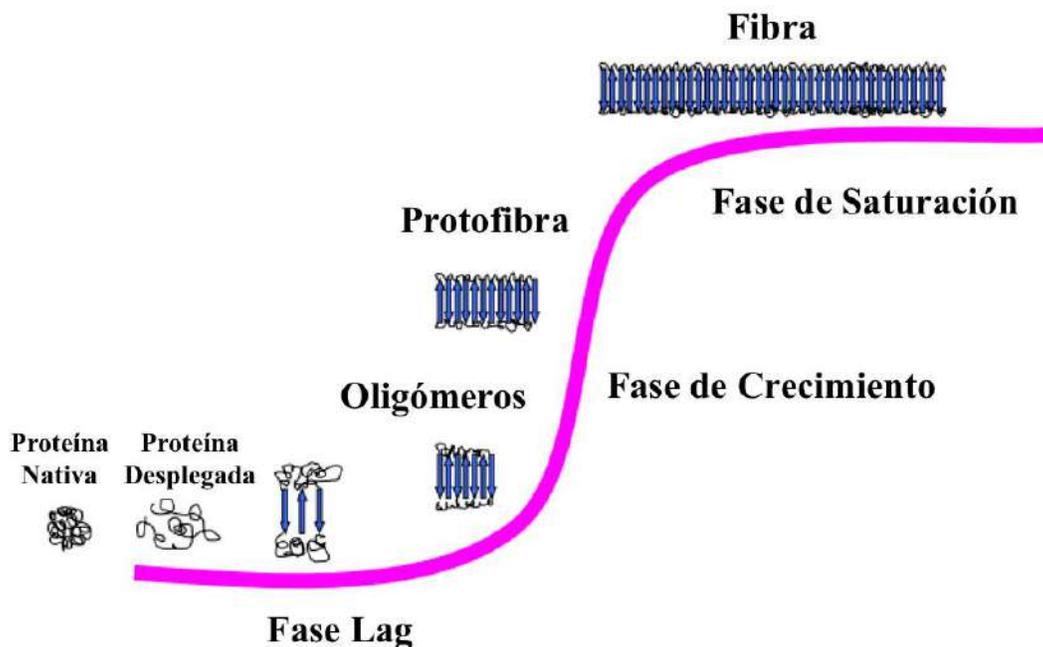


Figura 8. Cinética de agregación de una proteína a su forma amiloide, seguida mediante la intensidad de fluorescencia de la ThT.

En el caso de la proteína AS, se han propuesto diferentes mecanismos de agregación para explicar la formación de los cuerpos de Lewy, en donde se comienza con la forma monomérica de la AS y diferentes causas favorecen la formación de oligómeros solubles, agregados "amorfos", o fibras amiloides que finalmente se observan en los cuerpos de Lewy (Figura 9). La morfología y el tamaño de las especies que se forman durante la agregación de la AS, incluyen diversas formas y tamaños^{75,76}. Estas propuestas están basadas en diversos estudios *in vitro* partiendo de la proteína monomérica en solución. Las especies que son más tóxicas incluyen a los oligómeros y a los intermediarios prefibrilares como se ha demostrado en estudios de cerebros de ratas al inducir mayor estrés oxidativo, mientras que el monómero inicial y la forma fibrilar son menos tóxicos⁷⁷. Los oligómeros son tóxicos debido a que pueden formar una clase de poros que puede afectar la membrana y causar disfunción celular⁷⁵. Incluso las mutaciones familiares de la AS causan un impacto en los agregados observados. Por ejemplo, se observó que las mutaciones A30P y A53T afectaban tanto a la morfología como a la distribución de tamaños de las protofibrillas. En la variante A30P se promueve la formación de protofibrillas anulares parecidas a poros, mientras que la A53T promueve la formación de estructuras protofibrilares anulares y tubulares^{76,78}. En la figura 9, se puede observar un mecanismo en el cual se puede explicar la formación de los cuerpos de Lewy a partir de la agregación de la AS. Este mecanismo ha sido observado en otras enfermedades relacionadas con el mal plegamiento de proteínas.

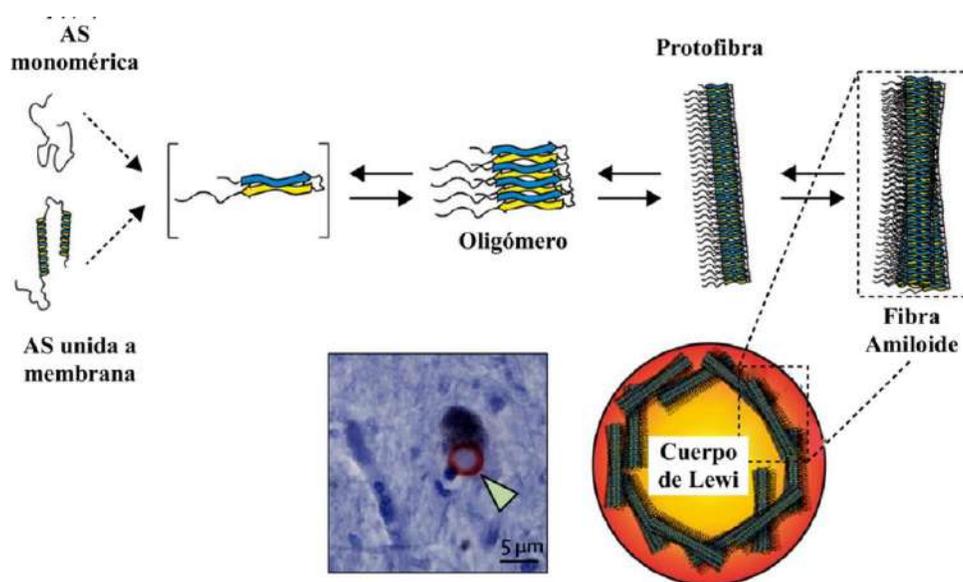


Figura 9. Diversos productos del proceso de agregación de la AS.

La agregación de la AS es modulada por diversos factores⁷⁹, incluyendo metales, pesticidas, las mutaciones genéticas, modificaciones postraduccionales e incluso las interacciones con otras proteínas. Por ejemplo, la AS forma un complejo en relación 2:1 con las histonas, afectando la rapidez de agregación de la AS⁸⁰.

La EP y los iones metálicos

El cerebro es un órgano especializado en usar metales tanto para su función como para mantener sus funciones fisiológicas. Por otro lado, un desajuste en la homeostasis de los metales y/o su exposición puede conducir a la aparición de desórdenes neurológicos⁸¹⁻⁸³.

A partir de estudios epidemiológicos, se ha concluido que los metales tienen relación con la etiología de la EP⁸⁴. Por ejemplo, en el periodo de 1986 a 1988 en Michigan, Estados Unidos se observó que la exposición laboral en industrias relacionadas con metales resultó en una mayor incidencia de casos de EP comparada con la población en ciudades donde no están presentes esta clase de industrias⁸⁵. Posteriormente, un análisis *postmortem* de cerebros de pacientes de EP confirmaron que la concentración de ciertos metales estaba alterada.

Hierro. Mediante espectroscopía de plasma acoplado inductivamente y de absorción atómica se determinó que la concentración de hierro total en la SNpc se incrementó en personas con EP entre un 31% a 35% comparado con el tejido control⁸⁶. Además, se ha observado que la ferritina y la neuromelanina disminuyen en la SNpc⁸⁷. Por otro lado, también se ha demostrado que el Fe³⁺ aumenta significativamente en la SNpc, mientras que Fe²⁺ permanece sin cambios⁸⁸. Incluso, en estudios recientes la sobreexpresión de la AS induce una mayor acumulación de hierro y su redistribución en cultivos neuronales expuestos al hierro⁸⁹.

Manganeso. El manganeso es un elemento que en bajas concentraciones es esencial, ya que es cofactor de varias metaloproteínas como la proteína superóxido dismutasa (MnSOD), aunque en altas concentraciones puede ejercer un efecto neurotóxico. La sobreexposición a Mn conduce a un tipo de parkinsonismo conocido como “manganismo”⁹⁰. El manganismo se

caracteriza por temblores, letargo e impedimentos del habla, acompañados ocasionalmente de psicosis. En este padecimiento, la concentración de Mn está elevada en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, lo cual podría explicar los déficits motores observados en el “manganismo”. Los individuos con parkinsonismo inducido por manganeso pueden parecerse clínicamente a los pacientes con EP idiopática, aunque la síntesis de dopamina parece preservarse en el manganismo⁹¹.

Cobre. El cobre es un metal de transición con varios estados de oxidación: Cu⁰, Cu¹⁺ y Cu²⁺, siendo el Cu²⁺ y el Cu¹⁺ los más relevantes fisiológicamente, ya que se han encontrado en el medio extracelular e intracelular, respectivamente. El contenido de cobre en el cerebro humano está en el rango de 31. a 5.1 µg/g peso húmedo. Mientras que la concentración promedio en el tejido neural es del orden de 0.1 mM, y en ciertas regiones del cerebro, por ejemplo, está de 2 a 3 veces más concentrado en la materia gris que en la materia blanca. En la SNpc, donde se produce dopamina, la concentración de cobre es 0.4 mM, mientras que en la zona responsable del stress y pánico llamada *locus ceruleus* es 1.3 mM.

El cobre tiene efectos ambivalentes en los organismos vivos. Por un lado, el cobre se utiliza como cofactor de ciertas enzimas, como la enzima superóxido dismutasa 1 (SOD1), la ceruloplasmina, la lisil oxidasa, la tirosinasa y la dopamina β-hidroxilasa⁹². Por otro lado, se ha sugerido que ciertas enfermedades neurodegenerativas, como la esclerosis lateral amiotrófica (ALS, por sus siglas en inglés), la enfermedad de Alzheimer y las enfermedades de priones, son el resultado de la alteración en la homeostasis de cobre⁸². Por ejemplo, un defecto en el cromosoma 21, que codifica para la SOD1, está asociado con aproximadamente el 20% de los casos de ALS familiar, esto es aproximadamente el 2% de todos los casos de ALS⁹³. En el caso de la AD, se sabe que el cobre aumenta la formación de placas β amiloides, lo que resulta en la progresión de la enfermedad, y se acumula en las placas β amiloides en una alta concentración (~ 0.4 mM)⁹⁴. También se ha sugerido que la regulación interrumpida de los iones de cobre en el cerebro es un factor clave en la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob y otras enfermedades priónicas⁹⁵. En pacientes con enfermedad de Menkes, por ejemplo, la cantidad de cobre en el cerebro se ve reducida de 2.3 a 0.4-1.7 µg/g peso húmedo.

En la EP, el cobre ha sido implicado en mecanismos de estrés oxidativo, la oligomerización de la AS y por ende la formación de cuerpos de Lewy, así como en la modulación de los neurotransmisores ácido gamma amino butírico tipo A (GABA-A) y N-metil-D-aspartato (NMDA)⁹⁶. En estudios del nivel de cobre en sangre en pacientes con EP con respecto a pacientes sanos, aunque los datos no son exhaustivos, ya que varios estudios diferentes informaron resultados positivos significativos⁹⁷ y también negativos⁹⁸⁻¹⁰⁰, mientras que otros 12 estudios no reportaron diferencia significativa. Sin embargo, los niveles de cobre en líquido cefalorraquídeo mostraron altos niveles en personas con EP en comparación con los controles¹⁰¹⁻¹⁰³.

Interacciones AS y metales.

Como se ha descrito anteriormente, varios estudios epidemiológicos han sugerido que la exposición a ciertos metales o la perturbación en el metabolismo de los metales están involucrados en el inicio de la neurodegeneración⁸⁷. Poco después del descubrimiento de la AS en su forma fibrilar como el principal componente en los cuerpos de Lewy, varios estudios han reportado la unión de metales a la AS, así como sus efectos en la formación de fibras.

Por ejemplo, uno de los primeros trabajos demostró que varios metales en el rango de milimolar y a pH fisiológico interactúan con la AS induciendo un cambio conformacional¹⁰⁴. El impacto estructural más notorio sobre la AS se encontró con los iones metálicos: Al^{3+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} y Co^{3+} , al ser caracterizada por espectroscopia de dicroísmo circular, mientras que al usar el fluoróforo ANS (ácido 8-anilino naftaleno-1-sulfónico), se vio que los iones metálicos favorecieron conformaciones parcialmente plegadas y por ende más propensas a agregar que la proteína en su estado monomérico.

Otros estudios mostraron también que los iones metálicos en concentraciones del orden milimolar, influyen en la agregación de la AS y en la formación de diferentes tipos de agregados, por ejemplo, se ha encontrado que el Cu^{2+} y Zn^{2+} inducen la auto-oligomerización.

Otro grupo, demostró que al interactuar la AS con Mg^{2+} , Al^{3+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} y Zn^{2+} a pH 6.5, el Cu^{2+} demostró ser el más efectivo en generar oligómeros, mientras que el resto de los iones metálicos probados producen una variedad de formas oligoméricas sin una generación significativa de la oligomerización neta¹⁰⁵. Por otro lado, al monitorear mediante microscopía de fuerza atómica (AFM, por sus siglas en inglés: *Atomic Force Microscopy*) la naturaleza de las especies agregadas de AS en presencia de diferentes metales, se encontraron 3 clases de efectos: Cu^{2+} , Fe^{3+} y Ni^{2+} inducen la formación de agregados en forma de partículas esféricas, Mg^{2+} , Cd^{2+} y Zn^{2+} inducen oligómeros más grandes pero con la misma forma, mientras que Co^{2+} y Ca^{2+} indujeron oligómeros aún más grandes "en forma de anillo", los cuales son reconocidos como una de las especies más neurotóxicas.

Posteriormente, trabajos más detallados de Claudio O. Fernández, Andrés Binolfi et al., demostraron mediante ensayos de agregación *in vitro* que los iones divalentes Ni^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} y Cu^{2+} afectan la agregación de la AS, siendo el Cu^{2+} el que acelera más su agregación en condiciones fisiológicamente relevantes y en concentraciones micromolares⁹.

Los estudios anteriores sugirieron que, a pesar de la aparente falta de especificidad de la unión de la AS a metales, el impacto de los metales en los diferentes agregados de la AS está altamente determinado por la naturaleza del metal. La explicación a los cambios conformacionales y la formación de estados parcialmente plegados fue atribuida a la interacción del C-terminal de la AS con carga negativa (debido a la presencia de residuos como Asp y Glu) con la carga positiva de los iones metálicos.

La especificidad de la interacción de la AS con metales entonces fue dirigida hacia elucidar la región o regiones donde se unían los metales al C-terminal, encontrando que diferentes metales se unen alrededor de los aminoácidos 119 a 124 cuya secuencia es ¹¹⁹DPDNEA¹²⁴, pero lo hacen con baja afinidad, es decir con una constante de disociación ($K_d \sim 10^{-3}$ M), la cual fue determinada por diferentes técnicas espectroscópicas de RMN y absorción electrónica^{9, 106}.

Por el contrario, el dominio extremo N-terminal de la AS muestra especificidad hacia el Cu^{2+} . Diversas investigaciones han mostrado que el Cu^{2+} se une a la forma soluble de la proteína AS, tanto en el extremo N-terminal (con mucha mayor afinidad con respecto al C-terminal) y al extremo C-terminal^{106, 107}, mientras que a la forma unida a membrana sólo al extremo N-terminal¹⁰⁸. Incluso, se ha demostrado que Cu^{1+} se une a la forma fisiológica N-acetilada de AS afectando tanto la unión a membrana y la agregación¹⁰⁹.

Otro estudio pudo identificar tres sitios de unión a Cu^{2+} a la proteína AS, dos de ellos con muy alta afinidad, en condiciones de relevancia fisiológica¹⁰⁶. De acuerdo con estudios de unión a Cu^{2+} de la proteína seguidas por RMN en dos dimensiones (HSQC, *Heteronuclear Single Quantum Correlation*, por sus siglas en inglés) los primeros residuos afectados por la adición de Cu^{2+} corresponden a los aminoácidos en el extremo amino terminal y la región alrededor de la Histidina 50. Todo lo anterior coloca al cobre como el metal con mayor relevancia fisiológica con la AS y por ende con la etiología de la EP.

Estrés Oxidativo en la enfermedad de Parkinson.

El estrés oxidativo puede definirse como el desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés *reactive oxygen species*)^{110, 111} y la capacidad de la célula para defenderse contra ellos a través de un conjunto de antioxidantes y enzimas desintoxicantes.

Las ROS son moléculas que pueden participar en múltiples reacciones y que incluyen a diversas especies como el oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$), el radical hidroxilo (OH^\bullet), el anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2)¹¹². Por otro lado la célula tiene como medio de defensa a diversas biomoléculas por ejemplo, a la familia de las superóxido dismutasas (SODs)¹¹³, a la catalasa y el glutatión. En el caso de las SODs, su función es dismutar el anión superóxido a peróxido de hidrógeno. Estas SODs usan diversos metales (Cu, Mn, Zn) como cofactores en el sitio activo para llevar a cabo la dismutación del $\text{O}_2^{\bullet-}$ para producir O_2 y H_2O_2 . Como resultado del desbalance entre la producción de ROS y su eliminación surge el estrés oxidativo causando modificaciones irreversibles provocando

peroxidación de lípidos, oxidación de proteínas, oxidación de ADN y ARN, así como eventual muerte celular¹¹⁴⁻¹¹⁶. Las SODs son tan importantes para la vida que en un experimento donde se pudieron obtener ratones *knockout* que carecían de la enzima MnSOD la mayoría de los ratones murieron dentro de los 10 días posteriores al nacimiento, con anomalías cardíacas, acumulación de grasa en el hígado y el músculo esquelético, acidosis metabólica y daño mitocondrial grave en el corazón¹¹⁷.

El estrés oxidativo es un factor común en las enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, encefalopatía espongiiforme bovina, Huntington y la EP, siendo una consecuencia de la progresión de estas enfermedades. En el caso de la EP, se han observado una serie de fenómenos asociados al estrés oxidativo. Por ejemplo, se encontró que los niveles de ácidos grasos poliinsaturados (un índice de la cantidad de sustrato disponible para la peroxidación lipídica) se redujeron en la SNpc en comparación con otras regiones del cerebro de personas de la misma edad sanas y con EP. Sin embargo, los niveles de malondialdehído basal (MDA, un intermediario en el proceso de peroxidación lipídica) se incrementaron hasta 10 veces en la SNpc en comparación con otras regiones cerebrales¹¹⁸. También, se encontró una pérdida selectiva de glutatión en su forma reducida (GSH) en la SNpc (40% en comparación con los sujetos control), pero no en otras partes del cerebro¹¹⁹. Esta disminución es uno de los primeros cambios bioquímicos que se han observado en la enfermedad, y da como resultado una caída selectiva en la actividad del complejo I mitocondrial, otra característica de la EP¹²⁰. Por otro lado, se ha observado un aumento sustancial en los niveles de SOD en la SNpc y los ganglios basales en pacientes con EP¹²¹.

El estrés oxidativo ya ha sido probado en modelos de Parkinson, por ejemplo, en el caso del modelo producido por 1-metil-4-fenil1,2,3,6-tetrahidropiridinio (MPTP). Se demostró que la enzima NADPH-oxidasa (principal enzima productora de ROS durante la inflamación), está incrementada en la SNpc de humanos y de ratones. Estos cambios coinciden con la producción local de ROS, activación microglial y pérdida neuronal observada después de las inyecciones de MPTP. Los ratones mutantes *knock out* en NADPH-oxidasa exhiben menos pérdida neuronal de DA de SNpc y oxidación de proteínas que sus compañeros de camada después de las inyecciones de MPTP¹²².

Por otra parte, las especies reactivas de nitrógeno (RNS) son moléculas que incluyen al óxido nítrico (NO^\bullet), el radical dióxido de nitrógeno (NO_2) y el peroxinitrito (ONOO^-) que se forma a partir de la reacción entre el anión superóxido con el NO ¹²³. Por otro lado el peroxinitrito se descompone en radical OH^\bullet , el radical NO_2^\bullet y catión NO_2^+ , los cuales son moléculas capaces de dañar las células nerviosas¹²⁴.

Los metales como el Cu, Fe, Mn o Zn son metales esenciales que tienen tanto efectos positivos como negativos en la salud. Pueden mencionarse sus efectos positivos diversos al ser parte de los sitios activos de las SODs catalizando reacciones redox para disminuir el estrés oxidativo. Además, cuando la homeostasis de estos metales es alterada puede causar pérdida de función en ciertas metaloproteínas o inducir su agregación o incluso la producción de ROS¹²⁵.

Un ejemplo de conexión entre los metales, el estrés oxidativo y la neurodegeneración es el caso de la enfermedad de Alzheimer. Una de las características principales es la formación de placas amiloides, donde el componente mayoritario es un péptido denominado beta amiloide ($\text{A}\beta$) el cual resulta de la proteólisis de la proteína precursora amiloide (APP)¹²⁶. Se ha medido la toxicidad del $\text{A}\beta$ y se ha encontrado que forma peróxido de hidrógeno e incluso radical hidroxilo cuando es incubado con Fe en una reacción tipo Fenton¹²⁷. Muchos estudios han mostrado la participación de metales en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer¹²⁸⁻¹³⁰. Incluso se ha propuesto que la Met35 del péptido $\text{A}\beta$ (1-42) es un residuo crítico para su toxicidad y el estrés oxidativo, debido a que al remover este residuo disminuye la neurotoxicidad y el estrés oxidativo del péptido $\text{A}\beta$ (1-42)^{131, 132}. Además analizando la química redox del azufre en la cadena lateral de la Met35 éste es altamente susceptible a la oxidación, formando el radical MetS^+ y reduciendo el Cu^{2+} a Cu^{1+} .¹³³

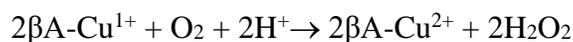
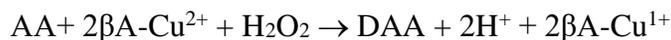
El radical MetS^+ es capaz de experimentar reacciones muy rápidas con el anión superóxido, lo que conduce a la formación de sulfóxido de metionina (MetO). En las placas amiloides, una fracción significativa del péptido $\text{A}\beta$ tiene la Met35 en forma de MetO¹³⁴. Con respecto a la formación de ROS vía el complejo Cu- $\text{A}\beta$, recientemente se ha propuesto

la formación de peróxido mediante el anión superóxido como un intermediario, cuando el complejo Cu-A β se enfrenta a oxígeno en un medio reductor biológico como el ascorbato.¹³⁵

En estudios previos, se ha demostrado que la interacción de la AS con metales puede originar la formación de peróxido, David Allsop, demostró en forma *in vitro* que la AS y un fragmento AS (61-95) cuando son incubados con Fe²⁺ liberan radicales hidroxilos mediante una reacción tipo Fenton, donde ocurren las reacciones Fe²⁺/Fe³⁺ y Cu¹⁺/Cu²⁺, lo cual fue monitoreado por resonancia paramagnética electrónica (EPR) al usar la técnica de atrapadores de spin^{136, 137}. Por otro lado, se encontró que la oxidación de la AS es catalizada por cobre en un medio de lípidos, y además en presencia de Cu²⁺ y H₂O₂, la AS forma oligómeros, que son especies mucho más tóxicas que las fibras¹³⁸. Entonces la asociación de metales a la AS impacta tanto en la agregación de la proteína como en su oxidación y por lo consiguiente en su estructura, en el estrés oxidativo y en la formación de los cuerpos de Lewy. Como parte de este proceso oxidativo se han encontrado aminoácidos oxidados y formación de ditirosinas¹³⁹.



Por otro lado, en el cerebro existen especies como el oxígeno molecular y el ácido ascórbico que se ha sugerido que pueden reaccionar con los complejos $\beta\text{A-Cu}^{2+}$ generando peróxido de hidrógeno. En las siguientes reacciones el ácido ascórbico (AA) está en su forma reducida, mientras que DAA corresponde a la forma del ácido ascórbico oxidada, conocido como ácido dehidroascórbico.



Hierro, estrés oxidativo y EP.

El hierro juega un papel fundamental en el mantenimiento de varias funciones biológicas en todos los organismos vivos, que incluyen el transporte de oxígeno, la

respiración mitocondrial, el crecimiento y la diferenciación celular, así como el sitio activo de algunas metaloenzimas. Dentro del cerebro, el hierro es crucial para mantener los altos requerimientos metabólicos y energéticos de los tejidos neuronales y también participa en la síntesis de mielina, síntesis de neurotransmisores, etc.

La homeostasis del Fe alterada y la disfunción mitocondrial también son características de la EP. Si bien no se han encontrado diferencias significativas en los niveles de Fe en la sangre, suero y el líquido cefalorraquídeo, el Fe se encuentra incrementado en la SN de los pacientes con EP¹⁴⁰. La neuromelanina es un pigmento rico en Fe que se encuentra en las neuronas dopaminérgicas y se ha sugerido que su presencia hace que las neuronas sean vulnerables al daño oxidativo. También se ha propuesto que los niveles disminuidos de ceruloplasmina sérica o su oxidación exacerban la acumulación de Fe en la EP.

La acumulación de Fe en la SN podría estar asociada con una liberación no funcional de Fe a las mitocondrias¹⁴¹. De hecho, se ha descrito un mecanismo dependiente de transferrina/transferrina receptor 2 (Tf/TfR2) para el transporte de Fe a las mitocondrias de las neuronas dopaminérgicas, mientras que también se ha implicado un papel de los genes Tf y TfR2 en la acumulación de Fe y la disfunción mitocondrial que son características en la EP¹⁴².

Actividad redox de complejos metal-sinucleína.

Un estudio espectroscópico demostró que se produce H₂O₂ durante la incubación del péptido βA (1-40) con Fe²⁺ y al mismo tiempo favorece su fragmentación y por consiguiente la formación de radicales orgánicos¹⁴³, detectables por EPR. Los residuos afectados durante la oxidación fueron las metioninas. En la figura 10, se presenta un mecanismo donde existe la participación de radicales para la oxidación del azufre de la metionina.

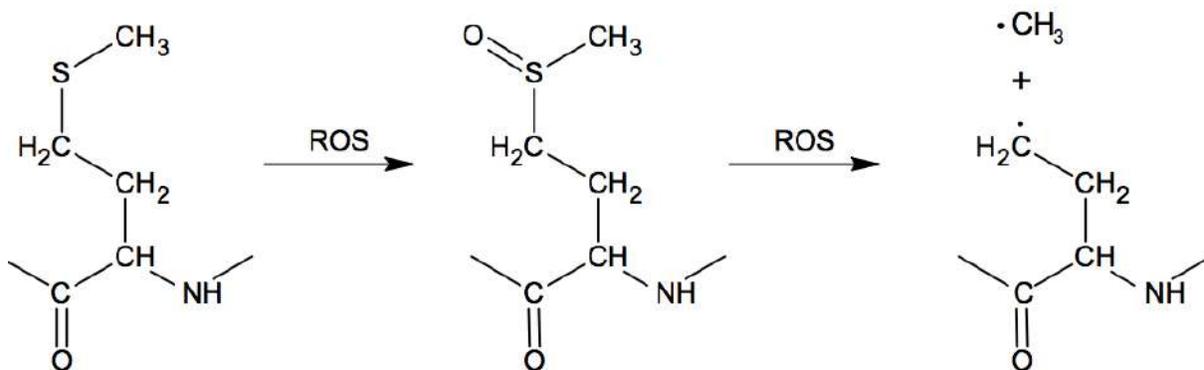


Figura 10. Fragmentación de la cadena lateral de una metionina oxidada mediante ROS.

Figura Adaptada.

Se sabe que las metioninas pueden ser fácilmente oxidadas *in vivo* por diferentes agentes oxidantes como: peróxido de hidrógeno, hipoclorito y peroxinitrito. En el medio celular, la química redox de las metioninas es regulada por las metioninas sulfóxido reductasas (Msr) las cuales reducen el grupo sulfóxido a sulfuro¹⁴⁴.

Por otro lado, se ha observado que el Cu^{2+} es capaz de catalizar la nitración de la tirosina, la cual es otra característica observada en las proteínas involucradas en los desórdenes neurodegenerativos bajo estrés oxidativo¹⁴⁵. En el mecanismo (Figura 11) el complejo de Cu^{2+} mediante una reacción tipo Fenton genera un radical hidroxilo para posteriormente reaccionar con radicales provenientes de la ruta de la oxidación del nitrito NO_2^- al radical $\cdot\text{NO}_2$ que al reaccionar con la tirosina favorece la incorporación del grupo nitro. La AS humana tiene 4 residuos de tirosina, Tyr39 localizado en el extremo N-terminal y los restantes en el C-terminal: Tyr125, Tyr133 y Tyr136. Muchos trabajos han confirmado que la formación de nitrotirosina tiene importantes consecuencias en la toxicidad de la AS¹⁴⁶.

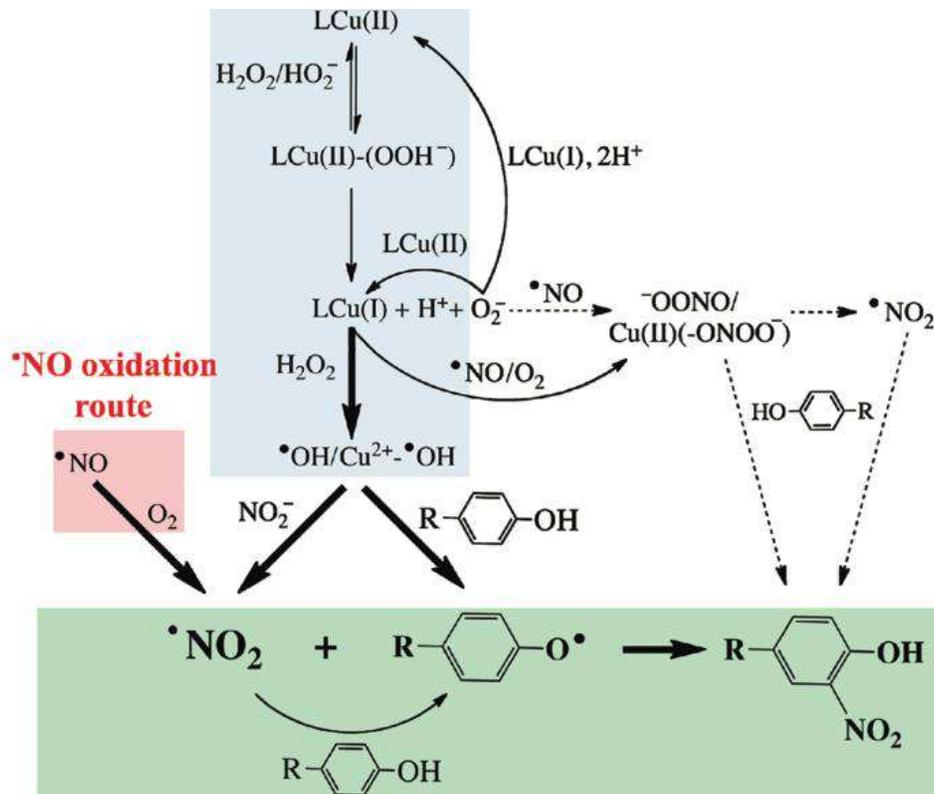


Figura 11. Mecanismo propuesto para la nitración de la Tyr inducido por Cu^{2+} . Figura Adaptada¹⁴⁷

Ambos procesos, el de oxidación de metioninas y el de nitración de tirosinas impactan en la agregación de la AS. Por ejemplo, se ha visto que, en el caso de las metioninas, esta modificación inhibe el proceso de fibrilización y promueve la formación de oligómeros, siendo incluso dependiente del número de metioninas oxidadas. También se ha visto que cuando las 4 metioninas están oxidadas la hidrofobicidad de la AS decrece, con lo cual se incrementa la polaridad de la proteína completa y por lo tanto cambia la estructura secundaria y así formar oligómeros solubles que al acumularse oxidan la dopamina.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La función fisiológica de las proteínas alfa- y beta- sinucleínas aún no se ha elucidado. La AS es el principal componente proteico en los cuerpos de Lewy, asociados a neurodegeneración en la enfermedad de Parkinson. Cuando se inició este proyecto, se tenía evidencia de que los iones metálicos podían acelerar la agregación amiloide de la AS, siendo el cobre el que causaba un efecto más grande. Sin embargo, se desconocía cómo éste, y otros metales, se coordinan a la AS y a su proteína homóloga BS. Dado que las interacciones cobre-AS y cobre-BS son importantes, tanto a nivel fisiológico, como patológico, en este proyecto, se plantearon las siguientes preguntas: ¿Cuántos de sitios de unión a Cu^{2+} presenta la AS a lo largo de su secuencia? ¿Será posible modelar estos sitios mediante fragmentos peptídicos? Dada la homología entre AS y BS ¿Se parecen los sitios de unión a cobre entre estas dos proteínas? ¿Cuál es la mínima secuencia necesaria para modelar cada sitio de unión? ¿Estos sitios presentan actividad redox? ¿Existe alguna relación entre la actividad redox de los sitios y las modificaciones oxidativas que sufre la AS? Estas preguntas serán resueltas desde el punto de vista de la química bioinorgánica.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Las proteínas AS y BS tienen sitios independientes y específicos de unión a Cu^{2+} , que involucran al grupo N-terminal y la única histidina en sus secuencias. Fragmentos peptídicos de estas proteínas pueden constituir un buen modelo de los sitios de unión al metal, porque las sinucleínas son proteínas intrínsecamente desordenadas. De acuerdo con su secuencia, la unión de Cu^{2+} al extremo N-terminal y al sitio de histidina dará lugar a complejos con esferas de coordinación muy similares entre las proteínas AS y BS. La presencia de metioninas en el sitio del extremo N-terminal favorecerá la reducción de Cu^{2+} a Cu^{1+} , siendo este efecto mayor para la BS (contiene tres metioninas) que para la AS (contiene 2 metioninas). La reactividad de los complejos de Cu^{1+} con oxígeno puede dar lugar a eventos de oxidación sobre estas proteínas. El estudio de los complejos de Cu^{2+} con las sinucleínas es importante para entender algunas de las características patológicas de la enfermedad de Parkinson.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Estudiar los sitios de unión a Cu^{2+} en las proteínas AS y BS.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Estudiar los sitios de coordinación de Cu^{2+} en las proteínas AS y BS mediante diversas técnicas espectroscópicas, como dicroísmo circular, absorción electrónica en la región UV-Vis y resonancia paramagnética electrónica.
- Elucidar la esfera de coordinación de Cu^{2+} en el sitio del N terminal de la AS.
- Evaluar el rol de las metioninas 1 y 5 en la coordinación a Cu^{2+} en el N-terminal y su química redox.
- Caracterizar cinéticamente la reducción y reoxidación del complejo Cu-AS (1-6) y compararlo con el complejo Cu-BS(1-15).
- Estudiar la reactividad frente a oxígeno del complejo reducido Cu^{1+} -AS y caracterizar los productos de la reoxidación.
- Estudiar y comparar los sitios de unión de Cu^{2+} a las histidinas de la AS y BS.

CAPÍTULO 1. LOS SITIOS DE UNIÓN A Cu^{2+} EN LA PROTEÍNA ALFA-SINUCLEÍNA

SECCIÓN 1.1 Identificación de sitios de coordinación a Cu^{2+} en la proteína AS

Con el objetivo de identificar los sitios de unión a Cu^{2+} en la proteína AS, se realizaron titulaciones de la proteína AS con Cu^{2+} , seguidas por resonancia paramagnética electrónica (**EPR** por sus siglas en inglés) y dicroísmo circular electrónico (**CD** por sus siglas en inglés).

La proteína AS fue titulada con Cu^{2+} , la cual fue monitoreada por EPR a pH 7.5. En la titulación se observa un conjunto de señales (indicados en la Figura 1, como el juego de señales A) con valores $g_z=2.25$ y $A_z=184$ G, los cuales indican una coordinación ecuatorial 2N2O de acuerdo con las gráficas de Peisach y Blumberg (Ver Anexo A1)¹⁴⁸. Después del primer equivalente de Cu^{2+} , se observa un segundo conjunto de señales (indicados como el juego de señales B, Figura 1), cuyos valores $g_z=2.32$ y $A_z=157$ G indican una coordinación 1N3O. Finalmente, entre 2 y 3 equivalentes de Cu^{2+} , aparece un tercer juego de señales (indicados como C, Figura 1), con valores $g_z=2.36$ y $A_z=137$ G, que indican un modo de coordinación 4O. Cada juego de señales indica un modo de coordinación independiente del Cu^{2+} unido a la proteína AS. A mayor concentración de cobre, aparecen señales que corresponden al Cu^{2+} en solución (datos no mostrados), indicando que la proteína AS coordina hasta 3 equivalentes de Cu^{2+} a pH 7.5

Estos resultados indican que la AS tiene 3 sitios independientes de unión a Cu^{2+} , con modos de coordinación diferentes: el **sitio 1**, de mayor afinidad, tiene un modo de coordinación 2N2O; el **sitio 2** tiene un modo 1N3O, mientras que para el **sitio 3** el modo de coordinación es rico en ligantes basados en oxígeno (4O). De la química de coordinación de Cu^{2+} en sistemas biológicos se sabe que los ligantes comunes son los que están basados en oxígeno, azufre y nitrógeno y que provienen de las cadenas laterales de los aminoácidos como cisteína, metionina en el caso del azufre, histidina en el caso del nitrógeno y el grupo carboxilato de aminoácidos como aspártico para el oxígeno.

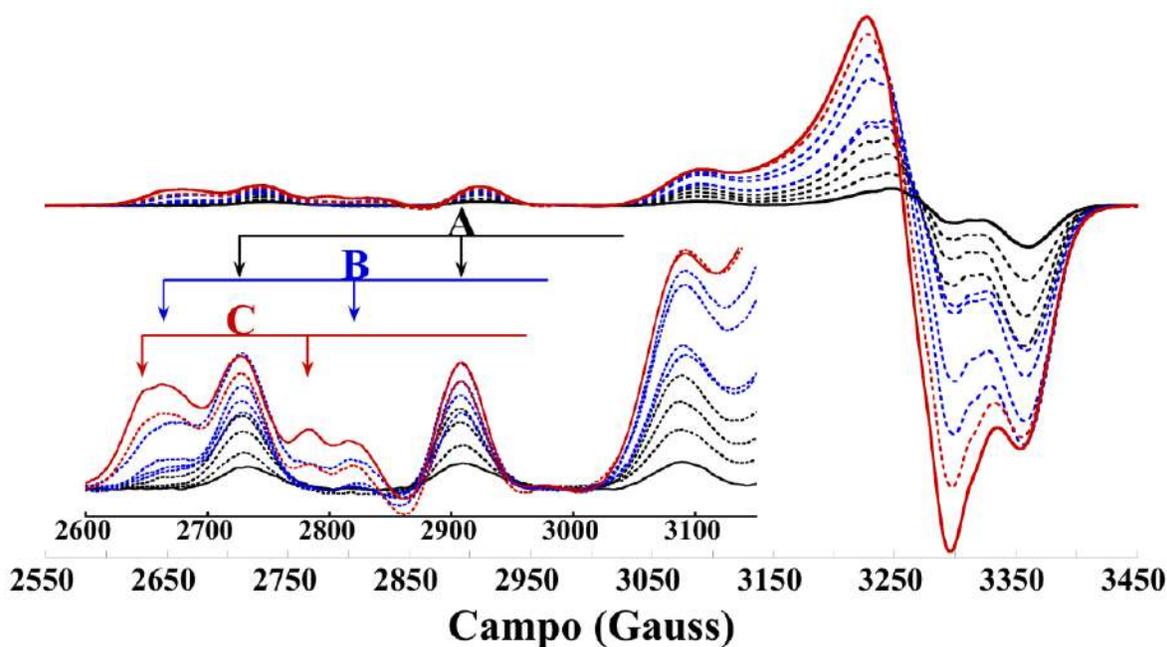


Figura 1. Titulación de la AS en solución amortiguadora MOPS 20 mM, 100mM NaCl a pH 7.5, adicionando Cu^{2+} de 0.25 (negro) a 3 equivalentes (rojo), cada 0.25 equivalentes, seguida por EPR Banda-X a 150 K. El juego de señales denotadas como “A” corresponden a valores $g_z=2.25$; $A_z=184$ G; mientras que las señales “B” corresponden a valores $g_z=2.32$; $A_z=157$ G y finalmente las señales en “C” $g_z=2.36$ y $A_z=137$ G.

Para complementar la caracterización de los sitios de unión a Cu^{2+} en la proteína AS, se realizó la titulación seguida por dicroísmo circular. El espectro de CD de la titulación de la AS con Cu^{2+} en solución amortiguadora MES a pH 7.5, se caracteriza por la aparición hasta 1 equivalente de una banda d-d positiva a 16900 cm^{-1} ($\Delta\epsilon=0.22\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), mostrado en el espectro rojo en la Figura 2, también muestra una banda negativa de transferencia de carga de ligante a metal (LMCT) a 33000 cm^{-1} ($\Delta\epsilon=-1.1\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), originada por una amida desprotonada $[(\text{N}^-)\text{-Cu}, 295 - 315\text{ nm}]$, mientras que la transición a 42600 cm^{-1} podría ser asignada a una LMCT del grupo NH_2 terminal a Cu^{2+} . En la literatura existen reportes para las transiciones asociadas a bandas LMCT que se originan debido a la coordinación del grupo NH_2 -terminal al Cu^{2+} , los valores varían en el rango de $245\text{-}278\text{ nm}^{149-152}$. Para la banda LMCT asociada a la interacción del Cu^{2+} con una amida desprotonada de la cadena peptídica $[(\text{N}^-)\text{-Cu}]$, normalmente aparecen en el rango de $295\text{-}315\text{ nm}^{150}$.

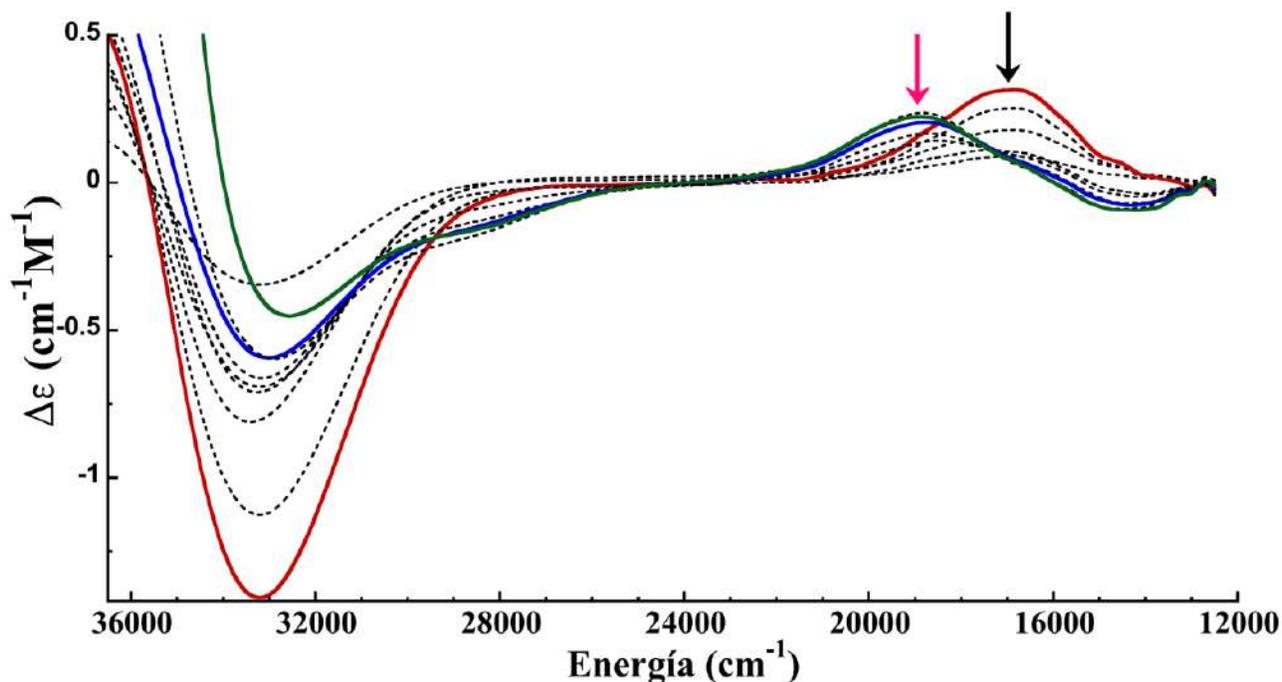


Figura 2. Titulación de la AS seguida por CD en solución amortiguadora MES a pH 6.5, adicionando Cu^{2+} de 0.25 (negro) a 3 equivalentes (verde), cada 0.25 equivalentes, a temperatura ambiente. La flecha en color negro denota el juego de señales del primer sitio, mientras que, en color rosa, denota al segundo sitio. Se remarcan los espectros de los complejos de AS con Cu^{2+} : 1 equivalente (rojo), 2 equivalentes (azul) y 3 equivalentes (verde).

Después de la adición de 1 equivalente de Cu^{2+} , se observa el crecimiento de un segundo juego de señales formado por: una banda d-d positiva a una energía de 19000 cm^{-1} ($\Delta\epsilon=0.201 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), un hombro a 28300 cm^{-1} ($\Delta\epsilon=0.201 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) una banda de transferencia de carga positiva a $38\ 235 \text{ cm}^{-1}$ ($\Delta\epsilon=0.925 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), la cual corresponde a Cu^{2+} unido al nitrógeno del anillo imidazol de la Histidina (π_2), $[(\text{N}_{\text{Im}})\text{-Cu}$, 245 - 260 nm]. Por último, después de la adición de más de 2 equivalentes de Cu^{2+} ya no se observan cambios en los espectros de CD, lo cual sugiere que el sitio 3 no da lugar a señales en el CD, es decir, no es un complejo quiral de Cu^{2+} .

Para entender estos resultados, de diferentes estudios de complejos de Cu^{2+} con este tipo de ligantes se conoce que la interacción de un grupo imidazol con este ion metálico da lugar a tres transiciones tipo LMCT¹⁴⁹⁻¹⁵¹:

$N_{Im} \sigma \rightarrow Cu$ a 45454 cm^{-1} ($\sim 220 \text{ nm}$)

$N_{Im} \pi_1 \rightarrow Cu$ entre $35714 - 28985 \text{ cm}^{-1}$ (280-345 nm)

$N_{Im} \pi_2 \rightarrow Cu$ entre $40800 - 38500 \text{ cm}^{-1}$ (245-260 nm)

Por último, para completar la caracterización se realizó la titulación de la proteína completa AS, seguida por absorción electrónica en la región del UV-Vis, hasta 3 equivalentes (Figura 3), donde se muestra claramente que la adición de Cu^{2+} ocasiona el crecimiento de una señal poco intensa a 35714 cm^{-1} (280 nm), que corresponde a la absorción del enlace amida y también se observa mucho menos intensa una banda d-d a 16393 cm^{-1} (610 nm), que crece de 0 a 3 equivalentes (acercamiento en Figura 3). Debido a que la definición de las transiciones electrónicas AS- Cu^{2+} en el espectro de absorción son poco intensas, en parte a que una transición d-d es prohibida por dipolo eléctrico, es conveniente usar dicroísmo circular Electrónico para resolver las transiciones de las interacciones metal proteína, de tal forma que se puede apreciar el crecimiento de señales diferentes dependiendo de la cantidad de Cu^{2+} añadida al péptido, tal como se observa en la Figura 2 en la región d-d del espectro.

En conjunto, los resultados de EPR y CD indican que existen tres sitios de unión a Cu^{2+} en la proteína AS. El **sitio 1** corresponde al sitio de mayor afinidad y está caracterizado por un modo de coordinación ecuatorial 2N2O, una banda d-d positiva a 16900 cm^{-1} y dos LMCT negativas a 33000 cm^{-1} y 42600 cm^{-1} , que sugieren coordinación a amidas desprotonadas y un grupo NH_2 -terminal. El **sitio 2**, corresponde a un modo de coordinación 1N3O, y presenta una banda d-d- positiva a 19000 cm^{-1} y una LMCT negativa a 33000 cm^{-1} que sugiere la participación de una histidina en la coordinación del metal. Por último, el sitio 3 corresponde un modo de coordinación rico en oxígenos (4O), y no presenta señales en CD, lo cual sugiere que se trata de un complejo de Cu^{2+} no quiral, en el que participan posiblemente ligandos basados en oxígeno como grupos carboxilato y moléculas de agua.

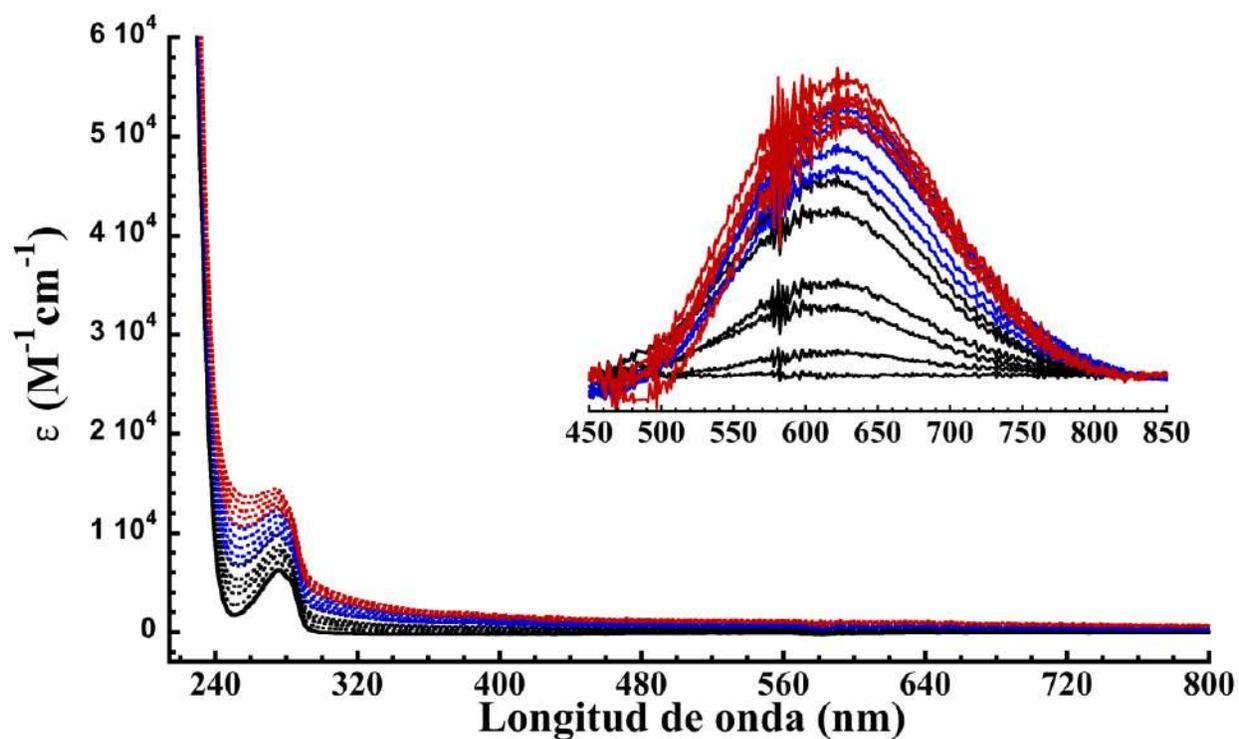


Figura 3. Titulación de la AS seguida por absorción electrónica en solución amortiguadora MES a pH 6.5, adicionando Cu^{2+} de 0.2 (negro) a 3 equivalentes (rojo), cada 0.2 equivalentes, a temperatura ambiente. Los espectros en color negro son de 0.2 a 1 equivalentes, mientras que en azul de 1.2 a 2 equivalentes, y en rojo de 2.2 a 3 equivalentes.

SECCIÓN 1.2 Evaluación del papel de la Histidina 50 en la unión de Cu^{2+} a la AS

El cobre que se encuentra unido a la mayoría de las proteínas está coordinado a las cadenas laterales de las histidinas, cisteínas y metioninas, ya que el ion Cu^{2+} puede coordinarse vía los átomos de azufre, oxígeno o nitrógeno de dichos aminoácidos. Por otro lado, la proteína AS contiene una única histidina en la posición 50, incluso este residuo es conservado en la proteína homóloga la beta-sinucleína, pero en la posición 65. Para caracterizar la unión de cobre a la proteína AS, se dispuso de una variante de la AS con la mutación H50A, donde la Histidina de la posición 50 es reemplazada por Alanina, esto con el fin de evaluar si uno de los nitrógenos que participa en el sitio de coordinación proviene del anillo imidazol de la cadena lateral de la histidina (Figura 4).

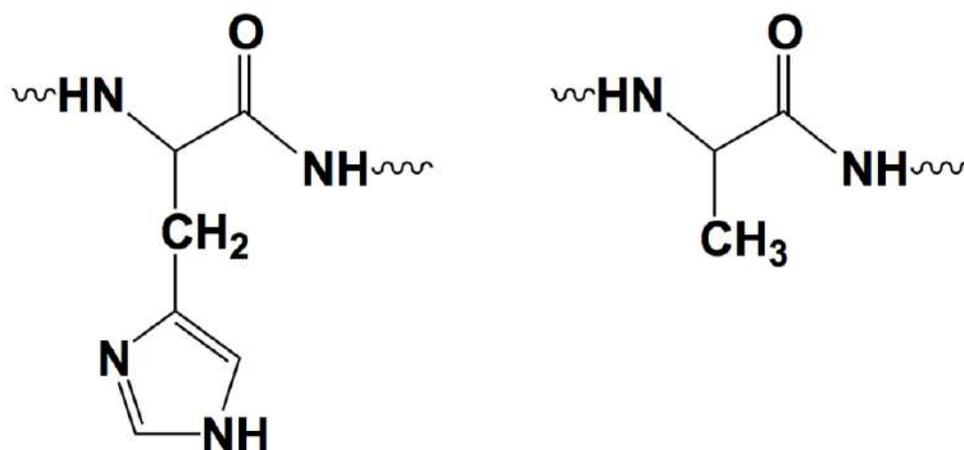


Figura 4. Representación de los aminoácidos en una cadena peptídica: histidina (derecha) y alanina (izquierda), haciendo énfasis en sus cadenas laterales.

La proteína AS_H50A fue titulada con Cu^{2+} a pH 7.5 y monitoreada por EPR, y en la Figura 5 se muestra que con la adición del metal crece un conjunto de señales en el espectro con valores $g_z=2.24$ y $A_z=181$ G, los cuales indican una coordinación 2N2O. Este juego de señales es idéntico a las del **sitio 1**, el cual ya se había identificado en la proteína nativa, la cual contiene la His50. Este resultado indica que este residuo no participa en la esfera de coordinación del sitio 1. Una vez saturado el primer sitio, se observa el crecimiento de un segundo juego de señales con valores $g_z=2.35$ y $A_z=139$ G, los cuales indican una coordinación de 4O. Cabe resaltar, que estas señales tienen valores a los observados para el **sitio 3** en la proteína AS nativa, y que en ningún momento de la titulación se observaron las

señales de EPR asociadas al **sitio 2** en la AS nativa. Estos resultados sugieren que la His50 podría participar como ligante ecuatorial para el **sitio 2**, que tiene el modo de coordinación 3N1O y que no participa en el **sitio 1**, ni en el **sitio 3**.

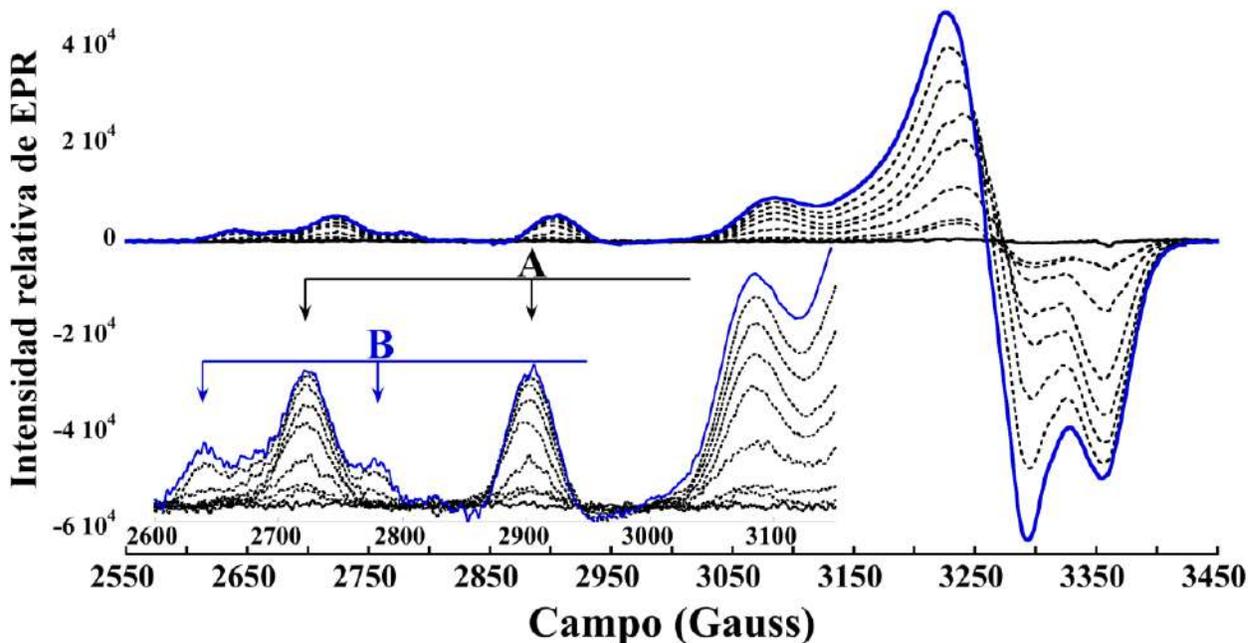


Figura 5. Titulación de AS_H50A con Cu²⁺ de 0 (rojo) a 2 equivalentes (azul) de 0.25 en 0.25 equivalentes seguida por EPR Banda-X a 150 K. Las señales “A” corresponden a las del sitio 1, mientras que el juego de señales “B” a las del sitio 3.

1.2.2. Comparación entre la AS y la AS H50A.

Para complementar la caracterización, se comparó el **sitio 1** de Cu²⁺ de la proteína AS y de la AS H50A, por EPR y por CD. Para hacer una comparación de 2 o más espectros por EPR, es adecuado hacer esta comparación usando el valor g_z , en lugar del campo magnético. En la Figura 6, se observa que el sitio es el mismo, con valores $g_z= 2.25$ y $A_z= 184$ G, los cuales correlacionan para el mismo modo de coordinación 2N2O.

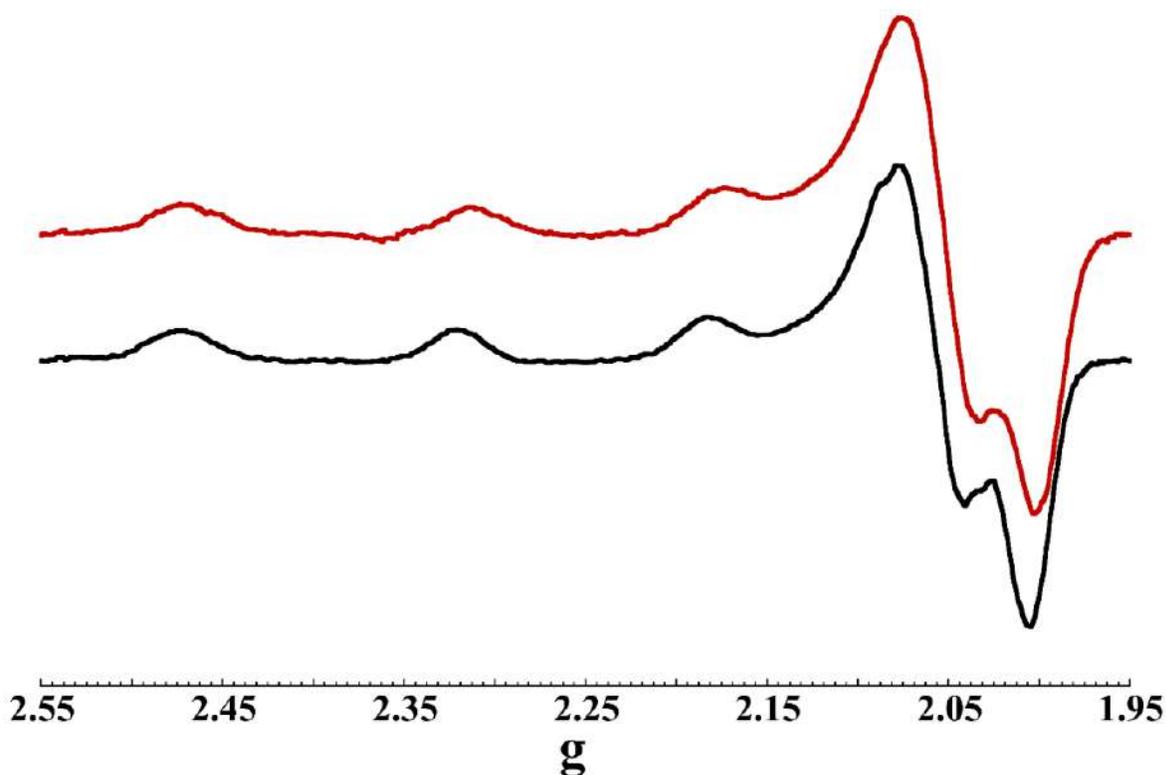


Figura 6. Comparación de los espectros de EPR Banda-X de los complejos de la AS (rojo) y AS_H50A (negro) con Cu^{2+} en solución amortiguadora MOPS 20 mM, 100mM NaCl a pH 7.5 con un equivalente de Cu^{2+} , a 150 K.

Cabe mencionar que en ambas proteínas el complejo de Cu^{2+} , que se muestra en la comparación por EPR es un complejo en relación de 1:0.9 equivalentes, para evitar saturar el sitio y que aparezcan señales debido a otro sitio de coordinación.

En la Figura 7, al graficar los complejos de Cu^{2+} de ambas proteínas a la misma concentración, se observa que los espectros de CD se caracterizan por la presencia de dos bandas con la misma intensidad y en la misma energía: una banda d-d positiva a 16900 cm^{-1} ($\Delta\epsilon=0.22 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y una banda negativa de transferencia de carga de ligante a metal (LMCT) a 33000 cm^{-1} ($\Delta\epsilon=-1.1 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$),

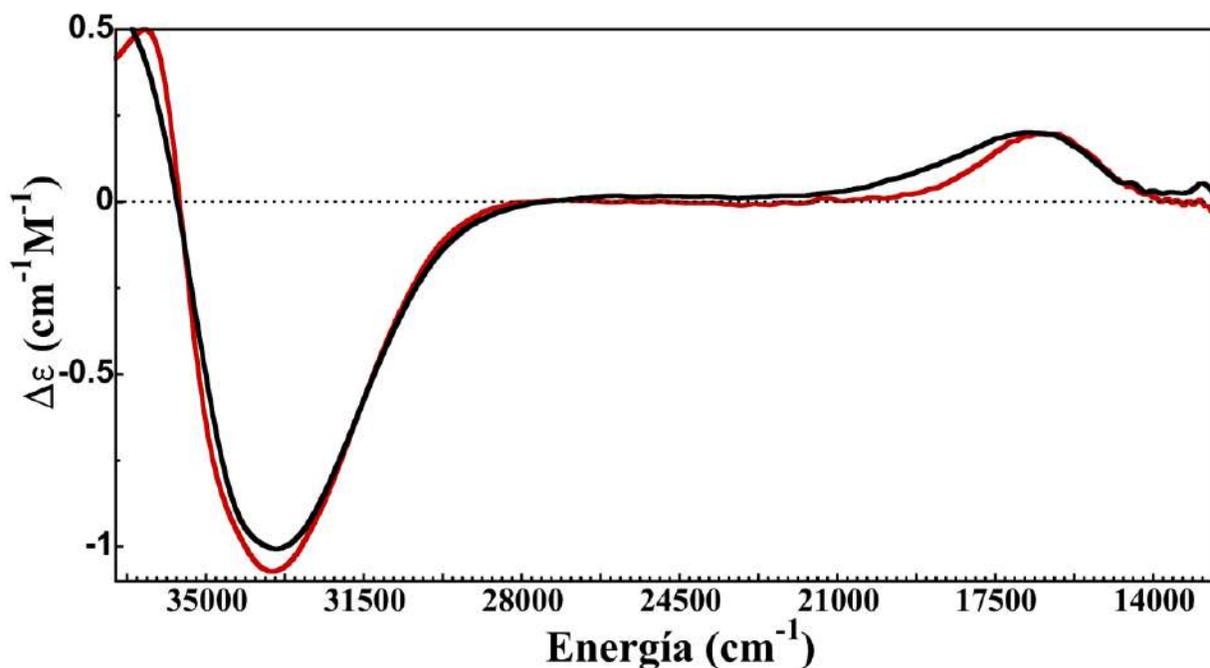


Figura 7. Comparación de los espectros de CD de los complejos de Cu^{2+} con la AS (rojo) y la variante AS_H50A (negro) en solución amortiguadora MOPS 20 mM, 100mM NaCl a pH 7.5, con un equivalente de Cu^{2+} .

Para caracterizar la especificidad de la unión de cobre a la proteína AS, se dispuso de una variante de la AS con la mutación H50A y además sin el extremo C-terminal, es decir su estructura comprende los primeros 108 residuos de los 140 de la estructura completa, a la cual llamaremos AS (1-108) H50A; esto con el fin de determinar dónde se encuentra el sitio de unión a Cu^{2+} en la proteína completa al no tener el C-terminal ni la presencia de la His50.

De estudios anteriores, se sabe que una sección del C-terminal de la AS, interactúa con el extremo N y con cierta parte de la región del NAC (85-95). Estas interacciones a larga distancia previenen la oligomerización espontánea de la AS y son importantes en el entendimiento de los procesos de agregación. Por lo tanto, entender la interacción específica de cobre a alguna de estas regiones nos puede dar idea del papel del cobre en este tipo de interacciones y de la agregación misma. Al comparar el sitio de unión a Cu^{2+} en la proteína completa con el complejo formado con AS (1-108) H50A (Figura 8) a la misma concentración de cobre y a pH 6.5, se observa que el sitio es casi idéntico.

Los parámetros EPR para el sitio extraídos del espectro en azul de la Figura 8, tiene valores $g_z=2.23$ y $A_z=193$ G, los cuales correlacionan para el mismo modo de coordinación 2N2O del sitio 1 en la proteína

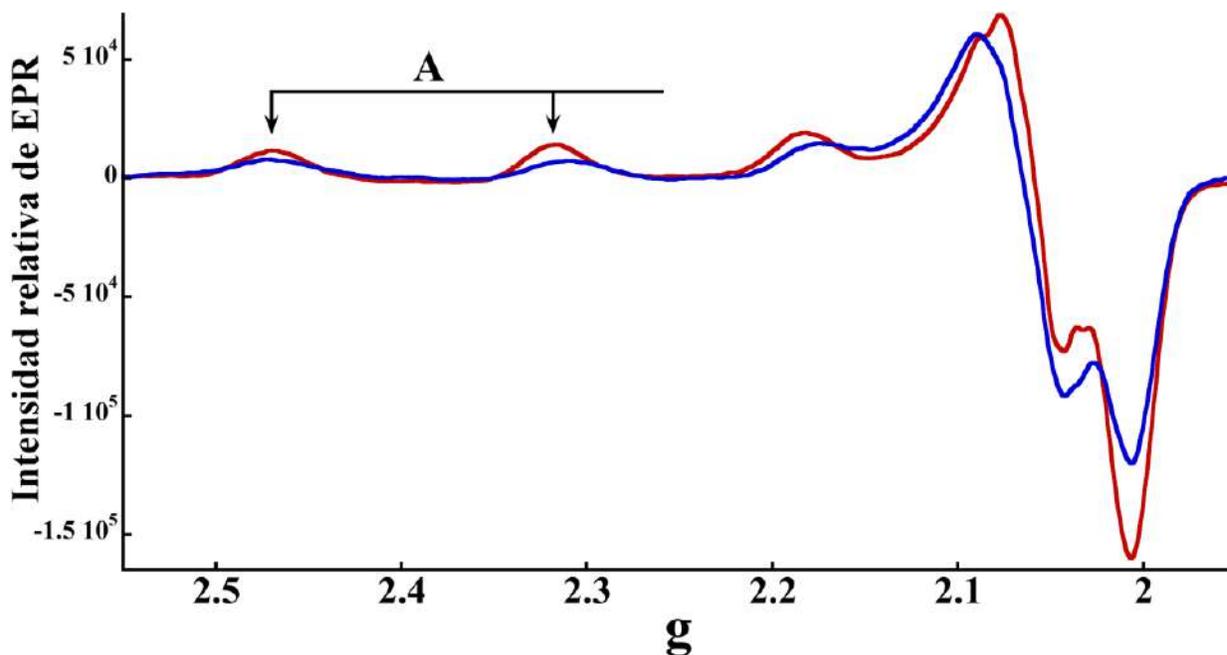


Figura 8. Comparación de los espectros de EPR Banda-X de los complejos de la AS (rojo) y AS (1-108) H50A (azul) con Cu^{2+} en solución amortiguadora MOPS 20 mM, 100mM NaCl a pH 7.65 con 0.5 equivalentes de Cu^{2+} , a 150 K.

De la comparación anterior, se puede concluir que el sitio 1 de la proteína AS se encuentra en la región del extremo N-terminal. Nuestra observación coincide con lo investigado por el grupo del Dr. Claudio O Fernández, ya que al mapear la interacción de la AS nativa con concentraciones que van de 0 a 60 μM de Cu^{2+} a pH 6.5 mediante una serie de experimentos de resonancia magnética nuclear (RMN) HSQC ^1H - ^{15}N , se observaron cambios en los residuos 3-9 y 49-52 y otros cambios menos significativos en los residuos 110-140¹⁰⁶. Asimismo, esto es consistente con nuestros resultados de la caracterización mediante EPR, CD y UV, ya que encontramos 3 sitios independientes. También, el Dr. Fernández y colaboradores determinaron la dependencia del sitio 1 en un rango de pH 5 a 6.5, encontrando que el Cu^{2+} no se une al sitio 1 a valores de pH por debajo de 5.

De la misma manera, concluyeron por RMN los cambios en los residuos 3-9 y 49-52 son de la misma magnitud, lo cual también es consistente con nuestros resultados de CD y EPR, donde se observa que existen dos sitios de alta afinidad por Cu^{2+} , siendo el sitio 1 el de mayor afinidad.

En general, de acuerdo con la caracterización espectroscópica de las proteínas AS, H50A y AS CT H50A, se concluye que el **sitio 1** es el sitio de anclaje a Cu^{2+} en el extremo N-terminal y que este sitio aparece primero, teniendo un modo de coordinación 2N2O. Además, la His50 participa en otro sitio independiente al cual denominamos **sitio 2** con un modo de coordinación 1N3O. Mientras que el sitio que aparece después de llenarse el sitio 1 y 2 lo llamaremos **sitio 3**, el cual tiene un modo de coordinación 4O. En particular, el grupo de Claudio O Fernández encontró que el sitio 3 está asociado a residuos en la región C-terminal, incluyendo a los residuos Asp121, Asp129, Asn122 y Glu123, donde los átomos donadores son los oxígenos de las cadenas laterales de estos aminoácidos para completar el modo 4O observado mediante EPR. Por lo anterior, y dado que el sitio 1 es el sitio de mayor afinidad por Cu^{2+} , se procederá a caracterizar la esfera de coordinación del metal en este sitio.

SECCIÓN 1.3. Evaluación del papel del extremo N-terminal en la unión de Cu^{2+} a la AS

Dado que la AS es una proteína intrínsecamente desordenada, el estudio de los sitios de unión a Cu^{2+} utilizando péptidos como modelo de la proteína completa es una estrategia que ha resultado exitosa. Con el objetivo de identificar los residuos que participan en el **sitio 1** que corresponden a la unión de Cu^{2+} al extremo N-terminal en la proteína AS, se procedió a sintetizar el péptido AS (1-15), el cual tiene la secuencia $^1\text{MDVFMKGLSKAKEGV}^{15}$. En el péptido sintético, el grupo amino de la metionina 1 quedó libre, tal como lo encontraríamos en la proteína completa y el carboxilo en el C-terminal quedó amidado, ya que usamos esta modificación en la síntesis química de péptidos en fase sólida.

El fragmento AS (1-15) se tituló con cantidades crecientes de Cu^{2+} , con el objetivo de conocer la estequiometría y conocer si esta secuencia es capaz de coordinar más de un

equivalente. La titulación fue seguida por CD. En la Figura 9, se observa que el espectro se caracteriza por la aparición de una banda d-d positiva a 16900 cm^{-1} ($\Delta\epsilon=0.22\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y una banda negativa de transferencia de carga de ligante a metal (LMCT) a una energía de 33000 cm^{-1} ($\Delta\epsilon=-1.1\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), la cual corresponde a una transición de ligante a metal originada por una amida desprotonada [(N-)-Cu, 295 - 315 nm]. Estas transiciones son muy similares a las observadas en la proteína completa. Por otro lado, estas señales se saturan después de la adición de un equivalente, esto quiere decir que la secuencia AS (1-15) sólo coordina un equivalente de Cu^{2+} .

El AS (1-15) también se tituló con cantidades crecientes de Cu^{2+} y se siguió por espectroscopia de EPR. En la Figura 10, se observa que el espectro se caracteriza por un conjunto de señales (A, Figura 10) con valores $g_z=2.25$ y $A_z=184\text{ G}$, los cuales indican una coordinación ecuatorial $2\text{N}2\text{O}$ y que también corresponde al sitio 1 de la proteína AS. Después de un equivalente de Cu^{2+} , aparecen otras señales (azul, Figura 10) que corresponden a cobre en solución, es decir metal no coordinado al fragmento, lo cual es consistente con lo observado por CD.

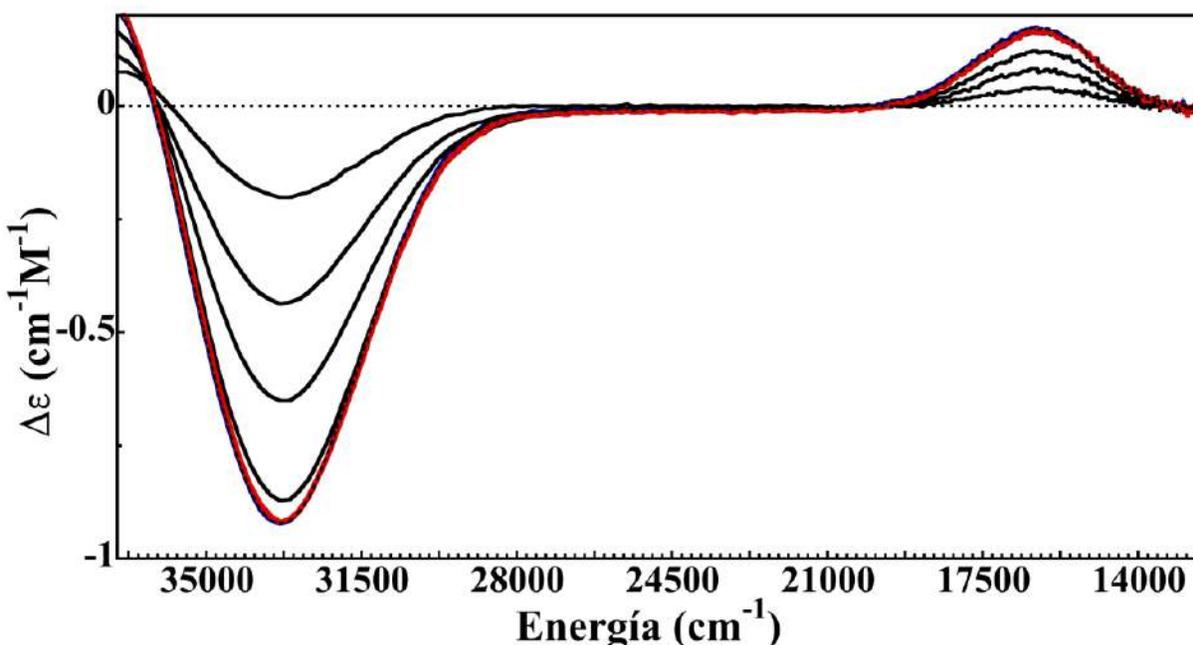


Figura 9. Titulación del péptido AS (1-15) en solución amortiguadora MES a pH 6.5, adicionando Cu^{2+} de 0.2 a 2 equivalentes, cada 0.2 equivalentes, a temperatura ambiente. En rojo aparece el espectro del complejo AS (1-15)- Cu^{2+} en relación 1:1.

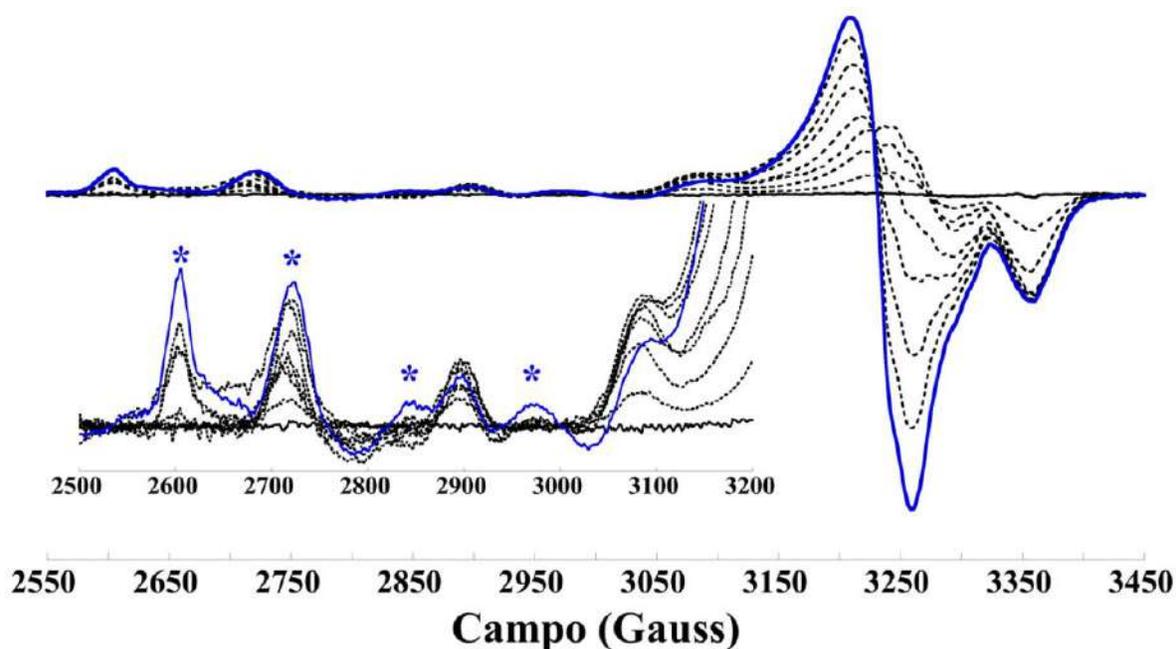


Figura 10. Titulación del péptido AS (1-15) por EPR, Banda X, en solución amortiguadora MES a pH 6.5, adicionando Cu^{2+} de 0 a 2 (azul) equivalentes, cada 0.25 equivalentes, a 150 K. En azul, se indican las señales de cobre en solución.

1.3.1 Comparación espectroscópica de los complejos de Cu^{2+} con AS (1-15), AS y AS H50A.

Para comprobar que el **sitio 1** es reproducido fielmente tanto en las proteínas completas AS y AS H50A, como en el péptido AS (1-15), se compararon los espectros de los complejos formados con Cu^{2+} tanto por EPR como por CD a 0.8 equivalentes. Se utilizó esta concentración de metal con el fin de apreciar bien el sitio y no tener interferencia de señales del cobre en solución. Por ejemplo, en la Figura 11, mediante EPR se observa claramente que la naturaleza del complejo es la misma en los tres casos.

A partir de estos datos espectroscópicos, se puede concluir que el **sitio 1 de coordinación** de Cu^{2+} en la proteína AS se puede reproducir usando sólo los primeros 15 residuos del extremo N-terminal en la proteína AS.

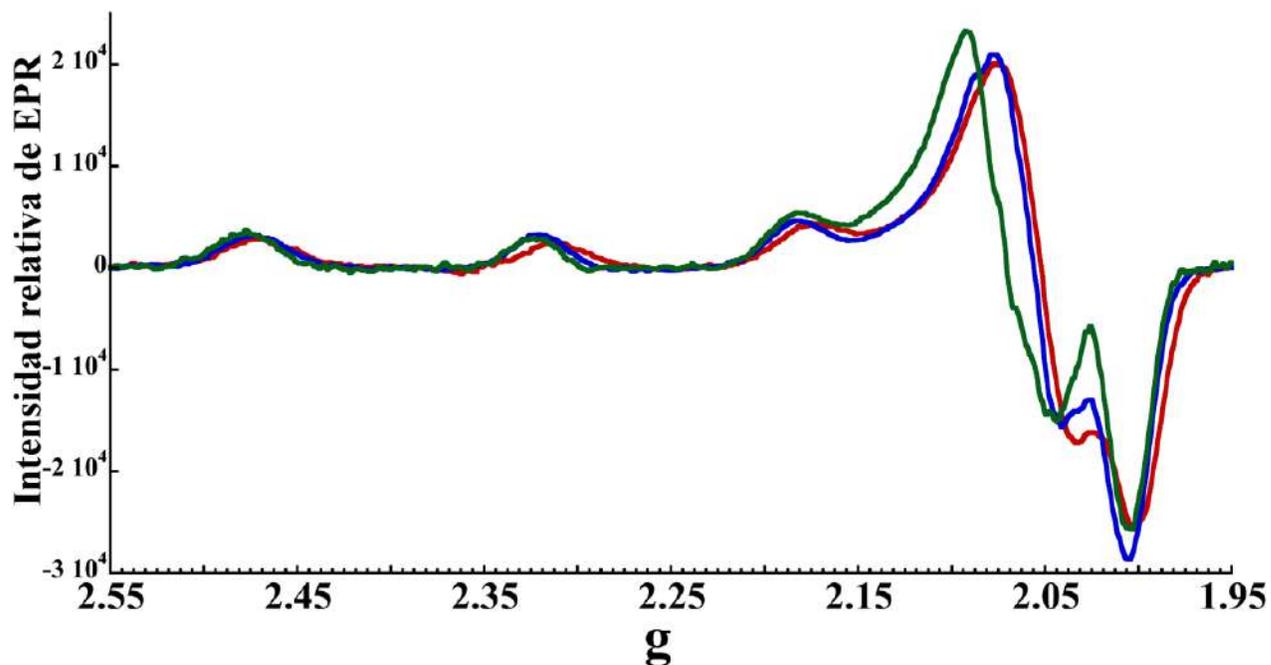


Figura 11. Comparación de los espectros EPR, Banda X a 150 K de los complejos de Cu²⁺ con la AS (rojo), AS H50A (azul) y el AS (1-15) (verde) en solución amortiguadora MES a pH 6.5 en relación 0.8:1.

SECCIÓN 1.4 Determinación de la secuencia mínima asociada al sitio 1.

Para identificar los residuos que participan en el modo de coordinación del **sitio 1**, y determinar la secuencia mínima necesaria que reproduzca este sitio de unión, se sintetizaron péptidos más pequeños: el péptido AS (1-3) con secuencia **MDV** y el péptido AS (1-6) con secuencia **MDVFMK**. En ambos péptidos el grupo amino de la metionina 1 quedó libre, tal como lo encontraríamos en la proteína completa y el grupo carboxilo en el C-terminal se encuentra amidado.

El AS (1-6) se tituló con cantidades crecientes de Cu^{2+} siguiendo la titulación por EPR. En la Figura 12, se observa que el espectro se caracteriza por un conjunto de señales (A, Figura 12), con valores $g_z=2.25$ y $A_z=184$ G, los cuales indican una coordinación ecuatorial 2N2O y que también corresponde al **sitio 1** de la proteína completa AS. Después de un equivalente de Cu^{2+} , aparecen otras señales (línea discontinua, Figura 11), las cuales corresponden a cobre en solución, es decir, a cobre no coordinado al fragmento.

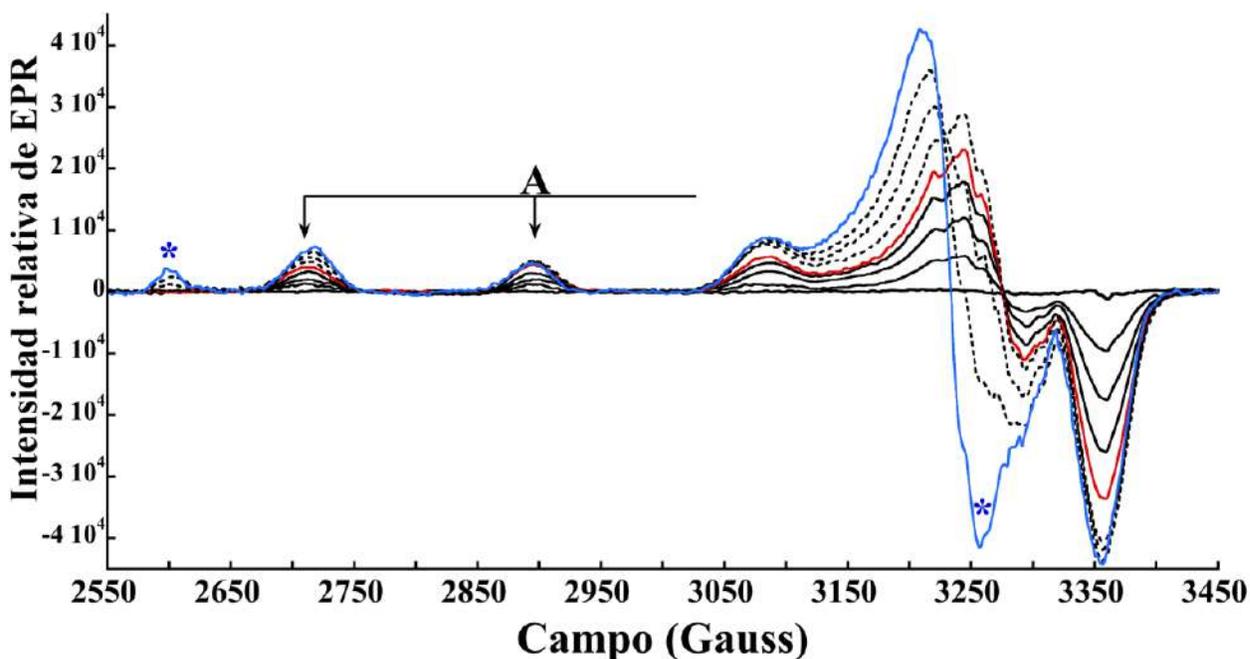


Figura 12. Titulación del péptido AS (1-6) en solución amortiguadora MES a pH 6.5, por EPR, Banda X a 150 K, adicionando Cu^{2+} de 0 (negro) a 2 equivalentes (azul claro), cada 0.25 equivalentes. En rojo, aparece el espectro del complejo AS (1-6)- Cu^{2+} en relación 1:1. En asteriscos azules, se indican las señales que corresponden a cobre en solución.

Debido a que las señales son débiles en el espectro de absorción UV-Vis, la definición de las transiciones electrónicas es más fácil por CD. El AS (1-6) se tituló con cantidades crecientes de Cu^{2+} (Figura 13), para reproducir el sitio 1 del AS (1-15). El espectro CD del complejo del AS (1-6) con Cu^{2+} a pH 7.5 está caracterizado por la presencia de una banda d-d positiva a 16300 cm^{-1} con un $\Delta\epsilon=0.28\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, una banda negativa de transferencia de carga a 33600 cm^{-1} ($\Delta\epsilon=-1.1\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) que corresponde a una transición LMCT de una amida desprotonada y una banda negativa a 43500 cm^{-1} ($\Delta\epsilon=-5.88\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) que corresponde a una transición LMCT del grupo amino.

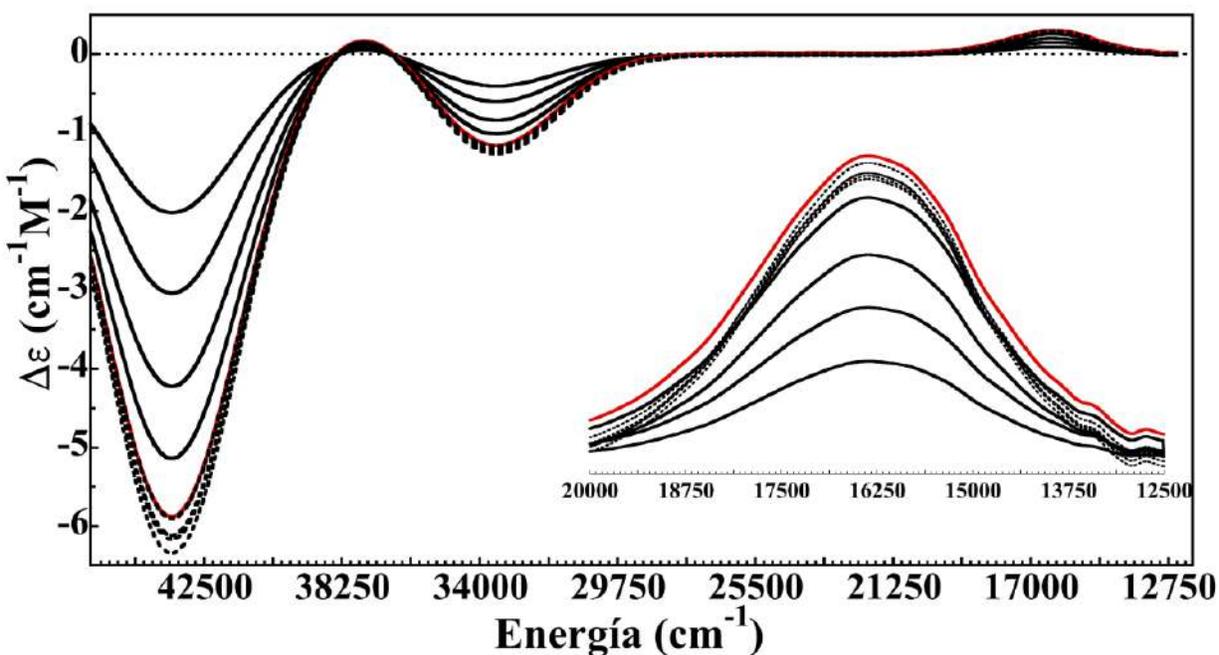


Figura 13. Titulación del péptido AS (1-6) en solución amortiguadora MOPS a pH 7.5, con Cu^{2+} de 0.2 a 2 equivalentes, cada 0.2 equivalentes, a temperatura ambiente. En rojo aparece el espectro del complejo AS (1-6)- Cu^{2+} en relación 1:1.

El péptido AS (1-6) también se tituló con cantidades crecientes de Cu^{2+} a pH 7.5, siguiendo la titulación por absorción electrónica en la región UV-visible. El espectro de absorción del complejo formado (Figura 14, ampliación en la parte superior, en rojo) muestra que la adición de cobre ocasiona el crecimiento de una transición poco intensa aproximadamente a 16400 cm^{-1} (610 nm, $\epsilon=64 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Sin embargo, el sitio se satura después de un equivalente de cobre.

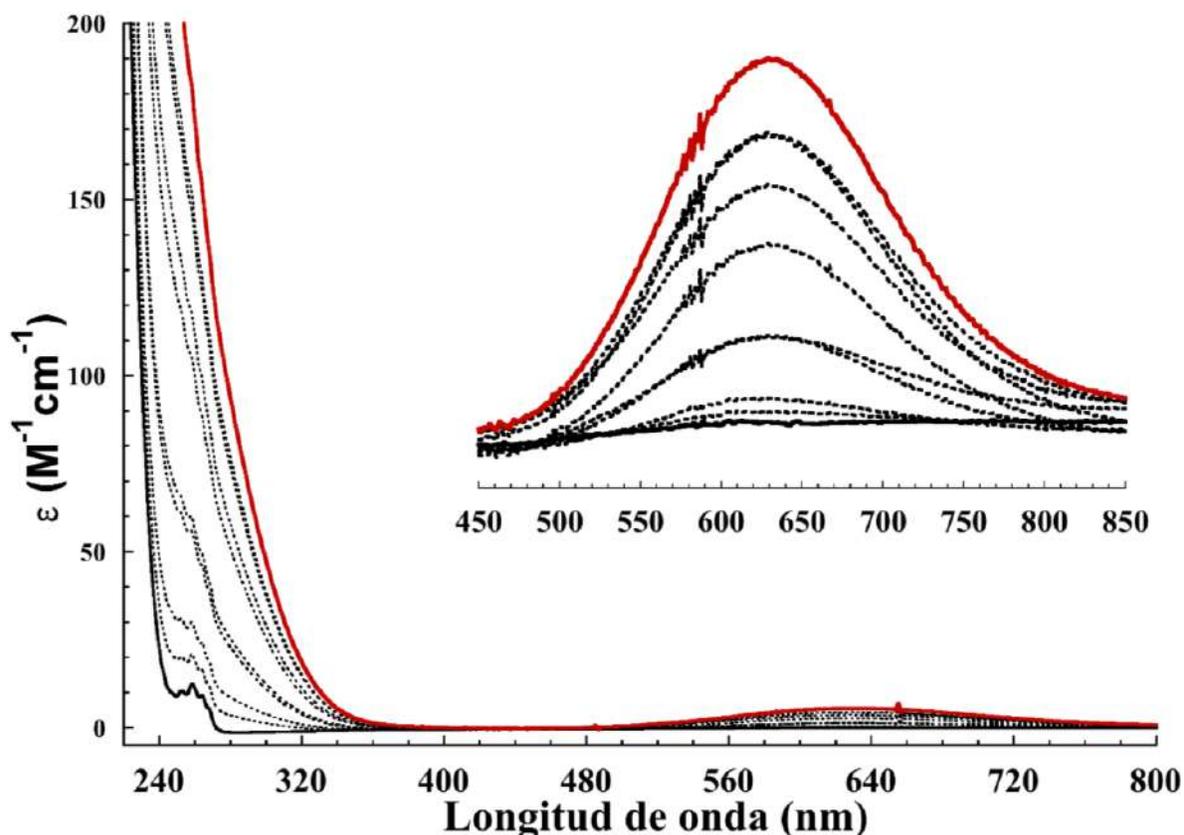


Figura 14. Titulación del péptido AS (1-6) en solución amortiguadora MOPS a pH 7.5, con Cu^{2+} de 0.1 a 1 equivalentes, cada 0.1 equivalentes, a temperatura ambiente. En rojo aparece el espectro del complejo AS (1-6)- Cu^{2+} en relación 1:1.

También se caracterizó el fragmento AS (1-3) con las mismas técnicas espectroscópicas, con el objetivo de determinar los residuos mínimos para reproducir la esfera de coordinación completa del sitio 1 que está presente en la proteína completa.

El complejo AS (1-3)-Cu²⁺ se evaluó por EPR en relación equimolar. En la Figura 15, se observa que el espectro se caracteriza por el mismo conjunto de señales que corresponde al **sitio 1** de la proteína completa AS ($g_z=2.25$; $A_z=184$ G), los cuales indican una coordinación ecuatorial 2N2O. Después de un equivalente de Cu²⁺, aparecen otras señales (no mostrado), las cuales corresponden al cobre en solución, es decir sin coordinarse al fragmento.

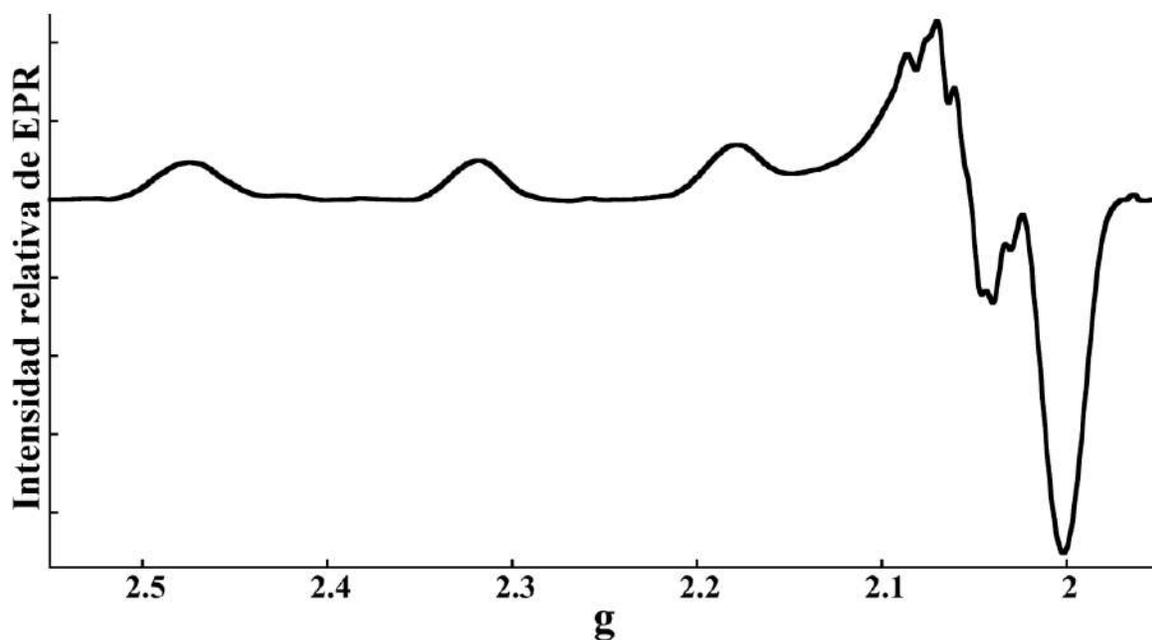


Figura 15. Espectro EPR, banda X a 150 K, del AS (1-3)-Cu²⁺ en solución amortiguadora MOPS a pH 7.5, a temperatura ambiente. Complejo AS (1-3)-Cu²⁺ en relación 1:1.

El AS (1-3) se tituló con cantidades crecientes de Cu²⁺, siguiendo la titulación por CD. El espectro CD del complejo del AS (1-3) con Cu²⁺ a pH 7.5 está caracterizado por la presencia de una banda d-d positiva a 16300 cm⁻¹ con un $\Delta\epsilon=0.21$ M⁻¹cm⁻¹, una banda negativa de transferencia de carga a 33600 cm⁻¹ ($\Delta\epsilon=-0.9$ M⁻¹cm⁻¹) que corresponde a una transición LMCT de una amida desprotonada y otra banda negativa a 43500 cm⁻¹ ($\Delta\epsilon=-2.88$ M⁻¹cm⁻¹) que corresponde a una LMCT del grupo amino. Después de un equivalente, el sitio de unión se satura, como se observa en el espectro en azul en la Figura 16.

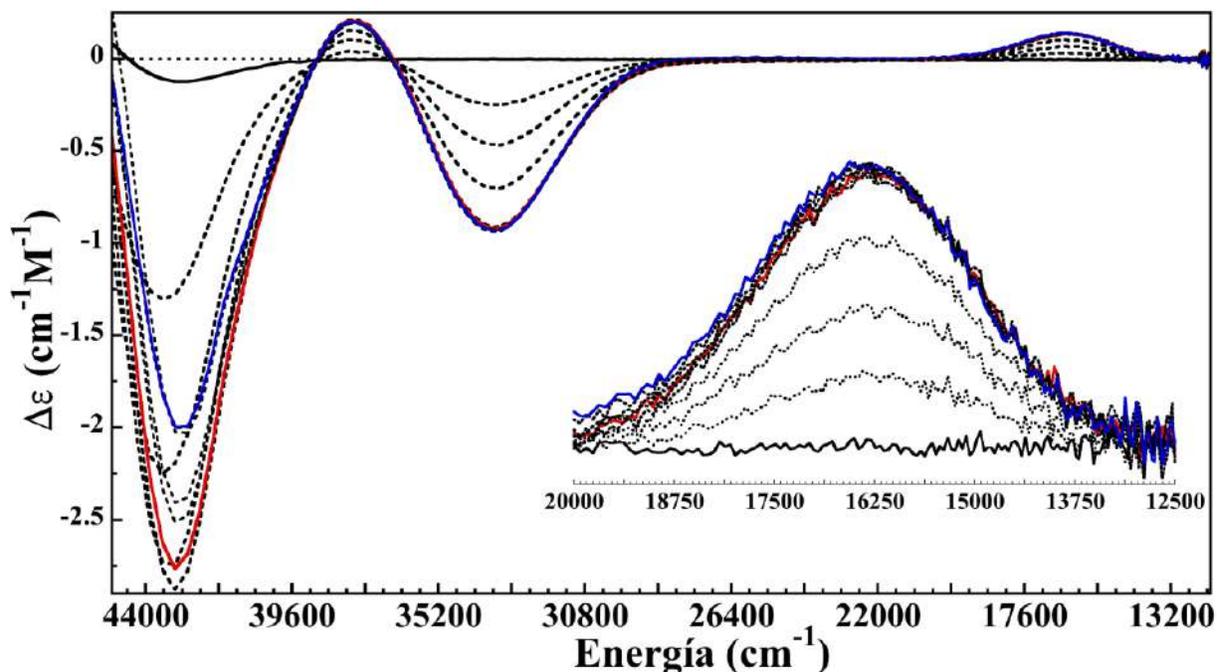


Figura 16. Titulación del péptido AS (1-3) en solución amortiguadora MOPS a pH 7.5, con Cu^{2+} de 0 a 2 equivalentes, cada 0.2 equivalentes, a temperatura ambiente. En rojo aparece el espectro del complejo AS (1-3)- Cu^{2+} en relación 1:1, mientras que en azul en relación 1:2.

Asimismo, el fragmento AS (1-3) se tituló con cantidades crecientes de Cu^{2+} a pH 7.5, seguida por absorción electrónica. El espectro de absorción del complejo formado (Figura 17, en la ampliación en la parte superior, banda d-d característica) muestra que la adición de cobre ocasiona el crecimiento de una transición poco intensa aproximadamente a una energía de 16400 cm^{-1} (610 nm , $\epsilon=64 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) hasta un equivalente. Después de seguir añadiendo más cobre el sitio se satura y no crece más. En la Figura 17, se hace una ampliación de la banda d-d y se nota el crecimiento continuo de esta banda¹⁵³.

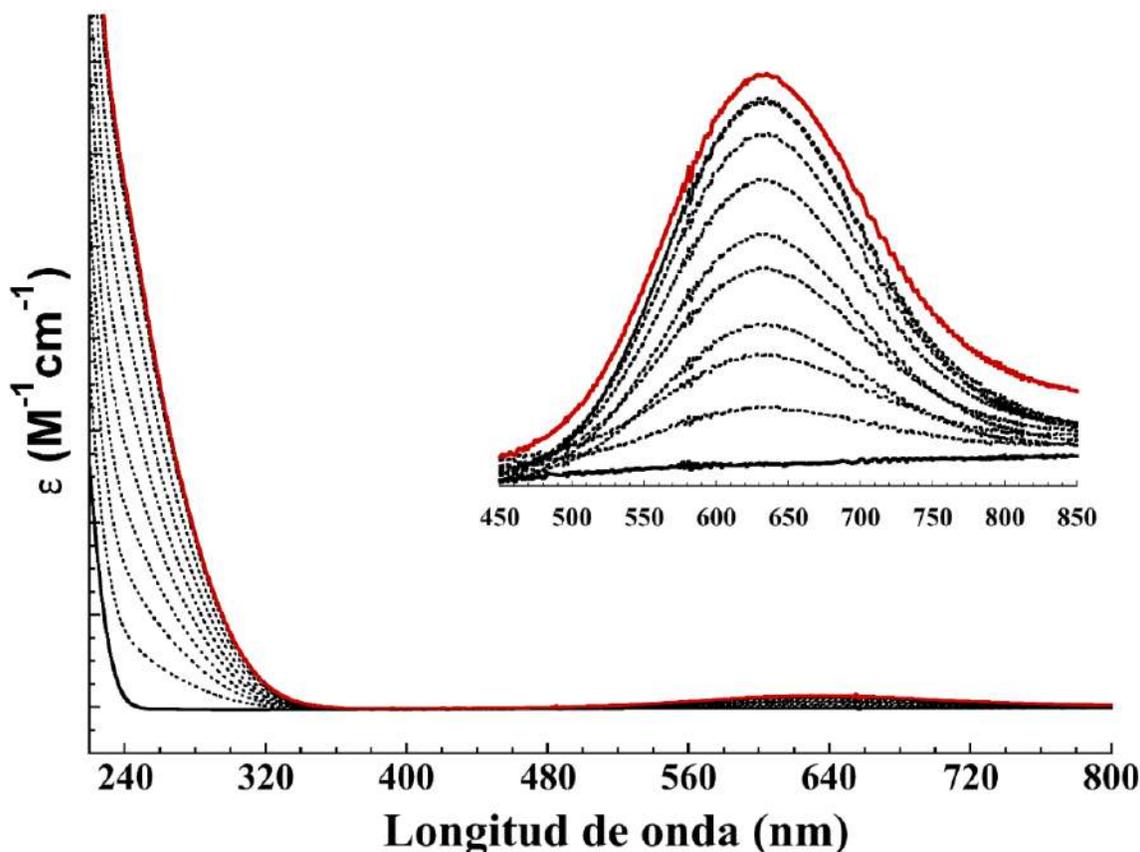


Figura 17. Titulación del péptido AS (1-3) en solución amortiguadora MOPS a pH 7.5 mediante absorción electrónica, con Cu^{2+} de 0 a 1 equivalentes, cada 0.1 equivalentes, a temperatura ambiente. En rojo aparece el espectro del complejo AS (1-6)- Cu^{2+} en relación 1:1.

Después de hacer la caracterización espectroscópica se concluye que los primeros 3 aminoácidos son suficientes para que el Cu^{2+} se una al extremo N-terminal de la AS. Asimismo, se compararon los espectros de varios de estos fragmentos con las proteínas completas para asegurar que todos los péptidos sintéticos modelan el sitio 1. Al comparar los espectros de CD de los complejos de cobre con los péptidos AS (1-15), AS (1-6) y AS (1-3) con el espectro asociado al sitio 1 de la AS (Figura 18), se observan prácticamente las mismas señales en todos los casos: una banda d-d positiva a 16000 cm^{-1} , una banda negativa LMCT a 33600 cm^{-1} asociada a amidas desprotonadas, y otra banda negativa a 43500 cm^{-1} , asociada a una LMCT del grupo extremo N-terminal al cobre.

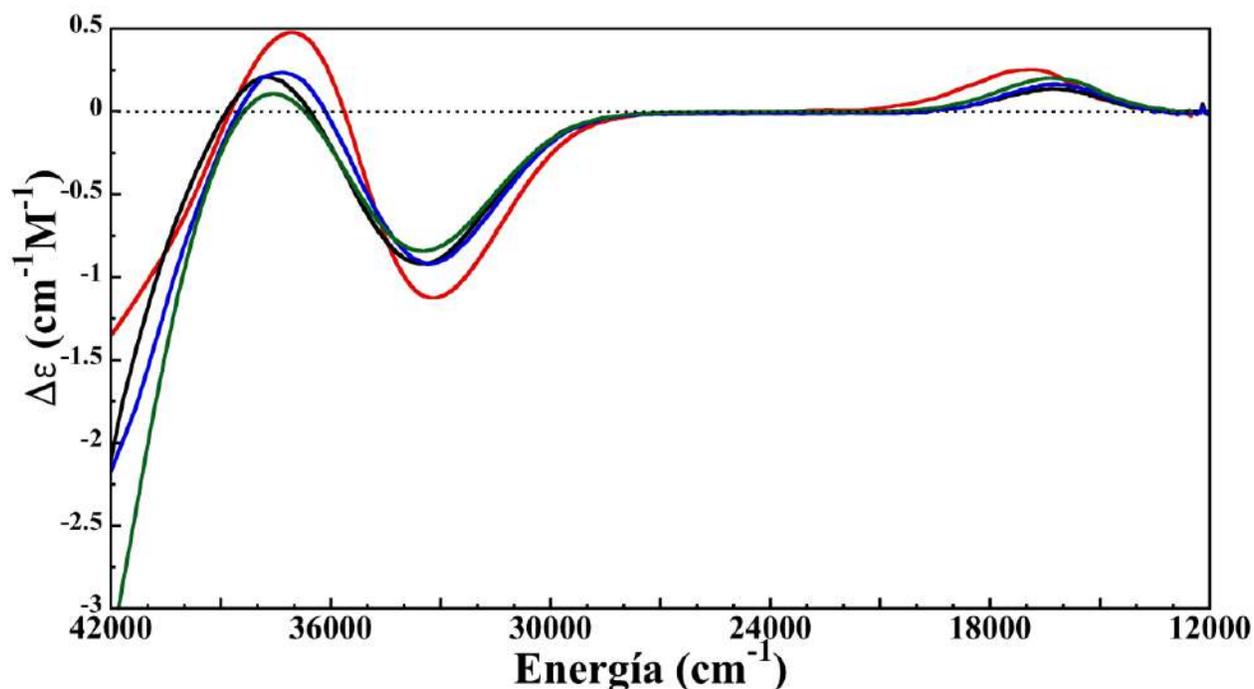


Figura 18. Comparación de los espectros CD en solución amortiguadora MOPS a pH 7.5, de los complejos de Cu^{2+} con AS (rojo), AS (1-15) en azul, AS (1-6) en verde y AS (1-3) en negro. Los complejos están en relación 1:0.9 de péptido con respecto a Cu^{2+} .

1.4.1 Comparación espectroscópica de los complejos de Cu^{2+} con AS H50A, AS (1-15), AS (1-6) y AS (1-3).

Por absorción electrónica, los complejos de Cu^{2+} con los péptidos AS (1-15), AS (1-6), AS (1-3) y las proteínas AS y ASH50A muestran una banda característica del complejo a 610 nm (datos no mostrados). Por otro lado, al hacer la misma comparación por EPR, se observa el mismo modo de coordinación en todos los casos. En la Figura 19, se muestra que los complejos de los péptidos en relación estequiométrica 1:0.9 reproducen el sitio 1 del extremo N-terminal encontrado en las proteínas AS y AS H50A pues sus valores $g_z=2.25$ y $A_z=184$ G, corresponden al mismo modo de coordinación ecuatorial.

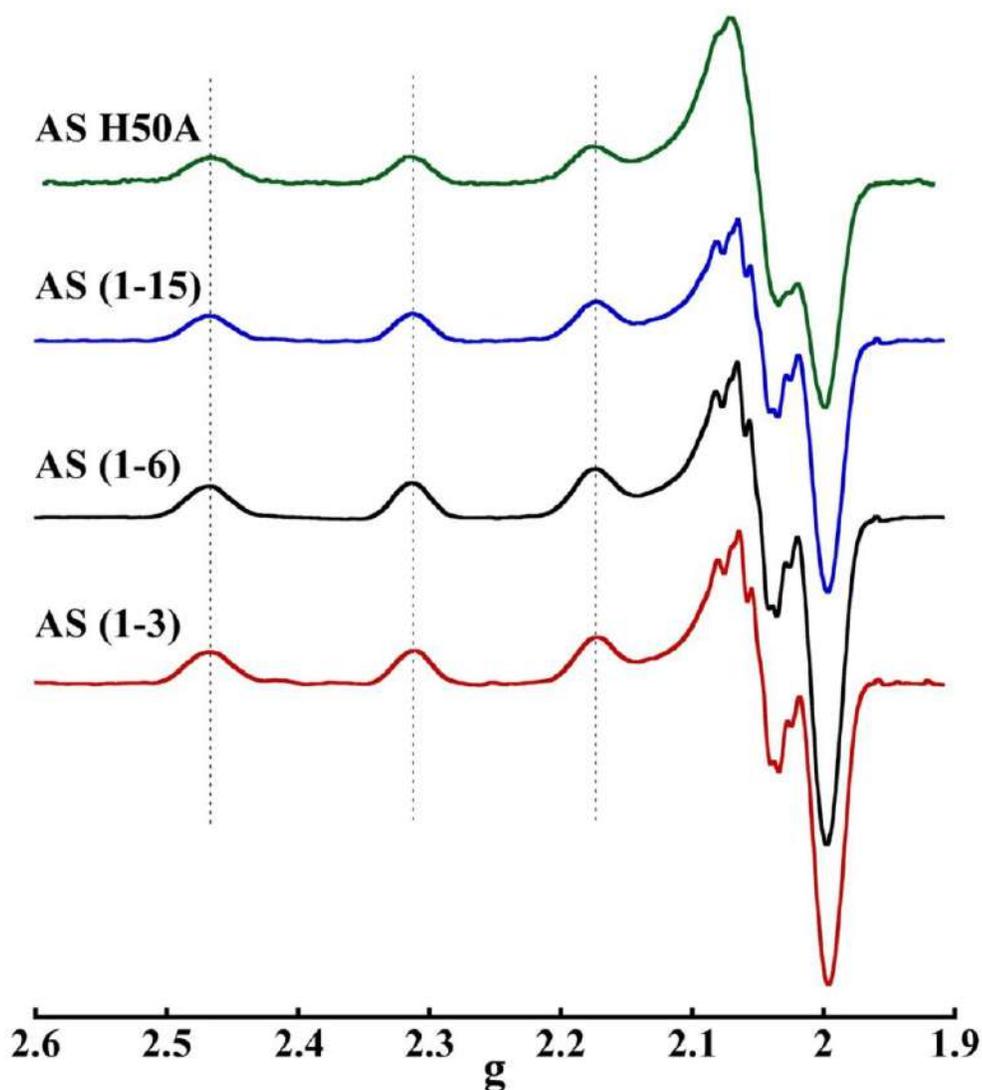


Figura 19. Comparación de los espectros de EPR banda X de los complejos de Cu^{2+} con los péptidos: AS (1-3) en rojo, AS (1-6) en azul marino, AS (1-15) en negro y la proteína AS H50A (verde) en solución amortiguadora MOPS a pH 7.5, a temperatura ambiente. En todos los casos, se adicionaron 0.9 equivalentes de Cu^{2+} .

Con todos los datos espectroscópicos anteriores, se sabe que la secuencia mínima necesaria para reproducir el **sitio 1** de la AS a pH fisiológico son los primeros 3 residuos que se encuentran en el extremo N-terminal de la AS, los cuales son: metionina, aspártico y valina (MDV).

Los espectros EPR son complejos y pueden ser interpretados con la ayuda del Hamiltoniano (**Ecuación 1**), donde **S** es el espín electrónico, **I** es el espín nuclear, *D* es el tensor de desdoblamiento a campo cero, mientras que *g* y *A* son las matrices Zeeman y de acoplamiento hiperfino, *Q* es el tensor de cuadrupolo, γ es la razón nuclear giromagnética, σ es el tensor de desplazamiento químico, β es el magnetón de Bohr y **B** es el campo magnético aplicado^{154, 155}. El valor *g* está asociado al entorno químico alrededor del espín electrónico. Para los radicales libres, por ejemplo, el valor *g* es aproximadamente igual a 2.0023; mientras que, para iones de metales de transición con un electrón desapareado, el valor de *g* puede tener pequeñas desviaciones del valor 2. Así como el entorno químico alrededor del electrón desapareado puede ser anisotrópico, los valores *g* también pueden ser anisotrópicos. Esto significa que la magnitud del desdoblamiento Zeeman depende de la orientación relativa de la molécula con respecto al campo magnético **B**. Por lo tanto, una especie paramagnética con simetría rómbica, es decir, con tres ejes no equivalentes, muestra también 3 diferentes valores de *g*: *g_z*, *g_y*, *g_x*. El núcleo con espín nuclear **I** cercano a un electrón desapareado causa un desdoblamiento hiperfino en una magnitud de 2**I** + 1 señales. Por lo tanto, la magnitud de la interacción hiperfina con un núcleo de Nitrógeno será ^NA y también será dependiente de la naturaleza espacial, por lo tanto, será en 3 direcciones si es anisotrópica.

$$H_A = \mathbf{S} \cdot \mathbf{D} \cdot \mathbf{S} + \beta \mathbf{B} \cdot \mathbf{g} \cdot \mathbf{S} + \mathbf{S} \cdot \mathbf{A} \cdot \mathbf{I} + \mathbf{I} \cdot \mathbf{Q} \cdot \mathbf{I} - \gamma \mathbf{I} \cdot (1 - \sigma) \cdot \mathbf{B} \cdot \mathbf{I} \dots \dots \dots \mathbf{Ecuación 1}$$

Para encontrar los parámetros anteriores con precisión, lo adecuado es simular los espectros experimentales de EPR con diferentes *softwares* de simulación. Para obtener todos los parámetros del espectro de EPR del **sitio 1**, se corrigió la línea base y se simuló el espectro usando los programas *WinEPR SimFonia* y *XSophe (Bruker)*¹⁵⁶, con lo cual se obtuvieron los parámetros del Hamiltoniano que describen de mejor forma la interacción del Cu²⁺ a los ligandos de Nitrógeno y Oxígeno.

Los parámetros obtenidos de estas simulaciones de EPR se muestran en la Tabla 1. La estructura superhiperfina del nitrógeno en la región perpendicular del espectro puede ser simulada considerando la interacción superhiperfina del espín electrónico del cobre con el espín nuclear de cada uno de los dos nitrógenos, los cuales no son magnéticamente

equivalentes. Estos nitrógenos corresponden al grupo amino de la AS y a una amida desprotonada, los cuales forman enlaces con el cobre con diferente grado de covalencia. La covalencia de los enlaces Cu-N se puede cuantificar con los datos del espectro simulado que se observan en la tabla 1, ya que las interacciones hiperfinas ^{N1}A vs ^{N2}A son diferentes en sus distintas direcciones.

Los desdoblamientos hiperfinos, que se extraen de los espectros EPR están en unidades de campo magnético. La conversión de los valores de A en unidades de frecuencia (cm^{-1}), está dada por: $A (\text{cm}^{-1}) = A (\text{Gauss}) * g * 4.6686 * 10^{-5}$, donde g es el valor asociado a la señal en EPR. Por otro lado, los anchos de banda (L) de las señales desdobladas de EPR, también pueden ser expresados en unidades de campo o de frecuencia.

Tabla 1. Parámetros EPR para el complejo AS (1-6)-Cu²⁺ simulado.

g_x	2.051
g_y	2.059
g_z	2.250
A_x	19
A_y	8
A_z	189
$^{N1}A_x$	10
$^{N1}A_y$	16
$^{N1}A_z$	10
$^{N2}A_x$	15
$^{N2}A_y$	13
$^{N2}A_z$	13
L_x	11
L_y	6
L_z	10

Los desdoblamientos hiperfinos y anchos de banda están expresados como valores $\times 10^{-4}$ cm^{-1} .

CAPÍTULO 2. Elucidación estructural del sitio de unión a Cu^{2+} en el N-terminal de la AS

SECCIÓN 2.1. Efecto del pH en el sitio de unión a cobre en el extremo N-terminal de la AS.

Para evaluar si el **sitio 1** de Cu^{2+} en la proteína AS es dependiente del pH, se evaluaron los complejos formados con el AS (1-6) a pH 5.0, 6.5 y 7.5 en relación equimolar. Por CD, se observa que el complejo formado a estos 3 diferentes valores de pH muestran las mismas transiciones electrónicas que ya se observaron en el AS (1-6), como se observa en la Figura 20. También, se observó que debajo de pH 4.7 (dato no mostrado) el cobre no se une al fragmento peptídico.

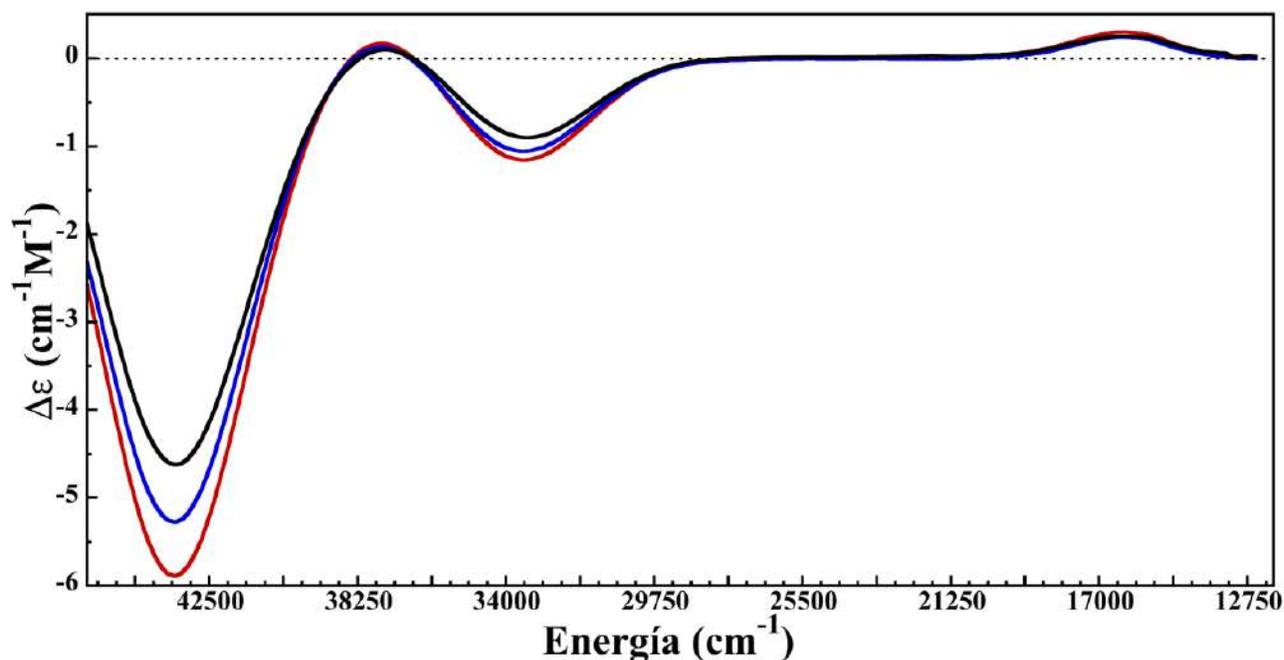


Figura 20. Comparación por CD de los complejos de Cu^{2+} con AS (1-6) a pH 7.5 (rojo), pH 6.5 (azul marino) y pH 5.0 (negro), solución amortiguadora MES 20 mM (pH 5.0 y 6.5) y MOPS 20 mM a pH 7.5

Al caracterizar la dependencia del complejo en función del pH por EPR, se observa que el complejo a **pH 6.5 y 7.5** se coordina al péptido, (Figura 20, espectros en negro y azul). Los valores del conjunto de señales que aparecen tienen $g_z=2.25$ y $A_z=189$ G con modo de coordinación 2N2O. Debajo de **pH 5** se observa que las señales que dominan el espectro son de Cu^{2+} libre en solución, lo cual indica que la coordinación del péptido por Cu^{2+} disminuye significativamente a un pH bajo, en la Figura 21 se observan las señales en B.

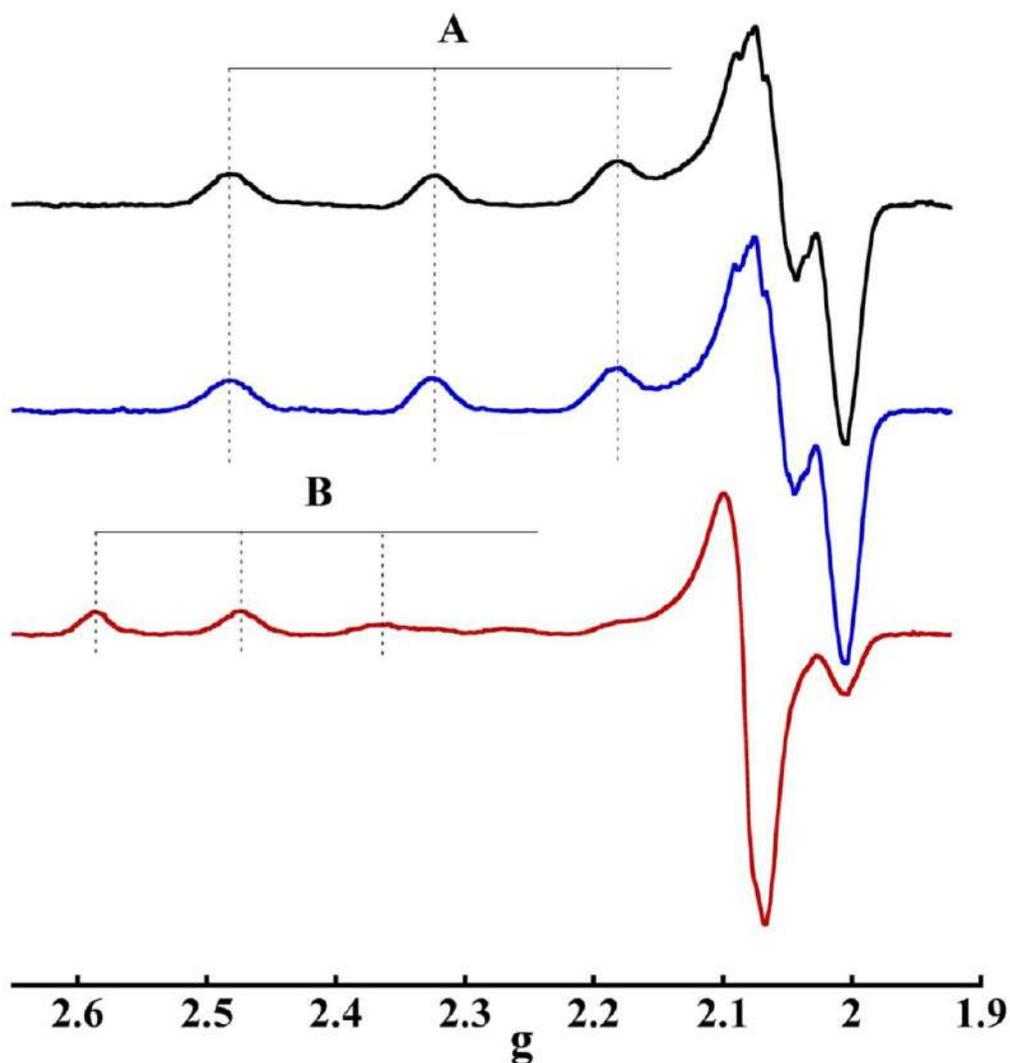


Figura 21. Comparación del complejo AS (1-6) con Cu^{2+} por EPR Banda-X a 150 K a pH < 5.0 (rojo), pH 6.5 (azul marino) y pH 7.5 (negro). En el espectro en rojo se muestran las señales que corresponden a Cu^{2+} en solución.

SECCIÓN 2.2 Evaluando el papel del Asp2 en el sitio 1 de la AS.

Con el fin de evaluar el papel del aspartato en posición 2 como ligante en el sitio 1 de la AS y su efecto en la coordinación al extremo amino, se sintetizó el péptido AS (1-6) D2A (MAVFMK), donde el aminoácido aspártico (Asp, D) es reemplazado por el aminoácido Alanina (Ala, A), con el objetivo de bloquear la unión a Cu^{2+} vía el carboxilato de la cadena lateral (Figura 22).

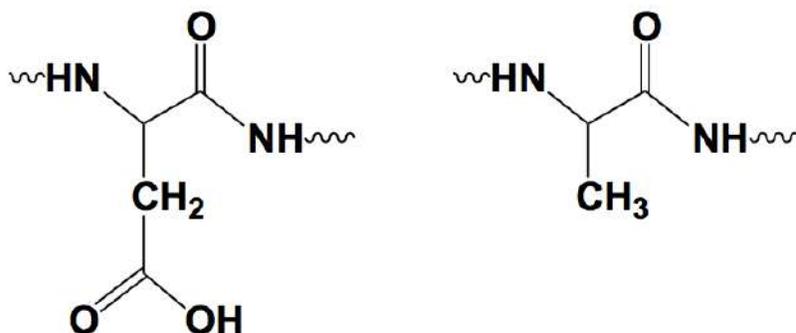


Figura 22. Representación de los aminoácidos en una cadena peptídica: aspártico (derecha) y alanina (izquierda), haciendo énfasis en sus cadenas laterales.

Durante la adición de Cu^{2+} en cantidades subestequiométricas se observa el crecimiento de un juego de señales hasta 0.25 equivalentes de Cu^{2+} (Figura 23, espectro en azul intenso). Este primer juego de señales tiene un valor g de 2.24 y un acoplamiento hiperfino (A_{II}) de 181 G, y corresponde a un modo de coordinación 2N2O, el cual pertenece al sitio 1. Después de 0.25 equivalentes aparece una nueva señal a 2600 G (Figura 23, espectro en verde) y finalmente después de 0.5 equivalentes hasta 1 equivalente aparecen 2 nuevas señales a 2840 G y 2965 G, las cuales corresponden a cobre en solución. Esta coordinación de Cu^{2+} a pH 6.5 es menor a la del péptido AS (1-6) ya que se observa que las señales de Cu^{2+} en solución dominan el espectro después de los 0.25 equivalentes.

Al comparar los espectros de EPR de los dos complejos, al mismo pH 6.5 y con la misma cantidad de Cu^{2+} , se observa claramente que el sitio es afectado por la sustitución del grupo carboxilato que proviene del Asp2. Estos resultados sugieren que el carboxilato es un ligante indispensable en el sitio de unión y que, si está ausente, el Cu^{2+} no se une al

extremo N-terminal de la AS. La misma observación ocurre cuando se titula el AS (1-6) D2A a pH 7.5 en las mismas concentraciones de Cu^{2+} con respecto al péptido.

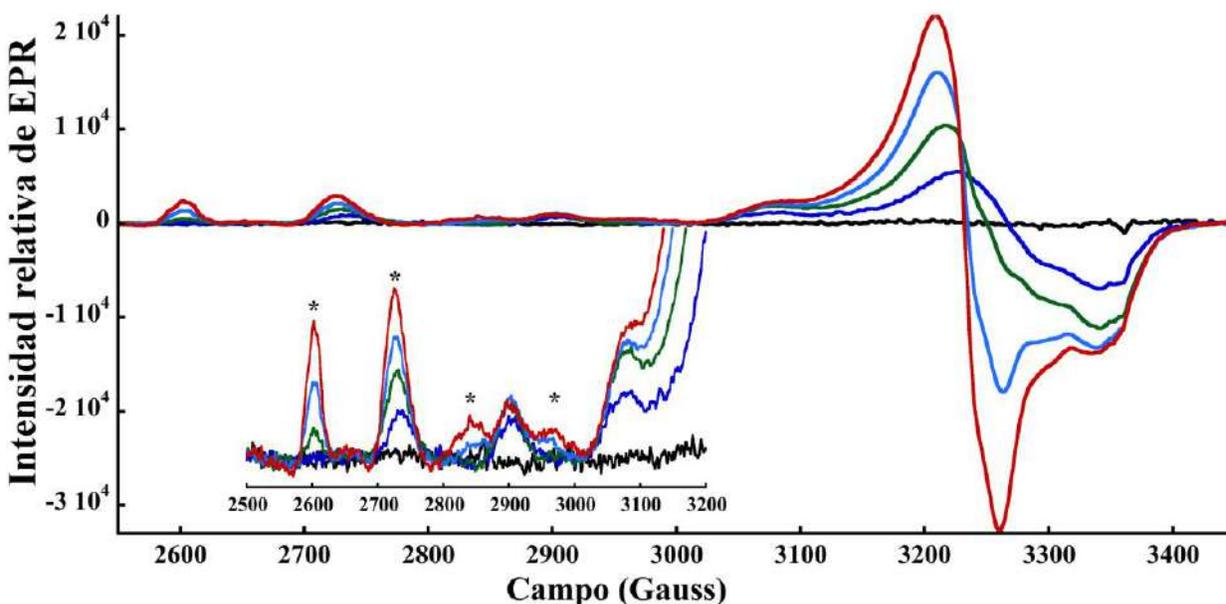


Figura 23. Titulación del péptido AS (1-6) D2A con Cu^{2+} de 0 (negro) a 1 equivalentes (rojo) cada 0.25 equivalentes en solución amortiguadora MES pH 6.5, seguida por EPR Banda-X a 150 K. En asteriscos se muestran las señales que corresponden a Cu^{2+} en solución.

También se evaluó si lo poco que se coordina el Cu^{2+} al fragmento AS (1-6) D2A es dependiente del pH. Como se muestra en la Figura 24, a **pH 6.5** se observa que las señales de los complejos AS (1-6) D2A son diferentes que las obtenidas con el AS (1-6). El poco Cu^{2+} coordinado lo hace con un modo 2N2O con valores $g_z=2.23$ y $A_z=188$ G, mientras que a **pH 5.0** se observa que el AS (1-6) D2A no coordina Cu^{2+} , puesto que las señales de Cu^{2+} en solución dominan el espectro desde la primera adición de Cu^{2+} , de ahí su mayor intensidad con respecto a los espectros a pH 7.5 y pH 6.5. En resumen, los valores de g_z y A_z para los complejos que se formaron con de Cu^{2+} del AS (1-6) a los 3 pH son similares entre ellos, mientras que los valores para el AS (1-6) D2A a pH 5.0, 6.5 y 7.5, indican una mayor cantidad de Cu en solución que pegado al fragmento.

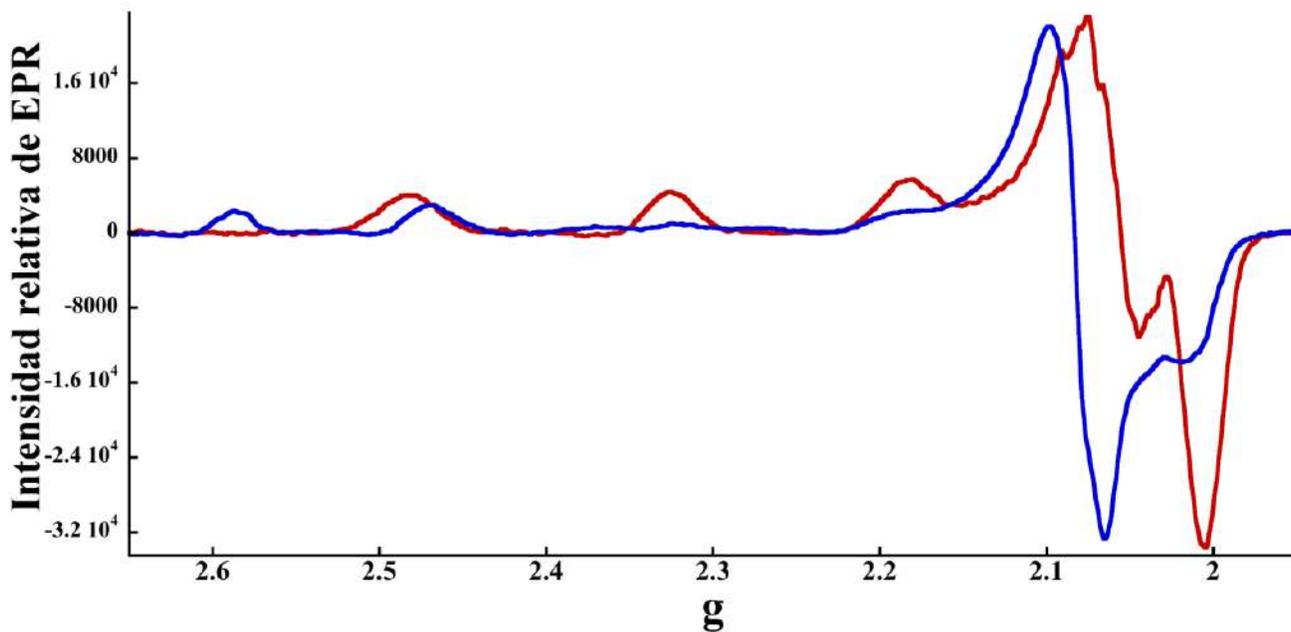


Figura 24. Comparación de los complejos de los péptidos AS (1-6) en rojo y AS (1-6) D2A en azul con 1 equivalente de Cu^{2+} en solución amortiguadora MES pH 6.5 por EPR Banda-X a 150 K.

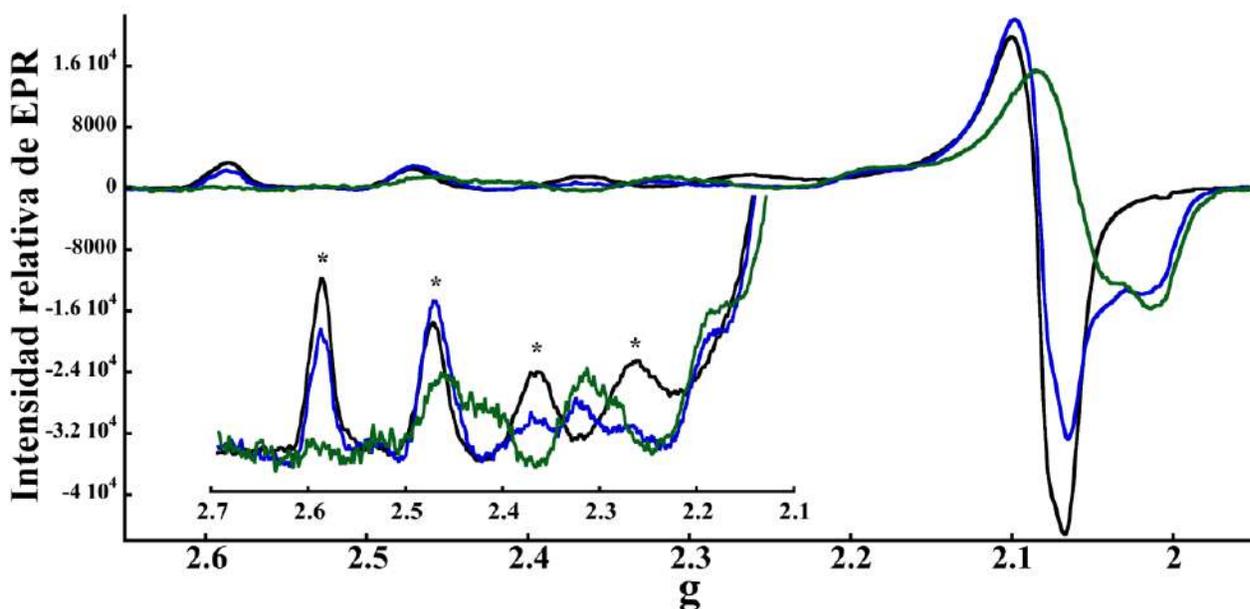


Figura 25. Comparación del AS (1-6) D2A con 1 equivalente de Cu^{2+} por EPR Banda-X a 150 K a pH 5.0 (verde), pH 6.5 (azul marino) y pH 7.5 (negro). Se indican con asteriscos las señales de Cu^{2+} en solución.

Para confirmar el papel clave del Asp2, se caracterizaron los complejos de las especies AS (1-6) y AS (1-6) D2A, mediante CD con 1 equivalente de Cu^{2+} . Se observa, que la banda de transición d-d característica a 610 nm y la banda negativa de transferencia de carga de alta intensidad a 300 nm no se detectan para el AS (1-6) D2A. En cambio, se detecta una banda positiva extremadamente débil a 300 nm para el complejo AS (1-6) D2A. Estos cambios espectrales probablemente reflejan un entorno de coordinación diferente para Cu^{2+} , lo cual se corrobora por EPR (Figura 25, espectro en azul). En el espectro de EPR del AS (1-6) D2A se observan señales asociadas a Cu^{2+} libre en solución, indicando una menor población de formación de complejo metálico debido a la sustitución del Asp2 por alanina. Estos datos indican claramente que el grupo carboxilato del Asp2 debe ser uno de los ligantes basado en oxígeno en el complejo Cu^{2+} -AS.

SECCIÓN 2.3 El agua como posible ligante ecuatorial en el sitio 1.

Con el fin de conocer los ligantes basados en oxígeno que participan en el modo de coordinación 2N2O, se evaluó la posible participación del agua como ligante ecuatorial. Para ello, se preparó el complejo Cu²⁺-AS (1-6) en solución amortiguadora MES a pH 6.5 en agua enriquecida con ¹⁷O (60-70%). En la literatura existe evidencia de que, cuando una molécula de agua participa como ligante ecuatorial en un complejo de Cu²⁺, se observa un incremento en el ancho de banda de las señales cuando el complejo se forma en un solvente enriquecido con el isótopo de ¹⁷O¹⁵⁷. Este efecto se debe al acoplamiento hiperfino del espín electrónico del cobre con el espín nuclear del ¹⁷O, (I=5/2), lo cual generaría un desdoblamiento en seis señales. La magnitud de la constante de acoplamiento hiperfino con ¹⁷O es muy pequeña y generalmente no se resuelven las 6 señales esperadas, sino que solo se observa un ensanchamiento de la señal.

El espectro de EPR en banda X del complejo formado en agua enriquecida con ¹⁷O fue comparado con el formado en agua normal (¹⁶O), (Figura 26). De esta comparación resulta evidente que las señales en la región paralela del espectro del complejo con ¹⁷O tienen mayor amplitud, por ejemplo, la señal a 2704 G tiene una amplitud de 54.5 G con ¹⁷O, mientras que con ¹⁶O, tiene 41 G de amplitud. El desdoblamiento hiperfino esperado para la interacción de Cu²⁺ con ¹⁷O se manifiesta por medio de un mayor ancho de banda de las señales, donde la diferencia en ensanchamiento experimental fue de 13.5 G.

Por otro lado, se realizó una simulación del sitio 2N2O modelado con ¹⁶O y ¹⁷O para saber si efectivamente el espectro simulado es igual al experimental al modificar el núcleo de oxígeno. Los parámetros finales obtenidos se muestran en la tabla 2, después de la simulación, usando como datos de partida los espectros EPR experimentales de la Figura 26. La interacción para este complejo es de naturaleza rómbica, de acuerdo con los valores $g_z > g_y > g_x$ (**Tabla 2**). La simulación del espectro de EPR estima una interacción de acoplamiento super-hiperfino con el ¹⁷O de $13 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$, la cual es muy parecida al valor experimental.

El ensanchamiento de las bandas debido al acoplamiento ^{17}O no es significativo para moléculas de agua coordinadas de manera axial, mientras que para las moléculas de agua ecuatoriales unidas a Cu^{2+} las constantes de acoplamiento superhiperfinas para ^{17}O del orden de 12 a $16 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$.

En la literatura se encuentran ejemplos de complejos de Cu^{2+} , donde hay moléculas de agua coordinadas ecuatorialmente, en moléculas pequeñas se puede mencionar el caso de los complejos de Cu^{2+} con acetilacetato¹⁵⁸ y con una sal de Tutton dopada¹⁵⁹ $\text{K}_2\text{Zn}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y que muestran acoplamientos hiperfinos en el orden reportado para nuestro complejo. En el caso de las metaloproteínas, también se han encontrado constantes de acoplamiento súper hiperfino de ^{17}O similares como lo son el sitio de Cu^{2+} tipo 2 en lacasa fúngica¹⁶⁰ y el sitio activo en la ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa¹⁶¹. Por lo tanto, la constante de acoplamiento superhiperfina ^{17}O observada para el complejo de Cu^{2+} con AS (1-6) es consistente con la presencia de una molécula de agua coordinada en la posición ecuatorial.

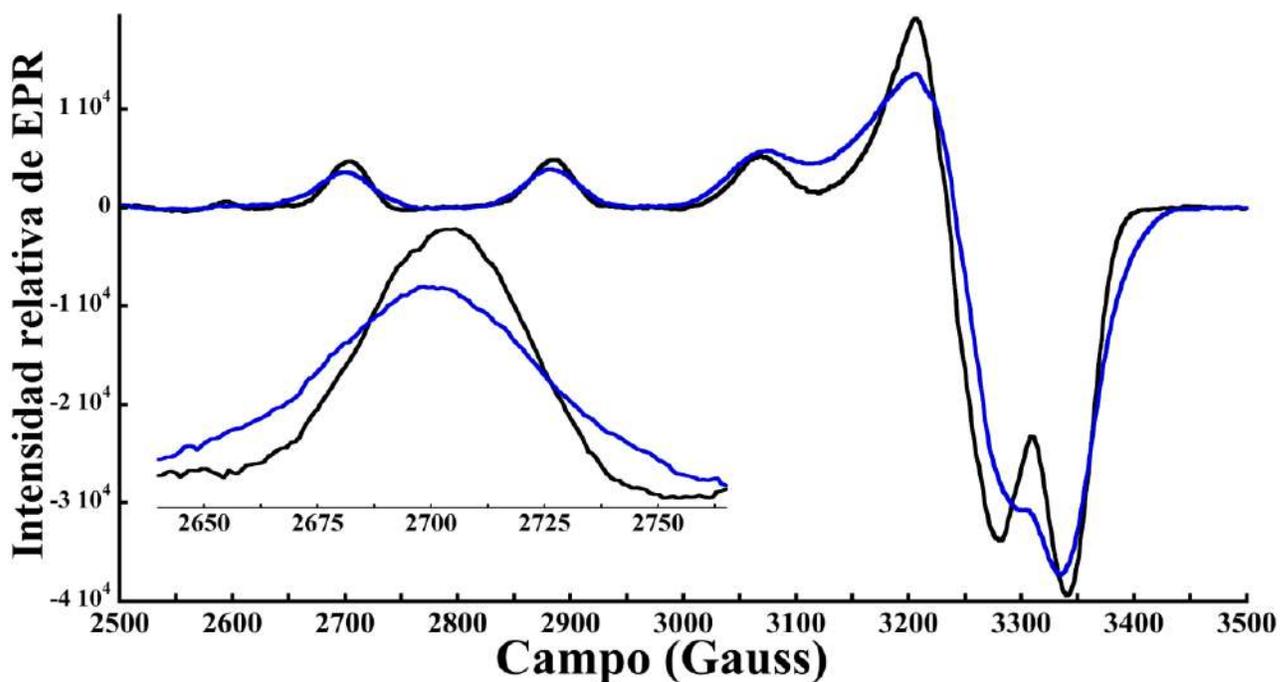


Figura 26. Comparación por EPR del complejo AS (1-6) con Cu^{2+} en relación equimolar, donde el complejo está en H_2^{16}O (negro) y en H_2^{17}O (azul). En el acercamiento, se muestra la región paralela, donde se aprecia que la señal es de mayor amplitud (13.5 G).

Estos datos están resumidos en la tabla 3, donde se pueden apreciar mayor amplitud para las bandas a 2704 G y 2884 G con ^{17}O comparado con ^{16}O , tanto en los espectros simulados como en el experimental.

Tabla 2. Parámetros EPR para el complejo AS (1-6)- Cu^{2+} simulado con H_2^{17}O .

g_x	2.0518
g_y	2.07
g_z	2.253
A_x	12
A_y	10
A_z	189
$^{N1}A_x$	10
$^{N1}A_y$	16
$^{N1}A_z$	10
$^{N2}A_x$	15
$^{N2}A_y$	13
$^{N2}A_z$	13
$^{17\text{O}}A_x$	11
$^{17\text{O}}A_y$	13
$^{17\text{O}}A_z$	11
L_x	11
L_y	9
L_z	12

Los desdoblamientos hiperfinos y anchos de banda se muestran como 10^{-4} cm^{-1} .

Tabla 3. Anchos de banda en EPR de los complejos AS (1-6)- Cu^{2+} con H_2^{17}O y H_2^{16}O .

Datos Experimentales		
	<i>Banda a 2704 G</i>	<i>Banda a 2884 G</i>
$^{16}\text{O}_{\text{exp}}$	41.0	44.7
$^{17}\text{O}_{\text{exp}}$	54.5	56.7
$\Delta^{17}\text{O}$	13.5	12
Datos Simulados		
	<i>Banda a 2704 G</i>	<i>Banda a 2884 G</i>
$^{16}\text{O}_{\text{sim}}$	44.7	43.1
$^{17}\text{O}_{\text{sim}}$	56.9	54
$\Delta^{17}\text{O}$	12.2	10.9

SECCIÓN 2.4. Modelo de coordinación de Cu^{2+} en el sitio 1.

A partir de los resultados espectroscópicos anteriores y la exhaustiva caracterización en un rango de pH entre 5 y 7.5 y en una relación equimolar de metal y proteína, se puede proponer un modelo de coordinación en el sitio 1 de la AS. En la Figura 27, se muestra el modelo en el cual, el ion Cu^{2+} tiene una geometría tetragonal, donde los ligantes donadores son 2 nitrógenos y 2 oxígenos. Uno de los nitrógenos proviene del grupo amino del extremo N-terminal, el otro de la amida desprotonada del enlace peptídico entre el aminoácido metionina y el aminoácido ácido aspártico, un oxígeno proviene de la cadena lateral del ácido aspártico y el otro oxígeno de una molécula de agua.

Nuestra caracterización detallada de este sitio es de gran importancia ya que en la literatura se ha generado controversia con respecto a cuáles son los ligandos del sitio de unión a la AS^{162, 163}. En las primeras caracterizaciones, incluso se responsabilizó al C terminal como el sitio de unión a Cu^{2+} , esto probablemente fue debido a una explicación de naturaleza electrostática entre los residuos en su mayoría con carga negativa y el ion metálico¹⁰⁵. Estudios posteriores, también determinaron la posible participación del nitrógeno de la His50 en la esfera de coordinación¹⁶⁴, con nuestros resultados concluimos que no participa y que este sitio es relevante en el extremo N-terminal de la AS en condiciones fisiológicas¹⁰.

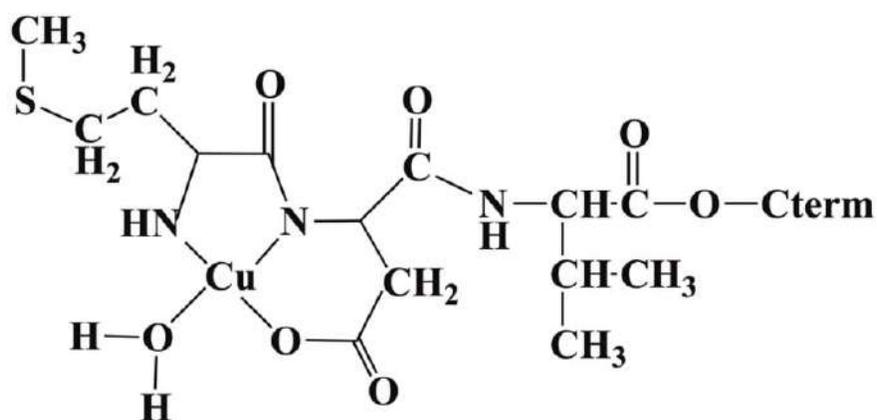


Figura 27. Modo de coordinación 2N2O de Cu^{2+} de la AS en el sitio 1 a pH mayor a 5 y menor a 7.5

SECCIÓN 2.5. Evaluación de la acetilación en el sitio 1 de la AS.

Recientemente, se reveló que la AS sufre una modificación en el extremo N-terminal de forma *in vivo* (AcAS)^{165, 166}. De muchos estudios *in vitro* donde se tuvo esta forma de la AS se demostró que la modificación induce una población de α -hélice para los primeros seis residuos y que mejora las propiedades de unión de lípidos de la proteína, mientras que no se observaron diferencias significativas en la cinética de fibrilación entre la forma AcAS y la AS. En ese sentido, diseñamos otro péptido sintético llamado AcAS (1-6), el cual tiene una acetilación en el extremo N-terminal, con lo cual esperamos que la coordinación a Cu^{2+} sea abatida o afectada al ser el nitrógeno del extremo N-terminal parte del sitio 1 encontrado anteriormente.

Al realizar la titulación del fragmento AcAS (1-6) con Cu^{2+} , seguida por absorción electrónica, se puede observar que a pH 7.5 no aparece la banda d-d característica del complejo del sitio 1, sino que el espectro es dominado por una banda intensa alrededor de 220 nm ($\sim 45454 \text{ cm}^{-1}$) la cual es una banda característica del péptido en solución y no está asociada a la formación de ningún complejo a pH 7.5 (Figura 28).

Estos resultados indican que no hay coordinación del metal al péptido en las condiciones estudiadas y que esta modificación al extremo N-terminal es importante para entender la naturaleza de la interacción de Cu^{2+} con la AS.

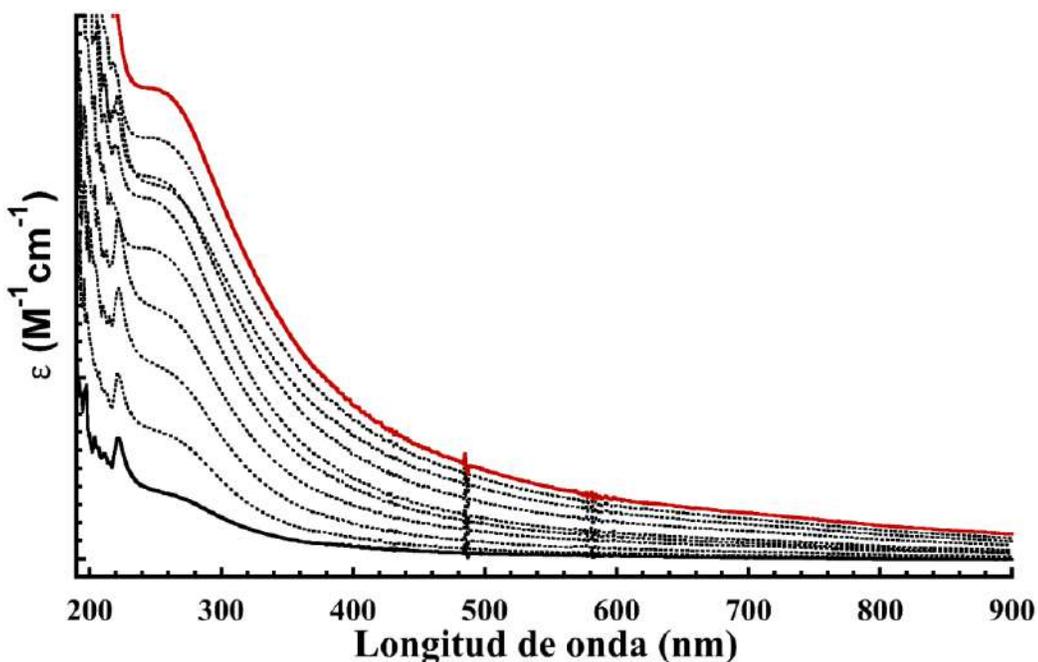


Figura 28. Titulación del AcAS (1-6) con cantidades crecientes de Cu^{2+} seguida por absorción electrónica cada 0.1 equivalentes, desde 0.1 (negro) hasta 1.0 (rojo) equivalentes a pH 7.5 en solución amortiguadora MOPS 20 mM a temperatura ambiente.

Por otro lado, al analizar el efecto del pH en la interacción de Cu^{2+} hacia la forma acetilada del AS (1-6), se encontró que en los espectros de CD del péptido AcAS (1-6) con un equivalente de Cu^{2+} a diferentes valores de pH, no existe ninguna señal por debajo de pH 9 (Figura 29, en línea continua en negro). Estos datos son consistentes con lo observado por absorción electrónica. A valores de pH mayores a 9 y hasta 12, aparecen 4 bandas: 2 positivas (32000 cm^{-1} y 17000 cm^{-1}) y 2 negativas (35600 cm^{-1} y 20000 cm^{-1}) que no corresponden al complejo encontrado por CD para el fragmento AS (1-6), lo cual sugiere que estas señales corresponden a otro sitio de coordinación donde no participan los ligandos del sitio 1. Cabe recordar que las transiciones electrónicas que ocurren a bajas energías ($\sim 15000\text{ cm}^{-1}$ – 20500 cm^{-1}) son asignadas a transiciones d-d, mientras que las de mayor energía ($\sim 28000\text{ cm}^{-1}$ – 32000 cm^{-1}) corresponden a transiciones tipo LMCT. Las señales asociadas al complejo Cu^{2+} -AcAS (1-6) aparecen a valores de pH a partir de 9 (espectro azul en la Figura 29), y crecen en intensidad hasta un pH 12 (espectro rojo en la Figura 29).

Cuando se compara este sitio encontrado en la forma acetilada del fragmento AcAS (1-6) con la forma no acetilada del AS (1-6) a la misma concentración de Cu^{2+} , se observa que las bandas de los espectros son completamente diferentes, en la región de las LMCT se encuentra un efecto Cotton arriba de 32000 cm^{-1} , con lo cual es un sitio muy diferente. Además, la banda a 32845 cm^{-1} ($\sim 308 \text{ nm}$) puede ser asignada como una banda LMCT asociada a la interacción del Cu^{2+} con una amida desprotonada de la cadena peptídica (N^-), las cuales normalmente aparecen en la región de 33898 a 31746 cm^{-1} (295 - 315 nm).

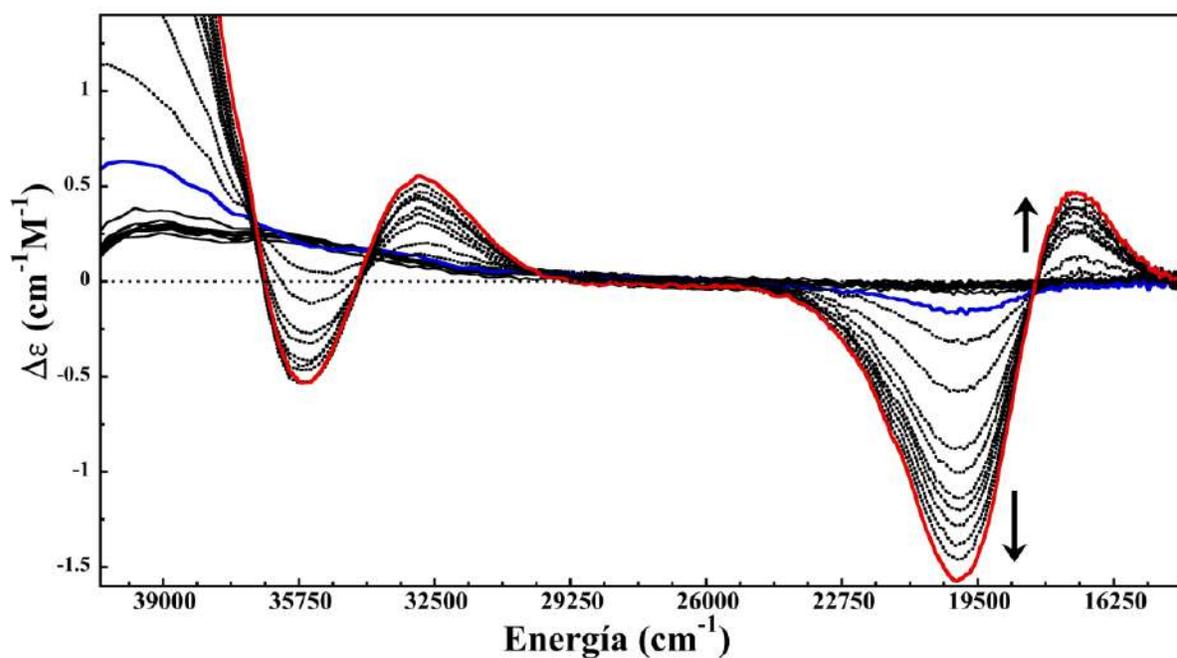


Figura 29. Espectros de CD de los complejos de Cu^{2+} con AcAS (1-6) a diferentes valores de pH, desde pH 7.2 (negro) hasta pH 12.2 (rojo), en solución amortiguadora NEM-MES 20mM a temperatura ambiente, y con 1 equivalente de Cu^{2+} .

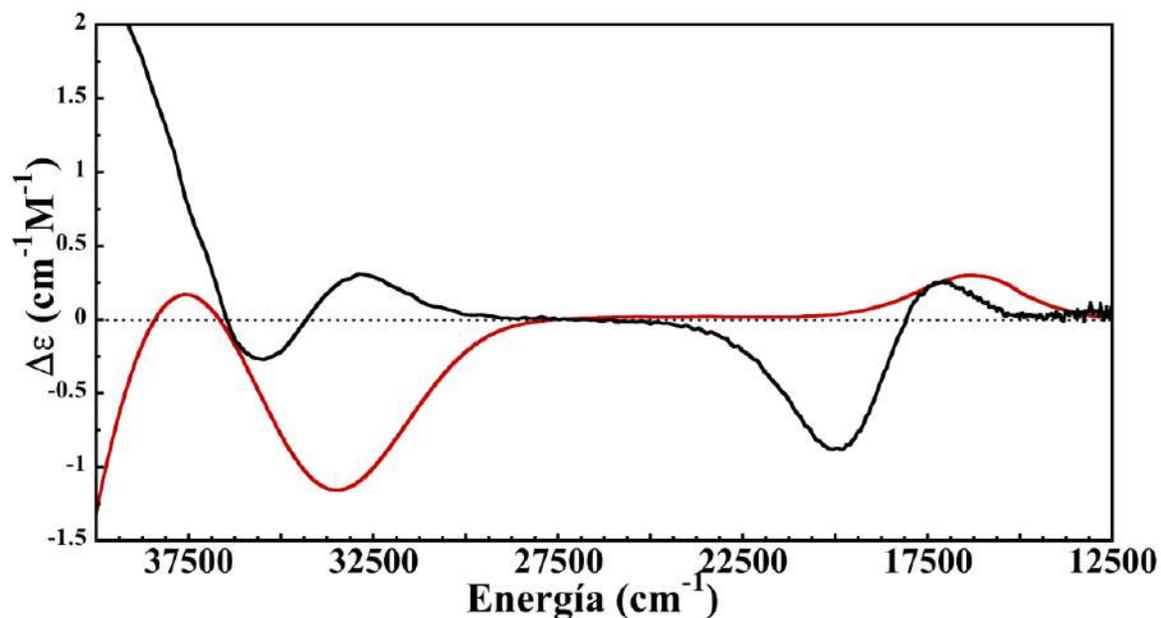


Figura 30. Comparación de los espectros de CD de los complejos de Cu^{2+} con AcAS (1-6) y AS (1-6) en negro y rojo respectivamente, con 1 equivalente de Cu^{2+} , a temperatura ambiente.

El complejo Cu^{2+} -AcAS (1-6) que logra formarse a partir de pH 9, fue caracterizado por EPR (Figura 31). El espectro tiene un conjunto de señales que se asocia a un valor $g_z=2.165$ y un valor $A_z=216$ G (A, en la Figura 31), los cuales no corresponden al **sitio 1** de la proteína completa AS ($g_z=2.25$; $A_z=184$ G), además que debajo de pH 9 el AcAS (1-6) no coordina Cu^{2+} , ya que aparecen otras señales (no mostradas), las cuales corresponden al cobre en solución, es decir sin coordinarse al fragmento.

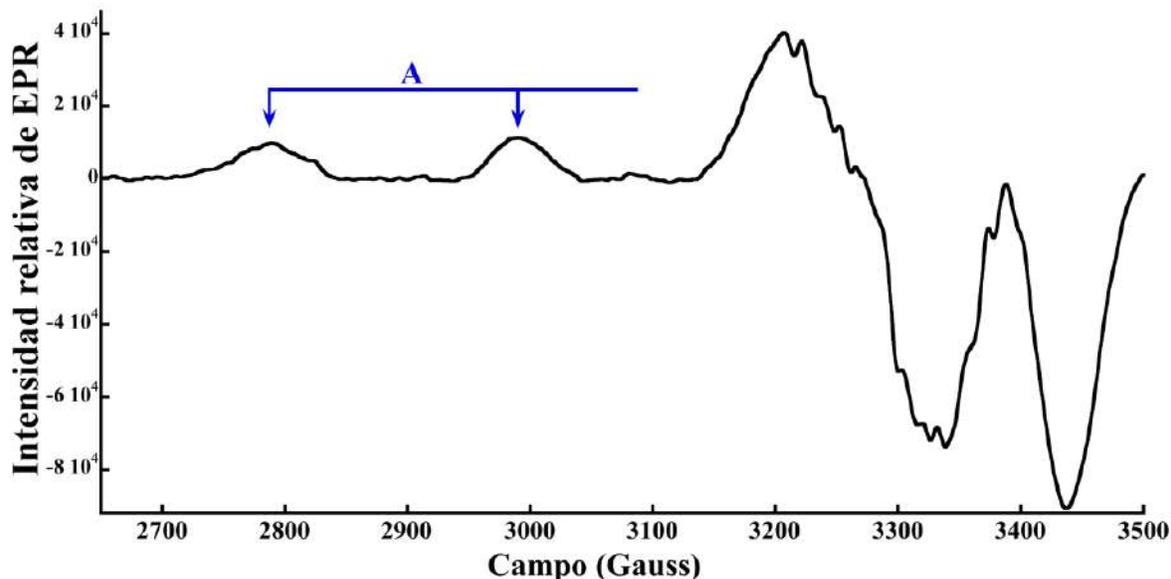


Figura 31. Espectro característico por EPR del complejo AcAS (1-6) con Cu^{2+} en relación equimolar, a un pH 11.5, en solución amortiguadora NEM/MES 20 mM a 150 K.

Cuando se comparan, los espectros de los complejos por EPR de la forma acetilada del fragmento AcAS (1-6) con la forma no acetilada del AS (1-6) a la misma concentración de Cu^{2+} , se observa que el sitio de coordinación es 4N, en la región ecuatorial, (Figura 32). Incluso, cuando se analiza el EPR de moléculas que contienen nitrógenos y azufres como ligandos ecuatoriales, los valores de g_z son parecidos, pero no causan desdoblamiento superhiperfino en la región ecuatorial del espectro, como los observados para el AcAS (1-6).

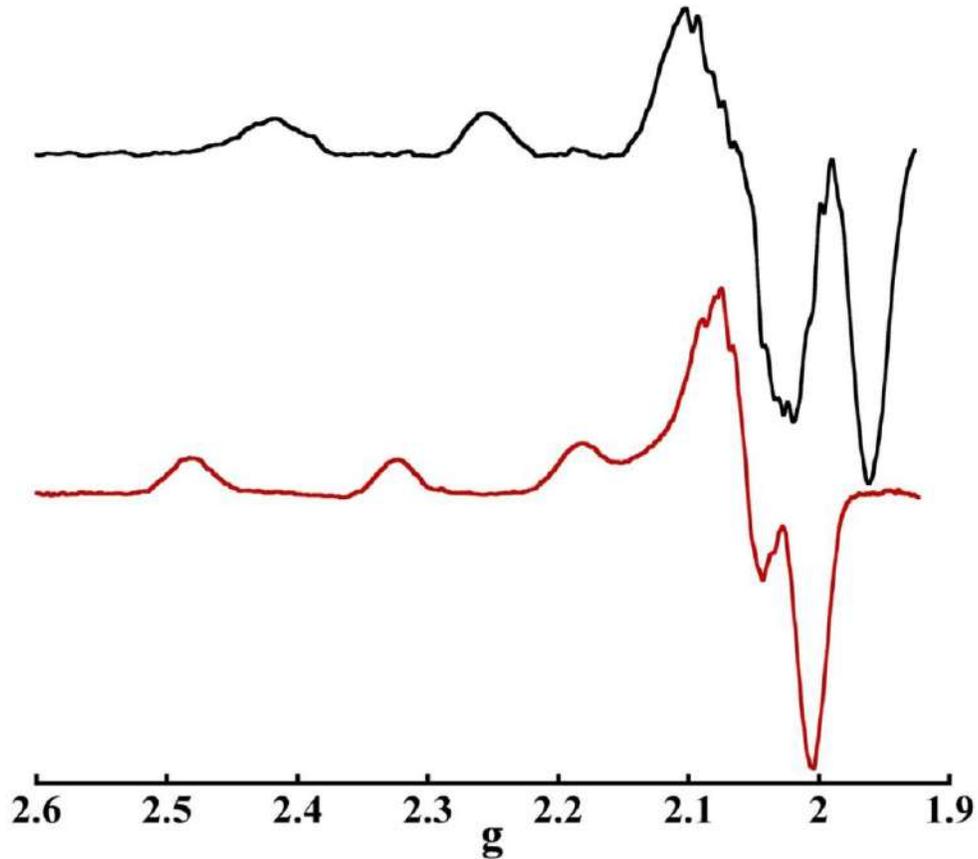


Figura 32. Comparación de los espectros de EPR de los complejos de Cu^{2+} con AcAS (1-6) y AS (1-6) en negro y rojo respectivamente, con 1 equivalente de Cu^{2+} , a 150 K.

De los datos espectroscópicos de la unión de Cu^{2+} al péptido Ac-AS (1-6), se concluye que la acetilación impacta de manera significativa la coordinación de Cu^{2+} al fragmento AS (1-6), reduciendo su afinidad por el metal a valores de pH en el rango fisiológico. Esto significa que, si la forma natural de la AS es la forma acetilada, el sitio 1 de unión a Cu^{2+} no existe en tal proteína. Sin embargo, también se sabe que la AS humana está en diferentes formas, y aunque se ha determinado que in vivo la AS está acetilada, su grado de acetilación en la enfermedad de Parkinson no ha sido evaluado.

Por tanto, es importante que esta modificación se tome en cuenta en las implicaciones que tienen las interacciones de Cu^{2+} hacia la proteína AS y su impacto en los procesos de formación amiloide. Por otro lado, el Dr. Claudio O Fernández y su grupo encontraron recientemente que la proteína acetilada, si bien no puede unir Cu^{2+} con la misma afinidad

que la forma no acetilada, es capaz de unir cobre en su estado de oxidación (I) y que el sitio de coordinación involucra azufres como ligandos provenientes de las metioninas que se encuentren en el extremo N-terminal. Estos hallazgos nos dan una nueva dirección para estudiar la química redox de este sitio en su forma acetilada.

CAPÍTULO 3. EVALUACIÓN DEL PAPEL DE LAS METIONINAS EN LA ESTRUCTURA Y REACTIVIDAD DEL SITIO 1 DE LA PROTEÍNA AS

SECCIÓN 3.1. Evaluación del papel de las metioninas del extremo N-terminal de la AS en la coordinación a Cu^{2+} .

La oxidación de las metioninas (Met) en las proteínas juega un papel importante *in vivo*, tanto estructural como en condiciones de estrés oxidativo. La AS tiene cuatro residuos de metioninas a lo largo de su estructura, dos de ellas (Met1 y Met5) están en la región del extremo N-terminal y las otras dos (Met116 y Met127) en el C-terminal.

Para entender el papel de las metioninas presentes en el extremo N-terminal de la AS en la coordinación de cobre, se sintetizaron variantes del péptido AS (1-6), cuya secuencia es $\text{M}^1\text{DVF}\text{M}^5\text{K}$, donde se cambiaron las metioninas (Met1, Met5 o ambas) por residuos de isoleucinas; esto con el fin de quitar al azufre como posible ligante (Figura 33). Los fragmentos sintetizados fueron: AS (1-6) M1I, con secuencia IDVFMK , AS (1-6) M5I, con secuencia MDVFIK y AS (1-6) M1I/M5I, con secuencia IDVFIK . En los péptidos sintéticos, el grupo amino del primer aminoácido quedó libre, tal como lo encontraríamos en la proteína completa ($-\text{NH}_2$) mientras que el carboxilo se encuentra amidado en el C-terminal.

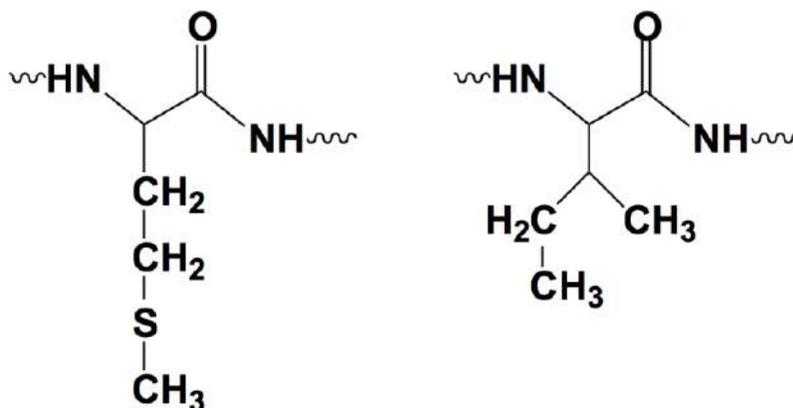


Figura 33. Representación de los aminoácidos en una cadena peptídica: metionina (Met, M) a la derecha e isoleucina (Ile, I) a la izquierda, donde se muestra la cadena lateral.

Con el fin de evaluar si la presencia de las metioninas influye en la coordinación de Cu^{2+} al **sitio 1** en la AS, se formaron complejos con los diferentes fragmentos sintetizados derivados del AS (1-6) con 0.9 equivalentes de Cu^{2+} a pH 7.5. Los espectros de absorción electrónica de los complejos formados (Figura 34, ampliación de la banda d-d, en la parte superior) muestran que la adición de Cu^{2+} ocasiona el crecimiento de la transición característica del complejo a 16400 cm^{-1} (610 nm, $\epsilon = 64\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Sin embargo, el sitio se satura después de un equivalente de Cu^{2+} y presenta las mismas señales observadas en la AS.

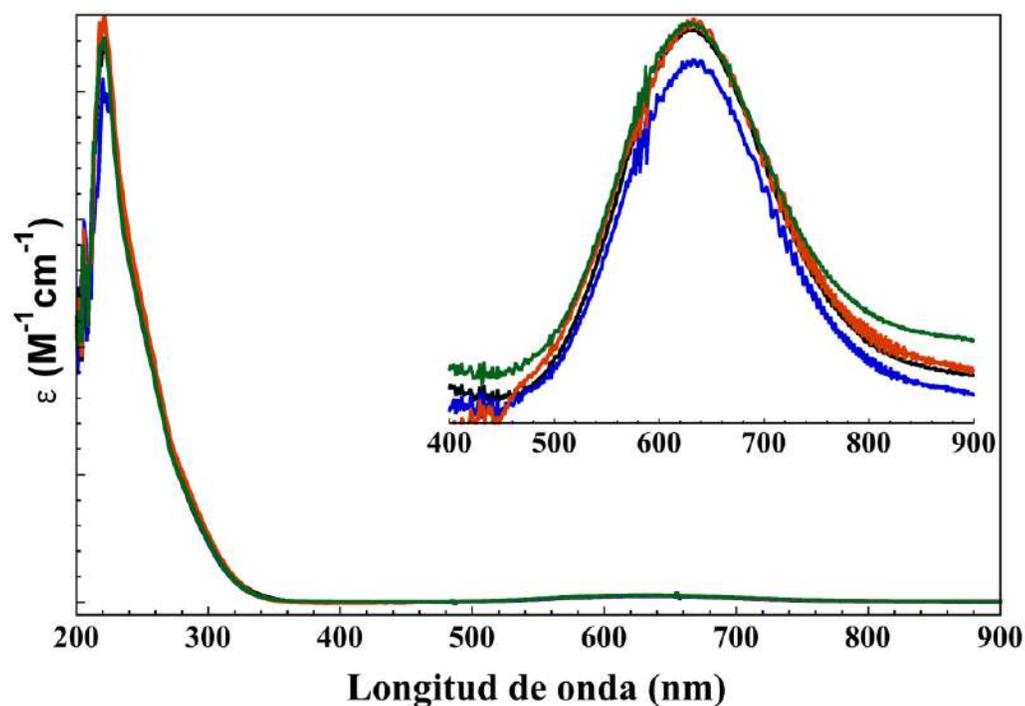


Figura 34. Comparación por absorción electrónica de los complejos con 0.9 equivalentes de Cu^{2+} de los fragmentos AS (1-6) en rojo, AS (1-6) MII, en azul, AS (1-6) M5I en verde, y AS (1-6) MII/M5I en negro, en solución amortiguadora MOPS 20 mM, pH 7.5 a temperatura ambiente. Ampliación de la banda d-d en la parte superior.

Estos datos, indican que el sitio 1 de la AS, con modo de coordinación 2N2O, no es afectado por la ausencia de la Met1 o de la Met5 o ambas al menos en su región ecuatorial, ya que la banda d-d es la misma en todos estos complejos, y los espectros son idénticos. De moléculas biológicas como las metaloproteínas que contienen Cu^{2+} , se conoce que los ligandos que comúnmente se encuentran unidos al ion metálico son los nitrógenos, los

oxígenos y los azufres de las cadenas laterales de los aminoácidos. Si se observa detenidamente la banda d-d del complejo AS (1-6) M1I (espectro azul, en la Figura 34), se puede notar que existe una ligera disminución de intensidad atribuida al reemplazo de la Met1, de lo cual se puede inferir que, aunque el azufre de la cadena lateral no participa como ligante al sitio de coordinación a Cu^{2+} , influye debido a su cercanía con el Cu^{2+} .

Los diferentes complejos de cobre también fueron analizados por dicroísmo circular a pH 7.5 con 0.9 equivalentes de Cu^{2+} . De forma similar a lo observado por absorción electrónica, los espectros de CD para estos complejos son casi idénticos (Figura 35), mostrando una banda positiva d-d a $16\,400\text{ cm}^{-1}$ (610 nm) y otra transición negativa de ligante a metal (LMCT) a $33\,000\text{ cm}^{-1}$ (303 nm), la cual se ha asignado a una amida desprotonada, y una segunda banda LMCT con una energía más alta ($43\,000\text{ cm}^{-1}$, 233 nm), que cae en el rango de las transiciones del grupo amino NH_2 a Cu^{2+} . En el acercamiento de la Figura 35, se observa una pequeña disminución en la intensidad en la banda d-d, que se encuentra a $16\,650\text{ cm}^{-1}$ para las variantes AS (1-6) M1I y AS (1-6) M1I/M5I, en comparación con la misma banda en los espectros de los complejos AS (1-6) y AS (1-6) M5I.

Este cambio en la banda d-d, podría deberse a una pequeña diferencia en la fuerza del campo ligante y/o a la disminución de la covalencia del complejo de Cu^{2+} , que está claramente asociado a la ausencia de la Met1. Esta observación sugiere que el azufre de la primera metionina podría desempeñar un papel como ligante axial o como parte de una segunda esfera de coordinación en el **sitio 1** de la AS.

De los datos de absorción electrónica y dicroísmo circular, se puede concluir que el sitio 1 de coordinación de Cu^{2+} a la proteína AS en el extremo N-terminal, que involucra los primeros aminoácidos, es afectado por la primera metionina, sólo en forma axial o como parte de una segunda esfera de coordinación.

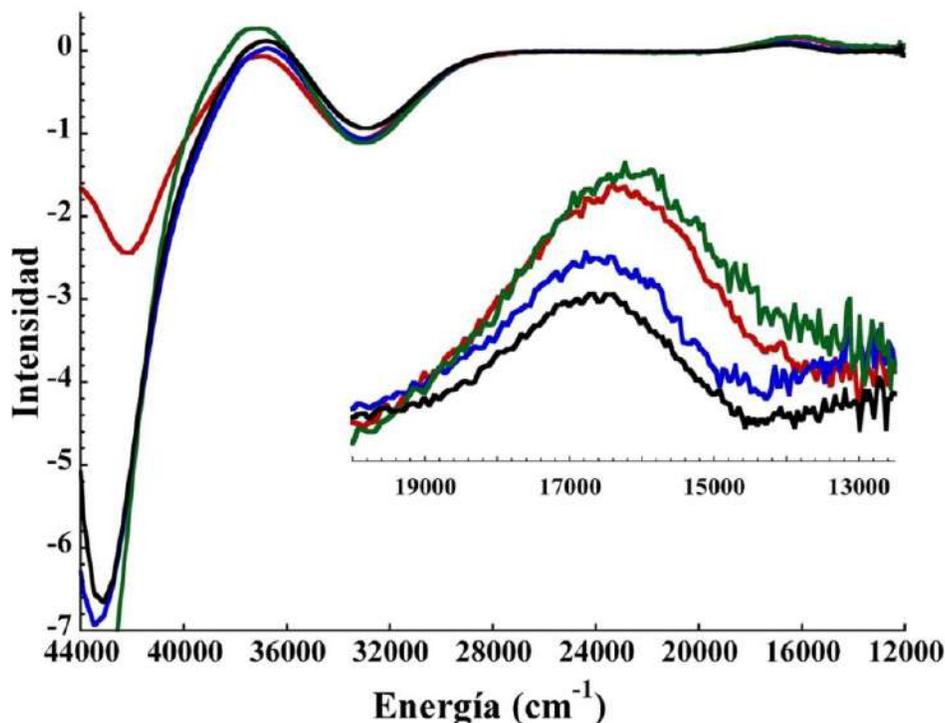


Figura 35. Comparación por absorción electrónica de los complejos de los fragmentos con 0.9 equivalentes de Cu^{2+} AS (1-6) en rojo, AS (1-6) M1I, en azul, AS (1-6) M5I en verde, y AS (1-6) M1I/M5I en negro, en solución amortiguadora MOPS 20 mM, a pH 7.5, a temperatura ambiente.

Al comparar los espectros de EPR de todos los complejos de Cu^{2+} de los fragmentos, se puede observar que muestran señales idénticas, independientemente de la presencia de metioninas (Figura 36). En todos los casos se observa un único conjunto de señales EPR que corresponden al **sitio 1**, con parámetros $g_z=2.25$ y $A_z=184$ G. Mientras que en la región perpendicular del espectro se observa también que los complejos formados son casi idénticos.

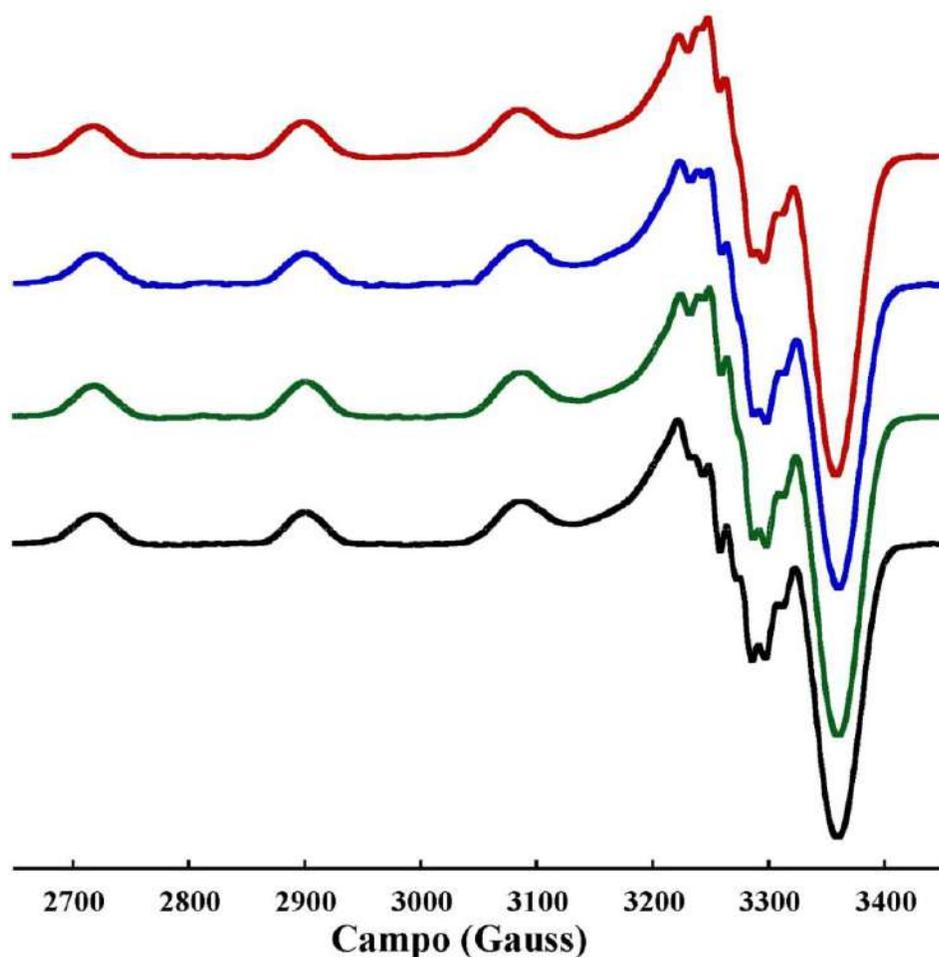


Figura 36. Comparación por EPR, Banda X a 150 K de los complejos de los fragmentos con 0.9 equivalentes de Cu^{2+} AS (1-6) en rojo, AS (1-6) M1I, en azul, AS (1-6) M5I en verde, y AS (1-6) M1I/M5I en negro, en solución amortiguadora MOPS 20 mM, pH 7.5

Los resultados de las diferentes técnicas espectroscópicas indican que la esfera de coordinación ecuatorial de Cu^{2+} del sitio 1 no se ve afectada significativamente por las sustituciones de Met por Ile en las posiciones 1 y 5. Asimismo, estos resultados descartan la participación de la Met5 como posible ligante axial y concuerdan con los valores experimentales de los parámetros de EPR observados para el complejo AS (1-6)- Cu^{2+} (**Tabla 1**).

de agua. Adicionalmente, para modelar el modo 2N2O1S se incluyó al átomo de azufre de la Met1 o Met5 participando como un ligante axial, dando lugar a un complejo pentacoordinado.

Para construir cada conjunto de modelos, se probaron diferentes conformaciones de partida del péptido: hélice alfa (a), beta-lámina (b) giro (t) y conformación extendida(e). Con los ocho modelos diferentes que fueron calculados, los resultados indican que los modelos con el azufre de la Met1 como ligante axial son energéticamente más favorables que aquellos que contienen a la Met5 como ligante axial. Por lo tanto, el sitio 1 de la proteína AS puede ser una mezcla de las poblaciones formadas por los modos de coordinación 2N2O y 2N2O1S.

SECCIÓN 3.2. Evaluación del papel de las metioninas 1 y 5 en la reducción del complejo Cu²⁺-AS (1-6)

Para caracterizar la química redox del sitio 1 en la AS, se evaluó el papel de las Met1 y Met5 en la reducción del sitio 1, usando como modelo al complejo Cu²⁺-AS (1-6). Las reducciones de los complejos de Cu²⁺ con AS (1-6) y las variantes AS (1-6) M1I, AS (1-6) M5I y AS (1-6) M1I/M5I, seguidas por absorción electrónica, se llevaron a cabo con ascorbato de sodio a pH 7.5 en condiciones anaeróbicas. La intensidad de absorción de la banda característica d-d en estos complejos (610 nm), se midió en función del tiempo después de la adición del ascorbato en exceso. La reacción de reducción para los complejos es la que se observa en la Ecuación 2, donde se utiliza al AS (1-6) como modelo peptídico, AA⁻ es la forma del ácido ascórbico como ascorbato y AA⁺ es su forma como dehidroascorbato, estas formas del ácido ascórbico se pueden observar en la Figura 38.

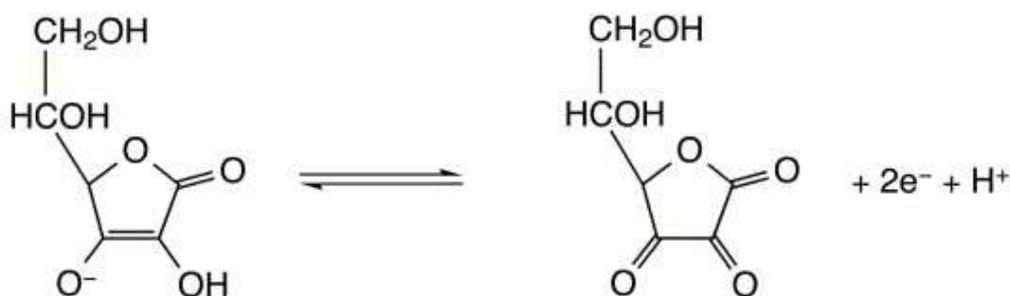
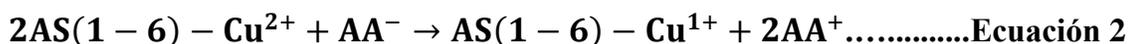


Figura 38. Reacción de oxidación del ascorbato (AA⁻) a su forma dehidroascorbato (AA⁺).

Se determinó que la cantidad de ascorbato necesario para lograr una reducción completa que permita estudiar la cinética de la reacción corresponde a 16 excesos de ascorbato con respecto a la concentración de cada uno de los complejos utilizados. En la Figura 39, se muestran los espectros de absorción de los experimentos cinéticos realizados, sólo mostrando la **banda d-d** de cada complejo, ya que la disminución de esta banda mostraría el grado de reducción del complejo.

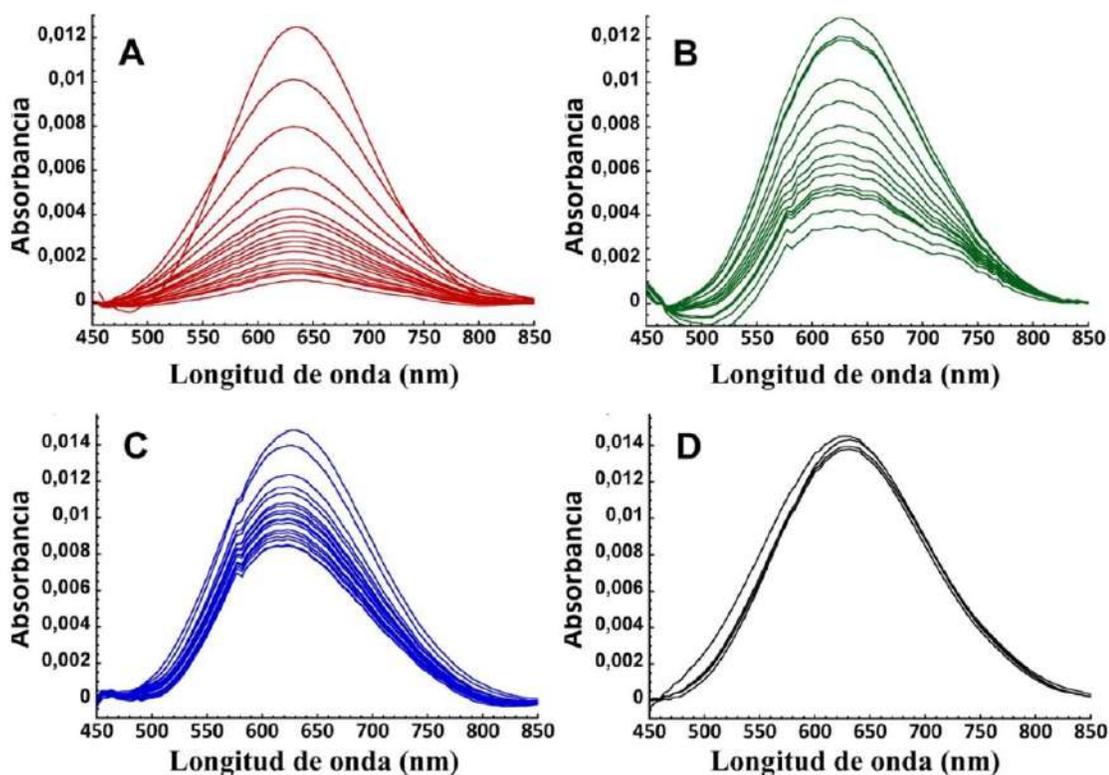


Figura 39. Espectros de absorción electrónica, siguiendo la reducción de los complejos con 16 excesos de ascorbato en solución amortiguadora MOPS 20 mM pH 7.5, a temperatura ambiente en condiciones anaeróbicas. Se muestran los espectros colectados después de la adición del agente reductor, de 0 a 120 min. AS (1-6)-Cu²⁺ en rojo, AS (1-6) M1I-Cu²⁺ en azul, AS (1-6) M5I-Cu²⁺ en verde, y AS (1-6) M1I/M5I-Cu²⁺ en negro.

La reducción del complejo AS (1-6)-Cu²⁺ por ascorbato fue casi completa 120 minutos después de la adición del agente reductor en condiciones anaeróbicas. La intensidad de absorción a 610 nm disminuyó en un 93% (Figura 39, espectro en rojo). De forma similar, en la reducción del complejo AS (1-6) M5I-Cu²⁺ hay una disminución del 84% de la banda d-d (Figura 39, verde). Sin embargo, para el complejo AS (1-6) M1I-Cu²⁺, que no tiene la Met1, la reducción es más difícil y solo se reduce el 45% del complejo (figura 39, azul).

De manera sorprendente, cuando se agrega ascorbato al complejo AS (1-6) M1I/M5I-Cu²⁺ no se observa reducción del complejo en absoluto (Figura 39, negro); incluso cuando se añade un exceso de reductor de 50 veces la concentración del complejo, el comportamiento

es el mismo. Estos resultados indican claramente que los residuos de metionina son esenciales para la reducción de este complejo, pero particularmente la Met1 parece jugar un papel más importante que la Met5. El hecho de que la Met1 sea más importante que la Met5 empata con el hecho de que la Met1 parece ser parte de una segunda esfera de coordinación para el caso de coordinación a Cu^{2+} , así que facilita su reducción estabilizando al Cu^{1+} coordinando posiblemente al azufre de la cadena lateral de la Met1.

Con los datos de la absorción electrónica a 610 nm para cada complejo, se ajustaron los cambios en absorción en función del tiempo (trazas de reducción) a un modelo de decaimiento de pseudo primer orden (**Ecuación 3**), las cuales se ajustaron con el programa Origin 8 y las constantes de rapidez de reducción calculadas (k_{obs}) son observadas en la **Tabla 4**. En la Figura 40, se muestran las gráficas de los ajustes realizados a los experimentos de reducción. Al contrastar las constantes de reducción de los complejos de Cu^{2+} con los péptidos AS (1-6) y AS (1-6) M5I se observa que son casi idénticas; $k_{\text{obsAS (1-6)}} = 0.120 \pm 0.016 \text{ min}^{-1}$ y $k_{\text{obsAS (1-6)M5I}} = 0.10 \pm 0.054 \text{ min}^{-1}$, respectivamente. Sin embargo, la substitución de la Met1 por Ile conduce a una disminución significativa en la constante de reducción: $k_{\text{obsAS (1-6)M1I}} = 0.050 \pm 0.001 \text{ min}^{-1}$, lo que sugiere que la Met1 desempeña un papel clave en la reducción del AS (1-6)- Cu^{2+} .

$$y = y_0 + Ae^{-x/t} \dots \dots \dots \text{Ecuación 3}$$

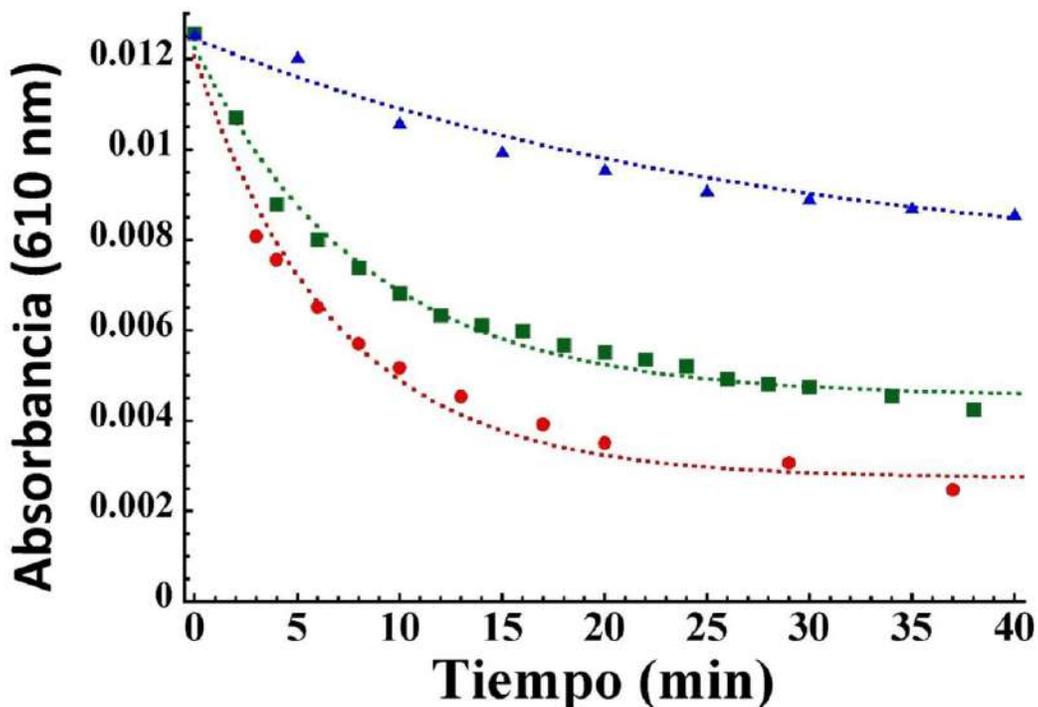


Figura 40. Ajustes de la cinética de reducción de los complejos Cu^{2+} -AS con 16 excesos de ascorbato a un modelo de decaimiento de pseudo primer orden, en solución amortiguadora a pH 7.5. AS (1-6)- $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^{1+}$ en rojo, AS (1-6) MII- $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^{1+}$ en azul, AS (1-6) M5I- $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^{1+}$ en verde.

Tabla 4. Constantes de rapidez de primer orden de la reducción de los complejos AS (1-6)- Cu^{2+} , AS (1-6) MII- Cu^{2+} y AS (1-6) M5I- Cu^{2+} a pH 7.5, con 15 excesos de ascorbato de sodio. Se indica la desviación estándar, calculada con 3 repeticiones experimentales.

Complejo	k_{obs} (min^{-1})
AS (1-6)- Cu^{2+}	0.120 ± 0.016
AS (1-6) M5I- Cu^{2+}	0.100 ± 0.005
AS (1-6) MII- Cu^{2+}	0.050 ± 0.001
AS (1-6) MII/M5I- Cu^{2+}	No hay reducción

SECCIÓN 3.3 Estimación de los potenciales de reducción, de los complejos de los fragmentos derivados del AS (1-6)-Cu(II/I) a pH 7.5

Basándose en la reducción anaeróbica por ascorbato del complejo AS (1-6)-Cu²⁺ y sus variantes AS (1-6) M1I-Cu²⁺ y AS (1-6) M5I-Cu²⁺, se pueden obtener estimaciones de sus potenciales de reducción, suponiendo el equilibrio químico como el punto final de las reducciones obtenidas por absorción electrónica de la Figura 39 y usando la reacción para la reducción de los diferentes complejos de Cu²⁺ (Ecuación 4), así como la expresión de la constante de equilibrio (Ecuación 5), donde C_i es la concentración de los diferentes complejos de Cu²⁺ [L-Cu²⁺] al inicio de la reacción y x es la cantidad de complejo reducido [L-Cu¹⁺] que fue obtenido por el porcentaje de reducción de la absorción a 610 nm, se puede



$$k_{eq} = \frac{\left[\frac{x}{2}\right][x]^2}{[8C_i - \frac{x}{2}][C_i - x]^2} \dots\dots\dots(\text{Ecuación 5})$$

$$\Delta G^{\circ} = -nF\Delta E^{\circ} \dots\dots\dots(\text{Ecuación 6})$$

$$\Delta E^{\circ} = E^{\circ}_{(Cu(II/I)-AS(1-6))} - E^{\circ}_{(AA/DA)} \dots\dots\dots (\text{Ecuación 7})$$

$$\Delta G^{\circ} = -RT \ln k_{eq} \dots\dots\dots (\text{Ecuación 8})$$

Los valores de los potenciales de reducción, E° AS (1-6)-Cu(II/I) y sus variantes E° AS (1-6) M1I-Cu(II/I), E° AS (1-6) M5I-Cu(II/I) y E° AS (1-6) M1I/M5I-Cu(II/I) fueron estimados a partir de las ecuaciones 6, 7, y 8 tomando en cuenta que el potencial para el ascorbato E°(AA/DA)=0.052 V vs. NHE (Electrodo Normal de Hidrógeno).

Se estimó que el potencial de reducción para el complejo AS (1-6)-Cu²⁺ es de 82 mV, mientras que para el AS (1-6) M5I-Cu²⁺ el potencial es 57 mV y para el AS (1-6) M1I-Cu²⁺ se obtiene un valor de 1.4 mV. Como se observa la ausencia de la Met1 causa la mayor caída en el potencial de reducción.

El cálculo de los potenciales de reducción para los complejos AS (1-6)-Cu y sus variantes, también se pueden determinar a partir de las afinidades hacia Cu²⁺ y Cu¹⁺ respectivamente, si se considera un ciclo termodinámico (Figura 36), donde se relacionan el potencial de reducción del complejo AS (1-6)-Cu²⁺, con el de Cu²⁺ libre y las afinidades relativas del péptido AS (1-6) para los iones Cu¹⁺ y Cu²⁺. Las constantes de formación de los complejos del péptido AS (1-6) con Cu²⁺ y Cu¹⁺ han sido determinadas experimentalmente por RMN^{10, 168, 169}, por el grupo del Dr. Claudio O Fernández y se pueden visualizar en la tabla 5.

Tabla 5. Constantes de disociación de los complejos formados de los péptidos AS (1-6), AS (1-6) M1I y AS (1-6) M5I a pH 7.5, con Cu²⁺ y Cu¹⁺. Se indica la desviación estándar.

Péptido	K _a (Cu ²⁺)	K _a (Cu ¹⁺)
AS (1-6)	0.11 ± 0.01 μM	20 ± 2 μM
AS (1-6) M5I		200 ± 20 μM
AS (1-6) M1I		500 ± 50 μM

Asumiendo un potencial de reducción del Cu²⁺/Cu¹⁺ de 0.153 V (1 atm y 298.15 K, en medio acuoso), donde tenemos al ion metálico libre es decir sin ligandos unidos, es posible estimar el potencial de reducción del complejo Cu-AS (1-6), usando la siguiente ecuación 7:

$$E_b - E_f = 0.059 * \frac{K_a(Cu^{1+})}{K_a(Cu^{2+})} \dots\dots\dots \text{Ecuación 7}$$

Donde E_f es el potencial de reducción del Cu libre, K_a(Cu¹⁺) corresponde a la constante de asociación del complejo AS (1-6)-Cu¹⁺, K_a(Cu²⁺) corresponde a la constante de asociación del complejo de Cu²⁺ y E_b es el potencial de reducción para las variantes del AS (1-6). Utilizando E_f=0.158 V (versus el potencial normal de electrodo de Hidrógeno) y las constantes de afinidad (las cuales son el inverso de las constantes de disociación) para el complejo AS (1-6)-Cu: K_a(Cu²⁺)=5*10⁶ M, K_a(Cu¹⁺)=5*10⁴ M, E_b para el complejo AS (1-6)-Cu se estimó +0.040 V, mientras que para el AS (1-6) M1I-Cu se estimó -0.042 V, usando

el valor de la constante de afinidad $K_a(\text{Cu}^{1+})=2 \cdot 10^3 \text{ M}$, para esta variante. De esta manera, se explicaría una disminución en 82 mV en el potencial de reducción causado por la ausencia de Met1.

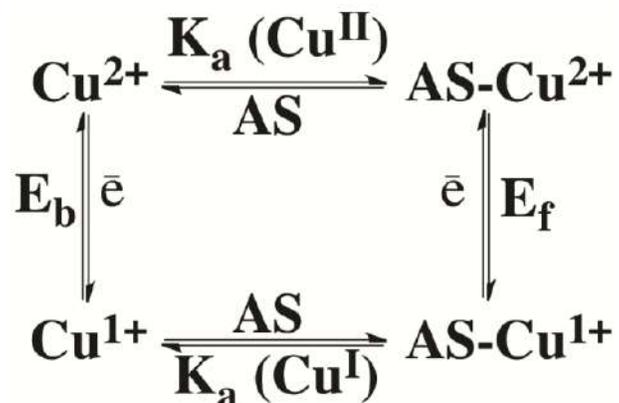


Figura 36. Ciclo termodinámico, donde se especifican las reacciones de óxido-reducción y las afinidades para el complejo AS (1-6)-Cu²⁺/Cu¹⁺ y el Cu libre.

La disminución drástica en el potencial de reducción del complejo de AS (1-6) al reemplazar la Met1 por Ile es consistente con una menor afinidad por Cu¹⁺, esto fue confirmado en un reciente estudio, donde se estudió la unión de Cu¹⁺ a la AS por RMN y se determinó la constante de disociación aparente K_d .¹⁶⁹

SECCIÓN 3.4 Análisis de la rapidez de reacción de las reducciones usando la ecuación de Marcus.

Utilizando la ecuación semiclásica de Marcus para la transferencia de electrones, se calculó la relación entre las constantes de rapidez que presentan los complejos AS (1-6)-Cu y AS (1-6) MII-Cu, $k_{ETAS(1-6)}/k_{ETAS(1-6)MII}$, donde se asumió que la matriz de acoplamiento electrónico H_{AB} es comparable para ambos procesos de reducción para ambos complejos, es decir, que $H^2_{AB(AS(1-6))}=H^2_{AB(AS(1-6)MII)}$. De esta forma podemos usar una ecuación donde se relacionan las velocidades de reducción para ambos complejos:

$$\frac{k_{ETAS(1-6)}}{k_{ETAS(1-6)MII}} = \frac{\lambda^{1/2}_{ETAS(1-6)MII}}{\lambda^{1/2}_{ETAS(1-6)}} e^{\frac{(\Delta G^{\circ}_{AS(1-6)MII} + \lambda_{AS(1-6)MII})^2}{4\lambda_{AS(1-6)MII}k_B T} - \frac{(\Delta G^{\circ}_{AS(1-6)} + \lambda_{AS(1-6)})^2}{4\lambda_{AS(1-6)}k_B T}}$$

Las energías de reorganización que se usaron fueron las calculadas a partir de las estructuras de Cu con los modos de coordinación 2N2O y 2N2O1S, donde se considera el azufre como ligante axial. La energía calculada es 1.60 eV y 1.58 eV respectivamente. Por lo tanto, podemos asumir que las energías de reorganización son similares sin tomar en cuenta la interacción axial del azufre, es decir $\lambda_{AS(1-6)}=\lambda_{AS(1-6)MII}$. Con las energías libres calculadas a partir de los estudios cinéticos de reducción, $\Delta G^{\circ}_{AS(1-6)}=-1.4$ kcal/mol y $\Delta G^{\circ}_{AS(1-6)MII}=+2.3$ kcal/mol, se obtiene una relación de constantes de rapidez $k_{ETAS(1-6)}/k_{ETAS(1-6)MII}=26$. Sin embargo, el valor experimental para $k_{ETAS(1-6)}/k_{ETAS(1-6)MII} = 2.4$. Este análisis indica que hay otros factores que contribuyen a que la rapidez de reducción del complejo AS (1-6)-Cu²⁺ sea afectada por la sustitución de la Met1. Por ejemplo, para que lleguemos al valor experimental de $k_{ETAS(1-6)}/k_{ETAS(1-6)MII} = 2.4$, tendríamos que hacer un reajuste de la energía de reorganización de la variante sin la Met1 a un valor de $(\lambda_{AS(1-6)MII} = 1.35$ eV, es decir 0.23 eV menos de lo originalmente estimado. Incluso en un estudio electroquímico aplicado a nuestros péptidos con Cu²⁺, hay evidencia de una cinética de transferencia electrónica más rápida para el AS (1-6) MII, lo cual podría reflejarse en la menor energía de reorganización que el AS (1-6).¹⁷⁰

SECCIÓN 3.5. Reactividad del complejo AS (1-6)-Cu¹⁺ y sus variantes con oxígeno.

Para evaluar la reactividad frente a oxígeno, a los complejos previamente reducidos con ditionita de sodio AS (1-6)-Cu¹⁺, AS (1-6) MII-Cu¹⁺ y AS (1-6) M5I-Cu¹⁺, se les añadió solución amortiguadora MOPS saturada con oxígeno a 4 °C e inmediatamente se monitoreó su espectro de absorción electrónica para observar la reoxidación del complejo. Si el complejo es reoxidado, esto será evidente mediante el aumento de la intensidad de la banda d-d a 610 nm.

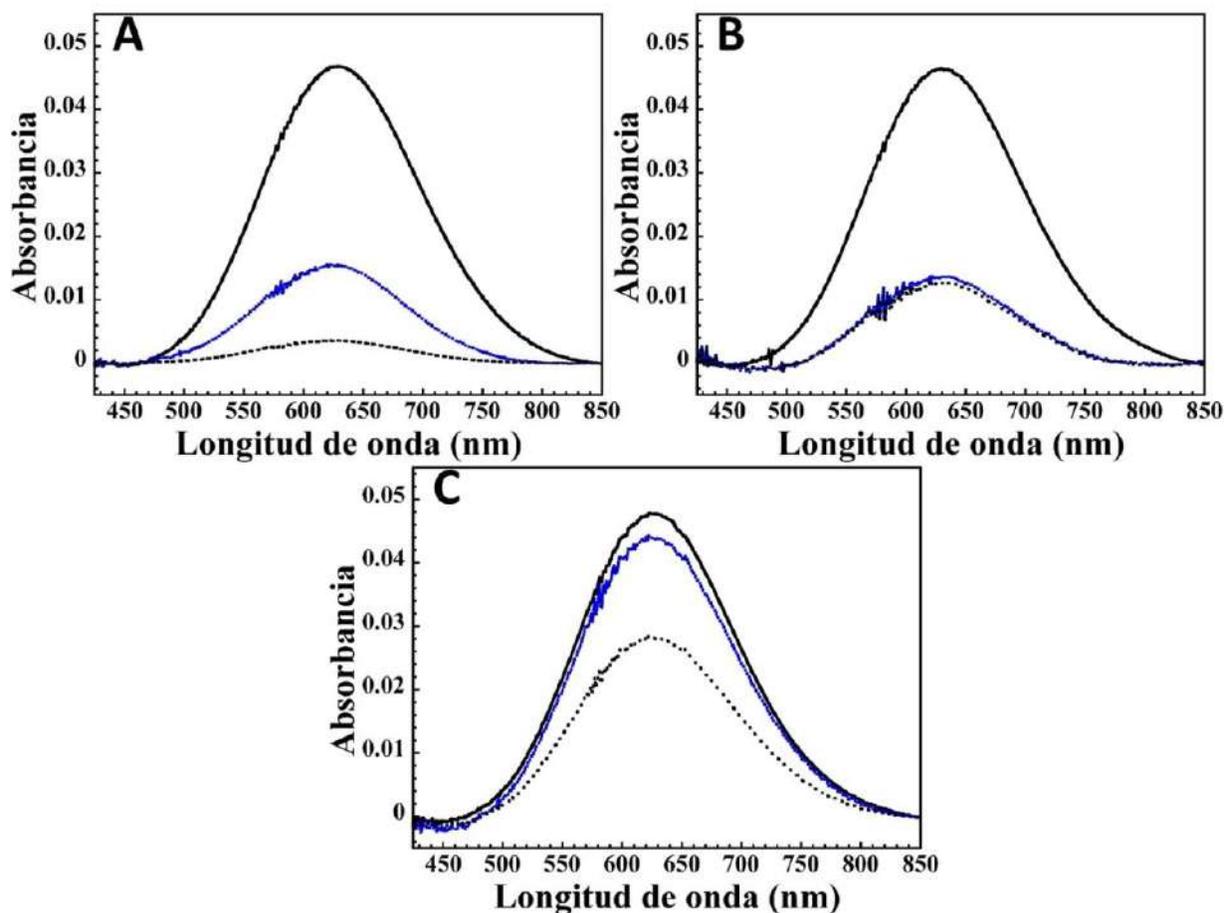


Figura 37. Espectros de absorción electrónica durante la reducción y re-oxidación de los complejos de Cu con: AS (1-6) (A), AS (1-6) M5I (B) y AS (1-6) MII (C), en solución amortiguadora MOPS 20 mM pH 7.5 saturada con oxígeno. En línea continua se muestra el complejo de Cu²⁺, mientras que en línea punteada el complejo (después de la adición de 1 equivalente de ditionita y 90 min de reacción), y en azul el complejo reoxidado.

El grado de recuperación de la banda d-d fue diferente para cada complejo, como se aprecia en la Figura 37. Este proceso, es dependiente de la presencia de las metioninas. Para el complejo AS (1-6)-Cu, la reducción en línea continua (Figura 37, panel A) muestra un decremento del 93% de la banda original, mientras que al adicionar oxígeno en este punto la recuperación de la banda d-d logra ser un 33% de la original en 90 minutos, en suma es una recuperación del 26%. Mientras que para el complejo AS (1-6) M5I la reducción en línea continua (Figura 37, panel B) muestra un decremento del 73% de la banda original, mientras que al adicionar oxígeno en este punto la recuperación de la banda d-d logra ser un 30% de la original en 90 minutos en suma es una recuperación del 3% y para el complejo AS (1-6) M1I, la reducción en línea continua (Figura 37, panel C) muestra un decremento del 41% de la banda original, mientras que al adicionar oxígeno en este punto la recuperación de la banda d-d logra ser un 92% de la original en 90 minutos, lo cual es en suma una recuperación del 50%.

La tendencia en base al grado de recuperación de la banda d-d del proceso de reoxidación es AS (1-6) M1I > AS (1-6) > AS (1-6) M5I, lo cual indica que la Met5 conduce el proceso de reoxidación, mientras que la Met1 el proceso de reducción. De los resultados anteriores, podemos concluir que las metioninas son residuos indispensables para la reducción del complejo de Cu^{2+} a Cu^{1+} a pH 7.5, y que por lo tanto la reoxidación es dirigida primeramente por el grado de reducción y después por la reactividad hacia el oxígeno por parte de los complejos de Cu^{1+} .

Para una mejor caracterización del proceso redox, a continuación, se muestran los complejos reducidos (en su punto final) y reoxidados, comparados contra el complejo inicial en solución amortiguadora a pH 7.5.

SECCIÓN 3.6 Análisis de las especies oxidadas por HPLC-Espectrometría de Masas.

Dado que los datos de absorción electrónica durante la reoxidación de los complejos Cu-AS señalan que no fue posible recuperar al 100% los complejos Cu^{2+} -AS iniciales, se determinó pertinente analizar las muestras reoxidadas de los complejos Cu-AS, para evaluar si el ciclo redox dio lugar a algún daño oxidativo en el péptido. Para esto, las muestras se trataron con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) para complejar el cobre y después hacer pasar las muestras a través de una columna de HPLC y obtener el espectro de masas de cada pico del cromatograma en un equipo ESI-TOF.

En todos los casos, los cromatogramas (Figura 38) muestran un pico con tiempo de retención alrededor de 31 min (marcado como ** en AS (1-6) MII y AS (1-6) M5I y cómo *** en AS (1-6)), en los cuales los análisis de sus espectros de masas revelaron la presencia de los péptidos intactos con valores m/z idénticos a los péptidos purificados (Figura 39). También, los cromatogramas revelan la presencia de otras especies, a diferentes tiempos de retención.

Para el AS (1-6), se observan dos especies adicionales: uno que eluye a 26.1 min (etiquetado como **, en la Figura 38) el cual muestra una relación m/z correspondiente a la masa del péptido AS (1-6) con un oxígeno (Figura 39, panel B); y una segunda especie a 21.9 min (etiquetado cómo *, en la Figura 38) correspondiente al AS (1-6) con dos átomos de oxígeno (Figura 39, panel B). Las tres especies mayoritarias que se observan en los espectros de masas son, el péptido ($m/z=769.36$) y el péptido más un oxígeno ($m/z=785.39$) lo cual puede corresponder a que una metionina (Met1 o Met5) y otra especie que es el péptido más dos oxígenos ($m/z=801.34$) la cual indicaría que ambas metioninas están oxidadas, la proporción de estas especies al analizar el cromatograma es 31%, 42% y 27% respectivamente.

De esta relación, podemos concluir que sólo una tercera parte del péptido se recupera intacto, es decir sin ninguna modificación química y que la población restante sufre una modificación en una metionina o en ambas. Esto coincide con lo visto por absorción electrónica, ya que la recuperación de la banda d-d es alrededor del 26%, después de que se reoxidará el complejo.

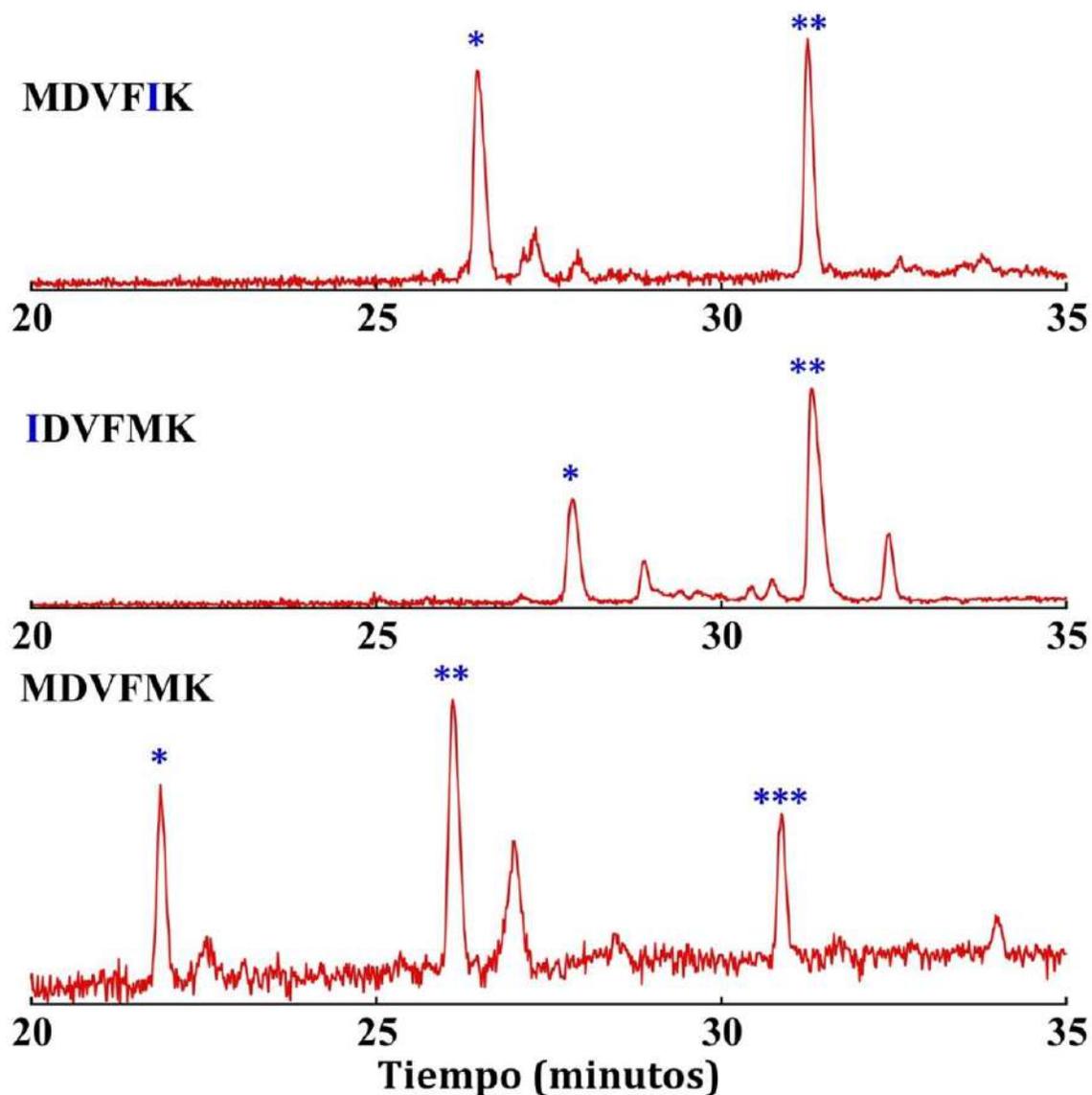


Figura 38. Cromatogramas de HPLC en fase reversa de las especies AS (1-6), AS (1-6) M1I y AS (1-6) M5I (de arriba hacia abajo) después de un ciclo redox.

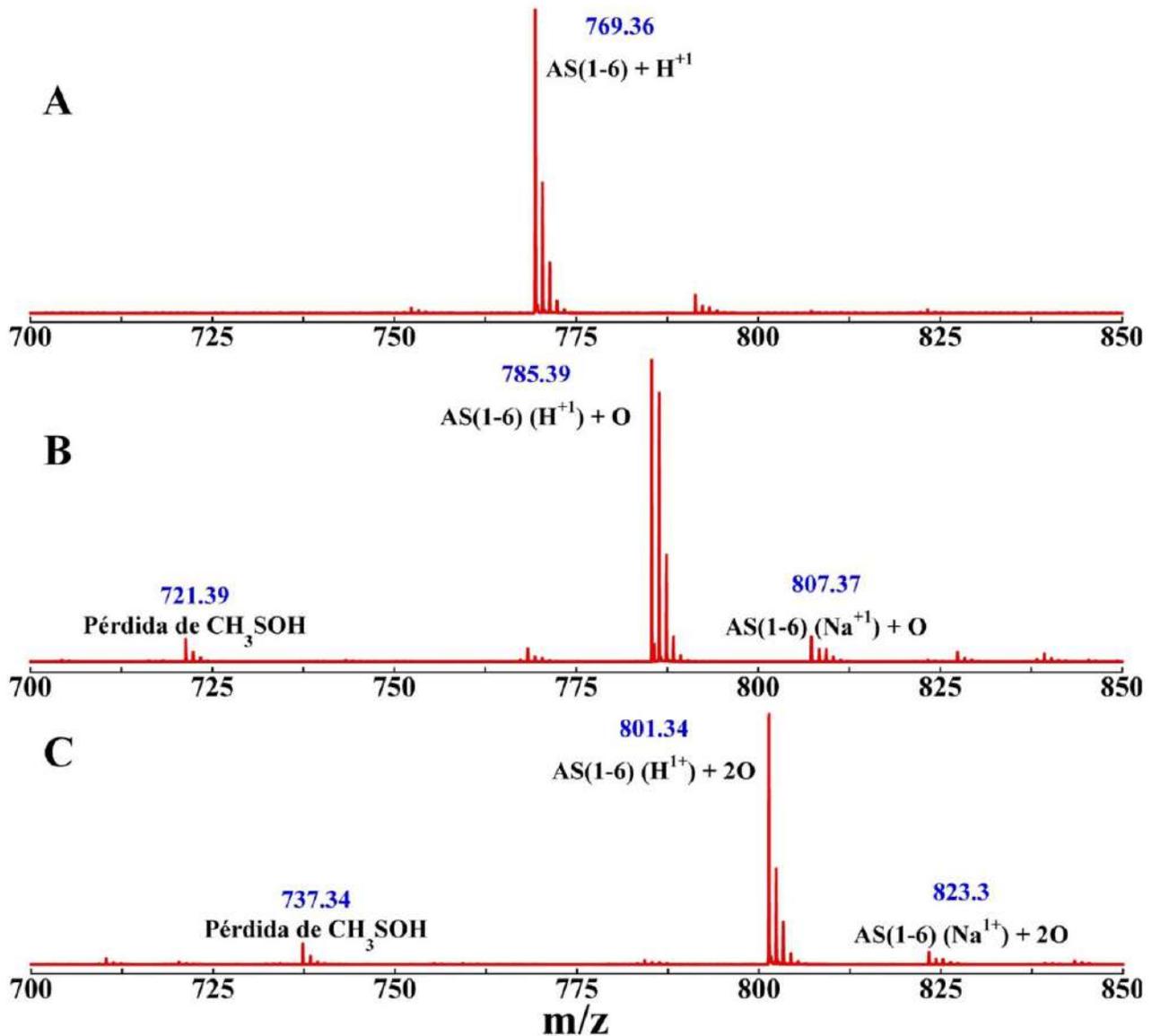


Figura 39. Espectros de masas de las especies oxidadas obtenidas de HPLC en fase reversa después de un ciclo redox del AS (1-6). En A, especies a $t_r=31$ min, en B, especies a $t_r=26.1$ min y en C, especies a $t_r=21.9$ min.

Se sabe que la oxidación de las metioninas conduce al sulfóxido de metionina, un producto biológicamente relevante. Sin embargo, el siguiente paso, la oxidación a la sulfona, requiere un ataque químico más drástico y rara vez se ha encontrado en sistemas biológicos, por eso es lógico concluir que las dos metioninas oxidadas están como sulfóxido. Esta noción es consistente con el hecho de que, en ningún caso, se observó la adición de más de dos

átomos de oxígeno por péptido, lo cual se esperaría para el caso en que una o ambas Met fuesen oxidadas a sulfonas. Adicionalmente, en las especies oxidadas del AS (1-6) (Figura 39, paneles B y C) se observa un pico que corresponde a una pérdida de 64 Da, que corresponde a un fragmento de CH_3SOH , lo cual es indicativo de la oxidación del azufre de metionina a sulfóxido¹⁷¹.

A la par, los cromatogramas de los péptidos AS (1-6) M5I y AS (1-6) M1I (Figura 38) revelan la presencia mayoritaria de 2 picos, uno que contiene al péptido intacto (tiempo de retención alrededor de 31 min) y otro pico que corresponde a otra especie. Para la especie AS (1-6) M1I, al analizar las masas de sus especies después de la reoxidación (Figura 40), se observa al péptido en $m/z=751.36$ (panel A), mientras que el péptido más un átomo de oxígeno a $m/z=767.39$ (panel B) lo cual corresponde a la oxidación de la Met5. La proporción de estas especies al analizar el cromatograma es 67% y 33% respectivamente. De esta relación podemos concluir que dos terceras partes del péptido se recupera intacto, es decir sin ninguna modificación química y que la población restante se queda con la Met5 oxidada como sulfóxido. Es importante mencionar que, para este péptido no se observó la adición de dos oxígenos, lo cual es consistente con la noción de que la Met5 únicamente puede ser oxidada a sulfóxido y no a sulfona. También en las especies oxidadas del AS (1-6) M1I (Figura 40, panel B) se observa un pico a $m/z=703.34$, el cual corresponde a una pérdida de 64 Da (asignada a CH_3SOH).

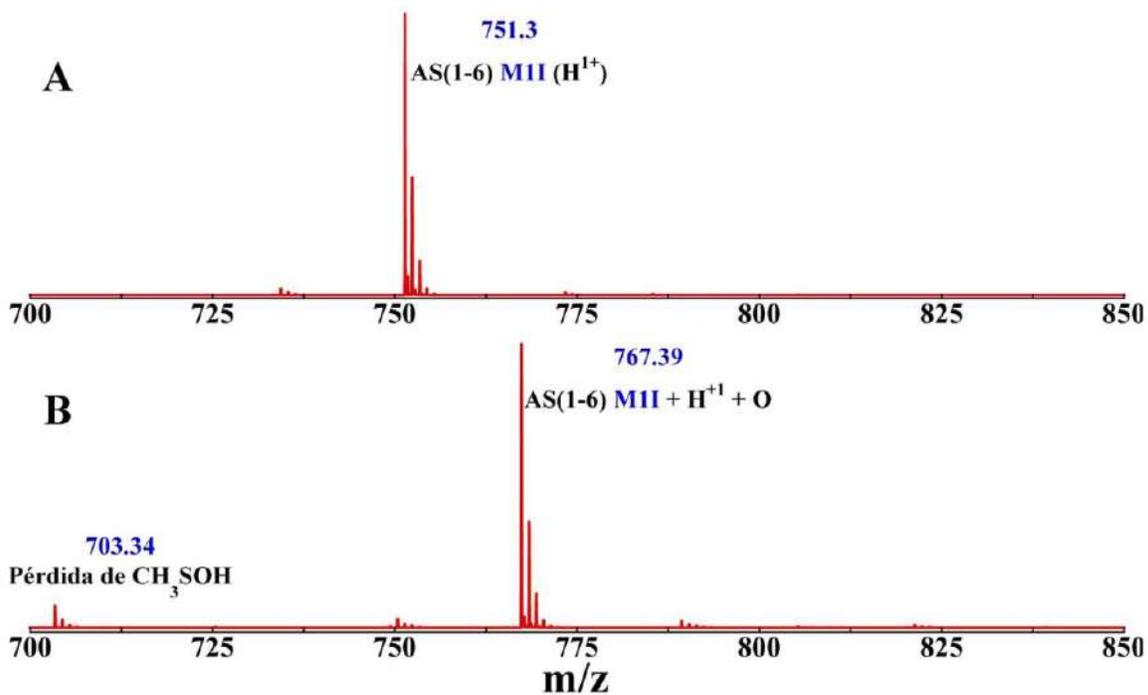


Figura 40. Espectros de masas de las especies oxidadas obtenidas de HPLC en fase reversa después de un ciclo redox del AS (1-6) MII. En A, especies a $t_r=31$ min, en B, especies a $t_r=27.8$ min

Para el AS (1-6) M5I, al analizar las masas de sus especies después de la reoxidación (Figura 41), se observa al péptido en $m/z=751.36$ (panel A), mientras que el péptido más un oxígeno a $m/z=767.39$ (panel B) lo cual corresponde a la oxidación de la Met1, la proporción de estas especies de acuerdo con su cromatograma es 53% y 47% respectivamente. De esta relación podemos concluir que la mitad de la concentración del péptido se recupera intacto, es decir sin ninguna modificación química y que la otra mitad se encuentra con la Met1 oxidada como sulfóxido. Es importante mencionar que, para este péptido no se observó la adición de dos oxígenos, lo cual es consistente con la noción de que la Met5 únicamente puede ser oxidada a sulfóxido y no a sulfona.

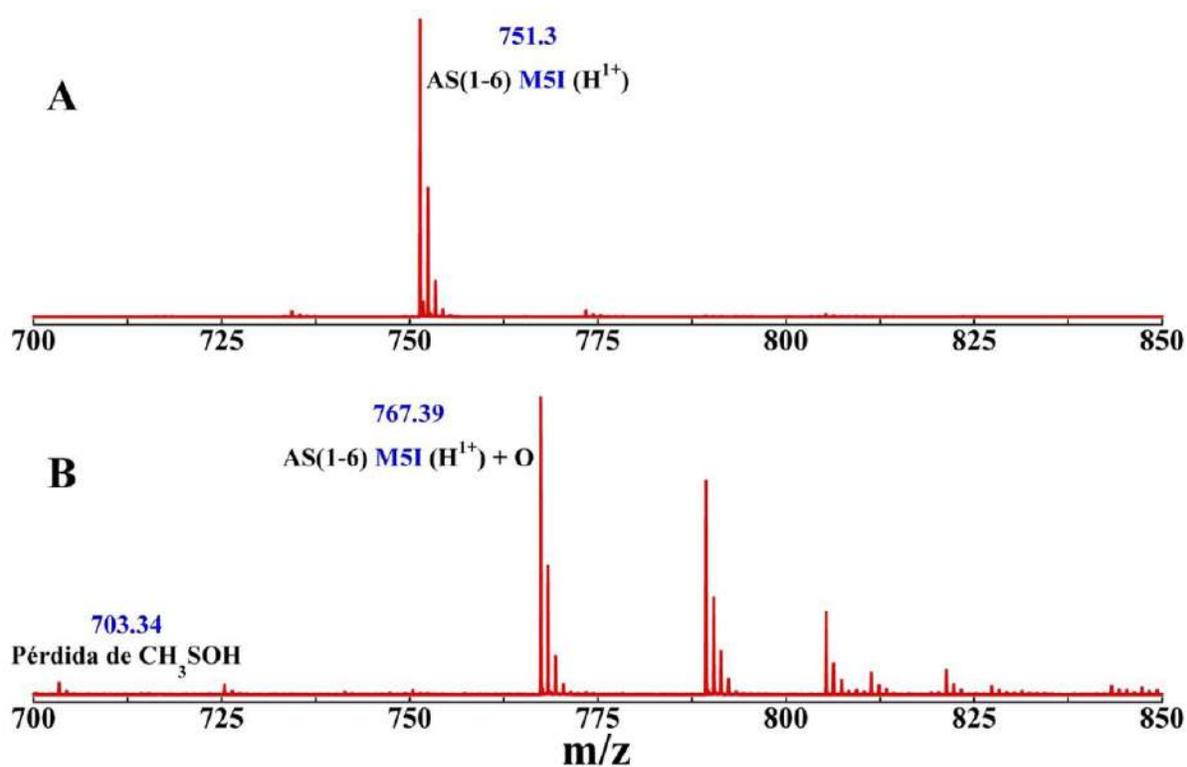


Figura 41. Espectros de masas de las especies oxidadas obtenidas de HPLC en fase reversa después de un ciclo redox del AS (1-6) MII. En A, especies a $t_r=31.2$ min, en B, especies a $t_r=26.5$ min

En el caso del fragmento AS (1-6) MSI, que contiene únicamente la Met1, el grado de oxidación como sulfóxido es mayor (47%) en comparación con el péptido AS (1-6) MII (33%), que contiene solamente Met5. Estos resultados son consistentes con la noción de que la Met1 es más susceptible a la oxidación que Met5, como ya se observó en un estudio por RMN¹⁶⁹. La mayor susceptibilidad de la Met1 a la oxidación es probablemente debido al hecho de que este residuo juega un papel clave como ligante tanto para Cu²⁺ como para Cu¹⁺.

SECCIÓN 3.7 Mecanismo de la oxidación del AS (1-6) catalizado por $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^{1+}$

Los resultados del análisis por espectrometría de masas de los complejos Cu-AS después de un ciclo redox, sugieren que las especies de metionina como sulfóxido son susceptibles a una reacción de eliminación para generar CH_3SOH (ácido metanosulfénico), modificando la cadena lateral de la metionina y convirtiéndola en un alqueno (Figura 42). Tal modificación química irreversible sobre los residuos Met1 y Met5 disminuyen la posibilidad de la AS para unir Cu^{1+} .

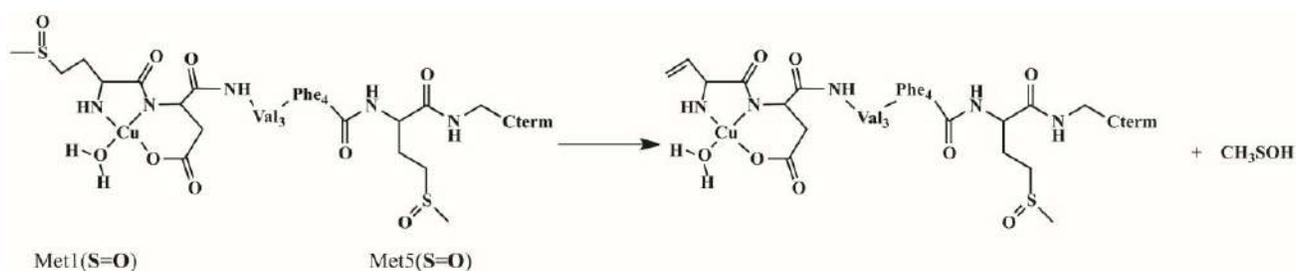


Figura 42. Mecanismo de la oxidación de las metioninas Met1 y Met5 de la AS (1-6), catalizada por cobre, donde se aprecian las especies oxidadas.

Estas modificaciones químicas en la región extremo N-terminal de la AS tienen diferentes impactos, uno de ellos sobre los procesos de agregación ya que se ha visto que la AS con metioninas oxidadas no forma fibras a pH 7.5, pero, se ha sugerido que la oxidación de los residuos de metionina favorece la formación de oligómeros tóxicos, y que incluso afecta la capacidad de la proteína para asociarse a las membranas. En el medio celular, la oxidación de las metioninas puede ser revertido por ciertas enzimas, tales como la metionina sulfóxido reductasas (Msr). De hecho, se ha demostrado recientemente que las MsrA y MsrB reducen las metioninas del extremo N-terminal, pero no del C-terminal y que MsrA puede reducir la forma sulfóxido de la Met5 en la AS, pero no revertir la oxidación de la Met1. Por otro lado, en el caso de la forma de la AS acetilada se ha encontrado que la Met1 es un buen sustrato para la MsrA.

Tabla 6. Resumen de las modificaciones observadas por HPLC-MS para cada fragmento de las variantes del AS (1-6) después de un ciclo redox $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^{1+}$ y enfrentarlos a un ambiente con oxígeno. Para cada especie detectada, se muestran el tiempo de retención (t_R), cuantificación relativa, y m/z observada mediante ESI-TOF MS.

<i>Péptido</i>	<i>Modificación</i>	<i>m/z</i>	<i>t_R (min)</i>	Cuantificación
AS (1-6)	Ninguna	769.36	30.8	19.8%
	Oxidación de una Metionina	785.38	26.1	29.7%
	Oxidación de ambas Met1&Met5	801.34	21.9	22.2%
AS (1-6) M5I	Ninguna	751.30	31.3	47.5%
	Oxidación de una Metionina	767.39	26.4	41.4%
AS (1-6) M1I	Ninguna	751.30	31.4	54.4%
	Oxidación de una Metionina	767.39	27.8	27.5%

SECCIÓN 3.8 Voltamperometría cíclica de los complejos del AS (1-6).

Una vez caracterizados espectroscópicamente los complejos de AS (1-6)-Cu²⁺ y sus variantes, se determinaron los potenciales redox correspondientes. Para ello, se usó la voltamperometría cíclica (CV, *Cyclic Voltammetry* por sus siglas en inglés). Cabe mencionar que todas las mediciones de voltamperometría cíclica fueron llevadas a cabo por Lidia Guadalupe Trujano Ortiz en el laboratorio del Dr. Felipe González (Depto. de Química, Cinvestav).

La voltamperometría cíclica de los diferentes complejos de Cu²⁺ se llevaron a cabo a pH 7.4 (Figura 43). El comportamiento electroquímico del complejo AS (1-6)-Cu²⁺ (en rojo, Figura 43) muestra dos picos de reducción consecutivos E_{PC}⁽¹⁾ ~ -0.365 V vs Ag/Ag⁺ (-0.142 V vs NHE, 1c en la Figura 43) y E_{PC}⁽²⁾ ~ -0.461 vs Ag/Ag⁺ (- 0.238 V vs NHE, 2c en la Figura 43) los cuales no están relacionadas con dos picos de oxidación que se solapan E_{Pa}⁽¹⁾ ~ -0.101 vs Ag/Ag⁺ (0.122 V vs. NHE, 1a en la Figura 43) y E_{Pa}⁽²⁾ ~ - 0.024 vs Ag/Ag⁺ (0.199 V vs. NHE, 2a en la Figura 43). El hecho de que se observen dos conjuntos de picos muestra la ocurrencia de dos procesos redox diferentes.

Para los complejos AS (1-6) M5I-Cu²⁺ y AS (1-6) M1I-Cu²⁺, se observan que los picos E_{PC}⁽¹⁾ ~ -0,365 V vs Ag/Ag⁺ (-0,142 V vs NHE) y E_{pa}⁽¹⁾ ~ -0,101 V vs Ag/Ag⁺ (0.122 V vs. NHE) desaparecen. Este resultado sugiere que el ciclo redox responsable de estos dos picos requiere la presencia de ambas metioninas (Met1 y Met5).

Con la caracterización espectroscópica para el complejo AS (1-6)-Cu²⁺, en donde sugerimos la participación de la Met1 como ligante axial en el sitio 1, y además por estudios de RMN donde se sugiere la participación de ambas metioninas Met1 y Met5 para el complejo AS (1-6)-Cu¹⁺ se puede asignar el pico catódico en E_{PC}⁽¹⁾ ~ -0.365 V vs Ag/Ag⁺ (- 0.142 V vs NHE) a la reducción del complejo AS (1-6)-Cu²⁺, donde las Met1 y Met5 participan como ligandos de Cu¹⁺.

En general, los voltamperogramas para los complejos que tienen la Met1, es decir, AS (1-6)-Cu²⁺ (en rojo, Figura 43) y AS (1-6) M5I-Cu²⁺ (en verde, Figura 43), se observa que los picos de reducción son casi idénticos: $E_{pc}^{AS(1-6)} = -0.461$ V vs Ag/Ag⁺ (-0.238 V vs. NHE) y $E_{pc}^{AS(1-6)M5I} = -0.467$ V vs Ag/Ag⁺ (-0.244 V vs NHE, 2c en la Figura 43). Ambos picos presentan un pico medio de 67 mV, lo cual indica que la velocidad de reducción de los complejos es lenta. Este valor de pico (67 mV) es un valor intermedio entre los valores teóricos para una transferencia rápida de electrones (~59 mV) y una transferencia de electrones lenta (electroquímicamente irreversible, ~95.6 mV)¹⁷².

Si se toma en cuenta que los picos catódicos y anódicos están bastante separados (405 a 433 mV), se puede proponer que los complejos de AS (1-6)-Cu²⁺ y AS (1-6) M5I-Cu²⁺ son reducidos en un primer paso siguiendo un mecanismo de transferencia de electrones cuasi-reversible seguido por una reacción química acoplada que puede ser considerada como la reorganización en el sitio de coordinación de Cu¹⁺. Incluso, se podría asumir que existen dos posibles especies: 2N2O o 2N2O1S donde la Met1 funciona como ligante axial. En ambos casos, se necesitaría una gran reorganización del sitio para tener las especies de Cu¹⁺ ya sea con alguna de las metioninas como ligandos (por AS (1-6)) o necesariamente con la Met1 para el AS (1-6) M5I, lo que indicaría que al menos una metionina tiene que entrar en la esfera de coordinación para estabilizar la especie de Cu¹⁺.

Por otro lado, los voltamperogramas de los complejos que no tienen la Met1, es decir, AS (1-6) M1I (en negro, Figura 43) y AS (1-6) M1I/M5I (en azul, Figura 43) muestran un voltamperograma casi idéntico, donde los picos de reducción se observan alrededor de -0.44 V, $E_{pc}^{AS(1-6)M1I} = -0.444$ V vs Ag/Ag⁺ (-0.221 V vs NHE) y $E_{pc}^{AS(1-6)M1I/M5I} = -0.449$ V vs Ag/Ag⁺ (-0.226 V vs NHE), etiquetados como 2c en la Figura 43. Al comparar estos picos con los de los complejos que sí tienen la Met1, éstos se mueven a valores menos negativos. Además, la cinética de transferencia electrónica para estos complejos parece ser más rápida que la de los complejos AS (1-6)-Cu²⁺ y AS (1-6) M5I-Cu²⁺, según lo mostrado por un mayor valor de pico medio (62 mV). En ausencia de la Met1, el único modo de coordinación factible de Cu²⁺ sería 2N2O, que al reducirse a Cu¹⁺ preferiría coordinar ligandos de nitrógeno o de oxígeno, como en el caso del AS (1-6) M1I/M5I, o incluso podría tomar como ligante a la

Met5, como en el caso del AS (1-6) M1I, aunque tal proceso requeriría una gran energía de reorganización en la cadena peptídica. Dado que, en ambos casos, los voltamperogramas son casi idénticos, es probable que el pico catódico observado, sea debido al proceso donde la Met1 participa como ligante hacia el Cu^{1+} .

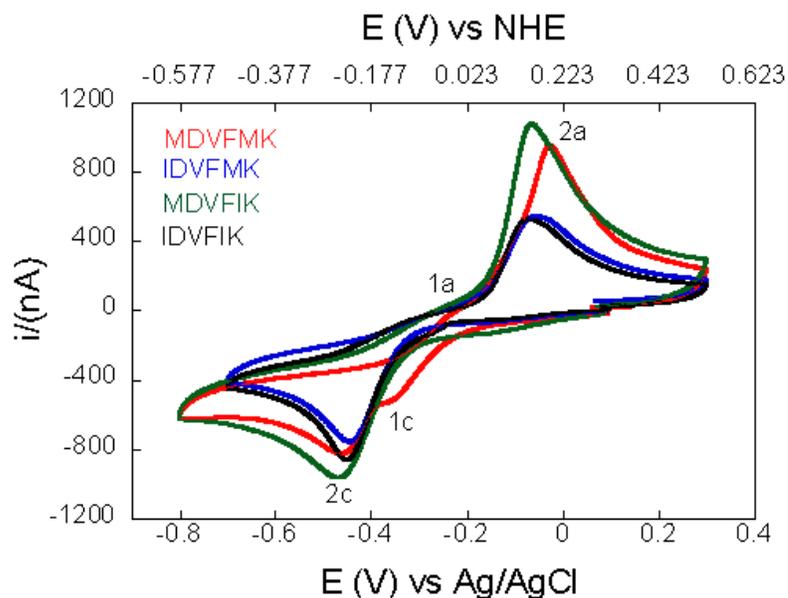


Figura 43. Voltamperometría cíclica de los complejos de Cu de AS (1-6) (rojo), y sus variantes: AS (1-6) M1I (azul), AS (1-6) M5I (verde), y AS (1-6) M1I/M5I (negro). Los datos se recolectaron a una velocidad de barrido de 5 mV/s. Los picos anódicos se indican como 1a o 2a, mientras que los picos catódicos corresponden a 1c o 2c.

CAPÍTULO 4. Los sitios de unión a Cu^{2+} en la proteína beta-sinucleína.

4.1 Identificación de sitios de coordinación.

Con el objetivo de identificar los sitios de unión a Cu^{2+} en la proteína BS, se realizaron titulaciones de la proteína completa con Cu^{2+} , seguidas por EPR, CD y absorción electrónica en la región UV-Vis. En la titulación de la BS a pH 7.5 se observa un conjunto de señales de EPR (indicados en la Figura 44, como el juego de señales A) con valores $g_z=2.25$ y $A_z=181$ G, los cuales indican una coordinación ecuatorial 2N2O de acuerdo con las gráficas de Peisach y Blumberg (Ver Anexo A1)¹⁴⁸. A 0.9 equivalente de Cu^{2+} , se observa un segundo conjunto de señales (indicados como el juego de señales B, Figura 44), cuyos valores $g_z=2.32$ y $A_z=149$ G indican una coordinación 1N3O. Cada juego de señales indica un modo de coordinación independiente del Cu^{2+} indicando que la proteína BS coordina hasta 2 equivalentes de Cu^{2+} a pH 7.5. Estos resultados muestran que la BS tiene 2 sitios independientes de unión a Cu^{2+} , con modos de coordinación diferentes: el **sitio 1**, de mayor afinidad, tiene un modo de coordinación 2N2O; el **sitio 2** tiene un modo 1N3O.

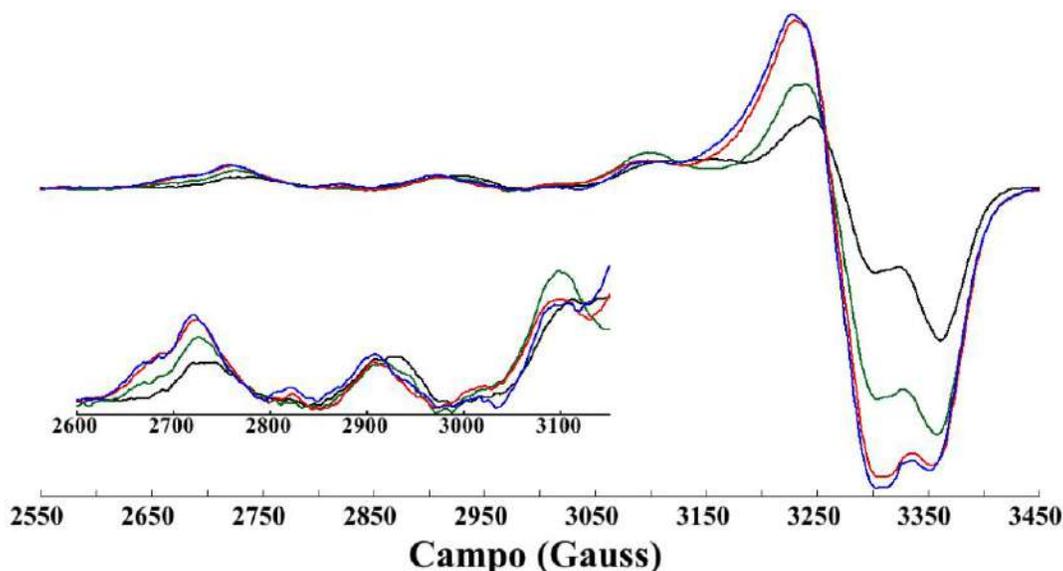


Figura 44. Titulación de la BS en solución amortiguadora MOPS 20 mM, 100mM NaCl a pH 7.5, adicionando Cu^{2+} de 0.25 (negro) a 3 equivalentes (rojo), cada 0.25 equivalentes, seguida por EPR Banda-X a 150 K. El juego de señales denotadas como “A” corresponden a valores $g_z=2.25$; $A_z=181$ G; mientras que las señales “B” corresponden a valores $g_z=2.32$; $A_z=149$ G

Al caracterizar por CD los sitios de unión a Cu^{2+} en la proteína BS a pH 7.5, el espectro se caracteriza por la aparición de una banda d-d positiva a 16900 cm^{-1} ($\Delta\epsilon=0.22 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), una banda negativa de transferencia de carga de ligante a metal (LMCT) a 33000 cm^{-1} ($\Delta\epsilon=-1.1 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), originada por una amida desprotonada $[(\text{N}^-)\text{-Cu}, 295 - 315 \text{ nm}]$, mientras que la transición a 42600 cm^{-1} podría ser asignada a una LMCT del grupo NH_2 terminal a Cu^{2+} (espectro rojo, Figura 45). En la literatura existen reportes para las transiciones asociadas a bandas LMCT que se originan debido a la coordinación del grupo NH_2 -terminal al Cu^{2+} , los valores varían en el rango de $245\text{-}278 \text{ nm}^{149-152}$. Para la banda LMCT asociada a la interacción del Cu^{2+} con una amida desprotonada de la cadena peptídica $[(\text{N}^-)\text{-Cu}]$, normalmente aparecen en el rango de $295\text{-}315 \text{ nm}^{150}$.

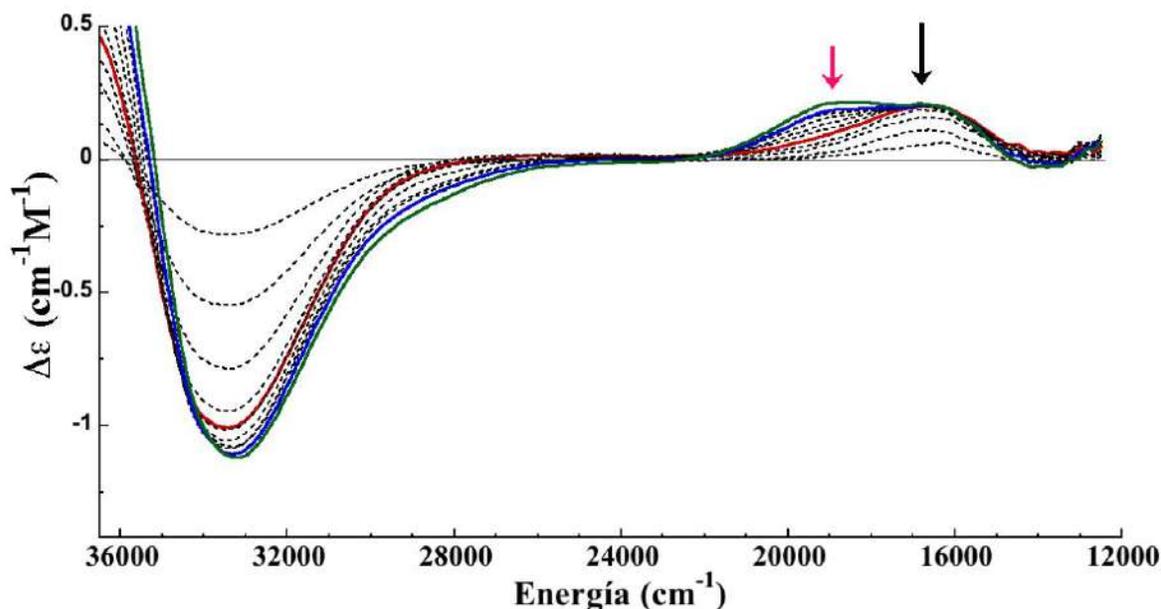


Figura 45. Titulación de la BS en solución amortiguadora MOPS a pH 7.5, adicionando Cu^{2+} de 0.2 (negro) a 3 equivalentes (verde), cada 0.2 equivalentes, a temperatura ambiente. La flecha en color negro denota el juego de señales del primer sitio, mientras que, en color rosa, denota al segundo sitio. Se remarcan los espectros de los complejos de BS con Cu^{2+} : 1 equivalente (rojo), 2 equivalentes (azul) y 3 equivalentes (verde).

Después de la adición de 1 equivalente de Cu^{2+} , se observa el crecimiento de un segundo juego de señales formado por: una banda d-d positiva a una energía de 19000 cm^{-1} ($\Delta\epsilon=0.201 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), un hombro a 28300 cm^{-1} ($\Delta\epsilon=0.201 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), y una LMCT positiva a

38235 cm^{-1} ($\Delta\epsilon=0.925 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), la cual corresponde a Cu^{2+} unido al nitrógeno del anillo imidazol de la Histidina (π_2), [(N_{Im})-Cu, 245 - 260 nm]. Por último, después de la adición de más de 2 equivalentes de Cu^{2+} ya no se observan cambios significativos en los espectros de CD, lo cual sugiere que el sitio 3 no da lugar a señales en el CD, es decir, no es un complejo quiral de Cu^{2+} .

Por último, se realizó la titulación de la proteína BS, seguida por absorción electrónica en la región del UV-Vis, hasta 3 equivalentes (Figura 46), donde se muestra claramente que la adición de Cu^{2+} ocasiona el crecimiento de una señal poco intensa a 35714 cm^{-1} (280 nm), que corresponde a la absorción del enlace amida y también se observa mucho menos intensa una banda d-d a 16393 cm^{-1} (610 nm), que crece de 0 a 3 equivalentes (acercamiento en Figura 46).

En conjunto, los resultados de EPR y CD indican que existen tres sitios de unión a Cu^{2+} en la proteína BS. El **sitio 1** corresponde al sitio de mayor afinidad y está caracterizado por un modo de coordinación ecuatorial 2N2O, una banda d-d positiva a 16900 cm^{-1} y dos LMCT negativas a 33000 cm^{-1} y 42600 cm^{-1} , que sugieren coordinación a amidas desprotonadas y un grupo NH_2 -terminal. El **sitio 2**, corresponde a un modo de coordinación 1N3O, y presenta una banda d-d- positiva a 19000 cm^{-1} y una LMCT negativa a 33000 cm^{-1} que sugiere la participación de una histidina en la coordinación del metal. Por último, después de 2 equivalentes no se observa un cambio significativo, lo cual sugiere que se trata de un complejo de Cu^{2+} no quiral.

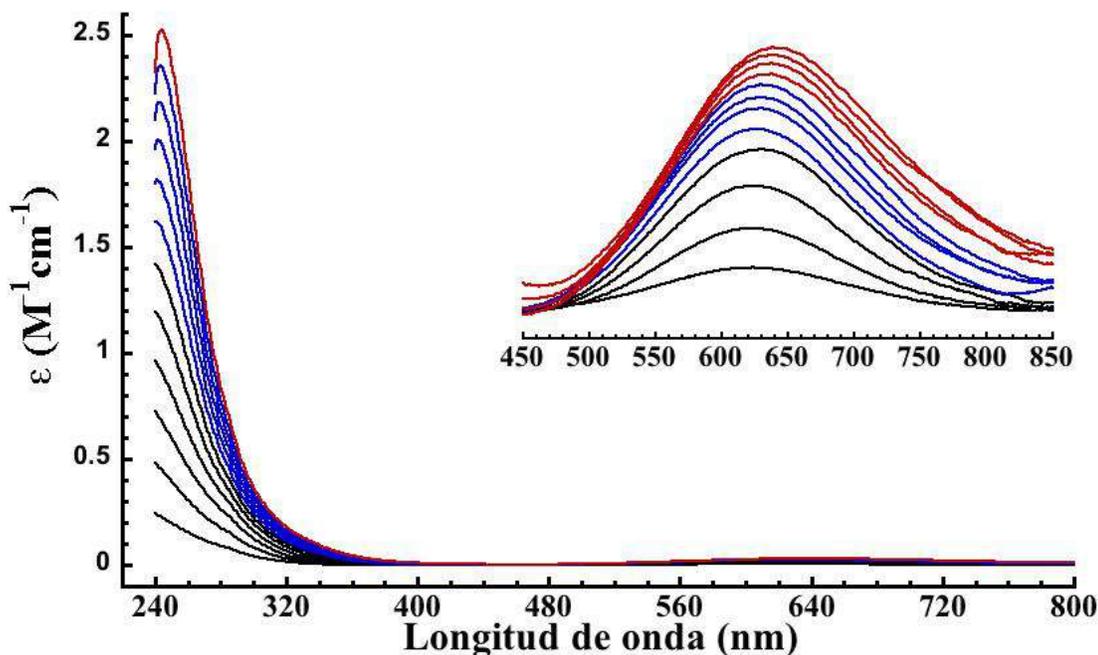


Figura 46. Titulación de la BS en solución amortiguadora MOPS a pH 7.5, adicionando Cu^{2+} de 0.2 (negro) a 3 equivalentes (rojo), cada 0.25 equivalentes, a temperatura ambiente. Los espectros en color negro son de 0.25 a 1 equivalentes, mientras que en azul de 1.25 a 2 equivalentes, y en rojo de 2.25 a 3 equivalentes.

4.2 Evaluación del papel de la histidina 65 en la unión de Cu^{2+} a la BS.

Para estudiar el efecto de la histidina en la unión a cobre hacia la proteína BS, se dispuso de una variante, donde la histidina de la posición 65 es reemplazada por alanina, esto con el fin de evaluar este sitio de manera independiente. La proteína BS_H65A fue titulada con Cu^{2+} a pH 7.5 y monitoreada por EPR, y en la Figura 47 se muestra que con la adición del metal crece un conjunto de señales en el espectro con valores $g_z=2.24$ y $A_z=181$ G, los cuales indican una coordinación 2N2O. Este juego de señales es idéntico a las del **sitio 1**, el cual ya se había identificado en la proteína nativa, la cual contiene la His65. Este resultado indica que este residuo no participa en la esfera de coordinación del sitio 1. A 1.5 equivalentes de Cu^{2+} se observa el crecimiento de un segundo juego de señales con valores $g_z=2.35$ y $A_z=126$ G, los cuales indican una coordinación 4O. Cabe resaltar, que estas señales de EPR no están asociadas al **sitio 2** en la BS nativa. Estos resultados indican que la His65 es el ligando de anclaje para el Cu.

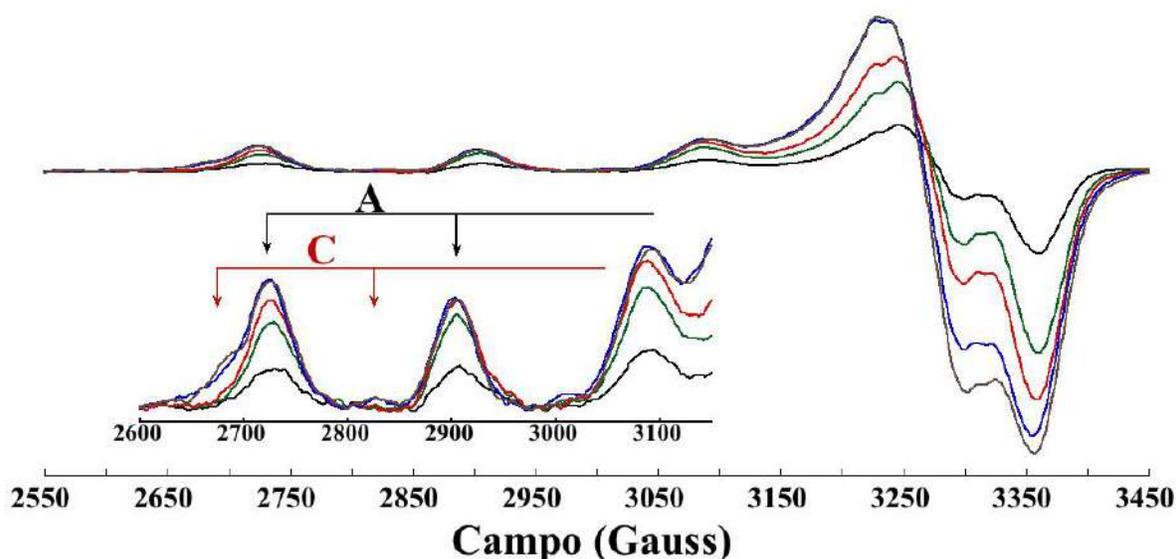


Figura 47. Titulación de la BS_H65A con Cu^{2+} con 0.3 equivalentes (negro), 0.6 equivalentes (verde), 0.9 equivalentes (rojo), 1.5 equivalentes (azul) y 1.9 equivalentes (café) seguida por EPR Banda-X a 150 K. Las señales “A” corresponden a las del sitio 1, mientras que el juego de señales “C” a las del sitio 3.

4.2 Coordinación de Cu^{2+} en el extremo N terminal de la BS.

Con el objetivo de identificar los residuos que participan en el **sitio 1** que corresponden a la unión de Cu^{2+} al N-terminal en la proteína BS, se procedió a sintetizar el péptido BS (1-15), el cual tiene la secuencia $^1\text{MDVFMKGLSMAKEGV}^{15}$. En el péptido, el grupo amino en la metionina 1 quedó libre y el carboxilo en el C-terminal amidado.

El fragmento BS (1-15) se tituló con Cu^{2+} , con el objetivo de conocer la estequiometría y conocer si esta secuencia es capaz de coordinar más de un equivalente. La titulación fue seguida por CD. En la Figura 47, se observa que el espectro se caracteriza por la aparición de una banda d-d positiva a 16900 cm^{-1} ($\Delta\epsilon=0.22\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y una banda negativa LMCT a una energía de 33000 cm^{-1} ($\Delta\epsilon=-1.1\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), la cual corresponde a una transición de ligante a metal originada por una amida desprotonada [(N-)-Cu, 295 - 315 nm]. Estas transiciones son muy similares a las observadas en la proteína completa. Por otro lado, estas

señales se saturan después de la adición de un equivalente, esto quiere decir que la secuencia BS (1-15) sólo coordina un equivalente de Cu^{2+} .

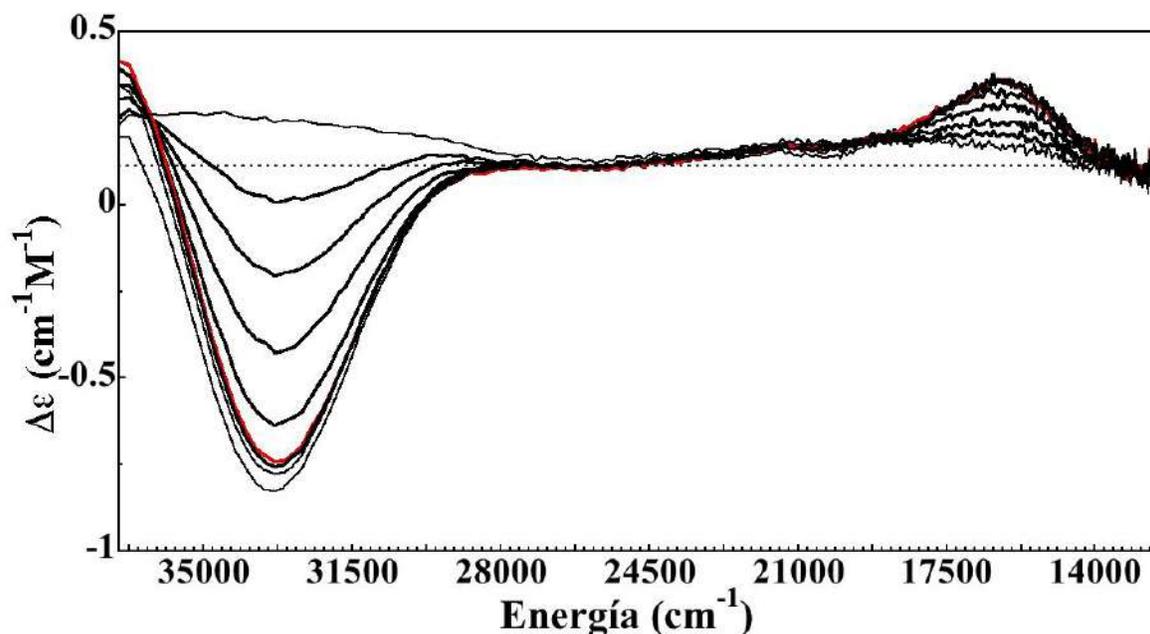


Figura 48. Titulación del péptido BS (1-15) en solución amortiguadora MOPS a pH 7.5, adicionando Cu^{2+} de 0 a 2 equivalentes, cada 0.2 equivalentes, a temperatura ambiente. En rojo aparece el espectro del complejo BS (1-15)- Cu^{2+} en relación 1:1.

El fragmento BS (1-15) también se tituló con cantidades crecientes de Cu^{2+} y se siguió por espectroscopia de EPR. En la Figura 49, se observa que el espectro se caracteriza por un conjunto de señales con valores $g_z=2.25$ y $A_z=184$ G, los cuales indican una coordinación ecuatorial 2N2O y que también corresponde al sitio 1 de la proteína BS.

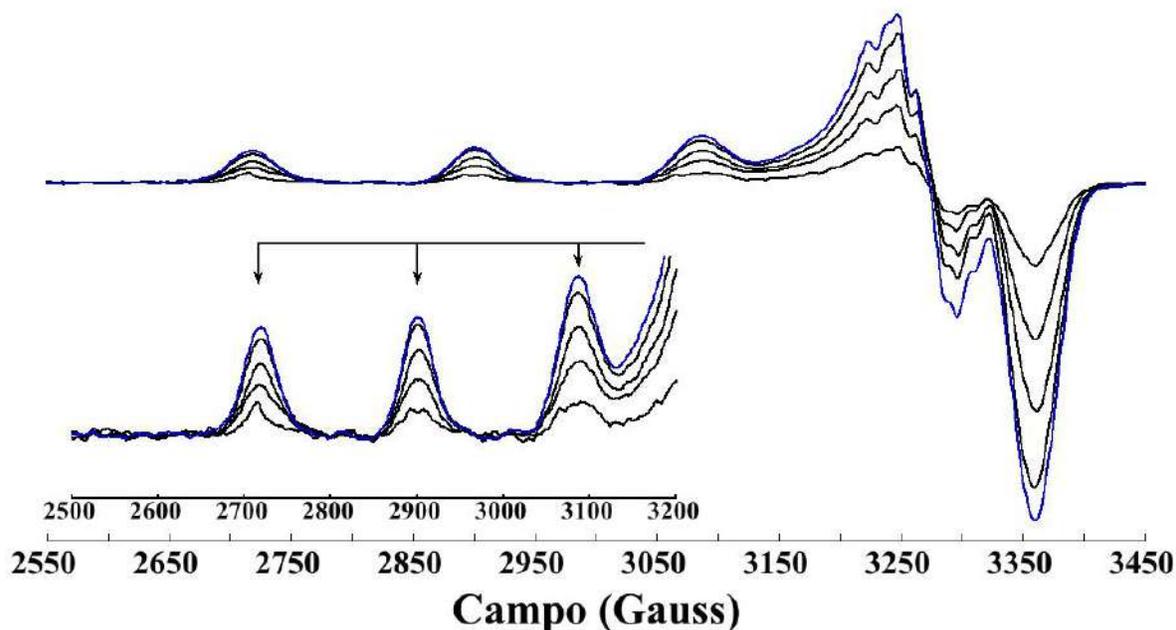


Figura 49. Titulación del péptido BS (1-15) por EPR en banda X, solución amortiguadora MOPS a pH 7.5, adicionando Cu^{2+} de 0 (negro) a 1 (azul) equivalentes, cada 0.25 equivalentes, a 150 K.

Comparación espectroscópica de los complejos de Cu^{2+} con AS (1-15) y BS (1-15).

Al comparar los complejos de Cu^{2+} de los fragmentos AS (1-15) y BS (1-15) mediante EPR (Figura 50) se observan que los espectros son idénticos, con señales asociadas a los valores $g_z=2.25$ y $A_z=184$ G, lo que indica el mismo modo de coordinación en ambos péptidos. A partir de estos datos espectroscópicos, se puede concluir que el **sitio 1 de coordinación** de Cu^{2+} es el mismo en las proteínas AS y BS en el N terminal. Considerando que la única diferencia en las secuencias de estos péptidos es la presencia de la Met10 en la BS, estos resultados indican que la Met10 no participa en la esfera de coordinación a Cu^{2+} en el N terminal de la BS.

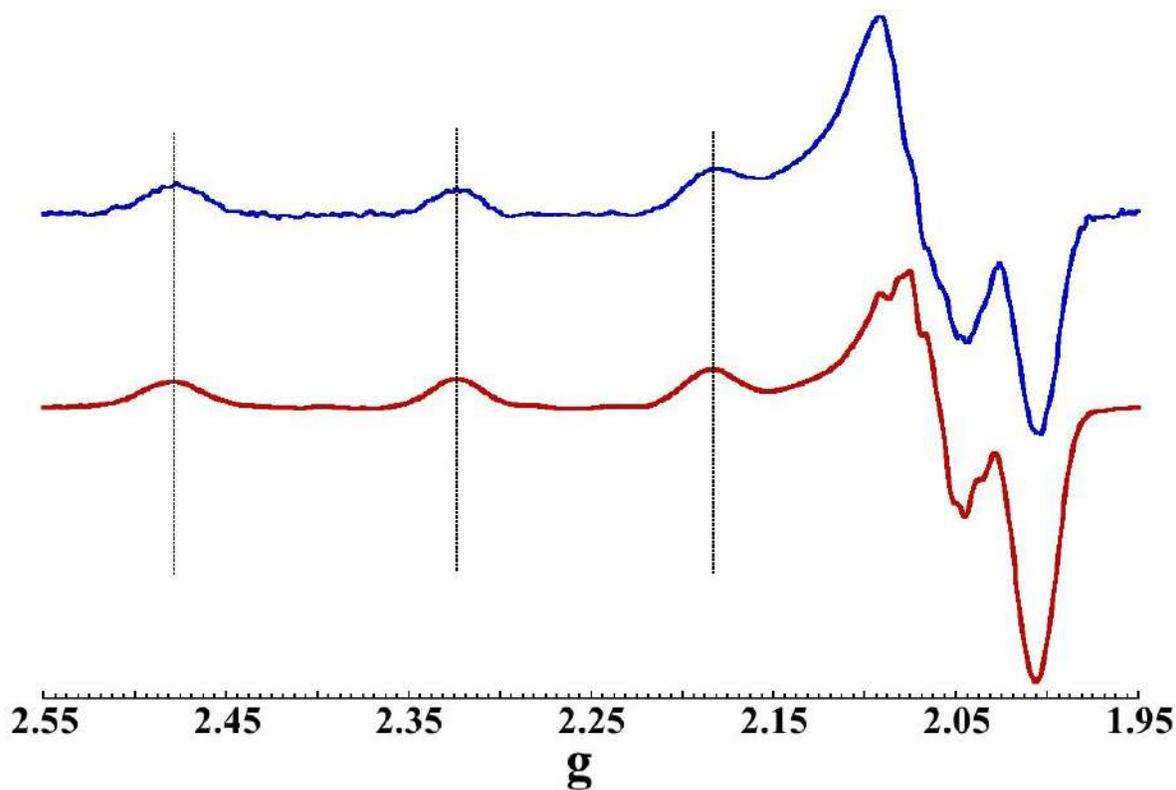


Figura 50. Comparación de los espectros EPR, Banda X a 150 K de los complejos de Cu^{2+} con AS (1-15) (azul) y el BS (1-15) (rojo) en solución amortiguadora MES a pH 7.5 en relación 1:1.

4.3 Reducción y reoxidación del complejo Cu-BS (1-15).

Para caracterizar la química redox del sitio 1 en la BS, se usó como modelo al complejo Cu^{2+} -BS (1-15). La reducción se llevó a cabo con ascorbato de sodio a pH 7.5 en condiciones anaeróbicas. La intensidad de absorción de la banda característica d-d a 610 nm se midió en función del tiempo después de la adición del ascorbato en exceso (Figura 51). Mediante el decremento en la intensidad de la banda d-d en función del tiempo se ajustó a una cinética de pseudo primer orden con un valor de $k = 0.442 \text{ min}^{-1}$ (Figura 51). Este valor de constante de rapidez es cuatro veces mayor que el obtenido para el complejo AS(1-6), cuya constante de reducción es $k = 0.120 \text{ min}^{-1}$. Este resultado claramente indica que la presencia de una metionina extra en la BS favorece el proceso de reducción en este sitio, lo cual es consistente con una mayor afinidad a Cu^{1+} reportada para la BS en comparación con la AS.¹⁷³

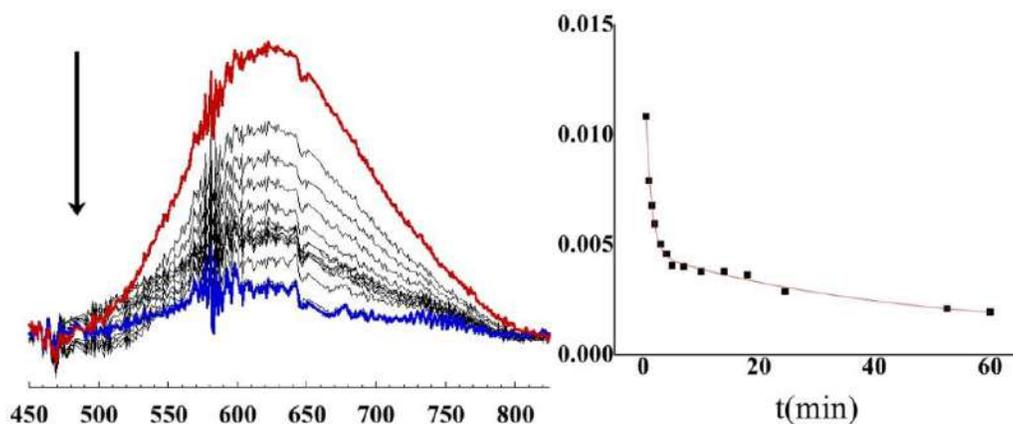


Figura 51. Reducción del complejo Cu^{2+} -BS(1-15), con 16 excesos de ascorbato en solución amortiguadora MOPS 20 mM pH 7.5, seguida por absorción electrónica a temperatura ambiente en condiciones anaeróbicas (izquierda). A la derecha, se muestra la traza de absorción a 610 nm (cuadrados) y el ajuste a un modelo de decaimiento de pseudoprimer orden, $k = 0.442 \text{ min}^{-1}$

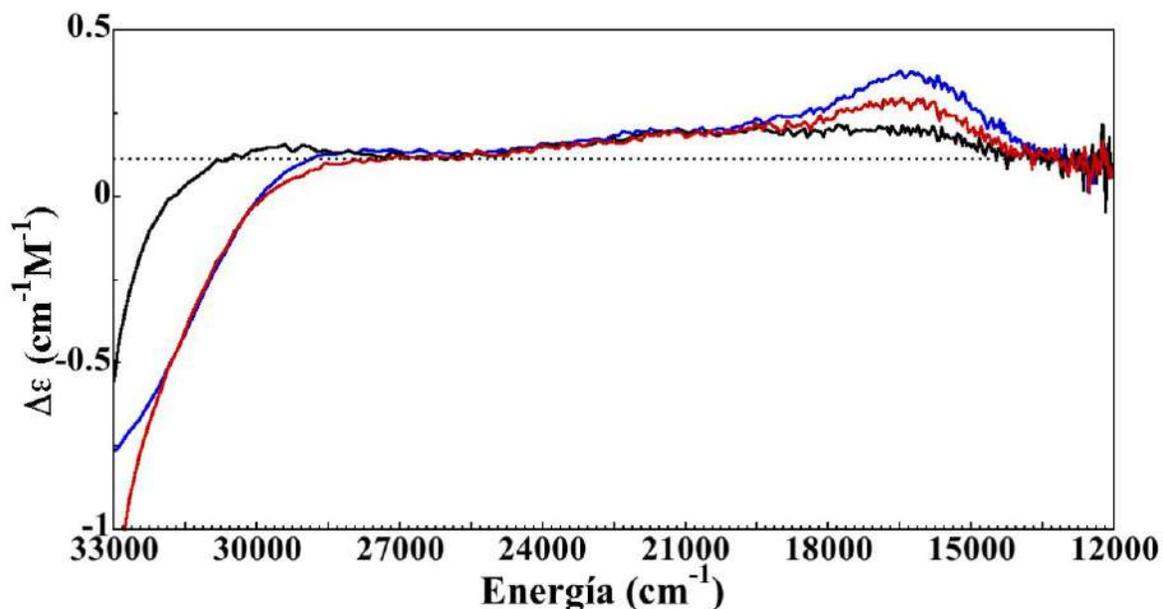


Figura 52. Comparación de los espectros CD, a temperatura ambiente de los complejos de Cu^{2+} con BS (1-15) (azul), BS (1-15) reducido (negro) y BS (1-15) reoxidado (rojo) en solución amortiguadora MES a pH 7.5.

Además, se midió el espectro de CD (Figura 52) del complejo antes de la reducción, después de la misma, y finalmente después de una hora de exponer el complejo reducido a

oxígeno. Dado que los datos de CD durante la reoxidación del complejo Cu-BS (1-15) muestran que no fue posible recuperar la intensidad original, se analizaron las muestras reoxidadas, para evaluar si el ciclo redox dio lugar a algún daño oxidativo en el fragmento. Para esto, las muestras se trataron con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) para complejar el cobre y después hacer pasar las muestras a través de una columna de HPLC y obtener el espectro de masas de cada pico del cromatograma en un equipo ESI-TOF. En todos los casos, el cromatograma (Figura 53) muestra un pico con tiempo de retención alrededor de 39 min, en el cual se analizó su espectro de masas (Figura 54). Este revela la presencia del péptido intacto ($m/z = 1679.81$) y también con un oxígeno de más ($m/z = 829.4$ y 851.39), el cual corresponde a un residuo de metionina oxidado. Al tener la secuencia BS (1-15) 3 metioninas, Met1, Met5 y Met10, no es posible aseverar cuál es la metionina oxidada, además que no existen indicios de más de una metionina oxidada como sucede en la AS.

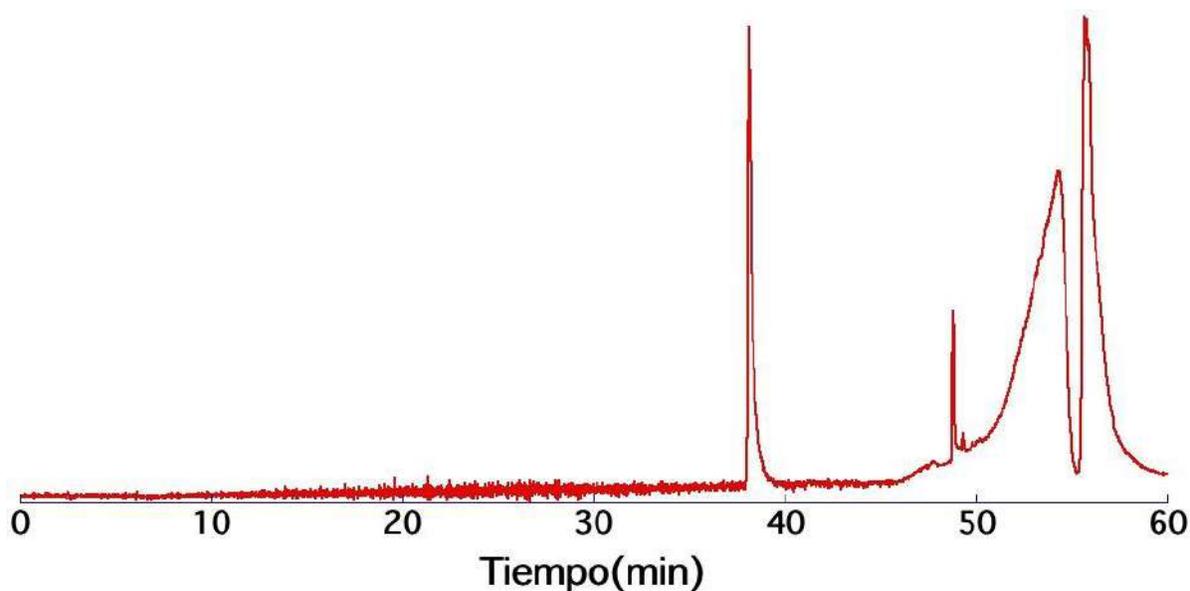


Figura 53. Cromatograma de los productos reoxidados obtenidos después del ciclo redox del complejo Cu-BS (1-15).

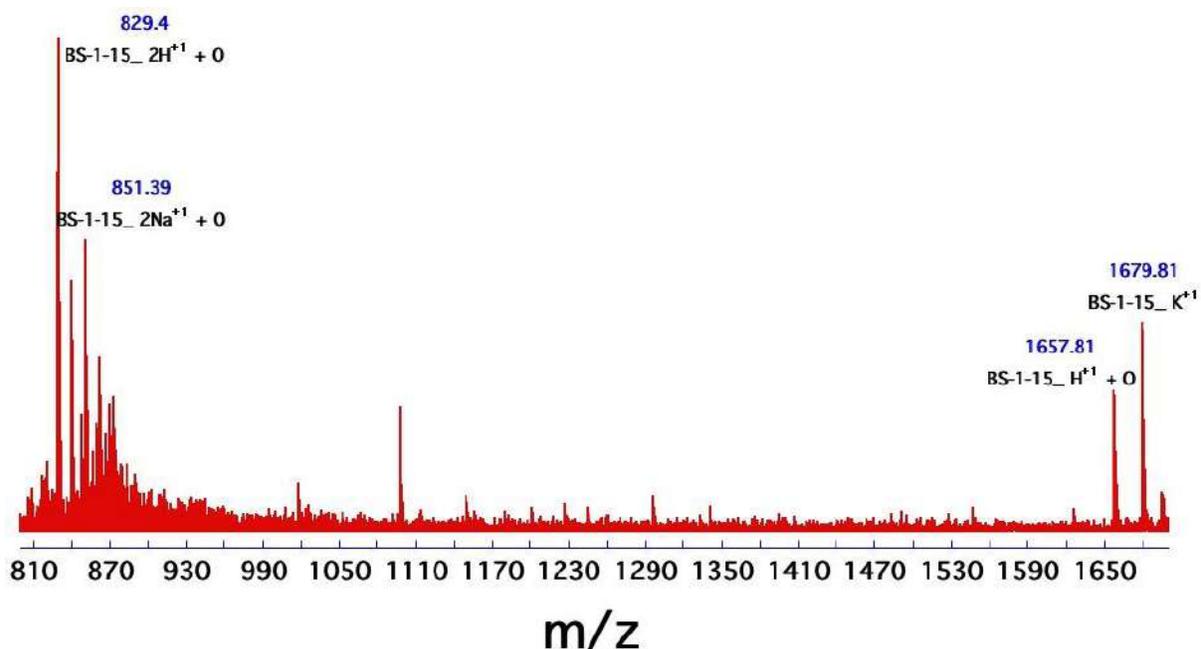


Figura 54. Espectro de masas de los productos reoxidados obtenidos después del ciclo redox Cu-BS (1-15).

La BS es una proteína que une Cu^{2+} , en 3 sitios a lo largo de su secuencia, en una forma muy similar a su proteína homóloga, la AS. El primer sitio de unión se localiza en el extremo N terminal, el segundo está asociado a la His65 y un tercer sitio que involucra ligandos basados en oxígeno. El sitio 1 puede ser modelado por el fragmento BS (1-15) y presenta el mismo modo de coordinación a Cu^{2+} que la AS, que involucra dos nitrógenos y dos oxígenos como ligandos. En el proceso de reducción del sitio 1 de la BS, la cinética mostró ser más rápida que en la AS, lo cual se atribuye a la presencia de una metionina extra en su secuencia (Met10) con respecto a la AS. En el proceso de reoxidación se notó que la BS sufre sólo una modificación oxidativa en una de sus metioninas, lo cual contrasta con lo observado en la AS, donde la Met1 y Met5 son oxidadas. Esta diferencia se puede deber a la naturaleza del complejo BS- Cu^{1+} y su reactividad frente a oxígeno. Se espera que el complejo BS- Cu^{1+} tenga un mayor potencial de reducción debido a su mayor afinidad hacia Cu^{1+} , y por tanto se dificultaría su oxidación por oxígeno y la generación de especies reactivas de oxígeno que oxidan a las metioninas.

CAPÍTULO 5. Estudio de los sitios de unión a cobre asociados a las histidinas en las proteínas AS y BS.

5.1 Elucidación estructural del sitio de coordinación en que participa la His50 en la AS.

La proteína AS contiene en su estructura primaria una única histidina en la posición 50, y es conservada en su homóloga la beta-sinucleína en la posición 65. Estas histidinas están asociadas al segundo sitio de unión a Cu^{2+} en cada proteína y para caracterizarlos estructuralmente se sintetizaron diferentes péptidos. El sitio de la His50 en la proteína AS se caracteriza por tener un conjunto de señales de EPR cuyos valores $g_z=2.32$ y $A_z=157$ G indican una coordinación 1N3O. Para modelar el sitio de la His50 de la AS se estudiaron los péptidos: AS (45-55), AS (45-50) y AS (50-55).

El fragmento AS (45-55) cuya secuencia es $^{45}\text{KEGVVHGVATV}^{55}$ fue titulado con Cu^{2+} . Los complejos formados se midieron por EPR a pH 6.5. En la titulación se observa un conjunto de señales (indicados en la Figura 55, como el juego de señales A) con valores $g_z=2.231$ y $A_z=165$ G, los cuales indican una coordinación ecuatorial 2N2O de acuerdo con las gráficas de Peisach y Blumberg (Ver Anexo A1).¹⁴⁸ Además, se observa un segundo conjunto de señales (indicados como el juego de señales B, Figura 1), cuyos valores $g_z=2.294$ y $A_z=155$ G indican una coordinación 1N3O. Estos datos confirman la existencia de dos especies a pH 6.5, lo cual es consistente con el valor de pKa (6.65) que se obtuvo al realizar una titulación de pH seguida por dicroísmo circular (Datos de Tesis de Maestría de Anacelia Rios Quiroz).¹⁷⁴

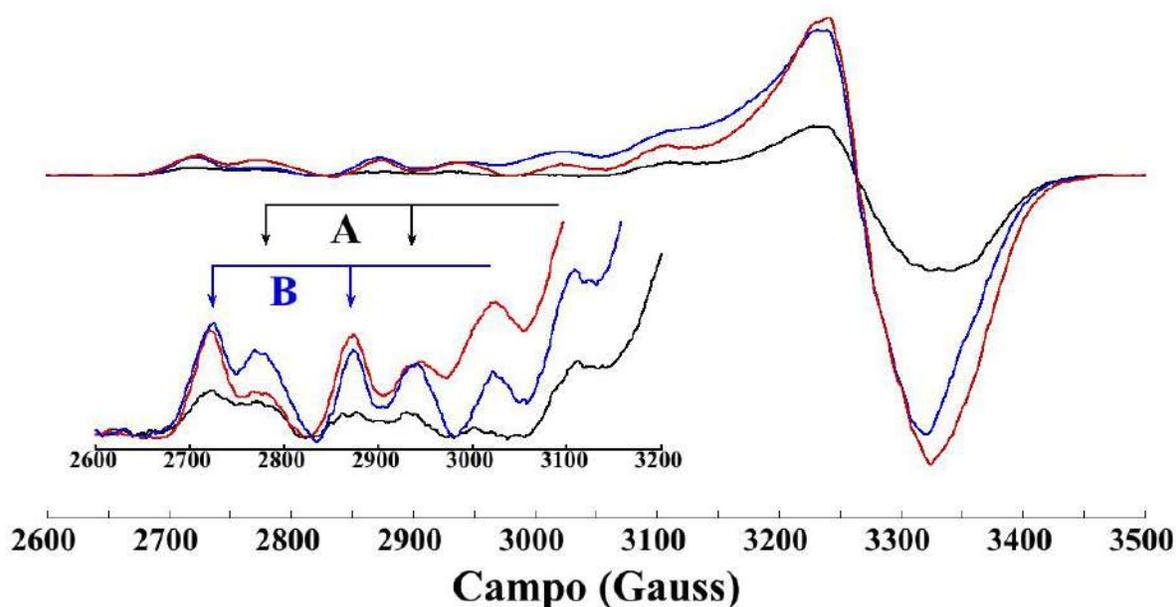


Figura 55. Titulación del complejo AS 45-55 de 0.3 a 0.9 equivalentes de Cu^{2+} , en negro (0.3 equivalentes), en azul (0.6 equivalentes) y en rojo (0.9 equivalentes), en solución amortiguadora MES, pH 6.5 a 150 K. En la ampliación de la región paralela del espectro, se muestran 2 juegos de señales A y B.

El fragmento AS (45-50) cuya secuencia es $^{45}\text{KEGVVH}^{50}$ fue titulado con Cu^{2+} . Los complejos formados se midieron por EPR a pH 7.5. En la titulación se observa un conjunto de señales (indicados en la Figura 56, como el juego de señales A) con valores $g_z=2.290$ y $A_z=156$ G, los cuales indican una coordinación ecuatorial $3\text{N}1\text{O}$ de acuerdo con las gráficas de Peisach y Blumberg (Ver Anexo A1)¹⁴⁸. Este modo de coordinación coincide con una de las especies encontradas en el fragmento AS (45-55), sugiriendo que el fragmento AS (45-50) es un buen modelo del sitio de unión en el péptido largo. El hecho de que sólo se observe una especie en el AS (45-50) es debido a que se colectó a un pH más alto, por encima del pKa del fragmento largo.

Por otro lado, al titular con Cu^{2+} el fragmento AS (50-55) por EPR a pH 7.5, las señales que se observan son débiles y poco definidas, lo cual no permite obtener parámetros sobre la coordinación del metal a este fragmento. El espectro de EPR (Figura 58, espectro en verde) es distinto de los obtenidos con los fragmentos AS (45-55) y AS (45-50). Además,

por CD (Figura 57, espectro en verde) es clara la baja afinidad del metal a este sitio. Por lo tanto, este fragmento AS (50-55) no reproduce la unión de Cu^{2+} al sitio de histidina en esta proteína.

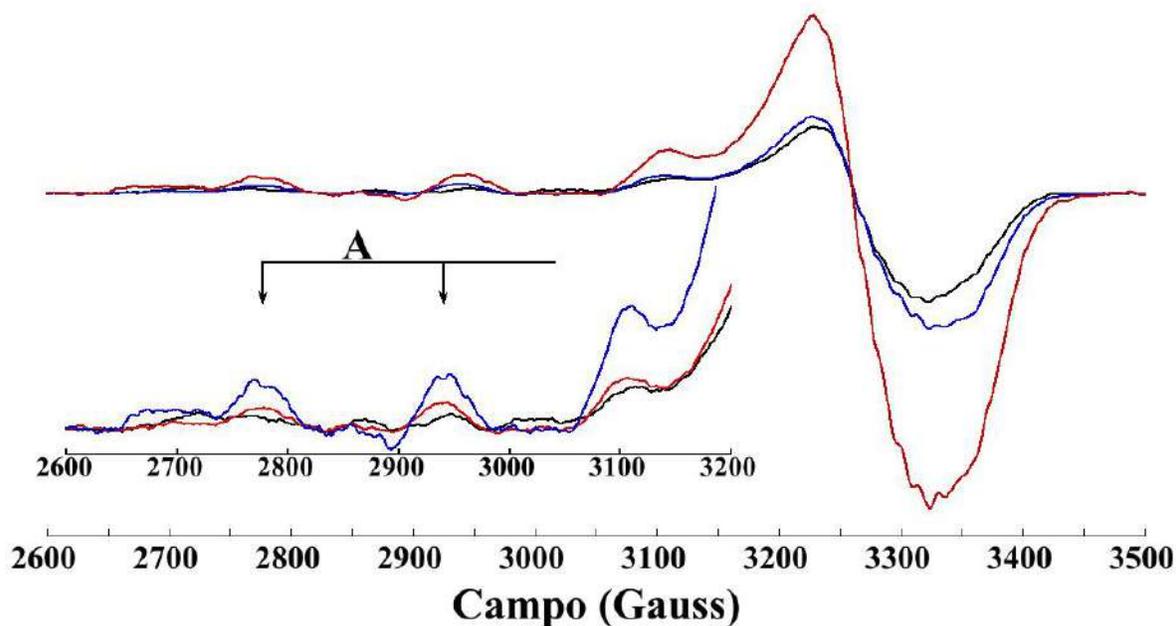


Figura 56. Titulación del complejo AS 45-50 de 0.3 a 0.9 equivalentes de Cu^{2+} , en negro (0.3 equivalentes), azul (0.6 equivalentes) y en rojo (0.9 equivalentes), en solución amortiguadora MOPS, pH 7.5 a 150 K. Ampliación de la región paralela del espectro.

Al comparar los espectros de CD de los complejos de Cu^{2+} con los fragmentos AS (45-55) y AS (45-50) al mismo pH (Figura 57) se observa que tienen las mismas bandas, una banda d-d positiva alrededor de 19000 cm^{-1} y una banda LMCT negativa alrededor de 28700 cm^{-1} . Estos datos muestran que los péptidos AS (45-55) y AS (45-50) tienen el mismo sitio de unión. Asimismo, al comparar por EPR estos complejos (Figura 58), se encontró que el fragmento AS (45-50) tiene un conjunto de señales que coincide con el conjunto de señales de A en el AS (45-55). Además, si se obtiene la segunda derivada del espectro de absorción de microondas, se puede apreciar en la región perpendicular, un patrón de señales consistentes con interacciones super hiperfinas de ligandos basados en nitrógeno, que es muy parecido para los fragmentos AS (45-55) y AS (45-50). Esto indica que la unión de Cu^{2+} involucra a los aminoácidos que preceden a la His50 en la secuencia.

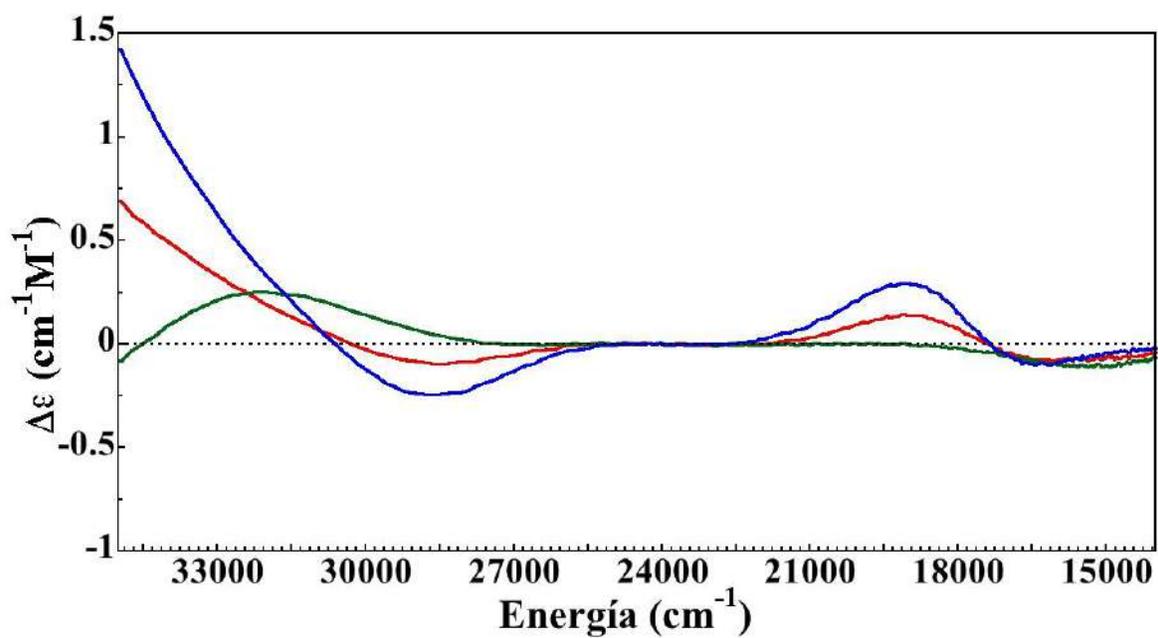


Figura 57. CD de los complejos de Cu^{2+} con los fragmentos AS 45-55 (rojo); AS 45-50 (azul) y AS 50-55 (verde) en solución amortiguadora MES, pH 6.5 a temperatura ambiente. Figura con datos de Tesis de maestría de Anacelia Rios Quiroz.

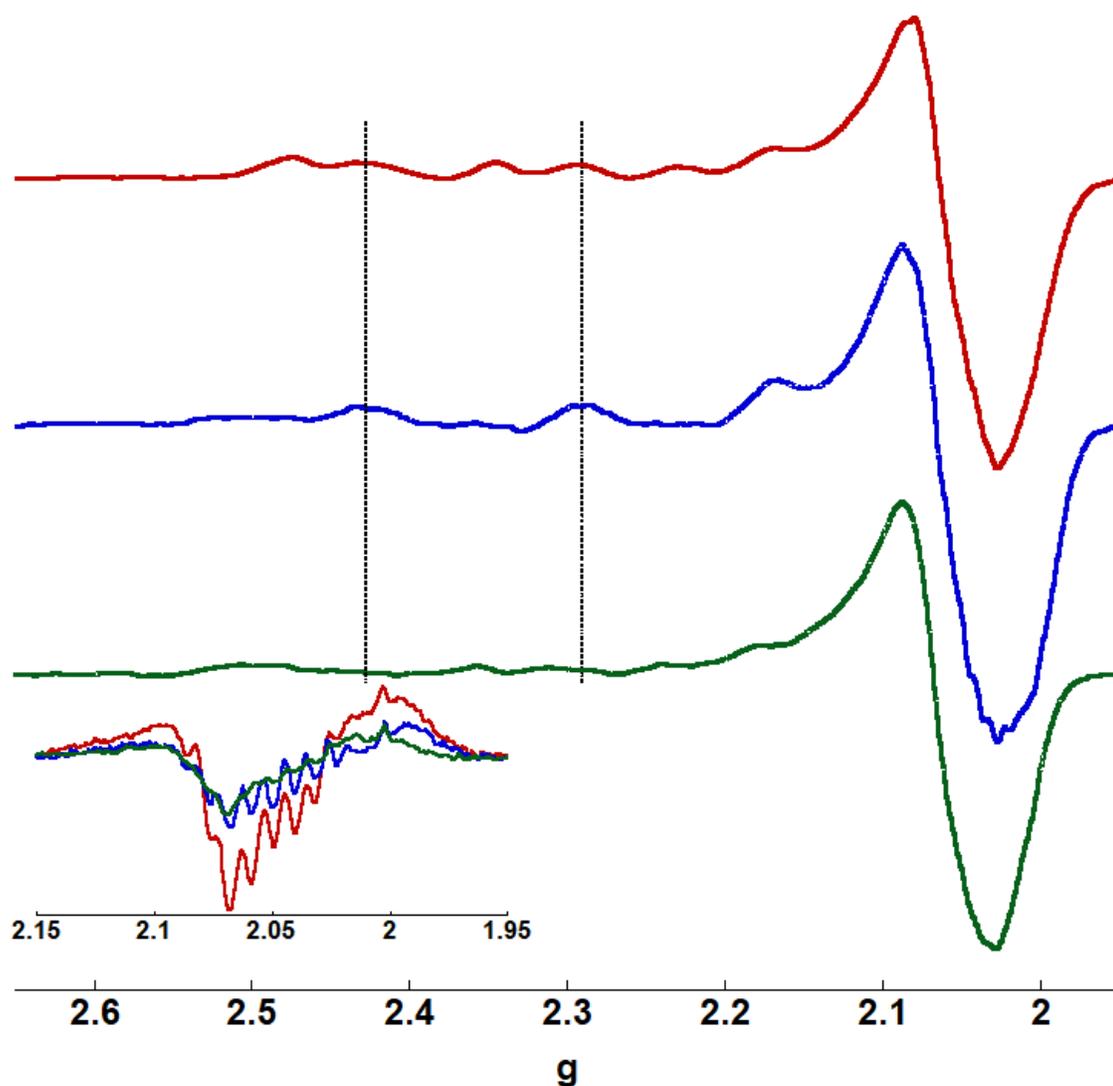


Figura 58. Comparación por EPR de los complejos con 0.9 equivalentes de Cu^{2+} de los fragmentos AS (45-55) en rojo, AS (45-50), en azul, AS (50-55) en verde, en solución amortiguadora MES pH 6.5 y MOPS pH 7.5 a 150 K. En el inset se muestra la comparación de la primera derivada del espectro EPR en la región perpendicular.

Tabla 7. Parámetros EPR de los diferentes complejos formados en la AS.

Complejo	Señales	g_z	A_z (G)	Modo
AS 45-55 0.9 eq Cu pH 6.5	Modo II	2.231	165	2N2O
AS 45-55 0.9 eq Cu pH 6.5	Modo I	2.294	155	3NO
AS 45-50 0.9 eq Cu pH 7.5	Modo I	2.290	156	3NO

5.2 Elucidación estructural del sitio de la His65 en la BS.

En términos de homología, la BS comparte un 90% de homología con el extremo N-terminal de la AS y 33% con el C-terminal. La única histidina en la AS está conservada en la BS en la posición 65. El fragmento BS (60-70) cuya secuencia es ⁶⁰KEQASHLGGAV⁷⁰ fue titulado con Cu²⁺. Los complejos formados se midieron por EPR a pH 7.5. En la titulación se observa un conjunto de señales (indicados en la Figura 59, como el juego de señales A) con valores $g_z=2.23$ y $A_z=168$ G, los cuales indican una coordinación ecuatorial 2N2O de acuerdo con las gráficas de Peisach y Blumberg (Ver Anexo A1). Cabe hacer notar que estos parámetros de EPR no coinciden con los del sitio 2 observado en la proteína completa, lo cual puede deberse a que el pKa del complejo sea diferente.

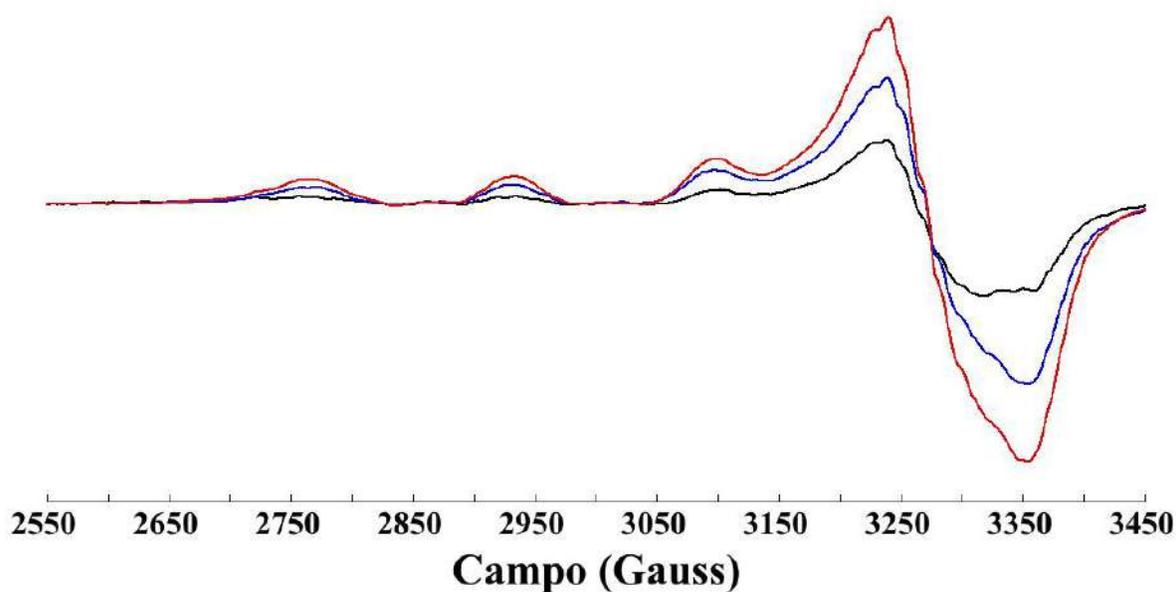


Figura 59. Titulación del complejo BS 60-70 de 0.3 a 0.9 equivalentes de Cu²⁺, en negro (0.3 equivalentes), azul (0.6 equivalentes) y en rojo (0.9 equivalentes), en solución amortiguadora MOPS, pH 7.5 a 150 K.

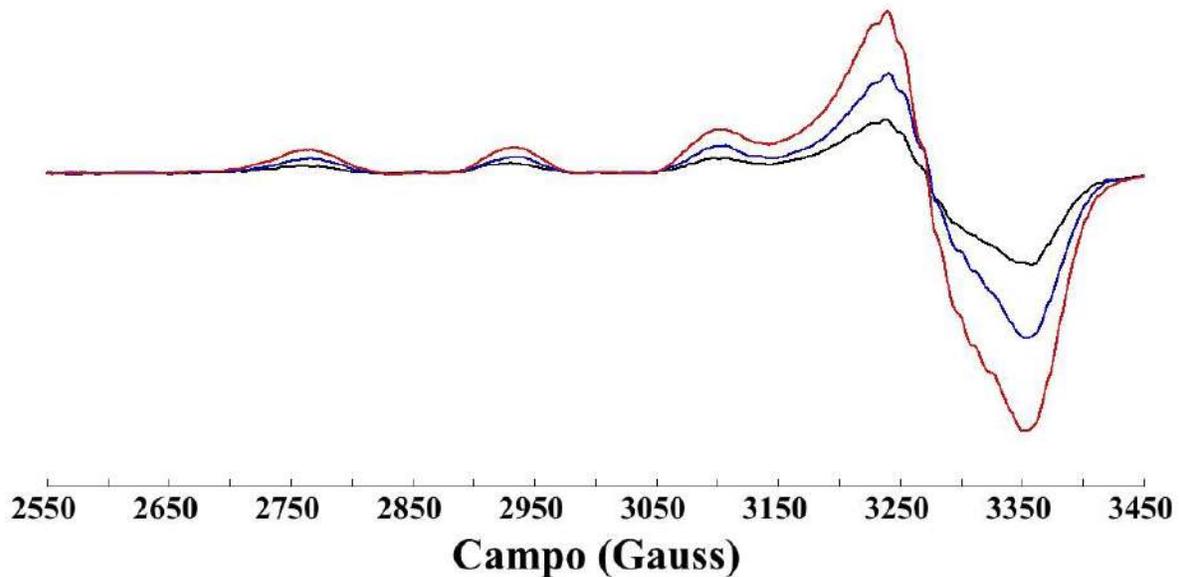


Figura 60. Titulación del complejo BS (60-65) de 0.3 a 0.9 equivalentes de Cu^{2+} , en negro (0.3 equivalentes), azul (0.6 equivalentes) y en rojo (0.9 equivalentes), en solución amortiguadora MOPS, pH 7.5 a 150 K.

El fragmento BS (60-65) cuya secuencia es $^{60}\text{KEQASH}^{65}$ fue titulado con Cu^{2+} y seguido por EPR a pH 7.5. En la titulación se observa un conjunto de señales con valores $g_z=2.23$ y $A_z=168$ G, los cuales indican una coordinación ecuatorial 2N2O de acuerdo con las gráficas de Peisach y Blumberg (Ver Anexo A1). Si se comparan los espectros de EPR para los fragmentos BS (60-70) y BS (60-65), encontramos que sus valores g_z y A_z son idénticos (Figura 61), lo cual indica la formación del mismo modo de coordinación a pH 7.5, y que el complejo en el fragmento BS (60-70) involucra a los residuos que preceden a la His65.

Además, al caracterizar los complejos de Cu^{2+} con BS (60-70), BS (60-65) y BS (65-70) por dicroísmo circular a pH 7.5 (Figura 62), se encontró que el fragmento BS (60-70) y BS (60-65) tienen las mismas bandas: una banda d-d positiva alrededor de 18900 cm^{-1} y una banda LMCT negativa alrededor de 29800 cm^{-1} . Por otro lado, al adicionar Cu^{2+} al péptido BS (65-70) no se observan señales de CD, sugiriendo que, no se forma ningún complejo o el complejo que se ha formado no es quiral. Estos datos muestran que los péptidos BS (60-70) y BS (60-65) tienen el mismo sitio de unión a Cu^{2+} .

Es importante notar que las señales asociadas a los complejos de Cu^{2+} con estos péptidos sí coinciden con las del sitio 2 de la proteína BS (Figura 45).

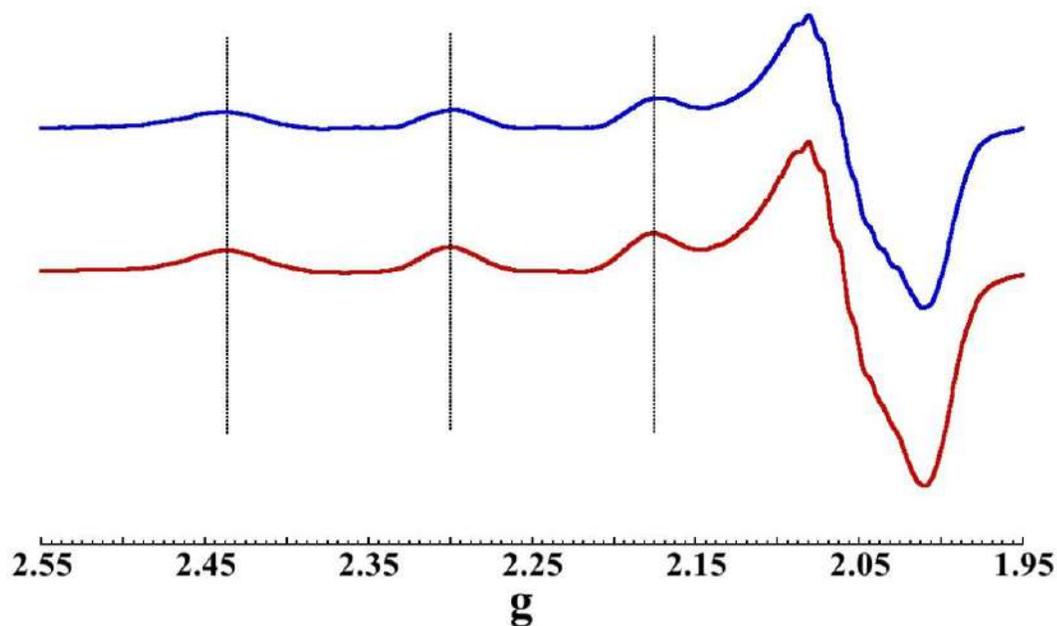


Figura 61. Comparación por EPR de los complejos BS (60-70) en rojo y BS (60-65) en azul con 0.9 equivalentes de Cu^{2+} en solución amortiguadora MOPS pH 7.5 a 150 K.

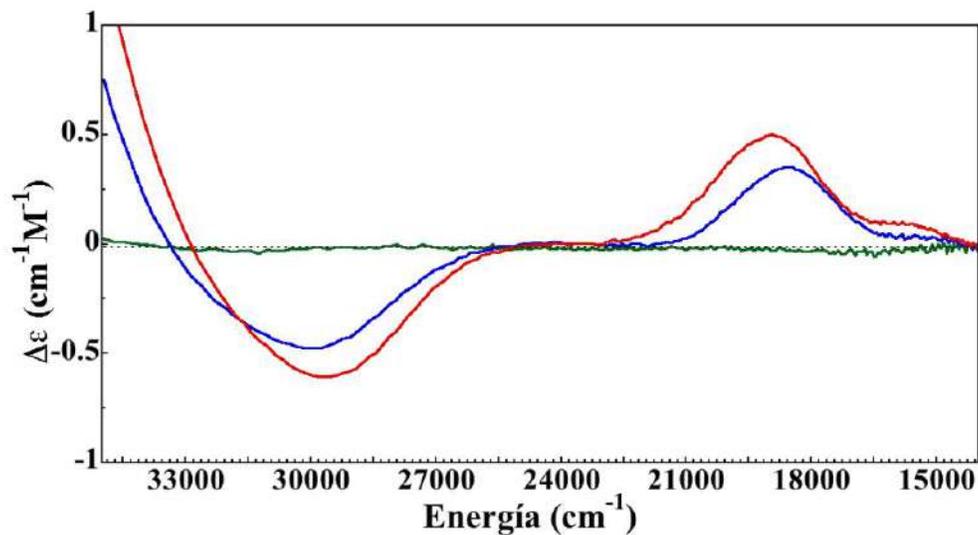


Figura 62. CD de los complejos de Cu^{2+} con los fragmentos BS (60-70) en rojo, BS (60-65) en azul y BS (65-70) en verde en solución amortiguadora MOPS, pH 7.5 a temperatura ambiente. Figura con datos de Tesis de maestría de Anacelia Rios Quiroz.

Tabla 8. Parámetros EPR de los diferentes complejos formados en la BS.

BS 60-70 pH 7.5	2.230	168	2N2O
BS 60-65 pH 7.5	2.230	168	2N2O

5.3 Comparación de los sitios de histidinas.

Si comparamos los sitios de unión a Cu^{2+} histidinas en las proteínas AS y BS, encontramos similitudes estructurales. En ambas proteínas los sitios de unión involucran a la histidina y a los aminoácidos que la preceden. Si se comparan los espectros de EPR de los complejos de Cu^{2+} con los péptidos AS (45-55) y BS (60-70) se observa que el sitio en la BS coincide con una de las especies observadas para la AS. En el caso de la AS (45-55) se observan dos especies debido que el espectro del complejo fue colectado a pH 6.5 cercano al pKa del complejo (Figura 63).

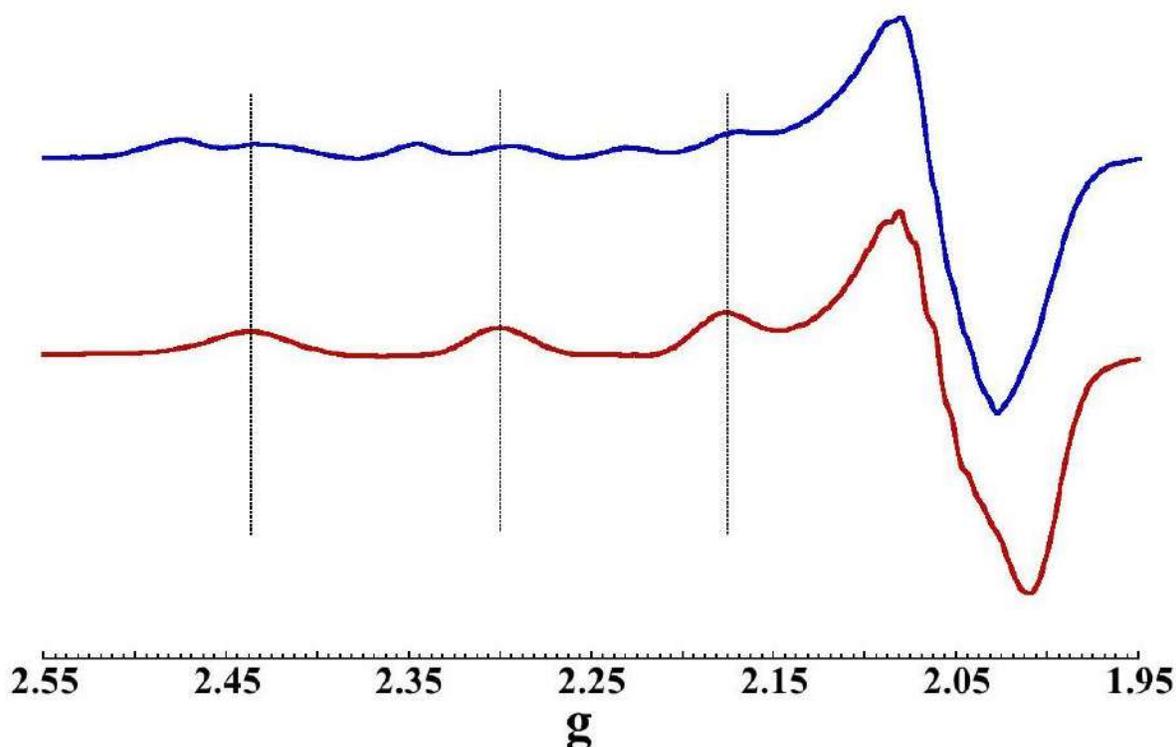


Figura 63. Comparación por EPR de los complejos BS (60-70) en rojo y AS (45-55) en azul con 0.9 equivalentes de Cu^{2+} en solución amortiguadora MES pH 6.5 para el BS (60-70) y MOPS pH 7.5 para el AS (45-55) a 150 K.

No obstante, con nuestros resultados es posible proponer una esfera de coordinación en el segundo sitio de estas proteínas. Nuestros datos de EPR y CD nos permiten afirmar que los ligandos del sitio de Histidina en la AS pueden corresponder a un modelo 3N1O, donde un nitrógeno es del anillo imidazol de la His50, los otros dos nitrógenos podrían ser grupos amida (V49, His50) y un ligando basado en oxígeno. Por otro lado, el sitio de la BS tiene un modo de coordinación 2N2O, y le correspondería una esfera de coordinación donde un nitrógeno provenga del anillo imidazol de la His65, otro de algún grupo amida y los otros dos oxígenos. Estas propuestas son consistentes con lo propuesto con un estudio teórico, donde los ligandos basados en oxígeno pueden provenir de los grupos carbonilo o de una molécula de agua¹⁷⁵. En ese mismo estudio¹⁷⁵, se discute el papel de la His50 en la AS a nivel celular se sabe que la AS H50Q es una variante hereditaria causante del Parkinson y que agrega más rápido en presencia de Cu^{2+} que la AS. Por lo tanto, la His50 juega un papel importante tanto a nivel estructural como en la agregación, y la unión a Cu^{2+} en este sitio parece tener un papel protector con respecto a la agregación.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.

Dado que las interacciones cobre-AS y cobre-BS son importantes, tanto a nivel fisiológico, como patológico, en este proyecto se plantearon las siguientes preguntas: ¿Cuántos de sitios de unión a Cu^{2+} presenta la AS a lo largo de su secuencia? ¿Será posible modelar estos sitios mediante fragmentos peptídicos? Dada la homología entre AS y BS ¿Se parecen los sitios de unión a cobre entre estas dos proteínas? ¿Cuál es la mínima secuencia necesaria para modelar cada sitio de unión? ¿Estos sitios presentan actividad redox? ¿Existe alguna relación entre la actividad redox de los sitios y las modificaciones oxidativas que sufre la AS?

El trabajo presentado en esta tesis se ha realizado en paralelo con estudios de resonancia magnética nuclear colectados por el grupo del Dr. Claudio O. Fernández del Laboratorio Max Planck de Biología Estructural de Rosario en Argentina; de manera que las conclusiones del trabajo se han fortalecido.

Los resultados espectroscópicos de EPR y CD indican que existen tres sitios de unión a Cu^{2+} en la proteína AS. El **sitio 1** corresponde al de mayor afinidad y está caracterizado por un modo de coordinación ecuatorial 2N2O. El **sitio 2**, corresponde a un modo de coordinación 1N3O, con la participación de la histidina 50 en la coordinación hacia Cu^{2+} . Por último, un **sitio 3** que corresponde un modo de coordinación 4O en el que participan ligandos basados en oxígeno como grupos carboxilato y moléculas de agua. También al comparar la proteína completa AS con las variantes AS H50A y AS CT H50A, se concluye que el **sitio 1** es el sitio de anclaje a Cu^{2+} en el extremo N-terminal.

El estudio de péptidos sintéticos derivados de la secuencia de aminoácidos del extremo N-terminal utilizando diferentes técnicas espectroscópicas fue una estrategia que permitió esclarecer los ligantes a Cu^{2+} en el sitio 1 de la AS con modo de coordinación 2N2O. Los ligantes basados en nitrógeno son el nitrógeno del grupo NH_2 del extremo amino y el nitrógeno de la amida del enlace peptídico entre los aminoácidos metionina 1 y aspártico 2.

Por otro lado, el oxígeno de la cadena lateral del aspártico 2 y el de una molécula de agua completan la esfera de coordinación a Cu^{2+} .

El papel que juegan las metioninas 1 y 5 en el proceso de reducción y la reactividad frente a oxígeno del complejo de cobre en el sitio 1 de la AS fue determinado usando diferentes fragmentos peptídicos con sustituciones de metionina por isoleucina. Los procesos termodinámicos y cinéticos de reducción del complejo de cobre son dependientes de la presencia de las metioninas. Particularmente la metionina 1 tiene un papel más importante que la metionina 5. Este hecho empata con la idea de que la metionina 1 parece ser parte de una segunda esfera de coordinación facilitando su reducción y estabilizando al Cu^{1+} coordinando posiblemente al azufre de la cadena lateral de la Met1. Nuestros hallazgos fueron soportados utilizando la electroquímica, incluso los potenciales de reducción medidos por voltametría cíclica confirmaron la tendencia de reducción de los complejos de cobre de las variantes de metionina.

En los estudios de reactividad, los complejos cobre-AS ya reducidos los reoxidamos con una solución saturada de oxígeno, encontramos la siguiente tendencia de reoxidación es: AS (1-6) M1I > AS (1-6) > AS (1-6) M5I, lo cual indica que la metionina 5 es importante para el proceso de reoxidación, mientras que la metionina 1 juega un papel más importante para el proceso de reducción. La caracterización de los productos de la reoxidación demostró la presencia de fragmentos peptídicos con oxidación en las metioninas, mostrando que la metionina 1 es más susceptible a la oxidación que la metionina 5. La mayor susceptibilidad de la metionina 1 a la oxidación es probablemente debida al hecho de que este residuo juega un papel clave como ligante tanto para Cu^{2+} como para Cu^{1+} . Los procesos de óxido-reducción del complejo cobre-AS aquí estudiados son relevantes cuando la AS se encuentra en un ambiente extracelular donde hay agentes reductores y oxígeno. En dichas condiciones, se favorecería la oxidación del complejo AS- Cu^{1+} y la generación de AS con residuos de metionina oxidados, como aquellos que han sido observados en los cuerpos de Lewy, característica fundamental en la enfermedad de Parkinson.

La beta-sinucleína une Cu^{2+} , en tres sitios independientes. El primer sitio de anclaje al metal se localiza en el extremo N terminal, mientras que el segundo une a la His65. El primer sitio de Cu^{2+} es modelado por un péptido BS (1-15) e involucra dos nitrógenos y dos oxígenos como ligandos. Se estudió la química redox del cobre unido al N terminal de la BS, encontrándose que la reducción del sitio es más rápida que en la AS, debido a la presencia de una metionina extra que estabiliza la unión a Cu^{1+} . El complejo BS (1-15)- Cu^{1+} sufre sólo una modificación oxidativa de metionina al enfrentarse a oxígeno. Esta diferencia se puede deber a la naturaleza del complejo BS- Cu^{1+} y su reactividad frente a oxígeno.

Mediante la estrategia de usar péptidos sintéticos y espectroscopía esclarecimos la esfera de coordinación en el sitio de histidinas en las proteínas AS y BS. En el caso de la AS, los ligandos del sitio de Histidina50 corresponden a un modelo 3N1O, donde los ligandos son: un nitrógeno del anillo imidazol, dos nitrógenos de grupos amida (V49, His50) y un ligando basado en oxígeno. El sitio de la Histidina65 en la BS tiene un modo de coordinación 2N2O, donde los ligandos pueden ser un nitrógeno del anillo imidazol de la His65, un nitrógeno de algún grupo amida y los otros ligandos oxígenos pueden corresponder a moléculas de agua o grupos carbonilo.

En resumen, en esta tesis demostramos que el uso de distintas técnicas espectroscópicas y el diseño racional de fragmentos peptídicos pueden contribuir de manera importante al estudio de la interacción de cobre con las proteínas AS y BS. El estudio de la naturaleza y la reactividad de los complejos cobre-AS y cobre-BS es relevante para entender el papel del cobre en la enfermedad de Parkinson y en otras enfermedades neurodegenerativas. Los resultados reportados en esta tesis representan una contribución importante a la química bioinorgánica de la enfermedad de Parkinson.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de Proteínas recombinantes AS

Las proteínas recombinantes fueron proporcionadas por el grupo de investigación del Profesor Claudio O. Fernández, *Max Planck Laboratory for Structural Biology, Chemistry and Molecular Biophysics of Rosario* (MPLbioR, UNR-MPIbpC) e Instituto de Investigaciones para el Descubrimiento de Fármacos de Rosario (IIDEFAR, UNR-CONICET) de la Universidad Nacional de Rosario. A continuación, se enlistan:

- AS-wt.** Es la proteína recombinante humana de 140 aminoácidos.
- BS-wt.** Es la proteína recombinante humana de 134 aminoácidos.
- ASH50A.** Es la proteína AS donde la His50 es reemplazada por Alanina.
- BSH65A.** Es la proteína BS donde la His65 es reemplazada por Alanina.

Éstas fueron obtenidas por sobre expresión en *E. Coli*, esto implica transformar las células BL21 con el plásmido p7-T7, el cual contiene la secuencia codificante de la AS. Se prepara un precultivo haciendo crecer las bacterias a 37 °C, se lisan las células con sonicación y se centrifuga. Se recogió el pellet para su posterior separación tanto por cromatografía de intercambio aniónico como cromatografía de filtración en gel usando solución amortiguadora adecuada. Se prepararon alícuotas a la concentración deseada y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido. Finalmente se almacenaron a -80 °C. Y finalmente las muestras se liofilizaron para su posterior uso.

Síntesis de Péptidos.

La síntesis de péptidos en fase sólida (**SPPS**, del inglés *Solid-Phase Peptide Synthesis*), es una estrategia de síntesis química descrita por primera vez por Merrifield en 1962 para obtener péptidos con secuencias de tamaño menor a 50 aminoácidos^{176, 177}. Esta estrategia se basa en la unión del aminoácido que se encuentra en el C-terminal de la secuencia, que se desea sintetizar, a un soporte insoluble (sólido)¹⁷⁸.

Posteriormente al primer aminoácido, la secuencia se elonga al agregar aminoácido tras aminoácido, hasta completar la secuencia.

Este método de síntesis presenta numerosas ventajas respecto a la síntesis de péptidos en solución. Sus ventajas radican en los rendimientos que se obtienen debido a que al trabajar con el péptido unido a un soporte sólido (resina), se pueden emplear excesos de reactivos que se eliminan fácilmente tras sencillos procesos de lavado. Además, no se producen pérdidas de péptido sintetizado puesto que el soporte sólido al que está unido el péptido permanece en el mismo recipiente durante todo el proceso. Por otro lado, las operaciones de lavado y filtrado son sencillas y susceptibles de automatización. La síntesis de péptidos **SPPS**, se ilustra en la figura M1.

La secuencia peptídica se sintetiza sobre el soporte sólido polimérico, empezando por el C-terminal hacia el extremo N-terminal. Los aminoácidos por otro lado se encuentran protegidos tanto en sus cadenas laterales como en el alfa-amino, Fmoc (9-fluorenilmetoxycarbonilo). Después de tener el primer aminoácido, los demás aminoácidos se añaden mediante ciclos repetitivos de desprotecciones y reacciones de acoplamiento entre los aminoácidos. Las cadenas laterales de ciertos aminoácidos están protegidas de manera permanente mediante “grupos protectores”, que son estables en las condiciones de reacción utilizadas durante la elongación del péptido. El grupo α -amino tiene protección temporal (T), y generalmente se trata de compuestos derivados de uretano. El grupo de protección temporal (T) puede ser fácilmente removido bajo condiciones suaves que preservan al péptido y reduce la epimerización (la mayoría de los casos conduce a la formación de oxazolonas) como se ilustra en la figura M2. La función protectora de tipo uretano para evitar la epimerización también explica la forma de la síntesis. Después del acoplamiento, el exceso de reactivos se elimina por filtración y lavados. La desprotección del grupo protector temporal extremo N-terminal se realiza para permitir la adición del siguiente aminoácido protegido por N-uretano y activados en su extremo ácido α -carboxílico. Este proceso (desprotección / acoplamiento) se repite hasta llegar a la secuencia deseada. En una etapa final, el péptido se libera de la resina y los grupos de protección de las cadenas laterales (Pn) son eliminados, usando ácido trifluoroacético.

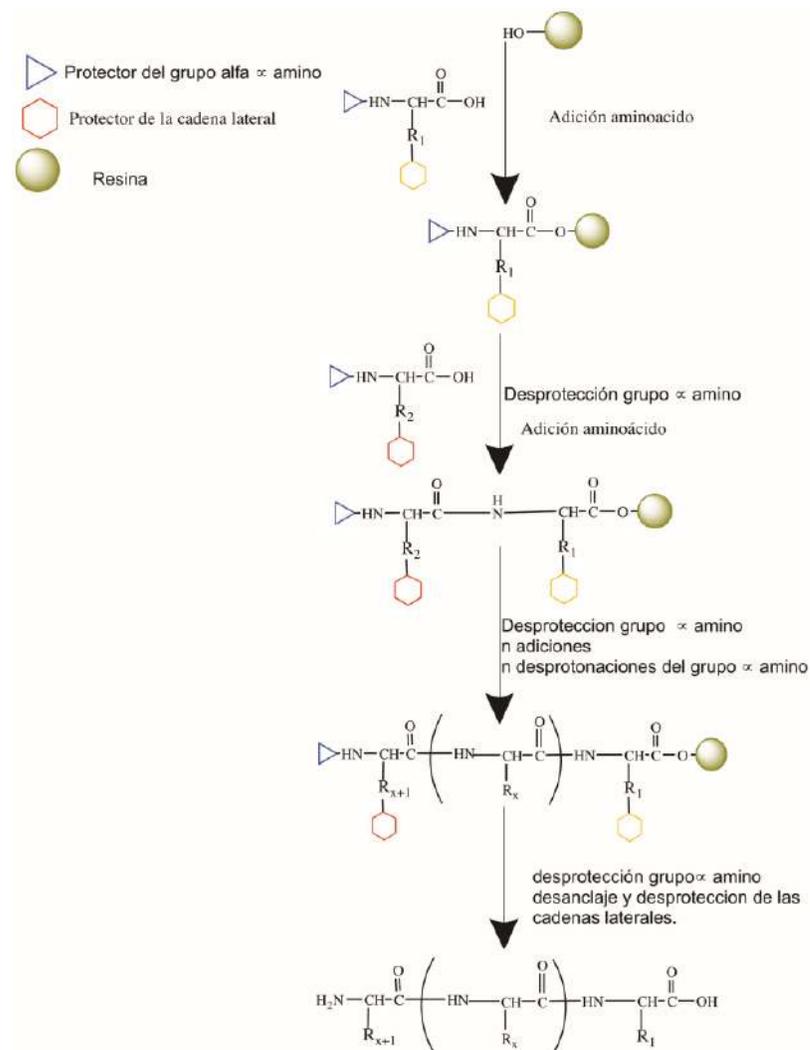


Figura M1. Esquema de la estrategia de la síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS)

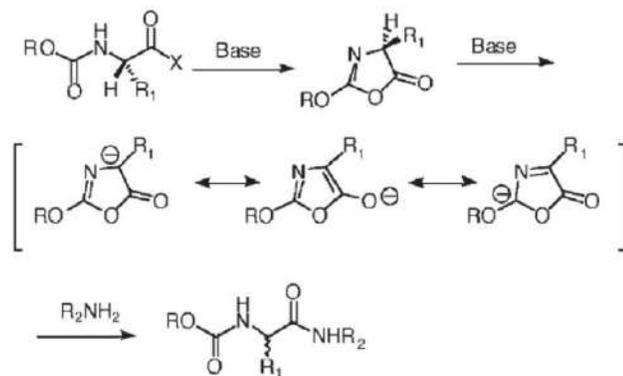


Figura M2. Remoción del grupo protector, durante la SPPS. Figura adaptada¹⁷⁹

El test de Kaiser o prueba de ninhidrina¹⁸⁰, es una prueba colorimétrica que sirve para determinar la presencia o ausencia de grupos amino libres y como control durante la síntesis. Se realiza al finalizar el acoplamiento de un aminoácido, de la desprotección de la resina y/o de una acetilación. La prueba consiste en tomar una pequeña cantidad de resina seca y colocarla en un tubo eppendorf no graduado, añadiendo 20 ul de la solución A [constituida por la solución 1 (40g de fenol grado reactivo en 10 mL de metanol absoluto) y la solución 2 (1 mL de la solución de KCN en 50 mL de piridina de alta pureza), 1:1 (v/v)] y 10 ul de la solución B (1.25g de ninhidrina en 25 mL de etanol absoluto), se mezclan y se coloca el tubo en un baño previamente calentado hasta ebullición durante 6 minutos. Una coloración de un tono azul oscuro es indicativa de la presencia de grupos amino libres y por tanto se continua con el siguiente paso en la síntesis. Por otro lado, una coloración amarilla revela que el grupo amino se encuentra protegido, y finalmente, coloraciones intermedias (verde, azul claro, amarillo- verdoso, etc) indican una mezcla de especies protegidas/desprotegidas, por lo cual la reacción en curso (acople o desprotección) se debe repetir para mejorar el rendimiento de la síntesis en general.

La solución 1, se debe almacenar en un frasco ámbar y en un lugar oscuro a temperatura ambiente, mientras que la solución de KCN (0.065g de KCN en 100 mL de agua Milli-Q) se almacena a baja temperatura. Todos los reactivos y disolventes utilizados para la SPPS, son de grado reactivo y adquiridos con diversos proveedores.

A continuación, se listan:

Resinas:

4-(2,4-Dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)-fenoxiacetamida norleucilaminometil), también llamada Rink Amide (RAM)

4-(2,4-Dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)-fenoxiacetamida, conocida también como MBHA.

Aminoácidos:

Todos los aminoácidos están protegidos con el grupo N-fluorenilmetoxicarbonil (Fmoc), de la marca NovaBiochem.

Solventes: Piperidina (99.0%), piridina, Ácido trifluoroacético (TFA), Anhídrido Acético (98.0%), Triisopropilsilano (TIS, 99.0%), N-metilpirrolidona (NMP, 99.5%), N, N-diisopropil-carbodiimida (DIC, 99.0%), cianuro de potasio (KCN, 99.5%), todos de la marca Sigma-Aldrich. Dimetilformamida (DMF) y Diclorometano (DCM) de la marca Meyer, mientras que el alcohol Isopropílico (IPA) de Fermont y éter etílico de Analitika.

Reactivos: 1,2-etanoditiol (EDT), 1,8-diazabicyclo [5.4.0]undec-7-eno (DBU) de la marca Fluka, 1-Hidroxibenzotriazol (HOBt) de CEM corporation.

Mediante la estrategia anterior se sintetizaron los péptidos que se muestran a continuación, con ciertas modificaciones en sus extremos.

Tabla 1. Péptidos sintetizados de las proteínas AS y BS

NOMBRE	SECUENCIA	MODIFICACIONES
AS (1-3)	MDV	<i>Extremo N-terminal libre y C-terminal amidado.</i>
AS (1-6)	MDVFMK	
AS (1-6) D2A	MAVFMK	
AS (1-6) M1I	IDVFMK	
AS (1-6) M5I	MDVFIK	
AS (1-6) M1I/M5I	IDVFIK	
AS (1-15)	MDVFMKGLSKAKEGV	
AS (45-55)	KEGVVHGVATV	<i>Extremo N-terminal acetilado, C-terminal amidado</i>
AS (45-50)	KEGVVH	
AS (50-55)	HGVATV	
AcAS (1-6)	AcMDVFMK	
BS (1-15)	MDVFMKGLSMAKEGV	<i>Extremo N-terminal libre y C-terminal amidado.</i>
BS (60-70)	KEQASHLGGAV	<i>Extremo N-terminal acetilado, C-terminal amidado</i>
BS (60-65)	KEQASH	
BS (65-70)	HLGGAV	

Purificación de Péptidos sintetizados.

Los péptidos se purificaron por cromatografía líquida de alto rendimiento en fase reversa (HPLC). El equipo utilizado fue un HPLC marca Waters Modelo 1525, con un detector de arreglo de diodos modelo 2998 de la misma marca. Para la realización de la cromatografía analítica, se utilizó una columna *C18 Waters Symmetry*, 4.6 X 150 mm, mientras que para la purificación en fase reversa se usó una columna *C18 Waters μ Bondapak* semipreparativa 7.8 X 300 mm, 10 μ m, 125 Å. La fase móvil ocupada fue: agua MilliQ acidificada con TFA al 0.05% y acetonitrilo acidificado con TFA al 0.01% en (JT Baker, grado HPLC). El gradiente usado fue de 0 a 30% ACN/TFA (0.01%) en 20 minutos con flujo total de 1.5 ml por minuto y las muestras fueron analizadas midiendo la absorbancia a las longitudes de onda 210 nm y 274 nm.

Todos los picos cromatográficos se analizaron mediante espectrometría de masas de ionización por electrospray (ESI-MS TOF marca Agilent). Una vez caracterizados los picos, los correspondientes a los péptidos se liofilizaron a una temperatura -50 °C y una presión de 0.18 mbar. Finalmente, los péptidos se guardaron en un desecador a -15 °C.

Absorción electrónica.

Los espectros se midieron en el rango de 190 a 800 nm, colectando cada 1 nm. Se utilizó un espectrofotómetro UV-Vis de arreglo de diodos, Agilent 8453. Para los experimentos se usaron celdas de cuarzo grado *spectrosil* de diferentes pasos ópticos: una de 0.1 cm para apreciar mejor las transiciones de banda del ligante al metal (LMCT), las cuales caen entre 200 y 400 nm aproximadamente y otra de 1 cm para apreciar las transiciones tipo d-d (después de los 400 nm).

Dicroísmo circular electrónico (CD por sus siglas en inglés).

Se midieron los espectros de dicroísmo circular electrónico de cada complejo, cada 2 nm en un rango de 190 nm a 800 nm con una velocidad de barrido de 100 nm/min y un ancho de banda de 5 nm, con una sensibilidad estándar (100 mdeg), un modo de escaneo continuo y acumulando de 2 a 3 scans.

La concentración de péptido o proteína utilizada fue de 285 a 985 μM y la concentración del stock de Cu^{2+} utilizada fue 30 mM. Se usó un espectropolarímetro de dicroísmo circular, Jasco 815 y una celda grado *Spectrosil* con paso óptico de 1 cm.

Espectrometría de masas mediante ionización por electrospray con tiempo de vuelo (ESI-TOF MS, por sus siglas en inglés). Se obtuvieron los espectros de masas de los diferentes péptidos sintetizados, así como de los productos de los ciclos redox de los complejos péptidos-Cu. El equipo utilizado fue un Agilent Electrospray ionization (ESI-TOF). El rango de m/z que se usó fue de 100 a 2500 m/z y con un voltaje del fragmentador de 400 mV. En el caso de los péptidos sintetizados, la muestra se inyectó al equipo ESI-TOF después de pasar por la purificación por HPLC en fase reversa, en el caso de los complejos, que se analizaron después de los ciclos redox, las muestras se trataron con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y se inyectaron a una columna Eclipse XDB-C18, 4,6 x 150 mm, 5 μm (PN 993967-902), flujo 0.5 ml/min, 25 °C, H_2O / ácido fórmico (0,5%), acetonitrilo y metanol, voltaje capilar 3500 V, temperatura de desgasificación 300 °C, resolución en todos los experimentos > 12.000 a m/z igual a 2722.

Resonancia paramagnética electrónica (EPR por sus siglas en inglés). Los complejos péptido- Cu^{2+} se analizaron mediante EPR a 150 K usando un sistema de nitrógeno líquido para temperatura variable ER4131VT, con un flujo adecuado para mantener a baja temperatura. El equipo usado fue espectrómetro EMX Plus EPR Bruker System, banda X, con una fuente de microondas ER 041 XG y una cavidad ER 4102ST. Se utilizaron las siguientes condiciones en el equipo: potencia de microondas: 10 mW; amplitud de modulación: 5 G; frecuencia de modulación: 100 kHz; constante de tiempo: 327 ms; tiempo de conversión: 82 ms; y cada espectro es el resultado del promedio de 12 corridas. Algunas de las muestras para EPR, fueron preparadas a partir de la solución amortiguadora con 50% en volumen de glicerol como agente crioprotector, para así obtener un adecuado glaseado de la muestra y una mejor resolución del espectro. Cabe mencionar que la adición de glicerol no afecta la medición de los complejos, lo cual se comprobó por absorción electrónica en la región UV-Vis y por CD.

Preparación de las muestras para los estudios cinéticos y espectroscópicos.

Las proteínas AS, BS y AS_H50A recombinantes liofilizadas fueron disueltas en diferentes soluciones amortiguadoras adecuadas (NEM o MES 20 mM, 100 mM NaCl). La concentración final que se usó fue de 250 a 500 μM en el intervalo de pH 5 a 7.5. El agua para las soluciones se purificó usando un sistema Millipore, obteniendo una resistividad de 18 $\text{m}\Omega/\text{cm}$. El coeficiente de extinción molar usado para ambas proteínas a 274 nm fue de $\epsilon_{274\text{nm}}=5600 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$.

Para los experimentos con péptidos, se prepararon soluciones stocks concentradas de 10 mM, y posteriormente se diluyeron en las soluciones amortiguadoras correspondientes (NEM, MES o MOPS 20 mM, 100 mM NaCl) para obtener una concentración final que varió de 250 a 500 μM .

El coeficiente de extinción molar para los péptidos sintetizados a 214 nm ($\epsilon_{214\text{nm}}$), se determinó utilizando una curva de calibración preparada en la solución amortiguadora adecuado, a partir de la pendiente de la regresión lineal de la curva (concentración vs absorbancia), se obtuvo $11500 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$, el cual se utilizó para determinar su concentración.

Para los estudios cinéticos la concentración fue de 0.3 mM del complejo Cu^{2+} -péptido y se preparó mediante la adición de sulfato de cobre (II) en relación molar de 1:1 o 0.9:1. El sulfato de cobre (II) anhidro, fue usado en todos los experimentos.

Preparación de los complejos Cu-AS y Cu-BS. Los péptidos liofilizados se disolvieron en solución amortiguadora MOPS (ácido 3- (N-morfolino) propanosulfónico) 20 mM, NaCl 100 mM, a pH 7.5. Los complejos con una concentración de 300 μM (para estudios espectroscópicos) y 1000 μM (para estudios redox) se prepararon añadiendo sulfato de cobre (II) en una razón 1:0.9 respectivamente.

Reducción de los complejos péptido- Cu^{2+} . La reducción de los complejos de péptidos de Cu^{2+} por ascorbato se realizó en condiciones anaeróbicas. Los complejos en

solución amortiguadora MOPS 20 mM pH 7.5 se desgasificaron en una línea de Schlenk, bajo una atmósfera de nitrógeno de alta pureza. Los complejos desgasificados se colocaron en una celda de cuarzo anaeróbica de 1 cm. Después de la adición de 16 equivalentes de L-(+) ascorbato se siguió la intensidad de la banda d-d característica (610 nm) en función del tiempo. La solución se mantuvo en atmósfera de nitrógeno de alta pureza durante el curso del experimento para asegurar un ambiente anaeróbico.

Reoxidación del complejo AS (1-6)-Cu¹⁺ y BS (1-15)-Cu¹⁺. La reacción de oxígeno con los complejos de Cu¹⁺ preparados con ~0.9 mM de péptido y 0.9 equivalentes de Cu en solución amortiguadora MOPS 20 mM a pH 7.5) se inició añadiendo 10% de volumen de la misma solución amortiguadora saturada de oxígeno a 4 °C y fue realizada en un espectrofotómetro Agilent 8453 equipado con un arreglo de diodos. Todos los experimentos se llevaron a cabo en una celda de cuarzo con paso óptico de 1 cm.

ANEXOS

A1. Gráficas Peisach-Blumberg.

Para asignar la coordinación ecuatorial de cada complejo, se extraen los valores A y g paralelos del espectro experimental de EPR. El valor g es adimensional, mientras que el valor A está en unidades de campo magnético (Gauss). Posteriormente, con los valores de g y A (en diferentes unidades de campo, como miliKaisers, mK) y utilizando en las gráficas de correlación de Peisach-Blumberg (Figura A1), se determinan los posibles modos de coordinación. Para realizar la conversión de unidades de Gauss a miliKaisers usar la ecuación 1. Cabe recalcar que las correlaciones a partir de las cuáles se obtienen los ligandos a Cu^{2+} , fueron hechas en 1974 en modelos peptídicos y en proteínas de cobre cuyas estructuras ya habían sido definidas a partir de difracción de Rayos X o ya habían sido exhaustivamente estudiadas por EPR.

$$A = 0.046686g\Delta H \text{Ecuación (A1)}$$

Donde g , es la constante giromagnética y ΔH es el valor de A en Gauss.

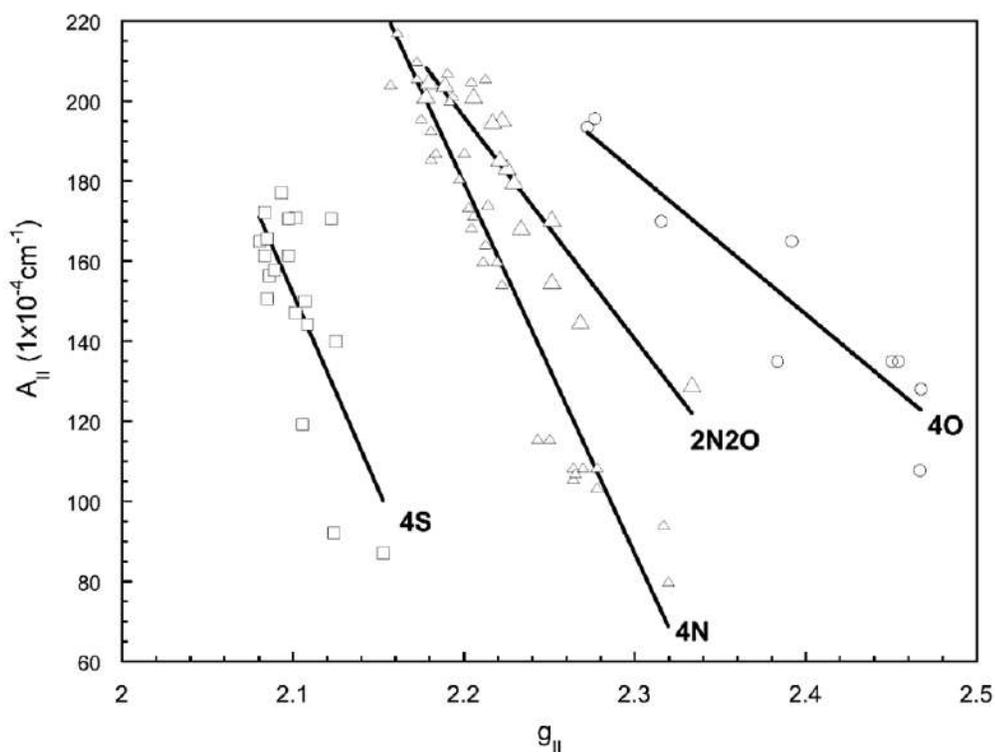


Figura A1. Gráfico Peisach Blumberg.

A2. Caracterización de péptidos sintéticos.

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

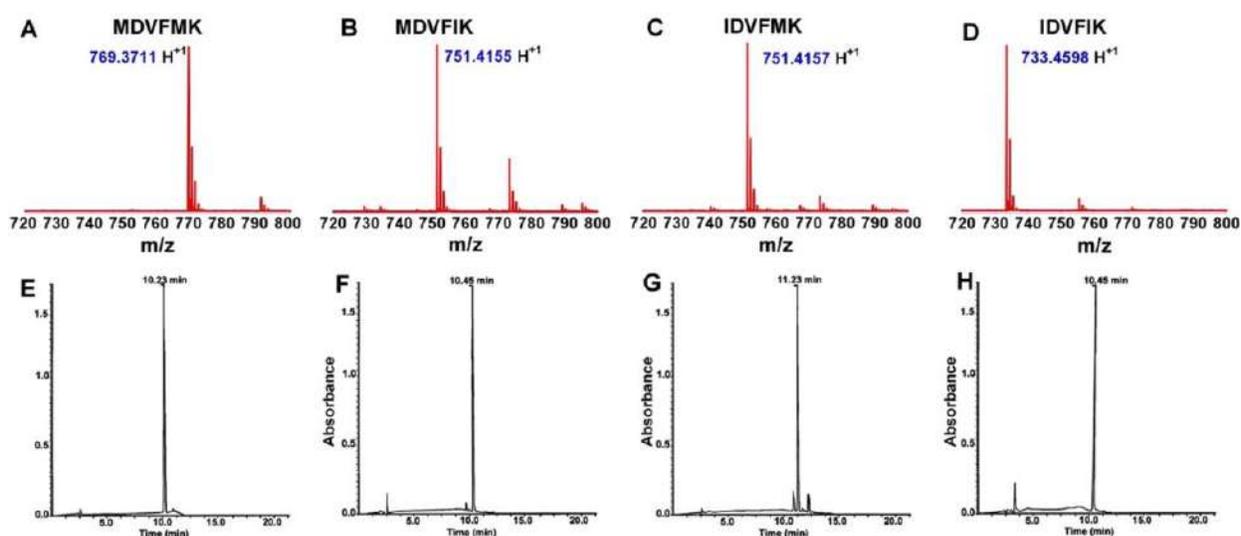


Figura A2. Espectros de Masas ESI-TOF (arriba) y cromatogramas analíticos HPLC (abajo) de los péptidos: MDVFMK (A y E), MDVFIK (B y F), IDVFMK (C y G), e IDVFIK (D y H). Los péptidos se purificaron usando HPLC en fase reversa con una columna C18 y un gradiente de 0 a 30% ACN/H₂O en 20 minutos. Como se observa en la figura A2, los tiempos de retención fueron: 10.23 min para el fragmento MDVFMK, 10.45 min para MDVFIK, 11.23 min para IDVFMK y 10.45 min para IDVFIK, monitoreando la absorbancia a $\lambda=214$ nm.

REFERENCIAS

1. Caughey, B.; Peter T. Lansbury, J. Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: Separating the Responsible Protein Aggregates from The Innocent Bystanders. *Annual Review of Neuroscience* **2003**, 26 (1), 267-298
2. Fraga, C. G. Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health. *Molecular Aspects of Medicine* **2005**, 26 (4), 235-244
3. Savelieff, M. G.; Lee, S.; Liu, Y.; Lim, M. H. Untangling Amyloid- β , Tau, and Metals in Alzheimer's Disease. *ACS Chemical Biology* **2013**, 8 (5), 856-865
4. Scholefield, M.; Unwin, R. D.; Cooper, G. J. S. Shared perturbations in the metallome and metabolome of Alzheimer's, Parkinson's, Huntington's, and dementia with Lewy bodies: A systematic review. *Ageing Research Reviews* **2020**, 63, 101152
5. Mariani, S.; Ventriglia, M.; Simonelli, I.; Donno, S.; Bucossi, S.; Vernieri, F.; Melgari, J.-M.; Pasqualetti, P.; Rossini, P. M.; Squitti, R. Fe and Cu do not differ in Parkinson's disease: A replication study plus meta-analysis. *Neurobiology of Aging* **2013**, 34 (2), 632-633
6. Serena Bucossia, M. V., Valentina Panettac, Carlo Salustrid, Patrizio Pasqualettic, Stefania Mariania, Mariacristina Siottoa, Paolo Maria Rossinib and Rosanna Squitti. Copper in Alzheimer's Disease: A Meta-Analysis of Serum, Plasma, and Cerebrospinal Fluid Studies. *Journal of Alzheimer's Disease* **2011**, 24 (1), 175-185.
7. Neurocirugía, I. N. d. N. y. Enfermedad de Parkinson. (01/01/2021),
8. Goedert, M. Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Neuroscience* **2001**, 2 (7), 492
9. Binolfi, A.; Rasia, R. M.; Bertoncini, C. W.; Ceolin, M.; Zweckstetter, M.; Griesinger, C.; Jovin, T. M.; Fernández, C. O. Interaction of α -Synuclein with Divalent Metal Ions Reveals Key Differences: A Link between Structure, Binding Specificity and Fibrillation Enhancement. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, 128 (30), 9893-9901.
10. Binolfi, A.; Rodriguez, E. E.; Valensin, D.; D'Amelio, N.; Ippoliti, E.; Obal, G.; Duran, R.; Magistrato, A.; Pritsch, O.; Zweckstetter, M.; Valensin, G.; Carloni, P.; Quintanar, L.; Griesinger, C.; Fernández, C. O. Bioinorganic Chemistry of Parkinson's Disease: Structural Determinants for the Copper-Mediated Amyloid Formation of Alpha-Synuclein. *Inorganic Chemistry* **2010**, 49 (22), 10668-10679
11. Kalia, L. V.; Lang, A. E. Parkinson's disease. *The Lancet* **2015**, 386 (9996), 896-912
12. Dorsey, E. R.; Constantinescu, R.; Thompson, J. P.; Biglan, K. M.; Holloway, R. G.; Kieburtz, K.; Marshall, F. J.; Ravina, B. M.; Schifitto, G.; Siderowf, A.; Tanner, C. M. Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology* **2007**, 68 (5), 384-386.
13. Goetz, C. G. The History of Parkinson's Disease: Early Clinical Descriptions and Neurological Therapies. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*: **2011**, 1 (1), a008862
14. van Rooden, S. M.; Heiser, W. J.; Kok, J. N.; Verbaan, D.; van Hilten, J. J.; Marinus, J. The identification of Parkinson's disease subtypes using cluster analysis: A systematic review. *Movement Disorders* **2010**, 25 (8), 969-978
15. van Rooden, S. M.; Colas, F.; Martínez-Martín, P.; Visser, M.; Verbaan, D.; Marinus, J.; Chaudhuri, R. K.; Kok, J. N.; van Hilten, J. J. Clinical subtypes of Parkinson's disease. *Movement Disorders* **2011**, 26 (1), 51-58.

16. Marras, C.; Lang, A. Parkinson's disease subtypes: lost in translation? *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* **2013**, 84 (4), 409.
17. Dickson, D. W.; Braak, H.; Duda, J. E.; Duyckaerts, C.; Gasser, T.; Halliday, G. M.; Hardy, J.; Leverenz, J. B.; Del Tredici, K.; Wszolek, Z. K.; Litvan, I. Neuropathological assessment of Parkinson's disease: refining the diagnostic criteria. *The Lancet Neurology* **2009**, 8 (12), 1150-1157.
18. Greffard, S.; Verny, M.; Bonnet, A. M.; Beinis, J. Y.; Gallinari, C.; Meaume, S.; Piette, F.; Hauw, J. J.; Duyckaerts, C. Motor score of the Unified Parkinson Disease Rating Scale as a good predictor of Lewy body-associated neuronal loss in the substantia nigra. *Archives of neurology* **2006**, 63 (4), 584-8
19. Kordower, J. H.; Olanow, C. W.; Dodiya, H. B.; Chu, Y.; Beach, T. G.; Adler, C. H.; Halliday, G. M.; Bartus, R. T. Disease duration and the integrity of the nigrostriatal system in Parkinson's disease. *Brain* **2013**, 136 (8), 2419-2431
20. Dickson, D. W. Parkinson's Disease and Parkinsonism: Neuropathology. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **2012**, 2 (8), a009258.
21. Spillantini, M. G.; Schmidt, M. L.; Lee, V. M.; Trojanowski, J. Q.; Jakes, R.; Goedert, M. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* **1997**, 388.
22. Chiti, F.; Dobson, C. M. Protein Misfolding, Functional Amyloid, and Human Disease. *Annual Review of Biochemistry* **2006**, 75 (1), 333-366.
23. Greffard, S.; Verny, M.; Bonnet, A.-M.; Seilhean, D.; Hauw, J.-J.; Duyckaerts, C. A stable proportion of Lewy body bearing neurons in the substantia nigra suggests a model in which the Lewy body causes neuronal death. *Neurobiology of Aging* **2010**, 31 (1), 99-103
24. Xu, J.; Kao, S.-Y.; Lee, F. J. S.; Song, W.; Jin, L.-W.; Yankner, B. A. Dopamine-dependent neurotoxicity of α -synuclein: A mechanism for selective neurodegeneration in Parkinson disease. *Nature Medicine* **2002**, 8, 600
25. Maroteaux, L.; Campanelli, J. T.; Scheller, R. H. Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *Journal of Neuroscience* **1988**, 8.
26. Maroteaux, L.; Scheller, R. H. The rat brain synucleins; family of proteins transiently associated with neuronal membrane. *Molecular Brain Research* **1991**, 11 (3-4), 335-43.
27. Jakes, R.; Spillantini, M. G.; Goedert, M. Identification of two distinct synucleins from human brain. *FEBS Letters* **1994**, 345 (1), 27-32
28. Burré, J.; Sharma, M.; Tsetsenis, T.; Buchman, V.; Etherton, M. R.; Südhof, T. C. α -Synuclein Promotes SNARE-Complex Assembly in Vivo and in Vitro. *Science* **2010**, 329 (5999), 1663.
29. Hunn, B. H. M.; Cragg, S. J.; Bolam, J. P.; Spillantini, M.-G.; Wade-Martins, R. Impaired intracellular trafficking defines early Parkinson's disease. *Trends in Neurosciences* **2015**, 38 (3), 178-188
30. Middleton, E. R.; Rhoades, E. Effects of Curvature and Composition on α -Synuclein Binding to Lipid Vesicles. *Biophysical Journal* **2010**, 99 (7), 2279-2288
31. Varkey, J.; Isas, J. M.; Mizuno, N.; Jensen, M. B.; Bhatia, V. K.; Jao, C. C.; Petrlava, J.; Voss, J. C.; Stamou, D. G.; Steven, A. C.; Langen, R. Membrane Curvature Induction and Tubulation Are Common Features of Synucleins and Apolipoproteins. *Journal of Biological Chemistry* **2010**, 285 (42), 32486-32493
32. Westphal, C. H.; Chandra, S. S. Monomeric Synucleins Generate Membrane Curvature. *Journal of Biological Chemistry* **2013**, 288 (3), 1829-1840
33. Shen, H.; Pirruccello, M.; De Camilli, P. SnapShot: Membrane Curvature Sensors and Generators. *Cell* **2012**, 150 (6), 1300-1300.e2

34. Antonny, B. Mechanisms of Membrane Curvature Sensing. *Annual Review of Biochemistry* **2011**, 80 (1), 101-123.
35. Abeliovich, A.; Schmitz, Y.; Farinas, I.; Choi-Lundberg, D.; Ho, W. H.; Castillo, P. E.; Shinsky, N.; Verdugo, J. M.; Armanini, M.; Ryan, A.; Hynes, M.; Phillips, H.; Sulzer, D.; Rosenthal, A. Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron* **2000**, 25.
36. Uéda, K.; Fukushima, H.; Masliah, E.; Xia, Y.; Iwai, A.; Yoshimoto, M.; Otero, D. A.; Kondo, J.; Ihara, Y.; Saitoh, T. Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1993**, 90 (23), 11282.
37. Davidson, W. S.; Jonas, A.; Clayton, D. F.; George, J. M. Stabilization of α -Synuclein Secondary Structure upon Binding to Synthetic Membranes. *Journal of Biological Chemistry* **1998**, 273 (16), 9443-9449.
38. Sung, Y.-h.; Eliezer, D. Secondary structure and dynamics of micelle bound β - and γ -synuclein. *Protein Science : A Publication of the Protein Society* **2006**, 15 (5), 1162-1174.
39. Surguchov, A.; Surgucheva, I.; Solessio, E.; Baehr, W. Synoretin—A New Protein Belonging to the Synuclein Family. *Molecular and Cellular Neuroscience* **1999**, 13 (2), 95-103
40. Iwai, A.; Masliah, E.; Yoshimoto, M.; Ge, N.; Flanagan, L.; Rohan de Silva, H. A.; Kittel, A.; Saitoh, T. The precursor protein of non-A β component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system. *Neuron* **1995**, 14 (2), 467-475
41. Barbour, R.; Kling, K.; Anderson, J. P.; Banducci, K.; Cole, T.; Diep, L.; Fox, M.; Goldstein, J. M.; Soriano, F.; Seubert, P.; Chilcote, T. J. Red Blood Cells Are the Major Source of Alpha-Synuclein in Blood. *Neurodegenerative Diseases* **2008**, 5 (2), 55-59.
42. Miller, D. W.; Hague, S. M.; Clarimon, J.; Baptista, M.; Gwinn-Hardy, K.; Cookson, M. R.; Singleton, A. B. α -Synuclein in blood and brain from familial Parkinson disease with SNCA locus triplication. *Neurology* **2004**, 62 (10), 1835.
43. Fujiwara, H.; Hasegawa, M.; Dohmae, N.; Kawashima, A.; Masliah, E.; Goldberg, M. S.; Shen, J.; Takio, K.; Iwatsubo, T. α -Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nature Cell Biology* **2002**, 4, 160.
44. Giasson, B. I.; Duda, J. E.; Murray, I. V.; Chen, Q.; Souza, J. M.; Hurtig, H. I.; Ischiropoulos, H.; Trojanowski, J. Q.; Lee, V. M. Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions. *Science* **2000**, 290.
45. Takahashi, M.; Kanuka, H.; Fujiwara, H.; Koyama, A.; Hasegawa, M.; Miura, M.; Iwatsubo, T. Phosphorylation of α -synuclein characteristic of synucleinopathy lesions is recapitulated in α -synuclein transgenic *Drosophila*. *Neuroscience Letters* **2003**, 336 (3), 155-158.
46. Ellis, C. E.; Schwartzberg, P. L.; Grider, T. L.; Fink, D. W.; Nussbaum, R. L. α -Synuclein Is Phosphorylated by Members of the Src Family of Protein-tyrosine Kinases. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, 276 (6), 3879-3884.
47. Anderson, J. P.; Walker, D. E.; Goldstein, J. M.; de Laat, R.; Banducci, K.; Caccavello, R. J.; Barbour, R.; Huang, J.; Kling, K.; Lee, M.; Diep, L.; Keim, P. S.; Shen, X.; Chataway, T.; Schlossmacher, M. G.; Seubert, P.; Schenk, D.; Sinha, S.; Gai, W. P.; Chilcote, T. J. Phosphorylation of Ser-129 is the dominant pathological modification of alpha-synuclein in familial and sporadic Lewy body disease. *Journal of Biological Chemistry* **2006**, 281.

48. Vicente Miranda, H.; Cássio, R.; Correia-Guedes, L.; Gomes, M. A.; Chegão, A.; Miranda, E.; Soares, T.; Coelho, M.; Rosa, M. M.; Ferreira, J. J.; Outeiro, T. F. Posttranslational modifications of blood-derived alpha-synuclein as biochemical markers for Parkinson's disease. *Scientific Reports* **2017**, 7 (1), 13713.
49. Lavedan, C. The Synuclein Family. *Genome Research* **1998**, 8 (9), 871-880.
50. Krassnig, S.; Schweinzer, C.; Taub, N.; Havas, D.; Auer, E.; Flunkert, S.; Schreibmayer, W.; Hutter-Paier, B.; Windisch, M. Influence of Lentiviral β -Synuclein Overexpression in the Hippocampus of a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease on Amyloid Precursor Protein Metabolism and Pathology. *Neurodegenerative Diseases* **2015**, 15 (4), 243-257.
51. Allison, J. R.; Rivers, R. C.; Christodoulou, J. C.; Vendruscolo, M.; Dobson, C. M. A Relationship between the Transient Structure in the Monomeric State and the Aggregation Propensities of α -Synuclein and β -Synuclein. *Biochemistry* **2014**, 53 (46), 7170-7183.
52. Raina, A.; Leite, K.; Guerin, S.; Mahajani, S. U.; Chakrabarti, K. S.; Voll, D.; Becker, S.; Griesinger, C.; Bähr, M.; Kügler, S. Dopamine promotes the neurodegenerative potential of β -synuclein. *Journal of Neurochemistry* **2020**, .
53. Kruger, R.; Kuhn, W.; Muller, T.; Woitalla, D.; Graeber, M.; Kosel, S.; Przuntek, H.; Eppelen, J. T.; Schols, L.; Riess, O. Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nature Genetics* **1998**, 18.
54. Giasson, B. I.; Duda, J. E.; Quinn, S. M.; Zhang, B.; Trojanowski, J. Q.; Lee, V. M. Neuronal alpha-synucleinopathy with severe movement disorder in mice expressing A53T human alpha-synuclein. *Neuron* **2002**, 34.
55. Zarranz, J. J.; Alegre, J.; Gomez-Esteban, J. C.; Lezcano, E.; Ros, R.; Ampuero, I.; Vidal, L.; Hoenicka, J.; Rodriguez, O.; Amares, B.; Llorens, V.; Gomez Tortosa, E.; del Ser, T.; Munoz, D. G.; de Yebenes, J. G. The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Annals of Neurology* **2004**, 55.
56. Appel-Cresswell, S.; Vilarino-Guell, C.; Encarnacion, M.; Sherman, H.; Yu, I.; Shah, B.; Weir, D.; Thompson, C.; Szu-Tu, C.; Trinh, J.; Aasly, J. O.; Rajput, A.; Rajput, A. H.; Stoessl, A.; Farrer, M. J. Alpha-synuclein p.H50Q, a novel pathogenic mutation for Parkinson's disease. *Movement Disorders* **2013**, 28 (6), 811-813.
57. Lesage, S.; Anheim, M.; Letournel, F.; Bousset, L.; Honore, A.; Rozas, N.; Pieri, L.; Madiona, K.; Durr, A.; Melki, R.; Verny, C.; Brice, A. G51D alpha-synuclein mutation causes a novel parkinsonian-pyramidal syndrome. *Annals of Neurology* **2013**, 73 (4), 459-71.
58. Bertoncini, C. W.; Fernandez, C. O.; Griesinger, C.; Jovin, T. M.; Zweckstetter, M. Familial Mutants of α -Synuclein with Increased Neurotoxicity Have a Destabilized Conformation. *Journal of Biological Chemistry* **2005**, 280 (35), 30649-30652
59. Wang, W.; Perovic, I.; Chittuluru, J.; Kaganovich, A.; Nguyen, L. T. T.; Liao, J.; Auclair, J. R.; Johnson, D.; Landeru, A.; Simorellis, A. K.; Ju, S.; Cookson, M. R.; Asturias, F. J.; Agar, J. N.; Webb, B. N.; Kang, C.; Ringe, D.; Petsko, G. A.; Pochapsky, T. C.; Hoang, Q. Q. A soluble α -synuclein construct forms a dynamic tetramer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2011**, 108 (43), 17797-17802.
60. Bartels, T.; Choi, J. G.; Selkoe, D. J. [agr]-Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation. *Nature* **2011**, 477 (7362), 107-110.
61. Binolfi, A.; Theillet, F.-X.; Selenko, P. Bacterial in-cell NMR of human α -synuclein: a disordered monomer by nature? *Biochemical Society Transactions* **2012**, 40 (5), 950-954.

62. Englander, S. W.; Mayne, L. The nature of protein folding pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2014**, 111 (45), 15873.
63. Onuchic, J. N.; Luthey-Schulten, Z.; Wolynes, P. G. Theory of protein folding: The Energy Landscape Perspective. *Annual Review of Physical Chemistry* **1997**, 48 (1), 545-600
64. Hartl, F. U.; Hayer-Hartl, M. Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. *Nature Structural & Molecular Biology* **2009**, 16, 574.
65. Theillet, F.-X.; Binolfi, A.; Bekei, B.; Martorana, A.; Rose, H. M.; Stuiver, M.; Verzini, S.; Lorenz, D.; van Rossum, M.; Goldfarb, D.; Selenko, P. Structural disorder of monomeric α -synuclein persists in mammalian cells. *Nature* **2016**, 530, 45.
66. Fauvet, B.; Mbefo, M. K.; Fares, M.-B.; Desobry, C.; Michael, S.; Ardah, M. T.; Tsika, E.; Coune, P.; Prudent, M.; Lion, N.; Eliezer, D.; Moore, D. J.; Schneider, B.; Aebischer, P.; El-Agnaf, O. M.; Masliah, E.; Lashuel, H. A. α -Synuclein in Central Nervous System and from Erythrocytes, Mammalian Cells, and Escherichia coli Exists Predominantly as Disordered Monomer. *Journal of Biological Chemistry* **2012**, 287 (19), 15345-15364.
67. Linse, S. Monomer-dependent secondary nucleation in amyloid formation. *Biophysical Reviews* **2017**, 9 (4), 329-338.
68. Bartolini, M.; Bertucci, C.; Bolognesi, M. L.; Cavalli, A.; Melchiorre, C.; Andrisano, V. Insight Into the Kinetic of Amyloid β (1-42) Peptide Self-Aggregation: Elucidation of Inhibitors' Mechanism of Action. *ChemBioChem* **2007**, 8 (17), 2152-2161.
69. Liu, G.; Gaines, J. C.; Robbins, K. J.; Lazo, N. D. Kinetic Profile of Amyloid Formation in the Presence of an Aromatic Inhibitor by Nuclear Magnetic Resonance. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2012**, 3 (10), 856-859.
70. Pauwels, K.; Williams, T. L.; Morris, K. L.; Jonckheere, W.; Vandersteen, A.; Kelly, G.; Schymkowitz, J.; Rousseau, F.; Pastore, A.; Serpell, L. C.; Broersen, K. Structural Basis for Increased Toxicity of Pathological A β (42):A β (40) Ratios in Alzheimer Disease. *The Journal of Biological Chemistry* **2012**, 287 (8), 5650-5660.
71. Seshadri, S.; Khurana, R.; Fink, A. L. In *Methods in Enzymology*; Academic Press: 1999; Vol. 309, pp 559-576.
72. Khurana, R.; Coleman, C.; Ionescu-Zanetti, C.; Carter, S. A.; Krishna, V.; Grover, R. K.; Roy, R.; Singh, S. Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils. *Journal of Structural Biology* **2005**, 151 (3), 229-238.
73. Biancalana, M.; Koide, S. Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **2010**, 1804 (7), 1405-1412.
74. Arosio, P.; Knowles, T. P. J.; Linse, S. On the lag phase in amyloid fibril formation. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2015**, 17 (12), 7606-7618.
75. Lashuel, H. A.; Hartley, D.; Petre, B. M.; Walz, T.; Lansbury Jr, P. T. Amyloid pores from pathogenic mutations. *Nature* **2002**, 418, 291.
76. Lashuel, H. A.; Petre, B. M.; Wall, J.; Simon, M.; Nowak, R. J.; Walz, T.; Lansbury, P. T. α -Synuclein, Especially the Parkinson's Disease-associated Mutants, Forms Pore-like Annular and Tubular Protofibrils. *Journal of Molecular Biology* **2002**, 322 (5), 1089-1102
77. Cremades, N.; Cohen, Samuel I. A.; Deas, E.; Abramov, Andrey Y.; Chen, Allen Y.; Orte, A.; Sandal, M.; Clarke, Richard W.; Dunne, P.; Aprile, Francesco A.; Bertocini, Carlos W.; Wood, Nicholas W.; Knowles, Tuomas P. J.; Dobson, Christopher M.; Klenerman, D. Direct Observation of the Interconversion of Normal and Toxic Forms of α -Synuclein. *Cell* **2012**, 149 (5), 1048-1059

78. Stockl, M. T.; Zijlstra, N.; Subramaniam, V. alpha-Synuclein oligomers: an amyloid pore? Insights into mechanisms of alpha-synuclein oligomer-lipid interactions. *Molecular Neurobiology* **2013**, 47 (2), 613-21.
79. Deleersnijder, A.; Gerard, M.; Debyser, Z.; Baekelandt, V. The remarkable conformational plasticity of alpha-synuclein: blessing or curse? *Trends in Molecular Medicine* **2013**, 19 (6), 368-377.
80. Goers, J.; Manning-Bog, A. B.; McCormack, A. L.; Millett, I. S.; Doniach, S.; Di Monte, D. A.; Uversky, V. N.; Fink, A. L. Nuclear Localization of α -Synuclein and Its Interaction with Histones. *Biochemistry* **2003**, 42 (28), 8465-8471.
81. Garza-Lombó, C.; Posadas, Y.; Quintanar, L.; Gonsebatt, M. E.; Franco, R. Neurotoxicity Linked to Dysfunctional Metal Ion Homeostasis and Xenobiotic Metal Exposure: Redox Signaling and Oxidative Stress. *Antioxidants & Redox Signaling* **2018**, 28 (18), 1669-1703
82. Gaggelli, E.; Kozlowski, H.; Valensin, D.; Valensin, G. Copper Homeostasis and Neurodegenerative Disorders (Alzheimer's, Prion, and Parkinson's Diseases and Amyotrophic Lateral Sclerosis). *Chemical Reviews* **2006**, 106 (6), 1995-2044.
83. Ijomone, O. M.; Ifenatuoha, C. W.; Aluko, O. M.; Ijomone, O. K.; Aschner, M. The aging brain: impact of heavy metal neurotoxicity. *Critical Reviews in Toxicology* **2020**, 50 (9), 801-814.
84. Gorell, J. M.; Johnson, C. C.; Rybicki, B. A.; Peterson, E. L.; Kortsha, G. X.; Brown, G. G.; Richardson, R. J. Occupational exposure to manganese, copper, lead, iron, mercury and zinc and the risk of Parkinson's disease. *Neurotoxicology* **1999**, 20 (2-3), 239-47.
85. Rybicki, B. A.; Johnson, C. C.; Uman, J.; Gorell, J. M. Parkinson's disease mortality and the industrial use of heavy metals in Michigan. *Movement Disorders* **1993**, 8 (1), 87-92
86. Dexter, D. T.; Wells, F. R.; Lee, A. J.; Agid, F.; Agid, Y.; Jenner, P.; Marsden, C. D. Increased Nigral Iron Content and Alterations in Other Metal Ions Occurring in Brain in Parkinson's Disease. *Journal of Neurochemistry* **1989**, 52 (6), 1830-1836.
87. Dexter, D. T.; Carayon, A.; Javoy-Agid, F.; Agid, Y.; Wells, F. R.; Daniel, S. E.; Lees, A. J.; Jenner, P.; Marsden, C. D. Alterations in the levels of iron, ferritin and other trace metals in parkinson's disease and other neurodegenerative diseases affecting the basal ganglia. *Brain* **1991**, 114 (4), 1953-1975.
88. Riederer, P.; Sofic, E.; Rausch, W.-D.; Schmidt, B.; Reynolds, G. P.; Jellinger, K.; Youdim, M. B. H. Transition Metals, Ferritin, Glutathione, and Ascorbic Acid in Parkinsonian Brains. *Journal of Neurochemistry* **1989**, 52 (2), 515-520.
89. Ortega, R.; Carmona, A.; Roudeau, S.; Perrin, L.; Dučić, T.; Carboni, E.; Bohic, S.; Cloetens, P.; Lingor, P. α -Synuclein Over-Expression Induces Increased Iron Accumulation and Redistribution in Iron-Exposed Neurons. *Molecular Neurobiology* **2016**, 53 (3), 1925-1934.
90. Kwakye, G.; Paoliello, M.; Mukhopadhyay, S.; Bowman, A.; Aschner, M. Manganese-Induced Parkinsonism and Parkinson's Disease: Shared and Distinguishable Features. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **2015**, 12 (7), 7519.
91. Tuschl, K.; Mills, P. B.; Clayton, P. T. In *International Review of Neurobiology*; Bhatia, K. P., Schneider, S. A., Ed.; Academic Press: 2013; Vol. 110, pp 277-312.
92. Balamurugan, K.; Schaffner, W. Copper homeostasis in eukaryotes: Teetering on a tightrope. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **2006**, 1763 (7), 737-746.

93. Shaw, C. E.; Enayat, Z. E.; Powell, J. F.; Anderson, V. E. R.; Radunovic, A.; Al-Sarraj, S.; Leigh, P. N. Familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* **1997**, 49 (6), 1612.
94. Lovell, M. A.; Robertson, J. D.; Teesdale, W. J.; Campbell, J. L.; Markesbery, W. R. Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *Journal of the Neurological Sciences* **1998**, 158 (1), 47-52.
95. Millhauser, G. L. Copper and the Prion Protein: Methods, Structures, Function, and Disease. *Annual Review of Physical Chemistry* **2007**, 58 (1), 299-320.
96. Montes, S.; Rivera-Mancia, S.; Diaz-Ruiz, A.; Tristan-Lopez, L.; Rios, C. Copper and Copper Proteins in Parkinson's Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2014**, 2014, 15.
97. Kumudini, N.; Uma, A.; Devi, Y. P.; Naushad, S. M.; Mridula, R.; Borgohain, R.; Kutala, V. K. Association of Parkinson's disease with altered serum levels of lead and transition metals among South Indian subjects. *Indian journal of biochemistry & biophysics* **2014**, 51 (2), 121-6.
98. Younes-Mhenni, S.; Aissi, M.; Mokni, N.; Boughammoura-Bouatay, A.; Chebel, S.; Frih-Ayed, M.; Kerkeni, A.; Bost, M.; Chazot, G.; Sfar, M. T.; Sfar, M. H. Serum copper, zinc and selenium levels in Tunisian patients with Parkinson's disease. *La Tunisie medicale* **2013**, 91 (6), 402-5.
99. Forte, G.; Bocca, B.; Senofonte, O.; Petrucci, F.; Brusa, L.; Stanzione, P.; Zannino, S.; Violante, N.; Alimonti, A.; Sancesario, G. Trace and major elements in whole blood, serum, cerebrospinal fluid and urine of patients with Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission* **2004**, 111 (8), 1031-1040.
100. Bharucha, K. J.; Friedman, J. K.; Vincent, A. S.; Ross, E. D. Lower serum ceruloplasmin levels correlate with younger age of onset in Parkinson's disease. *Journal of Neurology* **2009**, 255 (12), 1957.
101. Hozumi, I.; Hasegawa, T.; Honda, A.; Ozawa, K.; Hayashi, Y.; Hashimoto, K.; Yamada, M.; Koumura, A.; Sakurai, T.; Kimura, A.; Tanaka, Y.; Satoh, M.; Inuzuka, T. Patterns of levels of biological metals in CSF differ among neurodegenerative diseases. *Journal of the Neurological Sciences* **2011**, 303 (1), 95-99.
102. Boll, M.-C.; Alcaraz-Zubeldia, M.; Montes, S.; Rios, C. Free Copper, Ferroxidase and SOD1 Activities, Lipid Peroxidation and NO_x Content in the CSF. A Different Marker Profile in Four Neurodegenerative Diseases. *Neurochemical Research* **2008**, 33 (9), 1717-1723.
103. Pall, H. S.; Blake, D. R.; Gutteridge, J. M.; Williams, A. C.; Lunec, J.; Hall, M.; Taylor, A. Raised cerebrospinal-fluid copper concentration in parkinson's disease. *The Lancet* **1987**, 330 (8553), 238-241.
104. Uversky, V. N.; Li, J.; Fink, A. L. Metal-triggered Structural Transformations, Aggregation, and Fibrillation of Human α -Synuclein: a possible molecular link between parkinson's disease and heavy metal exposure. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, 276 (47), 44284-44296.
105. Paik, S. R.; Shin, H.-J.; Lee, J.-H.; Chang, C.-S.; Kim, J. Copper(II)-induced self-oligomerization of α -synuclein. *Biochemical Journal* **1999**, 340 (3), 821-828.
106. Rasia, R. M.; Bertoncini, C. W.; Marsh, D.; Hoyer, W.; Cherny, D.; Zweckstetter, M.; Griesinger, C.; Jovin, T. M.; Fernández, C. O. Structural characterization of copper(II) binding to α -synuclein: Insights into the bioinorganic chemistry of Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**, 102 (12), 4294-4299.

107. Drew, S. C. The N Terminus of α -Synuclein Forms CuII-Bridged Oligomers. *Chemistry – A European Journal* **2015**, 21 (19), 7111-7118.
108. Dudzik, C. G.; Walter, E. D.; Abrams, B. S.; Jurica, M. S.; Millhauser, G. L. Coordination of Copper to the Membrane-Bound Form of α -Synuclein. *Biochemistry* **2013**, 52 (1), 53-60.
109. Miotto, M. C.; Valiente-Gabioud, A. A.; Rossetti, G.; Zweckstetter, M.; Carloni, P.; Selenko, P.; Griesinger, C.; Binolfi, A.; Fernández, C. O. Copper Binding to the N-Terminally Acetylated, Naturally Occurring Form of Alpha-Synuclein Induces Local Helical Folding. *Journal of the American Chemical Society* **2015**, 137 (20), 6444-6447
110. Halliwell, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *Journal of Neurochemistry* **2006**, 97 (6), 1634-1658.
111. Gandhi, S.; Abramov, A. Y. Mechanism of Oxidative Stress in Neurodegeneration. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2012**, 2012, 428010
112. Popa-Wagner, A.; Mitran, S.; Sivanesan, S.; Chang, E.; Buga, A.-M. ROS and Brain Diseases: The Good, the Bad, and the Ugly. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2013**, 2013, 963520
113. Miao, L.; St. Clair, D. K. Regulation of superoxide dismutase genes: Implications in disease. *Free Radical Biology and Medicine* **2009**, 47 (4), 344-356.
114. Floyd, R. A.; Hensley, K. Oxidative stress in brain aging: Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. *Neurobiology of Aging* **2002**, 23 (5), 795-807.
115. Forman, H. J. Redox signaling: an evolution from free radicals to aging. *Free radical biology & medicine* **2016**, 97, 398-407.
116. Finkel, T. Signal transduction by reactive oxygen species. *The Journal of Cell Biology* **2011**, 194 (1), 7.
117. Lebovitz, R. M.; Zhang, H.; Vogel, H.; Cartwright, J.; Dionne, L.; Lu, N.; Huang, S.; Matzuk, M. M. Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1996**, 93 (18), 9782-9787.
118. Dexter, D. T.; Carter, C. J.; Wells, F. R.; Javoy-Agid, F.; Agid, Y.; Lees, A.; Jenner, P.; Marsden, C. D. Basal Lipid Peroxidation in Substantia Nigra Is Increased in Parkinson's Disease. *Journal of Neurochemistry* **1989**, 52 (2), 381-389.
119. Sian, J.; Dexter, D. T.; Lees, A. J.; Daniel, S.; Agid, Y.; Javoy-Agid, F.; Jenner, P.; Marsden, C. D. Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. *Annals of Neurology* **1994**, 36 (3), 348-355.
120. Chinta, S. J.; Andersen, J. K. Redox imbalance in Parkinson's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2008**, 1780 (11), 1362-1367.
121. Marttila, R. J.; Lorentz, H.; Rinne, U. K. Oxygen toxicity protecting enzymes in Parkinson's disease: Increase of superoxide dismutase-like activity in the substantia nigra and basal nucleus. *Journal of the Neurological Sciences* **1988**, 86 (2), 321-331 .
122. Wu, D.-C.; Teismann, P.; Tieu, K.; Vila, M.; Jackson-Lewis, V.; Ischiropoulos, H.; Przedborski, S. NADPH oxidase mediates oxidative stress in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2003**, 100 (10), 6145.
123. Förstermann, U.; Sessa, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal* **2012**, 33 (7), 829-837.

124. Bedard, K.; Krause, K.-H. The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. *Physiological Reviews* **2007**, 87 (1), 245-313.
125. Martinez-Finley, E. J.; Chakraborty, S.; Fretham, S.; Aschner, M. Admit One: How Essential and Nonessential Metals Gain Entrance into the Cell. *Metallomics : integrated biometal science* **2012**, 4 (7), 593-605.
126. O'Brien, R. J.; Wong, P. C. Amyloid Precursor Protein Processing and Alzheimer's Disease. *Annual Review of Neuroscience* **2011**, 34 (1), 185-204.
127. Tabner, B. J.; Turnbull, S.; El-Agnaf, O. M. A.; Allsop, D. Formation of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals from A β and α -synuclein as a possible mechanism of cell death in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Free Radical Biology and Medicine* **2002**, 32 (11), 1076-1083.
128. Salvador, G. A.; Uranga, R. M.; Giusto, N. M. Iron and Mechanisms of Neurotoxicity. *International Journal of Alzheimer's Disease* **2011**, 2011.
129. Molina-Holgado, F.; Hider, R. C.; Gaeta, A.; Williams, R.; Francis, P. Metals ions and neurodegeneration. *BioMetals* **2007**, 20 (3), 639-654.
130. Hung, Y. H.; Bush, A. I.; Cherny, R. A. Copper in the brain and Alzheimer's disease. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* **2010**, 15 (1), 61-76.
131. Yatin, S. M.; Varadarajan, S.; Link, C. D.; Butterfield, D. A. In vitro and in vivo oxidative stress associated with Alzheimer's amyloid beta-peptide (1-42). *Neurobiology of Aging* **1999**, 20 (3), 325-30; discussion 339-42.
132. Butterfield, D. A.; Sultana, R. Methionine-35 of A β (1-42): Importance for Oxidative Stress in Alzheimer Disease. *Journal of Amino Acids* **2011**, 2011, 10.
133. Butterfield, D. A.; Bush, A. I. Alzheimer's amyloid β -peptide (1-42): involvement of methionine residue 35 in the oxidative stress and neurotoxicity properties of this peptide. *Neurobiology of Aging* **2004**, 25 (5), 563-568.
134. Näslund, J.; Schierhorn, A.; Hellman, U.; Lannfelt, L.; Roses, A. D.; Tjernberg, L. O.; Silberring, J.; Gandy, S. E.; Winblad, B.; Greengard, P. Relative abundance of Alzheimer A beta amyloid peptide variants in Alzheimer disease and normal aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1994**, 91 (18), 8378.
135. Reybier, K.; Ayala, S.; Alies, B.; Rodrigues, J. V.; Bustos Rodriguez, S.; La Penna, G.; Collin, F.; Gomes, C. M.; Hureau, C.; Faller, P. Free Superoxide is an Intermediate in the Production of H₂O₂ by Copper(I)-A β Peptide and O₂. *Angewandte Chemie International Edition* **2016**, 55 (3), 1085-1089.
136. Turnbull, S.; Tabner, B. J.; El-Agnaf, O. M. A.; Moore, S.; Davies, Y.; Allsop, D. α -synuclein implicated in Parkinson's disease catalyses the formation of hydrogen peroxide in vitro. *Free Radical Biology and Medicine* **2001**, 30 (10), 1163-1170.
137. Tabner, B. J.; Turnbull, S.; El-Agnaf, O. M. A.; Allsop, D. Formation of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals from A β and α -synuclein as a possible mechanism of cell death in Alzheimer's disease and Parkinson's disease^{1,2}. *Free Radical Biology and Medicine* **2002**, 32 (11), 1076-1083.
138. Lee, E.-N.; Lee, S.-Y.; Lee, D.; Kim, J.; Paik, S. R. Lipid interaction of α -synuclein during the metal-catalyzed oxidation in the presence of Cu²⁺ and H₂O₂. *Journal of Neurochemistry* **2003**, 84 (5), 1128-1142.
139. Ruf, R. A. S.; Lutz, E. A.; Zigoneanu, I. G.; Pielak, G. J. α -Synuclein Conformation Affects Its Tyrosine-Dependent Oxidative Aggregation. *Biochemistry* **2008**, 47 (51), 13604-13609.

140. Wang, J.-Y.; Zhuang, Q.-Q.; Zhu, L.-B.; Zhu, H.; Li, T.; Li, R.; Chen, S.-F.; Huang, C.-P.; Zhang, X.; Zhu, J.-H. Meta-analysis of brain iron levels of Parkinson's disease patients determined by postmortem and MRI measurements. *Scientific Reports* **2016**, 6 (1), 36669.
141. Das, A.; Nag, S.; Mason, A. B.; Barroso, M. M. Endosome-mitochondria interactions are modulated by iron release from transferrin. *Journal of Cell Biology* **2016**, 214 (7), 831-45.
142. Mastroberardino, P. G.; Hoffman, E. K.; Horowitz, M. P.; Betarbet, R.; Taylor, G.; Cheng, D.; Na, H. M.; Gutekunst, C. A.; Gearing, M.; Trojanowski, J. Q.; Anderson, M.; Chu, C. T.; Peng, J.; Greenamyre, J. T. A novel transferrin/TfR2-mediated mitochondrial iron transport system is disrupted in Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease* **2009**, 34 (3), 417-31
143. Pillozzi, A.; Yu, Z.; Carreras, I.; Cormier, K.; Hartley, D.; Rogers, J.; Dedeoglu, A.; Huang, X. A Preliminary Study of Cu Exposure Effects upon Alzheimer's Amyloid Pathology. *Biomolecules* **2020**, 10 (3).
144. Reiterer, M.; Schmidt-Kastner, R.; Milton, S. L. Methionine sulfoxide reductase (Msr) dysfunction in human brain disease. *Free Radical Research* **2019**, 53 (11-12), 1144-1154.
145. Chavarría, C.; Souza, J. M. Oxidation and nitration of α -synuclein and their implications in neurodegenerative diseases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2013**, 533 (1-2), 25-32.
146. He, Y.; Yu, Z.; Chen, S. Alpha-Synuclein Nitration and Its Implications in Parkinson's Disease. *ACS Chemical Neuroscience* **2019**, 10 (2), 777-782
147. Qiao, L.; Lu, Y.; Liu, B.; Girault, H. H. Copper-catalyzed tyrosine nitration. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, 133 (49), 19823-31.
148. 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 (2), 691-708.
149. 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. *Journal of the American Chemical Society* **1981**, 103 (7), 1686-1691.
150. 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. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* **1996**, (15), 3269-3275.
151. Fawcett, T. G.; Bernarducci, E. E.; Krogh-Jespersen, K.; Schugar, H. J. Charge-transfer absorptions of copper(II)-imidazole and copper(II)-imidazolate chromophores. *Journal of the American Chemical Society* **1980**, 102 (8), 2598-2604.
152. Kowalik-Jankowska, T.; Leśniak, W.; Brasuń, J.; Stasiak, M.; Leplawy, M. T. Copper(II) complexes of deltaxephalin and its analogues containing α -hydroxymethylserine. *Polyhedron* **2000**, 19 (2), 241-245.
153. Ostrerova-Golts, N.; Petrucelli, L.; Hardy, J.; Lee, J. M.; Farer, M.; Wolozin, B. The A53T alpha-synuclein mutation increases iron-dependent aggregation and toxicity. *Journal of Neuroscience* **2000**, 20.
154. Hansen, S.; Müller-Warmuth, W. J. R. Pilbrow: Transition Ion Electron Paramagnetic Resonance, Clarendon Press, Oxford 1990. ISBN 0-19-855214-9. 717 Seiten, Preis: £85.-. *Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie* **1991**, 95 (10), 1307-1307.

155. Mabbs, F. E.; Collison, D.; Gatteschi, D. Electron paramagnetic resonance of d transition metal compounds, Elsevier, Amsterdam, 1992. xx + 1326 pages. \$622.00, Dfl. 995.00 ISBN 0-444-89852-2. *Magnetic Resonance in Chemistry* **1994**, 32 (1), 67-67.
156. Hanson, G. R.; Gates, K. E.; Noble, C. J.; Griffin, M.; Mitchell, A.; Benson, S. XSophe-Sophe-XeprView®. A computer simulation software suite (v. 1.1.3) for the analysis of continuous wave EPR spectra. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2004**, 98 (5), 903-916.
157. Miziorako, H. M.; Sealy, R. C. Electron spin resonance studies of ribulose biphosphate carboxylase: identification of activator cation ligands. *Biochemistry* **1984**, 23 (3), 479-485.
158. T., V. *Biological Applications of Electron Spin Resonance*. Wiley-Interscience: New York, 1972.
159. Getz, D.; Silver, B. L. ESR of Cu²⁺(H₂O)₆. I. The oxygen-17 superhyperfine tensors in ⁶³Cu²⁺ doped zinc Tutton's salt at 20 °K. *The Journal of Chemical Physics* **1974**, 61 (2), 630-637.
160. Brändén, R.; Deinum, J. Type 2 copper(II) as a component of the dioxygen reducing site in laccase: Evidence from EPR experiments with ¹⁷O. *FEBS Letters* **1977**, 73 (2), 144-146.
161. Styring, S.; Braenden, R. Identification of ligands to the metal ion in copper(II)-activated ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase by the use of electron paramagnetic resonance spectroscopy and oxygen-17 labeled ligands. *Biochemistry* **1985**, 24 (21), 6011-6019.
162. Drew, S. C.; Ling Leong, S.; Pham, C. L. L.; Tew, D. J.; Masters, C. L.; Miles, L. A.; Cappai, R.; Barnham, K. J. Cu²⁺ Binding Modes of Recombinant α -Synuclein – Insights from EPR Spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, 130 (24), 7766-7773.
163. Wright, J. A.; Brown, D. R. Alpha-synuclein and its role in metal binding: Relevance to Parkinson's disease. *Journal of Neuroscience Research* **2008**, 86 (3), 496-503.
164. Kowalik-Jankowska, T.; Rajewska, A.; Jankowska, E.; Grzonka, Z. Copper(II) binding by fragments of α -synuclein containing M1-D2- and -H50-residues; a combined potentiometric and spectroscopic study. *Dalton Transactions* **2006**, (42), 5068-5076.
165. Kang, L.; Moriarty, G. M.; Woods, L. A.; Ashcroft, A. E.; Radford, S. E.; Baum, J. N-terminal acetylation of α -synuclein induces increased transient helical propensity and decreased aggregation rates in the intrinsically disordered monomer. *Protein Science : A Publication of the Protein Society* **2012**, 21 (7), 911-917.
166. Moriarty, G. M.; Minetti, C. A. S. A.; Remeta, D. P.; Baum, J. A Revised Picture of the Cu(II)- α -Synuclein Complex: The Role of N-Terminal Acetylation. *Biochemistry* **2014**, 53 (17), 2815-2817.
167. Huheey JE, K. E., Keiter RL. *Inorganic chemistry: principles of structure and reactivity*. 4th ed.; HarperCollins College Publishers: New York, 1993.
168. 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. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, 130 (35), 11801-11812.
169. Miotto, M. C.; Rodriguez, E. E.; Valiente-Gabioud, A. A.; Torres-Monserrat, V.; Binolfi, A.; Quintanar, L.; Zweckstetter, M.; Griesinger, C.; Fernández, C. O. Site-Specific Copper-Catalyzed Oxidation of α -Synuclein: Tightening the Link between Metal Binding

- and Protein Oxidative Damage in Parkinson's Disease. *Inorganic Chemistry* **2014**, 53 (9), 4350-4358.
170. Rodríguez, E. E.; Arcos-López, T.; Trujano-Ortiz, L. G.; Fernández, C. O.; González, F. J.; Vela, A.; Quintanar, L. Role of N-terminal methionine residues in the redox activity of copper bound to alpha-synuclein. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* **2016**, 21 (5), 691-702.
171. Bridgewater, J. D.; Vachet, R. W. Metal-catalyzed oxidation reactions and mass spectrometry: The roles of ascorbate and different oxidizing agents in determining Cu-protein-binding sites. *Analytical Biochemistry* **2005**, 341 (1), 122-130.
172. Faulkner, A. J. B. L. R. *Electrochemical methods: fundamentals and applications*. 2nd ed.; New York, 2001.
173. Miotto, M. C.; Pavese, M. D.; Quintanar, L.; Zweckstetter, M.; Griesinger, C.; Fernández, C. O. Bioinorganic Chemistry of Parkinson's Disease: Affinity and Structural Features of Cu(I) Binding to the Full-Length β -Synuclein Protein. *Inorganic Chemistry* **2017**, 56 (17), 10387-10395.
174. Rios Quiroz, Anacelia. Tesis de maestría. "Estudio espectroscópico de la coordinación de Cu(II) al sitio de histidina de las proteínas α - y β -sinucleína". Departamento de Farmacología. Cinvestav, 2012.
175. Villar-Piqué, A.; Rossetti, G.; Ventura, S.; Carloni, P.; Fernández, C. O.; Outeiro, T. F. Copper(II) and the pathological H50Q α -synuclein mutant: Environment meets genetics. *Communicative & Integrative Biology* **2017**, 10 (1), e1270484.
176. Merrifield, B. *Federation of American Societies for Experimental Biology* **1962**, 21, 412.
177. Merrifield, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society* **1963**, 85 (14), 2149-2154.
178. Merrifield, B. In *Peptides*; Gutte, B., Ed.; Academic Press: San Diego, 1995; pp 93-169.
179. Amblard, M.; Fehrentz, J.-A.; Martinez, J.; Subra, G. Methods and protocols of modern solid phase peptide synthesis. *Molecular Biotechnology* **2006**, 33 (3), 239-254.
180. Kaiser, E.; Colescott, R. L.; Bossinger, C. D.; Cook, P. I. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Analytical Biochemistry* **1970**, 34 (2), 595-598.