



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**Estudio atomístico y electrónico de la interacción de iones
metálicos con proteínas intrínsecamente desordenadas
implicadas en la enfermedad de Alzheimer**

T E S I S

Que presenta

CARLOS ZEPACTONAL GÓMEZ CASTRO

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Director de la Tesis:

ALBERTO VELA AMIEVA

México, D.F.

Marzo, 2015

Resumen

En la actualidad, la enfermedad de Alzheimer es la causa más importante de demencia, la cual produce un deterioro de la memoria, el pensamiento, el comportamiento y la capacidad para llevar a cabo tareas cotidianas. La proteína β amiloide y la proteína prion son dos de los componentes celulares con mayor relevancia para explicar el origen, aún desconocido, de ésta y otras enfermedades neurodegenerativas. Si bien los mecanismos celulares a través de los cuales estas proteínas generan neurotoxicidad aún no están completamente claros, los procesos de agregación y formación de fibras amiloides así como los de formación de complejos con diversos iones metálicos han demostrado jugar un papel importante en dichos mecanismos neurotóxicos.

Con la finalidad de mejorar la comprensión a nivel molecular de estos procesos, en el presente trabajo se crearon modelos atomísticos de las proteínas β amiloide y prion, así como de fibras formadas por la proteína β amiloide. Estos se utilizaron para estudiar el efecto estructural derivado de su interacción o coordinación con iones metálicos como cobre o zinc. Se analizó la evolución temporal de la estructura de los modelos de fibras amiloides interaccionando con iones metálicos y de modelos de la proteína prion coordinada a cobre mediante simulaciones de dinámica molecular. Por su parte, la coordinación del cobre a la proteína β amiloide se evaluó comparando la estabilidad de diferentes modos de coordinación mediante cálculos de estructura electrónica basados en la teoría de funcionales de la densidad.

Los resultados mostraron que la interacción con iones metálicos tiene un efecto importante en términos de estructura y plegamiento de las proteínas β amiloide y prion, lo cual tiene como consecuencia el cambio de sus propiedades fisicoquímicas y, por lo tanto, de sus propiedades de agregación. Los modelos de fibras de la proteína β amiloide mostraron que el plegamiento del dominio N-terminal de la fibra es particularmente sensible a la presencia de los iones. Este dominio mostró un plegamiento particular en el que el incremento de la estructura de tipo β en esta región produce una interacción regioselectiva por parte de los cationes presentes en el sistema, característica que no se había reportado previamente. El análisis de los complejos de la proteína β amiloide con el cobre mostraron que esta coordinación podría inhibir la formación de estructuras β en esta región y, de esta manera, modificar su plegamiento en las fibras amiloides. El descubrimiento de diversos modos de coordinación a cobre también tiene implicaciones importantes en la estructura y propiedades de las fibras. Por su parte, la coordinación del cobre a la proteína prion también impide la formación de estructuras secundarias y promueve la formación de estructuras globulares. La principal aportación de éste trabajo es proporcionar una visión a nivel atomístico de diversos procesos implicados en la enfermedad de Alzheimer, los cuales son difíciles de estudiar mediante otras metodologías tanto teóricas como experimentales. Esta información ayuda en el diseño de nuevas estrategias terapéuticas y preventivas dirigidas a combatir la enfermedad.

Abstract

Currently, Alzheimer's disease is the most important cause of dementia, which causes a deterioration of memory, thinking, behavior and ability to perform everyday activities. The amyloid- β and prion proteins are two of the most important cellular components to explain the origin, still unknown, of this and other neurodegenerative diseases. While the cellular mechanisms by which these proteins produce neurotoxicity are not yet completely clear, the aggregation and formation of amyloid fibrils, as well as the formation of complexes with several metal ions have been shown to play an important role in these neurotoxic mechanisms.

In order to enhance understanding at molecular level of these processes, atomistic models of amyloid- β and prion proteins as well as fibrils formed by the amyloid- β protein were created. These were used to study the structural effect derived from their interaction or coordination with metal ions such as copper or zinc. The temporal evolution of the structure of amyloid fibril models interacting with metal ions and prion protein models coordinated to copper was analyzed by means of molecular dynamics simulations. Meanwhile, copper coordination stability by amyloid- β protein was evaluated by comparing different coordination modes using electronic structure calculations based on density functional theory.

The results showed that the interaction with metal ions has a significant effect in terms of structure and folding of the amyloid- β and prion proteins, which results in the change of their physicochemical properties and, therefore, of their aggregation properties. Fibril models of amyloid- β protein showed that the folding of the N-terminal domain of the fibril is particularly sensitive to the presence of ions. This domain showed a particular folding in which the increase in β -type structure in this region produces a regioselective interaction with the cations present in the system, feature not previously reported. The analysis of amyloid- β -copper complexes showed that the coordination could inhibit the formation of β structures in this region and, thus, change its folding in amyloid fibrils. The discovery of various copper-coordination modes also has important implications for the structure and properties of the fibers. Meanwhile, copper coordination to prion protein prevents the formation of secondary structures too and promotes the formation of globular structures. The main contribution of this work is to provide insights at atomistic level of various processes involved in Alzheimer's disease, which are difficult to study using other methodologies both theoretical and experimental. This information helps in the design of new therapeutic and preventive strategies to combat the disease.

Agradecimientos

Al Departamento de Química del Cinvestav, al IPN y al Conacyt, por brindarme la oportunidad y los medios para obtener una formación académica y profesional.

A mi asesor, el Dr. Alberto Vela Amieva,

por su guía, su apoyo generoso y por ser un ejemplo para mí de entusiasmo por la ciencia y por el trabajo riguroso y bien hecho. Siempre le estaré agradecido por el aprendizaje que me llevo del doctorado.

Al comité que integra el jurado,

Dr. Arvi Rauk, Dr. Arturo Rojo, Dra. Patrizia Calaminici, Dr. Omar Solorza y Dr. Eusebio Juaristi, por la revisión de esta tesis y por sus valiosas aportaciones que me permitieron mejorar por mucho el resultado final.

A la Dra. Annick Goursot y a la Dra. Lílana Quintanar,

por su apoyo, asesoría en el planteamiento de estrategias, en la obtención y discusión de resultados y al facilitar el acceso a recursos e infraestructura de computo. Gracias Dra. Annick y Dra. Tzonka por facilitar mi estancia en Montpellier y por su ayuda con varios de los cálculos que se reportan.

Agradezco también al Dr. Rafael Grande Aztatzi por el por el cálculo de parámetros de EPR que se reportan en este trabajo y al Dr. Jorge Luis Rosas Trigueros por facilitarme el acceso a sus tarjetas gráficas que me hicieron posible llevar a cabo varios cálculos.

A las secretarías del Departamento de Química,

Ma. Teresa Contreras, Gloria León Maturano, Ma. de Lourdes Murillo Escutia y Lorena Sanchez Mendoza, por su apoyo por parte de la coordinación académica y en actividades administrativas.

A los profesores y estudiantes del departamento de Química,
Andreas, Patrizia, Gerald, Rodrigo, Kato, Rafael, Ulises, Jorge Luis, Angel, Trinidad, Víctor, Emilio,
Emilbus, Aurelio, Lidia, Angélica, Aldo, Pilar, Esaú, Daniel, Gabriel, Manuel, Jorge, Atenea, Javier,... por su
amistad, sus conocimientos, por resolver mis dudas, por ayudarme con mis deficiencias y por hacer tan
amena la estancia en el Cinvestav.

A la Dra. Itzia Padilla Martínez y al Dr. José Trujillo Ferrara,
por apoyarme, orientarme e impulsarme en este camino siempre.

A mis amigos, en especial a

Ameyalli, Margarita, Myriam, Nancy, Raúl, Io, Lidia, Angélica, Ana, Gaby, Velina, Miguel, Alicia, José Luis,
José, Jazmín, Alejandro... Me sería imposible mencionar todo lo que me han brindado y que me tendrá
eternamente agradecido. Ustedes son ejemplos, testigos, cómplices, benefactores, etc. de este logro que les
quiero compartir. Gracias por su amistad incondicional.

A mi amada familia, a quienes está dedicada esta tesis,

Mis padres Silvia y Jesús, mi hermano Edgar, mi cuñada Liliana y mi pequeño sobrino Damián, por su
amor, comprensión y apoyo incondicionales que me permitieron aventurarme, transcurrir y cerrar esta
etapa de mi vida. Todo lo que soy se lo debo a mi familia, de quienes jamás dejaré de aprender y disfrutar.
Gracias también a mis abuelitas Luz y Graciela, a mis tíos Gloria, Ruth, Robert, Gilberto, Rosalba y
Francisco, a mis primos Raul, Claudia, Carmela, Tania, Valeria, Alethia y Gilberto, y a mis sobrinos y
nuevos integrantes de la familia.

De todo corazón, gracias
Carlos Zepactonal Gómez Castro

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Química Teórica del departamento de Química del Cinvestav bajo la asesoría del Dr. Alberto Vela Amieva.

Parte del trabajo se realizó también en una estancia de investigación en el Institut Charles Gerhardt de la Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Montpellier en Francia, bajo la asesoría de la Dra. Annick Goursot.

Parte de los resultados obtenidos fueron publicados en el Journal of Physical Chemistry B (vol. 118, No. 34, pág. 10052-10064, año 2014). Además, se tiene en preparación una segunda publicación derivada de esta tesis.

Insights into the Oxygen-Based Ligand of the Low pH Component of the Cu^{2+} -Amyloid- β Complex

Carlos Z. Gomez-Castro,[†] Alberto Vela,^{*,†} Liliana Quintanar,[†] Rafael Grande-Aztatzi,[†] Tzonka Mineva,[‡] and Annick Goursot[‡]

[†]Departamento de Química, Cinvestav, Avenida Instituto Politécnico Nacional 2508, México D.F. 07360, México

[‡]ICGM, UMR 5253 CNRS, Ecole de Chimie de Montpellier, 8 Rue de l'Ecole Normale, 34296 Montpellier, Cédex 5, France

Supporting Information

ABSTRACT: In spite of significant experimental effort dedicated to the study of Cu^{2+} binding to the amyloid beta ($A\beta$) peptide, involved in Alzheimer's disease, the nature of the oxygen-based ligand in the low pH component of the Cu^{2+} - $A\beta(1-16)$ complex is still under debate. This study reports density-functional-theory-based calculations that explore the potential energy surface of Cu^{2+} complexes including N and O ligands at the N-terminus of the $A\beta$ peptide, with a focus on evaluating the role of Asp1 carboxylate in copper coordination. Model conformers including 3, 6, and 17 amino acids have been used to systematically study several aspects of the Cu^{2+} -coordination such as the Asp1 side chain conformation, local peptide backbone geometry, electrostatic and/or hydrogen bond interactions, and number and availability of Cu^{2+} ligands. Our results show that the Asp1 peptide carbonyl binds to Cu^{2+} only if the coordination number is less than four. In contrast, if four ligands are available, the most stable structures include the Asp1 carboxylate in equatorial position instead of the Asp1 carbonyl group. The two lowest energy Cu^{2+} - $A\beta(1-17)$ models involve Asp1 COO^- , the N-terminus, and His6 and His14 as equatorial ligands, with either a carbonyl or a water molecule in the axial position. These models are in good agreement with experimental data reported for component I of the Cu^{2+} - $A\beta(1-16)$ complex, including EXAFS- and X-ray-derived Cu^{2+} -ligand distances, Cu^{2+} EPR parameters, and ^{14}N and ^{13}C superhyperfine couplings. Our results suggest that at low pH, Cu^{2+} - $A\beta$ species with Asp1 carboxylate equatorial coordination coexist with species coordinating the Asp1 carbonyl. Understanding the bonding mechanism in these species is relevant to gain a deeper insight on the molecular processes involving copper-amyloid- β complexes, such as aggregation and redox activity.



Abreviaturas

AD	Enfermedad de Alzheimer
APP	Proteína precursora amiloide
$A\beta$	Proteína beta amiloide
C-ter	Grupo (extremo) carboxilo terminal de una proteína
DFT	Teoría de funcionales de la densidad
DM	Dinámica molecular
EPR	Resonancia paramagnética electrónica
eq	Equivalente
EXAFS	Estructura fina de absorción de rayos-X extendida
GA	Algoritmo genético
GAFF	Campo de fuerza generalizado de Amber
GB	modelo de solvatación implícita Born generalizado
HYSCORE	Correlación de subniveles hiperfinos
IMD	Dinámica molecular interactiva
IR	Infrarrojo
LJ	Lennard-Jones
N-ter	Grupo (extremo) amino terminal de una proteína
NMR	Resonancia magnética nuclear
p. ej.	Por ejemplo
PDB	Base de datos de proteínas
PES	Superficie de energía potencial
PrP	Proteína prion
RMSD	Raíz cuadrada de la desviación cuadrática media
RMSF	Raíz cuadrada de la fluctación cuadrática media
SA	Recocido simulado
TSE	Encefalopatía transmisible espongiforme
VDW	van der Waals
τ	Proteína tau

Notas sobre nomenclatura

En esta tesis se eligió utilizar nomenclatura y abreviaciones cortas. Para hacer referencia al nombre de alguna técnica o concepto por medio de siglas o acrónimos, en la mayoría de los casos, estos se derivaron del idioma inglés, ya que son los términos más comunes en la literatura científica. Por ejemplo, para abreviar la técnica de resonancia magnética nuclear, utilizamos las siglas NMR derivadas de *Nuclear Magnetic Resonance*. En los casos donde se hace referencia a secuencias de aminoácidos, se utilizó el código de nomenclatura de una letra, por ejemplo, la secuencia del pentapéptido HGGGW se refiere a His-Gly-Gly-Gly-Trp en el código de tres letras, donde His = histidina, Gly = glicina y Trp = triptofano. Los símbolos utilizados para referirse a parámetros u objetos matemáticos se escriben con estilo itálico, por ejemplo, la función de distribución radial por pares atómicos se denominó $g(r)$. Las variables matriciales o tensoriales se escriben en estilo negritas, p. ej. \mathbf{A} es el tensor de acoplamiento hiperfino.

Índice de contenido

Resumen.....	i
Abstract.....	ii
Agradecimientos.....	iii
Abreviaturas.....	vi
Notas sobre nomenclatura.....	vi
Capítulo 1. Bases moleculares de la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades neurodegenerativas.....	1
1.1. Introducción.....	1
1.2. La proteína β amiloide.....	2
1.2.1. Función biológica y características de la proteína β amiloide.....	2
1.2.2. Estructura de la proteína β amiloide.....	2
1.2.3. Oligomerización de la proteína β amiloide.....	3
1.2.4. Estructura y función de las fibras de la proteína β amiloide.....	4
1.2.5. Papel de la proteína β amiloide en la enfermedad de Alzheimer.....	5
1.2.6. Terapias farmacológicas.....	5
1.3. La proteína prion.....	6
1.3.1. Funciones fisiológicas de la proteína prion y su participación en enfermedades neurodegenerativas.....	6
1.3.2. Estructura de la proteína prion.....	7
1.3.3. Agregación de la proteína prion.....	8
1.3.4. Coordinación de metales de transición a la proteína prion.....	8
Capítulo 2. Interacción de iones metálicos con las fibras amiloides de la proteína β amiloide (1-42).....	9
2.1. Antecedentes.....	9
2.1.1. Modelos estructurales de fibras amiloides.....	9
2.2. Objetivos.....	10
2.2.1. Objetivo general.....	10
2.2.2. Objetivos particulares.....	10
2.3. Metodología.....	10
2.3.1. Construcción de los modelos de fibras amiloides (modelo I).....	10
2.3.2. Equilibración y simulaciones de dinámica molecular.....	13
2.3.3. Construcción de modelos secundarios (modelos II-V).....	14
2.3.4. Criterios de análisis de la dinámica molecular de los modelos de fibras amiloides.....	15
2.4. Equilibración y estabilidad del modelo I.....	16
2.4.1. Perfiles de energía durante la equilibración.....	16
2.4.2. Cambios estructurales durante la equilibración.....	17
2.5. Simulación de dinámica molecular del modelo I.....	19
2.5.1. Estabilidad del modelo oligomérico.....	19
2.5.2. Estructura helicoidal de la fibra amiloide.....	20
2.5.3. Estructura secundaria de proteínas.....	22
2.5.4. Estructura de los cierres estéricos.....	25
2.5.5. Distribución de los iones en la superficie de la fibra.....	29
2.6. Efecto de los iones y de la interacción con cationes divalentes.....	31
2.6.1. Efecto de los iones en la estructura de las fibras amiloides.....	32
2.6.2. Interacción del ion zinc en la superficie de la fibra amiloide.....	35
2.7. Estructura del modelo de fibra amiloide de longitud infinita.....	36

2.8. Conclusiones.....	39
Capítulo 3. La coordinación del cobre a la proteína β amiloide.....	40
3.1. Antecedentes.....	40
3.1.1. La coordinación del cobre a la proteína β amiloide.....	40
3.1.2. Cálculos de estructura electrónica en complejos M-A β	40
3.2. Objetivos.....	41
3.2.1. Objetivo general.....	41
3.2.2. Objetivos particulares.....	41
3.3. Metodología.....	42
3.3.1. Construcción de modelos del complejo Cu ²⁺ -A β	42
3.3.2. Búsqueda conformacional aplicada a la obtención de distintos modos de coordinación.....	43
3.3.3. Optimización de la esfera de coordinación del cobre.....	47
3.3.4. Análisis conformacional sobre la cadena lateral del Asp1.....	48
3.3.5. Cálculo de parámetros de EPR del cobre y constantes de acoplamiento hiperfinas.....	49
3.4. Estructura y estabilidad de los complejos Cu-A β ₁₇	49
3.4.1. Estructura del péptido A β ₁₇ libre y coordinado a cobre.....	50
3.4.2. Geometrías y modos de coordinación.....	54
3.4.3. Ligantes fuertes o ecuatoriales coordinados al cobre.....	56
3.4.4. Átomos con unión débil y/o en posición axial al cobre.....	60
3.5. La coordinación del Asp1 del péptido A β al cobre.....	62
3.5.1. Isómeros conformacionales de la cadena lateral del Asp1.....	62
3.5.2. Coordinación bidentada de los grupos N-ter y CO del Asp1 al cobre.....	64
3.5.3. Coordinación tridentada de los grupos N-ter, CO y COO ⁻ del Asp1 al cobre.....	65
3.5.4. Participación de las moléculas de agua en la coordinación al cobre.....	66
3.5.5. Participación de los ligantes basados en oxígeno en la coordinación al cobre.....	67
3.6. Papel de la cadena peptídica de la proteína A β en la coordinación con el cobre.....	68
3.6.1. Isómeros conformacionales de los complejos Cu-A β ₃ y Cu-A β ₆	69
3.6.2. Efectos mediados por la segunda capa de coordinación.....	72
3.7. Comparación con las mediciones experimentales.....	74
3.7.1. Distancias metal - ligando derivadas de experimentos de EXAFS y de estructuras cristalográficas.....	74
3.7.2. Parámetros de EPR del cobre.....	75
3.7.3. Constantes de acoplamiento hiperfinas de ¹⁴ N para ligantes del cobre.....	78
3.7.4. Constantes de acoplamiento hiperfinas de ¹³ C para átomos vecinos a los ligantes.....	79
3.7.5. Constantes de acoplamiento hiperfino de ¹⁴ N para la Ala2.....	81
3.7.6. Comparación con otras mediciones experimentales.....	82
3.7.7. Factores metodológicos que afectan la comparación con los experimentos.....	83
3.8. Conclusiones.....	84
Capítulo 4. La coordinación de cobre a la proteína prion.....	87
4.1. Antecedentes.....	87
4.1.1. Modelos para el estudio de la interacción entre el cobre y la proteína prion.....	87
4.2. Objetivos.....	88
4.2.1. Objetivo general.....	88
4.2.2. Objetivos particulares.....	88
4.3. Metodología.....	88
4.3.1. Modelos estructurales.....	88
4.3.2. Optimización de los modelos de complejos cobre-PrP y parametrización para el campo de fuerza CHARMM.....	90

4.3.3. Simulaciones de dinámica molecular.....	94
4.3.4. Búsqueda conformacional del péptido HGGGW.....	94
4.4. Resultados de la parametrización del complejo Cu-PrP.....	94
4.4.1. Parámetros de uniones covalentes.....	95
4.4.2. Parámetros para interacciones no covalentes.....	98
4.4.3. Evaluación de los parámetros obtenidos.....	99
4.5. Análisis conformacional del péptido HGGGW de la proteína prion.....	101
4.5.1. Comparación entre las metodologías aplicadas en la búsqueda conformacional.....	101
4.5.2. Características estructurales de las conformaciones con mayor estabilidad en el péptido HGGGW	105
4.6. Efecto de la coordinación del cobre en la estructura del dominio octarepeat de la proteína prion.....	107
4.6.1. Estructura del dominio octarepeat de la proteína prion en estado libre y saturado de cobre.....	107
4.6.2. Estudio del efecto de la coordinación del cobre a la proteína prion completa.....	110
4.7. Conclusiones.....	110
Conclusiones Generales.....	112
Referencias.....	114
Anexos.....	125
Anexo 1. Creación de estructuras para cálculos de dinámica molecular e implementación de protocolos de simulación.....	125
A1.1. Creación de estructuras con PSFGEN y VMD.....	125
A1.2. Adición de solvente y de iones a la estructura proteica.....	128
A1.3. Calentamiento y enfriamiento del sistema durante los protocolos de equilibración y de recocido simulado (SA).....	128
A1.4. Restricciones de átomos fijos en equilibraciones.....	129
Anexo 2. Parámetros estructurales empleados en el análisis de modelos atomísticos.....	130
A2.1. Mediciones estructurales de geometrías.....	131
A2.2. Parámetros que miden cambios y fluctuaciones estructurales.....	132
A2.3. Parámetros de formación de motivos estructurales repetitivos estabilizados por puentes de hidrógeno (estructura secundaria de proteínas).....	133
A2.4. Histogramas de frecuencias y funciones de distribución radial.....	136
A2.5. Otras propiedades estructurales calculadas.....	137
Anexo 3. Definiciones de topología y parámetros para describir la coordinación del cobre a la proteína prion	138
A3.1. Archivo de topología para los tres sitios de coordinación al Cu de la PrP.....	138
A3.2. Archivo de parámetros para los tres sitios de coordinación al Cu de la PrP.....	140
Anexo 4. Estructuras XYZ de los modelos 1 y 4 de complejos entre el cobre y la proteína β amiloide.....	142

Índice de Figuras

Figura 1.1. Estructura de la proteína A β_{42} . a) Estructura primaria. b) Estructura de NMR en solución de hexafluoroisopropanol/agua (PDB: 1Z0Q). c) Estructura de NMR en estado sólido de fibras amiloides A β_{17-42} (PDB: 2BEG).....	3
Figura 1.2. Estructura de la proteína prion. a) Dominios estructurales de la PrP. b) Estructura tridimensional de la PrP (90-230) (PDB: 2PRP).....	7
Figura 2.1. Estructura inicial del modelo I de fibra amiloide (A β_{42}) ₃₆ . a) Vista en perspectiva. b) Sección transversal mostrando una hebra de cada capa del modelo.....	11
Figura 2.2. Secuencia de construcción de modelos secundarios de fibras amiloides.....	14
Figura 2.3. Perfil de temperatura (a), volumen (b), energías potenciales (c, d) y de energía electrostática y total (e) durante las cinco etapas (i-v) de equilibración del modelo I.....	16
Figura 2.4. Fluctuaciones estructurales del modelo I durante la equilibración. a) RMSD C α de la fibra. b) RMSF para C α 's de la fibra. c) RMSF C α promedio por residuo.....	18
Figura 2.5. RMSD C α para el modelo I de fibra amiloide completa y para el núcleo hidrofóbico (17-42).....	20
Figura 2.6. Estructura helicoidal de la fibra amiloide. a) Estructura del modelo I al inicio y al final de la simulación. b) Ángulo de giro promedio entre hebras y ángulo global con respecto al tiempo.....	21
Figura 2.7. Incidencia de motivos de estructura secundaria de proteínas por residuo para el modelo I. a) Estructura inicial. b) Promedio en 100 ns de DM.....	22
Figura 2.8. Incidencia del motivo estructural hoja β para las hebras de la fibra amiloide. Promedio temporal por residuos para la secuencia A β_{42} (a) y para las regiones 1-9 (b) y 20-30 (c).....	23
Figura 2.9. Estructura de los cierres estéricos del modelo I de fibra amiloide. En color azul se resalta el cierre estérico intercapas y en verde los cierres estéricos intracapa. a) Estructura inicial. b) Estructura después de la equilibración. c) Estructura final después de 100 ns de simulación.....	26
Figura 2.10. Posiciones relativas de los C α 's en los cierres estéricos del modelo I. a) Vista lateral. b) Vista superior. c) Vista transversal. Función g(r) para C α 's en el cierre estérico intercapas (d) e intracapa (e).....	27
Figura 2.11. Número promedio de moléculas de agua por monómero A β_{42} en el interior de los cierres estéricos intracapa del modelo I de fibra amiloide.....	28
Figura 2.12. Estructura final del modelo I después de 100 ns de simulación. Se resaltan el torcimiento de la fibra, los motivos de estructura secundaria, las moléculas de agua en el interior de los cierres estéricos y los iones Na ⁺ en contacto con la fibra amiloide (círculos amarillos).....	29
Figura 2.13. Interacción de los iones en el modelo I. a) Número de átomos de sodio (Na ⁺) a una distancia menor o igual a 3.5 Å de la fibra. b) Número promedio de átomos Na ⁺ por residuo. c) Funciones g(r) entre varios residuos y los iones Na ⁺ . d) Función g(r) entre pares de átomos Na ⁺	30
Figura 2.14. Estructura final de los modelos secundarios de fibra amiloide II (a), III (b), IV (c) y la superposición de las tres estructuras (d).....	32
Figura 2.15. Función de distribución radial entre los extremos N- y C-terminal de cada hebra de los modelos I-V.	34
Figura 2.16. Interacción de los iones con el modelo IV de fibra amiloide. a) Estructura final mostrando iones Na ⁺ en amarillo, Cl ⁻ en naranja y Zn ²⁺ en verde. b) Número de iones en la superficie de la fibra con respecto al tiempo de simulación.....	35
Figura 2.17. Estructura del modelo V de fibra amiloide de longitud infinita. a) Vista perpendicular al eje de la fibra. b) Vista lateral. c) Vista en perspectiva que permite ver el espacio considerado como celda unitaria,	

delimitado por las líneas azules.....	37
Figura 2.18. RMSD $C\alpha$ (a) y ángulo de giro promedio (b) para el modelo V de fibra amiloide.....	38
Figura 3.1. Procedimiento para la obtención de los modelos de los complejos Cu^{2+} - $A\beta_n$, $n = 3, 6$ y 17	42
Figura 3.2. Estructura inicial del péptido $A\beta_{17}$ utilizada en la búsqueda de conformeros del complejo Zn^{2+} - $A\beta_{17}$. En la búsqueda mediante GA los enlaces en color verde tuvieron libre rotación.....	44
Figura 3.3. Búsqueda conformacional mediante recocido simulado (SA). a) Etapas que conforman cada ciclo de SA. b) Gráfica de temperatura contra el tiempo (t) para una corrida de 5 ciclos de SA sobre el complejo Zn^{2+} - $A\beta_{17}$. c) Gráfica de la energía total relativa contra el tiempo para la misma corrida.....	46
Figura 3.4. a) Nomenclatura para los átomos de los residuos aspartato e histidina. b) Conformaciones anti y gauche de la cadena lateral del Asp1.....	48
Figura 3.5. Ejemplos de distintos plegamientos y macrociclos formados en los complejos Cu^{2+} - $A\beta_{17}(H_2O)_2$. En el panel de la izquierda se muestran alineadas por el extremo C-terminal (en rojo) las estructuras de los modelos mostrados en los paneles centrales y de la derecha.....	52
Figura 3.6. Estructura optimizada del complejo Cu^{2+} - $A\beta_{17}(H_2O)_2$, modelo 3.....	54
Figura 3.7. Estructura superpuesta de los modelos 1 y 4. a) Residuos coordinados al Cu^{2+} . b) Detalle de la estructura alrededor del centro metálico.....	57
Figura 3.8. Energía relativa y estructura del centro metálico para los conformeros de los complejos Cu^{2+} - $A\beta_{17}(H_2O)_2$	65
Figura 3.9. Energía relativa y estructura del centro metálico para los conformeros de los complejos Cu^{2+} - $A\beta_n(H_2O)_2$, $n = 3$ (a), 6 (b).....	70
Figura 3.10. Optimización geométrica de los modelos Cu^{2+} - $A\beta_6(H_2O)_2$ G2' (a) y G2 (b).....	72
Figura 3.11. Modo de coordinación propuesto como predominante en los complejos Cu^{2+} - $A\beta_{17}$ a valores bajos de pH (componente I).....	80
Figura 3.12. Especies con distintos modos de coordinación en el complejo Cu^{2+} - $A\beta_{17}$ a pH bajo que son congruentes con los experimentos de HYSCORE.....	81
Figura 4.1. Secuencia de la proteína Prion humana (hPrP). Alineadas debajo de la secuencia hPrP, se encuentran las secuencias de estructuras experimentales. Se indican los fragmentos construidos y las mutaciones consideradas en color rojo.....	89
Figura 4.2. Procedimiento general que muestra los diferentes modelos utilizados para ensamblar el modelo completo de la proteína prion humana (hPrP ₂₃₋₂₃₀).....	90
Figura 4.3. Estructuras de los modelos de complejos Cu^{2+} -PrP utilizados en la parametrización de los diferentes sitios de unión a cobre.....	91
Figura 4.4. Ejemplo de ajuste por mínimos cuadrados de la PES, restringiendo un enlace.....	91
Figura 4.5. Relación entre las cargas de CHARMM y las de Merz-Singh-Kollman (MK).....	93
Figura 4.6. Estructuras de mínima energía de los modelos utilizados como referencia para la obtención de parámetros de campo de fuerzas CHARMM.....	95
Figura 4.7. Comparación de los ajustes de las curvas de energía potencial correspondientes a los enlaces Cu^{2+} -L para el sitio 1 de coordinación al cobre en la PrP (sitio octarepeat).....	97
Figura 4.8. Simulación de prueba del complejo Cu^{2+} -HGG utilizando los parámetros calculados. a) RMSD respecto al tiempo. b) Estructuras a lo largo de la simulación superpuestas. En verde se muestra la estructura de referencia.....	100
Figura 4.9. Histograma de frecuencias de la energía relativa para los cuatro conjuntos de conformeros del pentapéptido HGGGW. a) Dreiding/Vacío. b) GAFF/Vacío. c) Dreiding/GB. d) GAFF/GB.....	102
Figura 4.10. Gráficas de Ramachandran para la Gly3 del péptido HGGGW considerando los cuatro conjuntos de	

confórmeros: a) Dreiding/Vacío b) GAFF/Vacío c) Dreiding/GB y d) GAFF/GB.....	104
Figura 4.11. Distribución de las propiedades estructurales del conjunto GAFF/GB de confórmeros del péptido HGGGW. a) Gráfica de los ángulos diedros entre los C α 's (1-4 vs 1-5). b) y c) Histogramas de frecuencias normalizados para los ángulos diedros. d) Distancias entre los C α 's de la His1 y el Trp5, e) radios de giro y f) áreas superficiales accesible al disolvente con respecto a la energía.....	106
Figura 4.12. Estructuras iniciales del dominio octarepeat libre (a) y en estado de alta ocupación del Cu $^{2+}$ (b). Las histidinas resaltadas (61, 69, 77 y 85) indican los sitios donde se coordinan los átomos de cobre.....	108
Figura 4.13. Evolución temporal de la estructura secundaria de la proteínas PrP $_{61-89}$, (a) y de dos simulaciones de DM del modelo (Cu $^{2+}$) $_4$ -PrP $_{61-89}$, (b y c). También se muestran sus respectivas estructuras finales (d, e y f). 108	
Figura 4.14. Interacción entre los cuatro sitios de unión al Cu $^{2+}$ en el fragmento octarepeat de la proteína prion. a) Distancias entre los centros metálicos respecto al tiempo. b) Una de las estructuras iniciales "extendidas". c) Estructura final que resalta la interacción de los diferentes tipos de anillos en el péptido.....	109
Figura 4.15. Estructura del modelo de PrP $_{23-230}$ libre y saturado de cobre después de 50 ns de simulación de DM.	110

Índice de Tablas

Tabla 2.1. Características de los modelos de fibras amiloides construidos.....	14
Tabla 2.2. Propiedades estructurales promedio de los modelos de fibras amiloides.....	33
Tabla 3.1. Energías relativas y mediciones estructurales de los complejos $\text{Cu}^{2+}\text{-A}\beta_{17}(\text{H}_2\text{O})_2$	51
Tabla 3.2. Características principales de la esfera de coordinación de los complejos $\text{Cu}^{2+}\text{-A}\beta_{17}(\text{H}_2\text{O})_2$	55
Tabla 3.3. Distancias (Å) al Cu^{2+} de los ligantes presentes en los complejos $\text{Cu}^{2+}\text{-A}\beta_{17}(\text{H}_2\text{O})_2$	61
Tabla 3.4. Energías relativas, ligantes involucrados y geometrías de los isómeros conformacionales de Asp1 en complejos $\text{Cu}^{2+}\text{-}\beta_{17}(\text{H}_2\text{O})_2$	63
Tabla 3.5. Energías relativas, ligantes involucrados y geometrías de los isómeros conformacionales de Asp1 en los complejos $\text{Cu}^{2+}\text{-A}\beta_3(\text{H}_2\text{O})_2$	69
Tabla 3.6. Energías relativas, ligantes involucrados y geometrías de los isómeros conformacionales de Asp1 en los complejos $\text{Cu}^{2+}\text{-A}\beta_6(\text{H}_2\text{O})_2$	69
Tabla 3.7. Parámetros de EPR calculados para los complejos $\text{Cu}^{2+}\text{-A}\beta_n(\text{H}_2\text{O})_2$, $n = 3, 6, 17$	76
Tabla 3.8. Constantes de acoplamiento hiperfinas calculadas para los complejos $\text{Cu}^{2+}\text{-A}\beta_n(\text{H}_2\text{O})_2$, $n = 3, 6, 17$..	78
Tabla 4.1. Parámetros de enlace seleccionados para los modelos $\text{Cu}^{2+}\text{-HGG}$ (Sitio 1), $\text{Cu}^{2+}\text{-GGTH}$ (Sitio 2) y $\text{Cu}^{2+}\text{-NMKH}$ (Sitio 3).....	96
Tabla 4.2. Cargas atómicas en el centro metálico del sitio 1 de coordinación al cobre ($\text{Cu}^{2+}\text{-HGG}$).....	98
Tabla 4.3. Parámetros de enlace seleccionados para la glicina y la alanina calculados en el presente trabajo y de los campos de fuerza CHARMM y Amber.....	99
Tabla 4.4. Coeficientes de correlación entre los parámetros de constantes de fuerza de enlaces (k_r) y distancias de equilibrio (r_0) obtenidos por diferentes metodologías.....	100
Tabla 4.5. Parámetros estructurales promedio para los cuatro conjuntos de conformeros del pentapéptido HGGGW	103
Tabla 4.6. Promedio de parámetros geométricos por intervalo de energías para el conjunto GAFF/GB de conformeros del péptido HGGGW.....	105

Capítulo 1. Bases moleculares de la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades neurodegenerativas

1.1. Introducción

Diversas enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (AD), la enfermedad de Parkinson y las encefalopatías espongiformes, son consideradas por la Organización Mundial de la Salud como un problema de salud prioritario debido al incremento en años recientes de su incidencia a nivel mundial. Las graves repercusiones a nivel de paciente, familia y sociedad que estos padecimientos originan son un foco de atención desde el punto de vista macroeconómico. Actualmente se estima que, a nivel mundial, alrededor de 35.6 millones de personas viven con demencia como consecuencia de diversas enfermedades neurodegenerativas, y se espera que este número se duplique para el año 2030 y se triplique antes del año 2050.¹

La AD es actualmente la causa más común de demencia con más de 20 millones de casos a nivel mundial.² Descrita por primera vez en 1907 por Alois Alzheimer,³ se trata de una enfermedad cerebral de naturaleza crónica y progresiva que afecta la memoria, el pensamiento, el comportamiento y la capacidad para llevar a cabo tareas cotidianas.^{1,2} En etapas avanzadas, la enfermedad resulta deshabilitante para quien la padece y, en última instancia, fatal. Esto tiene importantes repercusiones a nivel físico, psicológico y económico tanto para las personas que brindan cuidados al paciente con AD como para los familiares. El impacto social y económico también es importante, ya que se estima que el costo anual a nivel mundial debido a la demencia es de \$604,000 millones de dólares.¹

A pesar de la intensa investigación a nivel mundial, aún no se comprenden del todo los mecanismos que dan origen a la AD. No obstante, en las últimas décadas se han logrado identificar diversos componentes fisiológicos que juegan un papel clave en la patogénesis de la enfermedad. Tal es el caso de la proteína β amiloide ($A\beta$), la proteína tau (τ) y la proteína prión (PrP), las cuales son actualmente reconocidas como factores determinantes en la neurodegeneración.⁴ Así mismo, se reconoce que algunos biometales como el cobre o el zinc también juegan un papel importante en estas enfermedades.^{5,6} Otros factores que se encuentran involucrados son la agregación de proteínas mal plegadas y su interacción con metales de transición.⁷ Varias proteínas involucradas en enfermedades neurodegenerativas tienen la característica en común de coordinar metales de transición y de ser de naturaleza intrínsecamente desordenada, esto implica que, en condiciones celulares normales, no adoptan una estructura tridimensional definida (estructura nativa), sino que muestran estructuras dinámicas, desordenadas y aleatorias probablemente con múltiples estados metaestables.⁸

1.2. La proteína β amiloide

1.2.1. Función biológica y características de la proteína β amiloide

El análisis histopatológico del cerebro de pacientes con AD³ reveló la existencia de depósitos proteicos filamentosos anormales de dos tipos, las placas neuríticas extracelulares (o placas amiloides) y los agregados neurofibrilares intracelulares, los cuales se consideran como marcadores neuropatológicos de la enfermedad.² La $A\beta$ es el principal componente de las placas amiloides, mientras que la proteína τ lo es para los agregados neurofibrilares. Posteriormente se postuló la hipótesis de que tales depósitos podrían iniciar una cascada de eventos que desencadenarían en la muerte neuronal y eventualmente causarían la AD.⁹ Sin embargo, la hipótesis más aceptada en la actualidad sugiere que alteraciones en la producción y/o procesamiento de la proteína $A\beta$ llevarían a la formación de formas oligoméricas solubles, las cuales estarían actuando como los principales agentes neurotóxicos.^{4,10} Además, es evidente que existe una relación entre la $A\beta$ y otras proteínas con mecanismos fisiopatológicos entrecruzados,¹¹ tal es el caso de la PrP.^{4,10} Otras características observadas en la AD es un incremento en el estrés oxidativo¹² y la alteración en la homeostasis de biometales,^{5-7,13} además de una serie de alteraciones en la fisiología celular de las neuronas con múltiples vías bioquímicas involucradas, dando lugar a varias posibilidades terapéuticas potenciales.^{11,14} Un evento central en la patogénesis de la AD es la alteración del procesamiento de la proteína precursora amiloide (APP, por sus siglas en inglés), cuyos productos proteolíticos, incluida la proteína $A\beta$, juegan un papel clave en la neurodegeneración.^{9,11}

La $A\beta$ es un péptido de 4 kDa de 37 a 42 aminoácidos de longitud, el cual se encuentra de manera natural en el cerebro y muestra una alta propensión a agregarse.¹⁵ Las formas más comunes de la proteína son la $A\beta_{40}$ y la $A\beta_{42}$, las cuales se derivan de la APP por acción proteolítica de las β y γ secretasas.⁹ La $A\beta$ es una proteína de naturaleza anfipática, ya que en su estructura primaria se encuentra un dominio hidrofílico (rico en residuos polares) en el extremo N-terminal (residuos 1-16), mientras que el extremo C-terminal (a partir del residuo 17) predominan los residuos no polares formando un dominio hidrofóbico (Figura 1.1 a).¹⁵ Estas características proveen a la proteína de una alta flexibilidad estructural, la cual es sensible a factores como concentración, pH, interacción con iones metálicos y con membranas. Esta flexibilidad además da origen a diferentes estados de "asociación" de la $A\beta$, ya que puede encontrarse como monómeros en solución acuosa o en medios no polares,¹⁶⁻¹⁸ como oligómeros solubles^{10,19} o incrustados en membranas^{20,21} o como fibras amiloides insolubles.¹⁹

1.2.2. Estructura de la proteína β amiloide

La $A\beta$ es una proteína intrínsecamente desordenada ya que no posee una estructura nativa definida en condiciones fisiológicas normales. Los estudios de resonancia magnética nuclear (NMR, por sus siglas en inglés) y de dinámica molecular revelan que el dominio N-terminal es soluble y no presenta estructura definida en medio acuoso, mientras que, en membranas lipídicas, parte de la proteína adopta estructura tipo α . El dominio

hidrofóbico contiene dos regiones con estructura de hélice α entre los residuos 15-23 y 32-35 las cuales se encuentran conectadas mediante una región de "bisagra" entre los residuos 24 a 31.^{17,18,22,23} Este dominio probablemente es afín por micelas o membranas lipídicas (Figura 1.1 b).¹⁷

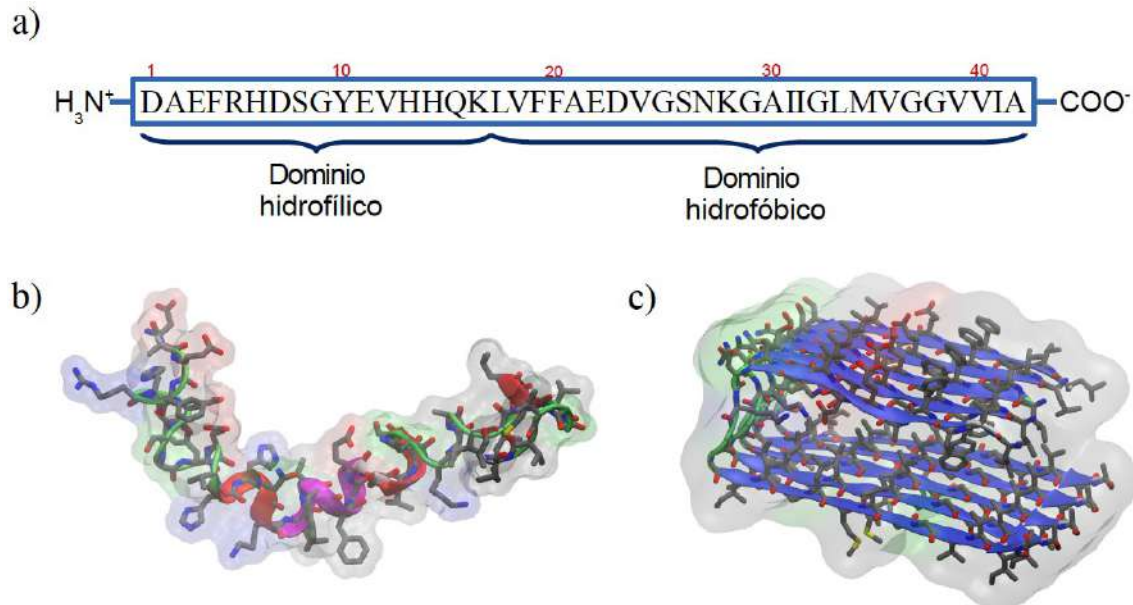


Figura 1.1. Estructura de la proteína $A\beta_{42}$. a) Estructura primaria. b) Estructura de NMR en solución de hexafluoroisopropanol/agua (PDB: 1Z0Q). c) Estructura de NMR en estado sólido de fibras amiloides $A\beta_{17-42}$ (PDB: 2BEG).

1.2.3. Oligomerización de la proteína β amiloide

Además de su forma monomérica soluble, la proteína $A\beta$ se puede observar en formas oligoméricas solubles o como parte de las fibras amiloides insolubles; la primera en condiciones fisiológicas normales, mientras que las dos últimas formas se encuentran en ciertos estados patológicos del cerebro. En su forma oligomérica se consideran agregados que pueden incluir dos, tres o hasta cientos de moléculas de $A\beta$. Dependiendo del orden del oligómero (dímeros, trímeros, tetrámeros, etc...) se afecta la estructura (y posiblemente la función) del agregado, ya que este orden incrementa la presencia de estructuras secundarias β .¹⁰ Mediante microscopía, los oligómeros de $A\beta$ se pueden observar como estructuras pseudo esféricas con diámetros predominantes de ~ 11 nm.²⁴ Los oligómeros también se pueden encontrar en forma de anillos formando poros en las membranas celulares.^{19-21,25-27}

El proceso de agregación proteica para formar oligómeros a partir de monómeros de $A\beta$ implica cambios conformacionales importantes, así como transiciones de estructura aleatoria a β o bien de estructura α a β .²² Estas transiciones se han relacionado con la toxicidad de la especie oligomérica.^{28,29} La estabilización de los agregados depende principalmente de las numerosas interacciones hidrofóbicas entre los monómeros así como de interacciones polares muy específicas, como por ejemplo, el puente salino intermonómero formado entre

Asp23 y Lys28, interacción clave para el proceso de agregación.³⁰⁻³² Una característica de las formas oligoméricas de la A β es que forman hojas β antiparalelas, a diferencia de las fibras amiloides que muestran hojas β paralelas.¹⁹

1.2.4. Estructura y función de las fibras de la proteína β amiloide

Debido a la naturaleza filamentosa, insoluble y no cristalina de las fibras amiloides resulta difícil conocer con detalle atómico su estructura; sin embargo, a través de estudios de resonancia magnética nuclear (NMR) en estado sólido, difracción de rayos X y de microscopía, entre otras técnicas, se han reconocido muchas características importantes.^{19,33-41} Las fibras de tipo amiloide formadas por la A β y por otras proteínas con secuencias de aminoácidos no relacionadas tienen un núcleo estructural en común, como lo revelan los patrones de difracción observados en diferentes tipos de fibras,^{39,40} el cual se conoce como el motivo estructural β cruzado (*cross- β*).^{19,42} Este motivo consiste en hojas β formadas a lo largo de la fibra del eje de crecimiento de la fibra, con sus hebras (cadenas peptídicas) orientados perpendicularmente con respecto al eje más largo de la fibra y, por lo tanto, orientando los puentes de hidrógenos entre las hebras de manera aproximadamente paralela al mismo eje (Figura 1.1 c). Las fibras amiloides suelen estar torcidas formando macroestructuras helicoidales.^{19,33,40,43} Además, las hojas β formadas en estos agregados suelen formar estructuras conocidas como "cierres estéricos" (*steric zippers*) que consisten en interfaces "secas" entre un par de hojas β acomodadas cara a cara en donde las cadenas laterales de cada una se encuentran "interdigitadas" entre sí con alta complementariedad estructural.⁴³⁻⁴⁵ Los cierres estéricos forman el núcleo hidrofóbico de las fibras amiloides derivadas de la A β o de otras proteínas sin relación entre sus secuencias de aminoácidos.⁴⁵

Para las fibras amiloides formadas a partir de la A β , cada hebra se encuentra alineada a lo largo del eje de crecimiento de la fibra y forma parte de dos hojas β , una de ellas abarcando los residuos 10 a 22 y la otra del 30 al 40; aunque esta asignación puede variar dependiendo de las técnicas y condiciones experimentales utilizadas en su elucidación.¹⁹ Entre las dos hojas β se encuentra una región de bisagra en conformación de *giro* (*turn*), que permite a ambas hojas β acomodarse una frente a la otra y entrar en contacto formando un cierre estérico en un motivo estructural "hoja β -*giro*-hoja β " con forma de "U" (Figura 1.1 c).³⁶ El dominio N-terminal de la proteína A β no presenta una estructura secundaria definida y, aunque se ha propuesto que puede jugar un papel estructural en la unión y organización entre filamentos amiloides, no forma parte del núcleo hidrofóbico de las fibras.⁴⁶

El arreglo descrito representa una unidad estructural que se conoce como "protofibra", la cual suele asociarse lateralmente con otra u otras protofibras para formar fibras "maduras".^{19,35} Dependiendo del número de protofibras que formen una fibra y de la forma en que interaccionan entre sí es común observar muy diversas morfologías de las fibras amiloides resultantes, de tal manera que en una misma muestra pueden observarse

fibras de distintos grosores, curvaturas y grado de torcimiento.⁴⁷ El número de protofibras en una fibra determinada suele variar desde 1 hasta 5, y se ha propuesto que cada protofibra puede estar formada por dos o tres capas de moléculas de $A\beta$, cuyos distintos arreglos también darían lugar a diversos polimorfismos.³⁵ Estas capas se arreglan de manera pseudosimétrica de tal forma que la protofibra tendría un eje de rotación C_2 paralelo al eje de crecimiento de la fibra.¹⁹ Las topologías observadas en el microscopio revelan estructuras filamentosas alargadas, alcanzando longitudes desde varios micrómetros hasta arriba de un milímetro, con ancho de 6-10 nm pero que pueden ensancharse hasta 23 nm. Las distancias de entrecruzado de la estructura helicoidal se encuentran desde 25 hasta 300 nm.^{19,24,34,47}

1.2.5. Papel de la proteína β amiloide en la enfermedad de Alzheimer

Las funciones fisiológicas de la $A\beta$ así como el papel que juegan en la AD aún están siendo investigadas. En la actualidad se cree que origina la patología a través de procesos como la acumulación y formación de depósitos fibrilares entre las células nerviosas,^{9,48} la formación de agregados anulares de $A\beta$ en las membranas celulares,^{19,27} la interacción de la $A\beta$ o sus agregados con metales de transición,^{5-7,49} entre otros.^{11,14} Otras proteínas intrínsecamente desordenadas, como la PrP, la α sinucleína y la τ , tienden a formar agregados de tipo amiloide y también son capaces de interactuar con metales de transición, por lo que se considera que estos procesos son de importancia en diversas enfermedades neurodegenerativas, como por ejemplo en la enfermedad de Huntington, la diabetes tipo 2, las encefalopatías espongiiformes, etc.⁶⁻⁸

De acuerdo con la hipótesis amiloide,⁹ el incremento en la producción o la deficiente depuración y consecuente acumulación de la $A\beta$ en el cerebro llevaría primero a la formación de oligómeros, después a la formación de protofibras y, finalmente, a la formación de fibras amiloides. Esto marcaría el inicio de una serie de cambios perjudiciales que llevarían a la muerte neuronal y eventualmente causaría la AD. Por otra parte, la hipótesis de metales en la AD establece que la interacción de la $A\beta$ con biometales como cobre, zinc o hierro, es determinante para producir los efectos neurotóxicos de la $A\beta$.⁴⁹ Esta interacción posiblemente afecta la estructura del péptido y sus características de agregación, además produciría estrés oxidativo por la posible formación de especies reactivas de oxígeno o alterando rutas de señalización o la actividad de otras proteínas.⁵ Otro de los mecanismos propuestos sugieren que los efectos neurotóxicos de los oligómeros $A\beta$ solubles son mediados por la proteína PrP, que estaría actuando como un receptor de alta afinidad para dichos oligómeros.⁵⁰ Estos y otros mecanismos propuestos sugieren múltiples rutas neuropatológicas en la enfermedad de Alzheimer.¹¹ Parte de la motivación del presente trabajo es entender a un nivel molecular las funciones de la $A\beta$ con base en sus propiedades estructurales y relacionarlas con los procesos fisiopatológicos con que se encuentran involucrados.

1.2.6. Terapias farmacológicas

A pesar de que no se comprenden las causas de la AD y no se conoce una cura, existen múltiples blancos farmacológicos que prometen utilidad terapéutica. Entre los principales agentes propuestos se encuentran los

inhibidores de la acetilcolinesterasa, inhibidores de la agregación proteica, antioxidantes y agentes que modifican el procesamiento de la proteína precursora amiloide (inhibidores de la β y γ secretasas).¹¹ De estos, los inhibidores de la acetilcolinesterasa representan una primera generación de fármacos en el mercado dedicados al tratamiento de los síntomas de la enfermedad.¹⁴ Las nuevas terapias aún tienen un camino por recorrer en estudios clínicos, sin embargo, la comprensión de los mecanismos moleculares implicados en la enfermedad permitirán el diseño de estrategias más efectivas.

1.3. La proteína prion

La PrP es un agente patógeno infeccioso sin precedentes que causa un grupo de enfermedades neurodegenerativas fatales mediadas por un mecanismo novedoso.⁵¹ Aunque se desconoce el papel que la proteína juega en condiciones normales, se ha reconocido como un componente indispensable en el inicio de las encefalopatías transmisibles espongiformes (TSE).⁵² Como ocurre en el caso de otras proteínas relacionadas con enfermedades neurodegenerativas, se han tratado de entender dos procesos moleculares llevados a cabo por la PrP como son la coordinación a diversos biometales y sus procesos de agregación proteica o fibrilización. Esta última característica hace difícil su estudio y caracterización ya que la baja solubilidad de las especies fibrilares limita considerablemente el uso de diversas técnicas espectroscópicas. No obstante, la relevancia de esta proteína en las TSEs ha generado mucho interés e intensa investigación en la comunidad científica, en especial las implicaciones de la formación de complejos con metales de transición.

1.3.1. Funciones fisiológicas de la proteína prion y su participación en enfermedades neurodegenerativas

La proteína prion se relaciona con una serie de procesos celulares, entre los que encontramos: adherencia celular, formación y regulación de contactos sinápticos, actividad antiapoptótica, transducción de señales transmembranales, prevención del estrés celular, metabolismo del Cu^{2+} , encefalopatías espongiformes y proliferación y metástasis en diferentes tipos de cáncer.⁵³⁻⁵⁶ Dada la capacidad de la PrP para coordinar cobre,⁵⁷ se supone un papel en el tráfico de este metal al interior de la célula, implicando también la regulación de sus niveles en la sinapsis.⁵⁸

Por otra parte, la PrP se identifica como el agente patogénico clave en las TSEs, (también conocidas como enfermedades priónicas), entre las que se encuentran la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, la enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Sheinker, kuru, insomnio fatal, entre otras.^{51,59} A pesar de que estos padecimientos pueden ser esporádicos, genéticos o infecciosos, el carácter transmisible en varios casos fue motivo de confusión, ya que el agente infeccioso no es un microorganismo o un virus en donde se implica la transmisión del material genético de dicho agente. En lugar de esto se descubrió que el agente infeccioso es una proteína, la cual se denominó como prion. El estado patológico surge como resultado de un cambio conformacional y un proceso de agregación hacia una forma de la proteína conocida como *scrapie* (PrP^{Sc}) que resulta neurotóxica y es capaz de

inducir a otras moléculas de PrP en su forma nativa o "celular" (PrP^C) hacia la forma *scrapie*.⁶⁰ Los mecanismos fisiopatológicos mediados por la PrP^{Sc} que dan origen a la neurodegeneración y a las TSEs aún no se entienden completamente. Muchos de los efectos tóxicos podrían relacionarse con la pérdida de la función de la forma PrP^C al transformarse a PrP^{Sc}; sin embargo, también se sugiere la interconexión de los mecanismos fisiopatológicos de las TSEs con otras enfermedades neurodegenerativas no originadas por la PrP, como es el caso de la enfermedad de Alzheimer.^{4,10,50}

1.3.2. Estructura de la proteína prion

La prion es una proteína anclada a la membrana mediante un enlace glicosilfosfatidilinositol (GPI) en el extremo C-terminal. La proteína madura es glicosilada y consiste en una secuencia de alrededor de 208 aminoácidos, la cual se puede dividir en dos dominios, como se muestra en la Figura 1.2 a). El dominio no estructurado se ubica en el extremo N-terminal abarcando las posiciones 23-128. El extremo C-terminal (residuos 129-230) corresponde al dominio estructurado de la proteína en el que se encuentran tres hélices α (posiciones 144-156, 172-194 y 200-225) y dos hebras β que forman una hoja β corta (posiciones 129-131 y 161-163).

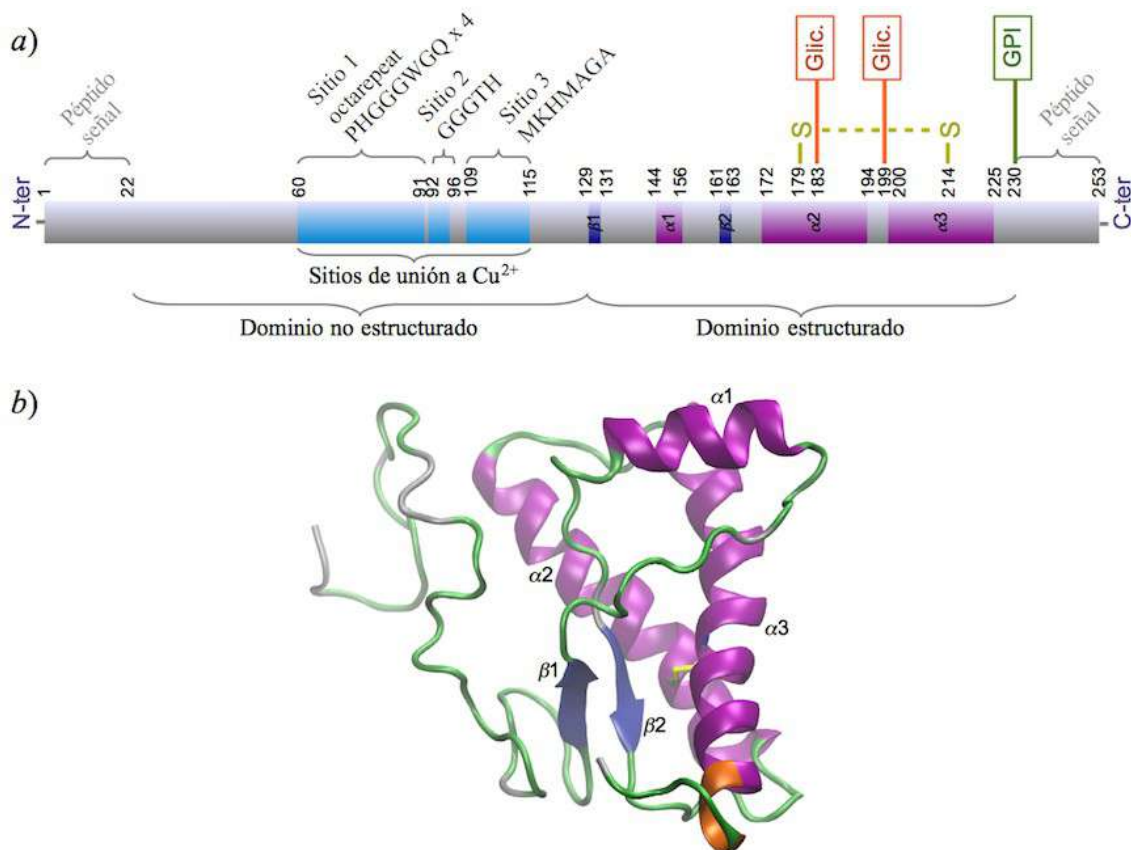


Figura 1.2. Estructura de la proteína prion. a) Dominios estructurales de la PrP. b) Estructura tridimensional de la PrP (90-230) (PDB: 2PRP).

Esta estructura secundaria se conserva en varias estructuras de la PrP derivadas a partir de diferentes especies en estudios de NMR y de difracción de rayos X disponibles en el Protein Data Bank (PDB), (Figura 1.2 b).⁶¹⁻⁶⁵ La

segunda y tercera hélice α se encuentran conectadas lateralmente mediante un puente disulfuro entre los residuos de cisteína en posiciones 179 y 214. A diferencia de la PrP^C en la que la estructura secundaria mayoritaria es de tipo α , la forma *scrapie* PrP^{Sc} muestra una conformación en la que predomina la estructura β .⁶⁶

1.3.3. Agregación de la proteína prion

El agente infeccioso en las enfermedades priónicas, la PrP^{Sc}, puede funcionar como un molde estructural y propagar sus características conformacionales hacia otras moléculas PrP^C no patogénicas. Esto implica la unión de la PrP^{Sc} con la PrP^C, o con un intermediario metaestable (PrP*), para llevar la PrP^C a la forma *scrapie*.⁶⁷ Esta conversión probablemente está relacionado a la formación de depósitos o fibras de tipo amiloide de la PrP^{Sc}, la cual es una característica neuropatológica observada en el cerebro de los pacientes con TSEs, que además generalmente se observan rodeados por lesiones neurodegenerativas espongiiformes.⁵⁹ Al igual como ocurre con otras enfermedades neurodegenerativas, la participación de una proteína que sufre un cambio conformacional de su estado nativo para formar agregados fibrilares de tipo amiloide marca un mecanismo molecular, que si bien no está claro como produce la neurodegeneración, es una característica de este tipo de padecimientos, cuya comprensión puede llevar a generar estrategias para curar, diagnosticar o prevenir la enfermedad.

1.3.4. Coordinación de metales de transición a la proteína prion

La capacidad de la proteína prion para coordinar Cu²⁺ ha sido extensamente estudiada,⁶⁸⁻⁷¹ por lo que se conoce su alta afinidad y especificidad en comparación con otros biometales divalentes.^{68,72-74} Sin embargo, la afinidad por cobre de la PrP es menor en comparación con otras metaloproteínas.⁷⁵ La PrP es capaz de coordinar hasta seis átomos de Cu²⁺ en el dominio N-terminal (ver Figura 1.2 a), mostrando una variedad de modos de coordinación dependiendo de la proporción PrP:Cu²⁺ y del pH.^{76,77} El dominio *octarepeat* de la PrP se encuentra formado por cuatro repeticiones de la secuencia PHGGGWGQ, entre las posiciones 60-91. Cada una de las cuatro repeticiones es capaz de coordinar un ion Cu²⁺ cuando hay un exceso del metal respecto a la concentración de la proteína; en cambio, cuando la proporción Cu²⁺:PrP es baja, varias repeticiones de la secuencia PHGGGWGQ a lo largo del dominio *octarepeat* pueden participar en la coordinación de un átomo de Cu²⁺ mediante los residuos de histidina (posiciones 61, 69, 77 y 84).⁷⁷ Estos modos de coordinación o componentes también se los conoce como modos de alta o baja ocupación de cobre. Además del dominio *octarepeat*, se han observado otros dos sitios de coordinación en el dominio no estructurado de la PrP (Figura 1.2 a), los cuales involucran a la His96 y a la His111.⁷¹ Uno de los objetivos del presente trabajo es estudiar la evolución en el tiempo de la estructura del estado de alta ocupación de cobre para lograr una mejor comprensión de la coordinación del cobre a la PrP y sus implicaciones en la formación de estructuras patogénicas observadas en las TSEs.

Capítulo 2. Interacción de iones metálicos con las fibras amiloides de la proteína β amiloide (1-42)

2.1. Antecedentes

Como se explicó en el capítulo anterior, una de las características en común de varias proteínas relacionadas a diferentes enfermedades neurodegenerativas es la agregación proteica que resulta en la formación de especies oligoméricas o fibrilares. En el caso de la $A\beta$, existe mucha información reportada en la literatura relacionada a la estructura que esta proteína adopta cuando forma parte de las fibras amiloides presentes en la AD. En este capítulo se consideró esta información para generar un modelo atomístico que permitiera estudiar la estructura de las fibras amiloides formadas por la proteína $A\beta_{42}$, así como las consecuencias de su interacción con iones metálicos mediante simulaciones de dinámica molecular (DM).

2.1.1. Modelos estructurales de fibras amiloides

La estructura molecular de las fibras amiloides aún no está completamente elucidada debido a su naturaleza insoluble y no cristalina; sin embargo, a través de una amplia variedad de métodos se conocen muchas de sus características. Gran parte de esta información se ha incorporado como "restricciones" en los protocolos de refinamiento estructural que han permitido proponer diversos modelos moleculares de las fibras amiloides.^{19,36,37,78,79} El núcleo hidrofóbico de las fibras ha sido descrito a través de modelos estructurales depositados en el *Protein Data Bank* (PDB),⁸⁰ como es el caso de la estructura 2BEG.³⁶ Éste modelo fue propuesto a partir de experimentos de NMR en estado sólido realizados en fibras amiloides derivados de la proteína $A\beta_{42}$, y cumple con muchas de las características estructurales reconocidas para las fibras amiloides. El modelo 2BEG del PDB (Figura 1.1 c, página 3) incluye 10 estructuras, cada una de las cuales contiene 5 moléculas o monómeros del fragmento 17-42 de la proteína β amiloide, $(A\beta_{17-42})_5$. Cada cadena también se denomina como "hebra", etiquetadas en este modelo con las letras A-E. La porción N-terminal restante de cada hebra (residuos 1-16) se reportó como fluctuante o en estructura aleatoria (*random coil*), por lo que no se resolvió en el experimento y no está incluida en el modelo 2BEG. Los cinco monómeros se encuentran alineados a lo largo del eje de la fibra, que es la dirección en la que crecen estos agregados, cada uno mostrando un plegamiento y estructuras secundarias similares. Los motivos de estructura secundaria asignados son dos hojas β entre los residuos 18-26 y 31-41, y una región de "bisagra" entre estas dos permitiendo un plegamiento de cada hebra en forma de "U". De esta manera, las dos hojas β se apilan una sobre la otra con sus cadenas laterales interactuando estrechamente para formar un cierre estérico.³⁶ Estas características son congruentes con el motivo β cruzado generalmente reconocido en las fibras amiloides.^{19,42} De la misma manera, los cierres estéricos presentes en esta estructura son característicos en las fibras amiloides formadas por diversos péptidos.⁴³⁻⁴⁵

La estructura descrita en el párrafo anterior provee una descripción de las interacciones inter- e intramoleculares que estabilizan el núcleo hidrofóbico de las fibras amiloides. Sin embargo, se ha reportado que cada filamento amiloide estaría formado por dos capas de moléculas $A\beta$, cada una cumpliendo con el motivo β cruzado para formar un arreglo supramolecular con una pseudosimetría C_{2z} .¹⁹ A partir de estas observaciones, con base en experimentos de NMR en estado sólido, se determinaron interacciones específicas entre los residuos Gly33 y Met35 provenientes de diferentes capas de moléculas $A\beta$, las cuales proveen información de la estructura cuaternaria de las fibras amiloides y permitieron generar nuevos modelos.³⁷ Estos modelos ponen en contacto dos hojas β de diferentes capas, idénticas en secuencia, pero orientadas en direcciones opuestas que generan un segundo tipo de cierre estérico que estabilizaría la unión entre las dos capas. De esta manera, el núcleo hidrofóbico de las fibras estaría formado por dos capas de moléculas $A\beta$, cada una generando un par de hojas β , las cuales se apilan para formar tres cierres estéricos entre las cuatro hojas β .³⁷

Otros modelos de fibras amiloides varían en el número de capas de moléculas $A\beta$, en la orientación relativa de cada capa o en el arreglo de las hebras que conforman la fibra.^{19,35,81,82} Sin embargo, los modelos generados en el presente capítulo consideran sólo las características estructurales ya mencionadas.

2.2. Objetivos

2.2.1. Objetivo general

- Estudiar el efecto de la interacción de iones metálicos en la estructura de las fibras amiloides.

2.2.2. Objetivos particulares

- Generar modelos atómico de fibras amiloides formadas a partir de la $A\beta_{42}$ que permitan modelar su estructura y comportamiento dinámico.
- Evaluar la estabilidad y la capacidad de los modelos para reproducir las características estructurales de las fibras amiloides reconocidas experimentalmente.
- Evaluar el efecto de la interacción de iones Na^+ , Cl^- y Zn^{2+} en la estructura de la fibra mediante simulaciones de dinámica molecular.

2.3. Metodología

2.3.1. Construcción de los modelos de fibras amiloides (modelo I)

El estudio de la estructura de las fibras amiloides que se llevó a cabo en el presente trabajo se basó en un modelo atómico construido a partir de información estructural experimental, como se ilustra en la Figura 2.1 y se describe a continuación. A partir del séptimo modelo de los diez contenidos en la estructura 2BEG⁸³ del PDB, se extrajeron las estructuras de las cadenas intermedias B, C y D, (excluyendo las cadenas A y E), para obtener un

trímero ($A\beta_{17-42}$)₃, (cadenas en azul en la Figura 2.1 a, i). Estas cadenas cumplen con el motivo estructural β cruzado de las fibras amiloides y fueron la base para extender el modelo en tamaño. Se eligió el séptimo modelo del archivo PDB 2BEG debido a que su estructura secundaria es más uniforme entre las 5 cadenas. Las cadenas A y E no se consideraron debido a que se encuentran en las terminaciones del pentámero, y, a diferencia de las hebras intermedias, las cadenas laterales de sus residuos no se encuentran adecuadamente alineadas y compactadas.

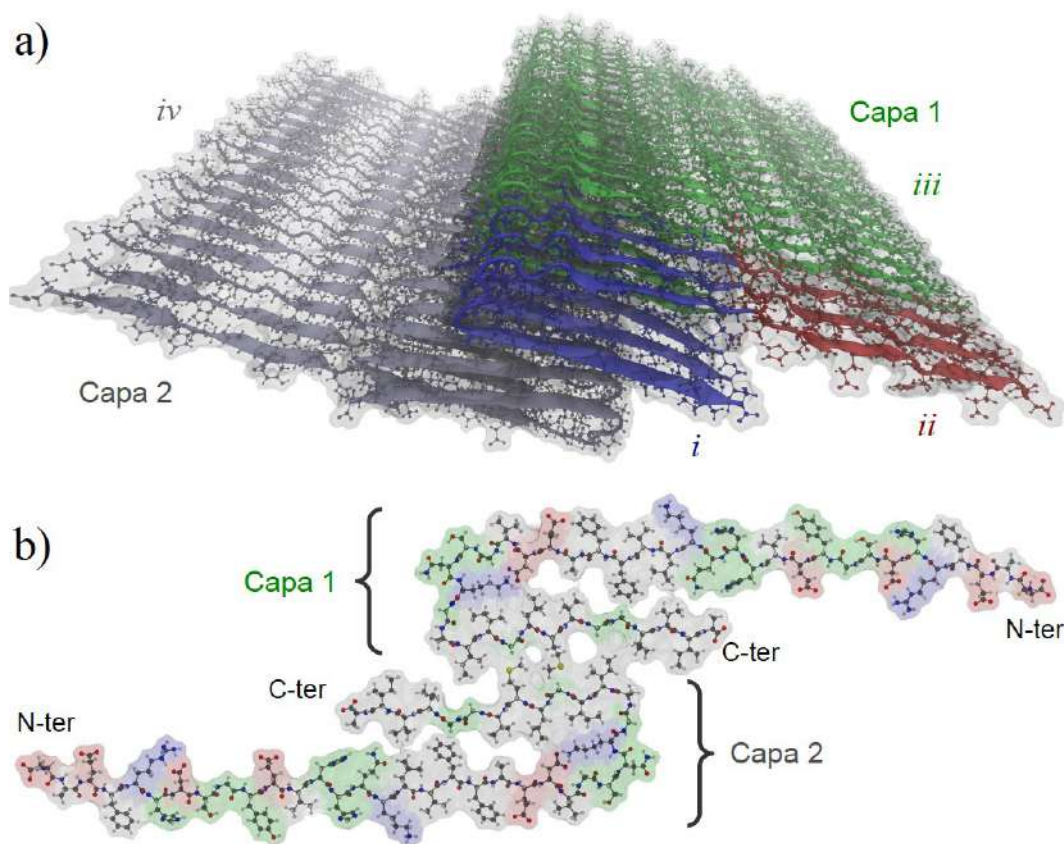


Figura 2.1. Estructura inicial del modelo I de fibra amiloide ($A\beta_{42}$)₃₆. a) Vista en perspectiva. b) Sección transversal mostrando una hebra de cada capa del modelo.

La secuencia 1-16 faltante en el dominio N-terminal, (cadenas en color rojo en la Figura 2.1 a, ii), se completó considerando la secuencia de aminoácidos 1-42 de la proteína $A\beta$ humana,⁸⁴ para formar el trímero ($A\beta_{42}$)₃ (cadenas en color azul y rojo, i y ii). Para esto se creó un péptido con la secuencia de aminoácidos 1-16 indicada en conformación β extendida, que es aproximadamente la misma que tienen los residuos contiguos (17-26) en el modelo 2BEG. El nuevo péptido se agregó a cada una de las cadenas B, C y D (seleccionadas en el paso anterior, i), formando un enlace peptídico entre los residuos 16 y 17, y respetando la orientación de las cadenas del modelo experimental. Al incorporar el dominio N-terminal de esta manera, se sobreestimó por construcción la estructura de tipo β en esta región, ya que el estudio experimental sugiere que el extremo N-terminal no se observa estructurado.³⁶ Sin embargo, se consideró que las condiciones de simulación elegidas en el presente

trabajo podrían corregir la estructura, es decir, disminuir la estructura de tipo β en el dominio N-terminal, en una DM suficientemente larga. Esta suposición se discutirá más adelante en la sección 2.5.3.

El crecimiento del modelo se realizó de acuerdo a la definición de la estructura β cruzada, con las nuevas cadenas $A\beta$ alineadas perpendicularmente al eje de crecimiento de la fibra, para incorporarse a las hojas β ya presentes; los puentes de hidrógeno entre las cadenas peptídicas se formaron en dirección aproximadamente paralela al mismo eje, como se ilustra en la Figura 2.1 a). La estructura del trímero construido se duplicó y se alineó de la manera indicada para formar un hexámero y, subsecuentemente, un nonámero. A partir de esta estructura y con la finalidad de incrementar el tamaño del oligómero de tal manera que el eje más largo de la estructura sea el eje de crecimiento de la fibra, se creó una copia que se alineó adyacente a la estructura original para llegar a un agregado con 18 monómeros (estructura en color azul, rojo y verde en la Figura 2.1 a, i, ii y iii). Con la finalidad de adoptar la simetría C_{2z} observada experimentalmente en las fibras amiloides (como se describió en la sección anterior), se incorporó una segunda capa de moléculas $A\beta_{42}$ al modelo al hacer un duplicado de la estructura de 18 monómeros, la cual se rotó 180° sobre el eje de la fibra (eje z) y se acopló a la estructura original de tal forma que las cadenas laterales de la Met35 a lo largo de la fibra quedaran próximas a los C_α de los residuos de Gly33 de la otra capa de moléculas, tal y como se sugirió en un estudio previo,³⁷ (estructura en color gris en la Figura 2.1 a, iv). Esta condición permitió que las cadenas laterales de cada capa de oligómeros formaran un cierre estérico compacto (Figura 2.1 b). El modelo final, designado aquí como modelo I, incluye 36 moléculas de $A\beta_{42}$ organizadas en dos capas de moléculas que cumplen con el motivo β cruzado y con la simetría y estequiometría reportados para las fibras amiloides. En este punto se llevó a cabo una minimización de la energía de la estructura por 500 pasos para eliminar interacciones desfavorables como choques estéricos resultantes del ensamblaje de la estructura, (ver metodología más adelante). Uno de los aspectos que no está considerado en el presente modelo es la estructura helicoidal de las fibra amiloides, ya que el modelo experimental no incluye esta información. Sin embargo, como se analiza en la sección 2.5.2, la dinámica molecular del modelo a temperatura fisiológica en ausencia de restricciones geométricas permite al modelo adoptar esta estructura de manera espontánea.

Como paso final en la construcción del modelo, la estructura completa se embebió en un cubo conteniendo 71,067 moléculas de agua de solvatación. Las dimensiones del cubo fueron $178 \times 108 \times 129 \text{ \AA}^3$, suficiente para contener la estructura proteica dejando un margen entre el soluto y los bordes de la caja de 14, 30 y 15 \AA en las direcciones de los ejes x , y y z , respectivamente. Además se evitó que los átomos del disolvente quedaran a una distancia menor de 2.6 \AA de los átomos proteicos. Finalmente se agregaron 108 átomos de Na^+ distribuidos aleatoriamente en el cubo de solvente con la finalidad de neutralizar la carga total de la fibra (-108). Considerando los átomos proteicos de la fibra, las moléculas de agua y los iones incluidos en el sistema, la estructura final consta de 235,881 átomos en total. La manipulación de las coordenadas de los fragmentos estructurales del modelo y su ensamblaje se llevaron a cabo mediante el programa VMD.⁸⁵ Cabe

mencionar que éste y los otros modelos de fibras amiloides que se describirán más adelante, se pueden considerar en la actualidad como "de gran tamaño", situación que se tomó en cuenta para elegir el tiempo de simulación empleado en consideración también de los recursos computacionales disponibles, como se discutirá más adelante.

2.3.2. Equilibración y simulaciones de dinámica molecular

El modelo final, construido de manera adecuada para realizar simulaciones de DM, fue sometido a un protocolo de equilibración, previo a la simulación "de producción", con la finalidad de uniformar las propiedades locales del sistema en toda su extensión y de llevar al sistema a las condiciones de simulación elegidas. El protocolo de equilibración aplicado se puede dividir en dos etapas: la de "adaptación del solvente" y la de "calentamiento y ajuste del volumen". En la primer etapa se mantiene fija la estructura de la fibra amiloide mientras que se permite el movimiento de las moléculas de agua y de los iones. Con estas restricciones se llevan a cabo 3,000 pasos de optimización geométrica minimizando la energía potencial mediante el método de gradiente conjugado, seguido de 20 ps de DM partiendo de una temperatura de 10 K e incrementándola en 1 K cada 50 fs hasta llegar a 310 K. En la segunda etapa de la equilibración se permite el movimiento de todas las especies (soluto, solvente e iones) eliminando las restricciones aplicadas en la etapa anterior, aplicando nuevamente 3,000 pasos de minimización de la energía, 100 ps de DM de 10 a 310 K con incrementos de 1 K cada 200 fs y una DM a temperatura (310.15 K) y presión (1 atm) constantes por 40 ps. Posteriormente, la simulación de producción se llevó a cabo por 100 ns partiendo de las coordenadas y velocidades finales del último paso de la equilibración para todos los átomos. Las condiciones de simulación en el ensamble termodinámico isotérmico-isobárico (NTP) fueron una temperatura de 310.15 K y una presión de 1 atm, sin restricciones estructurales.

Todas las corridas de equilibración y simulaciones se llevaron a cabo utilizando el paquete NAMD^{86,87} empleando el campo de fuerzas CHARMM27.⁸⁸ Para el cálculo de interacciones no covalentes de corto alcance se empleó un radio de corte de 10 Å, aplicando una función de atenuación a partir de 8 Å. Las listas de pares utilizadas por NAMD se crearon hasta 12 Å de distancia. Las interacciones electrostáticas se calcularon mediante el método *particle-mesh Ewald* (PME),^{89,90} aplicando condiciones a la frontera periódicas y utilizando un espaciado de los puntos de la rejilla de aproximadamente 1 Å en cada dimensión. Para llevar a cabo las dinámicas moleculares se utilizó un paso de 2 fs al integrar las ecuaciones de movimiento aplicando el método SHAKE,⁹¹ en donde se restringe el alargamiento de los enlaces que incluyen átomos de hidrógeno. Esto permitió un esquema de integración múltiple en donde las interacciones covalentes, no covalentes de corto alcance y electrostáticas se evaluaron cada 2, 2 y 4 fs, respectivamente. La temperatura de las simulaciones se controló utilizando dinámicas de Langevin, mientras que la presión se controló utilizando el método del pistón de Langevin implementado en NAMD.^{92,93}

2.3.3. Construcción de modelos secundarios (modelos II-V)

A partir de la estructura equilibrada del modelo I, descrito en las secciones anteriores, se construyeron otros modelos de fibras amiloides en los que se incluyeron diferentes iones en el solvente, ver Tabla 2.1. Esto con la finalidad estudiar el efecto de la interacción de los iones metálicos en la estructura de las fibras.

Tabla 2.1. Características de los modelos de fibras amiloides construidos.

Modelo	Número de monómeros $A\beta_{42}$	Número de iones en el solvente	Número de moléculas de agua	Número total de átomos
I	36	108 Na^+	71,067	235,881
II	48		90,685	302,151
III	48	170 Cl^- , 314 Na^+ (0.1 M)	90,103	301,183
IV	48	169 Cl^- , 265 Na^+ (0.1 M) / 48 Zn^{2+} (1 eq)	100,283	301,283
V	188	660 Cl^- , 1224 Na^+ (0.1 M)	351,162	1,173,246

El procedimiento para construir los modelos II-IV es el siguiente: A partir de la estructura del modelo I, después de 50 ns de simulación de DM, se replicaron las coordenadas de las seis hebras intermedias, es decir, de las 18 moléculas de $A\beta$ alineadas en cada una de las capas del modelo, sólo se consideraron de la número 7 a la 12. De manera similar a como se construyó el modelo I, las hebras replicadas se alinearon contiguas a las hebras originales, en este caso conservando el ángulo de torsión adoptado por la fibra, (ver sección 2.5.2). De este modo se extendió el modelo hasta llegar a una longitud de 24 hebras en cada una de las dos capas de moléculas $A\beta_{42}$ de la fibra. A esta estructura se le agregaron las moléculas de agua y, para cada modelo, se adicionaron diferentes iones de acuerdo a lo especificado en la Tabla 2.1. La Figura 2.2 muestra un esquema con la secuencia de pasos seguidos para la creación de cada modelo.

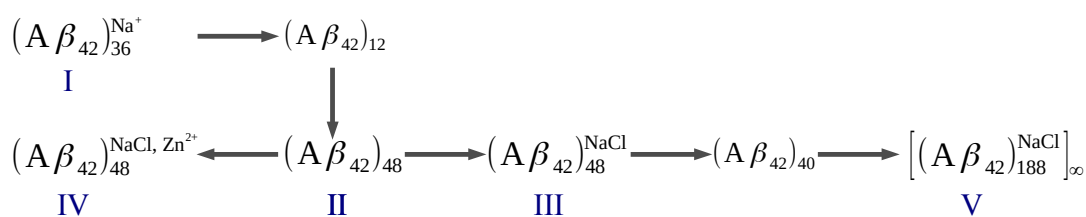


Figura 2.2. Secuencia de construcción de modelos secundarios de fibras amiloides.

El modelo V se construyó de manera similar a los modelos II-IV, pero utilizando como estructura de partida al modelo III después de 37 ns de DM. Este modelo utilizó 20 monómeros intermedios por capa de la estructura de la fibra (hebras 3-22), los cuales se reprodujeron y alinearon repetidamente sobre el eje de la fibra para incrementar su tamaño. Considerando el ángulo de torsión mostrado por las hebras del modelo III a lo largo del eje de la fibra, al agregar 94 hebras en ambas capas de la fibra se alcanzó un ángulo de torsión entre la primera y última hebra cercano a 180° . Dada la simetría (C_{2z}) del modelo, su estructura helicoidal y el empleo de

condiciones a la frontera periódicas, fue posible poner a la última hebra del modelo V en contacto directo con la primera hebra de la réplica periódica del sistema en la dirección positiva del eje z , mientras que la primera hebra del modelo se colocó de vecina a la última hebra de la réplica del sistema en la dirección negativa del eje z , para cada capa. Además, no se dejó ningún margen entre los átomos de la fibra y el borde de la caja de solvente en ambas direcciones del eje z . Al construir el modelo V de esta manera, se simula una fibra amiloide de longitud infinita que elimina cualquier efecto asociado al tamaño del oligómero. Este modelo se discutirá en la sección 2.7.

A diferencia del modelo I, que sólo incluyó el número de iones Na^+ suficiente para neutralizar la carga de la fibra, en los modelos III-V se agregó un exceso de átomos de Na^+ y Cl^- suficiente para simular una concentración de iones de 0.1 M y, al mismo tiempo, para neutralizar la carga del sistema. Al modelo IV se le agregaron además 48 átomos de Zn^{2+} que representa una proporción 1:1 de $\text{A}\beta_{42}:\text{Zn}^{2+}$ ó un equivalente (1 eq). El modelo II fue el único en el que no se adicionó ningún ion, por lo que sólo en este modelo la carga neta del sistema fue de -144, (la carga neta de cada molécula $\text{A}\beta_{42}$ es de -3 a pH fisiológico).*

El protocolo de equilibración de los modelos secundarios (II-V) fue similar al del modelo I con las siguientes diferencias: las corridas de minimización de la energía fueron de 5,000 pasos, las corridas de DM de calentamiento que se corrieron con el doble de pasos de los aplicados al modelo I y la DM de ajuste del volumen se aplicó por 0.4 ns. Cada paso del protocolo de equilibración de los modelos secundarios se planteó más largo que en el modelo I para permitir que los diferentes iones incluidos en cada modelo se adaptaran a la estructura ya equilibrada de la fibra.

2.3.4. Criterios de análisis de la dinámica molecular de los modelos de fibras amiloides

Para llevar a cabo el análisis de la evolución estructural de cada modelo se calcularon distintos parámetros estructurales sobre las trayectorias guardadas a partir de las simulaciones de DM. Dichas trayectorias se refieren al detalle de las coordenadas cartesianas para cada uno de los átomos que conforman a cada modelo, y que son almacenadas a intervalos regulares de tiempo durante la simulación para su posterior procesamiento y análisis. Para el caso de los modelos atomísticos de fibras amiloides, se consideraron como relevantes varios parámetros relacionados con la topología estructural del modelo y su evolución en el tiempo, la formación de interacciones atómicas estabilizadoras incluyendo la formación de estructuras secundarias, así como la interacción de la fibra con el medio de solvatación y con los iones metálicos. La mayoría de estos parámetros se calcularon mediante el programa VMD versión 1.9.1.⁸⁵ La determinación de estructuras secundarias (reconocimiento de motivos estructurales repetitivos en proteínas) se llevó a cabo mediante el algoritmo STRIDE.⁹⁴

* En condiciones experimentales, la mayor parte de la población de moléculas $\text{A}\beta_{42}$ tendrían una carga neta de -3 a pH fisiológico.

2.4. Equilibración y estabilidad del modelo I

El protocolo de equilibración aplicado al modelo I consistió en total de 6000 pasos de optimización más 160 ps de dinámica molecular, lo cual representa un tiempo de simulación muy corto en comparación con la subsecuente simulación "de producción". Esta equilibración es un requisito imprescindible ya que prepara al sistema llevándolo a las condiciones de simulación elegidas. Para este modelo, la equilibración además permite a la estructura adaptarse al cambio de una fase sólida amorfa (de la que se derivó el modelo experimental 2BEG) a las condiciones de solvatación y de temperatura fisiológica planteados en las simulaciones. Esto además considera la liberación de las restricciones geométricas impuestas durante el refinamiento estructural en los experimentos de NMR en estado sólido,³⁶ cuyo resultado se utilizó como base para crear el modelo I. La estructura resultante del protocolo de equilibración, que incluye las coordenadas tridimensionales y las velocidades atómicas finales, son utilizadas como punto de partida de la simulación de producción, por lo que la evolución temporal del sistema está directamente afectada por el protocolo elegido. A continuación se describe el resultado de este procedimiento.

2.4.1. Perfiles de energía durante la equilibración

El protocolo de equilibración aplicado al modelo I se ilustra en la Figura 2.3, donde se pueden observar los perfiles de energías y variables de simulación durante los cinco pasos que conforman dicho protocolo (i-v).

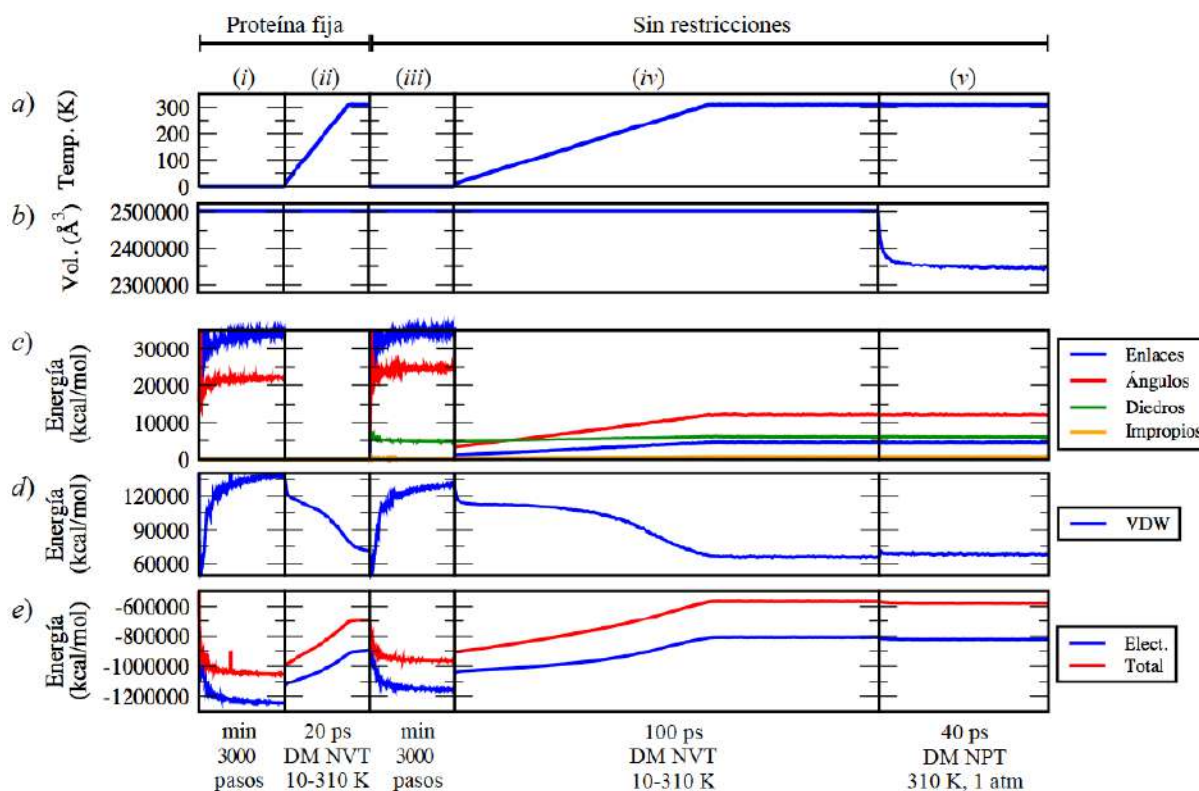


Figura 2.3. Perfil de temperatura (a), volumen (b), energías potenciales (c, d) y de energía electrostática y total (e) durante las cinco etapas (i-v) de equilibración del modelo I.

En la Figura 2.3 *a)* y *b)* se grafican las restricciones de temperatura y volumen aplicados a cada una de las etapas, así mismo, las gráficas *c)*, *d)*, y *e)* muestran el perfil de diferentes energías potenciales y el de la energía total (la suma de las energías potenciales y la energía cinética). Las etapas *i* y *iii* corresponden a minimizaciones de la energía total, mientras que en las etapas *ii* y *iv* se llevó a cabo un calentamiento del sistema. La etapa *v* corresponde a un ajuste de volumen (donde se restringe la presión del sistema a 1 atm y se libera la restricción de volumen aplicada durante los pasos *i-iv*).

Durante las etapas de minimización de la energía, la componente electrostática aportó la mayor contribución a la energía total (Figura 2.3 *c-e*, *i* y *iii*), lo que sugiere que en estas etapas se optimizaron la geometría y las interacciones electrostáticas entre las moléculas que conforman el sistema (moléculas de agua y de proteína A β ₄₂), modificando principalmente sus posiciones en el espacio y orientaciones relativas. Las energías de enlaces, de ángulos, y de van der Waals (VDW) se incrementaron en las etapas de minimización, mientras que las energías de ángulos diedros e impropios se observaron poco afectadas. Esto indica que las conformaciones de las moléculas que forman el sistema salieron ligeramente de sus valores de equilibrio, (definidos por el campo de fuerza), para favorecer la optimización de las interacciones electrostáticas durante las etapas *i* y *iii*. En el caso de las etapas de calentamiento del sistema (*ii* y *iv*), todas las energías potenciales se incrementaron o se mantuvieron casi constantes, con la excepción de la energía de VDW, la cual disminuyó su valor a medida que se incrementó la temperatura. Este comportamiento indica que la optimización de los contactos de VDW estabilizaron la energía total del sistema en las condiciones de temperatura fisiológica utilizadas en la simulación, mientras que la energía cinética incorporada en el cálculo modificó las geometrías de equilibrio de las moléculas permitiendo cambios conformacionales al rebasar barreras de energía en la superficie de energía potencial (PES). La liberación de la restricción del volumen constante (Figura 2.3 *b*, *v*) produjo un ligero incremento en la energía de VDW y una ligera disminución de la energía electrostática; al mismo tiempo se observó una disminución de ~6% de las dimensiones de la caja de disolvente (volumen de celda unitaria), la cual se asocia a la formación de contactos estrechos entre el soluto y el disolvente que no estaban presentes durante la construcción del modelo. En esta última etapa la energía de VDW parece disminuir lentamente hacia el final de la equilibración.

2.4.2. Cambios estructurales durante la equilibración

El tiempo de simulación asociado al protocolo de equilibración es demasiado corto como para esperar cambios conformacionales importantes en una estructura macromolecular del tamaño del modelo I. Sin embargo, a nivel local se observaron arreglos importantes entre los átomos que forman contactos estrechos; esto es evidente al observar el incremento de los parámetros RMSD y RMSF para los átomos de carbono α (C_α) de la fibra en el modelo I, como se puede observar en la Figura 2.4. Estos parámetros cuantifican respectivamente los cambios estructurales y las fluctuaciones espaciales para los átomos C_α en el modelo a lo largo del tiempo simulación en la equilibración.

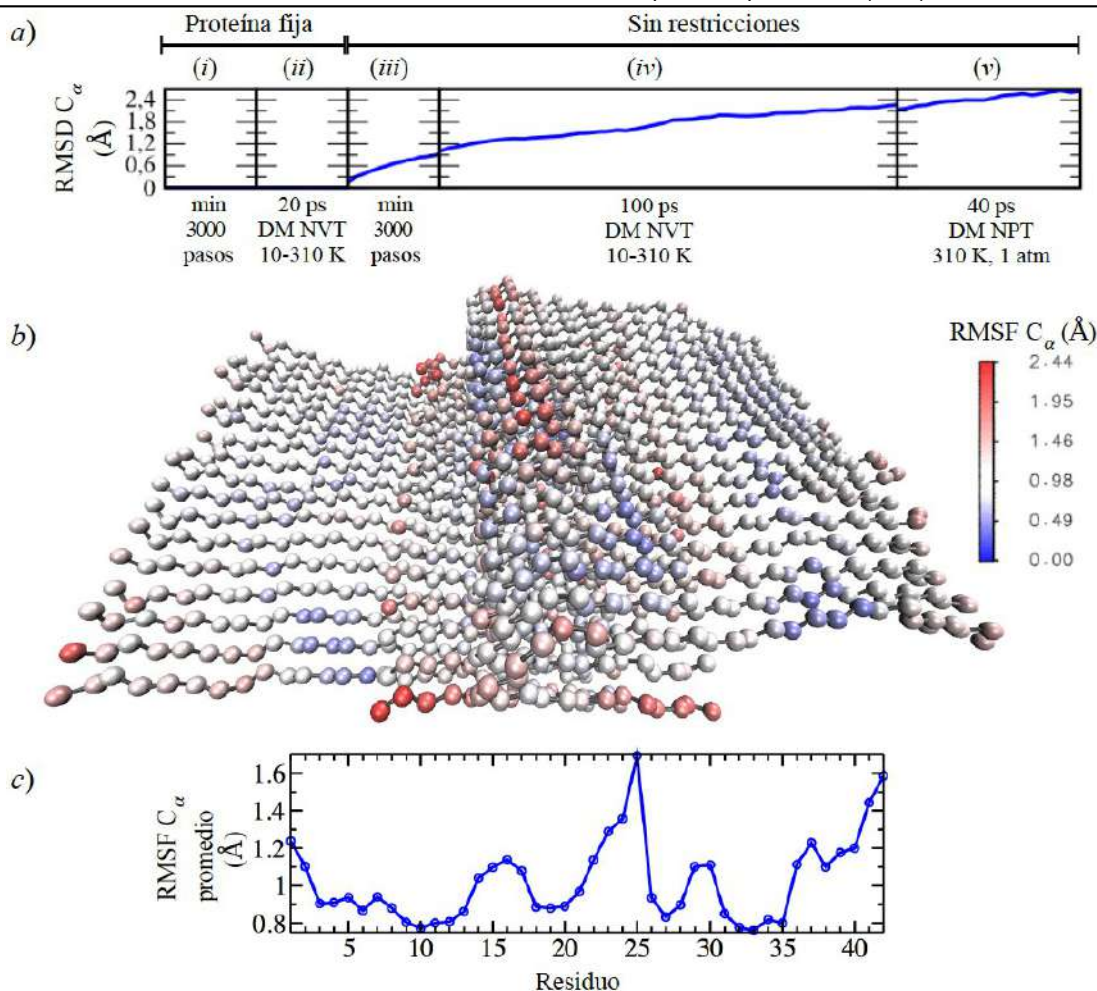


Figura 2.4. Fluctuaciones estructurales del modelo I durante la equilibración. a) RMSD C_{α} de la fibra. b) RMSF para C_{α} 's de la fibra. c) RMSF C_{α} promedio por residuo.

Como se mencionó en la sección anterior, las interacciones electrostáticas y de VDW son las primeras que tienen un efecto sobre la estructura, inicialmente del solvente y luego también del soluto, optimizando los contactos "no covalentes" entre las moléculas. La temperatura y la presión simuladas además incrementan la energía cinética de los átomos, permitiendo rebasar barreras de energía potencial, para así modificar más fácilmente su conformación. Como se observa en la Figura 2.4, estos efectos no se manifiestan de manera uniforme a lo largo de la estructura de la fibra, lo que sugiere la presencia de tensión estructural en regiones particulares del modelo.

La Figura 2.4 a) muestra una gráfica del RMSD C_{α} con respecto al tiempo. Se observa que, al liberar las restricciones estructurales sobre los átomos proteicos (iii), de inmediato comienza a incrementarse el RMSD y continúa aumentando durante el resto de la equilibración. Esto sugiere que, a pesar de que las componentes de la energía mostradas en la Figura 2.3 parecen estar estabilizadas en la etapa final de la equilibración (v), las transiciones o cambios conformacionales necesarios para equilibrar la estructura de la fibra tienen escalas de tiempo más largas, y se manifestarán durante la simulación de producción. La fuerza directriz de estos cambios es muy sutil y corresponde a la disminución lenta y constante de la energía de VDW hacia el final de la

equilibración. Cabe mencionar que el término CMAP⁹⁵ de la energía potencial del campo de fuerza de CHARMM, incluido en estos cálculos, también puede tener un efecto importante en la conformación de la estructura de la fibra, ya que este término considera los ángulos diedros del esqueleto peptídico, para favorecer la estabilidad de las conformaciones observadas experimentalmente en proteínas.⁹⁵

La estructura mostrada en la Figura 2.4 b) permite ubicar los residuos o regiones del modelo que están contribuyendo en mayor proporción a los cambios estructurales cuantificados globalmente por el RMSD. Las esferas coloreadas en rojo indican aquellos C_{α} 's que sufrieron mayores fluctuaciones (RMSF) durante la equilibración, mientras que aquellos en azul se mantuvieron más fijos o localizados. De esta manera se encontró que, paradójicamente, las mayores fluctuaciones se localizaron cerca de la región de "bisagra" y en el extremo C-terminal, regiones localizadas en el núcleo hidrofóbico de la fibra, mientras que el dominio N-terminal mostró fluctuaciones menores. Esto se puede verificar en la Figura 2.4 c), que muestra el RMSF C_{α} por residuo promediado para cada una de las hebras que forman el oligómero. En esta gráfica se observa que los residuos Asp23, Val24, Gly25, Leu42 y Ala42 (ubicados en el núcleo hidrofóbico) mostraron la mayor fluctuación. A partir de la Figura 2.4 b) es evidente que las fluctuaciones de cada residuo varían entre cada hebra a lo largo del eje de la fibra, lo cual manifiesta que algunas de las transiciones estructurales inician de manera localizada en uno de los extremos de la fibra (en este caso en el lado distal mostrado en la figura). El patrón de fluctuaciones observado durante la equilibración tuvo consecuencias estructurales importantes durante la simulación de producción del modelo I. Esto se analizará en detalle en las siguientes secciones.

2.5. Simulación de dinámica molecular del modelo I

La DM de producción del modelo I, iniciada a partir de la estructura equilibrada a la temperatura y presión propuesta (310.15 K y 1 atm), representa una mejor aproximación de las condiciones en que las fibras amiloides se encuentran a nivel fisiológico, considerando también el ambiente químico que el solvente y los iones incorporan al modelo de manera explícita. La secuencia de aminoácidos y estructura de la proteína $A\beta_{42}$ en conjunto con la compleja red de interacciones entre las moléculas que conforman el modelo determinarán la evolución temporal de la estructura del modelo. A pesar de que el modelo de fibra amiloide aquí estudiado se basa en diversas mediciones experimentales, varias características del modelo pueden limitar la correcta descripción del sistema real. Por este motivo es de especial importancia comparar las características estructurales del modelo con la información experimental disponible. Esta comparación puede establecer la utilidad del modelo en la descripción de características estructurales de las fibras amiloides que están fuera del alcance de los métodos experimentales, por lo que las siguientes secciones se dedicarán a este análisis.

2.5.1. Estabilidad del modelo oligomérico

Las fibras amiloides son estructuras altamente estables. En el caso de la proteína $A\beta_{42}$, la formación de los agregados ocurre de manera lenta pero espontánea, por lo que es deseable que el modelo sea capaz de mantener

sus características estructurales a lo largo del tiempo en las condiciones de simulación empleadas. En la Figura 2.5 se muestra la gráfica el RMSD C_{α} durante la simulación del modelo I, en la que se puede evaluar el grado de estabilización estructural alcanzado en 100 ns de DM. Para el núcleo hidrofóbico, (línea azul) la estructura parece estabilizarse poco antes de 40 ns con un nivel bajo y constante de fluctuaciones para el resto de la simulación. Por su parte, la gráfica que considera el modelo completo (línea negra) muestra un incremento superior del RMSD, lo que sugiere una transición estructural importante para el dominio hidrofílico N-terminal; también se observan fluctuaciones mayores de este parámetro prácticamente durante toda la simulación. En este sentido el tiempo de simulación parece ser suficiente para alcanzar una estructura "estacionaria" en el núcleo hidrofóbico; sin embargo, el dominio N-terminal parece tener fluctuaciones en una escala de tiempo más larga.

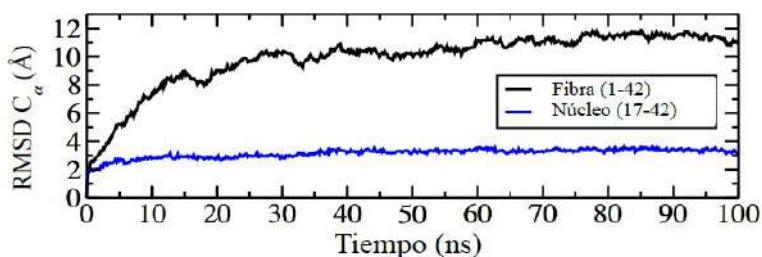


Figura 2.5. RMSD C_{α} para el modelo I de fibra amiloide completa y para el núcleo hidrofóbico (17-42).

Como se hará evidente en las siguientes secciones, durante los 100 ns de simulación de DM, el modelo I mantuvo su estructura cuaternaria intacta, es decir, ninguno de los 36 monómeros se disoció del agregado inicial. Esta disociación o fragmentación podría ocurrir entre las hebras que conforman el modelo (a lo largo del eje de la fibra), o entre las dos capas de moléculas $A\beta_{42}$ (ver Figura 2.1). Si bien 100 ns de simulación de DM puede parecer un tiempo demasiado corto en comparación con el tiempo que toma la formación de las fibras (en el orden de horas a días), el modelo I partió de una estructura pre-ensamblada del oligómero, por lo no es necesario un tiempo de simulación tan largo como el que sería necesario para estudiar procesos de formación o disgregación de las fibras. De hecho, durante el tiempo de simulación se observó una estabilización estructural del núcleo hidrofóbico y además fue tiempo suficiente para observar algunas transiciones estructurales importantes. Tal es el caso del torcimiento del agregado para adoptar una estructura helicoidal, la consolidación de estructuras secundarias, la modificación de las interacciones que estabilizan los cierres estéricos y la formación de interacciones duraderas entre los iones y la superficie de la fibra. A continuación se analizan con detalle estos procesos.

2.5.2. Estructura helicoidal de la fibra amiloide

El cambio estructural más evidente durante la simulación de producción del modelo I fue el torcimiento del oligómero sobre el eje de la fibra amiloide. Esta transición generó una estructura helicoidal a lo largo del eje de la fibra dada la simetría del modelo. La Figura 2.6 a) compara la estructura inicial y final del modelo desde una perspectiva que permite observar el alineamiento de las hebras que forman el oligómero así como el giro que

sufren las hebras a lo largo del eje de la fibra al término de la simulación.

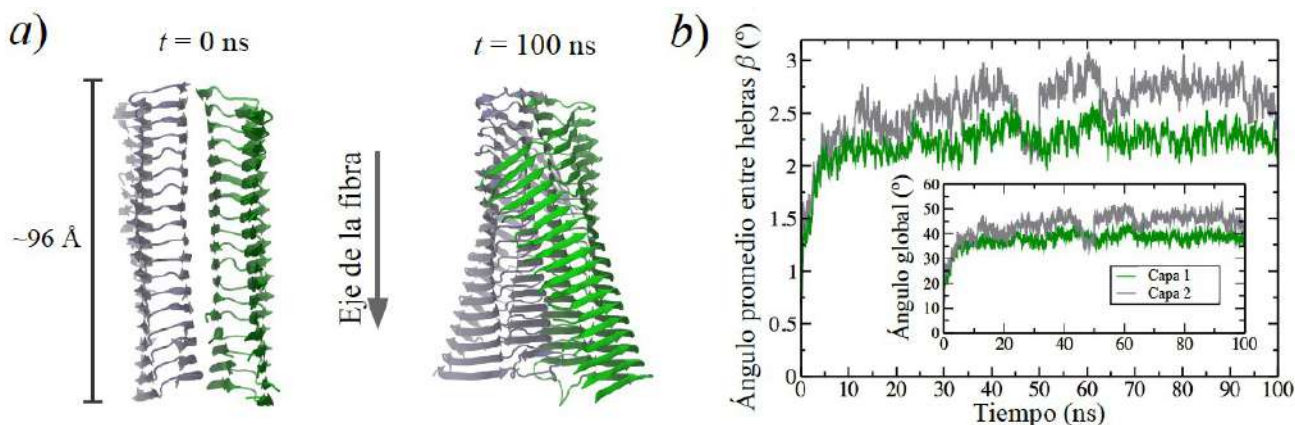


Figura 2.6. Estructura helicoidal de la fibra amiloide. a) Estructura del modelo I al inicio y al final de la simulación. b) Ángulo de giro promedio entre hebras y ángulo global con respecto al tiempo.

A pesar de que la estructura helicoidal de las fibras amiloides es una característica bien reconocida, ésta no se consideró al momento de la construcción del modelo I debido a la falta de información estructural. No obstante la Figura 2.6 demuestra que el modelo adopta esta característica de manera espontánea y sin la necesidad de imponer restricciones estructurales. Esto sugiere que la disposición de las hebras dentro del oligómero, y quizá su conformación, son factores que por si solos determinan esta propiedad estructural de las fibras amiloides. Por otro lado, el torcimiento del modelo no se atribuye a la secuencia de aminoácidos de la proteína $A\beta$, ya que se ha demostrado que las fibras amiloides formadas por una variedad de proteínas poseen características estructurales similares independientemente de las diferencias en sus secuencias de aminoácidos.^{40,41}

El grado de torcimiento de la fibra a lo largo de la simulación se puede observar en la Figura 2.6 b). En el recuadro exterior se grafica el ángulo de giro promedio entre todos los pares de hebras contra el tiempo, mientras que en el recuadro interno se grafica el ángulo de giro global del oligómero considerando el ángulo de giro promedio y el número de hebras a lo largo del eje de la fibra. Estas gráficas revelan que al inicio de la simulación el proceso de torsión ya había comenzado, lo que implica que se inició durante el protocolo de equilibración. De hecho, el patrón de fluctuaciones de los C_{α} 's observado durante la equilibración, (sección 2.4.2, página 17), se puede explicar en buena medida por este cambio estructural.

En el transcurso de los primeros 5 ns de simulación el modelo ya había alcanzado un ángulo de torsión global alrededor de 36° (con un ángulo promedio entre hebras cercano a 2°). Después de esto se comienza a observar un comportamiento asimétrico entre las dos capas del modelo, de tal forma que el ángulo promedio en las hebras de la capa 1 (graficado en color verde en la Figura 2.6 b) es menor y parece más estabilizado que el de la capa 2 (mostrada en color gris), efecto que podría interpretarse como que una de las capas "envuelve" a la otra. Como resultado de esto, la torsión total del modelo fluctúa alrededor de 40.7° para la capa 1 y de 47.2° para la capa 2, lo que se podría considerar como una torsión efectiva de $\sim 44^{\circ}$ para el modelo con 2 capas de 18 hebras de

longitud. Tomando en cuenta este parámetro estructural se puede proyectar el número de hebras necesarias para completar un giro de la fibra de 180° en ~ 74 , las cuales, considerando una distancia promedio entre cada hebra de 4.77 \AA , ocuparían una longitud total para este modelo hipotético de $\sim 35 \text{ nm}$. La longitud de giro de la estructura helicoidal predicha por el modelo I es de hecho compatible con las observaciones experimentales realizadas para fibras amiloides, en donde las distancias de giro más cortas se encuentran entre 25 y 30 nm , y pueden llegar a un máximo de $\sim 300 \text{ nm}$.^{24,47} El torcimiento espontáneo de este modelo es también congruente con el comportamiento observado en simulaciones previas realizadas en modelos de péptidos amiloidegénicos.⁴³

2.5.3. Estructura secundaria de proteínas

Los motivos de estructura secundaria de proteínas presentes en la estructura inicial del modelo I provienen del modelo experimental 2BEG del PDB,⁸³ al menos para la región del núcleo hidrofóbico (residuos 17-42). El dominio N-terminal (residuos 1-16) se reportó como no estructurado,³⁶ por lo que no se contó con alguna estructura experimental que pudiera incorporarse al modelo. En el presente trabajo se decidió construir este dominio en conformación extendida (estructura de tipo β similar a la de los residuos vecinos) como punto de partida. Esta propuesta consideró una estructura incorrecta o poco probable para el dominio N-terminal según los experimentos, sin embargo, se consideró que las condiciones de simulación elegidas en una DM lo suficientemente larga deberían ser suficientes para corregir la estructura. Como se observa en la Figura 2.7, esta predicción se cumplió parcialmente en 100 ns de simulación.

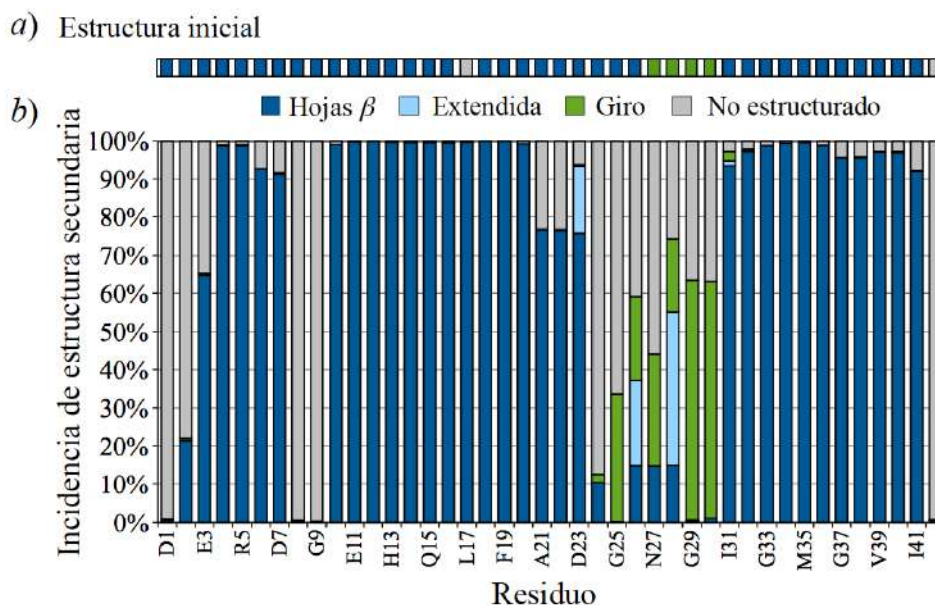
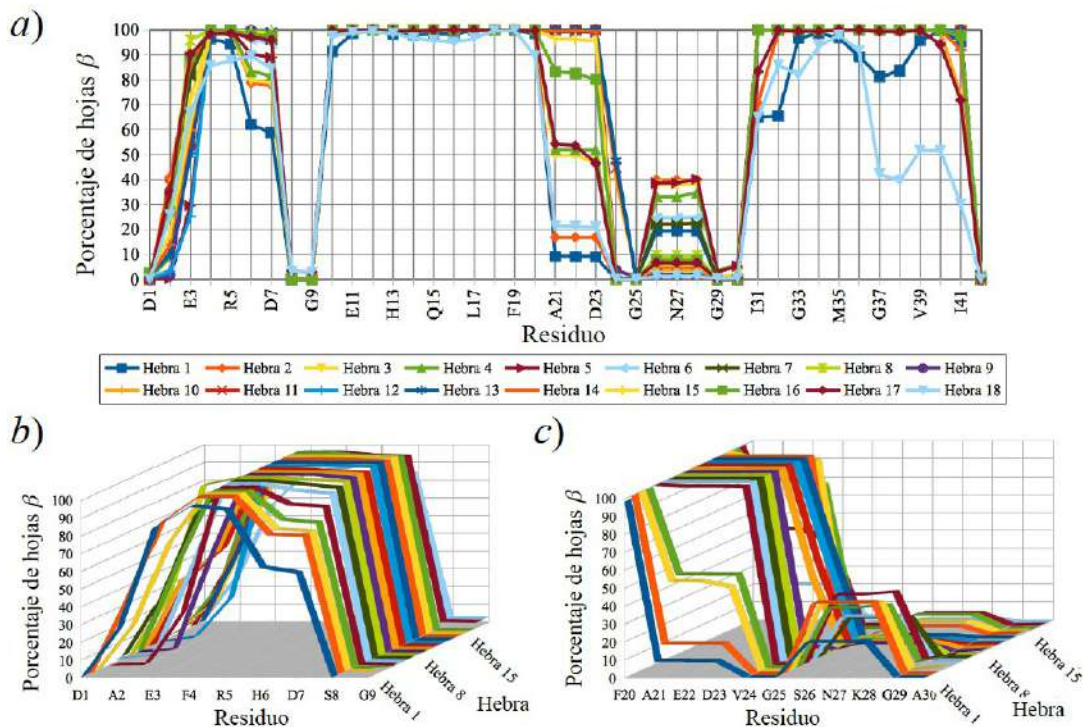


Figura 2.7. Incidencia de motivos de estructura secundaria de proteínas por residuo para el modelo I. a) Estructura inicial. b) Promedio en 100 ns de DM.

La estructura secundaria inicial para el dominio hidrofóbico consideró dos hojas β , identificadas aquí como S1 (residuos 18-26) y S2 (residuo 31-41). Entre las secuencias S1 y S2, la secuencia 27-30 inicialmente formaba una "bisagra" con motivo estructural de *giro*. Al incorporar el dominio N-terminal con estructura β , se

incrementó la extensión de la hoja β S1, abarcando prácticamente de los residuos 1 al 26 (Figura 2.7 a). En la Figura 2.7 b) se muestra la incidencia de diferentes motivos de estructura secundaria para cada residuo de aminoácido de la secuencia $A\beta_{42}$, promediadas en el tiempo de simulación y sobre cada una de las hebras que conforman el modelo I. En ningún momento se encontró la formación de estructuras tipo α , mientras que las estructuras β en general predominaron para la mayor parte de la secuencia de 42 aminoácidos. Comparando con el modelo 2BEG, se encontró una disminución de la estructura β en el dominio hidrofóbico mientras que el dominio N-terminal conservó una considerable fracción de este motivo a pesar de que se esperaba que se perdiera en su totalidad.

La hoja β S2 permaneció prácticamente intacta durante la simulación, ya que los residuos 31 a 41 mostraron este motivo por arriba del 90% del tiempo a lo largo de la estructura de la fibra. La disminución del porcentaje se debe a que las hebras en los extremos de las fibras disminuyeron considerablemente su incidencia de estructura β , como se puede observar en la Figura 2.8 a).



La región de "bisagra" entre las hojas β S1 y S2 (inicialmente residuos 27 al 30) se extendió durante la simulación incluyendo a los residuos 24 a 26, que originalmente formaban parte de la hoja β S1. El motivo de giro en esta región disminuyó a 2% para el residuo 24 y a 63% para el residuo 29, permitiendo una incidencia importante de estructura aleatoria (sin motivos de estructura secundaria), y en algunos casos estructura β

extendida o de hoja β (residuos 24, 26-28). Vecinos a esta región, los residuos 21-23 que forman parte de hoja β S1, también fueron afectados, ya que su contenido del motivo hoja β disminuyó a $\sim 76\%$, atribuible al efecto de los bordes del oligómero, (las primeras cuatro hebras y las últimas dos mostraron baja incidencia de estructura β , Figura 2.8 c). En esta misma figura también se observa que las hebras que pierden estructura β en los residuos 21-23 la ganan en los residuos 26-28. Adicionalmente, sólo cuatro hebras centrales forman estructuras β en el residuo 24 mientras que estas mismas muestran la menor incidencia en los residuos 26-28.

Estos resultados sugieren que la pérdida de la estructura secundaria de la hoja β S1 en los residuos 21-26 está acompañada (o quizá producida) por la deformación de la región de "bisagra" contigua (residuos 27-30) que tienden a perder el motivo estructural de *giro* y terminan con una estructura aleatoria o β extendida. Este efecto parece iniciar o potenciarse en las hebras ubicadas en los bordes de la fibra y se transmite a las hebras internas vecinas. Por otro lado, la ausencia del motivo de hoja β en el residuo 25 podría ser resultado de la alta fluctuación mostrada por este residuo durante la equilibración (ver Figura 2.4 c en la página 18), que reveló una alta tensión estructural en esta región del modelo en el estado sólido original. Al eliminar las restricciones estructurales y simular a temperatura fisiológica, esta región tiende a sufrir una deformación así como cambios en su estructura secundaria.

La Figura 2.7 b) muestra que la hoja β S1 es muy estable en el rango de los residuos 10 a 20, con sólo una ligera pérdida del motivo estructural por parte de las hebras en los extremos de la fibra (Figura 2.8 a). Como se comentó antes, esta hoja β redujo su extensión durante la simulación en comparación con el modelo experimental 2BEG. El resto de la estructura en el dominio N-terminal (residuos 1-9) se esperaba que se volviera aleatoria o no estructurada, sin embargo, para los residuos 2 a 7 se encontró una alta incidencia del motivo hoja β , con casi el 100% de estructura β para los residuos 4 y 5. En la Figura 2.8 b) se observa que la cantidad de este motivo es también dependiente de la posición de la hebra a lo largo de la estructura de la fibra, pero, a diferencia de lo que ocurre con las hojas β S1 y S2, la incidencia del motivo hoja β crece en dirección a uno de los extremos de la fibra. Este comportamiento probablemente se relaciona al plegamiento del extremo N-terminal de cada hebra a lo largo de la fibra, el cual tiene la misma tendencia a lo largo de la fibra (ver también sección 2.6.1). La alta incidencia de estructura β observada para los residuos Phe4 y Arg5 se puede deber a varios factores, uno de los cuales es la naturaleza de sus cadenas laterales. El grupo bencilo de la Phe4 puede interactuar con sus homólogos de las hebras vecinas y formar apilamientos de los anillos aromáticos y así favorecer a los puentes de hidrógeno "interhebras" necesarios para estabilizar una hoja β . En el caso de la Arg5, la conformación β extendida elegida para el péptido favoreció la formación del puente salino Arg5-Asp7, el cual también puede favorecer la conformación β extendida de la cadena. Otras cadenas laterales de los residuos en esta región podrían contribuir de manera similar, como es el caso del anillo aromático de la His6, o el puente salino formado entre carboxilato del Glu3 y el grupo amino terminal (NH_3^+).

A pesar de que la alta incidencia de estructura β para el dominio N-terminal es inesperada de acuerdo con varios reportes experimentales, éste resultado es de hecho congruente con un trabajo en el que se midió la protección al disolvente de los protones de las amidas peptídicas en fibras amiloides $A\beta_{42}$;⁹⁶ en este se reportó que los residuos Phe4 y Arg5 conservan ~30% de la protección al disolvente, lo cual puede sugerir un cierto grado de formación de hojas β . Por otra parte, la participación de estos residuos en la formación de hojas β no impide que exista una alta fluctuación estructural en el dominio N-terminal del modelo I, como se evidenció en la gráfica de la Figura 2.5 (página 20).

Los residuos Ser8 y Gly9 prácticamente no participaron en la formación de ningún motivo de estructura secundaria, ya que, como se observa en la Figura 2.7 b), su incidencia de estructura aleatoria fue casi del 100%. Considerando la formación de estructura β por parte de los residuos 2 a 7, los residuos 8 y 9 partieron la hoja β extendida que se impuso al inicio en la construcción del modelo I. Este resultado coincide con varios reportes experimentales en los que se determina la estructura secundaria en el núcleo hidrofóbico de fibras amiloides $A\beta_{40}$ o $A\beta_{42}$,^{34,35,79,97-100} en los que se encontró que la hoja β S1 se forma a partir del residuo 10, 11 o 14, aunque otros reportes marcan este inicio más adelante en la secuencia.^{36,101} Considerando esto, la estructura secundaria sobreestimada del modelo I se reduce a la secuencia 2-7 del dominio hidrofílico.

A pesar de que la estabilidad sostenida de la hoja β en el dominio N-terminal (observada en la DM del modelo I) podría corregirse al utilizar tiempos de simulación más largos, el contraste con las observaciones experimentales sugiere que las interacciones que estabilizan la estructura secundaria de esta región, (como las que se mencionaron anteriormente), tendrían que estar de alguna manera neutralizadas para evitar que se formen estas estructuras duraderas en las fibras amiloies. En principio, la alta fluctuación estructural observada en el dominio N-terminal del modelo I podría cumplir con esta tarea. Adicionalmente, la interacción de las fibras amiloides con iones metálicos como Cu^{2+} y Zn^{2+} es un factor que de hecho disminuye la incidencia de estructura β y modifica la morfología de las fibras.⁹⁶ Más adelante, en la sección 2.6, se analiza el impacto de la interacción de los iones Zn^{2+} en la estructura de las fibras. Así mismo, en el capítulo 3 se estudia la coordinación del Cu^{2+} al extremo N-terminal de la $A\beta$, la cual puede explicar a nivel molecular la inhibición de la formación de estructuras de tipo β .

2.5.4. Estructura de los cierres estéricos

Los cierres estéricos se describen como interfases secas entre las caras de dos hojas β apiladas cuyas cadenas laterales hidrofóbicas se complementan como los dientes de un engranaje y mantienen a la estructura estrechamente unida.^{44,45} Estas estructuras son comunes en fibras amiloides formadas por diferentes proteínas.⁴⁵ En la Figura 2.9 se muestran los dos tipos de cierres estéricos presentes en el modelo I. El tipo "intercapas" se forma en la interfase entre las dos capas de la fibra (Figura 2.9, regiones resaltadas en color azul), en donde las hojas β S2 de cada capa se unen cara a cara. El segundo tipo "intracapa" se forma entre una de las caras de las hojas β S1 y S2 en cada capa (Figura 2.9, regiones resaltadas en color verde). Los tres cierres estéricos

considerados en las interfases entre las cuatro hojas β apiladas forman el núcleo hidrofóbico del modelo (ver también Figura 2.1 *b*, en la página 11), y juegan un papel clave en la estabilidad de las fibras amiloides. En la Figura 2.9 se observan los cambios estructurales durante la DM comparando la estructura inicial (*a*) con la estructura después de la equilibración (*b*) y después de la simulación de producción (*c*).

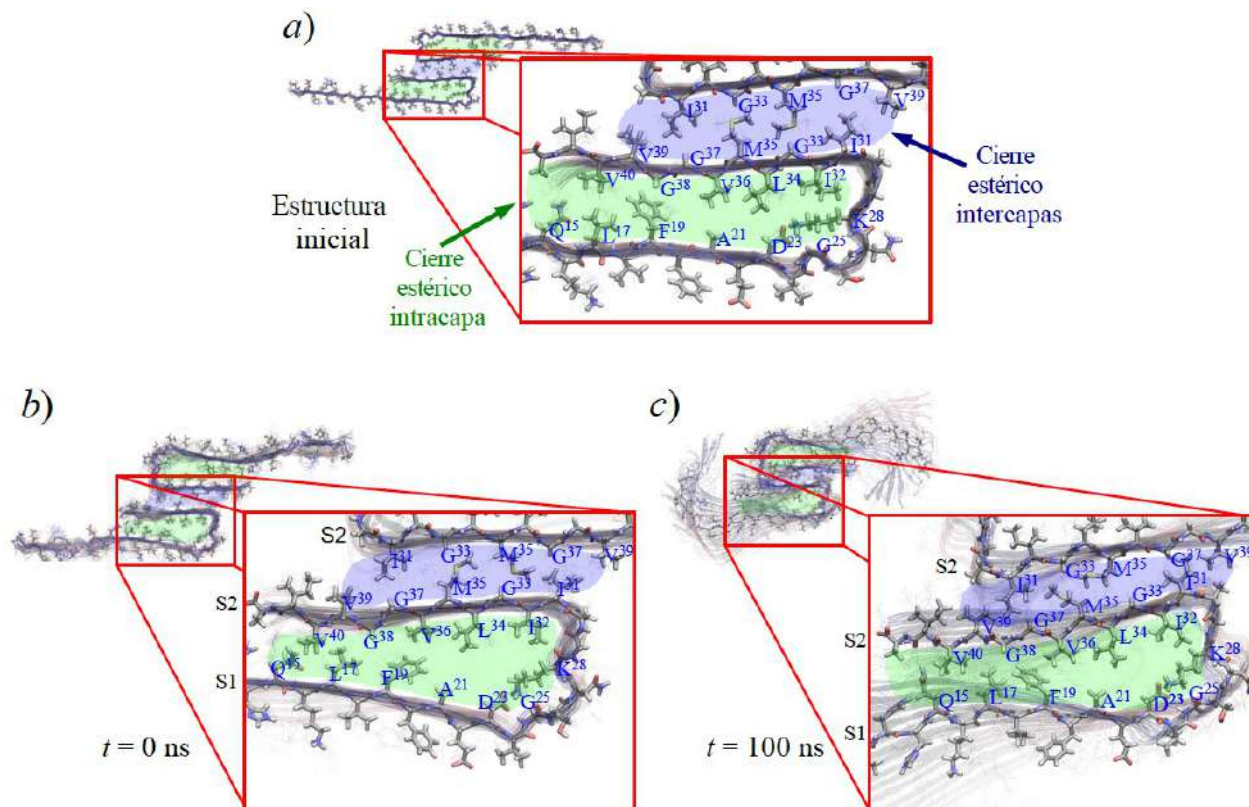


Figura 2.9. Estructura de los cierres estéricos del modelo I de fibra amiloide. En color azul se resalta el cierre estérico intercapas y en verde los cierres estéricos intracapa. *a*) Estructura inicial. *b*) Estructura después de la equilibración. *c*) Estructura final después de 100 ns de simulación.

El cierre estérico intercapas está formado por las cadenas laterales de los residuos Leu31, Gly33, Met35 y Gly37, provenientes de ambas capas de la fibra. Las hojas β S2 en cada capa se encuentran con orientación antiparalela una respecto a la otra, permitiendo a las cadenas laterales intercalarse para formar un ensamble compacto y libre de moléculas de agua. Como se observa en la Figura 2.9 *c*), las cadenas laterales dentro de este cierre estérico permanecieron alineadas "cara a cara" en dirección perpendicular al eje de la fibra; sin embargo, las hebras de una capa de la fibra se desplazaron con respecto a las hebras de la otra capa de tal forma que las cadenas laterales de cada capa se alternaron en forma de "zigzag" a lo largo del eje de la fibra (Figura 2.10 *a*). La función de distribución radial por pares $g(r)$ para los átomos C_{α} involucrados en esta interfase entre las dos capas (Figura 2.10 *d*), muestra que la distancia promedio más pequeña entre los C_{α} 's de una y otra capa es de ~ 6.5 Å. Esta distancia perpendicular al plano de la hoja β corresponde, por ejemplo, a la distancia entre el C_{α} del residuo Met35 de una capa, y el de la Gly33 en la otra capa. La función $g(r)$ muestra además otros dos picos en 9.2 y 9.9

Å, que corresponde a distancias diagonales entre C_{α} 's en dirección paralela y perpendicular a las hebras. En comparación, la función $g(r)$ para los cierres estéricos intracapa (Figura 2.10 e) muestran el menor pico a ~ 7.5 Å, mostrando una estructura menos compacta que el cierre estérico intercapas.

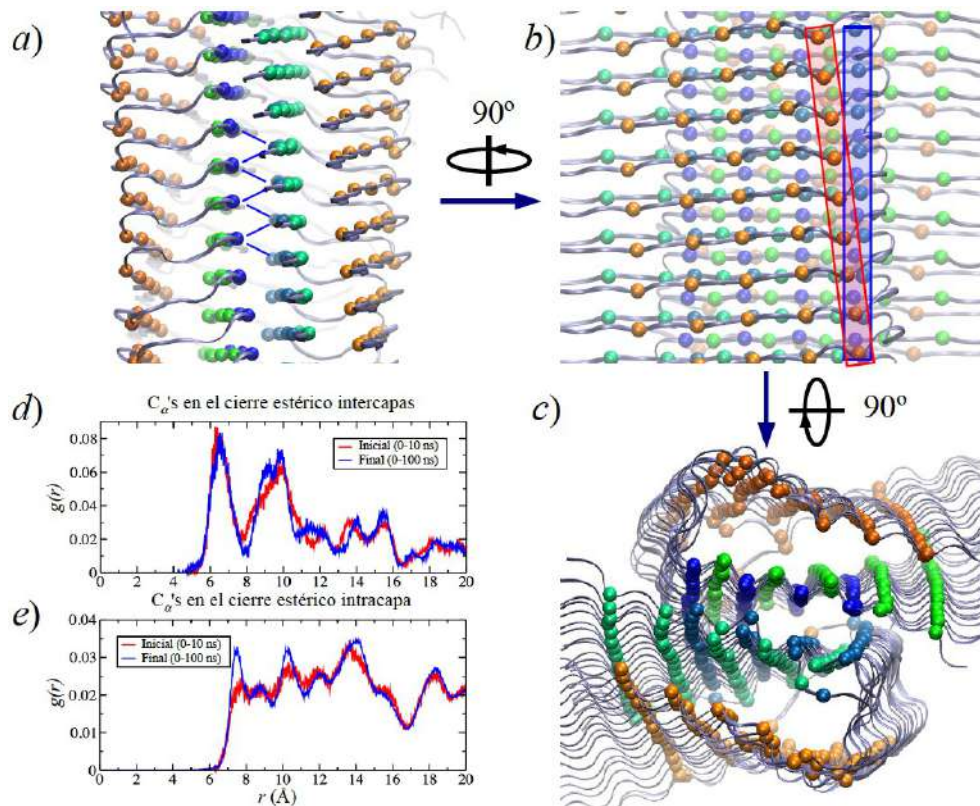


Figura 2.10. Posiciones relativas de los C_{α} 's en los cierres estéricos del modelo I. a) Vista lateral. b) Vista superior. c) Vista transversal. Función $g(r)$ para C_{α} 's en el cierre estérico intercapas (d) e intracapa (e).

Las cadenas laterales implicadas en los cierres estéricos intracapa son las provenientes de los residuos Leu17, Phe19, Ala21, Asp23 y Gly25 en la hoja β S1, y de los residuos Ile32, Leu34, Val16, Gly38 y Val40 de la hoja β S2 (Figura 2.9). Estos residuos forman un cierre estérico heterogéneo de naturaleza anfipática, lo cual produce una estructura diferente al cierre estérico intercapas. Como se observa en la Figura 2.9 (c), este cierre estérico no permaneció compacto en toda su extensión, ya que sufrió un ensanchamiento cerca de la región de bisagra (26-30). Este cambio se dio durante las etapas de equilibración y se manifiesta en la distribución de distancias entre C_{α} 's mostrada en la Figura 2.10 (e) como una función $g(r)$ más ancha y plana. A diferencia del cierre estérico intercapas, el cierre estérico intracapa no forma interacciones "cara a cara" entre la mayoría de las cadenas laterales de los residuos que lo conforman; para este cierre estérico sólo se observa esta alineación en la región de bisagra (Figuras 2.9 c y 2.10 b). Esta característica aunada a la formación del puente salino entre Asp23 y Lys28 imposibilita el contacto estrecho entre las hojas β S1 y S2, y, como consecuencia, originan el ensanchamiento de este cierre estérico. Cabe mencionar que el modelo en el estado sólido 2BEG propone este

tipo de cierre estérico completamente compacto y con interacciones "cara a cara" de sus cadenas laterales (Figura 2.9 a).³⁶ Las interacciones "cara a cara" observadas en el cierre estérico intercapas probablemente están favorecidas por la secuencia de aminoácidos y por la conformación particular de la cadena peptídica, ya que la ubicación de varios residuos de glicina evita que las cadenas laterales de otros residuos interfieran estéricamente entre sí. Esto parece ser un requisito estructural para obtener un cierre estérico compacto.

El ensanchamiento de los cierres estéricos intracapa tuvo como consecuencia la formación de un canal en cada capa de la fibra, los cuales permitieron el acceso de moléculas de agua hacia el interior del núcleo hidrofóbico. Esto produjo la solvatación de los puentes salinos formados entre los residuos Asp23 y Lys28 a lo largo del eje de la fibra. La formación y solvatación de estos canales también se reportó anteriormente en modelos de fibras $A\beta_{40}$ con arreglos distintos de las cadenas laterales a los utilizados en el presente trabajo.¹⁰² Además se analizó la formación de canales de agua en estructuras amiloides con cierres estéricos de naturaleza anfipática.¹⁰³ Durante la simulación se observó que las moléculas de agua atrapadas pueden formar puentes de hidrógeno con la cadena peptídica de la fibra, en algunos casos intercalándose entre las hebras. Estos resultados son consistentes con experimentos de espectroscopia de infrarrojo en dos dimensiones, en donde se demuestra la presencia de moléculas de agua en el interior de las fibras amiloides.¹⁰⁴ En este experimento se determinó que las cadenas laterales de los residuos Leu17, Val18, Ala21, Ile32, Leu34 y Val36, estarían "afectadas" por la presencia de las moléculas de agua y que cada hebra contendría 1.2 moléculas de agua en promedio.¹⁰⁴ La estructura final de los cierres estéricos intracapa muestra que el modelo I puede explicar la interacción de las cadenas laterales de la Val18, la Ala21, la Ile32 y la Leu34 con moléculas de agua, sin embargo, la interacción con la Leu17 y la Val36 con el solvente no se observa durante la simulación. En la Figura 2.11 se observa que cada hebra del modelo I contiene en promedio entre 4 y 9 moléculas de agua en el interior de núcleo hidrofóbico, y que la entrada de moléculas de agua se completó entre los primeros 10 a 20 ns de simulación.

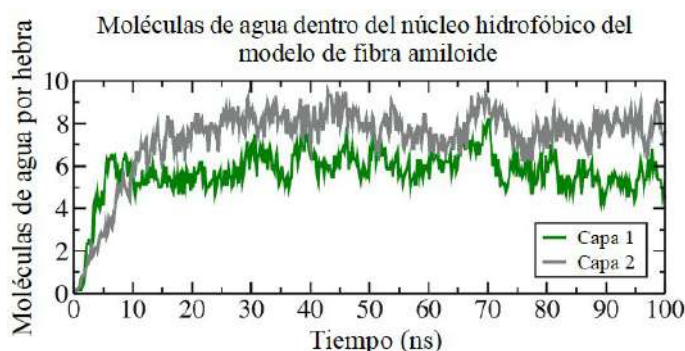


Figura 2.11. Número promedio de moléculas de agua por monómero $A\beta_{42}$ en el interior de los cierres estéricos intracapa del modelo I de fibra amiloide.

Además se observa que el número de moléculas de agua que entró al cierre estérico fue distinto en cada capa del modelo, en la capa 1 se observan alrededor de 6 moléculas, mientras que en la capa 2 entran en promedio ~8.

Este comportamiento asimétrico es similar al observado en el grado de torcimiento de cada capa (ver Figura 2.6 en la página 21), lo que sugiere que el número de moléculas de agua que solvatan el interior del núcleo hidrofóbico puede depender del grado de torcimiento de la fibra. La tendencia observada en el modelo I sugiere que a mayor grado de torcimiento de la fibra mayor es el número de moléculas de agua incorporadas en el interior de los cierres estéricos intracapa. Otra observación importante es que la formación de la cavidad en el cierre estérico se completó antes de que las moléculas de agua comenzaran a incorporarse en su interior, por lo que la formación de dicho canal no depende de la solvatación y más bien se asocia a la tensión estructural comentada anteriormente, (ver también la sección 2.4.2 en la página 17).

2.5.5. Distribución de los iones en la superficie de la fibra

La simulación de dinámica molecular del modelo I mostró que los iones Na^+ pueden interactuar de manera regioselectiva con la fibra amiloide, como se puede observar en la Figura 2.12, en donde se representan las posiciones finales de los iones Na^+ como círculos amarillos.

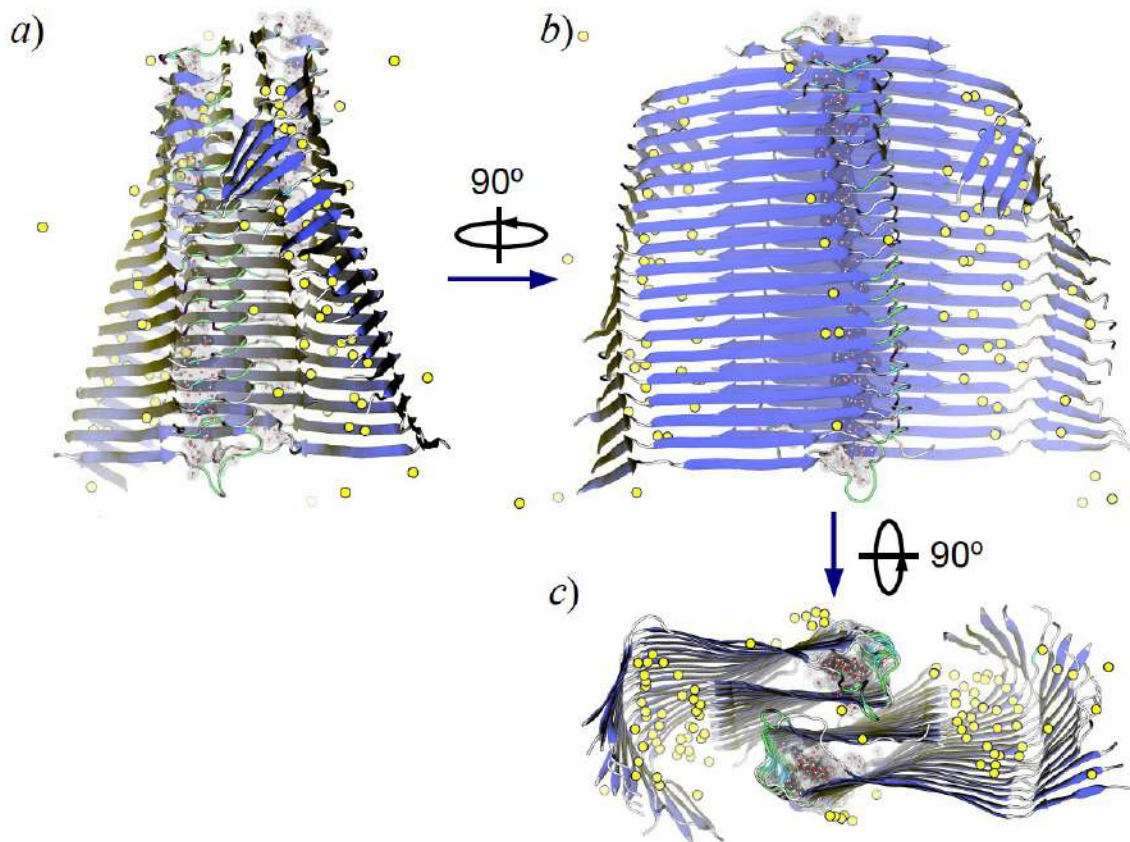


Figura 2.12. Estructura final del modelo I después de 100 ns de simulación. Se resaltan el torcimiento de la fibra, los motivos de estructura secundaria, las moléculas de agua en el interior de los cierres estéricos y los iones Na^+ en contacto con la fibra amiloide (círculos amarillos).

A pesar de que los iones al inicio de la simulación se encontraban distribuidos al azar en la caja del disolvente, al final de la simulación estos se concentraron en regiones específicas sobre la superficie de la fibra, en particular

en el espacio delimitado por el núcleo hidrofóbico de la fibra y el dominio N-terminal (Figura 2.12 c). En la Figura 2.13 a) se puede observar la evolución temporal del proceso de saturación de cationes Na^+ sobre la superficie de la fibra. Durante los primeros 10 ns de simulación, el número de iones a menos de 3.5 \AA de distancia de la fibra creció hasta llegar a ~ 90 iones, que representa más del 80% del total de los cationes presentes en el modelo. Durante el resto de la simulación, este número permaneció estable con ligeras fluctuaciones en el rango máximo de ~ 75 -100 átomos.

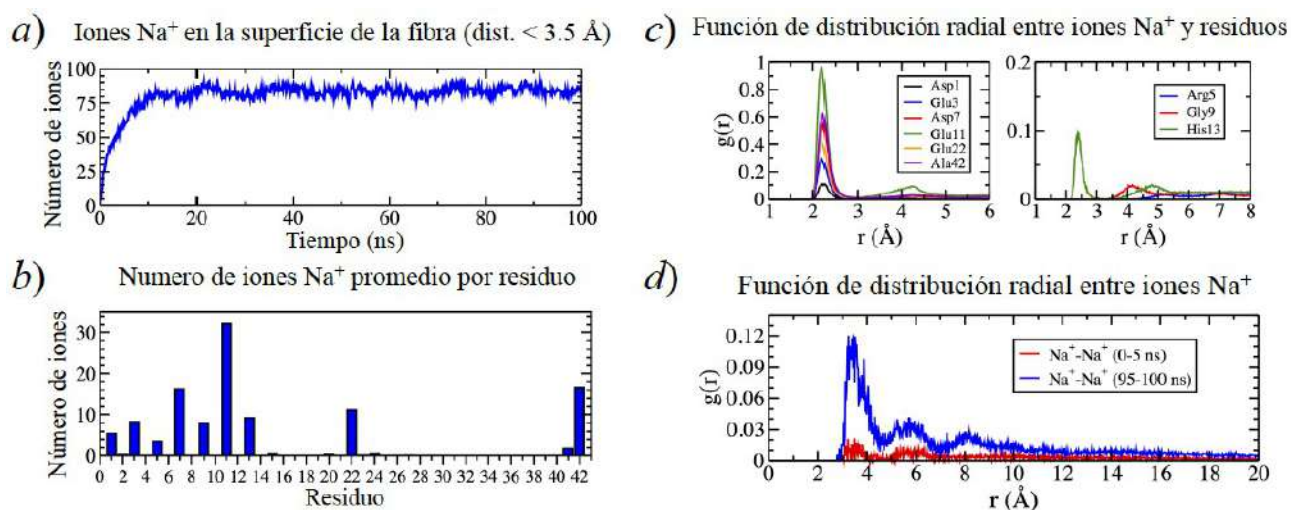


Figura 2.13. Interacción de los iones en el modelo I. a) Número de átomos de sodio (Na^+) a una distancia menor o igual a 3.5 \AA de la fibra. b) Número promedio de átomos Na^+ por residuo. c) Funciones $g(r)$ entre varios residuos y los iones Na^+ . d) Función $g(r)$ entre pares de átomos Na^+ .

Como se observa en la Figura 2.13 b), los residuos que presentaron mayor contacto con los iones Na^+ a lo largo de la fibra fueron Asp7, Glu11 y Ala42 (el grupo carboxilato terminal), con número de iones Na^+ promedio de 16.3, 32.2 y 16.7, respectivamente. Con excepción de Asp23, que no se encuentra en la superficie del modelo, el resto de los residuos ácidos (Asp1, Glu3 y Glu22) muestran valores considerables de 5.5, 8.2 y 11.2 iones, respectivamente. Es importante notar que algunos residuos no ácidos, (Arg5, Gly9 e His13) también entran en contacto con los iones Na^+ a un nivel comparable con algunos de los residuos ácidos. Esto ocurre claramente debido a la ubicación de estos aminoácidos en la secuencia proteica, (observe en la Figura 2.13 b que los residuos pares en el extremo N-terminal no entran en contacto con los iones por estar en la cara opuesta de la hoja β en donde se concentran los iones Na^+).

Con estos datos y la disposición espacial de los residuos (Figura 2.1 en la página 11) podemos afirmar que los grupos carboxilato de el Asp7, el Glu11 y la Ala42 (grupo COO^- -terminal) producen la regioselectividad de la interacción de los iones Na^+ observada en la simulación del modelo I, siempre y cuando estos residuos se sitúen en la misma cara de la hoja β S1. Esto se cumple en todo momento en el modelo I ya que la estructura β se encuentra sobreestimada en el extremo N-terminal. Las funciones $g(r)$ mostradas en la Figura 2.13 c), muestran que la His13, a diferencia de la His6 y la His14, entra en contacto estrecho con los iones debido también a su

posición en la secuencia de aminoácidos en la hoja β S1. La Figura 2.13 *d*) muestra que, al final de la simulación, la función de distribución radial entre los iones Na^+ adquiere una estructura de capas como resultado de la alta concentración en la superficie de la fibra en la región discutida.

En la Figura 2.12 se observa también el plegamiento particular de cada una de las hebras a lo largo de la fibra, el cual fue distinto en cada borde del modelo; en uno de los extremos del oligómero el dominio N-terminal de las hebras se encuentran más extendido, mientras que, en el otro extremo, de dominio N-terminal se encuentra plegado creando una segunda estructura de "bisagra" cerca de los residuos Ser8 y Gly9. Como se mencionó anteriormente, estos residuos tuvieron una participación nula en la formación de motivos de estructura secundaria de proteínas, hecho que puede estar relacionado con este plegamiento del dominio N-terminal. En este punto se puede relacionar la interacción regioselectiva de los iones sodio con el plegamiento del dominio hidrofílico N-terminal y, posiblemente, con la sobreestimación de los motivos de hojas β en esta región. De acuerdo a lo descrito anteriormente, el dominio N-terminal enriquecido con estructura β coloca varios residuos ácidos, (en particular el Asp7 y el Glu11), en una misma cara de la hoja β S1, lo que produce una alta densidad de carga negativa en esta región que se vuelve atractiva para los cationes presentes en el disolvente. Al mismo tiempo, el residuo alcalino Arg5, que se encuentra también en el lado indicado de la hoja β S1, es atraído por la densidad de carga negativa y favorece el doblamiento del dominio N-terminal de las hebras. Este efecto se da sólo en uno de los bordes de la fibra debido a que el traslape de las hebras entre las hojas β S1 y S2 no es completamente paralelo sino diagonal (ver Figura 2.10 *b*), por lo que el extremo N-terminal de las hebras en el borde superior de la fibra (Figura 2.12 *b*) se orientan en la dirección del borde opuesto cuando se encuentran más plegadas, mientras que las hebras en el borde opuesto se encuentran más extendidas.

2.6. Efecto de los iones y de la interacción con cationes divalentes

De acuerdo a la discusión de la sección anterior, la estructura β , sobrestimada por construcción en el dominio N-terminal del modelo I, probablemente favorece la interacción regioselectiva de los iones Na^+ sobre la superficie de la fibra. Al mismo tiempo, este efecto puede incrementar la estabilidad de las hojas β que, de otra manera, es inesperada en esta región. Como se comentó anteriormente, una fluctuación estructural alta por parte del dominio N-terminal, quizá en una escala de tiempo mayor a la considerada en la simulación descrita, podría revertir este comportamiento. Otra posibilidad es la coordinación específica del dominio N-terminal con metales de transición como cobre o zinc que impedirían la formación de hojas β ; este último caso se estudiará en el siguiente capítulo. En las próximas secciones se discute el efecto de la presencia de diferentes iones en la estructura, estabilidad y en la formación de motivos de estructura secundaria de las fibras amiloides. Esto se llevó a cabo utilizando modelos derivados de la estructura equilibrada del modelo I, (ver Figura 2.2, página 14). La comparación de las características de estos modelos secundarios permitirá esclarecer mejor el papel que juegan los iones metálicos en la estructura y estabilidad de las fibras amiloides.

2.6.1. Efecto de los iones en la estructura de las fibras amiloides

A diferencia del modelo I, que sólo incluyó el número de átomos Na^+ necesarios para neutralizar la carga neta de la fibra (-108), los modelos II-IV se crearon para evaluar el efecto de incluir diferentes tipos y números de iones en el medio, condiciones que se especificaron en la Tabla 2.1 (página 14). Estos modelos permiten evaluar la ausencia de iones (modelo II), la presencia conjunta de aniones y cationes en una concentración mayor (modelo III) y la presencia adicional de cationes divalentes (modelo IV). Además, el modelo V se construyó con 188 moléculas repetidas periódicamente a lo largo del eje de la fibra, en una representación de fibra amiloide de longitud infinita, cuya estructura se comparó con los otros modelos de oligómeros de tamaño finito (sección 2.7). En la Figura 2.14 se comparan las estructuras finales de los modelos II, III, y IV. También se muestra la estructura secundaria de cada modelo y se compara el plegamiento del dominio N-terminal en cada caso. A simple vista se puede observar que las estructuras de estos modelos muestran diferencias en el dominio N-terminal, mientras que el núcleo hidrofóbico parece similar en los tres casos.

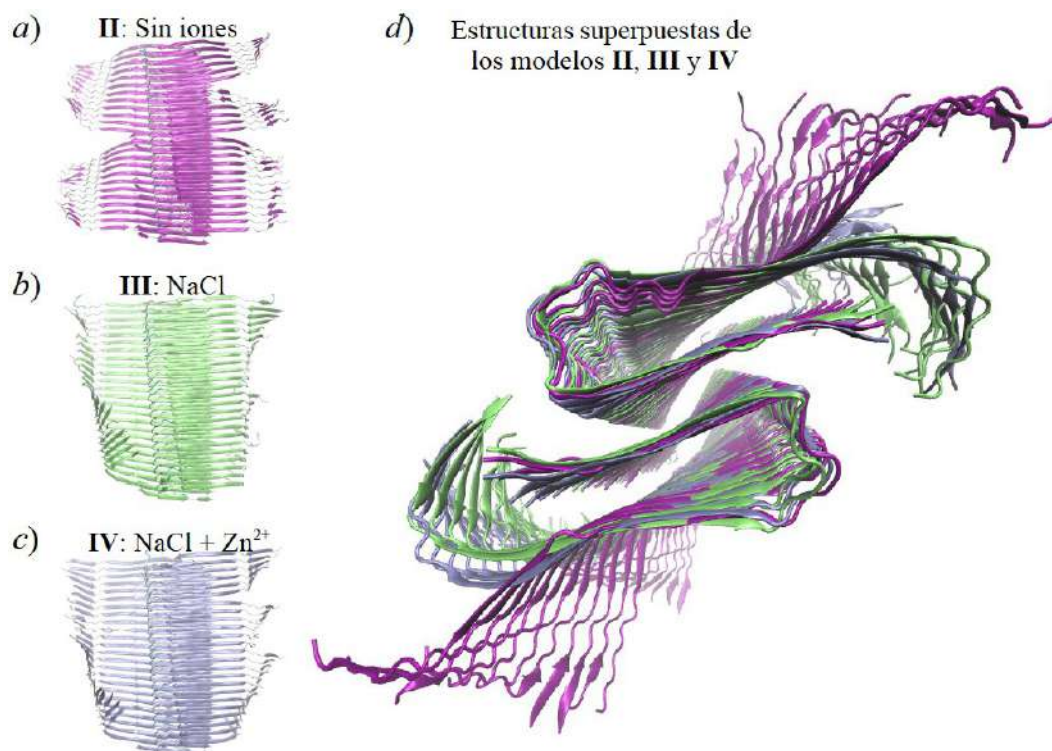


Figura 2.14. Estructura final de los modelos secundarios de fibra amiloide II (a), III (b), IV (c) y la superposición de las tres estructuras (d).

La Figura 2.14 a) muestra que, para el modelo II, ocurrió una disminución del motivo estructural hoja β en la región del dominio N-terminal, en comparación con los modelos III y IV. Dado que este modelo carece de iones en el disolvente, esta observación es compatible con la hipótesis de que la interacción regioselectiva de los cationes sobre la superficie de la fibra ayuda a mantener la estructura β en el dominio N-terminal de los modelos de fibra amiloide. Además, se puede apreciar (d) que el plegamiento del dominio N-terminal del modelo II

también es distinto al resto de los modelos; en lugar de plegarse en dirección del núcleo hidrofóbico (como ocurre con los modelos I, III y IV), las hebras parecen mantenerse extendidas o, en algunos casos, se doblan en la dirección opuesta. Al analizar los modelos III y IV (*b* y *c*), se encuentra una estructura consistente con la del modelo I, descrita en detalle en las secciones anteriores. Entre estos dos modelos también se encuentran ligeras diferencias en el plegamiento y en la estructura secundaria del dominio N-terminal; la presencia de los iones Zn^{2+} parece también distorsionar la hoja β previamente formada en el dominio N-terminal del modelo IV (*c*). Estas diferencias se pueden cuantificar en la Tabla 2.2, en donde se comparan algunas propiedades estructurales de los diferentes modelos. Estos valores se calcularon como un promedio temporal a lo largo de la simulación de DM de 100 ns.

Tabla 2.2. Propiedades estructurales promedio de los modelos de fibras amiloides.

Modelo	I	II	III	IV	V
Incidencia del motivo hoja β (fibra completa) (%)	70	64	69	67	<i>b</i>
Incidencia del motivo hoja β (núcleo hidrofóbico 17-42) (%)	67	69	71	69	<i>b</i>
Incidencia del motivo hoja β (dominio N-terminal 1-9) (%)	52	25	40	34	<i>b</i>
Ángulo de giro por hebra ($^{\circ}$)	2.4	2.1	1.8	1.7	1.9
Distancia de giro total de la fibra (nm) ^a	36	41	47	50	46
Número de moléculas de agua por hebra en el interior del núcleo hidrofóbico	6.8	6.3	5.6	5.9	1.1

^a Calculado a partir del ángulo de giro promedio por hebra, considerando el número de hebras necesario para conseguir un giro de 180° y un espaciado entre las hebras de 4.77 \AA .

^b No calculado.

La incidencia de estructura secundaria β mostrada en la Tabla 2.2 muestra que, con respecto al modelo I, los modelos secundarios (II-IV) mantuvieron o incrementaron ligeramente este motivo en el núcleo hidrofóbico, mientras que lo disminuyeron considerablemente en el dominio N-terminal. Esto sugiere que la estructura del núcleo hidrofóbico es poco sensible a la presencia de los iones en el medio, a diferencia del dominio N-terminal, cuya estructura se distorsiona debido a interacciones específicas con los iones. La ausencia de iones en el modelo II, que produce un cambio en el plegamiento del dominio N-terminal, produce una disminución de 27% en la incidencia de estructura β en este dominio. En el caso del modelo III se encontró una disminución del 12% de estructura β al incorporar iones Cl^{-} y Na^{+} en una concentración mayor. A su vez, la adición de 48 iones Zn^{2+} , produjo una disminución del 18% de las hojas β en el modelo IV.

Los parámetros de ángulo de giro por hebra promedio para los modelos II-IV (Tabla 2.2), muestran que las condiciones de ionización tienen un efecto mínimo sobre el grado de torcimiento de la fibra. De estos, el modelo en ausencia de iones (II) se encuentra ligeramente más torcido que los modelos con iones, de los cuales, el

modelo en presencia de Zn^{2+} muestra el menor grado de torcimiento. Curiosamente, el modelo I, que se sólo incluye 108 iones Na^+ , mostró el mayor grado de torcimiento; sin embargo, es posible que el tamaño del sistema pueda influir en este resultado, (36 monómeros en el modelo I contra 48 en los modelos II-IV). En el caso del modelo V, la comparación no es aplicable ya que, al ser un modelo de fibra periódica, el ángulo de giro se encuentra restringido.

El ángulo de giro por hebra observado en cada modelo puede utilizarse para estimar la distancia en que la fibra completaría un giro global de 180° . Estos valores, reportados en la Tabla 2.2, se encontraron en el rango de 36 a 50 nm, completamente dentro del rango observado experimentalmente (25-300 nm).^{24,47} El número de moléculas de agua por hebra dentro del núcleo hidrofóbico, incluido en esta tabla, confirmó la tendencia observada en cada una de las capas del modelo I, en la que un mayor grado de torcimiento de la fibra permitió un mayor número de moléculas de agua dentro del cierre estérico (ver Figura 2.11). En el caso del modelo periódico (V), los canales en los que entran las moléculas de agua se encuentran aislados del medio, por lo que hubo un número muy limitado de moléculas de agua en el interior de los canales durante la simulación. Sin embargo, la entrada de moléculas de agua en el núcleo hidrofóbico se observó en la región de bisagra (residuos 24-30) entre algunas de las hebras a lo largo del eje de la fibra. Este proceso se favoreció en parte por el doblamiento (curvatura) de la fibra (que se describirá en la sección 2.7). El número de moléculas de agua por hebra encontrado en este modelo (1.1) es comparable al valor propuesto experimentalmente (1.2 moléculas por hebra).¹⁰⁴

El efecto de los iones en el plegamiento del dominio N-terminal de las fibras se puede analizar en la Figura 2.15, donde se muestran las funciones de distribución radial por pares entre los átomos C_α de los extremos N- y C-terminal. Esta distancia es una medida del grado en el que el dominio N-terminal se plegó en dirección del núcleo hidrofóbico; las distancias menores sugieren un mayor grado de plegamiento, mientras que una mayor distancia significa que el dominio N-terminal permaneció extendido. En estas funciones sólo consideraron las estructuras al final de cada simulación, (tiempo entre 95 y 100 ns).

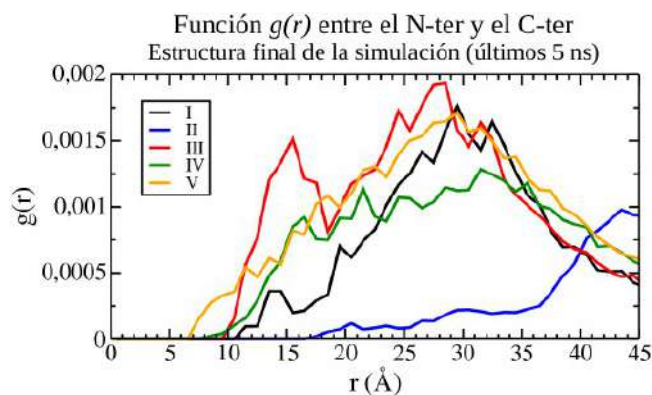


Figura 2.15. Función de distribución radial entre los extremos N- y C-terminal de cada hebra de los modelos I-V.

Las formas de las distribuciones mostradas en esta figura confirman las tendencias observadas en las estructuras finales de los diferentes modelos (Figura 2.14 *d*). El modelo II muestra el menor grado de plegamiento con su dominio N-terminal extendido (el máximo en su función $g(r)$ se encontró a 43 Å). Los modelos I, III y V, que incluyen átomos Na^+ como catión, muestran máximos alrededor de 29 Å. Sin embargo, el modelo I parece estar menos plegado que los modelos III y V, probablemente como resultado de la presencia de un número menor de iones Na^+ y la ausencia de iones Cl^- . El modelo III mostró el mayor grado de plegamiento de su dominio N-terminal, lo cual se manifestó como un segundo máximo a 15 Å en la $g(r)$ que no se observó en ningún otro modelo. Considerando que los modelos III y V tienen la misma concentración de iones, se puede suponer que la ausencia de este máximo en la $g(r)$ del modelo V es consecuencia de las condiciones a la frontera periódicas; esto significaría que el estrecho plegamiento del dominio N-terminal solo se observaría en agregados oligoméricos pequeños y no en fibras amiloides largas. El modelo IV, que incluye iones Zn^{2+} , mostró una distribución ancha y más aplanada que el resto, con un máximo no muy pronunciado a 31 Å. Esto sugiere que hay una mayor diversidad estructural en el dominio N-terminal de este modelo, probablemente debido a interacciones específicas con el ion metálico y por la distribución no uniforme de los iones a lo largo de la fibra, esto se analiza a continuación.

2.6.2. Interacción del ion zinc en la superficie de la fibra amiloide

En la sección 2.5.5 se analizó la interacción de los iones Na^+ en el modelo I; en este caso se describe la interacción de los iones Zn^{2+} con las fibras amiloides. Cabe mencionar que se eligió utilizar Zn^{2+} en estos cálculos (en lugar de Cu^{2+}) debido a la disponibilidad de parámetros empíricos en el campo de fuerza de CHARMM; no obstante, la interacción de Zn^{2+} con las fibras amiloides es tan relevante como la interacción del Cu^{2+} . El modelo IV consideró en el disolvente una concentración 0.1 M de iones Na^+ y Cl^- , (169 y 265 átomos, respectivamente), y además se incluyeron 48 átomos de Zn^{2+} (1 eq). La Figura 2.16 muestra la evolución temporal del proceso de saturación de los iones en la superficie del modelo IV.

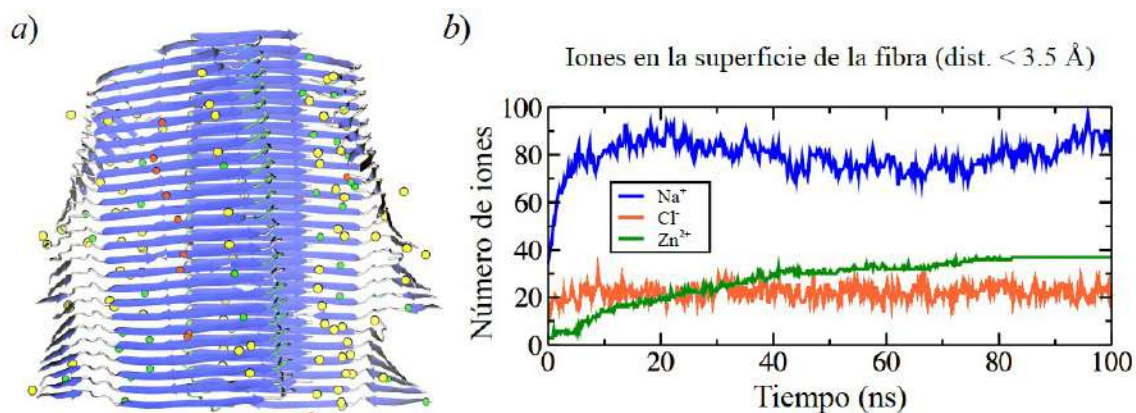


Figura 2.16. Interacción de los iones con el modelo IV de fibra amiloide. *a*) Estructura final mostrando iones Na^+ en amarillo, Cl^- en naranja y Zn^{2+} en verde. *b*) Número de iones en la superficie de la fibra con respecto al tiempo de simulación.

En la Figura 2.16 *a*) se puede observar que la región en la que interactúan los iones de zinc es prácticamente la misma que para los iones de sodio, (compare con la Figura 2.12 *b*). En (*b*) se puede observar que la saturación de los iones Na^+ se completó mucho más rápido que con los iones Zn^{2+} ; en el primer caso, se alcanzó un número de iones cercano a 90 durante los primeros 20 ns, mientras que el número de átomos de zinc se incrementó lentamente hasta alcanzar un máximo de 37 átomos después de 80 ns. Esta gráfica también muestra que existe una competencia entre estos cationes por la fibra; esto se observó como una disminución del número de átomos de Na^+ después de 20 ns a medida que se incrementó el número de iones Zn^{2+} . Sin embargo, hacia el final de la simulación, cuando se saturó el número de átomos de zinc en contacto con la fibra, el número de átomos de sodio se volvió a incrementar. Esto también se puede interpretar en la estructura como un radio de exclusión entre los cationes, ya que se pueden apreciar zonas en las que el número de iones Na^+ se reduce por la presencia de iones Zn^{2+} . Así mismo, algunas regiones del dominio N-terminal parecen distorsionadas en su plegamiento y estructura secundaria por la interacción con los cationes.

En el modelo III, donde se incluyó la misma concentración de iones Na^+ y Cl^- , pero en ausencia de Zn^{2+} , el comportamiento del ion cloruro fue idéntico al observado en la Figura 2.16 *b*), mientras que el número de iones sodio en contacto con la fibra se elevó hasta aproximadamente 150 átomos. La diferencia entre el número máximo de iones Na^+ en los modelos III y IV se debe a que la interacción regioselectiva de los cationes es favorecida solo mientras la carga de -3 de cada molécula $\text{A}\beta_{42}$ se neutraliza. El modelo III, que se saturó con un mayor número de átomos de Na^+ , mostró en general un mayor grado de plegamiento del dominio N-terminal hacia el núcleo hidrofóbico que en el modelo IV. Esto puede indicar que la exclusión de los iones Na^+ por parte de los iones Zn^{2+} en la superficie de la fibra del modelo IV inhibe el plegamiento mencionado del dominio N-terminal, proceso que también se puede conectar con la disminución de la estructura β .

2.7. Estructura del modelo de fibra amiloide de longitud infinita

La pseudosimetría utilizada en los modelos de fibra amiloide (C_{2z}), donde el eje z coincide con el eje de crecimiento de la fibra, permitió generar un modelo periódico en el que la estructura helicoidal de la fibra se reprodujo en las celdas periódicas vecinas simulando una estructura de longitud infinita (modelo V). Esto se llevó a cabo "extrapolando" la estructura equilibrada del modelo III, el cual produjo un torcimiento de sus hebras de tal forma que, en una longitud teórica de 47 nm sobre el eje de la fibra (ver Tabla 2.2), se completa un giro de 180° de su estructura helicoidal, (en la sección 2.3.3 se detalló la construcción de este modelo). Existen reportadas simulaciones periódicas con esta y otras simetrías en modelos de fibras amiloides más pequeños,^{102,105} sin embargo, estos modelos no consideran el torcimiento de las fibras amiloides, por lo que, al ser modelos periódicos, se eliminó la posibilidad de estudiar tal característica. Por otro lado, la interacción de las fibras amiloides con iones metálicos también se estudió usando modelos de fibras amiloides en optimizaciones o simulaciones cortas para ayudar a la interpretación de observaciones experimentales.^{106,107} El modelo V, en

cambio, permitió el análisis de la estructura dinámica en una simulación más larga (100 ns) que consideró la estructura helicoidal de las fibras amiloides, y que además permitió el estudio del dominio N-terminal y su interacción con los iones en el medio. En la Figura 2.17 se puede observar la estructura del modelo V al inicio y después de 100 ns de simulación.

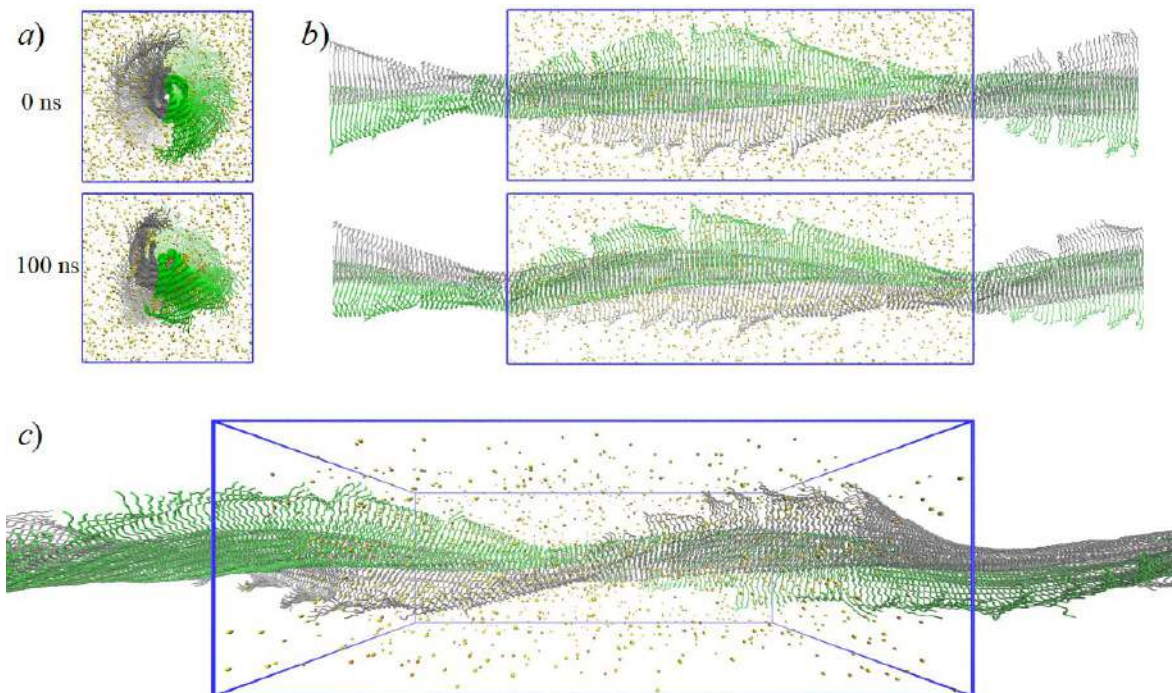


Figura 2.17. Estructura del modelo V de fibra amiloide de longitud infinita. a) Vista perpendicular al eje de la fibra. b) Vista lateral. c) Vista en perspectiva que permite ver el espacio considerado como celda unitaria, delimitado por las líneas azules.

En esta figura se muestran los límites de la celda unitaria utilizada en la simulación con condiciones a la frontera periódicas (líneas azules). Esta caja tiene unas dimensiones aproximadas de $16.1 \times 16.2 \times 44.5 \text{ nm}^3$, y en su interior se muestran los átomos de Na^+ y Cl^- inmersos en el solvente explícito (no mostrado). En b) y c) se incluyeron las estructuras de las celdas periódicas vecinas en la direcciones $\pm z$, en donde se aprecia que los extremos de la fibra en cada celda se encuentran directamente conectados. Comparando las estructuras a 0 y 100 ns, se observa que la estructura global de la fibra sufrió una deformación durante la simulación, la cual se puede apreciar como una curvatura o doblamiento a lo largo de la celda unitaria (Figura 2.17 b).

La gráfica de RMSD C_α del modelo V (Figura 2.18 a) muestra que el doblamiento de la fibra se completa durante los primeros 30 ns de simulación, después de esto la estructura parece estabilizarse con ligeras fluctuaciones. De manera interesante, el RMSD medido exclusivamente para el núcleo hidrofóbico crece de manera casi paralela al medido para la fibra completa; esto sugiere que el dominio N-terminal no presentó cambios estructurales importantes además de la misma deformación de la fibra completa, (compare con la gráfica equivalente para el modelo I en la Figura 2.5, página 20). La similitud de estas dos curvas es congruente

con la afirmación de que, en el modelo de fibra amiloide de longitud infinita, el plegamiento del extremo N-terminal hacia el dominio hidrofóbico estaría limitado por las interacciones con las hebras vecinas en fibras amiloides largas (sección 2.6.1). Sin embargo, la Figura 2.15 muestra que si se encontró una pequeña fracción de hebras muy plegadas para este modelo. La Figura 2.18 b) muestra que no hay cambios significativos en el ángulo de giro promedio entre las hebras, resultado esperado en un modelo periódico; sin embargo, el torcimiento parece ser asimétrico entre las dos capas del modelo. Esta observación probablemente está relacionada a la deformación de la fibra, donde una de las capas se enrolla o envuelve a la otra capa.

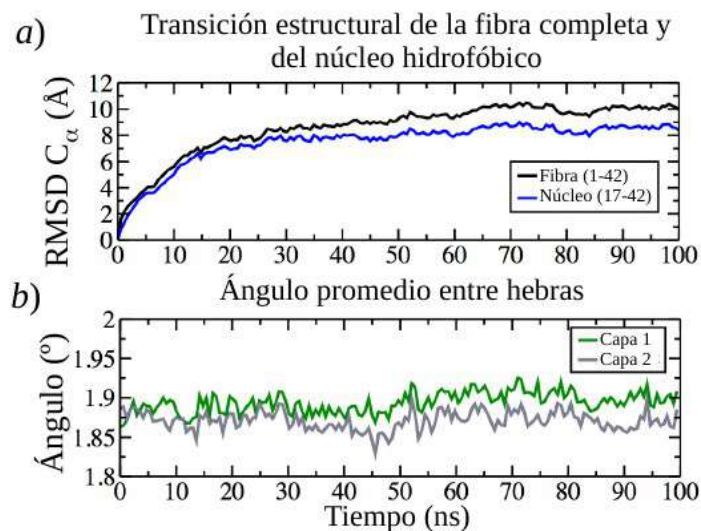


Figura 2.18. RMSD C_{α} (a) y ángulo de giro promedio (b) para el modelo V de fibra amiloide..

La estructura asimétrica de las dos capas del modelo V de fibra amiloide, encontrada también en los modelos I-IV, puede ser el origen de la curvatura o doblamiento del modelo de longitud infinita, situación que no se esperaba en primera instancia. No obstante, esta característica no es incompatible con la morfología de las fibras observada experimentalmente, ya que son conocidas las estructuras "superenrolladas" de las fibras amiloides maduras. En sentido estricto, el modelo V corresponde a una "protofibra" que es una unidad estructural de las fibras amiloides maduras; dos o más protofibras se asocian lateralmente para formar fibras maduras que suelen observarse superenrolladas.^{19,35} La estructura curva del modelo V podría manifestar la necesidad de acoplarse con una o más protofibras vecinas para encontrar una estructura lineal más estable compatible con el superenrollamiento de las fibras amiloides maduras. Otra posible explicación es que, al incrementar el tamaño del agregado (del modelo III utilizado para generar el modelo V), los parámetros de giro de la fibra podrían modificarse de tal forma que sea necesario un reajuste del tamaño de la celda unitaria. De acuerdo con las tendencias observadas en los distintos modelos, un agregado más grande disminuye su grado de torcimiento y llevaría a una longitud de giro mayor. De hecho, la distancia de giro promedio teórica (46 nm) es ligeramente mayor a la requerida cuando se construyó el modelo (44.5 nm), debido a irregularidades estructurales entre las hebras que componen el modelo.

2.8. Conclusiones

En este capítulo se presentó el modelado atomístico de fibras amiloides basado en estructuras experimentales que describen los contactos intra e intermoleculares de su núcleo hidrofóbico. Los modelos creados extendieron la descripción de las estructuras propuestas experimentalmente con elementos que generalmente han sido ignorados en estudios previos, como son la estructura del dominio N-terminal y el efecto de los iones metálicos en contacto con las fibras. Las simulaciones de dinámica molecular mostraron que los modelos cumplen en general con la mayoría de las características descritas experimentalmente para las fibras amiloides, por lo que se consideraron adecuados para el análisis de su estructura molecular.

En comparación con la estructura experimental en estado sólido, las simulaciones en solución a temperatura fisiológica mostraron cambios importantes en el núcleo hidrofóbico de las fibras, en particular se observó que los cierres estéricos anfipáticos formaron canales que permitieron la solvatación de los residuos polares confinados en el núcleo hidrofóbico, en un proceso que incrementaría la estabilidad de la estructura. Por su parte, el cierre estérico hidrofóbico permaneció compacto y estable conservando la estructura observada en el estado sólido, permitiendo además el torcimiento de las fibras en acuerdo con la topología observada experimentalmente. Este torcimiento produce la estructura helicoidal de las fibras y parece un característica invariable del motivo β cruzado, considerado en todos los modelos. Durante las simulaciones se observó que los agregados más pequeños y/o con una baja (o nula) concentración de iones, tienden a sufrir un mayor grado de torcimiento. También se encontró que el grado de torcimiento de la fibra tiene un efecto sobre la solvatación del interior del núcleo hidrofóbico, ya que las fibras más torcidas permiten un mayor número de moléculas de agua en su interior.

La cuantificación detallada de la estructura de tipo β en los diferentes modelos resultó congruente con varias estimaciones experimentales para el núcleo hidrofóbico de las fibras amiloides, mientras que, para el dominio N-terminal, se encontró una incidencia de este motivo con un tiempo de vida superior al esperado. La interacción de los iones metálicos presentes en el medio tuvo un efecto importante sobre la formación de la estructura β en el dominio N-terminal, ya que una alta concentración de iones Na^+ estabilizaron la formación de hojas β , mientras que la presencia de iones Zn^{2+} interfirió con esta actividad. Debido a la estabilización de la estructura β en el dominio N-terminal y la consecuente orientación selectiva de las cadenas laterales de residuos ácidos de la proteína $\text{A}\beta_{42}$, se observó una acumulación regioselectiva de cationes sobre la superficie de las fibras amiloides. Este proceso estuvo acompañado de un plegamiento particular del extremo N-terminal de las hebras que forman el dominio N-terminal en el que las cadenas se doblaron dirección del núcleo hidrofóbico, encapsulando los iones acumulados en la superficie de la fibra. Este comportamiento, descrito por primera vez para el dominio N-terminal de las fibras amiloides $\text{A}\beta_{42}$, podría explicar la alta concentración de metales de transición que se observa en las placas amiloides como resultado de un incremento de la estructura de tipo β .

Capítulo 3. La coordinación del cobre a la proteína β amiloide

3.1. Antecedentes

Diversas enfermedades neurodegenerativas, incluida la AD, tienen como una de sus características la presencia de concentraciones elevadas de metales de transición en las placas amiloides en el cerebro de los pacientes que las padecen.^{108,109} De hecho, se han reconocido una variedad de proteínas relacionadas con enfermedades neurodegenerativas que tienen alta afinidad por biometales.^{74,110-112} Las funciones fisiológicas asociadas a la unión del cobre con proteínas intrínsecamente desordenadas aún no están completamente comprendidas. No obstante, en el caso de la proteína $A\beta$, la unión a cobre se ha relacionado con efectos neurotóxicos y con su proceso de agregación.⁷ Por este motivo, la comprensión de los mecanismos moleculares implicados en la coordinación del cobre y otros metales a la proteína $A\beta$ es de interés.

3.1.1. La coordinación del cobre a la proteína β amiloide

Diversos estudios pioneros, dedicados a estudiar la coordinación del Cu^{2+} a la proteína $A\beta$, establecieron que el modo de coordinación del complejo es de tipo 3N1O.¹¹³⁻¹¹⁶ Dependiendo del pH, existen diferentes especies del complejo que varían en su modo de coordinación,¹¹⁷ aunque las especies más relevantes a pH fisiológico se conocen como los componentes I y II. El valor de pH en el que los componentes I y II se encuentran en equilibrio es 7.8.^{117,118} A valores bajos de pH, donde el componente I predomina, se observa un modo de coordinación 3N1O, donde los ligandos N en el plano ecuatorial del cobre incluyen al grupo N-terminal, un átomo N imidazólico proveniente de la His6 y otro proveniente de la His13 o de la His14.¹¹⁹⁻¹²¹ El ligante basado en O es motivo de debate, ya que originalmente se propuso la participación del grupo carboxilato del Asp1,^{116,119} mientras que los estudios más recientes propusieron que el O coordinado al Cu^{2+} en el plano ecuatorial proviene del grupo carbonilo del Asp1 con una posible participación del grupo carboxilato del Asp1 en posición axial.^{120,122-125} El modo de coordinación del componente II, que comienza a predominar a pH por arriba de 7.8, es también de tipo 3N1O, pero los ligandos involucrados en este caso son el grupo N-terminal, la amida desprotonada (N^-) de la Ala2, un Nimidazólico de la His6 y el O del grupo carbonilo de la Ala2.^{120,122,123} Estas asignaciones son las más aceptadas pero no excluyen otras posibilidades, como se ha hecho evidente en experimentos de NMR.¹²⁵ Además de estos complejos, se han estudiado los complejos entre cobre o zinc y diferentes variantes de la proteína $A\beta$ que también son relevantes a nivel fisiológico.^{126,127}

3.1.2. Cálculos de estructura electrónica en complejos M- $A\beta$

Los métodos computacionales basados en la mecánica cuántica son útiles en el estudio de los complejos entre metales de transición y la proteína $A\beta$, en particular los métodos basados en la teoría de funcionales de la densidad (DFT). Estos métodos complementan los resultados experimentales ya que permiten crear modelos de

sistemas que son difíciles de estudiar experimentalmente. Además permiten hacer conjeturas y verificar datos experimentales con una descripción atomística o electrónica, así como calcular propiedades que no son fácilmente observables en el laboratorio y que ofrecen información que complementan la comprensión del sistema real. En particular, se han reportado estudios en complejos de la proteína A β o de modelos más pequeños con Cu⁺, Zn²⁺ o Cu²⁺, analizando su estructura y estabilidad, así como su participación en procesos de oxidoreducción.¹²⁸⁻¹³⁴ También hay algunos reportes teórico-experimentales en donde se usan modelos de complejos de cobre con agregados amiloides.^{106,107}

En el presente trabajo hay una particular motivación por estudiar la coordinación del cobre con estructuras fibrilares, por lo que en este capítulo se planteó la estrategia de analizar, haciendo uso de una metodología que considere todos los electrones del sistema, la formación de complejos Cu²⁺-A β tomando como punto de partida la estructura de las fibras amiloides estudiada en el capítulo anterior. Esto implica que en lugar de utilizar una proteína con estructura aleatoria o con motivos de estructura secundaria α , que es como se encontraría la forma monomérica de este péptido, se utilizó una estructura de tipo predominantemente β que pueda fácilmente incorporarse a un modelo de fibra amiloide. A diferencia de la metodología aplicada en el capítulo anterior, en esta parte del trabajo se mejoró la descripción de la interacción de la proteína A β con el cobre, ya que se emplean cálculos de estructura electrónica, por lo que las conclusiones derivadas de estos cálculos deben considerarse como un refinamiento de la descripción de las interacciones descritas en el capítulo anterior.

3.2. Objetivos

3.2.1. Objetivo general

- Estudiar la coordinación del cobre al extremo N-terminal de la proteína β amiloide así como el efecto en su estructura.

3.2.2. Objetivos particulares

- Generar diferentes modelos moleculares del complejo Cu²⁺-A β ₁₇.
- Evaluar la participación de diferentes residuos en la estabilidad del complejo.
- Evaluar el efecto de la coordinación del cobre en la estructura de la proteína A β .
- Comparar diversas propiedades y parámetros derivados de los modelos con mediciones experimentales.

3.3. Metodología

3.3.1. Construcción de modelos del complejo $\text{Cu}^{2+}\text{-A}\beta$

Los modelos de coordinación del Cu^{2+} a la proteína β amiloide humana de 42 aminoácidos ($\text{A}\beta_{42}$) creados en este trabajo involucran a la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 1.1 (página 3). Se sabe que el sitio de unión a cobre en esta secuencia se encuentra ubicado dentro de los primeros 16 residuos en el dominio hidrofílico N-terminal,¹¹⁶ por lo que ninguno de los residuos restantes (17-42) participarían en la coordinación al metal. De hecho, el péptido $\text{A}\beta_{16}$ es comúnmente utilizado en los estudios experimentales de interacción con cobre mediante diversas técnicas como un modelo simplificado de la proteína de 42 aminoácidos.¹²⁷ El principal beneficio de utilizar el modelo $\text{A}\beta_{16}$, además del hecho de que posee la misma esfera de coordinación que la $\text{A}\beta_{42}$, es su alta solubilidad en agua, lo que le permite permanecer en forma monomérica en solución y evitar así los problemas de agregación encontrados al utilizar la proteína completa. Para fines de cálculos de estructura electrónica, el modelo $\text{A}\beta_{16}$ también resulta ventajoso ya que el número de átomos que se deben considerar para describir proteína $\text{A}\beta_{42}$ es muy grande (arriba de 600 átomos) y resulta demasiado costoso en términos computacionales. En el presente trabajo se utilizó el modelo $\text{A}\beta_{17}$, que considera el fragmento tradicional N-terminal de 16 aminoácidos, incluyendo además a la Leu17. Este último residuo se utilizaría como "ancla" para posteriormente acoplar el dominio N-terminal coordinado a cobre al resto de la secuencia de 42 aminoácidos.

En la Figura 3.1 se muestra un esquema general del procedimiento utilizado para obtener diversos modelos del complejo $\text{Cu}^{2+}\text{-A}\beta_{17}$, que en conjunto consideran una variedad de residuos coordinados al metal con diferentes geometrías y modos de coordinación. A partir de éstos se generaron otros modelos más pequeños que consideraron a los péptidos $\text{A}\beta_3$ y $\text{A}\beta_6$. Todos los modelos incluyeron dos moléculas de agua cercanas (o en algunos casos coordinados) al ion metálico. A continuación se describe la metodología aplicada en cada paso.

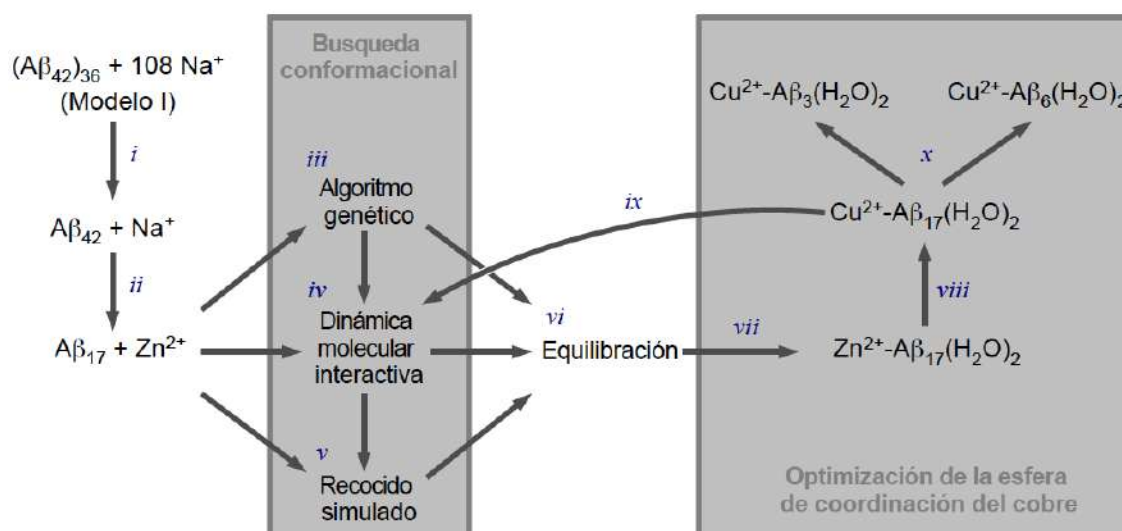


Figura 3.1. Procedimiento para la obtención de los modelos de los complejos $\text{Cu}^{2+}\text{-A}\beta_n$, $n = 3, 6$ y 17 .

Como se muestra en la Figura 3.1 *i*, la estructura del péptido $A\beta_{17}$ utilizada se derivó del modelo de fibra amiloide $A\beta_{42}$ de 36 monómeros estudiado en el Capítulo 2 (modelo I). A partir de la estructura de este modelo, equilibrado a temperatura fisiológica durante 50 ns, se tomó el noveno monómero $A\beta_{42}$ de la capa 1 de la fibra, elegido por encontrarse en una posición intermedia a lo largo del eje de la fibra amiloide. También se consideraron las coordenadas de uno de los iones Na^+ cercano a esta hebra. De esta cadena se eliminó el extremo C-terminal, conservando sólo el fragmento 1-17 con estructura predominantemente β extendida y se cambió el átomo de sodio por un ion metálico divalente Zn^{2+} (*ii*). El extremo C-terminal de este fragmento fue metilacetilado. En las etapas de búsqueda conformacional (*iii-vi*) se utilizó un átomo Zn^{2+} en lugar de Cu^{2+} debido a que el campo de fuerza empleado (CHARMM) no incluye parámetros para el ion cobre. Sin embargo, las etapas de optimización de la esfera de coordinación (*vii* y *x*) se realizaron mediante cálculos de estructura electrónica que no dependen de parámetros empíricos, por lo que en éstos se reemplazó el átomo Zn^{2+} por Cu^{2+} .

3.3.2. Búsqueda conformacional aplicada a la obtención de distintos modos de coordinación

A partir de la estructura extendida del péptido $A\beta_{17}$, que incluye un átomo de Zn^{2+} en su cercanía, se aplicaron diferentes estrategias de búsqueda conformacional sobre la estructura del péptido con la intención de obtener diversos modelos del complejo Zn^{2+} - $A\beta_{17}$, (Figura 3.1 *iii*, *iv* y *v*). Los métodos que se describen a continuación son de especial importancia ya que la estructura predominantemente β extendida del péptido $A\beta_{17}$ de la que se parte es probablemente inadecuada para modelar el comportamiento del péptido como un monómero. Más adelante, en la sección 3.4.1 se analizan las implicaciones derivadas del uso de este tipo de estructura. A continuación se describen las metodologías de búsqueda conformacional aplicadas en la obtención de diversos modelos de coordinación.

Búsqueda conformacional mediante algoritmos genéticos (GA) (Figura 3.1 *iii*). En este método se empleó el algoritmo Genético-Lamarckiano implementado en el programa AutoDock 4.2.^{135,136} El programa considera la estructura de dos moléculas, designadas como receptor y ligante, en donde el objetivo es encontrar el complejo más estable entre las dos moléculas. Mientras que el receptor se mantiene completamente inmóvil, se proponen cambios en las coordenadas internas del ligante para generar isómeros conformacionales (principalmente por rotaciones de ángulos diedros seleccionados); así mismo se modifican la posición y orientación del ligante respecto a la estructura del receptor de acuerdo a las reglas definidas por el algoritmo genético (GA).¹³⁵ En el presente trabajo el péptido $A\beta_{17}$ se trató como ligante flexible, cuya estructura se modificó a lo largo de la búsqueda alrededor del átomo Zn^{2+} , el cual permaneció fijo como "receptor". Para esto se propusieron diferentes selecciones de enlaces con libre rotación dentro de la estructura del péptido $A\beta_{17}$. En la Figura 3.2 se muestra un ejemplo de una de las selecciones de enlaces con libre rotación aplicadas, en donde los enlaces coloreados en verde se rotaron durante la búsqueda conformacional mientras que los enlaces en color gris permanecieron

rígidos. Para cada selección de enlaces rotables, se calcularon 100 conformeros del complejo Zn^{2+} - $A\beta_{17}$, tomando como criterios de selección el mayor número de coordinación para el Zn^{2+} , considerando los átomos provenientes de grupos funcionales o residuos del péptido a distancias $< 3 \text{ \AA}$ del metal y que dichos ligantes formaran modos de coordinación similares a lo reconocidos en la literatura para complejos Cu^{2+} - $A\beta$.

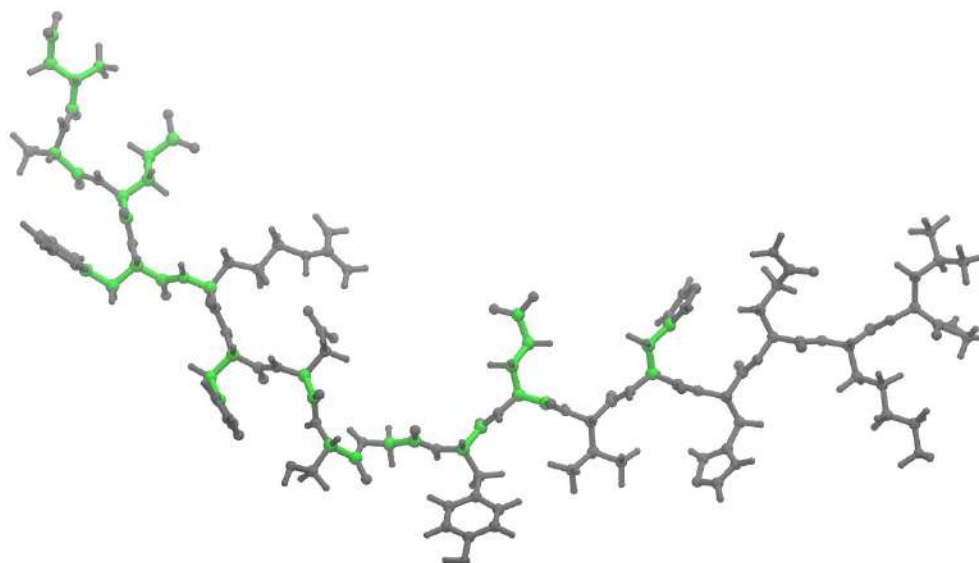


Figura 3.2. Estructura inicial del péptido $A\beta_{17}$ utilizada en la búsqueda de conformeros del complejo Zn^{2+} - $A\beta_{17}$. En la búsqueda mediante GA los enlaces en color verde tuvieron libre rotación.

Los parámetros de búsqueda para el algoritmo Genético-Lamarckiano en AutoDock fueron: una población aleatoria inicial de 150 individuos, un número máximo de 250,000 evaluaciones de energía y un número máximo de 270,000 generaciones, dejando el resto de los parámetros considerados por el programa en sus valores predeterminados. Como lo indican las flechas de flujo en la Figura 3.1, algunas de las estructuras obtenidas en este paso fueron consideradas como punto de partida para los otros dos métodos de búsqueda conformacional mientras que otras continuaron directamente hacia un paso de equilibración, (ver más adelante).

Búsqueda conformacional mediante dinámica molecular interactiva (IMD) (Figura 3.1 iv). Este método se aplicó a estructuras resultantes de la búsqueda mediante GA que se consideraron como "parcialmente coordinadas" o en las que se buscó reemplazar algún grupo o residuo coordinado por algún otro. Así mismo, se aplicó a la estructura extendida mostrada en la Figura 3.2 en donde, de manera secuencial, se acercaron los ligantes deseados al ion Zn^{2+} durante una simulación de dinámica molecular. Para llevar a cabo esto se utilizaron en conjunto los programas NAMD⁸⁷ y VMD⁸⁵ en una simulación que consideró los parámetros del campo de fuerza CHARMM27⁸⁸ y varias opciones de configuración similares a las descritas en la sección 2.3.2 (página 13) para la equilibración del modelo de fibra amiloide. En términos generales, la simulación de dinámica molecular interactiva (IMD) consiste en aplicar fuerzas externas a uno o más átomos específicos del sistema durante una DM con la finalidad de modificar su estructura y forzar ciertas conformaciones. La magnitud y dirección de la

fuerza aplicada a cada átomo seleccionado es definido por el usuario mediante una interfaz gráfica (disponible en VMD) o a través de un archivo de instrucciones predefinido. En el primer caso (método interactivo) el usuario se conecta con un cálculo (de NAMD) de DM en ejecución mediante la interfaz gráfica de VMD, lo que le permite visualizar la estructura del sistema que se actualiza en tiempo real al momento que las nuevas coordenadas de todos los átomos son calculadas. Durante esta conexión el usuario "dibuja" vectores sobre los átomos de interés que representan las fuerzas externas que en ese momento NAMD incorpora al cálculo. En el presente trabajo se aplicaron fuerzas externas a átomos de diferentes residuos en dirección del ion metálico para acercarlos a distancias de enlace, mientras que a las moléculas de agua circundantes se les aplicaron fuerzas en direcciones "divergentes" para "desolvatar" al ion metálico y a los residuos por coordinarse a fin de facilitar la formación del complejo deseado.

Como requisito previo a la corrida IMD, el sistema debe someterse a un protocolo de equilibración, el cual varía dependiendo de la estructura inicial utilizada y del modo de coordinación que se desee obtener. En general, la estructura inicial del péptido $A\beta_{17}$ con el ion Zn^{2+} incluido es inmerso en una caja con cerca de 6,300 moléculas de agua. Las moléculas de agua fueron sometidas a 3000 pasos de minimización de la energía y a una DM de calentamiento de 10 a 310 K durante 20 ps, manteniendo fija la estructura del péptido. Parte del péptido fue entonces liberado de las restricciones estructurales con la intención de modificar la estructura local para promover la unión al Zn^{2+} de algún átomo proveniente de esa región mediante la IMD. Para esto se aplicaron otros 3000 pasos de minimización de la energía aplicando las nuevas restricciones, seguido por la corrida IMD en donde se aplican las fuerzas externas definidas por el usuario. La longitud de esta simulación fue de 20 a 150 ps dependiendo de la magnitud de los cambios conformacionales necesarios para conseguir algún modo de coordinación específico. Además, durante los primeros 20 ps de esta corrida se llevó a cabo un calentamiento lento del sistema de 10 a 310 K con una velocidad de calentamiento de 1 K/50 fs. Después de obtener el modo de coordinación deseado, se minimizó la energía sin restricciones sobre el sistema completo (3000 pasos). En algunos casos, en lugar de una minimización se llevó a cabo una DM a baja temperatura (p. ej. 50 K) para disminuir la energía del sistema permitiendo la posibilidad de rebasar barreras bajas de energía potencial.

Este protocolo se aplicó a la obtención diversos modelos Zn^{2+} - $A\beta_{17}$ en los que el ion Zn^{2+} se encuentra unido a diferentes residuos únicamente a través de interacciones no covalentes (electrostáticas y VDW). Debido a la carga del ion metálico (2+), los átomos electronegativos como nitrógeno y oxígeno son fuertemente atraídos, por lo que en general se encontraron hasta 6 átomos a corta distancia del Zn^{2+} . De las múltiples combinaciones posibles de residuos unidos al metal, sólo se eligieron modelos que fuesen probables candidatos a representar los modos de coordinación observados experimentalmente de acuerdo con diferentes propuestas reportadas en la literatura. Como se muestra en la Figura 3.1 (iv), algunos de los modelos se trataron adicionalmente con un protocolo de recocido simulado con la finalidad de incrementar el muestreo conformacional de la cadena peptídica (ver a continuación). En la sección 3.4 se analizarán las estructuras de los modelos obtenidos.

Búsqueda conformacional mediante recocido simulado (SA) (Figura 3.1 v). El método de recocido simulado (SA) consiste en ciclos de calentamiento y enfriamiento del sistema durante una simulación de dinámica molecular, (ver Figura 3.3 a). En las etapas a alta temperatura se promueven cambios conformacionales de la estructura peptídica al introducir mayor energía cinética en los átomos, lo que permite al sistema rebasar barreras de energía sobre la PES. En cambio, las etapas a baja temperatura "congelan" o afianzan algunas de estas estructuras. Este tipo de protocolos además permiten la "relajación" de la estructura peptídica, que se traduce en una mejor exploración estructural y abarca un rango más amplio de conformaciones. Las gráficas en las Figuras 3.3 b) y c) muestran como ejemplo una de las corridas SA aplicadas a uno de los modelos Zn^{2+} - $A\beta_{17}$. Un beneficio adicional para los complejos preparados con los métodos GA e IMD es asegurar la estabilidad del complejo formado, ya que una conformación particular de la cadena peptídica podría no favorecer la unión al metal. En estos casos, la tensión en la cadena peptídica competiría con las interacciones atractivas que mantienen la unión entre los átomos peptídicos y el metal, por lo que sólo las conformaciones más favorables sobrevivirían coordinadas en las etapas a alta temperatura.

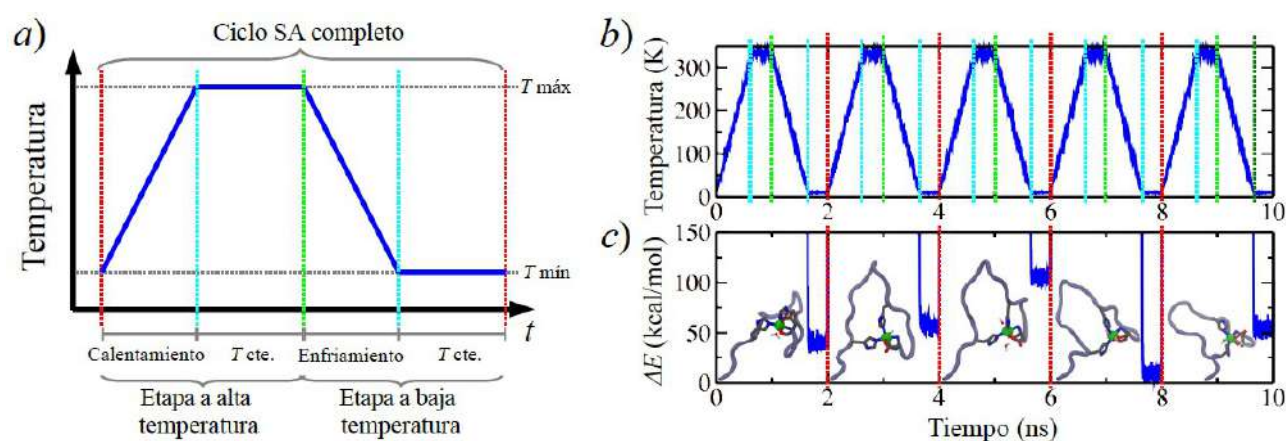


Figura 3.3. *Búsqueda conformacional mediante recocido simulado (SA)*. a) Etapas que conforman cada ciclo de SA. b) Gráfica de temperatura contra el tiempo (t) para una corrida de 5 ciclos de SA sobre el complejo Zn^{2+} - $A\beta_{17}$. c) Gráfica de la energía total relativa contra el tiempo para la misma corrida.

La metodología SA aplicada, implementada mediante el programa NAMD,⁸⁷ utiliza opciones de configuración similares a las descritas previamente, (sección 2.3.2, página 13). En este caso la corrida consistió de 10 a 25 ciclos de calentamiento-enfriamiento con una duración por ciclo de 2 ns. Como se observa en la Figura 3.3 a), cada ciclo se puede dividir en 2 etapas, donde se ejecuta la DM a alta y baja temperatura. Cada una de estas dos etapas incluye una porción de tiempo en la que se calienta o enfría el sistema lentamente y otra en la que se mantiene la temperatura constante. La porción de tiempo en que el sistema se simula a temperatura constante (ya sea a alta o baja temperatura), con respecto al tiempo en el que se calienta o enfría depende de la velocidad de calentamiento o enfriamiento predefinida. En el presente trabajo se manejaron dos esquemas de SA, en el primero la etapa a alta temperatura era más larga que la etapa a baja temperatura (1.6 y 0.4 ns, respectivamente), donde la temperatura mínima fue de 50 K y la máxima de 600 K. El segundo esquema de SA considera la misma

duración para las etapas a alta y baja temperatura (1 ns), con un rango de temperaturas de 10 a 333 K. Las velocidades de calentamiento y enfriamiento utilizadas fueron de 0.5 a 1 K/ps. En el anexo A1.3 se puede consultar un ejemplo de la implementación de estos protocolos en NAMD.

Los tres métodos de búsqueda conformacional descritos en esta sección permitieron obtener diferentes modelos estructurales del complejo Zn^{2+} - $A\beta_{17}$ equilibrados en una caja periódica con moléculas de disolvente explícitas, por lo que el efecto de la temperatura y de las interacciones con el medio acuoso fueron considerados para el rango de conformaciones explorado. Los modelos derivados del método GA que no fueron tratados posteriormente con los métodos IMD y SA son una excepción, ya que se obtuvieron en el vacío y a través de un método que no sigue una trayectoria temporal. En estos casos las estructuras fueron también inmersas en una caja de agua y equilibradas como se hizo con el resto de las estructuras modeladas mediante DM (Figura 3.1 vi). Este último paso de equilibración también se aplicó para uniformizar las condiciones finales de todos los modelos, en donde todas las estructuras se minimizaron sin restricciones estructurales en la secuencia 1-16 del péptido $A\beta$. Es importante mencionar que las restricciones en el residuo 17 se aplicaron de manera uniforme a todos los modelos en todos los cálculos, debido a que, como se mencionó antes, este residuo se consideró como una "ancla" entre los fragmentos 1-16 y 18-42 de la proteína $A\beta$ completa.

El refinamiento posterior de la geometría alrededor del ion metálico, que se describe en la siguiente sección, parte de estructuras derivadas de los tres métodos de búsqueda conformacional (ver Figura 3.1), por lo que fue necesario extraer exclusivamente las coordenadas del complejo (proteína + metal) incluyendo también dos moléculas de agua en la cercanía del ion Zn^{2+} . Las moléculas de agua incluidas en los modelos resultantes Zn^{2+} - $A\beta_{17}(H_2O)_2$ (Figura 3.1 vii), que en algunos casos formaron parte de la primera esfera de coordinación del metal, se incluyeron con la finalidad de que todos los modelos consideraran un número de coordinación de 6 como estructura inicial para la siguiente etapa.

3.3.3. Optimización de la esfera de coordinación del cobre

Las estructuras de los modelos obtenidos en la sección anterior son producto de cálculos basados en métodos empíricos que no consideran la estructura electrónica de las moléculas. Estos modelos incluyen potenciales analíticos (campos de fuerza) que por definición requieren parámetros que les permitan reproducir las estructuras y el comportamiento de los sistemas químicos estudiados. A pesar de que los campos de fuerza utilizados en la etapa anterior han sido parametrizados y refinados a lo largo de varias décadas para reproducir el comportamiento de biomoléculas, la simplicidad de los mismos no permite describir de manera adecuada las diversas geometrías observadas en complejos con metales de transición, como es el caso del ion zinc incluido en estos modelos. Por este motivo es necesaria una etapa de optimización de las geometrías de los complejos que involucran átomos metálicos utilizando métodos que permitan corregir el comportamiento de estos sistemas. En esta sección se describe la metodología para optimizar las esferas de coordinación de todos los modelos.

Los cálculos de optimización de la geometría se llevaron a cabo considerando la teoría de funcionales de la densidad^{137,138} (DFT) mediante el programa deMon2k.^{139,140} Se utilizaron los funcionales de intercambio PBE revisado¹⁴¹ y de correlación LYP,¹⁴² aumentados con una función empírica para la considerar la dispersión.¹⁴³ Las funciones de base empleadas para todos los átomos fueron de tipo DZVP, con excepción del átomo de cobre, para el cual se utilizó la base TZVP.¹⁴⁴ Estas bases se utilizaron en combinación con funciones de base auxiliares de tipo GEN-A2 y GEN-A2* para las bases DZVP y TZVP, respectivamente.¹⁴⁵

Los modelos de los complejos $\text{Cu}^{2+}\text{-A}\beta_{17}(\text{H}_2\text{O})_2$ obtenidos a partir de estas optimizaciones, (Figura 3.1 *viii*), consideraron como punto de partida las mismas estructuras derivadas de la sección anterior reemplazando el ion Zn^{2+} por el Cu^{2+} . Una vez optimizados, algunos modelos fueron sometidos nuevamente a simulaciones IMD (Figura 3.1 *ix*) con la finalidad ya sea de reemplazar algún átomo coordinado por otro, o para relajar la estructura de la cadena peptídica después de tener optimizado el centro metálico. En estos casos los pasos de DM clásica se corrieron manteniendo el ion Cu^{2+} y los residuos coordinados fijos. Estas estructuras se volvieron a optimizar con la metodología DFT sin ninguna restricción estructural, con la excepción de algunos átomos "anclados" del residuo 17, como se explicó anteriormente.

3.3.4. Análisis conformacional sobre la cadena lateral del Asp1

Además de los modelos obtenidos de acuerdo a la metodología descrita en las secciones anteriores, también se generaron tres conjuntos de isómeros conformacionales a partir en el modelo $\text{Cu}^{2+}\text{-A}\beta_{17}(\text{H}_2\text{O})_2$ de menor energía. Cada una de estas tres series consideró diferentes longitudes del extremo N-terminal de la proteína $\text{A}\beta$ de 3, 6 y 17 aminoácidos (Figura 3.1 *x*). Para cada serie de confórmeros se exploraron las posibles conformaciones *anti* (A) y *gauche* (G) alrededor de la cadena lateral del residuo Asp1, mediante la rotación del ángulo diedro alrededor de los carbonos α y β de este residuo ($\text{C}_\delta, \text{C}_\alpha, \text{C}_\beta, \text{C}_\gamma$) (Figura 3.4). La estructura del resto del péptido se mantuvo intacta. Todos estos modelos se optimizaron de acuerdo a la metodología DFT descrita en la sección anterior y se incluyeron también dos moléculas de agua explícitas. En los modelos con 6 aminoácidos se agregó a la estructura una molécula de *N*-etilimidazol para simular el ligante His13/14 faltante, mientras que en los modelos con 3 aminoácidos se agregaron dos de estas moléculas (simulando a la His6 y a la His13/14).

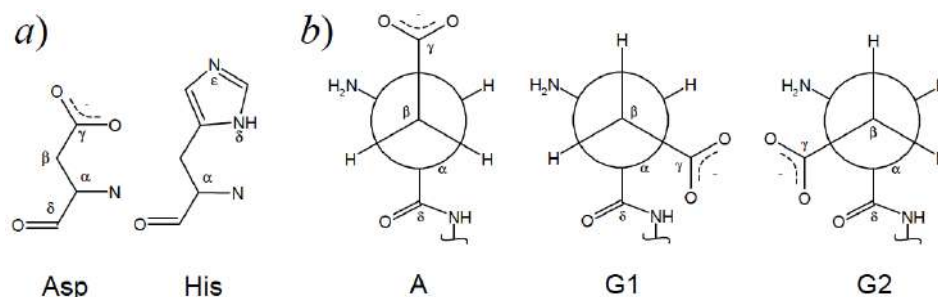


Figura 3.4. a) Nomenclatura para los átomos de los residuos aspartato e histidina.
b) Conformaciones *anti* y *gauche* de la cadena lateral del Asp1.

La construcción de estos modelos tuvo por objeto estudiar el efecto de varios factores sobre la coordinación del cobre a la proteína $A\beta$, tales como el papel de la conformación del Asp1, la estructura del esqueleto peptídico, las interacciones no covalentes y el número de sitios de coordinación disponibles para el Cu^{2+} . Los modelos pequeños fueron particularmente útiles para estudiar la competencia entre los grupos carboxilato y carbonilo del Asp1 por la coordinación del ion metálico, así como para reducir la dimensionalidad de la superficie de energía potencial y estudiar la coordinación sin el efecto de la conformación particular de la cadena peptídica.

3.3.5. Cálculo de parámetros de EPR del cobre y constantes de acoplamiento hiperfinas

Para varios de los modelos $\text{Cu}^{2+}\text{-}A\beta_{17}$ optimizados se calcularon parámetros de EPR con la finalidad de compararlos con los datos experimentales reportados en la literatura. Los parámetros considerados fueron los tensores \mathbf{g} y \mathbf{A} para el Cu^{2+} , así como constantes de acoplamiento hiperfinas entre el Cu^{2+} y los átomos de nitrógeno y carbono vecinos en la esfera de coordinación del ion metálico. Todos los parámetros se calcularon mediante el programa ORCA¹⁴⁶ considerando las estructuras finales de los modelos descritos en la sección anterior. Para el cálculo de los tensores \mathbf{g} y \mathbf{A} de EPR del Cu^{2+} se empleó el funcional PBE0,¹⁴⁷ considerando la base CP¹⁴⁸ para el átomo de cobre y la base DGAUSS¹⁴⁴ para el resto de los átomos. El cálculo del tensor \mathbf{A} para átomos ^{14}N y ^{13}C seleccionados se llevó a cabo utilizando la base EPRIII.¹⁴⁹ En todos los casos se utilizó IGLO como origen de norma; se incluyó el acoplamiento espín-órbita en el tensor \mathbf{A} del Cu^{2+} y se consideraron los efectos de solvatación utilizando el modelo de solvente implícito COSMO.^{150,151} Todos los valores de las componentes de los tensores \mathbf{g} y \mathbf{A} calculados se reportan en unidades de ppm y MHz, respectivamente. Estos resultados se analizarán en la sección 3.7.

3.4. Estructura y estabilidad de los complejos $\text{Cu-A}\beta_{17}$

La secuencia de aminoácidos de la proteína $A\beta_{17}$ contiene múltiples grupos funcionales capaces de coordinarse al Cu^{2+} , los cuales pueden generar un enorme conjunto de variantes del complejo $\text{Cu}^{2+}\text{-}A\beta_{17}$. De hecho, la naturaleza no estructurada de esta proteína permite que diversas especies se encuentren presentes en solución,⁸ posiblemente en equilibrio dinámico entre varias combinaciones de átomos coordinados, como se evidencia en experimentos de NMR.^{125,152} No obstante, la intensa investigación en este campo permite delimitar el número de posibilidades hasta el punto en que actualmente sólo unas pocas estructuras se consideran predominantes en el complejo. Para el complejo $\text{Cu}^{2+}\text{-}A\beta_{16}$ a valores bajos de pH (componente I) se considera que las especies predominantes involucran sitios de coordinación como el grupo carboxilato proveniente de residuos de aspartato o glutamato, nitrógenos imidazólicos de los residuos de histidina, grupos carbonilo provenientes de la cadena peptídica y el grupo amino terminal.¹²⁷ La coordinación de moléculas de agua en la posición axial también ha sido propuesta.¹⁵³

Varios de estos ligantes propuestos en la literatura fueron considerados en los modelos construidos en el presente trabajo con la finalidad de evaluar la participación de cada uno en la estructura y estabilidad de los complejos. Estos modelos además permiten evaluar diversos factores que afectan la coordinación con el metal como son la disponibilidad de diferentes ligantes, las interacciones involucradas en la segunda capa de coordinación, la participación de moléculas de agua y el efecto de la conformación tanto de la cadena peptídica como de las cadenas laterales de los residuos en la proteína. En las siguientes secciones se presentan y discuten los resultados obtenidos a partir de 20 modelos estructurales del complejo $\text{Cu}^{2+}\text{-A}\beta_{17}(\text{H}_2\text{O})_2$ optimizados a nivel de DFT; más adelante (sección 3.7) se comparan estos resultados con las observaciones experimentales reportadas en la literatura.

3.4.1. Estructura del péptido $\text{A}\beta_{17}$ libre y coordinado a cobre

La estructura del péptido $\text{A}\beta_{17}$ libre de cobre que se utilizó como punto de partida para generar los modelos coordinados al cobre se puede observar en la Figura 3.2 (página 44). En esta figura se observa que el motivo estructural predominante es de tipo β extendido, debido a que la cadena se extrajo de un modelo de fibra amiloide. Esta conformación probablemente no es la que se espera en solución para este péptido, sin embargo, resultó de particular utilidad para evaluar el efecto de la coordinación del Cu^{2+} a la proteína $\text{A}\beta$. Además, el uso de esta estructura permite extrapolar el análisis para entender la coordinación del ion metálico a la proteína cuando esta se encuentra formando parte de las fibras amiloides.

Los residuos utilizados como sitios de coordinación para el Cu^{2+} fueron el Asp1, la His6, el Glu11, la His13 y la His14, los cuales se encuentran distribuidos a lo largo de la secuencia de aminoácidos del péptido $\text{A}\beta_{17}$. Cuando se coordina el metal a dos o más ligantes provenientes de una misma molécula se generan macrociclos que restringen la flexibilidad de la molécula y modifican, por consecuencia, la estructura global del péptido así como sus propiedades fisicoquímicas. En la Tabla 3.1 se recopilan diversas características y mediciones estructurales para los 20 modelos obtenidos, las cuales tienen como objeto cuantificar los cambios estructurales derivados de diferentes situaciones de coordinación y evaluar su efecto en la estabilidad del complejo. Los valores de *RMSD* permiten comparar la estructura del péptido completo (*RMSD_{noH}*), de la cadena peptídica principal (*RMSD_{bbk}*) o de las cadenas laterales de sus residuos (*RMSD_{CadLat}*), con alguna estructura de referencia; en este caso se utilizó como referencia la estructura de mínima energía. El radio de giro relativo, Δr_{gyr}^2 , permite diferenciar las estructuras extendidas (valores más elevados) de las globulares (valores más pequeños). Tanto la diferencia de área superficial accesible a disolvente, ΔSASA , como el número de puentes de hidrógeno, *nHB*, cuantifican interacciones intramoleculares estabilizantes. Una gran ΔSASA implica mayor contacto con el medio y, por lo tanto, un menor número de contactos intramoleculares.

A partir de los datos recopilados en la Tabla 3.1, se puede observar que el modelo **20** muestra propiedades completamente distintas al resto de los modelos. De hecho, su estructura se encuentra parcialmente plegada ya

que sólo el extremo N-terminal y la His6 están involucrados en la coordinación con el metal. Este modelo, que es el más extendido, muestra el menor número de puentes de hidrógeno y la mayor área superficial en contacto con el disolvente. El resto de los modelos muestran un plegamiento tal que permite la coordinación simultánea de ligantes tan distantes como el Asp1 y la His14. En todos los casos se observa un incremento en el número de puentes de hidrógeno que lleva a una disminución del área superficial accesible al disolvente y, en general, resulta en estructuras más globulares.

Tabla 3.1. Energías relativas y mediciones estructurales de los complejos Cu²⁺-A β 17(H₂O)₂.

No.	ΔE (kcal/mol)	Modo de coord. ^a	Macrociclos formados	$RMSD_{noH}$ (Å) ^b	$RMSD_{bkb}$ (Å) ^b	$RMSD_{CadLat}$ (Å) ^b	Δr_{gyr}^2 (Å ²)	$\Delta SASA$ (Å ²)	$nHB_{130}^{3.5}$ ^c
1	0.0	3N1O (1O)	1-6-14	0.00	0.00	0.00	0.62	131	14
2	1.7	3N1O	1-6-14	0.29	0.12	0.35	0.65	117	14
3	6.7	3N1O (1O)	1-6-14	0.77	0.36	0.40	0.57	119	15
4	7.1	3N1O (1O)	1-6-14	0.75	0.35	0.37	0.57	126	16
5	9.9	3N1O (1O)	1-6-14	0.76	0.34	0.35	0.58	122	15
6	12.0	3N1O	1-6-14	2.49	1.39	3.14	0.24	5	16
7	12.0	3N	1-6-14	2.60	1.55	3.30	0.22	0	18
8	16.9	3N (1O)	1-6-14	0.83	0.33	0.62	0.60	148	17
9	19.4	3N1O (1O)	1-6-13	5.80	3.71	7.22	1.26	364	11
10	21.5	3N1O (2O)	6-11-13-14	7.44	6.38	8.12	0.33	159	14
11	21.7	3N1O (1O)	1-6-13	5.80	3.72	7.21	1.25	360	10
12	22.2	3N1O (1O)	1-6-13-14	6.52	5.53	7.15	0.16	155	15
13	29.0	3N1O (1O)	1-6-14	2.06	1.37	2.50	0.33	116	13
14	29.1	3N1O	1-6-13-14	6.51	5.50	7.13	0.15	116	16
15	33.5	2N1O (1O)	1-13-14	5.70	4.58	6.49	0.00	115	13
16	58.5	2N1O (1N)	1-14	6.88	5.56	7.54	0.22	224	12
17	67.5	2N1O	1-6-14	4.31	3.01	5.38	0.77	233	10
18	73.8	3N1O (1O)	1-6-14	5.63	4.67	6.27	0.34	365	9
19	81.4	2N1O (1N1O)	1-6-13	2.17	0.81	2.86	0.60	222	11
20	91.5	2N2O (1O)	1-6	9.97	8.38	10.64	5.67	600	7

^a Entre paréntesis se indican los átomos débilmente unidos con distancias de enlace: $2.3 < d_{Cu} \leq 3.2$ Å.

^b Raíz cuadrada de la distancia cuadrática media de las coordenadas atómicas de diferentes regiones de los complejos.

^c Número de puentes de hidrógeno (D-H...A) determinados mediante parámetros geométricos de distancia (d) y ángulo (θ) entre los átomos involucrados: $d_{D-A} < 3.5$ Å y $\theta_{D-H-A} > 130^\circ$.

Los valores de $RMSD_{bkb}$ muestran que los modelos pueden agruparse en varios tipos de plegamientos, los cuales tienen cierta correspondencia con los diferentes tipos de macrociclos formados. Las estructuras correspondientes a los diferentes tipos de plegamientos se pueden comparar en la Figura 3.5. Los macrociclos más comunes en los modelos son los formados por la coordinación del Cu²⁺ a los residuos Asp1 e His6 (1-Cu-6), y a los residuos His6 e His14 (6-Cu-14). También se observaron otros macrociclos como 6-Cu-11, 6-Cu-13, 11-Cu-13, 13-Cu-14

y combinaciones de estos; sin embargo, fueron menos frecuentes y formaron complejos menos estables que la combinación 1-6-14. Este resultado es congruente con reportes experimentales en donde la coordinación simultánea de la His6 y la His14 se ha propuesto como predominante en comparación con las combinaciones His6-His13 e His13-His14.¹²¹ A continuación se analizan las características de los macrociclos más comunes.

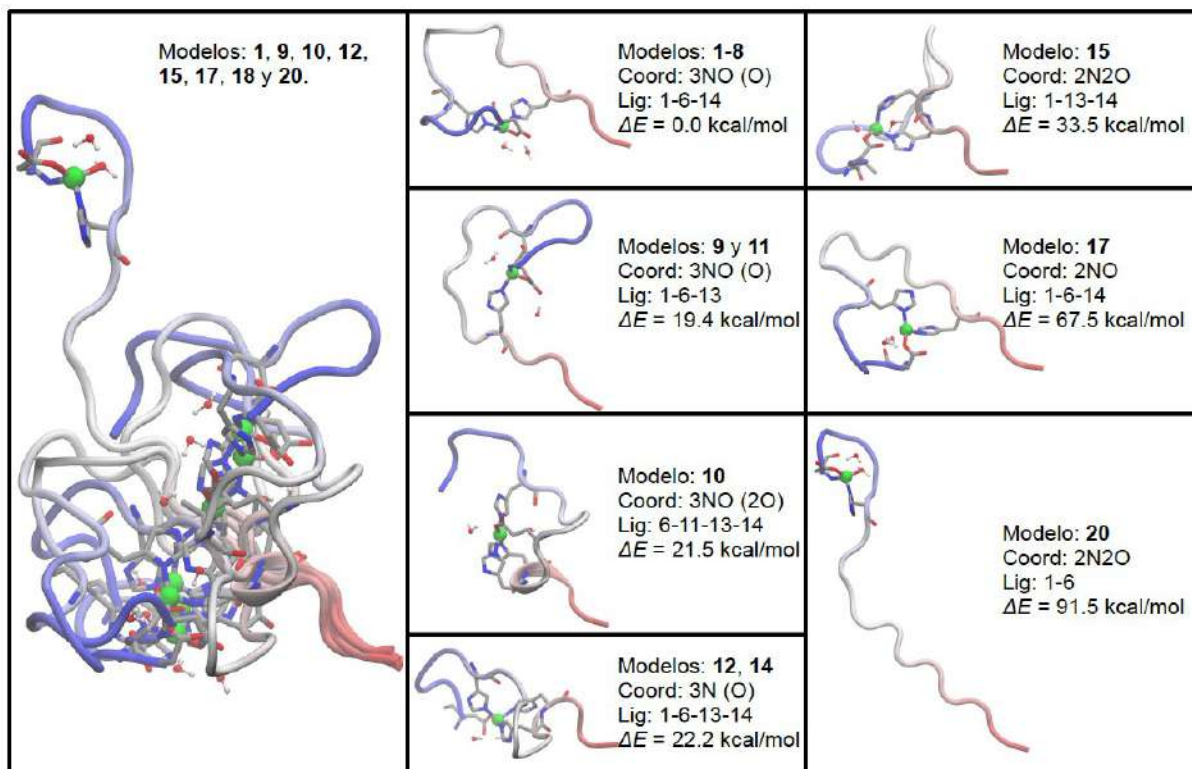


Figura 3.5. Ejemplos de distintos plegamientos y macrociclos formados en los complejos Cu^{2+} - $\text{A}\beta_{17}(\text{H}_2\text{O})_2$. En el panel de la izquierda se muestran alineadas por el extremo C-terminal (en rojo) las estructuras de los modelos mostrados en los paneles centrales y de la derecha.

a) *Macrociclo Asp1-Cu²⁺-His6 (1-Cu-6)*. En la mayor parte de los modelos estudiados (**1-9**, **11-14** y **17-20**), el Cu^{2+} coordina simultáneamente al Asp1 y a la His6 para formar el macrociclo 1-Cu-6; sólo los modelos **10**, **15** y **16** no se construyeron con esta característica. El modelo más estable, carente del macrociclo 1-Cu-6, tiene una energía relativa de 21.5 kcal/mol, lo que sugiere que la coordinación simultánea del Asp1 y de la His6 es esencial para la estabilidad del complejo. Un análisis más detallado de las estructuras con el macrociclo 1-Cu-6 permite detectar otras subclasificaciones adicionales, las cuales están relacionadas con los residuos coordinados al metal y con la geometría que adopta el complejo. Los modelos **1-5** son los prototipos de estructuras cuadrado planas distorsionadas, con modo de coordinación 3N1O en donde los átomos coordinados provienen de los residuos Asp1, His6 e His14. Los modelos **9** y **11** reemplazan la His14 por la His13, lo que resulta en una disminución en la estabilidad de los complejos resultantes y una geometría prácticamente tetraédrica (ver más adelante). De manera interesante, el intercambio de la His14 por la His13 tiene un efecto en la estructura del macrociclo 1-Cu-6; no obstante, el efecto más notorio fue el cambio en el tipo de plegamiento (ver Figura 3.5).

Esto se explica por la estructura predominantemente β extendida del modelo inicial, ya que, para este tipo de estructura, las cadenas laterales de cada residuo se orientan de manera alternada, hacia lados opuestos de un plano imaginario a lo largo de la cadena peptídica. Este es el caso de la His13 y la His14, orientados en direcciones opuestas uno respecto al otro, de tal forma que el péptido se tiene que plegar de manera distinta para coordinar a cada uno de estos residuos. En el caso de los modelos **6** y **7**, de acuerdo a los parámetros mostrados en la Tabla 3.1, también se encontró diferencia en el macrociclo 1-Cu-6 en comparación con los modelos **1-5**. Esto ocurrió como resultado de un rearrreglo de las cadenas laterales de los residuos Glu3, Phe4 y Arg5, que incrementaron el número de interacciones intramoleculares estabilizantes.

b) *Macrociclo His6-Cu²⁺-His14 (6-Cu-14)*. Los modelos que presentan este macrociclo, sin la participación del Glu11 o la His13, fueron **1-8**, **13**, **17** y **18**. Los modelos **1-8** tienen las características estructurales que ya se mencionaron, siendo estas las estructuras más estables. En comparación, el modelo **13** muestra un plegamiento y estructura similar al grupo más estable con algunas variaciones en las cadenas laterales, lo que produce un cambio de energía moderado; a diferencia de lo que ocurre con el modelo **18**, en donde la disminución de interacciones moleculares debido a un cambio considerable en el plegamiento del péptido, llevan a una completa desestabilización del complejo (ver datos en la Tabla 3.1). De manera similar, el modelo **17** muestra una estructura muy desfavorable energéticamente, que además carece del macrociclo 1-Cu-6, que como ya se había comentado, es también determinante de la estabilidad de los complejos.

c) *Macrociclo His13-Cu²⁺-His14 (13-Cu-14)*. Este macrociclo está presente en los modelos **10**, **12**, **14** y **15**, de los cuales el más estable tiene una energía relativa de 21.5 kcal/mol, por lo que podemos considerar que este macrociclo no favorece la estabilidad del complejo. Sin embargo, el segmento 13-Cu-14 se ha propuesto como relevante a pH fisiológico cuya presencia se estimó en alrededor del 15 % respecto a la especie que coordina a la His6 y la His14;¹²¹ resultados que son compatibles con la energética de los modelos aquí presentados. El macrociclo 13-Cu-14 se encontró en combinación con otros macrociclos como el 6-Cu-11, 11-Cu-13, 6-Cu-13 y 1-Cu-13; curiosamente, el modelo más estable (**10**) muestra un modo de coordinación y plegamiento similar al observado en una estructura proveniente de experimentos de NMR del complejo Zn²⁺-A β ₁₆,¹⁵⁴ mostrando también congruencia con estos resultados.

La estructura mostrada en la Figura 3.6 es un ejemplo de un complejo que muestra la coordinación del cobre a los residuos Asp1, His6 e His14, que fue una de las combinaciones más estables. En esta figura se puede apreciar con más detalle los contactos entre grupos funcionales de los residuos de aminoácido del péptido. Además, se puede ver la estructura de los dos macrociclos más estables formados en este complejo, el Asp1-Cu²⁺-His6 e His6-Cu²⁺-His14. También se aprecia que la región más afectada por la coordinación del metal, respecto a la estructura extendida inicial, es la secuencia 1-10. En cambio, la secuencia 11-17 no requiere modificaciones conformacionales importantes para permitir la coordinación de los residuos mencionados. Esto puede explicar la similitud entre los parámetros de EPR medidos para el complejo Cu²⁺-A β tanto en solución como en fibras

amiloides;¹⁵⁵ la región del péptido $A\beta$ que muestra estructura β en las fibras amiloides, (por lo regular a partir del residuo en posición 10), no sería afectada de manera importante por la coordinación al cobre. En cambio, la coordinación al metal en el extremo N-terminal dificultaría la formación de estructuras β en esta región.

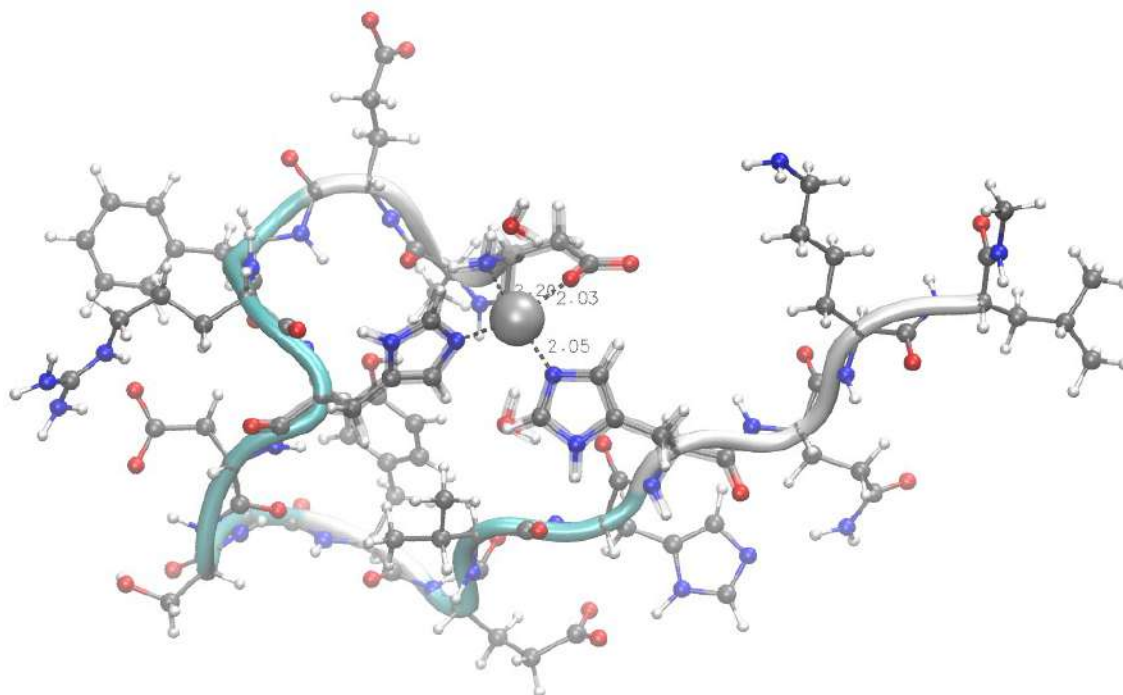


Figura 3.6. Estructura optimizada del complejo $\text{Cu}^{2+}\text{-A}\beta_{17}(\text{H}_2\text{O})_2$, modelo 3.

3.4.2. Geometrías y modos de coordinación

El conjunto de los 20 modelos del complejo $\text{Cu}^{2+}\text{-A}\beta_{17}(\text{H}_2\text{O})_2$ obtenidos incluyeron una variedad de geometrías (cuadrado planas, tetraédricas, trigonales, piramidales, ...) y modos de coordinación ($3\text{N}1\text{O}$, 3N , $2\text{N}2\text{O}$, $3\text{N}1\text{O}(1\text{O})_{\text{ax}}$, ...). Los modos de coordinación se indicaron en la Tabla 3.1. Todos estos modelos se optimizaron a partir de una geometría octaédrica en la que el centro metálico tenía 6 átomos coordinados. Las distancias de enlace iniciales se consideraron en todos los casos en el rango de 1.9 a 2.2 Å. Después de la optimización de geometría mediante DFT, en prácticamente todos los casos se observó un cambio importante en la geometría, así como una disminución del número de coordinación a 3 o 4, (considerando distancias de enlace al Cu^{2+} menores a 2.3 Å). Algunos de los residuos que originalmente se encontraban coordinados se alejaron a distancias mayores a 3.2 Å, mientras que otros permanecieron coordinados débilmente con distancias de enlace en el rango de 2.3 a 3.2 Å. Los átomos a distancias de enlace mayores a 3.2 Å no se consideraron como parte de la primera capa de coordinación del ion metálico. En la Tabla 3.2 se listan las energías relativas de cada modelo junto con sus átomos coordinados al cobre al final de las optimizaciones. Esta tabla también incluye los ángulos diedros entre los átomos más fuertemente enlazados al ion metálico, los cuales permiten clasificar las geometrías con al menos 4 de estos átomos desde cuadrados planos, cuadrados planos distorsionados y hasta tetraedros, en la medida que

este ángulo se incrementa de 0 a 60°.

Tabla 3.2. Características principales de la esfera de coordinación de los complejos Cu²⁺-A β 17(H₂O)₂.

No.	ΔE (kcal/mol)	Átomos con coordinación fuerte al metal ^a	Coord. débil ^b	ϕ_{Lig}^c (°)	ϕ_{3N-Cu}^d (°)	ϕ_{Asp1}^e (°)	Conform. Asp1
1	0.0	N _{ter} , N _{ϵ} ^{His6} , N _{ϵ} ^{His14} , O _{COO} ^{Asp1}	O _{H₂O}	28	22	-155	A
2	1.7	N _{ter} , N _{ϵ} ^{His6} , N _{ϵ} ^{His14} , O _{H₂O}		60	24	-170	A
3	6.7	N _{ter} , N _{ϵ} ^{His6} , N _{ϵ} ^{His14} , O _{CO} ^{Asp1}	O _{CO} ^{Asp1}	27	12	-75	G2
4	7.1	N _{ter} , N _{ϵ} ^{His6} , N _{ϵ} ^{His14} , O _{COO} ^{Asp1}	O _{CO} ^{Asp1}	24	11	-82	G2
5	9.9	N _{ter} , N _{ϵ} ^{His6} , N _{ϵ} ^{His14} , O _{COO} ^{Asp1}	O _{CO} ^{Asp1}	27	12	-78	G2
6	12.0	N _{ter} , N _{ϵ} ^{His6} , N _{ϵ} ^{His14} , O _{COO} ^{Asp1}		46	27	-64	G2
7	12.0	N _{ter} , N _{ϵ} ^{His6} , N _{ϵ} ^{His14}			5	59	G1
8	16.9	N _{ter} , N _{ϵ} ^{His6} , N _{ϵ} ^{His14}	O _{CO} ^{Asp1}	-42 ^f	9	-165	A
9	19.4	N _{ter} , N _{δ} ^{His6} , N _{ϵ} ^{His13} , O _{COO} ^{Asp1}	O _{H₂O}	-58	-12	-60	G2
10	21.5	N _{ϵ} ^{His6} , N _{ϵ} ^{His13} , N _{δ} ^{His14} , O _{COO} ^{Glu11}	2O _{H₂O}	-2	8	96	
11	21.7	N _{ter} , N _{δ} ^{His6} , N _{ϵ} ^{His13} , O _{COO} ^{Asp1}	O _{H₂O}	-56	-16	-62	G2
12	22.2	N _{ϵ} ^{His6} , N _{ϵ} ^{His13} , N _{ϵ} ^{His14} , O _{COO} ^{Asp1}	O _{H₂O}	-49	-46	158	
13	29.0	N _{ter} , N _{ϵ} ^{His6} , N _{ϵ} ^{His14} , O _{COO} ^{Asp1}	O _{CO} ^{Asp1}	25	12	-62	G2
14	29.1	N _{ϵ} ^{His6} , N _{ϵ} ^{His13} , N _{ϵ} ^{His14} , O _{COO} ^{Asp1}		-58	-41	157	
15	33.5	N _{ϵ} ^{His13} , N _{ϵ} ^{His14} , O _{COO} ^{Asp1}	O _{H₂O}	60 ^f		56	
16	58.5	N _{ter} , N _{ϵ} ^{His14} , O _{COO} ^{Asp1}	N _{ϵ} ^{His13}	-31 ^f	-13 ^f	175	A
17	67.5	N _{δ} ^{His6} , N _{ϵ} ^{His14} , O _{COO} ^{Asp1}				-72	
18	73.8	N _{ter} , N _{ϵ} ^{His6} , N _{ϵ} ^{His14} , O _{COO} ^{Asp1}	O _{CO} ^{Asp1}	48	12	-74	G2
19	81.4	N _{ϵ} ^{His6} , N _{ϵ} ^{His13} , O _{COO} ^{Asp1}	N _{ter} , O _{CO} ^{Asp1}	25 ^f	15 ^f	-73	G2
20	91.5	N _{ter} , N _{δ} ^{His6} , O _{COO} ^{Asp1} , O _{H₂O}	O _{CO} ^{Asp1}	61		-53	G2

^a Átomos coordinados al metal con distancias de enlace: $d_{Cu} \leq 2.3$ Å.

^b Átomos con distancias de enlace al metal: $2.3 < d_{Cu} \leq 3.2$ Å.

^c ϕ_{Lig} = Ángulo diedro entre los átomos coordinados al cobre.

^d ϕ_{3N-Cu} = Ángulo (impropio) del Cu²⁺ fuera del plano de los tres átomos N coordinados.

^e $\phi_{Asp1} = (C_{\delta}, C_{\alpha}, C_{\beta}, C_{\gamma})$; Ángulo diedro de la cadena lateral del Asp1. Ver también Figura 3.4 b).

^f El ángulo diedro en estos casos se midió considerando también átomos débilmente coordinados.

En la Tabla 3.2 se observa el tipo de geometría de cada complejo a través de los ángulos diedros formados entre los 4 ligantes más cercanos al centro metálico (ϕ_{Lig}). Los modelos **1**, **3-5**, **13** y **19** mostraron una geometría cuadrada plana distorsionada con valores de ϕ_{Lig} entre 24 - 28°. En cambio, los modelos **2**, **11**, **14-15** y **20** muestran una geometría tetraédrica con ángulos cercanos a 60°. En el caso de los modelos **6** y **18**, sus ángulos

diedros de ~ 46 y 48° , respectivamente, sugieren una estructura cuadrado plana aún más distorsionada. Al comparar la similitud de las geometrías y los modos de coordinación entre el modelos **13** y **19** con los modelos **1** o **3**, se pone en manifiesto que la estructura global del péptido tiene un efecto mucho más grande en la estabilidad del complejo que la deformación de la estructura local del centro metálico; aunque este efecto puede estar siendo potencializado artificialmente por la falta de solvatación explícita en los modelos, ya que las optimizaciones se llevaron a cabo en fase gaseosa. Estos resultados sugieren que puede haber una alta flexibilidad en la geometría en la primera esfera de coordinación del ion metálico. Los complejos parecen ser mucho más sensibles a los cambios en la conformación o plegamiento de la proteína A β_{17} ; sin embargo, como ya se comentó, la flexibilidad del péptido es tal que un mismo modo de coordinación puede observarse en conformaciones muy distintas del péptido y con diferentes residuos participando en la coordinación.

3.4.3. Ligantes fuertes o ecuatoriales coordinados al cobre

Los modelos del complejo $\text{Cu}^{2+}\text{-A}\beta_{17}(\text{H}_2\text{O})_2$ obtenidos en el presente trabajo incluyen diferentes geometrías, átomos peptídicos coordinados y modos de coordinación alrededor del Cu^{2+} . Los sitios de coordinación basados en nitrógeno considerados fueron el grupo N-terminal del péptido (en el Asp1) y los N imidazólicos de los residuos de histidina en posiciones 6, 13 y 14. Por su parte, los ligantes basados en oxígeno considerados fueron los grupos carboxilo de los residuos Asp1 y Glu11, el grupo carbonilo del Asp1 y el O de las moléculas de agua. Se probaron diferentes combinaciones de estos sitios de coordinación, dando prioridad a los modos de coordinación que se han propuesto en la literatura como modos de coordinación plausibles de acuerdo a diversas metodologías tanto teóricas como experimentales. Las Tablas 3.1 y 3.2 describen las principales características de los modelos optimizados, a partir de los cuales, en conjunto con las distancia de enlace de los distintos residuos se puede evaluar el papel que cada uno juega en la estabilidad del complejo.

La estructura más estable encontrada (modelo **1**), muestra una esfera de coordinación alrededor del átomo de Cu^{2+} con geometría cuadrado plana distorsionada. El plano ecuatorial contiene coordinados tres átomos N y un átomo O, descrito como modo de coordinación 3N1O. Los átomos N provienen del grupo amino terminal (N-ter) del Asp1 y de dos anillos imidazólicos de los residuos de histidina en posiciones 6 y 14 (His6 e His14). En este modelo los N imidazólicos coordinados al metal corresponden a la posición ϵ de las histidinas acuerdo a la nomenclatura PDB (posición τ de acuerdo a la notación IUPAC) (ver Figura 3.4 a). El átomo O proviene del grupo carboxilato del residuo Asp1, coordinado de manera monodentada. En la posición axial del modelo **1** se observó una molécula de agua cuyo átomo de O se encuentra a 2.652 \AA del átomo de Cu^{2+} ; este valor de distancia indica una unión débil al compararlo con las distancias de enlace de los átomos ecuatoriales (2.142 , 2.093 , 2.049 y 2.104 \AA para el N-ter, His6, His13 y Asp1, respectivamente). La estructura de este modelo se puede observar en la Figura 3.7, en donde se compara con el modelo **4**, el cual muestra una geometría muy similar, con la diferencia que el átomo en la posición axial es el O del grupo carbonilo (CO) del Asp1 en lugar de la molécula de agua.

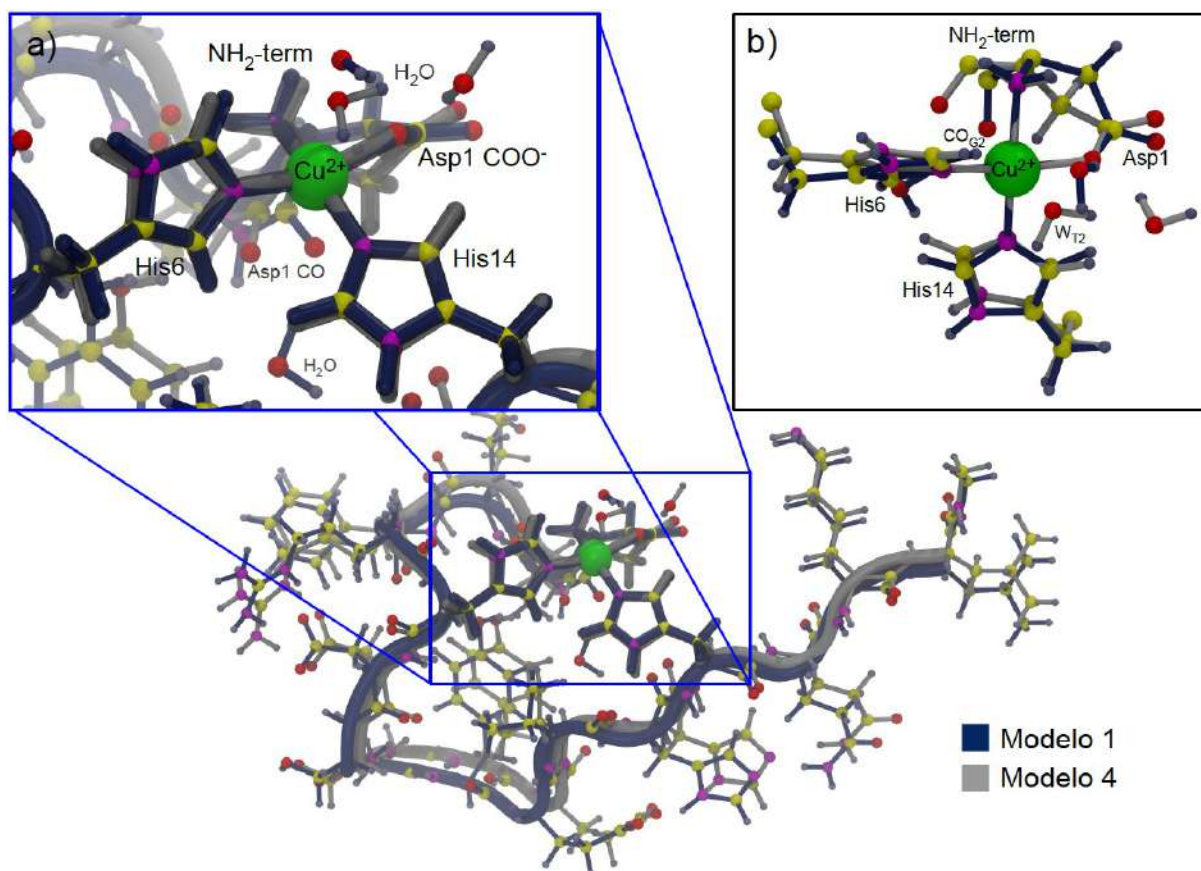


Figura 3.7. Estructura superpuesta de los modelos 1 y 4. a) Residuos coordinados al Cu²⁺. b) Detalle de la estructura alrededor del centro metálico.

Es importante mencionar que el modo de coordinación y geometría encontrados para el modelo 1 está en acuerdo con varias propuestas experimentales. En la sección 3.7 se analizarán en detalle los resultados teóricos en comparación con las mediciones experimentales reportadas en la literatura. Tomando como referencia el modelo 1, a continuación se analiza el papel de los diferentes residuos unidos en el plano ecuatorial en la coordinación con base en el impacto de la sustitución de cada uno en la estabilidad del complejo:

Al analizar en detalle los ligantes del Cu²⁺ en cada modelo (Tabla 3.2), se puede observar que en muchos casos un mismo residuo puede coordinarse al ion metálico en modos distintos, esto debido a que muchos aminoácidos poseen más de un sitio quelante en su estructura. El Asp1 tiene 3 diferentes sitios que pueden coordinarse al metal incluso de manera simultánea, estos sitios son el grupo amino terminal (N-ter), el grupo carboxilo (COO⁻) de su cadena lateral y el grupo carbonilo (CO) del enlace peptídico entre Asp1 y Ala2. Por su parte, la His6 puede coordinarse al Cu²⁺ mediante alguno de los dos nitrógenos imidazólicos de su cadena lateral o mediante su grupo CO peptídico, aunque este último caso no se probó en ninguno de los modelos. De esta forma, la participación de distintos sitios de coordinación por parte del Asp1 y la His6 llevan a diferencias en la estructura del macrociclo Asp1-Cu²⁺-His6 que se describió en la sección 3.4.1. A continuación se analiza el efecto de cada uno de estos ligantes en la estructura del complejo.

a) *Grupo amino terminal (N-ter)*: El grupo N-ter fue probado como ligante del Cu^{2+} en 15 de los 20 complejos listados en la Tabla 3.2, (modelos **1-9**, **11**, **13**, **16**, y **18-20**), y es característico de los modelos más estables. De los cinco modelos que no coordinan al N-ter, el modelo **10** es el más estable con una energía relativa de 21.5 kcal/mol. Este modelo reemplazó el grupo N-ter por un N imidazólico de la His13 y el grupo carboxilato del Asp1 por el del residuo Glu11, por lo que el modo de coordinación 3N1O se conserva respecto al modelo **1**. Los modelos **12** y **14**, por su parte, intercambiaron el N-ter por la His13 con una disminución de la estabilidad de 22.2 y 29.1 kcal/mol, respectivamente, por lo que se puede afirmar que el costo energético de intercambiar el grupo N-ter por la His13 como sitio de unión a Cu^{2+} es de ~ 22 kcal/mol. Sin embargo, es interesante considerar el caso del modelo **19**, que inicialmente se construyó con el grupo N-ter coordinado al metal y que después de la optimización se alejó a una distancia de 2.305 Å. En esta estructura se intercambió la His14 por la His13 conservando el mismo plegamiento del péptido, teniendo como consecuencia la desestabilización del complejo por ~ 75 kcal/mol y la pérdida de el ligante N-ter. Considerando este modelo podemos afirmar que aunque hay un costo energético considerable al intercambiar el N-ter por una histidina, el costo por no incluir alguno de estos dos grupos en la esfera de coordinación del Cu^{2+} es mucho mayor. Estos resultados sugieren que la participación del grupo N-ter es un determinante importante de la estabilidad del complejo y que de hecho produce una estabilidad superior a la aportada por los nitrógenos imidazólicos de los residuos de histidina al menos para las estructuras peptídicas exploradas.

b) *Nitrógenos imidazólicos de His6, His13 e His14*. Las histidinas son buenos ligantes de Cu^{2+} , sin embargo, el grado de participación de cada una de las tres histidinas presentes en la proteína $A\beta$ no había sido explicado del todo. Recientemente, varios trabajos evaluaron la participación de cada histidina de manera independiente.^{119,121} De acuerdo con los resultados mostrados en la Tabla 3.2, la His6 parece ser un requisito indispensable para lograr la estabilidad de los complejos. Los únicos modelos que no incluyeron a la His6 como ligante fueron **15** y **16**, los cuales se encuentran a una energía relativa de 33.5 y 58.5 kcal/mol. El modelo **20** es el único que sólo consideró una histidina, mientras que los modelos que consideraron dos histidinas fueron **1-8**, **13**, **17** y **18** (His6 e His14), **9** y **11** (His6 e His13), y el **15** (His13 e His14). Los modelos que incluyeron a las tres histidinas fueron **10**, **12** y **14**. Considerando las energías relativas de todos estos modelos podemos observar que la His6 y la His14 se encuentran favorecidas energéticamente sobre la His13. Como se comentó en el inciso anterior, el modelo **19** utilizó el mismo plegamiento que el modelo **3**, y únicamente se intercambió la His14 por la His13 modificando al mínimo el resto de su estructura, (ver valores de *RMSD* en la Tabla 3.1). El modelo resultante es ~ 75 kcal/mol menos estable que el modelo original, en parte debido a la pérdida del ligante N-ter; sin embargo, esta estructura sugiere que estos dos residuos no son equivalentes entre sí. Como se comentó antes, la coordinación de cada uno de estos residuos requiere de un plegamiento distinto de la cadena peptídica para las conformaciones β estudiadas. El intercambio His13 por His14, y viceversa, por consiguiente requeriría un rearrreglo importante en la estructura del péptido, el cual podría estar impedido en estructuras β , como las

observadas en fibras amiloides.

La energética de los modelos **1**, **9** y **10** podría explicar las abundancias relativas de las histidinas en coordinación con el Cu²⁺ observadas experimentalmente, ya que las tres histidinas pueden coordinar al cobre en distintas especies con diferentes modos de coordinación. Algunas especies podrían incluir a los tres residuos simultáneamente. La His6 se encontró coordinada en los tres modelos por lo que su contribución sería mayor, además de que participa en la especie más estable. Tanto la His13 como la His14 participarían en dos de estas tres especies, sin embargo la His14 forma complejos más estables, por lo que sería favorecido energéticamente. Esto, una vez más, es congruente con los reportes experimentales en donde en primer lugar se asignó a la His6 como el N imidazólico con mayor contribución por ser ligante común a dos especies, una involucrando a la His13 (Ia) y otra a His14 (Ib).¹¹⁹ A su vez, los resultados también son congruentes con el reporte de que la His14 es de hecho más favorecida que la His13, prácticamente al nivel de la His6, dejando a la His13 con una participación minoritaria (~15 %).¹²¹

Es importante hacer notar que, con la excepción del modelo **19**, los modelos que incluyeron a las histidinas 6 y 13 coordinan al Cu²⁺ a través de los N imidazólicos ϵ y δ , respectivamente, mientras que los modelos que incluyen a la His6 y la His14 lo hacen ambos residuos a través del N $_{\epsilon}$. Esta diferencia podría ser la causa de las estabilidades relativas observadas que cada ligante aporta al complejo. Para confirmar esta suposición sería necesario hacer una búsqueda conformacional exhaustiva considerando las diferentes formas tautoméricas de cada histidina. En el presente trabajo esto se plantea como una perspectiva. Sin embargo, cabe mencionar que la energética mostrada por los modelos construidos no se contradice con la mayoría de las observaciones experimentales.

c) *Grupo carboxilato (COO⁻) de Asp1 y Glu11.* Mientras que el grupo COO⁻ del Glu11 sólo se probó en el modelo **10**, el grupo carboxilato del Asp1 se encuentra en 16 de los 20 modelos estudiados. En el modelo **10**, en comparación con el modelo **12**, la participación del carboxilato del Glu11 parece ser comparable a la participación del grupo carboxilato del Asp1. Incluso los parámetros estructurales de los modelos **10** y **12** mostrados en la Tabla 3.1 son muy parecidos a pesar de que se está intercambiando un grupo β -COO⁻ del Asp1 por un γ -COO⁻ del Glu11 en posiciones distantes en la secuencia del péptido A β 17. Considerando además que el grupo carboxilato del Asp1 participa en estructuras tanto de alta como de baja energía, es de suponerse que este grupo funcional no es determinante de la estabilidad del complejo. De hecho, en el caso de los modelos **2** y **7**, la presencia del grupo COO⁻ parece no tener algún efecto considerable en la estabilidad de los complejos cuando se les compara con los modelos **1** y **6**, respectivamente. Esto sugiere una vez más una alta flexibilidad en el centro metálico del complejo, en donde el grupo carboxilato de alguno de los residuos ácidos del péptido pueden intercambiarse sin una gran penalización energética, al menos no asociada al centro metálico, sino más bien determinada por el efecto en la estructura global del péptido.

En contraste, la coordinación del grupo COO^- del Asp1 al Cu^{2+} puede tener un efecto importante en la geometría del centro metálico. Como se observa en la Tabla 3.2, la ausencia de este grupo unido al metal tuvo el efecto de modificar la geometría del complejo de una estructura cuadrado plana distorsionada (1) a una tetraédrica (2) o trigonal (7). A pesar de no tener una importante contribución energética a la estabilidad del complejo, la presencia y disponibilidad de grupos carboxilato como los provenientes de los residuos Asp1 y Glu11 pueden jugar un papel en la estabilización de la geometría cuadrado plana, que de hecho es la que se observa experimentalmente en un modo de coordinación ecuatorial 3N1O.^{125,156}

3.4.4. Átomos con unión débil y/o en posición axial al cobre

Los residuos considerados en la sección anterior (N-ter, His6, His13, His14, Asp1 y Glu11) mostraron distancias de enlace al cobre menores a 2.3 Å, por lo que fueron considerados como fuertemente ligados. En esta sección se consideran los átomos que mostraron distancias de coordinación en el intervalo de 2.3 a 3.2 Å, los cuales están identificados en la Tabla 3.2 (página 55), mientras que en la Tabla 3.3 se pueden consultar las distancias de enlace para todos los complejos. En todas las estructuras iniciales, los diferentes sitios de coordinación unidos al ion metálico en el péptido fueron tratados de manera equivalente, con distancias de enlace uniformes de ~ 2.1 Å. Esto sugiere que las distancias de enlace de los átomos débilmente coordinados se incrementaron durante el proceso optimización de manera selectiva, mientras que los residuos con unión fuerte en general disminuyeron sus distancias. El análisis de las distancias en ligantes fuertes y débiles se presenta en la sección 3.7.1, donde se comparan con diversos resultados experimentales. Como se discute a continuación, los ligantes débiles también ocuparon posiciones particulares en las geometrías del centro metálico, como por ejemplo, la posición axial de estructuras cuadrado planas.

a) *Grupo carbonilo (CO) del Asp1.* A pesar de que muchos de los modelos estudiados se construyeron considerando el grupo carbonilo del Asp1 como ligante en el plano ecuatorial del Cu^{2+} en su estructura inicial, ninguno de los complejos optimizados conservó al carbonilo en esa posición. Además, en todos los casos se observó un incremento considerable en la distancia CO-Cu^{2+} . En la Tabla 3.3 se incluyen las distancias al ion metálico del carbonilo del Asp1 para todos los complejos, en donde se puede observar que únicamente los modelos 3-5, 13 y 18-20 conservaron al grupo CO del Asp1 a una distancia menor a 3.2 Å. Entre estos, el modelo 13 mostró la menor distancia con un valor de 2.538 Å. Considerando estos resultados, se observa que la coordinación del grupo carbonilo del Asp1 en la posición ecuatorial del centro metálico en el componente I (a bajo pH) del complejo $\text{Cu}^{2+}\text{-A}\beta_{17}$ es poco probable y es de hecho inestable, al menos para el conjunto de conformaciones del péptido y de modos de coordinación estudiados. En el mejor de los casos este grupo puede unirse débilmente a una distancia del ion metálico promedio de ~ 2.7 Å. En la mayoría de los casos donde el CO del Asp1 se coordinó débilmente, este grupo se encontró ocupando la posición apical de una geometría cuadrado plana distorsionada (modelos 3-5, 13, 18 y 19).

Tabla 3.3. Distancias (\AA) al Cu^{2+} de los ligantes presentes en los complejos Cu^{2+} -A β 17(H_2O)₂.^a

No.	N _{ter}	O ^{Asp1} _{COO⁻}	O ^{Asp1} _{CO}	N ^{His6} _{ϵ}	N ^{His6} _{δ}	N ^{His13} _{ϵ}	N ^{His14} _{ϵ}	N ^{His14} _{δ}	O ^{Glu11} _{COO⁻}	O _{H₂O}	O _{H₂O}
1	2.142	2.104		2.093			2.049			2.652	
2	2.098			2.056			2.014			2.287	
3	2.200	2.032	2.705	2.029			2.052			3.248	
4	2.196	2.057	2.673	2.040			2.048			2.998	
5	2.201	2.036	2.644	2.033			2.061			3.230	
6	2.142	1.997		2.035			2.047			3.092	
7	2.098			2.009			2.003				
8	2.068		2.768	2.062			1.989				
9	2.097	2.070			2.018	2.170				2.620	
10				2.022		2.063		2.211	2.087	3.064	3.139
11	2.081	2.067			2.004	2.121				3.050	
12		2.081		2.054		2.072	2.300			2.326	3.350
13	2.198	2.056	2.538	2.067			2.016				
14		1.984		2.054		2.039	2.188			3.380	
15		2.009 ^b				2.026	2.050			2.549	
16	2.001	2.044				2.960	1.954			3.164	3.314
17		1.959			1.996		2.118				
18	2.173	2.121	2.711	2.033			2.064				
19	2.305	2.014	2.888	2.041		2.154				3.208	
20	2.193	1.993	3.129		2.056					2.170	3.410

^a Se muestran las distancias $d_{\text{Cu}} \leq 3.2 \text{ \AA}$ para ligantes proteicos y $d_{\text{Cu}} \leq 3.5 \text{ \AA}$ para moléculas de agua.

^b El grupo carboxilato mostró coordinación pseudobidentada con el segundo O a una $d_{\text{Cu}} = 3.087 \text{ \AA}$.

Las distancias de enlace observadas para el CO del Asp1, en contraste con las distancias observadas con otros átomos, se encuentran en desacuerdo con varios reportes experimentales en los que se propone que este grupo de hecho participaría en la coordinación al cobre en la posición ecuatorial, mientras que el grupo carboxilato del Asp1 en todo caso estaría ocupando la posición axial.¹²²⁻¹²⁵ Estos reportes también contrastan con los resultados presentados en la sección anterior relacionadas con el papel del grupo carboxilato del Asp1. Por este motivo, con la intención de explicar las diferencias entre los cálculos teóricos y las propuestas experimentales relacionadas a la participación de los grupos CO y COO⁻ del Asp1 en la coordinación al Cu^{2+} , se llevó a cabo un análisis más detallado acerca de la influencia de la estructura de la cadena lateral del Asp1 en la coordinación del cobre a la proteína A β 17. Este análisis se presentará más adelante en la sección 3.5.

b) Moléculas de agua. En la mayor parte de los complejos estudiados las moléculas de agua que inicialmente se incluyeron en la primera capa de coordinación del metal, ocupando principalmente posiciones axiales disponibles, salieron de la esfera de coordinación alejándose del Cu^{2+} y formando puentes de hidrógeno con grupos polares de la proteína. En algunos casos muy particulares, como por ejemplo en los modelos **2** y **20**, una

de las moléculas de agua se mantuvo directamente coordinado al Cu^{2+} con distancias del enlace de 2.287 y 2.170 Å, respectivamente. Sin embargo, como resultado de la coordinación de este ligante, la geometría del complejo se modificó hacia un tetraedro (Tabla 3.2, página 55). En el caso de los modelos **1**, **9-11**, **15** y **16** se observó una molécula de agua participando como ligante débil; las geometrías en estos modelos son principalmente tetraédricas o cuadrado planas muy distorsionadas. A diferencia de esto, en el modelo **12** las dos moléculas de agua participan como ligantes débiles en las dos posiciones axiales; posiblemente estas moléculas de agua también juegan un papel en la estabilización de la geometría de este complejo, ya que este modelo tiene la geometría más plana de todas. El modelo **1** por su parte muestra una molécula de agua axial en una geometría cuadrado plana, posiblemente participando también en la estabilización de esta geometría (ver Figura 3.7 en la página 57).

Un resultado que sobresale en cuanto a la coordinación de moléculas de agua al centro metálico de los complejos $\text{Cu}^{2+}\text{-A}\beta_{17}(\text{H}_2\text{O})_2$ es la alta estabilidad de los modelos **1** y **2**, los cuales involucran a una molécula de agua como ligante débil (**1**) o fuerte (**2**). La participación de una molécula de agua en la posición axial parece ser ligeramente más favorable que la participación axial del grupo carbonilo del Asp1. La geometría y modo de coordinación del modelo **1** es de hecho compatible con la propuesta basada en experimentos de ENDOR de 34 GHz en la que un acoplamiento hiperfino de ^{17}O es asociado con la participación de una molécula de agua axial.¹⁵³

3.5. La coordinación del Asp1 del péptido A β al cobre

En la sección 3.4 se analizaron las estructuras obtenidas de diferentes modelos de los complejos $\text{Cu}^{2+}\text{-A}\beta_{17}(\text{H}_2\text{O})_2$ evaluando el papel que la coordinación de diferentes residuos aporta a la estabilidad de cada complejo. En general se encontró una buena conexión con las propuestas experimentales reportadas en la literatura en las que se pretende elucidar el modo de coordinación del cobre, incluyendo la identificación del conjunto de residuos de aminoácido que participan en la coordinación. En esta sección se analiza con detalle la participación del Asp1 en la coordinación al Cu^{2+} , cuya evaluación a través del análisis energético y estructural (en la sección anterior) se encontró en franca contradicción con las predicciones experimentales. Dichas predicciones están basadas en diversas técnicas espectroscópicas como EPR y constituyen una sólida evidencia, por lo que nos dimos a la tarea de analizar extensa y cuidadosamente los factores que llevan a tal contradicción.

3.5.1. Isómeros conformacionales de la cadena lateral del Asp1

De acuerdo a la metodología descrita en la sección 3.3.4 (página 48), se generó una serie de modelos a partir de la estructura optimizada de uno de los modelos más estables, en los que se modificó la conformación de la cadena lateral del Asp1, es decir, sólo se rotó el ángulo diedro $\phi_{\text{Asp1}}=(\text{C}_\delta, \text{C}_\alpha, \text{C}_\beta, \text{C}_\gamma)$ a valores de 180° y $\pm 60^\circ$ para obtener los conformeros *anti* (A) y *gauche* (G1 y G2), respectivamente (ver Figura 3.4 b). Además se probaron diferentes configuraciones de las dos moléculas de agua incluidas; después de estas modificaciones estructurales

los modelos se optimizaron nuevamente. Los conformeros obtenidos de esta forma se encuentran incluidos en el conjunto de los 20 complejos descritos en las secciones previas. De esta manera se obtuvieron tres conformeros *anti* y tres *gauche*, los cuales en esta sección denominamos A1, A2, A3, G1, G2 y G2', para analizar el efecto de la conformación particular de la cadena lateral del Asp1. Estos conformeros corresponden a los modelos **2**, **1**, **8**, **7**, **4** y **6**, respectivamente.

En la Tabla 3.2 (página 55) se mostraron los valores del ángulo ϕ_{Asp1} , y la clasificación de la conformación para todos los modelos. En la Tabla 3.1 (página 51) se puede observar mediante los valores de $RMSD_{noH}$ o $RMSD_{bbk}$ que este conjunto de estructuras tienen conformaciones globales (plegamientos) muy similares y difieren ligeramente en las estructuras de sus cadenas laterales ($RMSD_{CadLat}$) debido a la modificación del ángulo ϕ_{Asp1} . Los modelos **6** y **7** (G2 y G1) además mostraron un cambio importante en la estructura de la cadena peptídica debido al rearrreglo de los residuos Glu3, Phe4 y Arg5 que llevó a incrementar el número de puentes de hidrógeno estabilizantes.

En la Tabla 3.4 se resumen algunas de las características estructurales de la esfera de coordinación del Cu^{2+} para la serie conformeros del Asp1. La comparación entre ligantes iniciales y optimizados ofrece información sobre la estabilidad de la coordinación de algunos grupos a través de un átomo de oxígeno; es decir, las preferencias del metal por enlazarse a un grupo carboxilato, a un grupo carbonilo o a una molécula de agua. Los átomos N coordinados (provenientes de los grupos N-ter, His6 e His14) son los mismos en todos estos modelos y se ubicaron en todos los casos en el plano ecuatorial como estructura inicial para la optimización.

Tabla 3.4. Energías relativas, ligantes involucrados y geometrías de los isómeros conformacionales de Asp1 en complejos $Cu^{2+}-\beta_{17}(H_2O)_2$.

Conformero	A1 (2)	A2 (1)	A3 (8)	G1 (7)	G2 (4)	G2' (6)
ΔE (kcal/mol)	1.7	0.0	16.9	12.0	7.1	12.0
Ligantes iniciales	(3N, CO) _{eq} , H ₂ O _{ax}	3N, H ₂ O	(3N, CO) _{eq} , H ₂ O _{ax}	(3N, CO) _{eq} , H ₂ O _{ax}	(3N, COO ⁻) _{eq} , CO _{ax}	(3N, CO) _{eq} , COO ⁻ _{ax}
Ligantes optimizados	3N, H ₂ O	(3N, COO ⁻) _{eq} , H ₂ O _{ax}	3N _{eq} , CO _{ax}	3N _{eq}	(3N, COO ⁻) _{eq} , CO _{ax}	(3N, COO ⁻) _{eq}
$d_{Cu-N-ter}$ (Å)	2.099	2.142	2.068	2.098	2.196	2.141
$d_{Cu-N(His6)}$ (Å)	2.056	2.093	2.063	2.009	2.039	2.034
$d_{Cu-N(His14)}$ (Å)	2.014	2.049	1.989	2.002	2.048	2.047
d_{Cu-OCO} (Å)	3.988	2.104	4.194	6.037	2.057	1.997
d_{Cu-OC} (Å)	3.255	3.290	2.768	3.361	2.673	3.307
d_{Cu-OH2} (Å)	2.287	2.652	3.547	4.021	3.998	3.092
ϕ_{Lig} (°)	60	28			24	46
ϕ_{3N-Cu} (°)	24	22	9	5	11	27

Como se mencionó anteriormente, la principal motivación detrás de analizar los conformeros de la cadena lateral del Asp1 es estudiar los factores estructurales que llevan a estos complejos a favorecer la coordinación al Cu^{2+} del grupo carboxilato del Asp1 en posición ecuatorial en lugar de favorecer a su grupo carbonilo, en desacuerdo con varias propuestas experimentales. Como se observa en la Tabla 3.4, cada uno de los conformeros permite una disposición diferente de los ligantes basados en oxígeno; mientras que las conformaciones A y G1 alejan al grupo COO^- del Cu^{2+} cuando este se encuentra unido al grupo N-ter, las conformaciones G2 resultan favorables para coordinación simultánea del N-ter, del CO y del COO^- . Esta configuración tridentada se supone más favorable que la bidentada posible en T y G1 en donde sólo el N-ter y el CO se pueden coordinar simultáneamente. De hecho, la configuración tridentada G2 ha sido considerada en los modos de coordinación propuestos en la literatura, donde el N-ter y el CO del Asp1 se han asignado a las posiciones ecuatoriales, mientras que su grupo COO^- se ha asignado a la posición apical.^{124,125} No obstante, un segundo arreglo de estos grupos es posible, en donde los grupos N-ter y COO^- ocupan el plano ecuatorial, mientras que el grupo CO se ubica en la posición axial. Estas dos disposiciones de la conformación G2 las identificaremos en adelante como $(\text{CO}_{\text{eq}}, \text{COO}^-_{\text{ax}})$ y $(\text{COO}^-_{\text{eq}}, \text{CO}_{\text{ax}})$, respectivamente. El modelo G2 de la Tabla 3.4 consideró la disposición $(\text{CO}_{\text{eq}}, \text{COO}^-_{\text{ax}})$ en su estructura inicial, mientras que el modelo G2' se construyó como $(\text{CO}_{\text{eq}}, \text{COO}^-_{\text{ax}})$. A continuación se describen las estructuras obtenidas para cada una de las diferentes disposiciones de átomos O.

3.5.2. Coordinación bidentada de los grupos N-ter y CO del Asp1 al cobre

La coordinación de los grupos N-ter y CO del Asp1 en el mismo plano ecuatorial que la His6 y la His14 se planteó en los conformeros A y G1, (ver ligantes iniciales de los modelos A1, A3 y G1 en la Tabla 3.4). Después de la optimización de geometría, el grupo COO^- se observó en estos conformeros a una distancia del Cu^{2+} de 3.988 Å o mayor, por lo que su participación en la coordinación con el metal no está favorecida. En el caso del grupo CO, en ninguno de los tres modelos se conservó la coordinación en el plano ecuatorial planteada inicialmente; de hecho, esta coordinación no se observó en ninguna estructura del conjunto completo de 20 modelos descrito anteriormente. Para el modelo A1, una molécula de agua reemplazó al grupo carbonilo en el plano ecuatorial, incrementando considerablemente la estabilidad del complejo en comparación con los modelos A3 y G1. En el modelo A3 no hubo reemplazo del CO por otro grupo, sin embargo, este grupo se desplazó a la posición axial quedando unido débilmente a una distancia al Cu^{2+} de 2.768 Å. En el caso de G1, el grupo CO salió completamente de la esfera de coordinación a una distancia de 3.361 Å del centro metálico sin que algún otro grupo lo reemplazara. En la Figura 3.8 se pueden comparar las energías relativas y las esferas de coordinación del Cu^{2+} de estos conformeros.

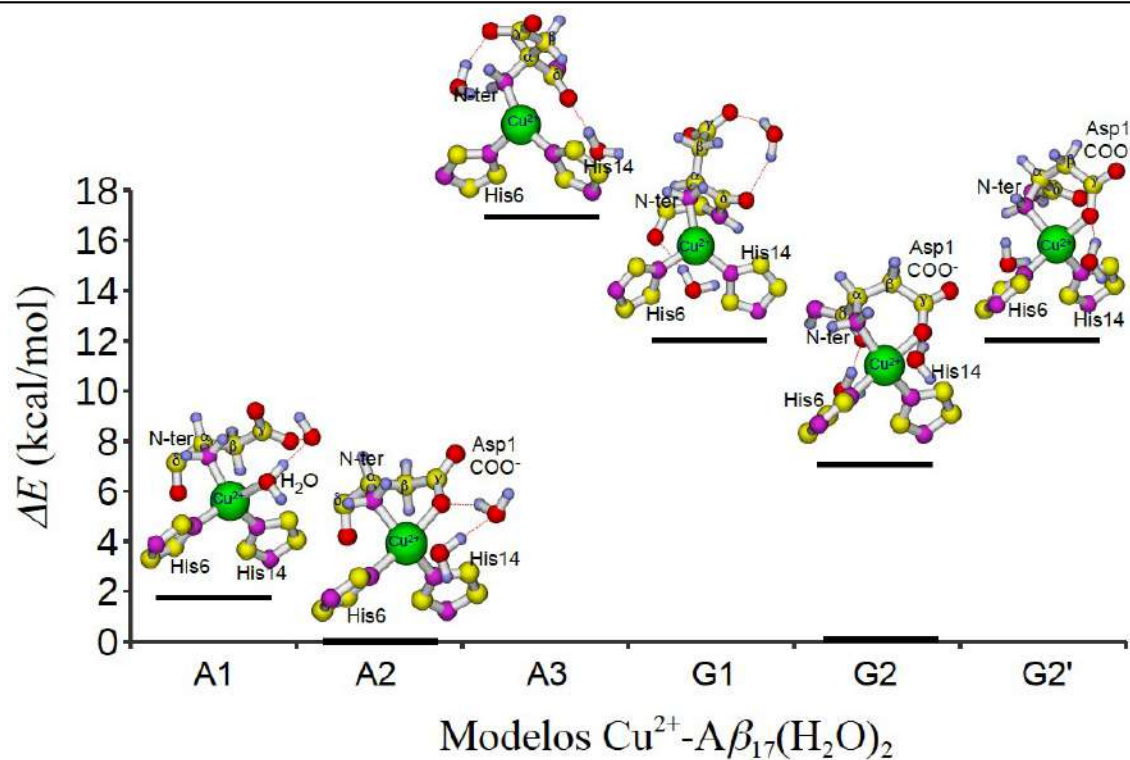


Figura 3.8. Energía relativa y estructura del centro metálico para los conformeros de los complejos Cu^{2+} - $\text{A}\beta_{17}(\text{H}_2\text{O})_2$.

En estas estructuras se puede observar que las moléculas de agua, además de ser capaces de entrar con facilidad en la esfera de coordinación del metal, pueden formar puentes de hidrógeno con los ligandos basados en oxígeno y de esta forma estabilizar el complejo. Sin embargo, estas interacciones no fueron suficientemente favorables para mantener la coordinación del carbonilo del Asp1 en el plano ecuatorial. Este tipo de estabilización mediada por puentes de hidrógeno se postuló en la literatura para explicar la estabilidad del componente I en complejos de Cu^{2+} con variantes del péptido $\text{A}\beta_{16}$ modificadas en el extremo N-terminal.^{116-118,126,157} En la sección 3.7 se comparan tales propuestas con los resultados derivados de nuestros modelos. Más adelante también se discuten los posibles factores metodológicos que podrían perjudicar nuestras observaciones relacionadas a la baja estabilidad del grupo carbonilo del Asp1 como ligante ecuatorial del Cu^{2+} ; sin embargo, los resultados de las optimizaciones de los modelos A1, A3 y G1 permiten concluir que la coordinación del grupo carbonilo en el plano ecuatorial del Cu^{2+} es desfavorable, y que de hecho la formación de la coordinación bidentada del Asp1 con los grupos N-ter y CO en el plano ecuatorial no están favorecidos en el complejo Cu^{2+} - $\text{A}\beta_{17}$.

3.5.3. Coordinación tridentada de los grupos N-ter, CO y COO^- del Asp1 al cobre

Este tipo de coordinación sólo es posible en los modelos en conformación G2 de la cadena lateral del Asp1 ($\phi_{\text{Asp1}} \sim -60^\circ$). Las dos disposiciones accesibles de los grupos carbonilo y carboxilato del Asp1 se probaron en los modelos G2 ($\text{COO}^-_{\text{eq}}, \text{CO}_{\text{ax}}$) y G2' ($\text{CO}_{\text{eq}}, \text{COO}^-_{\text{ax}}$). Como se puede observar en la Tabla 3.4 y en la Figura 3.8, la optimización de la estructura del modelo G2' provocó un cambio en la disposición de estos grupos en la esfera de

coordinación del Cu^{2+} , en la que el grupo COO^- , inicialmente ubicado en posición axial, se desplazó hacia el plano ecuatorial, mientras que el grupo CO pasó de la posición ecuatorial a quedar fuera de la esfera de coordinación (la distancia al ión metálico fue de 3.307 Å). La pérdida de la coordinación del grupo CO es congruente con el comportamiento observado en los modelos A1, A3 y G1, lo cual reafirma la conclusión de que la coordinación del grupo carbonilo del Asp1 en el plano ecuatorial no estable. Por su parte, la entrada del grupo carboxilato al plano ecuatorial del metal es un resultado que también contrasta con las varias propuestas de la literatura relativas a la participación de este grupo, en las que primero se descartó la coordinación directa del COO^- al Cu^{2+} ,¹¹⁸ y luego se le asignó como ligante axial.^{124,125} En todos los cálculos en donde se colocó el grupo COO^- del Asp1 en la posición axial, el ligante se desplazó al plano ecuatorial durante la optimización de geometría, por lo que podemos concluir que la coordinación del grupo carboxilato del Asp1 al Cu^{2+} en la posición axial es también inestable.

En el modelo G2, a diferencia de la optimización de G2', se conservó la disposición de ligantes durante la optimización de geometría (ver Tabla 3.4). De hecho, esta estructura es la única que no modificó su esfera de coordinación, además de resultar más estable que los modelos A1, A3, G1 y G2'. En este conformero encontramos entonces la coordinación de los grupos N-ter y COO^- compartiendo el plano ecuatorial con la His6 y la His14, mientras que la posición axial está ocupada por el grupo CO del Asp1 como ligante débil a una distancia de 2.673 Å del Cu^{2+} . Esta disposición se encontró también en varios otros de los modelos descritos en las secciones anteriores (ver Tabla 3.2). Estos resultados confirman que para la coordinación tridentada del Asp1, la disposición (COO^-_{eq} , CO_{ax}) de ligantes basados en oxígeno es la más favorable cuando el grupo N-ter, la His6 y la His14 ocupan el plano ecuatorial. También se concluye con certeza que la disposición (CO_{eq} , COO^-_{ax}) es inestable y por lo tanto poco probable.

3.5.4. Participación de las moléculas de agua en la coordinación al cobre

Aunque en todos los modelos se incluyó en su estructura dos moléculas de agua, la participación de estas no fue igual para todos los conformeros. De hecho, además de explorar los diferentes conformeros presentados, también se probaron diferentes posiciones de las moléculas de agua para llegar a los modelos más estables. En general, durante la optimización de los modelos, las moléculas de agua formaron interacciones por puente de hidrógeno con los grupos polares cercanos. Esto ocurrió en los modelos A3, G1, G2 y G2', como se puede observar en la Figura 3.8. Sin embargo, en el caso del conformero A1, la optimización llevó a que una molécula de agua reemplazara al grupo CO en la posición ecuatorial, con un considerable incremento en la estabilidad del complejo. Partiendo del modelo A1 con una rotación de 25° en el ángulo diedro de la cadena lateral del Asp1 (ϕ_{Asp1}) y, optimizando nuevamente la estructura, se llegó al modelo A2, en el cual el grupo COO^- del Asp1 reemplazó a la molécula de agua en el plano ecuatorial mientras que la molécula de agua se desplazó a la posición axial. Esto llevó a una ligera estabilización adicional (ver Figura 3.8). Estos resultados permiten proponer que el complejo Cu^{2+} -A β tiende a formar complejos con 4 ligantes ecuatoriales adoptando una

molécula de agua si el grupo carboxilato no se encuentra disponible. Curiosamente, comparando la estabilidad de los modelos A2 y G2 parece ser que la coordinación de una molécula de agua en la posición axial es ligeramente más estable que la coordinación del carbonilo del Asp1 en la misma posición, aunque A2 fue el único modelo en el que una molécula de agua se encontró en la posición axial de una geometría cuadrado plana.

3.5.5. Participación de los ligantes basados en oxígeno en la coordinación al cobre

Considerando que el modo de coordinación para el complejo Cu²⁺- β A más probable es el 3N1O de acuerdo a los experimentos de EPR,¹¹³⁻¹¹⁶ con la posible participación de ligantes axiales de acuerdo con experimentos de EXAFS, NMR e IR,^{124,125,156,158} y que los ligantes basados en nitrógeno suelen ser favorecidos sobre los ligantes basados en oxígeno en los complejos proteicos con Cu²⁺, podemos suponer que la coordinación de estos últimos ligantes es más lábil. En esta suposición el grupo N-ter, la His6 y la His14 permanecerían en cierta forma fijos o al menos permanecerían coordinados en mayor proporción, mientras que los ligantes basados en oxígeno tendrían oportunidad de intercambiarse o "reacomodarse" de distintas maneras. El planteamiento de los conformeros de la cadena lateral del Asp1 es congruente con esta suposición. Considerando la energética de los conformeros analizados en las secciones anteriores, podemos ubicar la diferentes disposiciones de ligantes basados en oxígeno en una escala de estabilidad creciente como (CO_{eq}, COO⁻_{ax}) \ll (CO_{ax}) < (COO⁻_{eq}) < (COO⁻_{eq}, CO_{ax}) < (H₂O_{eq}) \leq (COO⁻_{eq}, H₂O_{ax}), todos estos derivados de la coordinación del Asp1 e incluyendo los tres grupos que aportan a un nitrógeno coordinado en el plano ecuatorial (3N_{eq}) N-ter, His6 e His14. Las últimas cuatro de estas especies se encuentran en un rango de energía de ~12 kcal/mol, por lo que, considerando la energía térmica a temperatura ambiente o fisiológica, se podría esperar un libre intercambio o equilibrio entre estas especies en solución.

Como se discutió en la sección 3.4.3 (página 56), el intercambio de los grupos que coordinan al Cu²⁺ mediante un átomo de nitrógeno, a diferencia de los ligantes basados en oxígeno, resulta en una desestabilización del complejo de al menos ~20 kcal/mol, lo que reafirma la suposición que considera que los grupos que se coordinan mediante nitrógeno serían menos lábiles. Sin embargo, también existen las evidencias experimentales de que estos intercambios de ligantes N son comúnmente observables, como es el caso por ejemplo del intercambio entre la His13 y la His14 para formar los componentes Ia y Ib del complejo Cu²⁺-A β .^{119,121} Tomando en cuenta esto, es de esperarse una variedad de especies presentes en solución a temperatura fisiológica. Considerando a las especies que intercambian ligantes N (siempre y cuando se mantenga la coordinación del grupo N-terminal), el número de especies que intercambian ligantes basados en O sería aún mayor a los mencionados en esta sección. Por ejemplo, considerando estructuras que contengan los macrociclos 1-6-14, 1-6-13 y 1-13-14, cada una de estas tres especies podría incluir alguna de las cinco disposiciones de ligantes O analizadas, con lo que se obtendrían 15 posibles esferas de coordinación diferentes las cuales se encontrarían en un intervalo de energía de ~33 kcal/mol (ver Tabla 3.1, página 51). A estas número le podemos multiplicar las diferentes formas

tautoméricas de cada histidina debido a la coordinación con el Cu^{2+} a través del N_δ o N_ϵ , las cuales no fueron exploradas extensivamente en este trabajo, pero significarían un total de 120 especies diferentes. Las energías relativas de los modelos probados en este trabajo y las tendencias de estabilidad exploradas al intercambiar ligantes permiten tener una idea de la abundancia relativa de las diferentes especies posibles, sin embargo, estas energías no incluyen las contribuciones entrópicas necesarias para evaluar tales abundancias relativas en solución. Estas limitantes, en conjunto con otras discutidas en la sección 3.7.7, deben ser bien consideradas para evaluar los alcances de la metodología utilizada. Como se analiza en la sección 3.7, la comparación con diversas mediciones experimentales permiten orientar de mejor manera las conclusiones derivadas de estos modelos.

3.6. Papel de la cadena peptídica de la proteína $A\beta$ en la coordinación con el cobre

El conjunto de modelos analizados hasta el momento permitieron evaluar la contribución que cada uno de los diferentes residuos disponibles aporta a la estabilidad del complejo $\text{Cu}^{2+}\text{-}A\beta_{17}$, como se analizó en la sección 3.4. Además permitieron postular la existencia de diversas especies con estabilidades similares que estarían presentes en solución probablemente en equilibrio dinámico entre estas, (ver sección 3.5). Sin embargo, como se ha comentado en estas secciones, existen algunas discrepancias en cuanto a la información reportada en la literatura con respecto a la asignación del ligante basado en oxígeno ocupando el plano ecuatorial 3NIO de los complejos. El análisis detallado de los isómeros conformacionales del Asp1 y la comparación de la estabilidad de diferentes grupos aportando el átomo O coordinado sugirió que la especie propuesta en la literatura es de hecho inestable con respecto a los modelos aquí estudiados. Por este motivo, en la sección 3.7.7 se analizarán los posibles factores metodológicos que podrían artificialmente influenciar nuestras conclusiones hacia el desacuerdo con el experimento. Uno de los factores por analizar es la conformación de la cadena peptídica utilizada para construir los modelos, la cual, de ningún modo se podría considerar representativa de una proteína intrínsecamente desordenada que además es soluble en solución acuosa. La estructura "base" para generar varios modelos podría estar de alguna forma predispuesta para coordinar algunos residuos mientras que para otros podría estar impedida. De esta manera, el análisis del efecto de la estructura de la cadena peptídica utilizada en los complejos es obligada. Desafortunadamente, estudiar el espacio conformacional de un péptido con 858 grados de libertad, como las estructuras aquí estudiadas, es prácticamente imposible con la metodología elegida, por lo que en esta sección se propuso reducir la dimensionalidad de la superficie de energía potencial para estudiar la coordinación de los mismos ligantes considerados pero en modelos más simples. Para conseguir esto se generaron dos series de complejos considerando los péptidos $A\beta_3$ y $A\beta_6$, a los que se aplicó un tratamiento y análisis similar a lo descrito en modelos con el péptido $A\beta_{17}$, (ver también la explicación en la sección 3.3.4, página 48).

3.6.1. Isómeros conformacionales de los complejos Cu-A β ₃ y Cu-A β ₆

Para los modelos con 3 y 6 aminoácidos, se decidió explorar los mismos conformeros del Asp1 planteados en la Sección 3.5.1 para los modelos con 17 aminoácidos para comparar las tendencias energéticas. De esta forma, para cada serie se generaron 4 conformeros *anti* y *gauche* (A, G1, G2 y G2'), con las mismas disposiciones de ligantes ecuatoriales y axiales iniciales, como se describe en las Tablas 3.5 y 3.6.

Tabla 3.5. Energías relativas, ligantes involucrados y geometrías de los isómeros conformacionales de Asp1 en los complejos Cu²⁺-A β ₃(H₂O)₂.

Confórmero	A	G1	G2	G2'
ΔE (kcal/mol)	18.6	27.3	0.0	11.8
Ligantes iniciales	(3N, CO) _{eq} , H ₂ O _{ax}	(3N, CO) _{eq} , H ₂ O _{ax}	(3N, COO ⁻) _{eq} , CO _{ax}	(3N, CO) _{eq} , COO ⁻ _{ax}
Ligantes optimizados	(3N, CO) _{eq} , H ₂ O _{ax}	(3N, CO) _{eq} , H ₂ O _{ax}	(3N, COO ⁻) _{eq} , CO _{ax}	(3N, COO ⁻) _{eq} , CO _{ax}
$d_{Cu-N-ter}$ (Å)	2.090	2.133	2.130	2.072
$d_{Cu-N(His)}$ (Å)	2.074	2.006	2.016	2.037
$d_{Cu-N(His)}$ (Å)	2.050	2.074	2.041	2.121
d_{Cu-OCO} (Å)			2.034	2.012
d_{Cu-OC} (Å)	2.170	2.211	2.382	2.657
d_{Cu-OH2} (Å)	3.087	2.744	-	2.916
ϕ_{Lig} (°)	11	7	19	-12

Tabla 3.6. Energías relativas, ligantes involucrados y geometrías de los isómeros conformacionales de Asp1 en los complejos Cu²⁺-A β ₆(H₂O)₂.

Confórmero	A	G1	G2	G2'
ΔE (kcal/mol)	14.4	26.5	0.0	5.3
Ligantes iniciales	(3N, CO) _{eq} , H ₂ O _{ax}	(3N, CO) _{eq} , H ₂ O _{ax}	(3N, COO ⁻) _{eq} , CO _{ax}	(3N, CO) _{eq} , COO ⁻ _{ax}
Ligantes optimizados	(3N, CO) _{eq} , H ₂ O _{ax}	(3N, CO) _{eq} , H ₂ O _{ax}	(3N, COO ⁻) _{eq} , CO _{ax}	(3N, COO ⁻) _{eq} , CO _{ax}
$d_{Cu-N-ter}$ (Å)	2.099	2.113	2.097	2.113
$d_{Cu-N(His6)}$ (Å)	2.014	2.093	2.055	2.029
$d_{Cu-N(His)}$ (Å)	2.092	2.009	2.066	2.046
d_{Cu-OCO} (Å)			1.964	2.001
d_{Cu-OC} (Å)	2.357	2.303	2.617	2.765
d_{Cu-OH2} (Å)	2.319	2.573		
ϕ_{Lig} (°)	-25	-26	34	-8

En la Figura 3.9 se pueden comparar las estructuras y las energías relativas de la esfera de coordinación de cada uno de los conformeros para los complejos $\text{Cu}^{2+}\text{-A}\beta_3(\text{H}_2\text{O})_2$ y $\text{Cu}^{2+}\text{-A}\beta_6(\text{H}_2\text{O})_2$. En estas gráficas se observa que, en modelos con 3 y 6 aminoácidos, se pueden ubicar a los diferentes tipos de conformeros en una escala de estabilidad creciente como $\text{G1} < \text{A} < \text{G2}' < \text{G2}$. Este resultado se puede explicar de acuerdo con el análisis presentado en la Sección 3.5.3 (página 65), donde se encontró que la coordinación tridentada del Asp1 con los grupos N-ter y COO^- en el plano ecuatorial es la más favorecida para el complejo $\text{Cu}^{2+}\text{-A}\beta$.

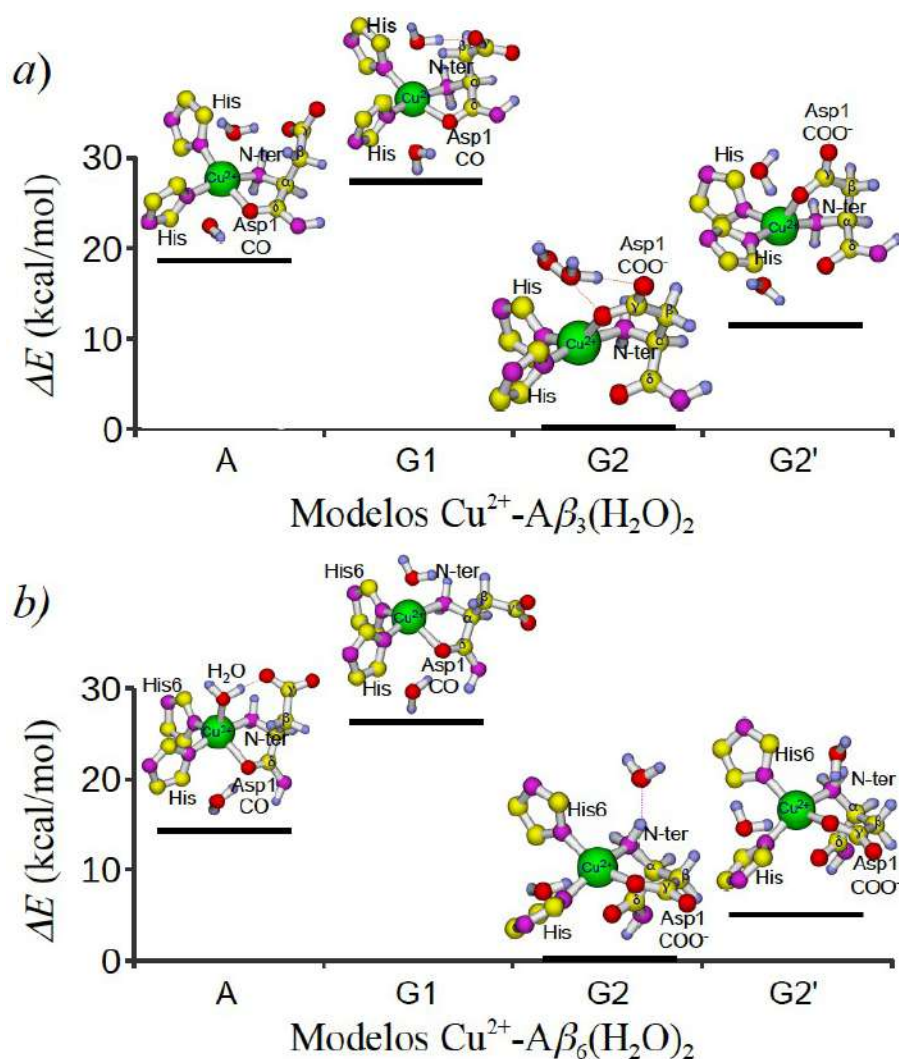


Figura 3.9. Energía relativa y estructura del centro metálico para los conformeros de los complejos $\text{Cu}^{2+}\text{-A}\beta_n(\text{H}_2\text{O})_2$, $n = 3$ (a), 6 (b).

Un resultado interesante que sobresale en la Figura 3.9, es que los conformeros A y G1 en modelos de 3 y 6 aminoácidos, a diferencia de los conformeros con 17 aminoácidos, son capaces de mantener el enlace entre el cobre y el grupo carbonilo del Asp1. En el caso de los conformeros $\text{Cu}^{2+}\text{-A}\beta_3(\text{H}_2\text{O})_2$, los modelos A y G1 tienen una distancia de enlace $\text{Cu}^{2+}\text{-OC}$ de 2.170 y 2.211 Å, respectivamente. Sin embargo, estos modelos son menos estables que el conformero G2 por 18.6 y 27.3 kcal/mol, respectivamente, lo que es congruente con las

conclusiones obtenidas con modelos de 17 aminoácidos, que establecen que el grupo COO⁻ es mejor ligante ecuatorial que el grupo CO. Además podemos agregar el hecho de que el enlace con el carbonilo en ambos modelos es el más largo en comparación con el resto de los átomos coordinados ecuatorialmente en cada modelo, (ver valores en la Tabla 3.5). Ésto también confirma que la estructura de la cadena peptídica utilizada en los modelos con 17 aminoácidos no es la causante de la aparente preferencia del Cu²⁺ por coordinarse al grupo carboxilato sobre el carbonilo del Asp1.

Los confórmeros A y G1 en los modelos con 6 aminoácidos muestran un comportamiento parecido a los modelos con 3 aminoácidos, pero presentan dos diferencias muy importantes. La primera es que el enlace Cu²⁺-OC se observa aún más alargado (distancias de enlace de 2.357 y 2.303 Å, para los modelos A y G1, respectivamente); en segundo lugar, en ambos modelos la interacción del ion metálico con las moléculas de agua es más estrecha que lo observado en los modelos con 3 aminoácidos. En el caso del confórmero A, la molécula de agua en posición axial se encuentra a una distancia menor que el grupo carbonilo en la posición ecuatorial (ver distancias en la Tabla 3.6). También se observó en este complejo que se redujo la energía relativa respecto al modelo más pequeño, lo que sugiere que la entrada de la molécula de agua estabiliza el complejo a la vez que desestabiliza la coordinación del grupo CO. Este comportamiento es congruente con lo observado con el modelo A1 de 17 aminoácidos. En este sentido pareciera ser que los modelos con 6 aminoácidos tienden a comportarse de manera más congruente con los modelos de 17 aminoácidos que con los de 3 residuos. Sin embargo, aún no está claro cual es el factor que provoca que el enlace Cu²⁺-OC sea más débil a medida que se incrementa el tamaño de la cadena peptídica de 3 a 6 y hasta 17 aminoácidos.

A diferencia de los modelos A y G1, los modelos G2 y G2' de 3 y 6 aminoácidos son completamente congruentes con el comportamiento observado en sus equivalentes confórmeros en modelos con 17 aminoácidos. Incluso la energética es muy comparable, con la diferencia de que la energía relativa de los confórmeros G2 y G2' parece ser mayor en los modelos de 3 aminoácidos (compare diferencias de los valores de energías relativas en la Tablas 3.4, 3.5 y 3.6). La participación del grupo CO del Asp1 en los confórmeros G2 en la posición axial con unión débil también fue congruente en estos modelos respecto a las estructuras más grandes analizadas anteriormente. Además, en todas la estructuras mostradas en la Figura 3.9 los enlaces COO⁻-Cu²⁺ siempre fueron más cortos que los enlaces CO-Cu²⁺, a pesar de que en las estructuras iniciales de los modelos G2' se incluyó al grupo CO en la posición ecuatorial y al COO⁻ en la posición axial. La Figura 3.10 a) ilustra el proceso de reacomodo de ligantes en los confórmeros G2' durante la optimización de la geometría, en la que ocurren tres eventos que son el rompimiento del enlace CO-Cu²⁺, el reacomodo de geometría para acomodar al grupo COO⁻ en la posición ecuatorial de un cuadrado plano distorsionado y la salida de una molécula de agua de la posición axial. La optimización del modelo G2, mostrada en la Figura 3.10 b), no presenta ningún cambio en los coordinación de los átomos de oxígeno, con la excepción de la pérdida de una molécula de agua de la posición axial.

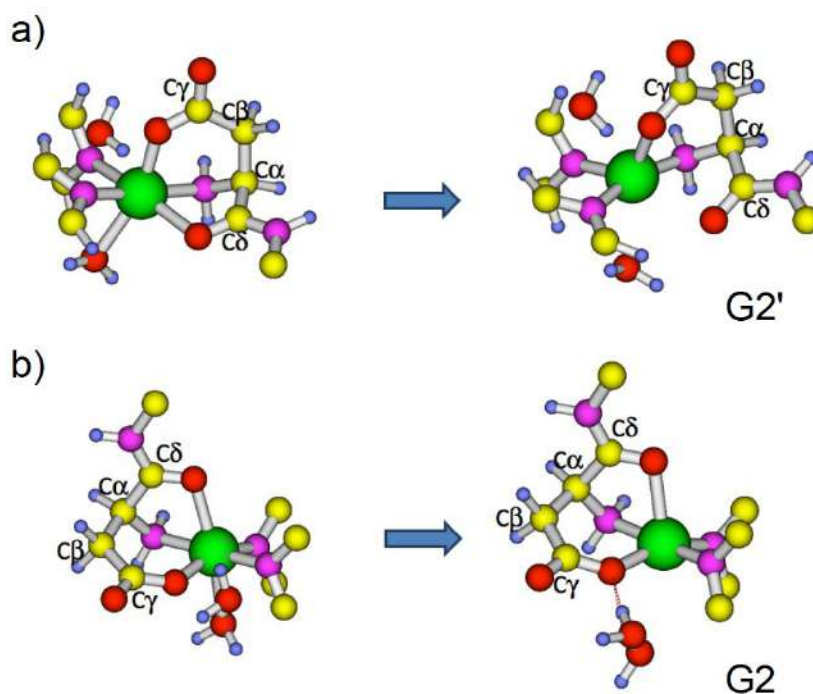


Figura 3.10. Optimización geométrica de los modelos $\text{Cu}^{2+}\text{-A}\beta_6(\text{H}_2\text{O})_2$ G2' (a) y G2 (b).

3.6.2. Efectos mediados por la segunda capa de coordinación

Se ha propuesto en la literatura que la estabilidad de algunas especies observadas en los complejos $\text{Cu}^{2+}\text{-A}\beta_{16}$ se debe a residuos que no participan directamente en la coordinación con el metal, como es el caso del efecto que tienen algunas mutaciones de la proteína $\text{A}\beta$ ubicadas en residuos ajenos a la coordinación con el Cu^{2+} .^{117,152,157,159} Aunque la forma correcta de evaluar la participación de esos residuos siguiendo las observaciones experimentales sería construir tales mutantes, los resultados presentados en la sección anterior permiten plantear hipótesis sobre el papel de algunos residuos en la segunda esfera de coordinación del metal. Para esto se discuten a continuación las diferencias observadas entre los modelos que utilizaron los péptidos $\text{A}\beta_3$, $\text{A}\beta_6$ y $\text{A}\beta_{17}$.

Una de las diferencias evidentes al comparar las gráficas en las Figuras 3.8 y 3.9, es el ordenamiento de la estabilidad de los diferentes conformeros del Asp1. Como se comentó en la sección anterior, el ordenamiento en estabilidad creciente para modelos con 3 y 6 aminoácidos fue $\text{G1} < \text{A} < \text{G2}' < \text{G2}$, mientras que, para modelos con 17 aminoácidos, se observa un cambio en el ordenamiento ($\text{A3} < \text{G1} = \text{G2}' < \text{G2}$), descartando a los modelos $\text{Cu}^{2+}\text{-A}\beta_{17}(\text{H}_2\text{O})_2$ A1 y A2 en los que una molécula de agua estabilizó de manera considerable a los complejos y modificó su modo de coordinación. La diferencia en el ordenamiento se explica por un incremento en la estabilidad del conformero G1 de 17 aminoácidos (modelo 7), que, como se había descrito anteriormente, es consecuencia de un reacomodo de algunas cadenas laterales y de su cadena peptídica para estabilizar la estructura global del péptido. Este efecto también se observó en el conformero G2' de 17 aminoácidos (modelo 6), como se manifiesta en sus parámetros estructurales de la Tabla 3.1 (página 51). Esto representa un efecto de

la estructura de la cadena peptídica, ya que debido a un rearrreglo de la estructura en un sitio fuera del centro metálico, la estabilidad global del péptido resultó comparable con la estabilidad asociada a un modo de coordinación en particular. Como consecuencia, la estructura G2' (3N1O) puede perder el grupo COO⁻ para llegar a la estructura G1 (3N) sin que haya un cambio en la energía total del complejo (ver Figura 3.8, página 65). No obstante, la falta de solvatación explícita probablemente tiene un efecto muy importante en la estabilidad asociada a la conformación de la cadena peptídica.

Otra observación importante, que se analizó en la sección anterior, es la estabilidad del enlace Cu²⁺-OC. Se describió que a medida que se incrementó el tamaño del modelo entre 3, 6 y 17, se observó una disminución en la estabilidad de este enlace (como un alargamiento de la distancia de enlace) en la posición ecuatorial. Ninguno de los modelos con 17 residuos mantuvo este grupo coordinado; en modelos con 6 residuos los enlaces se encontraron muy alargados (modelos A y G1), mientras que los modelos con 3 residuos mostraron las distancias más cortas del enlace Cu²⁺-OC en la posición ecuatorial. Este comportamiento podría estar conectado con las observaciones hechas sobre la mutante A β ₁₆ R5G, que muestra un cambio en la distribución de los componentes I y II en función de pH congruente con la desestabilización del componente I.¹⁵² Esta observación experimental muestra que la ausencia de la Arg5 en la secuencia desestabiliza el complejo a pesar de que tal residuo en ningún momento participa directamente en la coordinación del cobre. El papel que la Arg5 juega en los modelos estudiados podría relacionarse con la interacción por puente salino que este residuo forma junto con el Asp7 en los modelos de 17 aminoácidos, el cual no es posible en ninguno de los modelos con 3 o 6 residuos. La presencia de este puente salino, además de ser muy favorable energéticamente, probablemente modifica la estructura del macrociclo Asp1-Cu-His6 de tal forma que, de acuerdo a la presente propuesta, de alguna manera dificulta la coordinación del grupo CO del Asp1 especialmente en las conformaciones A y G1.

La participación de las moléculas de agua en la esfera de coordinación también se ve afectada por el tamaño del sistema, particularmente en las conformaciones A, mientras que en los modelos G2 en general no participaron las moléculas de agua en la coordinación (ver Tablas 3.4, 3.5 y 3.6, y Figuras 3.8 y 3.9). En el modelo A de 3 residuos se observa una molécula de agua participando como ligante débil en la posición axial, mientras que, para el mismo conformero de 6 residuos, la molécula de agua en la posición axial se observa a una distancia del cobre menor que el grupo carbonilo que se encuentra en posición ecuatorial en ese modelo. Para el modelo A1 de 17 residuos la molécula de agua se acercó a una distancia aún menor, de hecho enlazándose fuertemente en el plano ecuatorial y desplazando al grupo carbonilo del Asp1 fuera de la esfera de coordinación. El comportamiento observado en los modelos con 17 aminoácidos es de hecho más congruente con las propuestas experimentales, como se analiza a continuación.

3.7. Comparación con las mediciones experimentales

A lo largo de este capítulo hemos analizado información estructural derivada de modelos del complejo Cu^{2+} - $A\beta$ generados con base en una metodología combinada de dinámica molecular mediante el uso de campos de fuerza y la teoría de funcionales de la densidad. Las estructuras generadas permiten realizar cálculos de propiedades moleculares y electrónicas "observables" que pueden ser comparadas con diversas mediciones experimentales reportadas en la literatura. En las siguientes secciones se recopilan estas mediciones hechas utilizando el complejo Cu^{2+} - $A\beta_{16}$ en un rango de pH de ~ 6.4 a ~ 7.8 que es en el que predominan las especies comparables con las estructuras aquí estudiadas. Entre las propiedades que se calcularon encontramos a los tensores \mathbf{g} y \mathbf{A} para el Cu^{2+} en los complejos, y las constantes de acoplamiento hiperfinas entre el ion metálico y diversos átomos coordinados o vecinos al centro metálico.

3.7.1. Distancias metal - ligando derivadas de experimentos de EXAFS y de estructuras cristalográficas

Las geometrías de los complejos pueden ser directamente comparados con varios estudios de EXAFS realizados para el complejo Cu^{2+} - $A\beta_{16}$. Uno de estos llevado a cabo a pH de 6.6, encontró que 3 átomos coordinados N estarían a una distancia promedio de 1.98 Å, un átomo O estaría a 1.96 Å y otro átomo O estaría a 2.46 Å.¹²⁵ En otro estudio a pH de 7.2, se encontró que habrían 3 átomos N/O a 1.938 Å y otro N/O a 2.07 Å, en donde el sitio de Cu^{2+} corresponde a una coordinación ecuatorial con 4 ligantes.¹⁵⁶ Las Tablas 3.2 y 3.3 (páginas 55 y 61, respectivamente) describen los sitios de coordinación del Cu^{2+} en todos los modelos; sin embargo, para este análisis nos enfocaremos en los modelos más estables para los que su esfera de coordinación se describió en la Tabla 3.4 (página 63). Considerando los resultados derivados de EXAFS, podemos descartar como estructuras probables a todos los modelos que presentan coordinación 3N, 2N1O y 2N2O (modelos **2** (A1), **7** (G1), **8** (A3), **15-17**, **19** y **20**), para considerar las estructuras cuadrado planas distorsionadas más estables (modelos **1** (A2), **4** (G2) y **6** (G2')).

Considerando las distancias metal-ligante promedio en los complejos de 17 aminoácidos (2.146, 2.039, 2.092, 2.073 y 2.039 Å para grupos N-ter, His6, His13, His14, y Asp1, respectivamente), y comparándolas con las distancias derivadas de los experimentos de EXAFS, podemos observar que en general las distancias de los modelos son más largas que las predichas por el experimento. Ésto normalmente se observa en cálculos empleando funcionales de intercambio y correlación de tipo GGA (en enlaces metal-ligante, se suele admitir una sobreestimación de las distancias de ~ 0.5 Å). Para el caso de los átomos N coordinados derivados de histidinas en modelos 3N1O cuadrado planos, la distancia al ion metálico en promedio es de 2.078 Å, la cual es mayor que las estimadas por EXAFS para ligantes N por ~ 0.12 Å. Si consideramos que, en un análisis de bases de datos de proteínas, las distancias Cu^{2+} -N(His) son sistemáticamente más largas que las distancias derivadas de los estudios de EXAFS por ~ 0.1 Å,^{160,161} es evidente que los modelos cuadrado planos describen adecuadamente las

distancias de enlace $\text{Cu}^{2+}\text{-N}(\text{His})$ observadas experimentalmente.

También es importante resaltar que los reportes de EXAFS indican que hay tres distancias $\text{Cu}^{2+}\text{-N/O}$ equivalentes en el complejo, las cuales se encuentran a 1.94¹²⁵ o 1.98 Å.¹⁵⁶ Como se puede observar en la Tabla 3.4, los modelos 3N1O cuadrado planos con los grupos N-ter, His6, His14 y Asp1 (A2 y G2) coordinados cumplen con esta característica ya que las distancias $\text{Cu-O}(\text{Asp1})$ son pequeñas y comparables con las distancias $\text{Cu-N}(\text{His})$. Estas observaciones también son congruentes con los datos reportados para estructuras cristalográficas de complejos proteicos con cobre,¹⁶² en donde el promedio de las distancias $\text{Cu-N}(\text{His})$ reportado fue de 2.00 Å, mientras que el promedio para distancias $\text{Cu-O}(\text{carboxilato})$ resultó sólo ligeramente más pequeño, 1.98 Å.

Una característica generalizada en todos los modelos que incluyen al N-ter, la His6, la His14 y al Asp1 coordinados en la posición ecuatorial de un cuadrado plano, es que el enlace $\text{Cu}^{2+}\text{-N-ter}$ es el más largo de todos (ver distancias de los modelos A2 y G2 en la Tabla 3.4, página 63). Este comportamiento ha sido observado en proteínas que coordinan cobre en el extremo N-terminal, como es el caso de dos estructuras cristalinas de péptidos que modelan el motivo ATCUN de la proteína albúmina sérica humana (HSA).^{163,164} En estas estructuras el Cu^{2+} se coordina al extremo N-ter, un residuo de histidina, dos nitrógenos de amidas peptídicas desprotonadas y un ligante débil basado en oxígeno en la posición axial. La distancia de enlace $\text{Cu}^{2+}\text{-N-ter}$ en estas estructuras es 2.029 y 2.047 Å, mientras que el promedio de los otros tres ligantes N es menor por 0.081 y 0.108 Å, respectivamente. En otra estructura cristalina de un péptido coordinando Cu^{2+} en el extremo N-terminal,¹⁶⁵ el enlace $\text{Cu}^{2+}\text{-N-ter}$ muestra la mayor distancia de 2.043 Å, en comparación con las distancias de enlace de los otros grupos de 1.997, 1.991 y 2.007 Å, para N(His), N(amida) y O(carboxilato), respectivamente. Considerando estos resultados, se observa que los modelos A2 y G2 describen de manera adecuada la distancia del enlace $\text{Cu}^{2+}\text{-N-ter}$, y, al mismo tiempo, se reproduce la tendencia cuando se compara con las distancias $\text{Cu}^{2+}\text{-N}(\text{His})$ y $\text{Cu}^{2+}\text{-O}(\text{carboxilato})$. Además, la comparación de las distancias metal-ligante con los datos de EXAFS soporta los modelos con modo de coordinación 3N1O cuadrado plano, en donde los grupos coordinados son el N-ter, la His6, la His14 y el grupo carboxilato del Asp1 en el plano ecuatorial.

3.7.2. Parámetros de EPR del cobre

La resonancia paramagnética electrónica (EPR) ha sido una de las técnicas más empleadas para el estudio de la coordinación del Cu^{2+} a la proteína $A\beta$,^{116,119,120,122,123,152,166-169} por lo que existen varios reportes que permiten comparar parámetros de EPR experimentales con los cálculos teóricos. En la Tabla 3.7 se recopilan parámetros de EPR calculados para los complejos $\text{Cu}^{2+}\text{-}A\beta_3(\text{H}_2\text{O})_2$, $\text{Cu}^{2+}\text{-}A\beta_6(\text{H}_2\text{O})_2$, y $\text{Cu}^{2+}\text{-}A\beta_{17}(\text{H}_2\text{O})_2$; estos incluyen los componentes principales de los tensores \mathbf{g} y \mathbf{A} . En este caso se incluyen los cálculos para los modelos de 3 y 6 aminoácidos junto con los de 17 para comparar el efecto de los diferentes modos de coordinación encontrados en cada serie de modelos. Los resultados calculados pueden tener una variación aceptable respecto a las mediciones

experimentales de ~ 0.3 y ~ 50.0 MHz para los parámetros g_z y A_z , respectivamente, de acuerdo a reportes previos de cálculos similares.¹⁷⁰⁻¹⁷⁸

Tabla 3.7. Parámetros de EPR calculados para los complejos $\text{Cu}^{2+}\text{-A}\beta_n(\text{H}_2\text{O})_2$, $n = 3, 6, 17$.

Modelo	Confórmero	g_x	g_y	g_z	A_x (MHz)	A_y (MHz)	A_z (MHz)
$\text{Cu}^{2+}\text{-A}\beta_3(\text{H}_2\text{O})_2$	A	2.06	2.07	2.23	2	31	-527
	G1	2.05	2.08	2.24	-12	67	-503
	G2	2.05	2.09	2.23	-45	98	-526
	G2'	2.03	2.14	2.25	-61	245	388
$\text{Cu}^{2+}\text{-A}\beta_6(\text{H}_2\text{O})_2$	A	2.02	2.15	2.25	-21	306	-323
	G1	2.04	2.13	2.26	15	262	345
	G2	2.07	2.07	2.23	-10	11	-548
	G2'	2.06	2.07	2.23	-13	37	-529
$\text{Cu}^{2+}\text{-A}\beta_{17}(\text{H}_2\text{O})_2$	A1 (2)	2.07	2.21	2.34	181	259	-284
	A2 (1)	2.05	2.10	2.25	-42	75	-510
	A3 (8)	2.05	2.13	2.28	172	-211	314
	G1 (7)	2.09	2.14	2.41	132	145	-167
	G2 (4)	2.06	2.07	2.23	3	-11	-550
	G2' (6)	2.05	2.10	2.25	-22	94	-481
	9	2.04	2.18	2.31	100	-253	327
	10	2.06	2.07	2.23	-2	46	-520
	11	2.01	2.03	2.06	-151	270	-552
	12	2.01	2.03	2.06	93	-128	-743
13	2.07	2.08	2.24	-4	32	-537	
15	2.06	2.21	2.34	-136	172	393	
$\text{Cu}^{2+}\text{-A}\beta_{16}$	Exp. ^a	2.06	2.26 - 2.27	44 - 50	513 - 552		

^a Los datos experimentales se muestran como el intervalo entre los valores mínimo - máximo reportados.

Como se puede observar para modelos $\text{Cu}^{2+}\text{-A}\beta_{17}(\text{H}_2\text{O})_2$, los modelos A2 y G2 muestran buen acuerdo con los datos experimentales de g_z y A_z (en el intervalo de 2.26 - 2.27 y 513 - 552 Mhz, respectivamente). A2 mostró el valor de g_z (2.25) más cercano al experimento, mientras que su valor de A_z (510 MHz) se encuentra a sólo 3 MHz de uno del valor inferior reportado en la literatura.^{119,122} En el caso de G2, el valor de g_z de 2.3 resulta congruente con el valor experimental al igual que su parámetro A_z de -550 MHz, este último también muy cercano al valor superior reportado para A_z (a solo 2 MHz de diferencia).^{123,152,166-169} Resulta interesante que los valores de A_z calculados para los modelos A2 y G2 se acerquen cada uno a dos diferentes reportes experimentales, existe la posibilidad de que cada una de estas mediciones de alguna manera pudieran distinguir entre dos especies presentes en solución; esta posibilidad se analizará con mayor detalle más adelante. El confórmero G2' de 17 aminoácidos mostró un buen valor para g_z de 2.25, sin embargo su parámetro A_z (-480 MHz) subestima el valor experimental más pequeño por 32 MHz, que aún se puede esperar como dentro del

error esperado para estos cálculos, pero más bien puede estar manifestando el efecto de la pérdida de planaridad del complejo observada en este modelo (ver Tabla 3.4, página 63). Los conformeros A1, A3 y G1 de 17 aminoácidos no mostraron acuerdo en ninguno de los dos parámetros, lo que es congruente con los reportes experimentales que predicen una geometría cuadrada plana 3N1O para el complejo.

Para el resto de los modelos de 17 aminoácidos de mayor energía, mostrados en la Tabla 3.7 (**9-13, 15**), se puede observar que únicamente las estructuras con la geometría y modo de coordinación cuadrado plano 3N1O (**10 y 13**) son congruentes con los parámetros experimentales. A pesar de que los modelos **9, 11 y 12** poseen un modo de coordinación 3N1O, sus geometrías son tetraédricas, como se puede comprobar en la Tabla 3.2 (página 55) con los valores del ángulo diedro entre ligantes (ϕ_{Lig}), lo que produce que los parámetros de EPR se alejen del experimento. Estos resultados a su vez pueden relacionarse con la combinación particular de ligantes en los modelos con geometría tetraédrica, por lo que constituyen una evidencia, paralela a la energética de los modelos, de que los grupos coordinados encontrados en los modelos más estables (N-ter, His6, His14 y Asp1) son probablemente los más favorecidos en los complejos observados experimentalmente. De entre los modelos cuyos parámetros son congruentes con los experimentos, el modelo **10** es el único que tiene en el que los átomos N coordinados provienen de las histidinas 6, 13 y 14, mientras que el O coordinado proviene del grupo carboxilato del Glu11. Considerando que la energía relativa de este modelo es de 21.5 kcal/mol, resulta posible que esta especie se encuentre también contribuyendo al espectro de EPR experimental en cierto grado.

La Tabla 3.7 también incluye los parámetros calculados para los modelos de 3 y 6 residuos, los cuales resultaron ser consistentes con los parámetros derivados de los complejos de 17 aminoácidos. El empleo de estos modelos permitió la comparación de los modos de coordinación del Asp1 en los que su grupo carboxilato o carbonilo se coordinan en el plano ecuatorial, ya que los conformeros A y G1 conservaron el enlace $CO_{ec}-Cu^{2+}$, mientras que los modelos G2 muestran el enlace $COO^-_{ec}-Cu^{2+}$, (ver Tablas 3.5 y 3.6, y Figura 3.9). Los parámetros g_z de todos estos modelos resultaron de hecho congruentes con el experimento, lo que sugiere que tanto el ligante CO_{ec} como el COO^-_{ec} son compatibles con el parámetro experimental. En cambio, analizando el parámetro A_z se puede observar la diferencia, mientras que los valores de A_z son similares y congruentes con el experimento para los modelos A, G1 y G2 de 3 aminoácidos, los conformeros A y G1 en modelos de 6 aminoácidos no reproducen el resultado experimental. Como se discutió anteriormente, (sección 3.6.1, página 69), estos modelos mostraron el enlace $CO_{eq}-Cu^{2+}$ más alargado y con una mayor participación de moléculas de agua, lo que sugiere que, por efecto de la incorporación de un mayor número de residuos de la cadena peptídica, la coordinación del carbonilo es inestable y no es capaz de reproducir el parámetro experimental en conformidad con los resultados obtenidos para los modelos de 17 residuos (Tabla 3.7). De esta forma se encontró que el conformero G2 fue el único modelo con parámetros de EPR consistentes para las tres series de modelos, en acuerdo con los resultados experimentales y además, en general, fue el conformero más estable.

3.7.3. Constantes de acoplamiento hiperfinas de ^{14}N para ligantes del cobre

Algunos estudios han analizado la coordinación del Cu^{2+} a la proteína $\text{A}\beta$ mediante experimentos de HYSORE de los cuales han obtenido constantes de acoplamiento hiperfinas entre el ion metálico y átomos específicos dentro de la esfera de coordinación.^{119,122,123} Los modelos de los complejos aquí estudiados permitieron el cálculo de dichas constantes de acoplamiento hiperfinas, considerando la metodología descrita en la sección 3.3.5 mediante cálculos de DFT. Los resultados para los conformeros del Asp1 en modelos $\text{Cu}^{2+}\text{-A}\beta_n(\text{H}_2\text{O})_2$ se muestran en la Tabla 3.8. En esta sección se analizan los acoplamientos con átomos N directamente coordinados al metal, mientras que los acoplamientos con átomos vecinos se analizan en la sección siguiente.

Tabla 3.8. Constantes de acoplamiento hiperfinas calculadas para los complejos $\text{Cu}^{2+}\text{-A}\beta_n(\text{H}_2\text{O})_2$, $n = 3, 6, 17$.

Modelo	Confórmero	$A_{iso}^{14\text{N}^{\text{Asp1}}}$	$A_{iso}^{14\text{N}^{\text{His6}}}$	$A_{iso}^{14\text{N}^{\text{His14}}}$	$A_{iso}^{13\text{C}_\alpha}$	$A_{iso}^{13\text{C}_\gamma}$	$A_{iso}^{13\text{C}_\delta}$	$A_{iso}^{14\text{N}^{\text{Ala2}}}$
$\text{Cu}^{2+}\text{-A}\beta_3$ (H_2O) ₂	A	29.5	47.0	30.1	-4.3	-0.1	-3.7	1.7
	G1	26.8	46.7	33.9	-3.4	-0.2	-3.4	1.7
	G2	31.7	35.8	37.6	-3.7	2.2	0.9	0.0
	G2'	28.6	25.1	28.9	-3.8	0.7	0.1	0.2
$\text{Cu}^{2+}\text{-A}\beta_6$ (H_2O) ₂	A	27.7	42.9	32.6	-3.2	0.2	-1.6	0.8
	G1	26.7	42.7	30.5	-3.0	-0.1	-2.5	1.4
	G2	31.8	38.2	33.4	-3.7	-0.3	1.0	-0.1
	G2'	30.6	34.9	32.5	-3.2	-1.6	1.1	-0.0
$\text{Cu}^{2+}\text{-A}\beta_{17}$ (H_2O) ₂	A1 (2)	24.8	35.3	8.7	-0.3	-0.2	-0.1	0.1
	A2 (1)	29.6	38.4	27.4	-2.5	-2.3	-0.1	0.0
	A3 (8)	19.6	50.5	15.7	-0.8	-0.3	-0.7	0.4
	G1 (7)	10.1	45.2	12.7	-1.7	^a	0.5	-0.2
	G2 (4)	32.6	37.4	35.4	-3.3	-0.4	1.6	-0.1
	G2' (6)	26.5	33.9	29.2	-2.3	-0.6	0.8	0.0
$\text{Cu}^{2+}\text{-A}\beta_{16}$	Experimento	33.8	39.0	42.0	^b	^b	^b	^c

^a El programa no convergió a un resultado.

^b Se han detectado en conjunto acoplamientos de ~ 3 y ~ 1 MHz, o dos fuertes y uno débil.

^c Se detecta como un acoplamiento débil y con baja intensidad.

Los valores A_{iso} de ^{14}N para los residuos Asp1, His6 e His14 mostrados en la Tabla 3.8 corresponden a las constantes de acoplamiento entre el ion metálico y los tres átomos N coordinados en el plano ecuatorial. Para el caso de modelos con 17 aminoácidos, los conformeros G2, A2 y G2' muestran resultados en acuerdo con los valores de acoplamientos hiperfinos experimentales para el N-ter, His6 e His13/14 de 33.8, 39.0 y 42.0 MHz, respectivamente.¹¹⁹ Calculando el RMSD de los tres acoplamientos para cada modelo, resulta evidente que el mejor acuerdo fue obtenido por el modelo G2, con un valor de RMSD de 4.0 MHz, seguido por los modelos A2 y G2' que muestran RMSDs de 8.8 y 9.0 MHz, respectivamente. En cambio, los conformeros A1, A3 y G1 tuvieron valores de RMSD alrededor de 20 MHz, lo que reafirma que las geometrías cuadrados planas 3N1O

generan propiedades calculadas congruentes con los experimentos.

Las constantes de acoplamiento hiperfinas de átomos ^{14}N de los residuos Asp1, His6 e His14 en complejos pequeños con 3 y 6 residuos (Tabla 3.8), muestran consistencia con las constantes medidas para los modelos más grandes, ya que el mejor acuerdo con los valores experimentales fue obtenido para conformeros G2 con valores de RMSD de 3.4 y 5.1 MHz para modelos $\text{Cu}^{2+}\text{-A}\beta_3$ y $\text{Cu}^{2+}\text{-A}\beta_6$, respectivamente. Es interesante observar que en los modelos $\text{Cu}^{2+}\text{-A}\beta_3$ A y G1 que mantienen el grupo coordinado CO_{ec} , a pesar de reproducir correctamente los parámetros de EPR g_z y A_z experimentales, producen constantes de acoplamiento hiperfinas con mayor desviación respecto al experimento en comparación con el modelo G2 (RMSD de 8.7 y 7.6 MHz, respectivamente). Los conformeros $\text{Cu}^{2+}\text{-A}\beta_6$ A y G1 también se encontraron más desviados del experimento (RMSD de 6.9 y 8.6 MHz) que su similar modelo G2. Es importante mencionar que todos los modelos analizados comparten los mismos átomos N coordinados ecuatorialmente y sólo difieren en el arreglo de los átomos O ecuatoriales y axiales, por lo que estas constantes de acoplamiento son una buena prueba para evaluar el efecto del o los ligantes basados en oxígeno. Los resultados sugieren que el modo de coordinación G2 (3N, COO_{ec} , CO_{ax}) es probablemente la especie mayoritaria observada experimentalmente. Estos resultados también demuestran que las estructuras utilizadas y la metodología elegida son capaces de reproducir con un alto nivel de precisión las constantes de acoplamiento hiperfinas para átomos N directamente coordinados.

3.7.4. Constantes de acoplamiento hiperfinas de ^{13}C para átomos vecinos a los ligantes

Las constantes de acoplamiento hiperfinas entre el Cu^{2+} y varios átomos a dos o tres enlaces del metal también han sido reportados en experimentos de HYSORE con marcaje isotópico específico.^{123,122} Estos mismos acoplamientos también fueron calculados para los carbonos en posiciones α , γ y δ del Asp1 que son vecinos de los átomos ligantes N (N-ter), O (COO^-) y O (CO), respectivamente. Los valores A_{iso} de ^{13}C para los modelos $\text{Cu}^{2+}\text{-A}\beta_n$ mostrados en la Tabla 3.8 corresponden con dichos acoplamientos. En la Figura 3.11 se puede apreciar con claridad posición que estos átomos específicos ocupan respecto al ion metálico, donde se esquematiza el modo de coordinación más probable que de acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo estaría contribuyendo a las especies que se observan experimentalmente a valores bajos de pH.

Las constantes de acoplamiento hiperfinas con el $^{13}\text{C}_\alpha$ en los modelos $\text{Cu}^{2+}\text{-A}\beta_{17}(\text{H}_2\text{O})_2$ muestran que sólo los conformeros A2, G2 y G2' tienen un acoplamiento fuerte, con valores de A_{iso} $^{13}\text{C}_\alpha$ de 2.5, 3.3, y 2.3, respectivamente. Los valores son congruentes con los datos experimentales medidos a pH de 6.3 en donde se observó un valor A_{iso} de ~ 3 MHz con el Asp1 marcado con ^{13}C .¹²² Estos resultados indican que únicamente los complejos cuadrado planos que incluyen al ligante COO_{ec} del Asp1 generan un acoplamiento fuerte entre el Cu^{2+} y el $^{13}\text{C}_\alpha$. En aquellos modelos de 17 aminoácidos que no incluyen al COO_{ec} del Asp1 como ligante, (A1, A3 y G1), los valores de A_{iso} disminuyen considerablemente a 0.3, 0.8 y 1.7 MHz, a pesar de que el grupo N-ter

vecino al C_α se encuentra directamente coordinado. El análisis de este acoplamiento en modelos con 3 y 6 aminoácidos muestra los valores de estas constantes en estos modelos pequeños están sobreestimados con respecto a los modelos de 17 residuos y al experimento. Sin embargo, es interesante observar que los modelos A y G1 muestran valores de $A_{iso}^{13C_\alpha}$ fuertes (ver Tabla 3.8), lo que indica que tanto el ligante COO^-_{ec} como el CO_{ec} del Asp1 producen que el C_α muestre acoplamiento hiperfino fuerte.

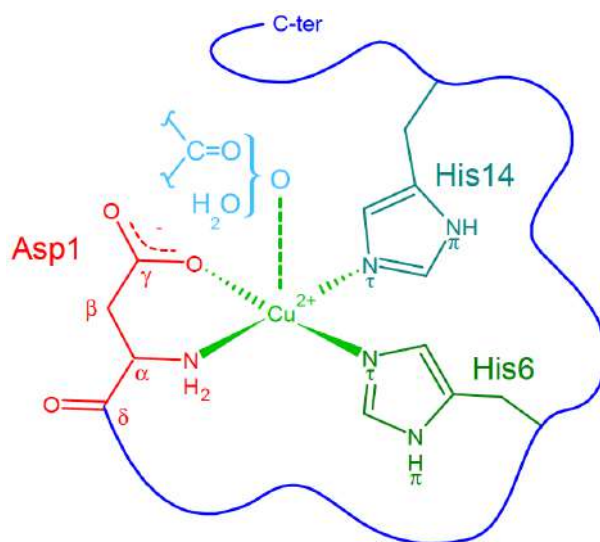


Figura 3.11. Modo de coordinación propuesto como predominante en los complejos $Cu^{2+}-A\beta_{17}$ a valores bajos de pH (componente I).

A pesar de que los valores de A_{iso} para $^{13}C_\gamma$ y $^{13}C_\delta$ parecen tener diferente tendencia en modelos $Cu^{2+}-A\beta_3$ con respecto a los modelos $Cu^{2+}-A\beta_6$ y $Cu^{2+}-A\beta_{17}$, los resultados muestran claramente el comportamiento de la coordinación ecuatorial y axial del grupo carbonilo del Asp1. Los acoplamientos hiperfinos con $^{13}C_\delta$ del grupo carbonilo del Asp1 son fuertes cuando este grupo se coordina en la posición ecuatorial, como es el caso de modelos A y G1 de 3 y 6 aminoácidos en los que las constantes de acoplamiento se observaron en el rango de 1.6 a 3.7 MHz. Cuando el grupo carbonilo se coordina en posición axial (como en el caso de los conformeros G2), el acoplamiento $^{13}C_\delta$ es generalmente débil, con valores en el rango de 0.9 a 1.6 MHz. Los valores $A_{iso}^{13}C_\gamma$, correspondientes al acoplamiento hiperfino con el grupo carboxilato del Asp1, en general se observaron como acoplamientos débiles; los acoplamientos $^{13}C_\gamma$ más fuertes se observaron para los modelos $Cu^{2+}-A\beta_{17}$ A2 y $Cu^{2+}-A\beta_3$ G2 con valores de 2.2 y 2.3 MHz, respectivamente. Para modelos G2 con 6 y 17 residuos, los acoplamientos para el C_γ del grupo carboxilato fueron de 0.3 y 0.4 MHz, respectivamente, por lo que estos acoplamientos son incluso menores que aquellos para el C_δ del grupo carbonilo. Ésto sugiere que, para estos modelos, el único acoplamiento observable (además del proveniente de C_α) es debido al carbonilo coordinado en la posición axial.

Estos resultados pueden conectarse con experimentos de HYSORE de 6 pulsos en los que se observaron dos acoplamientos hiperfinos de ^{13}C fuertes y uno débil medidos a un valor de pH de 6.5.¹²³ De acuerdo a los

resultados obtenidos, uno de los acoplamiento fuertes puede claramente asociarse al producido por el C_α como resultado de la coordinación del grupo N-ter. Los otros dos acoplamiento observados pueden ambos ser atribuidos a la coordinación del grupo carbonilo del Asp1, la coordinación CO_{ec} produciría un acoplamiento fuerte, mientras que la coordinación CO_{ax} mostraría un acoplamiento débil. El valor tan bajo de $A_{iso}^{13C_\gamma}$ en modelos G2 de 6 y 17 residuos pueden explicar la desaparición de estas señales en los espectros HYSORE de complejos Cu^{2+} - $A\beta$ en los que se ha marcado específicamente al C_γ del grupo carboxilato del Asp1.¹²² A pesar de esto, el modelo Cu^{2+} - $A\beta_{17}$ A2 sugiere que se puede encontrar un acoplamiento hiperfino de ^{13}C de ~ 2 MHz asociado con el grupo carboxilato cuando una molécula de agua reemplaza al carbonilo del Asp1 en la posición axial. De esta manera se puede postular que, de acuerdo a los cálculos de acoplamiento hiperfino con átomos C vecinos a diferentes ligantes del Cu^{2+} , los tres acoplamiento observados en los experimentos mencionados¹²³ son congruentes con la presencia de al menos tres diferentes especies en el espectro (Figura 3.12): 1) La especie (ya propuesta en la literatura) en la que el grupo carbonilo del Asp1 se coordina ecuatorialmente, la cual generaría dos acoplamiento hiperfino fuertes. 2) La especie en la que el grupo carboxilato del Asp1 se coordina en la posición ecuatorial, mientras que su grupo carbonilo ocupa la posición axial; esta especie generaría un acoplamiento fuerte y uno débil. Y 3) la especie que coordina el grupo carboxilato ecuatorialmente y a una molécula de agua en la posición axial, la cual mostraría un acoplamiento fuerte y otro de magnitud intermedia. Dado que en el experimento mencionado no se simulaban los parámetros A_{iso} para estos acoplamiento, no podemos confirmar que la magnitud del acoplamiento de la última especie propuesta sea congruente con el experimento, sin embargo, esta especie es compatible con las conclusiones derivadas de otro estudio en donde se propuso la coordinación de una molécula de agua axial.¹⁵³

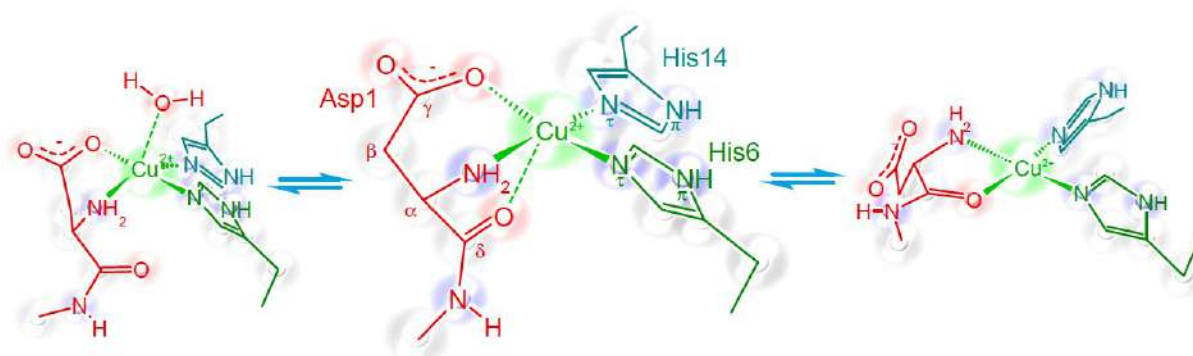


Figura 3.12. Especies con distintos modos de coordinación en el complejo Cu^{2+} - $A\beta_{17}$ a pH bajo que son congruentes con los experimentos de HYSORE.

3.7.5. Constantes de acoplamiento hiperfino de ^{14}N para la Ala2

El acoplamiento hiperfino del único átomo N presente en el residuo Ala2 (nitrógeno peptídico), ha sido utilizado en varios reportes como una evidencia de la coordinación del grupo carbonilo del Asp1, dado que son grupos vecinos y que dicho nitrógeno se encontraría a tres enlaces del ion metálico ante la coordinación del grupo

carbonilo.^{119,122,123} En la Tabla 3.8 se muestran los valores $A_{iso}^{14N^{Ala2}}$, que corresponden a este acoplamiento hiperfino. Los acoplamientos observados para modelos de 3 y 6 aminoácidos A y G1, con coordinación CO_{ec} , se encuentran en el rango de 0.8 a 1.7 MHz, mientras que para el resto de los conformeros estos valores fueron muy pequeños (0.0 - 0.4 MHz). Estos resultados muestran que el nitrógeno en cuestión forma un acoplamiento hiperfino sólo cuando el carbonilo del Asp1 se coordina en el plano ecuatorial del Cu^{2+} , lo cual es congruente con la aseveración de que tal especie es la que se observa en los experimentos mencionados. Sin embargo, esto no descarta la presencia de las otras especies propuestas en la Figura 3.12. De hecho, las señales en los espectros HYSORE asociadas con la coordinación CO_{ec} muestran ser menos intensas que las señales observadas para otros átomos similares, como por ejemplo la del N peptídico del Glu3 en experimentos para el componente II del complejo,¹²² lo que ha llevado a proponer que la coordinación ecuatorial del O del carbonilo del Asp1 podría no estar presente en todas las especies presentes en el componente I.¹²⁰ Esta observación es congruente con las conclusiones derivadas de los resultados aquí presentados, en donde se propone que al menos dos especies distintas de la propuesta anteriormente (CO_{ec}) coexisten en el complejo a valores bajos de pH. La baja estabilidad de la especie CO_{ec} , analizada en la Sección 3.6.1, es también congruente con la baja intensidad de las señales en los espectros HYSORE asociados a este modo de coordinación. En cambio, las especies que coordinan al carboxilo en posición ecuatorial son más estables y sus parámetros calculados son más congruentes con las mediciones experimentales, por lo que en este trabajo se propuso que estas especies son de hecho predominantes en el componente I del complejo $Cu^{2+}-A\beta_{17}$.

3.7.6. Comparación con otras mediciones experimentales

Los modelos estructurales aquí presentados permiten proponer una explicación a diversas observaciones experimentales, como es el caso del comportamiento de los complejos de Cu^{2+} con el péptido mutante $A\beta_{16}$ (D1N),¹¹⁸ o con la variante $A\beta_{2-16}$.¹¹⁶ Los parámetros de EPR para el componente I de estas variantes son similares a los parámetros derivados del complejo con el péptido nativo, lo que sugiere que todos estos complejos compartirían un mismo modo de coordinación. Sin embargo, los valores de pK_a asociados a la transición dependiente del pH del componente I al componente II (I/II) se reducen significativamente de 7.8 a 6.0 para el mutante D1N con respecto al péptido nativo.¹¹⁷ La explicación original a este comportamiento propuso la participación indirecta del grupo COO^- del Asp1 en la coordinación con el cobre mediante la formación de un puente de hidrógeno probablemente con algún ligante del Cu^{2+} .¹¹⁸

A pesar de esto, los resultados derivados de los modelos estructurales de los complejos $Cu^{2+}-A\beta_n$ aquí descritos permiten una interpretación alternativa del comportamiento observado en estas variantes del péptido $A\beta_{16}$. Los complejos de Cu^{2+} con las variantes del péptido $A\beta_{16}$ que carecen del grupo COO^- del Asp1, probablemente formarían especies que incluyan al ligante CO_{ec} en el complejo, mientras que el péptido $A\beta_{16}$ nativo podría formar estas mismas especies CO_{ec} además de especies que incluyeran el ligante COO^-_{ec} . De acuerdo con los

cálculos de EPR en los diferentes modelos (Tabla 3.7), tanto las especies CO_{ec} como las $\text{COO}^{-}_{\text{ec}}$ generarían parámetros de EPR muy similares, por lo que las especies $\text{COO}^{-}_{\text{ec}}$ formadas en el complejo con el péptido nativo no serían distinguibles respecto a las especies CO_{ec} formadas en las variantes del péptido en el espectro de EPR, que fue el comportamiento observado en los experimentos.

La diferencia en el valor del $\text{p}K_{\text{a}}$ (I/II) entre el péptido nativo y sus variantes puede explicarse mediante dos factores; el primero sería la energética de las especies $\text{COO}^{-}_{\text{ec}}$ y CO_{ec} (Figuras 3.8 y 3.9). De acuerdo a las estabildades relativas de cada especie, el péptido $\text{A}\beta_{17}$ nativo formaría especies $\text{COO}^{-}_{\text{ec}}$ que son las más estables, mientras el péptido mutante D1N únicamente podría formar la especie menos estable CO_{ec} . Como consecuencia de esto, el complejo mutante D1N favorecería la formación del componente II, lo que se manifiesta como una disminución del $\text{p}K_{\text{a}}$ (I/II). El segundo factor es la ausencia del grupo COO^{-} del Asp1, porque la coordinación de este grupo con el Cu^{2+} en el extremo N-terminal dificulta la desprotonación de la siguiente amida peptídica, es decir, dificulta la formación del componente II, como se observó en un estudio previo.¹³⁰ Por lo tanto, la ausencia de esta función en los complejos con la mutante $\text{A}\beta_{16}$ (D1N) y la variante $\text{A}\beta_{2-16}$ favorecen el componente II, acentuando la disminución observada del valor del $\text{p}K_{\text{a}}$ (I/II) de manera sinérgica al primer factor. De manera consistente con esta propuesta, el espectro de EPR de la variante isoAsp1 $\text{A}\beta_{16}$, no muestra señales del componente II incluso a valores altos de pH hasta de 8.0.¹²⁶ Esto probablemente se debe a que el anillo de 5 miembros formado cuando los grupos N-ter y COO^{-} de esta variante se coordinan al Cu^{2+} en el componente I es aún más estable que las especies $\text{COO}^{-}_{\text{ec}}$ y CO_{ec} aquí estudiadas, por lo que el $\text{p}K_{\text{a}}$ (I/II) en este caso se incrementaría con respecto a la proteína nativa.

3.7.7. Factores metodológicos que afectan la comparación con los experimentos

El análisis presentado en las secciones anteriores muestra que las propiedades derivadas de los modelos estudiados son congruentes con la mayoría de las observaciones experimentales. Sin embargo, es importante discutir las limitaciones de estos modelos que pueden afectar la comparación con el experimento y limitar las conclusiones obtenidas.

En primer lugar podemos considerar que los cálculos de estructura electrónica se llevan a cabo en el vacío, lo cual puede resultar inadecuado cuando se trabaja con biomoléculas, ya que su estructura nativa suele estar estabilizada por interacciones específicas con moléculas de agua. En los modelos se utilizaron dos moléculas de agua cercanas al centro metálico, las cuales, en varios casos, participaron directamente en la primera esfera de coordinación del ion metálico, y en otros casos formaron interacciones estabilizantes con átomos polares de la proteína. Considerando el comportamiento de los complejos durante las optimizaciones, podemos afirmar que las moléculas de agua incluidas permitieron completar efectivamente la primera esfera de coordinación, ya que, en casi todos los casos, estas moléculas se alejaron del centro metálico en lugar de afianzar su coordinación. Cabe mencionar también que, previo a los cálculos de estructura electrónica, para todos los modelos se llevó a cabo

una etapa de equilibración utilizando la metodología de dinámica molecular en la que las estructuras son tratadas en un medio con miles de moléculas de disolvente explícitas; esto permite afirmar que los cambios estructurales que sufre la proteína en esta etapa en ningún momento se da en el vacío o en alguna condición que impida modelar la estructura de manera "inadecuada". A pesar de que la etapa refinamiento de la geometría del centro metálico se da en el vacío, la estructura de la proteína no se ve demasiado afectada debido a que se trata de una minimización de la energía, en donde no es posible salir de un mínimo local en la superficie de energía potencial. El principal efecto estructural en estas optimizaciones es la consolidación de interacciones intramoleculares estabilizantes y la deseable optimización de la geometría del centro metálico.

Otro factor que no se consideró en los cálculos es la contribución térmica y entrópica, el cual puede modificar la superficie de energía potencial. De esta forma, las energías relativas de los modelos se pueden modificar y cambiar el ordenamiento de estabilidad; además, algunos mínimos podrían simplemente no existir al incorporar estos términos. Algunas estructuras aparentemente poco estables podrían estar más "pobladas" a una temperatura distinta a 0 K. El empleo de métodos que permitan el muestreo de múltiples estados o configuraciones a nivel *ab initio* es deseable; sin embargo, el costo computacional para tales cálculos es demasiado elevado para el sistema estudiado en el presente trabajo. En este sentido la estrategia de exploración de puntos estacionarios de la superficie de energía potencial adoptada es más adecuado que hacer un muestreo de estados insuficiente.

Relacionado al punto anterior, la naturaleza implícitamente desordenada de la proteína β amiloide complica el estudio debido a que la PES es plana y rugosa, teniendo como consecuencia una infinidad de posibles configuraciones con estabilidades similares. En este sentido una exploración exhaustiva de la PES también resulta poco práctica e inconveniente. En el presente trabajo la construcción de los modelos se apejó en todo momento a la información experimental disponible, lo que permitió delimitar el número de posibilidades a explorar. Además, se llevó a cabo una detallada comparación entre parámetros y propiedades calculados para los modelos y diversas mediciones experimentales para discriminar las estructuras realistas y congruentes con los experimentos de las que no lo son. La construcción de los modelos también está basada en el empleo de la estructura β extendida derivada de un modelo equilibrado de una fibra amiloide, la cual es una configuración evidentemente estable y duradera, y se puede considerar que la proteína β amiloide tiene la capacidad de adoptar esta estructura de manera espontánea para formar las fibras.

3.8. Conclusiones

El trabajo presentado en este capítulo describe una exploración detallada de la superficie de energía potencial de la proteína β amiloide, implicada en la enfermedad de Alzheimer, así como la formación de complejos con cobre. Los modelos atomísticos creados proveen una detallada descripción molecular de estos complejos que permite entender la naturaleza química de estas especies. Esta información permitió dilucidar el papel que juegan varios residuos en la coordinación del cobre, las cuales se encontraron a la par y en consistencia con la mayoría

de las observaciones experimentales disponibles en la literatura. A continuación se puntualizan algunos de los descubrimientos más relevantes:

1) Se encontró una base estructural del hecho experimental de que la proteína $A\beta$ muestra el mismo modo de coordinación cuando se encuentra como monómero en solución o cuando se encuentra formando parte de las fibras amiloides. Los modelos más estables encontrados en el presente trabajo son capaces de coordinar al cobre, de manera consistente a las evidencias espectroscópicas, sin que la coordinación afecte de manera importante la estructura β extendida de la proteína $A\beta$, la cual es compatible con la estructura que adopta como parte de las fibras amiloides.

2) La discusión de resultados relacionada a la coordinación de átomos de nitrógeno en los complejos $\text{Cu}^{2+}\text{-}A\beta$ explica, con argumentos energéticos, la contribución de cada residuo a la estabilidad de los complejos. En primer lugar se encontró, en conformidad con las propuestas experimentales, que la participación del grupo N-terminal y de la His6 producen la mayor estabilización en los complejos. En segundo lugar, se observó que la participación de la His14 es más favorable que la participación de la His13, aunque no está muy claro el origen de este resultado. Aunque este comportamiento ha sido menos explorado experimentalmente, algunos reportes coinciden con los resultados aquí observados. En general, los resultados sugieren que la coordinación de la His13 o la His14 en estructuras β como la que adopta la proteína $A\beta$ en las fibras amiloides es asimétrica, y que, para intercambiar un residuo por otro en el centro metálico, se requieren rearrreglos estructurales importantes, probablemente impedidos en las fibras amiloides.

3) El análisis de los ligantes basados en oxígeno llevó a conclusiones en directa contradicción con varias propuestas experimentales. Sin embargo, la revisión detallada de diferentes propiedades espectroscópicas permitió proponer una explicación a estas discrepancias. Además, esto llevó a una mejor comprensión de la naturaleza química del complejo $\text{Cu}^{2+}\text{-}A\beta$. La conclusión más relevante en este sentido es que existen varias especies del complejo (al menos dos o tres), que coexisten simultáneamente y que pueden considerarse predominantes en los estudios espectroscópicos; estas especies se basan en diferentes configuraciones de los ligantes basados en oxígeno las cuales producen una misma huella espectroscópica, motivo por el cual no se habían diferenciado experimentalmente. Los resultados también permiten postular que estas especies, que difieren en sus ligantes basados en oxígeno, podrían entrar en equilibrio mucho más fácilmente que las especies que intercambian residuos coordinados mediante átomos de nitrógeno, posiblemente, en una escala de tiempo distinta.

4) Los modelos estudiados también reflejan indirectamente el comportamiento de algunas variantes de la proteína $A\beta$ que son relevantes desde el punto de vista fisiopatológico y epidemiológico. Con esto se propuso una explicación al comportamiento, por ejemplo, de las mutantes D1N o R5G, cuyos efectos se manifiestan principalmente en las constantes de equilibrio que describen el intercambio de diferentes modos de coordinación

dependientes del pH. Esto sugiere que la metodología propuesta en el presente trabajo también es aplicable al estudio de los efectos de las mutaciones o modificaciones postraduccionales de la proteína A β asociados con diferentes enfermedades o estados patológicos específicos.

El cálculo de propiedades electrónicas, en acuerdo con las mediciones experimentales, jugó un papel fundamental en la comprensión del sistema estudiado. Además, el acuerdo con los parámetros experimentales permitió validar la metodología propuesta y confiar en las conclusiones derivadas de los análisis. Por este motivo resulta muy conveniente invertir en el desarrollo de metodologías robustas que permitan el cálculo adecuado de estos parámetros. De igual manera, el empleo de modelos estructurales lo más cercanos posible al sistema real, probó ser una estrategia, que si bien es costosa computacionalmente, muestra que tiene la ventaja de incorporar efectos complejos y poco evidentes a favor de una descripción más precisa del sistema, la cual no podría obtenerse con modelos más simplificados, especialmente en este tipo de sistemas biológicos.

Capítulo 4. La coordinación de cobre a la proteína prion

4.1. Antecedentes

El estudio teórico de la coordinación de metales de transición a proteínas intrínsecamente desordenadas, como la que se llevó a cabo en el presente trabajo, representa un reto metodológico, ya que por lo regular se trata de proteínas de gran tamaño que llevan al límite las capacidades computacionales y metodológicas disponibles para lograr el modelado. Los métodos de estructura electrónica comúnmente resultan inaplicables incluso en proteínas relativamente pequeñas, las cuales típicamente están formadas por varios miles de átomos. Una alternativa comúnmente utilizada es el empleo de métodos simplificados que desprecian la estructura electrónica de las moléculas, como es el caso de los campos de fuerza empleados en el capítulo 2, y parcialmente en el capítulo 3. Sin embargo, estos métodos resultan muy limitados para describir el comportamiento de metales de transición en sistemas biológicos. La principal dificultad es la necesidad de parámetros que permitan la adecuada descripción del sistema. Por estos motivos, en este capítulo se propuso una metodología de parametrización de permitiera estudiar la coordinación del Cu^{2+} a la proteína prion (PrP) utilizando campos de fuerza. Los parámetros y modelos creados se emplearon en el estudio de la dinámica molecular (DM) de esta proteína.

4.1.1. Modelos para el estudio de la interacción entre el cobre y la proteína prion

Uno de los aspectos más relevantes de la interacción del cobre con la proteína prion es el efecto que produce el metal en las propiedades de agregación de la proteína. Esta interacción se ha estudiado por métodos computacionales a pesar de las limitaciones metodológicas mencionadas. A continuación se hace un breve repaso de estos reportes que contienen mucha información relevante a considerar en el presente capítulo, en donde se utilizan metodologías similares. Ver también la sección 1.3 en la página 6.

A nivel local, la coordinación del cobre a la secuencia PHGGGWGQ (*octarepeat*) de la PrP tiene consecuencias importantes sobre la cadena peptídica de esta región y sobre las cadenas laterales de los residuos más cercanos. Al coordinarse a varios residuos vecinos (HGG) la cadena peptídica pierde su flexibilidad (particularmente alta para los residuos de glicina), y además se crea una interacción entre el centro metálico y el grupo indol del triptofano más cercano.¹⁷⁹⁻¹⁸¹ Las regiones de la secuencia PrP que conectan a los diferentes sitios *octarepeat* (CWGQ) también sufren cambios estructurales ante la coordinación del metal. Estas regiones tienden a adoptar una estructura de *giro*, permitiendo a los centros metálicos vecinos acercarse los unos a los otros, con lo que se forman apilamientos de los sitios de unión a cobre.¹⁸² Estas interacciones entre sitios metálicos tienen consecuencias para el plegamiento del dominio *octarepeat* completo de la PrP, ya que esta región "no estructurada" de la proteína, al saturarse de Cu^{2+} , adoptaría una estructura más definida y globular.¹⁸¹⁻¹⁸⁴ Esto, por supuesto, puede tener implicaciones importantes en la función de la PrP, especialmente si se consideran los múltiples modos de unión observados en los complejos Cu^{2+} -PrP dependiendo de las condiciones de

concentración y pH.

La unión del cobre a la PrP también tiene consecuencias en la formación de motivos de estructura secundaria, ya que se observaron incrementos en la prevalencia y estabilidad de estos motivos en simulaciones de DM del complejo.¹⁸⁴ Además, se propusieron mecanismos en los que la coordinación del cobre a los sitios His96 e His111 en el dominio N-terminal de la PrP puede inducir la formación de estructuras de tipo "horquilla β ".¹⁸⁵⁻¹⁸⁷ Estas propuestas conectan la coordinación del cobre a la PrP con sus propiedades de agregación, y plantean un posible papel de este metal en la formación de especies patogénicas de la proteína (PrP^{Sc}). Sin embargo, aún existen muchas preguntas por contestar relacionadas al papel que la interacción cobre-PrP puede jugar en diferentes estados tanto fisiológicos como fisiopatológicos, así como su relación con los procesos que desencadenan a las enfermedades priónicas. En este sentido, el presente trabajo busca generar modelos estructurales y parámetros adecuados al estudio de los complejos Cu²⁺-PrP.

4.2. Objetivos

4.2.1. Objetivo general

- Estudiar el efecto estructural de la coordinación del Cu²⁺ a la proteína prion humana.

4.2.2. Objetivos particulares

- Generar un modelo de la proteína prion humana completa para el análisis de su estructura.
- Generar un conjunto de parámetros para el campo de fuerzas de CHARMM que describan correctamente la coordinación entre el Cu²⁺ y la proteína prion.
- Analizar a detalle la estructura local y dinámica de diferentes fragmentos de la proteína prion así como el efecto al coordinar el metal.
- Analizar el efecto de la coordinación del Cu²⁺ sobre la estructura de la proteína.

4.3. Metodología

4.3.1. Modelos estructurales

Dadas las características estructurales de la proteína prion (PrP), la construcción de un modelo estructural presenta varios retos metodológicos, similares a los enfrentados en la construcción de modelos estructurales del caso Cu²⁺-A β , en especial si se desea describir la coordinación del cobre. Algunas de estas dificultades son: 1) Existe poca información estructural para el dominio N-terminal de la PrP. 2) Este dominio coordina hasta seis átomos de cobre considerando tres tipos distintos de sitios de unión a lo largo de su secuencia de más de 100 aminoácidos. 3) La secuencia de ~100 aminoácidos del dominio C-terminal, adicionales al extremo N-terminal, dificulta el manejo y evaluación de la proteína completa debido a su tamaño final. Considerando lo anterior, en

el presente trabajo se planteó dividir a la secuencia de aminoácidos de la PrP en fragmentos más pequeños con la finalidad de hacerlos más manejables. En la Figura 4.1 se muestran los fragmentos considerados en el modelo completo, y algunas de las fuentes de información estructural consideradas.

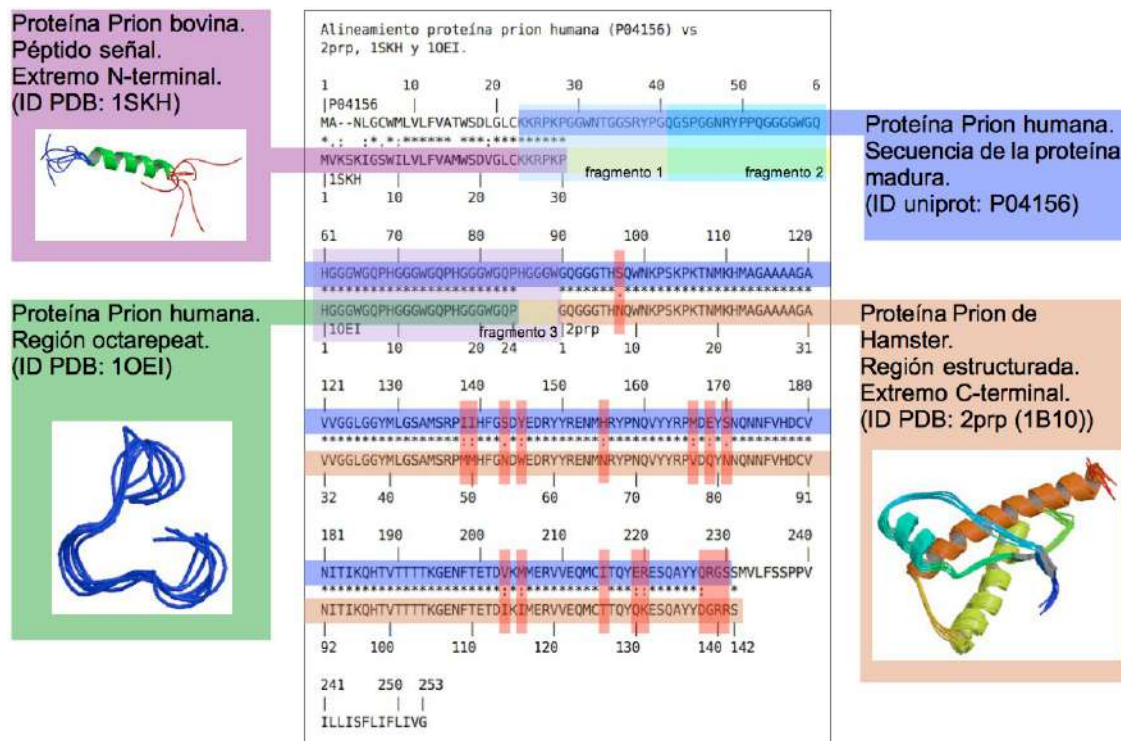


Figura 4.1. Secuencia de la proteína Prion humana (hPrP). Alineadas debajo de la secuencia hPrP, se encuentran las secuencias de estructuras experimentales. Se indican los fragmentos construidos y las mutaciones consideradas en color rojo.

En esta figura se muestra la secuencia completa de aminoácidos de la PrP humana, la cual alineó a varias otras secuencias parciales de la misma proteína para las que existen estructuras tridimensionales disponibles (PDB IDs: 1SKH, 10EI y 2PRP). Estos fragmentos estructurales fueron utilizados para construir parte del modelo completo, mientras que algunas secuencias faltantes se completaron de acuerdo a la secuencia de aminoácidos de la PrP humana.¹⁸⁸ Esto se llevó a cabo mediante el programa PSFGEN, disponible con los programas NAMD⁸⁷ y VMD,⁸⁵ (ver Figura 4.2 *i-iv*). El fragmento 1 (23-40), cuyos primeros 6 residuos provienen de la estructura de NMR 1SKH,¹⁸⁹ se construyó en conformación extendida (*ii*), al igual que el segundo fragmento (41-60), debido a que no cuentan con alguna estructura reportada. El tercer fragmento (61-91) fue construido a partir de la estructura de NMR 10EI (*iii*).¹⁹⁰ El fragmento (92-126) y el dominio C-terminal completo (127-230) fueron obtenidos a partir de la estructura 2PRP, la cual es una versión discontinuada del PDB 1B10,¹⁹¹ que contiene la estructura de la secuencia (90-230) (*iv*).

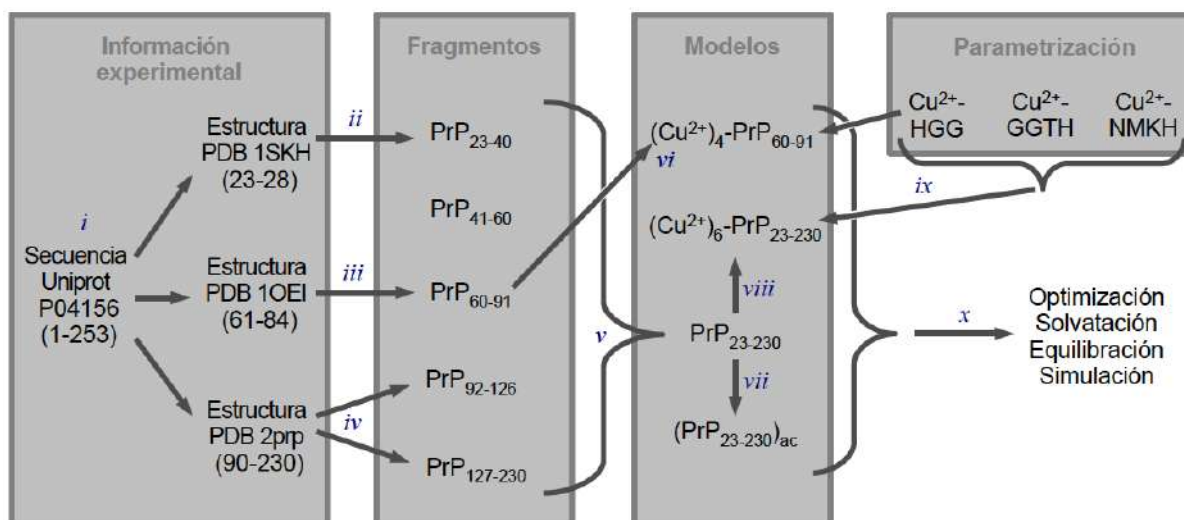


Figura 4.2. Procedimiento general que muestra los diferentes modelos utilizados para ensamblar el modelo completo de la proteína prion humana ($hPrP_{23-230}$).

De manera independiente, cada uno de los cinco fragmentos estructurales, mostrados en la Figura 4.2, fueron optimizados, solvatados, ionizados y equilibrados; en algunos casos la equilibración incluyó una simulación de DM de hasta 100 ns. La estructuras equilibradas de cada uno de estos fragmentos fue utilizada para ensamblar el modelo de la PrP_{23-230} (v), la cual a su vez fue utilizada para crear los modelos a pH ácido y coordinado al cobre en su estado de alta ocupación (vii y viii). Para los modelos que contienen cobre coordinado ($(Cu^{2+})_4-PrP_{60-91}$ y $(Cu^{2+})_6-PrP_{23-230}$), fue necesario incorporar las definiciones de topología y de cargas parciales, así como los parámetros de campos de fuerzas (ix), generados en el presente trabajo; esto se describe en la sección siguiente. En el caso del modelo $(PrP_{23-230})_{ac}$, se simuló un pH de ~ 2 , por lo que se consideraron las formas protonadas de los residuos Glu, Asp e His (vii). Finalmente, los modelos PrP_{23-230} , $(PrP_{23-230})_{ac}$, $(Cu^{2+})_4-PrP_{60-91}$ y $(Cu^{2+})_6-PrP_{23-230}$ fueron sujetos nuevamente a etapas de optimización, solvatación, ionización, equilibración y simulación de dinámica molecular (x).

4.3.2. Optimización de los modelos de complejos cobre-PrP y parametrización para el campo de fuerza CHARMM

El estudio del efecto de la coordinación del cobre a la proteína prion requirió generar parámetros de campos de fuerzas que permiten describir adecuadamente la geometría de los centros metálicos en los complejos $Cu^{2+}-PrP$. El campo de fuerza es posteriormente utilizado en simulaciones atómicas de dinámica molecular en las que se pone en evidencia el efecto estructural de dicha coordinación. Los parámetros se obtuvieron utilizando tres modelos estructurales del complejo $Cu^{2+}-PrP$, los cuales describen 3 tipos de coordinación encontrados en diferentes sitios de unión al metal en el dominio N-terminal de la PrP, (ver esquemas en la Figura 4.3 y la Figura 1.2 en la página 7). Estos y otros modos de coordinación se han estudiado exhaustivamente por métodos experimentales y teóricos.^{68-70,71,77} Los modelos propuestos son compatibles con el estado de alta ocupación del cobre en la PrP, en el que hay mayor certeza de los modos de coordinación presentes en cada sitio.

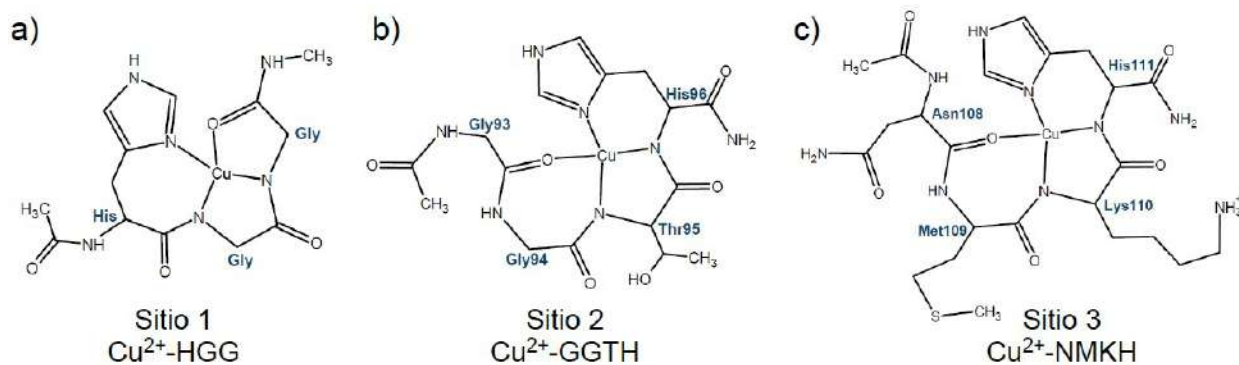


Figura 4.3. Estructuras de los modelos de complejos Cu^{2+} -PrP utilizados en la parametrización de los diferentes sitios de unión a cobre.

La construcción de los modelos se llevó a cabo utilizando el programa Molden.¹⁹² Los cálculos de estructura electrónica se llevaron a cabo aplicando métodos similares a los descritos en la sección 3.3.3 (página 47), mediante el programa deMon2k.^{139,140} Los funcionales utilizados en este caso fueron LSDA y PBE,¹⁹³ utilizando funciones de base orbital DZVP¹⁴⁴ y la base auxiliar Gen-A2.¹⁴⁵ En algunos cálculos se incluyó una función empírica para la dispersión.¹⁴³ Los parámetros generados son compatibles con el campo de fuerzas CHARMM.⁸⁸

Los parámetros de enlace, que describen la geometría de los átomos unidos covalentemente, se calcularon a partir de las curvas de energía potencial de cada enlace o ángulo involucrado en la coordinación al Cu^{2+} . Estas curvas se obtuvieron, para cada enlace o ángulo, en una gráfica de la energía total del complejo con respecto a los valores de distancia (o ángulo) específicos; estos valores se mantuvieron fijos durante una optimización del resto de la geometría. Como se observa en el ejemplo mostrado en la Figura 4.4, se partió de una geometría de mínima energía en la superficie de energía potencial (punto central), el cual se comprobó mediante un análisis de frecuencias; después se fijaron varios valores de la variable a parametrizar, (en este ejemplo, la distancia de enlace Cu-N), y se optimizó el resto de la geometría. Cada punto en esta gráfica corresponde a una optimización.

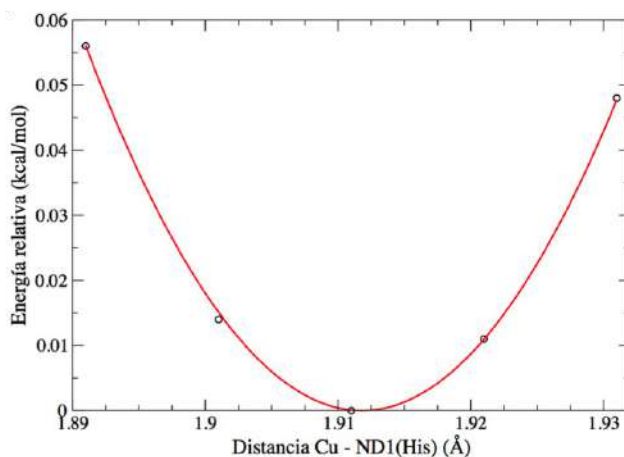


Figura 4.4. Ejemplo de ajuste por mínimos cuadrados de la PES, restringiendo un enlace.

Los puntos de las curvas de energía potencial se encuentran uniformemente espaciados. Para cada curva se probaron diferentes valores de espaciamiento: 0.004, 0.01 y 0.02 Å para enlaces, 0.4, 1.0 y 2.0° para ángulos y 1.0 y 2.0° para ángulos impropios. Los parámetros se derivaron de cada curva aplicando un ajuste por mínimos cuadrados utilizando una función de energía potencial con la siguiente forma:

$$E = k_v (v - v_0)^2,$$

donde k_v es una constante de fuerza asociada a la variable v , que puede ser una distancia de enlace, un ángulo de enlace o un ángulo impropio. v_0 corresponde al valor de la variable en equilibrio, correspondiente al mínimo de energía. k_v y v_0 son los parámetros ajustados por mínimos cuadrados usando los valores de la variable v fijos y a las correspondientes energías potenciales resultantes.

Para cada variable, se eligió el espaciamiento entre los puntos de la curva de energía potencial que produjera el mejor ajuste (mayor valor del coeficiente de correlación, r). Los ajustes por mínimos cuadrados se llevaron a cabo utilizando el programa Kaleidagraph. Considerando que la coordinación del metal en los tres sitios de unión genera anillos alrededor del metal de 5 a 7 miembros, no fue necesaria la obtención de parámetros para describir los ángulos diedros que incluyeran al átomo de Cu^{2+} , (ver Figura 4.3). Este fue también el caso para los parámetros de tipo Urey-Bradley de CHARMM.⁸⁸ Se comprobó que el conjunto de parámetros obtenido fue suficiente para reproducir y mantener la geometría optimizada mediante DFT en las simulaciones de mecánica molecular, (ver resultados en la sección 4.4).

Los parámetros de enlaces covalentes calculados incluyeron a los enlaces entre el Cu^{2+} y cuatro átomos de la proteína (N_{δ}^{His} , $2 N_{\text{amida}}^{-}$, O_{CO}). El mismo modo de coordinación (3N1O) con el mismo tipo de átomos enlazados fue considerado para los tres sitios de unión a cobre en el dominio N-terminal de la PrP. Sin embargo, el sitio 1 es un tipo de coordinación distinto al mostrado en los sitios 2 y 3 (ver Figura 4.3) ya que el primero coordina al cobre en dirección C-ter a partir de la histidina mientras que en los otros dos sitios esta coordinación se da en dirección N-ter.^{71,172,178,194,195} Considerando lo anterior se llevó a cabo la parametrización de los tres sitios de manera independiente y con fines comparativos a pesar de las similitudes en los tipos de enlaces.

Los parámetros para ángulos de enlace se calcularon para todas las combinaciones de ángulos que incluyeran al átomo de Cu^{2+} ($\text{Cu}^{2+}\text{-L-X}$ y $\text{L}_1\text{-Cu}^{2+}\text{-L}_2$), que en total fueron 13 para cada uno de los tres sitios de unión. De la misma manera se generaron parámetros para todos los ángulos impropios que involucran al ion metálico ($\text{Cu}^{2+}, \text{X}_1, \text{X}_2, \text{L}$ y $\text{Cu}^{2+}, \text{L}_1, \text{L}_2, \text{L}_3$), en donde se restringe el ángulo que forma el Cu^{2+} respecto al plano formado por uno de sus átomos ligantes (L) y dos átomos enlazados a L (X_1 y X_2), o al formado por tres átomos ligantes. En total se calcularon 7 ángulos impropios para cada sitio de unión, los cuales, como una aproximación, se duplicaron simétricamente para considerar las desviaciones por arriba y por abajo del plano.

Los parámetros de Lennard-Jones para el cobre se tomaron de la literatura.¹⁹⁶ Las cargas atómicas fueron calculadas mediante el programa Gaussian03¹⁹⁷ para el modelo Cu^{2+} -HGG, utilizando el esquema Merz-Singh-Kollman (MK).¹⁹⁸ Estas cargas fueron escaladas para hacerlas compatibles con las cargas del campo de fuerzas CHARMM y que conservaran la electroneutralidad de los residuos modificados por la coordinación del Cu^{2+} . Este escalamiento se llevó a cabo considerando dos modelos estructurales: el péptido HGG libre y coordinado a Cu^{2+} (modelo A = HGG; modelo B = Cu^{2+} -HGG). A partir de las cargas atómicas calculadas de los modelos A y B (q_A y q_B) se estimó el efecto de la coordinación del Cu^{2+} sobre las cargas MK (Δq_{A-B}), mediante la diferencia en las cargas de cada átomo:

$$\Delta q_{A-B}^{\text{MK}} = q_A^{\text{MK}} - q_B^{\text{MK}}$$

Aunque se conocen las cargas de CHARMM (FF) del modelo A (q_A^{FF}), no se conocen las cargas FF del modelo B ni el efecto de la coordinación del cobre sobre estas cargas ($\Delta q_{A-B}^{\text{FF}}$). Debido a que no hay garantía de que las cargas MK y FF sean comparables en escala y magnitud, no se puede utilizar el término $\Delta q_{A-B}^{\text{MK}}$ para determinar las cargas q_B^{FF} . En lugar de esto, se consideró un factor de escalamiento (f_{esc}) que permitiera conocer el término $\Delta q_{A-B}^{\text{FF}}$ y, por consecuencia, obtener las cargas q_B^{FF} de acuerdo con:

$$q_B^{\text{FF}} = q_A^{\text{FF}} - \Delta q_{A-B}^{\text{FF}}$$

$$\Delta q_{A-B}^{\text{FF}} = \Delta q_{A-B}^{\text{MK}} * f_{\text{esc}}$$

El factor de escalamiento se determinó graficando las cargas FF y MK del modelo A (q_A^{FF} vs q_A^{MK}), mostrada en la Figura 4.5. Se encontró una relación lineal entre los dos tipos de cargas con una ordenada al origen de cero, por lo que se utilizó $f_{\text{esc}} = 0.72$.

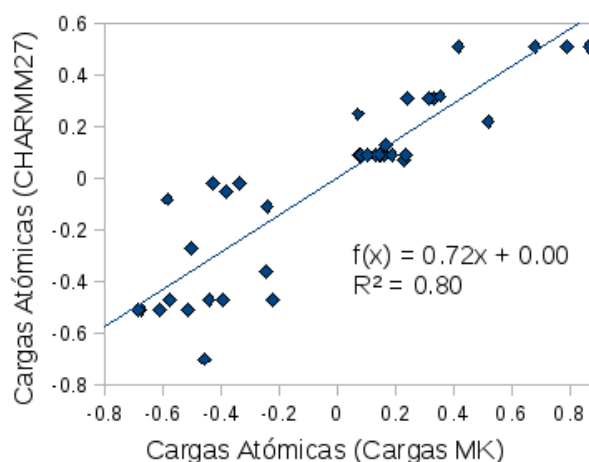


Figura 4.5. Relación entre las cargas de CHARMM y las de Merz-Singh-Kollman (MK)

Finalmente, se ajustó la electroneutralidad de las cargas resultantes del complejo, ya que el campo de fuerzas de CHARMM utiliza cargas formales enteras en fragmentos o grupos funcionales específicos. Aquí se eligió hacer el fragmento Cu^{2+} -HGG neutro dividiendo la carga restante entre los átomos involucrados de manera uniforme.

4.3.3. Simulaciones de dinámica molecular

El protocolo de equilibración, así como los parámetros de simulación empleados para todos los modelos completos y fragmentos indicados en la Figura 4.2 son similares a los aplicados anteriormente en la Sección 2.3.2 (página 13) para los modelos de fibras amiloides. Las simulaciones de producción para los modelos finales tuvieron una duración de entre 20 y 100 ns. De igual manera, el análisis de las trayectorias de DM se llevó a cabo mediante el programa VMD, utilizando diversas herramientas de análisis y mediciones estructurales (ver Sección 2.3.4 en la página 15).

4.3.4. Búsqueda conformacional del péptido HGGGW

Como parte de la caracterización del efecto estructural de la coordinación del cobre a la proteína prion, se llevó a cabo un análisis conformacional del pentapéptido HGGGW, que es la secuencia de aminoácidos del primer sitio de coordinación del metal en el dominio *octarepeat* de la PrP. Esta estructura se construyó también utilizando el programa Molden con los extremos N- y C-terminal amidados y acetilados, respectivamente. La geometría se optimizó con una metodología similar a la descrita anteriormente y se convirtió a formato MDL sdf para los siguientes pasos utilizando el programa Babel.¹⁹⁹ Para llevar a cabo el análisis se generaron más de 10,000 conformeros del pentapéptido utilizando el método de análisis conformacional basado en modos normales, Tork, implementado en el programa VConf.²⁰⁰ El análisis del conjunto conformaciones se llevó a cabo mediante el programa VMD midiendo los parámetros estructurales mencionados anteriormente; para esto fue necesario convertir el archivo de salida de VConf a formato PDB mediante el programa UCSF Chimera.²⁰¹ En total se realizaron cuatro corridas de búsqueda conformacional con VConf en las que se probaron dos campos de fuerzas (Dreiding²⁰² y GAFF²⁰³) tanto en el vacío como considerando un modelo de solvatación implícita (Born generalizado, GB).²⁰⁴ Estas corridas se denominan: Dreiding/Vacío, Dreiding/GB, GAFF/Vacío y GAFF/GB. La metodología utilizada en Vconf para cada corrida es la siguiente: 12,000 pasos (conformeros), asignación automática de cargas formales, filtrado de conformeros con una ventana de energía de 60 kcal/mol para corridas en el vacío y de 120 kcal/mol para corridas con solvente implícito GB, tolerancia de energía del filtrado de 0.4 kcal/mol y una tolerancia de ángulos y diedros para filtrado estructural de conformeros de 10.0°. Para el resto de los parámetros se utilizaron valores predeterminados.

4.4. Resultados de la parametrización del complejo Cu-PrP

La descripción de la coordinación de un metal de transición como el cobre a la proteína prion (PrP) utilizando campos de fuerzas requiere de un conjunto de parámetros que permitan reproducir de manera adecuada la geometría del complejo. La mayoría de los campos de fuerzas parametrizados para proteínas no incluyen los

parámetros necesarios para considerar la coordinación de metales de transición. A pesar de que regularmente se encuentran reportados protocolos de parametrización de complejos de proteínas con metales de transición, muchos de los parámetros sólo son aplicables a situaciones de coordinación muy específicas, lo que resulta muy limitante dada la diversidad estructural observada en este tipo de complejos. Otra limitación se encuentra en el hecho de que los parámetros de un campo de fuerza pueden no ser intercambiables con otros campos de fuerza. Considerando esto, en el presente trabajo se propuso generar un conjunto de parámetros que describan de manera adecuada la coordinación del cobre a la PrP, con la finalidad de analizar el efecto de esta coordinación en la estructura de la proteína en simulaciones atomísticas de dinámica molecular. El estudio de este efecto es de interés ya que permitiría entender mejor los mecanismos moleculares implicados en las funciones fisiológicas y fisiopatológicas de la PrP. En las siguientes secciones se discuten los resultados de esta parametrización considerando la metodología propuesta en la sección 4.3.2 (página 90).

4.4.1. Parámetros de uniones covalentes

Los parámetros covalentes utilizados para describir la geometría de los diferentes sitios de unión al cobre en la PrP incluyen 4 enlaces, 13 ángulos de enlace y 14 ángulos impropios, para un total de 93 pares de parámetros (considerando los tres sitios de unión) que incluyen una constante de fuerza y una distancia o ángulo de equilibrio. Cada uno de estos 93 pares de parámetros se derivó de una curva de energía potencial obtenida a partir de cinco optimizaciones restringidas y de un ajuste por mínimos cuadrados; en cada caso se probaron dos o tres curvas de energía potencial con diferentes rangos de la variable en cuestión. En la Figura 4.6 se muestran las estructuras de mínima energía de los modelos utilizados para cada sitio de unión, las cuales son las geometrías "objetivo" que el conjunto de parámetros debe reproducir.

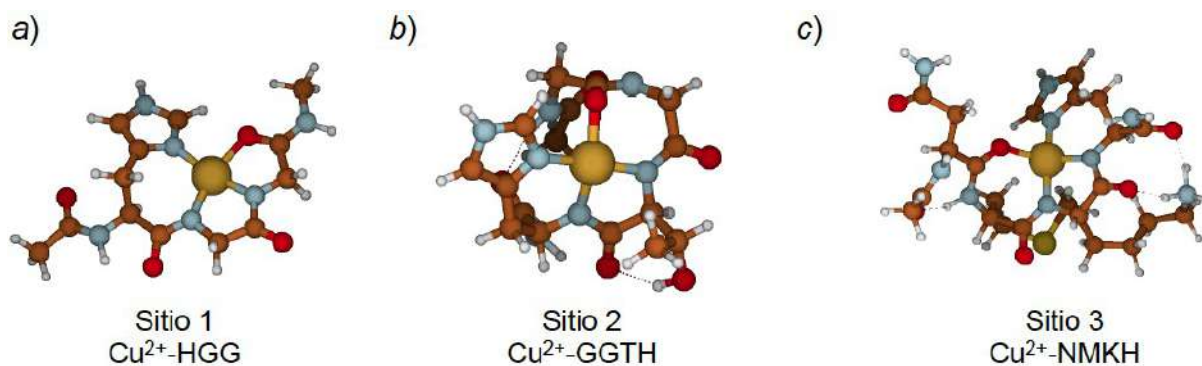


Figura 4.6. Estructuras de mínima energía de los modelos utilizados como referencia para la obtención de parámetros de campo de fuerzas CHARMM

En la Tabla 4.1 se muestra un resumen de los parámetros obtenidos para los tres sitios de coordinación. Es importante mencionar que no todos los parámetros propuestos se lograron obtener de manera satisfactoria. Los principales factores que limitaron la obtención de algunos parámetros fueron: 1) que durante algunas optimizaciones, se encontró un mínimo local distinto a la estructura de referencia, y 2) en algunos casos las

curvas de energía potencial fueron muy "suaves" llevando a constantes de fuerza demasiado pequeñas. En estos casos se utilizaron parámetros análogos provenientes de los otros sitios considerados, o se ignoró su contribución considerando constantes de fuerza nulas.

Tabla 4.1. Parámetros de enlace seleccionados para los modelos Cu²⁺-HGG (Sitio 1), Cu²⁺-GGTH (Sitio 2) y Cu²⁺-NMKH (Sitio 3)

Enlaces	Sitio 1		Enlaces	Sitio 2		Enlaces	Sitio 3	
	k_r^a	r_0^c		k_r	r_0		k_r	r_0
Cu ²⁺ -N _δ ^{His1}	129.5	1.912	Cu ²⁺ -N _δ ^{His4}	79.4	1.957	Cu ²⁺ -N _δ ^{His4}	109.4	1.936
Cu ²⁺ -N _{am} ^{Gly2}	96.2	1.971	Cu ²⁺ -N _{am} ^{His4}	140.0	1.917	Cu ²⁺ -N _{am} ^{His4}	108.7	1.939
Cu ²⁺ -N _{am} ^{Gly3}	192.4	1.859	Cu ²⁺ -N _{am} ^{Thr3}	127.1	1.917	Cu ²⁺ -N _{am} ^{Lys3}	128.4	1.884
Cu ²⁺ -O _{CO} ^{Gly3}	34.7	2.157	Cu ²⁺ -O _{CO} ^{Gly1}	44.8	2.043	Cu ²⁺ -O _{CO} ^{Asn1}	81.4	1.998
Ángulos	k_θ^b	θ_0^d	Ángulos	k_θ	θ_0	Ángulos	k_θ	θ_0
N _δ ^{His1} -Cu ²⁺ -N _{am} ^{Gly2}	78.6	108.7	N _δ ^{His4} -Cu ²⁺ -N _{am} ^{His4}	113.6	93.9	N _δ ^{His4} -Cu ²⁺ -N _{am} ^{His4}	99.6	95.7
N _{am} ^{Gly2} -Cu ²⁺ -N _{am} ^{Gly3}	170.2	83.3	N _{am} ^{His4} -Cu ²⁺ -N _{am} ^{Thr3}	180.2	84.8	N _{am} ^{His4} -Cu ²⁺ -N _{am} ^{Lys3}	166.3	84.1
N _{am} ^{Gly3} -Cu ²⁺ -O _{CO} ^{Gly3}	165.7	79.6	N _{am} ^{Thr3} -Cu ²⁺ -O _{CO} ^{Gly1}	67.6	99.0	N _{am} ^{Lys3} -Cu ²⁺ -O _{CO} ^{Asn1}	56.2	99.7
O _{CO} ^{Gly3} -Cu ²⁺ -N _δ ^{His1}	86.5	88.4	O _{CO} ^{Gly1} -Cu ²⁺ -N _δ ^{His4}	77.6	84.7	O _{CO} ^{Asn1} -Cu ²⁺ -N _δ ^{His4}	33.9	93.8
N _δ ^{His1} -Cu ²⁺ -N _{am} ^{Gly3}	110.5	168.0	N _δ ^{His4} -Cu ²⁺ -N _{am} ^{Thr3}			N _δ ^{His4} -Cu ²⁺ -N _{am} ^{Lys3}	85.0	159.7
O _{CO} ^{Gly3} -Cu ²⁺ -N _{am} ^{Gly2}	88.6	162.7	O _{CO} ^{Gly1} -Cu ²⁺ -N _{am} ^{His4}	30.8	161.4	O _{CO} ^{Asn1} -Cu ²⁺ -N _{am} ^{His4}	59.7	137.8
Cu ²⁺ -N _{am} ^{Gly2} -C _α ^{Gly2}	135.2	112.7	Cu ²⁺ -N _{am} ^{His4} -C _{CO} ^{Thr3}	132.0	115.2	Cu ²⁺ -N _{am} ^{His4} -C _{CO} ^{Lys3}	120.3	114.9
Cu ²⁺ -N _δ ^{His1} -C _γ ^{His1}	66.7	127.3	Cu ²⁺ -N _δ ^{His4} -C _γ ^{His4}	86.5	126.0	Cu ²⁺ -N _δ ^{His4} -C _γ ^{His4}	73.4	122.0
Impropios	k_ϕ^b	ϕ_0^d	Impropios	k_ϕ	ϕ_0	Impropios	k_ϕ	ϕ_0
N _{am} ^{Gly3} , C _α ^{Gly3} , C _{CO} ^{Gly2} , Cu ²⁺	4.3	0.2	N _{am} ^{Thr3} , C _{CO} ^{Gly2} , C _α ^{Thr3} , Cu ²⁺	21.0	9.6	N _{am} ^{Lys3} , C _{CO} ^{Met2} , C _α ^{Lys3} , Cu ²⁺	18.6	1.3
N _{am} ^{Gly2} , C _α ^{Gly2} , C _{CO} ^{His1} , Cu ²⁺	7.2	6.4	N _{am} ^{His4} , C _{CO} ^{Thr3} , C _α ^{His4} , Cu ²⁺	19.5	4.8	N _{am} ^{His4} , C _{CO} ^{Lys3} , C _α ^{His4} , Cu ²⁺	15.8	-5.8
N _δ ^{His1} , C _γ ^{His1} , C _ε ^{His1} , Cu ²⁺	32.7	0.4	N _δ ^{His4} , C _γ ^{His4} , C _ε ^{His4} , Cu ²⁺	23.5	3.6	N _δ ^{His4} , C _γ ^{His4} , C _ε ^{His4} , Cu ²⁺	26.9	-3.4
Cu ²⁺ , N _δ ^{His1} , N _{am} ^{Gly3} , N _{am} ^{Gly2}	3.7	5.7	Cu ²⁺ , N _δ ^{His4} , N _{am} ^{Thr3} , N _{am} ^{His4}			Cu ²⁺ , N _δ ^{His4} , N _{am} ^{Lys3} , N _{am} ^{His4}	8.1	-80.7

^a Unidades de kcal/mol/Å²; ^b Unidades de kcal/mol/rad²; ^c Unidades de Å; ^d Unidades de °

En términos generales, los parámetros para enlaces mostrados en la Tabla 4.1 sugieren que la longitud del enlace puede estar muy relacionada a la magnitud de su constante de fuerza, sin embargo, esta relación no es cuantitativa y depende también de la naturaleza del ligante, de la geometría global del centro metálico y de las cadenas laterales de los aminoácidos alrededor del centro metálico. El enlace Cu²⁺-O(carbonilo) en los tres sitios muestra las constantes de fuerza más débiles (34.7 - 81.4 kcal/(mol·Å)) y es el enlace más largo (1.998 - 2.157 Å). Las distancias más cortas se observaron en los enlaces Cu²⁺-N⁻ (amida desprotonada), en particular la que es "vecina" al carbonilo coordinado, con distancias y constantes de fuerza en el rango de 1.859 - 1.917 Å y 127.1 - 192.4 kcal/(mol·Å), respectivamente. Como se puede observar en la Figura 4.7, los enlaces con átomos N no son equivalentes entre sí, a pesar de que se tienen dos enlaces Cu²⁺-N⁻. También se observaron diferencias entre enlaces de un mismo tipo en diferentes sitio de unión.

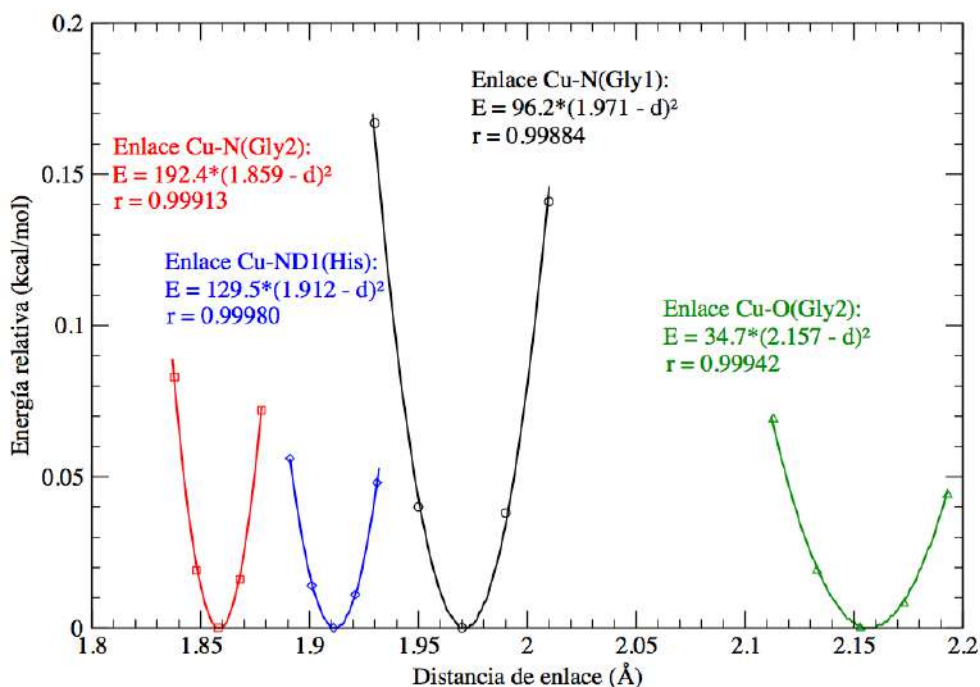


Figura 4.7. Comparación de los ajustes de las curvas de energía potencial correspondientes a los enlaces $\text{Cu}^{2+}\text{-L}$ para el sitio 1 de coordinación al cobre en la PrP (sitio octarepeat).

Los parámetros para ángulos de enlace y ángulos impropios parecen ser más congruentes entre los tres sitios de unión de acuerdo con la estructura del modelo; las constantes de fuerza reflejan la diferencia en el tipo de coordinación en el sitio 1 (en dirección C-terminal) y en los sitios 2 y 3 (en dirección N-terminal). Esto se observa particularmente para ángulos que incluyen a los ligantes N(His) u O(carbonilo); la coordinación de la histidina genera un anillo de 7 miembros en el sitio 1 y de 6 miembros en los sitios 2 y 3, mientras que la coordinación del carbonilo crea un anillo de 5 miembros en el sitio 1 y de 7 miembros en los sitios 2 y 3, (ver Figura 4.3, página 91). En estos casos, los ligantes que forman anillos más grandes generan constantes de fuerza más débiles. Esto explica porque en el sitio 1 los ángulos de enlace con constantes de fuerza más débiles fueron aquellos que incluyeron al N imidazólico de la histidina, mientras que en los sitios 2 y 3 las constantes de fuerza más débiles para ángulos de enlace incluyen al O carbonílico. El ángulo de enlace que mostró las constantes de fuerza más grandes involucra a los dos N amídicos para los tres sitios de unión. Las constantes de fuerza para ángulos impropios fueron en general más pequeñas en magnitud, indicando flexibilidad en el centro metálico para deformarse sacando al ion metálico del plano ecuatorial sin un gran costo energético. De hecho, muchas de estas constantes tuvieron valores cercanos a cero en el sitio 1, mientras que la presencia de las cadenas laterales en los residuos de los sitios 2 y 3 estabilizaron la geometría.

Como se mencionó anteriormente, el cálculo de los parámetros de ángulos diedros no fue necesario para los modelos considerados debido a que los átomos que coordinan al cobre en cada uno de los tres sitios se encuentran muy cercanos entre si, por lo que las rotaciones de los enlaces que involucran átomos ligantes o sus vecinos se encuentran impedidos. Sin embargo, en los modelos si se consideraron los términos CMAP utilizados en el campo de fuerza de CHARMM,⁹⁵ los cuales no fueron modificados de su forma original, sino que se adaptó la nomenclatura para que fueran correctamente aplicados a las estructuras modificadas.

4.4.2. Parámetros para interacciones no covalentes

Los parámetros para interacciones no covalentes incluyen a las cargas atómicas y a los parámetros de Lennard-Jones (LJ). Dado que en nuestros modelos el cobre no se encuentra considerado en el campo de fuerza CHARMM, este es el único átomo que requiere parámetros LJ nuevos. Estos se tomaron de la literatura, con valores de $\epsilon = 0.0427$ kcal/mol y $r_0 = 1.033$ Å.¹⁹⁶ Las cargas atómicas se calcularon, escalaron y adaptaron al campo de fuerzas CHARMM de acuerdo a la metodología propuesta en la sección 4.3.2 (página 90). Los resultados para el sitio 1 se muestran en la Tabla 4.2, junto con los valores para los átomos de los aminoácidos libres de cobre disponibles para el campo de fuerza CHARMM.²⁰⁵ Para los sitios 2 y 3 se utilizaron las cargas análogas obtenidas para el sitio 1 considerando que son los mismos tipos de átomos los que están involucrados en los tres sitios. Cabe mencionar que, como primera aproximación, el esquema de cálculo de las cargas atómicas sólo se consideraron a los átomos directamente coordinados al ion metálico, por lo que los átomos a dos o más enlaces del Cu²⁺ conservan las cargas originales CHARMM. Esta aproximación también fue aplicada para los parámetros de enlace covalente, ya que no se modificó ningún parámetro que no incluyera en su definición al átomo de cobre.

Tabla 4.2. Cargas atómicas en el centro metálico del sitio 1 de coordinación al cobre (Cu²⁺-HGG)

Átomo	HGG (CHARMM)	HGG (MK) ^a	Cu ²⁺ -HGG (MK) ^a	Cu ²⁺ -HGG (escalado) ^b	Cu ²⁺ -HGG (neutralizado) ^b
Cu ²⁺			0.36	0.26	0.24
N _δ ^{His1}	-0.70	-0.46	0.07	-0.32	-0.34
N _{am} ^{Gly2}	-0.47	-0.22	-0.45	-0.63	-0.66
N _{am} ^{Gly3}	-0.47	-0.40	-0.20	-0.33	-0.35
O _{CO} ^{Gly3}	-0.51	-0.68	-0.51	-0.39	-0.41
H _{am} ^{Gly3}	0.31	0.24			
H _{am} ^{Gly3}	0.31	0.33			

^a MK: cargas calculadas mediante el método de Merz-Singh-Kollman.

^b Cargas escaladas y neutralizadas para hacerlas compatibles con las cargas CHARMM.

En magnitud, las cargas resultantes son más cercanas y comparables a las cargas CHARMM. Sin embargo, el procedimiento de escalamiento hace que la diferencia entre las cargas atómicas de los modelos con y sin cobre, (efecto del metal calculado con el método MK), sea también de magnitud comparable (escalada). Se observó que

los cuatro átomos ligantes resultaron con cargas negativas, siendo la primera amida (a partir del ligante imidazólico) el átomo con la carga más negativa. Comparando las cargas neutralizadas con las obtenidas directamente del cálculo MK se observan dos diferencias importantes en el N imidazólico y en el O carbonílico. En el modelo MK el O es el más negativo de todos los ligantes, mientras el N queda con una carga ligeramente positiva. Estas diferencias son resultado de que, en el campo de fuerzas CHARMM, el N es más negativo que el O, situación que es opuesta en el cálculo MK para el modelo sin cobre. De esta forma, como el escalamiento considera la carga CHARMM más el efecto del cobre y de la neutralización, esto resulta en el orden invertido de cargas para estos átomos, más cercanas a un punto intermedio.

4.4.3. Evaluación de los parámetros obtenidos

Con la finalidad de evaluar el procedimiento de parametrización propuesto en el presente trabajo, se determinaron los conjuntos completos de parámetros de enlace de los residuos de aminoácido glicina y alanina, aplicando la misma metodología descrita para los complejos Cu-PrP. Estos resultados se comparan con los parámetros disponibles en los campos de fuerzas CHARMM^{88,205} y Amber,²⁰⁶ para estos mismos residuos. Los resultados se muestran en la Tabla 4.3, donde se puede comprobar que, en términos generales, el procedimiento propuesto proporciona parámetros comparables a los disponibles en los campos de fuerzas más comúnmente utilizados para sistemas biológicos. Sin embargo, algunas de las constantes de fuerza calculadas fueron muy sobrevaloradas, como se puede observar para el caso del enlace carbonilo. En la Tabla 4.4 se presentan los coeficientes de correlación para los conjuntos de parámetros derivados de la glicina y de la alanina considerando las diferentes metodologías. Estos resultados permiten cuantificar las diferencias entre los parámetros derivados de las diferentes metodologías.

Tabla 4.3. Parámetros de enlace seleccionados para la glicina y la alanina calculados en el presente trabajo y de los campos de fuerza CHARMM y Amber

Enlaces	LSDA		PBE		CHARMM		Amber	
	k_r^a	r_0^b	k_r^a	r_0^b	k_r^a	r_0^b	k_r^a	r_0^b
(N-H) ^{Gly}	501.3	1.031	500.4	1.028	440.0	0.997	434.0	1.010
(N-C _α) ^{Gly}	359.0	1.444	325.0	1.464	320.0	1.430	337.0	1.449
(C-C _α) ^{Gly}	278.0	1.521	257.6	1.538	250.0	1.490	317.0	1.522
(C=O) ^{Gly}	828.4	1.236	785.2	1.247	620.0	1.230	570.0	1.229
(C-N) ^{Gly}	497.6	1.357	465.5	1.369	370.0	1.345	490.0	1.335
(N-H) ^{Ala}	447.1	1.040	495.9	1.030	440.0	0.997	434.0	1.010
(N-C _α) ^{Ala}	365.8	1.441	356.2	1.460	320.0	1.430	337.0	1.449
(C-C _α) ^{Ala}	289.4	1.522	267.7	1.539	250.0	1.490	317.0	1.522
(C=O) ^{Ala}	800.6	1.242	766.5	1.253	620.0	1.230	570.0	1.229
(C-N) ^{Ala}	522.6	1.354	480.5	1.368	370.0	1.345	490.0	1.335

^a Unidades de kcal/mol/Å²; ^b Unidades de Å

Tabla 4.4. Coeficientes de correlación entre los parámetros de constantes de fuerza de enlaces (k_r) y distancias de equilibrio (r_0) obtenidos por diferentes metodologías

Coeficientes de correlación	Glicina		Alanina	
	k_r	r_0	k_r	r_0
LSDA vs CHARMM	0.983	0.998	0.944	0.998
LSDA vs Amber	0.949	0.999	0.962	0.999
PBE vs CHARMM	0.991	0.999	0.987	0.999
PAB vs Amber	0.942	0.999	0.951	0.999
LSDA vs PBE	0.996	1.000	0.982	1.000
CHARMM vs Amber	0.896	0.998	0.896	0.998

Los coeficientes de correlación para cada conjunto de parámetros muestran que las distancias de equilibrio determinadas se encuentran en excelente acuerdo con los campos de fuerzas CHARMM y Amber. Las constantes de fuerza en general tienen también buen acuerdo, pero este parece mejorar cuando se compara la metodología usando el funcional PBE con respecto al campo de fuerza CHARMM.

Además de estas comparaciones, se llevó a cabo una simulación corta de dinámica molecular del modelo del sitio 1 de coordinación a cobre utilizando los parámetros calculados. Esto permite comprobar que la geometría del centro metálico se describe correctamente. En la Figura 4.8 a) se muestra una gráfica con la evolución temporal del RMSD del modelo a lo largo de la simulación, la cual en general se observa constante. En la Figura 4.8 b) se pueden apreciar superpuestas las geometrías adoptadas por el modelo durante la simulación de prueba. Cada estructura se alineó considerando el ion cobre y sus ligantes para poder apreciar la extensión de sus fluctuaciones estructurales. Así mismo, se muestra superpuesta la estructura de mínima energía utilizada como referencia.

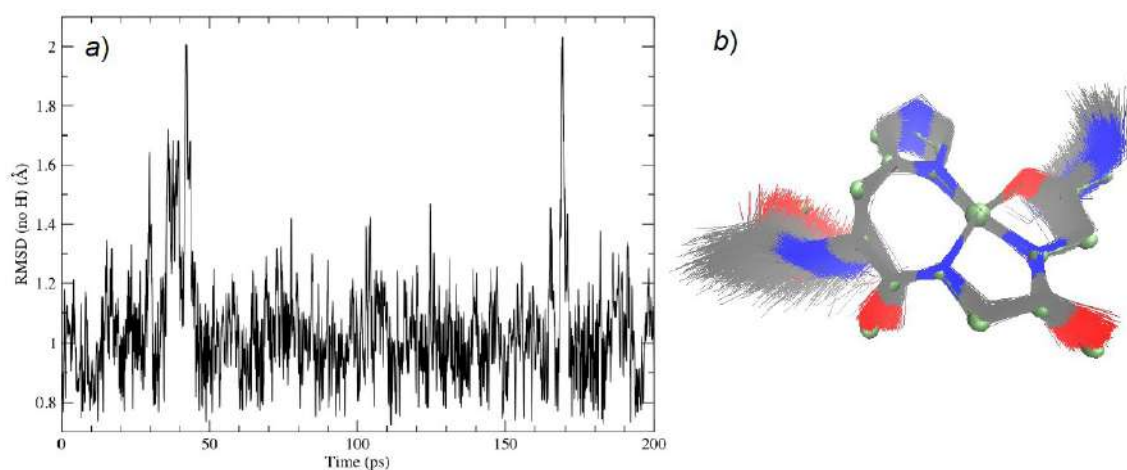


Figura 4.8. Simulación de prueba del complejo Cu^{2+} -HGG utilizando los parámetros calculados. a) RMSD respecto al tiempo. b) Estructuras a lo largo de la simulación superpuestas. En verde se muestra la estructura de referencia.

Esta figura muestra que los ligantes y el centro metálico mantienen su geometría a lo largo del tiempo, permitiendo además cierto grado de flexibilidad en el complejo. Los extremos N-terminal y C-terminal muestran alto grado de flexibilidad con respecto al plano del centro metálico. De esta manera se demuestra que el conjunto de parámetros elegido es suficiente para describir la geometría del centro metálico obtenida mediante cálculos de estructura electrónica. Además, se comprueba que los términos de ángulos diedros y de Urey-Bradley son prescindibles en un complejo cuyos átomos coordinados se encuentran muy cercanos en la cadena peptídica.

4.5. Análisis conformacional del péptido HGGGW de la proteína prion

En esta sección se considera una exploración extensa de puntos estacionarios de la superficie de energía potencial (PES) del péptido His-Gly-Gly-Gly-Trp, reconocido como el primer sitio de coordinación del Cu^{2+} en la proteína prion (PrP). Se eligió este sitio para realizar un análisis detallado debido a que es el que se encuentra mejor caracterizado estructuralmente en su coordinación al Cu^{2+} (ver por ejemplo la estructura cristalina del complejo de este pentapéptido con el Cu^{2+} y su caracterización espectroscópica).¹⁹⁴ En las siguientes secciones se exponen las principales características de la PES de este pentapéptido con la finalidad de entender su estructura intrínsecamente desordenada y su capacidad para coordinar Cu^{2+} .

4.5.1. Comparación entre las metodologías aplicadas en la búsqueda conformacional

Las cuatro corridas de búsqueda conformacional, realizadas de acuerdo con la metodología descrita en la sección 4.3.4, arrojaron diferentes tendencias respecto a algunas mediciones estructurales (ver más adelante). Este resultado es esperado dada la naturaleza empírica de los métodos aplicados; sin embargo, se observaron algunas similitudes en los resultados que se pueden atribuir a las naturaleza química del sistema, mientras que algunas diferencias son consecuencia de factores metodológicos. En la Figura 4.9 se muestra la distribución de frecuencias de energía potencial para cada conjunto, en donde se puede comparar el rango de energía en el que se encontraron las estructuras y el número de conformaciones con energía similar.

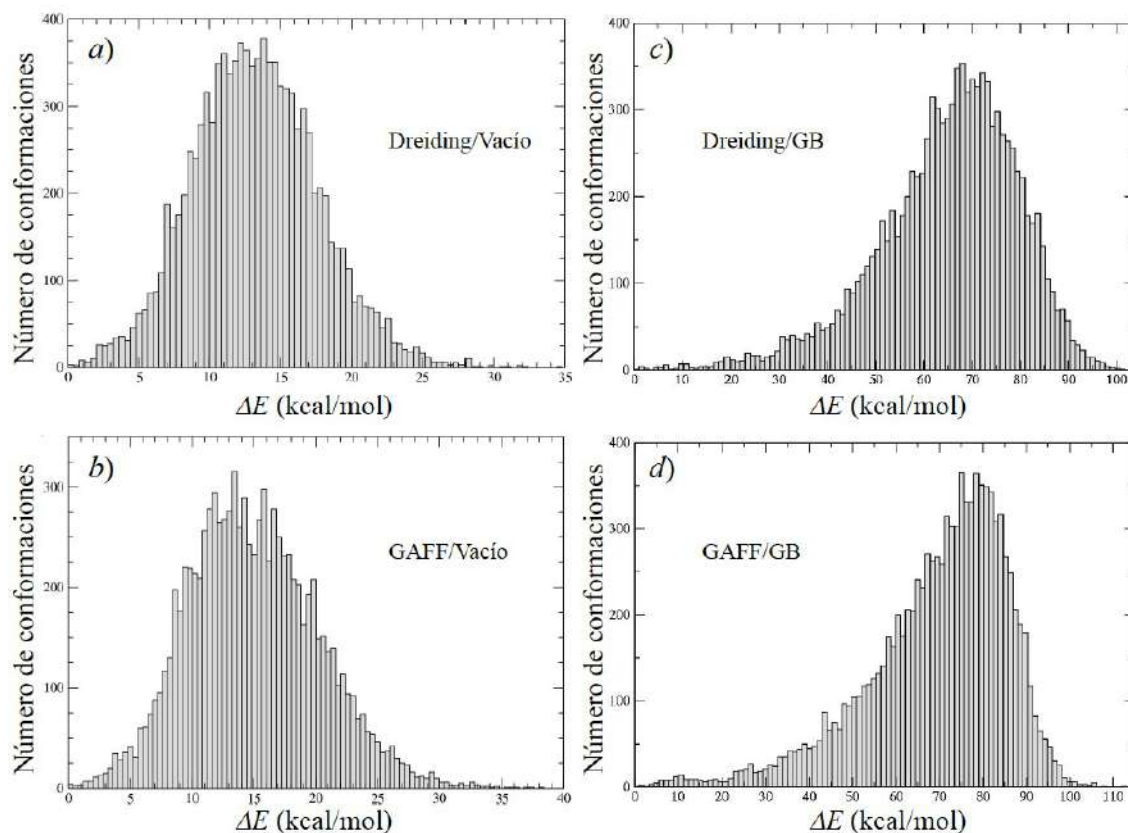


Figura 4.9. Histograma de frecuencias de la energía relativa para los cuatro conjuntos de conformeros del pentapéptido HGGGW. a) Dreiding/Vacio. b) GAFF/Vacio. c) Dreiding/GB. d) GAFF/GB.

En las gráficas de la Figura 4.9 se puede observar que los rangos de energía para los dos campos de fuerzas son similares, ya sea que se considere o no la solvatación implícita. Para los conjuntos obtenidos en el vacío (gráficas *a* y *b*) el rango de energía se observa alrededor de 30 kcal/mol, mientras que en las gráficas *c*) y *d*) muestran que la consideración del modelo de solvatación GB produjo un rango de energía que sobrepasa las 100 kcal/mol. La forma de las distribuciones en los conjuntos calculados en el vacío (*a* y *b*) también es similar para los dos campos de fuerza, sin embargo, para el campo de fuerza GAFF la curva parece estar un poco más sesgada, mientras que para Dreiding la forma es más simétrica. En el caso de los conjuntos considerando el modelo de solvente continuo, ambas curvas parecen sesgadas a energías más altas, lo que implica que existe un menor número de conformaciones de baja energía, es decir, que las estructuras más estables son más selectas. En la Tabla 4.5 se muestran los promedios de algunas mediciones estructurales para los cuatro conjuntos de conformeros, donde además se incluyen los rangos de energías y de valores de parámetros estructurales precisos para cada conjunto.

Tabla 4.5. Parámetros estructurales promedio para los cuatro conjuntos de conformeros del pentapéptido HGGGW^a

Conjunto	Dreiding/Vacío	GAFF/Vacío	Dreiding/GB	GAFF/GB
No. de conformeros	10,250	9,448	10,488	10,236
$\overline{\Delta E}$ (kcal/mol)	13.2 (0.0-34.6)	14.9 (0.0-40.3)	65.0 (0.0-103.7)	69.5 (0.0-113.0)
$\overline{d_{C\alpha}^{-1-5}}$ (Å)	7.6 (3.8-13.6)	7.6 (3.6-14.7)	7.9 (3.7-14.2)	7.8 (3.7-14.9)
$\overline{r_{gyr}^2}$ (Å ²)	4.9 (3.9-7.9)	4.9 (3.9-8.0)	5.0 (4.0-7.9)	5.0 (4.0-7.9)
\overline{SASA} (Å ²)	542.6 (517.1-564.5)	552.7 (526.9-573.7)	533.9 (498.0-562.7)	543.3 (513.7-570.1)
\overline{nHB}	1.3 (0-6)	1.4 (0-7)	2.5 (0-8)	2.3 (0-8)

^a Entre paréntesis se muestra el rango (mín-máx) correspondiente a cada medición.

El número de conformeros obtenido para cada conjunto muestra que, a pesar de que en todos los casos se solicitaron 12,000 estructuras, el proceso de filtrado por energía y geometría aplicado por VConf resulta en conjuntos con alrededor de 10,000 elementos. Esto permite suponer que la búsqueda conformacional es lo suficientemente exhaustiva como para posiblemente abarcar el espacio conformacional completo del pentapéptido. Los promedios de los parámetros estructurales mostrados en la Tabla 4.5 muestran que los dos campos de fuerza utilizados (Dreiding y GAFF) pueden generar estructuras similares con promedios y rangos comparables, sólo en el caso del área superficial accesible a disolvente (SASA) muestra que dicha área es ligeramente mayor para GAFF. Curiosamente, el radio de giro (r_{gyr}) muestra valores comparables para ambos campos de fuerzas. Esta diferencia sugiere que el campo de fuerzas Dreiding promueve interacciones intramoleculares más estrechas, es decir, que se logra un mejor "empaquetamiento", a pesar de que los plegamientos son en promedio similares para los dos campos de fuerza.

El uso de solvatación implícita GB produjo estructuras que son ligeramente más alargadas (menos globulares) que las estructuras en el vacío, como se puede observar al comparar los promedios de la distancia entre los C_{α} 's de la His1 y el Trp5 y del radio de giro en la Tabla 4.5. Por su parte, la superficie expuesta al disolvente se redujo al incluir el solvente implícito para ambos campos de fuerzas, mostrando que esta metodología en promedio favorece la formación de interacciones intramoleculares en el pentapéptido. Esta observación también se ve reflejada en el número de puentes de hidrógeno promedio, el cual es mayor en estructuras considerando el modelo GB para ambos campos de fuerza en comparación con las estructuras en el vacío.

Otra diferencia estructural se observa al comparar las gráficas de Ramachandran²⁰⁷ para el pentapéptido, por ejemplo, en la Figura 4.10 se muestran estas gráficas para la Gly3 en los cuatro conjuntos de conformeros.

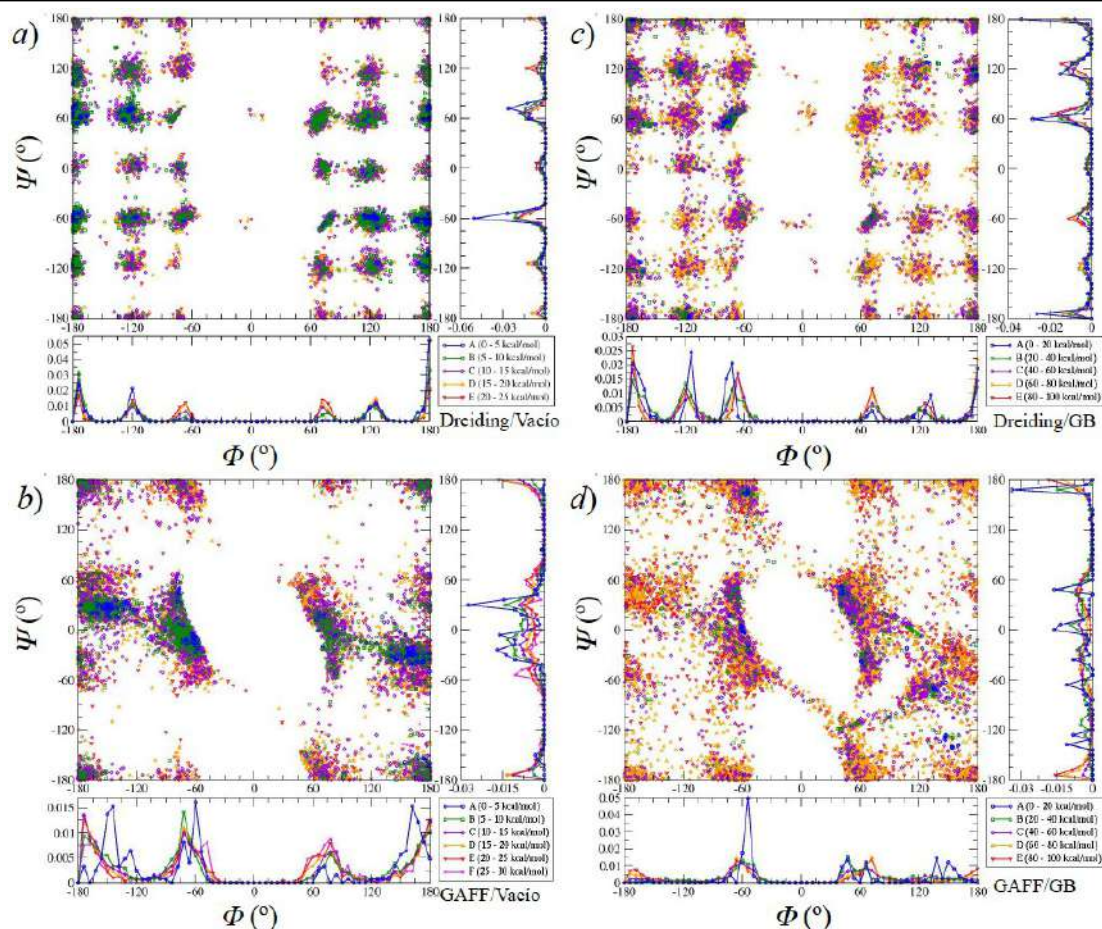


Figura 4.10. Gráficas de Ramachandran para la Gly3 del péptido HGGGW considerando los cuatro conjuntos de conformeros: a) Dreiding/Vacio b) GAFF/Vacio c) Dreiding/GB y d) GAFF/GB.

Las gráficas de Ramachandran muestran que existe una diferencia estructural importante entre los conformeros derivados de cada campo de fuerza, la cual se observa en los ángulos diedros Φ y Ψ de la cadena peptídica. Las gráficas de los pares de dichos ángulos obtenidas con el campo de fuerzas Dreiding (Figura 4.10 a y c) muestran una distribución regular en la que los puntos se concentran alrededor de los valores $\pm 60, 120$ y 180° , mientras que, para el campo de fuerzas GAFF (Figura 4.10 b y d), las distribuciones parecen tener un patrón similar al observado típicamente para glicinas en proteínas,^{208,209} que en este caso parece más adecuado. La incorporación del modelo GB de solvatación implícita produce una mayor dispersión de conformaciones en la gráfica de Ramachandran (Figura 4.10 c y d), generando un mayor número de conformeros de alta energía, lo que explica la distribución sesgada en las distribuciones de la Figura 4.9 c) y d).

Considerando las pequeñas diferencias en los parámetros estructurales "globales" observadas entre los cuatro conjuntos de conformaciones, es claro que la diferencia en la magnitud del rango de energía relativa entre los conjuntos de conformeros con y sin solvente implícito es arbitraria y es resultado de la incorporación del modelo de solvatación implícita para evaluar dicha energía potencial. En las próximas secciones se centrará el análisis en

el conjunto GAFF/GB y se harán comparaciones con los otros conjuntos cuando sea pertinente.

4.5.2. Características estructurales de las conformaciones con mayor estabilidad en el péptido HGGGW

Con la finalidad de analizar las características estructurales de las conformaciones más estables del pentapéptido, cada uno de los cuatro conjuntos de conformeros se dividió en subintervalos de 5 kcal/mol para conjuntos calculados en el vacío y de 20 kcal/mol para los conjuntos calculados con solvente implícito. En cada subintervalo de energía se calcularon los promedios de los parámetros estructurales de las conformaciones para su comparación. En la Tabla 4.6 se muestran los parámetros promedio para el conjunto de conformeros GAFF/GB, el cual es representativo de los otros tres conjuntos. En general, las tendencias de los promedios de estos parámetros respecto a los intervalos de energía son similares para los cuatro conjuntos de estructuras.

Tabla 4.6. Promedio de parámetros geométricos por intervalo de energías para el conjunto GAFF/GB de conformeros del péptido HGGGW

Intervalo (kcal/mol)	A (0-20)	B (20-40)	C (40-60)	D (60-80)	E (80-100)
No. conf.	124	470	1810	4902	2907
$\overline{d_{C\alpha}^{1-5}}$ (Å)	6.0	6.1	6.4	7.8	9.0
$\overline{r_{gr}^2}$ (Å ²)	4.5	4.5	4.6	5.0	5.4
\overline{SASA} (Å ²)	536.5	535.5	537.9	543.1	548.6
\overline{nHB}	3.3	3.6	3.3	2.4	1.3
$\overline{n\phi_{pept}^{sin}}$ ^a	1.1	0.9	1.0	1.4	2.0

^a Número de enlaces peptídicos en conformación *sin*.

En general se observó que para el conjunto GAFF/GB las estructuras de menor energía tienden a ser más compactas y globulares, como se puede interpretar por los resultados mostrados en la Tabla 4.6. También se observa que estas estructuras forman en promedio más puentes de hidrógeno intramoleculares y muestran menos frecuentemente sus enlaces peptídicos en conformación *sin*, lo cual es típicamente esperado para proteínas. De esta manera podemos afirmar que existen características estructurales determinantes de la estabilidad en el péptido HGGGW a pesar de su naturaleza intrínsecamente desordenada. La Figura 4.11 permite observar la forma como se distribuyen los valores de los parámetros estructurales medidos con respecto a la energía. Se observa que las características estructurales observadas para los conformeros más estables no son exclusivas, de tal forma que estas mismas características son observadas en conformeros menos estables. Por ejemplo, se puede observar en la Figura 4.11 e) que dentro del rango de energía de 0 a 30 kcal/mol el radio de giro de prácticamente todos los conformeros se encuentra entre 4 y 5 Å², sin embargo, los conformeros de alta energía muestran radios de giro en un rango amplio desde 4 hasta 8 Å². De esta forma, los valores de radio de giro pequeños son comunes en estructuras tanto estables como inestables, en cambio los valores de radio de giro altos se observan únicamente en las estructuras inestables. Esto sugiere que ninguno de los parámetros medidos puede

por si sólo explicar la estabilidad de los complejos, sólo a través de la combinación de esos y otros parámetros se podría entender dicha estabilidad.

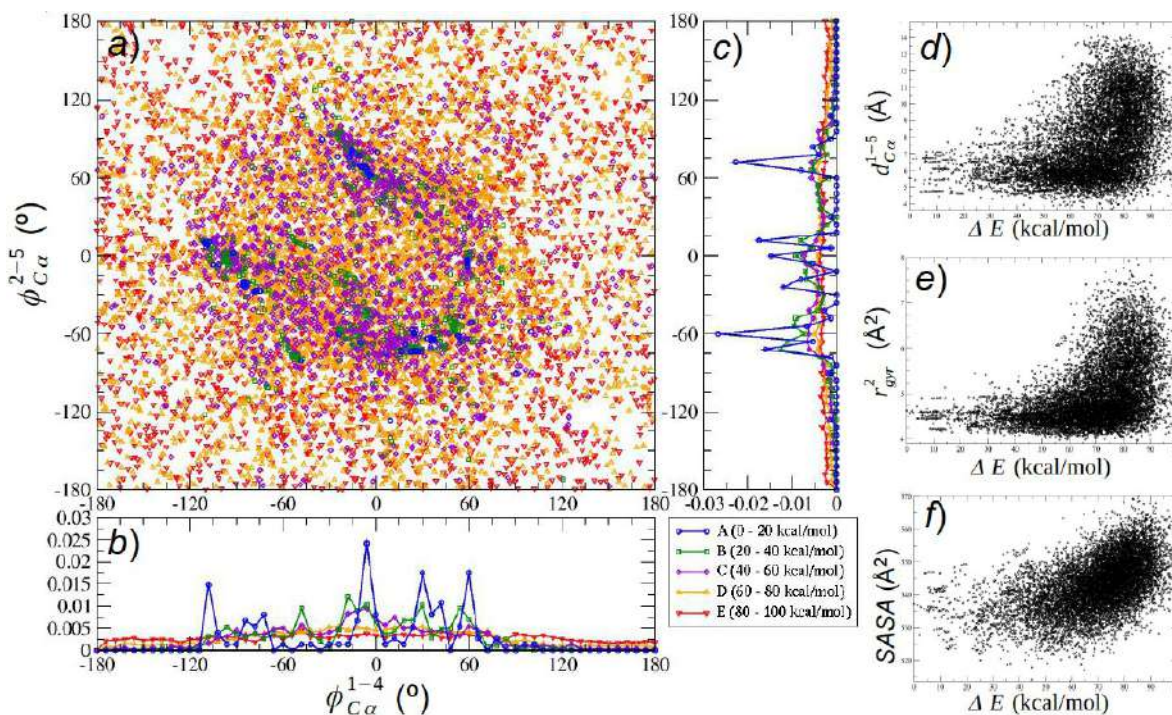


Figura 4.11. Distribución de las propiedades estructurales del conjunto GAFF/GB de conformeros del péptido HGGGW. a) Gráfica de los ángulos diedros entre los C_{α} 's (1-4 vs 1-5). b) y c) Histogramas de frecuencias normalizados para los ángulos diedros. d) Distancias entre los C_{α} 's de la His1 y el Trp5, e) radios de giro y f) áreas superficiales accesible al disolvente con respecto a la energía.

La gráfica de ángulos diedros entre C_{α} 's mostrada en la Figura 4.11 a) muestra que las conformaciones más estables del péptido HGGGW tienden a agruparse en regiones específicas de esta representación, la cual es análoga a la gráfica de Ramachandran.²⁰⁷ Los cúmulos de puntos, mostrados en esta gráfica en azul, representan plegamientos particulares del pentapéptido para los conformeros más estables (intervalo A, en el rango de 0 a 20 kcal/mol). Las gráficas en los costados (b y c) ayudan a comparar la densidad de puntos para cada ángulo, los picos que se observan indican la acumulación de los conformeros en un valor de ángulo definido. En cambio, los otros conjuntos de conformeros tienden a mostrarse más dispersos en esta gráfica a medida que se incrementa la energía, como se observa en las gráficas de densidad para los puntos provenientes de los intervalos B - E, los cuales muestran histogramas más anchos y planos, carentes de picos (Figuras Figura 4.11 b y c).

Estos resultados indican que se pueden esperar de cinco a seis plegamientos predominantes a baja energía, mientras que al incrementarse la energía ningún plegamiento predominaría debido a la alta flexibilidad del péptido HGGGW. Estas conformaciones predominantes también se pueden observar en las gráficas de las Figuras 4.11 d), e) y f) como secuencias de puntos alineados horizontalmente en el rango de 0 a 20 kcal/mol. Es

interesante observar que los confórmeros del conjunto Dreiding/GB también mostraron un número similar de conformaciones predominantes a baja energía, aunque la posición de los picos se desplazó ligeramente. En el caso de los conjuntos de confórmeros obtenidos en el vacío (Greiding/Vacío y GAFF/Vacío) se encontraron dos o tres plegamientos predominantes a baja energía, por lo que se puede afirmar que el método de solvatación implícita hace una diferencia importante en la determinación de las estructuras de menor energía. Ambos campos de fuerza permiten encontrar distribuciones de plegamientos predominantes comparables entre sí.

4.6. Efecto de la coordinación del cobre en la estructura del dominio octarepeat de la proteína prion

El análisis presentado en la sección 4.5 permite entender algunas características estructurales del sitio *octarepeat* de coordinación al cobre (sitio 1), sin embargo, para entender el efecto de la coordinación del metal es necesario comparar la estructura del péptido libre con su estructura en forma de complejo. Esto se analiza en la presente sección, en donde además se extrapola la comparación entre la estructura del dominio *octarepeat* completo en su forma libre y en su estado de alta ocupación de cobre. En las Figuras 4.6 *a*) y 4.8 *b*) (páginas 91 y 100, respectivamente) se mostró la estructura del complejo Cu^{2+} -HGG, la cual es la secuencia mínima necesaria para coordinar al cobre en el sitio 1 de unión. Esta estructura se utilizó como referencia para generar los parámetros de campos de fuerza (sección 4.4) que se utilizaron para construir modelos de los complejos más grandes que aquí se analizan. La Figura 4.12 muestra un ejemplo de los modelos generados. Así mismo, las estructuras mostradas en las Figuras 4.6 *b*) y *c*), que corresponden a los complejos Cu^{2+} -GGTH y Cu^{2+} -NMKH (sitios 2 y 3), se aplicaron en la generación de modelos para el estudio de la proteína prion completa saturada de cobre.

4.6.1. Estructura del dominio octarepeat de la proteína prion en estado libre y saturado de cobre

El dominio *octarepeat* completo de la proteína prion (PrP₆₀₋₉₁) se encuentra en la región no estructurada de esta proteína (PrP₂₃₋₁₂₉). A pesar de que se ha propuesto una estructura y plegamiento particular para el péptido 60-91,¹⁹⁰ esta estructura carece de los motivos de estructura secundaria característico de las proteínas con estructura nativa, lo cual sugiere una característica relevante en las propiedades de agregación de la PrP. La coordinación de iones metálicos a este dominio implicaría una modificación en su estructura y propiedades, por lo que el proceso de agregación se vería modificado de manera importante. La coordinación del Cu^{2+} al dominio *octarepeat* puede generar múltiples estructuras o componentes dependiendo de la proporción Cu:Prp, en donde dos o más sitios de coordinación puede interactuar con un único ión metálico.⁷⁷ El escenario cuando se consideran pocos equivalentes de Cu^{2+} es muy complejo, ya que son posibles demasiadas configuraciones y modos de unión. Por este motivo se decidió comparar la dinámica molecular del estado de alta ocupación de cobre en la proteína PrP₆₀₋₉₁ [$(\text{Cu}^{2+})_4$ -PrP₆₀₋₉₁] con la estructura libre de cobre. Las estructuras iniciales consideradas se muestran en la Figura 4.12.

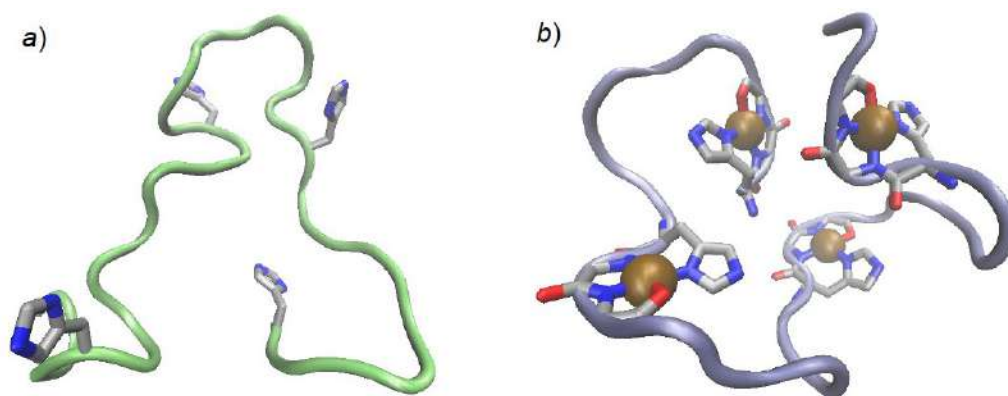


Figura 4.12. Estructuras iniciales del dominio octarepeat libre (a) y en estado de alta ocupación del Cu^{2+} (b). Las histidinas resaltadas (61, 69, 77 y 85) indican los sitios donde se coordinan los átomos de cobre.

Además de estas estructuras se probaron distintas configuraciones iniciales del péptido durante las dinámicas moleculares, las cuales permitieron evaluar el efecto de la coordinación del metal. La Figura 4.13 muestra la formación de estructuras secundarias durante el tiempo de simulación de la proteína libre (a y d) y saturada con cuatro átomos de cobre (b, c, e y f).

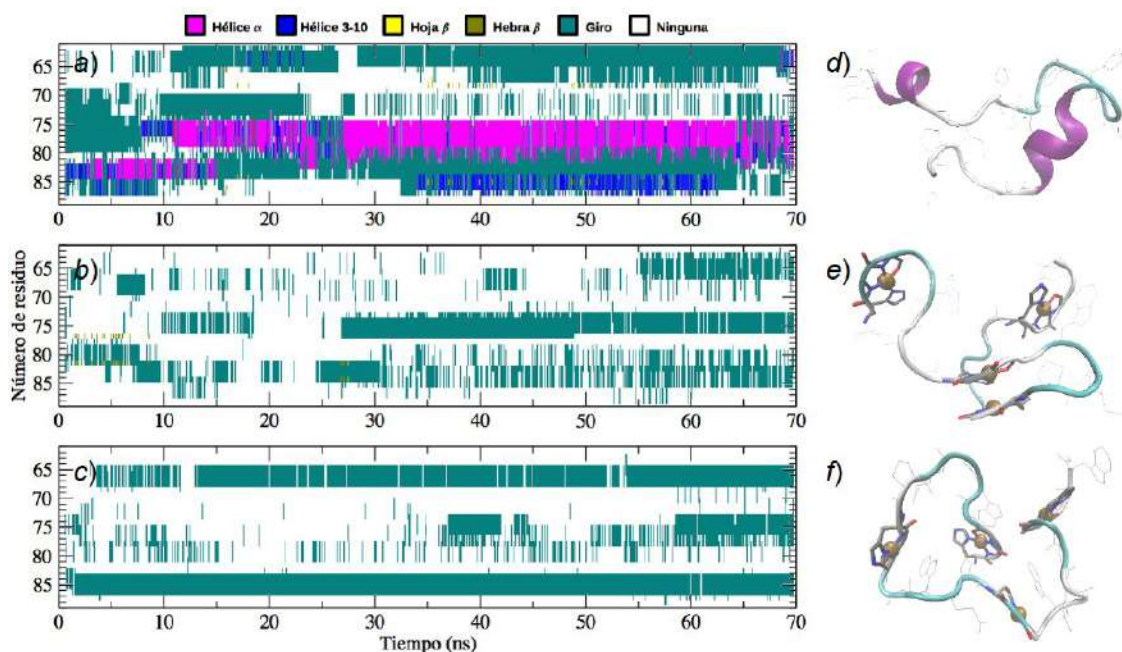


Figura 4.13. Evolución temporal de la estructura secundaria de la proteínas PrP₆₁₋₈₉, (a) y de dos simulaciones de DM del modelo $(\text{Cu}^{2+})_4\text{-PrP}_{61-89}$, (b y c). También se muestran sus respectivas estructuras finales (d, e y f).

Claramente, la estructura libre de cobre (a y d) es mucho más susceptible a formar estructuras secundarias particularmente de tipo α . Sin embargo, las hélices α formadas parecen no ser tan estables o estar en proceso de consolidación, ya que hay momentos en los que se pierde el motivo estructural α quedando como estructuras de

giro, el cual es el motivo estructural predominante. En el caso de las estructuras saturadas de cobre (*b*, *c*, *e* y *f*), el patrón de estructura secundaria respecto al tiempo es muy diferente, en estas estructuras se observan sólo motivos de *giro* con algunas fluctuaciones, pero que permiten identificar las tres bandas predominantes. Estas bandas corresponden a las secuencias que conectan a los cuatro sitios de unión a cobre, por lo que un efecto inmediato de la coordinación del metal es inhibir la formación de motivos de estructura secundaria α . Como se puede apreciar en la Figura 4.14, una característica de las estructuras saturadas con cobre es que los anillos formados en el plano ecuatorial tienden a apilarse con otros planos de los otros sitios de unión a cobre así como con otros anillos provenientes de los residuos prolina y triptofano.

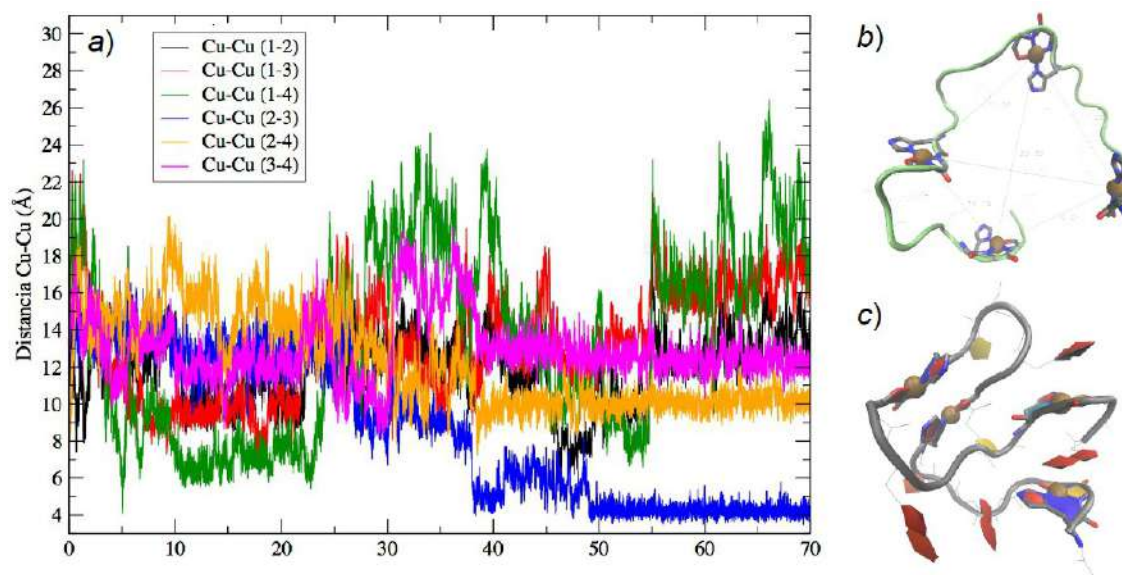


Figura 4.14. Interacción entre los cuatro sitios de unión al Cu^{2+} en el fragmento octarepeat de la proteína prion. a) Distancias entre los centros metálicos respecto al tiempo. b) Una de las estructuras iniciales "extendidas". c) Estructura final que resalta la interacción de los diferentes tipos de anillos en el péptido.

En esta figura se observa que las secuencias con estructura de giro permiten que los anillos formados en el plano ecuatorial de cada ion metálico se acerquen unos a otros y se apilen en diferentes patrones de interacción "cara a cara", formando finalmente una estructura compacta y globular. La gráfica en la Figura 4.14 a) muestra que la interacción puede ser tal que los átomos de cobre de dos sitios de unión pueden llegar a acercarse a ~ 4 Å de distancia, que corresponde a un apilamiento cara a cara de los dos sitios de unión intermedios (Figura 4.14 c). Esta forma de interacción es congruente con estudios previos en los que se postula la posibilidad de un apilamiento múltiple involucrando los cuatro sitios de unión al Cu^{2+} en este péptido.¹⁸² La distancia mínima observada entre los centros metálicos también es una característica esperada a partir de estudios espectroscópicos.⁷⁷ La conformación de la cadena lateral de los residuos Trp en este fragmento también forma un patrón de interacción característico respecto a los anillos del plano ecuatorial del metal. A diferencia de lo que se puede observar en la estructura Cu^{2+} -HGGGW,¹⁹⁴ en el dominio *octarepeat* completo se observa una mayor

diversidad en los patrones de interacción entre estas especies. De esta manera el grupo indol de los residuos de triptofano puede interactuar en el sitio de unión a Cu^{2+} inmediato o puede interactuar con otros sitios más distantes, y puede intercalarse entre dos anillos (ver Figura 4.14 c). De hecho, durante las simulaciones se pueden observar que las fluctuaciones estructurales parecen ser producidas por reacomodos en los patrones de interacción de los anillos.

4.6.2. Estudio del efecto de la coordinación del cobre a la proteína prion completa

Además de los modelos de coordinación del cobre al dominio *octarepeat* de la PrP, descritos en la sección anterior, se generaron diversos modelos de complejos de cobre con la proteína prion completa (23-230), los cuales se compararían con las estructuras libres de cobre para analizar el efecto de tal coordinación (Figura 4.15). Sin embargo, dada la dificultad metodológica al tratar con estructuras con dominios intrínsecamente desordenados tan grandes (~100 residuos), se consideró que tal estudio es aún demasiado preliminar para poder obtener conclusiones confiables. Por lo que se decidió no incluir este análisis en el presente trabajo. Cabe mencionar que el conjunto de parámetros generado puede ser utilizado en varios tipos de cálculos y experimentos computacionales que involucren la coordinación de Cu^{2+} a estructuras peptídicas en donde participen amidas peptídicas desprotonadas como ligantes. Estos complejos son observados, por ejemplo, en la componente II del complejo de cobre con la proteína β amiloide,^{123,125} o en el complejo con el motivo ATCUN de la proteína albúmina sérica humana.^{163,164} Por lo que el análisis planteado sobre la coordinación del cobre a la proteína prion completa es solo una de las posibles aplicaciones inmediatas de los resultados obtenidos.

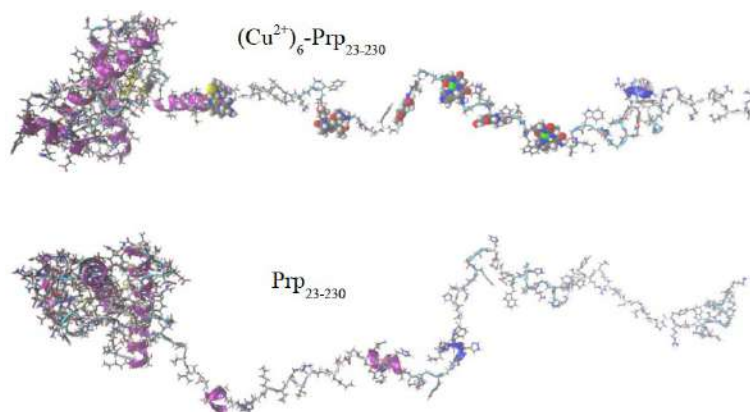


Figura 4.15. Estructura del modelo de PrP_{23-230} libre y saturado de cobre después de 50 ns de simulación de DM.

4.7. Conclusiones

En el presente capítulo se desarrolló una metodología que permite, de manera confiable y robusta, modelar en simulaciones de dinámica molecular varios modos de coordinación entre el Cu^{2+} y el dominio no estructurado de la proteína prion. Dado que los modos de coordinación seleccionados son compatibles con el estado de alta

ocupación de cobre, en el que cada uno de los seis sitios de unión están ocupados por un ion metálico, existe mayor certeza en cuanto al modo de coordinación del metal.

Los parámetros de unión covalente calculados probaron ser compatibles con los parámetros de los campos de fuerzas de CHARMM y Amber, y se observó que la metodología de optimización de la estructura electrónica puede refinarse para generar parámetros más compatibles con uno u otros campos de fuerzas. Se demostró que un conjunto reducido de parámetros para enlaces, ángulos de enlaces y ángulos impropios es suficiente para reproducir, en un cálculo de mecánica molecular, la estructura optimizada mediante los cálculos de estructura electrónica. Para esto se planteó una metodología en la que, con pocos puntos de muestreo de las curvas de energía potencial del complejo, se obtienen parámetros precisos y sensibles a las particularidades estructurales alrededor del centro metálico. Se propuso además un método simple para escalar las cargas atómicas obtenidos de un análisis de población y hacerlas equiparables con las cargas del campo de fuerzas de CHARMM.

Los parámetros generados se probaron en complejos Cu^{2+} -HGGGW del dominio *octarepeat* de la proteína prion, en donde también se llevó a cabo un análisis conformacional detallado del péptido libre de cobre. En este análisis se encontró que una característica de este péptido es la presencia varias estructuras estables (alrededor de 6) predominantes en intervalos pequeños de energía, las cuales muestran parámetros estructurales muy similares, pero difieren en el plegamiento global de la cadena peptídica, sugiriendo barreras de energía de reorganización bajas. La coordinación del cobre a este pentapéptido cambia completamente las propiedades estructurales, ya que el centro metálico se mantiene como una estructura plana y rígida con flexibilidad solo en las cadenas laterales de los residuos vecinos.

En acuerdo con estudios previos, la estructura del dominio *octarepeat* completo (60-91) presenta también características estructurales muy distintas cuando se encuentra libre o saturado de cobre. En el primer caso se tiene una estructura que promueve la formación de hélices α en solución, mientras que, al coordinar los cuatro átomos de cobre, se pierde cualquier rastro de estructura α ; en su lugar se observan regiones con motivos de *giro* entre los sitios de unión al metal. Estas regiones son muy flexibles y promueven la formación de apilamientos de los centros metálicos, formando interacciones estrechas con otros los sitios de unión (vecinos o distantes), y con otras estructuras rígidas, como el grupo indol de los residuos de triptofano y los anillos en los residuos de prolina. Los apilamientos de estos grupos forman diferentes patrones y estructuras que se observan en competencia dinámica para formar estructuras más globulares y definidas. Los parámetros generados describen modos de coordinación entre el Cu^{2+} y la PrP que también se pueden encontrar en complejos entre cobre y otras proteínas, por lo que los resultados derivados de este trabajo son fácilmente transferibles y aplicables en otras situaciones de coordinación en proteínas distintas a la PrP.

Conclusiones Generales

En este trabajo, desglosado en cuatro capítulos, se estudiaron con detalle atómico diversas especies derivadas de dos de las proteínas más relevantes para diversas enfermedades neurodegenerativas, la proteína β amiloide ($A\beta$) y la proteína prion (PrP), las cuales tienen una participación clave en la enfermedad de Alzheimer. En el primer capítulo se revisaron varios antecedentes históricos en la investigación científica encaminada a entender las bases moleculares de ésta y otras enfermedades neurodegenerativas, y se plantearon algunas motivaciones que dieron origen al presente trabajo. En particular se enfatiza la dificultad para estudiar este tipo de proteínas mediante métodos experimentales, por lo que el uso de los métodos teóricos aplicados en el presente trabajo, que son más económicos y amigables con el medio ambiente, se justifica también por motivos metodológicos. Esto sin mencionar el impacto que la enfermedad de Alzheimer (y otras enfermedades que producen demencia en el ser humano), tiene a nivel macroeconómico hoy en día. La necesidad de una mejor comprensión a nivel molecular de las proteínas y de los procesos moleculares involucrados en estos padecimientos hace particularmente valiosos a los estudios que aportan una visión molecular de estos procesos, como es el caso del presente trabajo.

Uno de los ejes sobre los que se planteó esta tesis, es el estudio de la interacción de cobre (y otros metales de transición) con las proteínas $A\beta$ y PrP, que es una característica importante para la enfermedad de Alzheimer. Además se planteó una metodología que permitiera el análisis de propiedades que afectan la agregación de estas proteínas, lo cual tiene también implicaciones en la formación de estructura fibrilares amiloides, también característica en estas enfermedades. El capítulo 2 tuvo como objetivo el estudio de estas dos propiedades. En éste se generaron modelos atómicos de fibras amiloides que permitieron analizar detalles estructurales que difícilmente se podrían observar mediante metodologías experimentales. Una de las observaciones más relevantes fue el efecto en la estructura del dominio terminal de estas especies de los iones presentes en el medio acuoso. Se encontró que tanto la naturaleza como la concentración de los iones pueden inducir cambios en el plegamiento de dicho dominio, lo cual plantea consecuencias en la formación de estructuras secundarias, en la agregación y en la coordinación de metales de transición en esta región de las fibras amiloides. La construcción de modelos enriquecidos de estructuras de hojas β en el dominio N-terminal reveló que la secuencia de aminoácidos de la proteína $A\beta_{42}$ y su conformación particular en las fibras es capaz de generar una interacción regioselectiva de los cationes en el medio, lo cual podría explicar la altas concentraciones de metales de transición encontradas en las fibras amiloides formadas en el cerebro de las personas que padecen la enfermedad Alzheimer.

La coordinación del cobre al extremo N-terminal de la proteína $A\beta$ fue el sujeto de estudio en el capítulo 3, en el que se buscó utilizar modelos estructurales de esta proteína que fueran compatibles con la estructura adoptada en las fibras amiloides. La construcción de estos complejos permitió una comparación directa con las diversas

propuestas experimentales de elucidación estructural, así como con las mediciones espectroscópicas en las que se basan. El examen detallado de estas comparaciones permitió aclarar algunas controversias, planteadas en la literatura, relacionadas a la identidad de los ligantes en la proteína A β que participan en la coordinación al Cu²⁺. Además, se explicó de manera cuantitativa la participación de diferentes ligantes en la estabilidad de los complejos, lo que permitió proponer la contribución de diferentes especies del complejo a diferentes observaciones experimentales que antes solo se atribuían a una sola especie predominante. Esta propuesta resultó congruente con varios parámetros espectroscópicos y con la naturaleza intrínsecamente desordenada de esta proteína. Otra de las propuestas derivadas de los modelos estructurales del complejo Cu²⁺-A β ₁₇, es que varias especies que intercambian el ligante basado en oxígeno podrían estar en un equilibrio dinámico rápido en comparación con el posible intercambio de ligantes basados en nitrógeno propuesto en la literatura, por ejemplo, el intercambio entre la His13 y la His14. La energética de los modelos indica que este intercambio estaría impedido en las fibras amiloides. La consideración de varias especies presentes en solución del complejo entre el cobre y la proteína β amiloide tiene implicaciones en las propiedades redox de los complejos, así como en sus propiedades de agregación, y, por lo tanto, puede ser relevante en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer.

Al igual que la coordinación de metales de transición a la proteína β amiloide es relevante en la enfermedad de Alzheimer, la coordinación del cobre a la proteína prion también es relevante en varias enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, como se planteó a lo largo de esta tesis, algunas dificultades metodológicas limitan su estudio. Esta fue la principal motivación del trabajo descrito en el capítulo 4, en donde se planteó la generación de parámetros estructurales que permiten el estudio de estos sistemas en simulaciones de dinámica molecular clásica. En este capítulo se describió un paso previo y necesario al estudio de las consecuencias de la coordinación del Cu²⁺ a la PrP. El conjunto mínimo de parámetros obtenido se validó y probó en una serie de simulaciones (en el dominio *octarepeat* de la proteína PrP coordinado a cuatro átomos de cobre), que permitió evaluar la sensibilidad estructural de los modelos a la coordinación planteada. De esta manera, se establecieron bases (metodológicas) para el estudio en la coordinación del cobre a modelos de la proteína prion completa, o a especies agregadas que coordinen a este metal utilizando simulaciones de dinámica molecular.

Las diferentes aproximaciones empleadas para cada sistema estudiado en esta tesis llevan al límite las capacidades computacionales y metodológicas disponibles en la actualidad. No obstante, esta estrategia probó ser redituable, ya que permitió la descripción a nivel atomístico y en algunos casos a nivel electrónico de los complejos sistemas y procesos planteados. Algunas de las simulaciones descritas en este trabajo, se encuentran probablemente entre las más grandes y complejas realizadas a la fecha en estos sistemas. Los modelos, parámetros y conclusiones derivadas de este trabajo pueden y serán utilizadas como una base robusta en trabajos futuros dirigidos a entender y combatir el origen de las enfermedades neurodegenerativas.

Referencias

1. World Health Organization, *Dementia: A public health priority*, **2012**.
2. Goedert, M.; Spillantini, M. G., A century of Alzheimer's disease. *Science* **2006**, *314* (5800), 777-781.
3. Alzheimer, A.; Stelzmann, R. A.; Schnitzlein, H. N.; Murtagh F. R., An English Translation of Alzheimer's 1907 Paper, "Über eine eigenartige Erkränkung der Hirnrinde" *Clin. Anat.* **1995**, *8*, 429-431.
4. Reiniger, L.; Lukic, A.; Linehan, J.; Rudge, P.; Collinge, J.; Mead, S.; Brandner, S., Tau, prions and A beta: The triad of neurodegeneration. *Acta Neuropathol.* **2011**, *121* (1), 5-20.
5. Lin, C.-J.; Huang, H.-C.; Jiang, Z.-F., Cu(II) interaction with amyloid-beta peptide: A review of neuroactive mechanisms in AD brains. *Brain Res. Bull.* **2010**, *82* (5-6), 235-242.
6. Kozłowski, H.; Luczkowski, M.; Remelli, M.; Valensin, D., Copper, zinc and iron in neurodegenerative diseases (Alzheimer's, Parkinson's and prion diseases). *Coord. Chem. Rev.* **2012**, *256* (19-20), 2129-2141.
7. Viles, J. H., Metal ions and amyloid fiber formation in neurodegenerative diseases. Copper, zinc and iron in Alzheimer's, Parkinson's and prion diseases. *Coord. Chem. Rev.* **2012**, *256* (19-20), 2271-2284.
8. Faller, P.; Hureau, C.; La Penna, G., Metal Ions and Intrinsically Disordered Proteins and Peptides: From Cu/Zn Amyloid-beta to General Principles. *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47* (8), 2252-2259.
9. Hardy, J. A.; Higgins, G. A., Alzheimer's Disease: The amyloid cascade hypothesis. *Science* **1992**, *256* (5054), 184-185.
10. Gunther, E. C.; Strittmatter, S. M., Beta-amyloid oligomers and cellular prion protein in Alzheimer's disease. *J. Mol. Med.* **2010**, *88* (4), 331-338.
11. Suh, Y. H.; Checler, F., Amyloid precursor protein, presenilins, and alpha-synuclein: Molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease. *Pharmacol. Rev.* **2002**, *54* (3), 469-525.
12. Nunomura, A.; Perry, G.; Aliev, G.; Hirai, K.; Takeda, A.; Balraj, E. K.; Jones, P. K.; Ghanbari, H.; Wataya, T.; Shimohama, S.; Chiba, S.; Atwood, C. S.; Petersen, R. B.; Smith, M. A., Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2001**, *60* (8), 759-767.
13. Bush, A. I., The metallobiology of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* **2003**, *26* (4), 207-214.
14. Jakob-Roetne, R.; Jacobsen, H., Alzheimer's Disease: From Pathology to Therapeutic Approaches. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48* (17), 3030-3059.
15. Masters, C. L.; Simms, G.; Weinman, N. A.; Multhaup, G.; McDonald, B. L.; Beyreuther, K., Amyloid plaque core protein in alzheimer-disease and down syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82* (12), 4245-4249.
16. Barrow, C. J.; Zagorski, M. G., Solution structures of beta peptide and its constituent fragments - Relation to amyloid deposition. *Science* **1991**, *253* (5016), 179-182.
17. Coles, M.; Bicknell, W.; Watson, A. A.; Fairlie, D. P.; Craik, D. J., Solution structure of amyloid beta-peptide(1-40) in a water-micelle environment. Is the membrane-spanning domain where we think it is? *Biochemistry* **1998**, *37* (31), 11064-11077.
18. Sticht, H.; Bayer, P.; Willbold, D.; Dames, S.; Hilbich, C.; Beyreuther, K.; Frank, R. W.; Rosch, P., Structure of amyloid A4-(1-40)-peptide of Alzheimers-disease. *Eur. J. Biochem.* **1995**, *233* (1), 293-298.
19. Faendrich, M.; Schmidt, M.; Grigorieff, N., Recent progress in understanding Alzheimer's beta-amyloid structures. *Trends Biochem. Sci.* **2011**, *36* (6), 338-345.
20. Quist, A.; Doudevski, L.; Lin, H.; Azimova, R.; Ng, D.; Frangione, B.; Kagan, B.; Ghiso, J.; Lal, R., Amyloid ion channels: A common structural link for protein-misfolding disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102* (30), 10427-10432.
21. Jang, H. B.; Zheng, J.; Lal, R.; Nussinov, R., New structures help the modeling of toxic amyloid beta ion channels. *Trends Biochem. Sci.* **2008**, *33* (2), 91-100.
22. Tomaselli, S.; Esposito, V.; Vangone, P.; van Nuland, N. A. J.; Bonvin, A.; Guerrini, R.; Tancredi, T.; Temussi, P. A.; Picone, D., The alpha-to-beta conformational transition of Alzheimer's A beta-(1-42) peptide in aqueous media is reversible: A step by step conformational analysis suggests the location of beta conformation seeding. *ChemBiochem* **2006**, *7* (2), 257-267.

23. Gerben, S.R.; Lemkul, J. A.; Brown, A. M.; Bevan, D. R. Comparing atomistic molecular mechanics force fields for a difficult target: a case study on the Alzheimer's amyloid β -peptide. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2013**, 1-13. DOI: 10.1080/07391102.2013.838518.
24. Goldsbury, C. S.; Wirtz, S.; Muller, S. A.; Sunderji, S.; Wicki, P.; Aebi, U.; Frey, P., Studies on the in vitro assembly of A beta 1-40: Implications for the search for A beta fibril formation inhibitors. *J. Struct. Biol.* **2000**, *130* (2-3), 217-231.
25. Jang, H.; Arce, F. T.; Capone, R.; Ramachandran, S.; Lal, R.; Nussinov, R., Misfolded Amyloid Ion Channels Present Mobile beta-Sheet Subunits in Contrast to Conventional Ion Channels. *Biophys. J.* **2009**, *97* (11), 3029-3037.
26. Jang, H.; Arce, F. T.; Ramachandran, S.; Capone, R.; Azimova, R.; Kagan, B. L.; Nussinov, R.; Lal, R., Truncated beta-amyloid peptide channels provide an alternative mechanism for Alzheimer's Disease and Down syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107* (14), 6538-6543.
27. Jang, H.; Arce, F. T.; Ramachandran, S.; Capone, R.; Lal, R.; Nussinov, R., beta-Barrel Topology of Alzheimer's beta-Amyloid Ion Channels. *J. Mol. Biol.* **2010**, *404* (5), 917-934.
28. Lorenzo, A.; Yankner, B. A., Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91* (25), 12243-12247.
29. Simmons, L. K.; May, P. C.; Tomaselli, K. J.; Rydel, R. E.; Fuson, K. S.; Brigham, E. F.; Wright, S.; Lieberburg, I.; Becker, G. W.; Brems, D. N.; Li, W. Y., Secondary structure of amyloid beta-peptide correlates with neurotoxic activity in-vitro. *Mol. Pharmacol.* **1994**, *45* (3), 373-379.
30. Straub, J. E.; Thirumalai, D., Principles governing oligomer formation in amyloidogenic peptides. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2010**, *20* (2), 187-195.
31. Tarus, B.; Straub, J. E.; Thirumalai, D., Dynamics of Asp23-Lys28 salt-bridge formation in A beta(10-35) monomers. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (50), 16159-16168.
32. Reddy, G.; Straub, J. E.; Thirumalai, D., Influence of Preformed Asp23-Lys28 Salt Bridge on the Conformational Fluctuations of Monomers and Dimers of A beta Peptides with Implications for Rates of Fibril Formation. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113* (4), 1162-1172.
33. Sunde, M.; Blake, C., The structure of amyloid fibrils by electron microscopy and X-ray diffraction. *Adv. Protein Chem.* **1997**, *50*, 123-159.
34. Petkova, A. T.; Ishii, Y.; Balbach, J. J.; Antzutkin, O. N.; Leapman, R. D.; Delaglio, F.; Tycko, R., A structural model for Alzheimer's beta-amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99* (26), 16742-16747.
35. Petkova, A. T.; Leapman, R. D.; Guo, Z. H.; Yau, W. M.; Mattson, M. P.; Tycko, R., Self-propagating, molecular-level polymorphism in Alzheimer's beta-amyloid fibrils. *Science* **2005**, *307* (5707), 262-265.
36. Luhrs, T.; Ritter, C.; Adrian, M.; Riek-Loher, D.; Bohrmann, B.; Doeli, H.; Schubert, D.; Riek, R., 3D structure of Alzheimer's amyloid-beta(1-42) fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102* (48), 17342-17347.
37. Petkova, A. T.; Yau, W. M.; Tycko, R., Experimental constraints on quaternary structure in Alzheimer's beta-amyloid fibrils. *Biochemistry* **2006**, *45* (2), 498-512.
38. Tycko, R., Solid-State NMR Studies of Amyloid Fibril Structure. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2011**, *62*, 279-299.
39. Eanes, E. D.; Glenner, G. G., X-ray diffraction studies on amyloid filaments. *J. Histochem. Cytochem.* **1968**, *16* (11), 673-677.
40. Sunde, M.; Serpell, L. C.; Bartlam, M.; Fraser, P. E.; Pepys, M. B.; Blake, C. C. F., Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction. *J. Mol. Biol.* **1997**, *273* (3), 729-739.
41. Makin, O. S.; Serpell, L. C., Structures for amyloid fibrils. *FEBS J.* **2005**, *272* (23), 5950-5961.
42. Fandrich, M., On the structural definition of amyloid fibrils and other polypeptide aggregates. *Cell. Mol. Life Sci.* **2007**, *64* (16), 2066-2078.
43. Esposito, L.; Pedone, C.; Vitagliano, L., Molecular dynamics analyses of cross-beta-spine steric zipper models: beta-sheet twisting and aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103* (31), 11533-11538.
44. Nelson, R.; Sawaya, M. R.; Balbirnie, M.; Madsen, A. O.; Riek, C.; Grothe, R.; Eisenberg, D., Structure of the cross-beta spine of amyloid-like fibrils. *Nature* **2005**, *435* (7043), 773-778.

45. Sawaya, M. R.; Sambashivan, S.; Nelson, R.; Ivanova, M. I.; Sievers, S. A.; Apostol, M. I.; Thompson, M. J.; Balbirnie, M.; Wiltzius, J. J. W.; McFarlane, H. T.; Madsen, A. O.; Riek, C.; Eisenberg, D., Atomic structures of amyloid cross-beta spines reveal varied steric zippers. *Nature* **2007**, *447* (7143), 453-457.
46. Egnaczyk, G. F.; Greis, K. D.; Stimson, E. R.; Maggio, J. E., Photoaffinity cross-linking of Alzheimer's disease amyloid fibrils reveals interstrand contact regions between assembled beta-amyloid peptide subunits. *Biochemistry* **2001**, *40* (39), 11706-11714.
47. Meinhardt, J.; Sachse, C.; Hortschansky, P.; Grigorieff, N.; Faendrich, M., A beta(1-40) Fibril Polymorphism Implies Diverse Interaction Patterns in Amyloid Fibrils. *J. Mol. Biol.* **2009**, *386* (3), 869-877.
48. Sinha, G., Peering inside Alzheimer's brains. *Nat. Biotechnol.* **2011**, *29* (5), 384-387.
49. Bush, A. I.; Tanzi, R. E., Therapeutics for Alzheimer's disease based on the Metal Hypothesis. *Neurotherapeutics* **2008**, *5* (3), 421-432.
50. Lauren, J.; Gimbel, D. A.; Nygaard, H. B.; Gilbert, J. W.; Strittmatter, S. M., Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. *Nature* **2009**, *457* (7233), 1128-1134.
51. Prusiner, S. B., Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95* (23), 13363-13383.
52. Encalada, S. E.; Moya, K. L.; Lehmann, S.; Zahn, R., The role of the prion protein in the molecular basis for synaptic plasticity and nervous system development. *J. Molec. Neurosci.* **2008**, *34* (1), 9-15.
53. Brown, D. R.; Besinger, A., Prion protein expression and superoxide dismutase activity. *Biochem. J.* **1998**, *334*, 423-429.
54. Pauly, P. C.; Harris, D. A., Copper stimulates endocytosis of the prion protein. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273* (50), 33107-33110.
55. Kozlowski, H.; Luczkowski, M.; Remelli, M., Prion proteins and copper ions. Biological and chemical controversies. *Dalton Trans.* **2010**, *39* (28), 6371-6385.
56. Mehrpour, M.; Codogno, P., Prion protein: From physiology to cancer biology. *Cancer Lett.* **2010**, *290* (1), 1-23.
57. Brown, D. R.; Qin, K. F.; Herms, J. W.; Madlung, A.; Manson, J.; Strome, R.; Fraser, P. E.; Kruck, T.; vonBohlen, A.; SchulzSchaeffer, W.; Giese, A.; Westaway, D.; Kretschmar, H., The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature* **1997**, *390* (6661), 684-687.
58. Vassallo, N.; Herms, J., Cellular prion protein function in copper homeostasis and redox signalling at the synapse. *J. Neurochem.* **2003**, *86* (3), 538-544.
59. Prusiner, S. B., Prion diseases and the BSE crisis. *Science* **1997**, *278* (5336), 245-251.
60. Telling, G. C.; Parchi, P.; DeArmond, S. J.; Cortelli, P.; Montagna, P.; Gabizon, R.; Mastrianni, J.; Lugaresi, E.; Gambetti, P.; Prusiner, S. B., Evidence for the conformation of the pathologic isoform of the prion protein enciphering and propagating prion diversity. *Science* **1996**, *274* (5295), 2079-2082.
61. Garcia, F. L.; Zahn, R.; Riek, R.; Wuthrich, K., NMR structure of the bovine prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97* (15), 8334-8339.
62. Zahn, R.; Liu, A. Z.; Luhrs, T.; Riek, R.; von Schroetter, C.; Garcia, F. L.; Billeter, M.; Calzolari, L.; Wider, G.; Wuthrich, K., NMR solution structure of the human prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97* (1), 145-150.
63. Wille, H.; Michelitsch, M. D.; Guenebaut, V.; Supattapone, S.; Serban, A.; Cohen, F. E.; Agard, D. A.; Prusiner, S. B., Structural studies of the scrapie prion protein by electron crystallography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99* (6), 3563-3568.
64. Hornemann, S.; Schorn, C.; Wuthrich, K., NMR structure of the bovine prion protein isolated from healthy calf brains. *EMBO Rep.* **2004**, *5* (12), 1159-1164.
65. Haire, L. F.; Whyte, S. M.; Vasisht, N.; Gill, A. C.; Verma, C.; Dodson, E. J.; Dodson, G. G.; Bayley, P. M., The crystal structure of the globular domain of sheep prion protein. *J. Mol. Biol.* **2004**, *336* (5), 1175-1183.
66. Pan, K. M.; Baldwin, M.; Nguyen, J.; Gasset, M.; Serban, A.; Groth, D.; Mehlhorn, I.; Huang, Z. W.; Fletterick, R. J.; Cohen, F. E.; Prusiner, S. B., Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90* (23), 10962-10966.

67. Cohen, F. E.; Pan, K. M.; Huang, Z.; Baldwin, M.; Fletterick, R. J.; Prusiner, S. B., Structural clues to prion replication. *Science* **1994**, *264* (5158), 530-531.
68. Millhauser, G. L., Copper binding in the prion protein. *Acc. Chem. Res.* **2004**, *37* (2), 79-85.
69. Millhauser, G. L., Copper and the prion protein: Methods, structures, function, and disease. *Ann. Rev. Phys. Chem.* **2007**, *58*, 299-320.
70. Arena, G.; La Mendola, D.; Pappalardo, G.; Sovago, I.; Rizzarelli, E., Interactions of Cu²⁺ with prion family peptide fragments: Considerations on affinity, speciation and coordination. *Coord. Chem. Rev.* **2012**, *256* (19-20), 2202-2218.
71. Quintanar, L.; Rivillas-Acevedo, L.; Grande-Aztatzi, R.; Gomez-Castro, C. Z.; Arcos-Lopez, T.; Vela, A., Copper coordination to the prion protein: Insights from theoretical studies. *Coord. Chem. Rev.* **2013**, *257* (2), 429-444.
72. Jackson, G. S.; Murray, I.; Hosszu, L. L. P.; Gibbs, N.; Waltho, J. P.; Clarke, A. R.; Collinge, J., Location and properties of metal-binding sites on the human prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98* (15), 8531-8535.
73. Singh, N.; Das, D.; Singh, A.; Mohan, M. L., Prion Protein and Metal Interaction: Physiological and Pathological Implications. *Curr. Issues Mol. Biol.* **2010**, *12*, 99-107.
74. Migliorini, C.; Porciatti, E.; Luczkowski, M.; Valensin, D., Structural characterization of Cu²⁺, Ni²⁺ and Zn²⁺ binding sites of model peptides associated with neurodegenerative diseases. *Coord. Chem. Rev.* **2012**, *256* (1-2), 352-368.
75. Thompsett, A. R.; Abdelraheim, S. R.; Daniels, M.; Brown, D. R., High affinity binding between copper and full-length prion protein identified by two different techniques. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (52), 42750-42758.
76. Burns, C. S.; Aronoff-Spencer, E.; Legname, G.; Prusiner, S. B.; Antholine, W. E.; Gerfen, G. J.; Peisach, J.; Millhauser, G. L., Copper coordination in the full-length, recombinant prion protein. *Biochemistry* **2003**, *42* (22), 6794-6803.
77. Chattopadhyay, M.; Walter, E. D.; Newell, D. J.; Jackson, P. J.; Aronoff-Spencer, E.; Peisach, J.; Gerfen, G. J.; Bennett, B.; Antholine, W. E.; Millhauser, G. L., The octarepeat domain of the prion protein binds Cu(II) with three distinct coordination modes at pH 7.4. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (36), 12647-12656.
78. Ma, B. Y.; Nussinov, R., Simulations as analytical tools to understand protein aggregation and predict amyloid conformation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10* (5), 445-452.
79. Paravastu, A. K.; Leapman, R. D.; Yau, W. M.; Tycko, R., Molecular structural basis for polymorphism in Alzheimer's beta-amyloid fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105* (47), 18349-18354.
80. RCSB Protein Data Bank. <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>.
81. Li, L. P.; Darden, T. A.; Bartolotti, L.; Kominos, D.; Pedersen, L. G., An atomic model for the pleated beta-sheet structure of A beta amyloid protofilaments. *Biophys. J.* **1999**, *76* (6), 2871-2878.
82. Antzutkin, O. N.; Leapman, R. D.; Balbach, J. J.; Tycko, R., Supramolecular structural constraints on Alzheimer's beta-amyloid fibrils from electron microscopy and solid-state nuclear magnetic resonance. *Biochemistry* **2002**, *41* (51), 15436-15450.
83. RCSB Protein Data Bank. 3D Structure of Alzheimer's A beta(1-42) fibrils. <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2BEG>.
84. Uniprot Knowledgebase. Amyloid beta A4 protein (A4_HUMAN). <http://www.uniprot.org/uniprot/P05067>.
85. Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K., VMD: Visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* **1996**, *14* (1), 33-38.
86. Kale, L.; Skeel, R.; Bhandarkar, M.; Brunner, R.; Gursoy, A.; Krawetz, N.; Phillips, J.; Shinozaki, A.; Varadarajan, K.; Schulten, K., NAMD2: Greater scalability for parallel molecular dynamics. *J. Comput. Phys.* **1999**, *151* (1), 283-312.
87. Phillips, J. C.; Braun, R.; Wang, W.; Gumbart, J.; Tajkhorshid, E.; Villa, E.; Chipot, C.; Skeel, R. D.; Kale, L.; Schulten, K., Scalable molecular dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.* **2005**, *26* (16), 1781-1802.
88. MacKerell, A. D.; Jr.; Bashford, D.; Bellott, M.; Dunbrack, R. L., Jr.; Evanseck, J.; Field, M. J.; Fischer, S.; Gao, J.; Guo, H.; Ha, S.; Joseph, D.; Kuchnir, L.; Kuczera, K.; Lau, F. T. K.; Mattos, C.; Michnick, S.; Ngo, T.; Nguyen, D. T.; Prodhom, B.; Reiher, I. W. E.; Roux, B.; Schlenkrich, M.; Smith, J.; Stote, R.; Straub, J.; Watanabe, M.; Wiorkiewicz-Kuczera, J.; Yin, D.; Karplus M., All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 3586-3616.

89. Darden, T.; York, D.; Pedersen, L., Particle mesh ewald - an $n \cdot \log(n)$ method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98* (12), 10089-10092.
90. Batcho, P. F.; Case, D. A.; Schlick, T., Optimized particle-mesh Ewald/multiple-time step integration for molecular dynamics simulations. *J. Chem. Phys.* **2001**, *115*, 4003-4018.
91. Ryckaert, J. P.; Ciccotti, G.; Berendsen, H. J. C., Numerical-integration of cartesian equations of motion of a system with constraints: Molecular-dynamics of n-alkanes. *J. Comput. Phys.* **1977**, *23* (3), 327-341.
92. Martyna, G. J.; Tobias, D. J.; Klein, M. L., Constant-pressure molecular-dynamics algorithms. *J. Chem. Phys.* **1994**, *101* (5), 4177-4189.
93. Feller, S. E.; Zhang, Y. H.; Pastor, R. W.; Brooks, B. R., Constant-pressure molecular-dynamics simulation - the langevin piston method. *J. Chem. Phys.* **1995**, *103* (11), 4613-4621.
94. Frishman, D.; Argos, P., Knowledge-based protein secondary structure assignment. *Proteins* **1995**, *23* (4), 566-579.
95. Mackerell, A. D.; Feig, M.; Brooks, C. L., Extending the treatment of backbone energetics in protein force fields: Limitations of gas-phase quantum mechanics in reproducing protein conformational distributions in molecular dynamics simulations. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25* (11), 1400-1415.
96. Olofsson, A.; Lindhagen-Persson, M.; Vestling, M.; Sauer-Eriksson, A. E.; Ohman, A., Quenched hydrogen/deuterium exchange NMR characterization of amyloid-beta peptide aggregates formed in the presence of Cu^{2+} or Zn^{2+} . *Febs J.* **2009**, *276* (15), 4051-4060.
97. Khetarpal, I.; Chen, M.; Cook, K. D.; Wetzel, R., Structural differences in A beta amyloid protofibrils and fibrils mapped by hydrogen exchange - Mass spectrometry with on-line proteolytic fragmentation. *J. Mol. Biol.* **2006**, *361* (4), 785-795.
98. Olofsson, A.; Sauer-Eriksson, A. E.; Ohman, A., The solvent protection of Alzheimer amyloid-beta-(1-42) fibrils as determined by solution NMR spectroscopy. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (1), 477-483.
99. Olofsson, A.; Lindhagen-Persson, M.; Sauer-Eriksson, A. E.; Ohman, A., Amide solvent protection analysis demonstrates that amyloid-beta(1-40) and amyloid-beta(1-42) form different fibrillar structures under identical conditions. *Biochem. J.* **2007**, *404*, 63-70.
100. Torok, M.; Milton, S.; Kaye, R.; Wu, P.; McIntire, T.; Glabe, C. G.; Langen, R., Structural and dynamic features of Alzheimer's A beta peptide in amyloid fibrils studied by site-directed spin labeling. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (43), 40810-40815.
101. Morimoto, A.; Irie, K.; Murakami, K.; Masuda, Y.; Ohigashi, H.; Nagao, M.; Fukuda, H.; Shimizu, T.; Shirasawa, T., Analysis of the secondary structure of beta-amyloid (A beta 42) fibrils by systematic proline replacement. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279* (50), 52781-52788.
102. Buchete, N. V.; Tycko, R.; Hummer, G., Molecular dynamics simulations of Alzheimer's beta-amyloid protofilaments. *J. Mol. Biol.* **2005**, *353* (4), 804-821.
103. Thirumalai, D.; Reddy, G.; Straub, J. E., Role of Water in Protein Aggregation and Amyloid Polymorphism. *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45* (1), 83-92.
104. Kim, Y. S.; Liu, L.; Axelsen, P. H.; Hochstrasser, R. M., 2D IR provides evidence for mobile water molecules in beta-amyloid fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106* (42), 17751-17756.
105. Buchete, N. V.; Hummer, G., Structure and dynamics of parallel beta-sheets, hydrophobic core, and loops in Alzheimer's A beta fibrils. *Biophys. J.* **2007**, *92* (9), 3032-3039.
106. Parthasarathy, S.; Long, F.; Miller, Y.; Xiao, Y. L.; McElheny, D.; Thurber, K.; Ma, B. Y.; Nussinov, R.; Ishii, Y., Molecular-Level Examination of Cu^{2+} Binding Structure for Amyloid Fibrils of 40-Residue Alzheimer's beta by Solid-State NMR Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (10), 3390-3400.
107. Gunderson, W. A.; Hernandez-Guzman, J.; Karr, J. W.; Sun, L.; Szalai, V. A.; Warncke, K., Local Structure and Global Patterning of Cu^{2+} Binding in Fibrillar Amyloid-beta A beta(1-40) Protein. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (44), 18330-18337.
108. 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. *J. Neurol. Sci.* **1998**, *158* (1), 47-52.

109. Miller, L. M.; Wang, Q.; Telivala, T. P.; Smith, R. J.; Lanzirotti, A.; Miklossy, J., Synchrotron-based infrared and X-ray imaging shows focalized accumulation of Cu and Zn co-localized with beta-amyloid deposits in Alzheimer's disease. *J. Struct. Biol.* **2006**, *155* (1), 30-37.
110. Faller, P.; Hureau, C., Bioinorganic chemistry of copper and zinc ions coordinated to amyloid-beta peptide. *Dalton Trans.* **2009**, (7), 1080-1094.
111. Tougu, V.; Tiiman, A.; Palumaa, P., Interactions of Zn(II) and Cu(II) ions with Alzheimer's amyloid-beta peptide. Metal ion binding, contribution to fibrillization and toxicity. *Metallomics* **2011**, *3* (3), 250-261.
112. Hureau, C., Coordination of redox active metal ions to the amyloid precursor protein and to amyloid-beta peptides involved in Alzheimer disease. Part 1: An overview. *Coord. Chem. Rev.* **2012**, *256* (19-20), 2164-2174.
113. Curtain, C. C.; Ali, F.; Volitakis, I.; Cherny, R. A.; Norton, R. S.; Beyreuther, K.; Barrow, C. J.; Masters, C. L.; Bush, A. I.; Barnham, K. J., Alzheimer's disease amyloid-beta binds copper and zinc to generate an allosterically ordered membrane-penetrating structure containing superoxide dismutase-like subunits. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (23), 20466-20473.
114. Miura, T.; Suzuki, K.; Kohata, N.; Takeuchi, H., Metal binding modes of Alzheimer's amyloid beta-peptide in insoluble aggregates and soluble complexes. *Biochemistry* **2000**, *39* (23), 7024-7031.
115. Syme, C. D.; Nadal, R. C.; Rigby, S. E. J.; Viles, J. H., Copper binding to the amyloid-beta (A beta) peptide associated with Alzheimer's disease - Folding, coordination geometry, pH dependence, stoichiometry, and affinity of A beta-(1-28): Insights from a range of complementary spectroscopic techniques. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279* (18), 18169-18177.
116. Karr, J. W.; Akintoye, H.; Kaupp, L. J.; Szalai, V. A. N-terminal deletions modify the Cu²⁺ binding site in amyloid-beta. *Biochemistry* **2005**, *44*, 5478-5487.
117. Alies, B.; Eury, H.; Bijani, C.; Rechignat, L.; Faller, P.; Hureau, C., pH-Dependent Cu(II) Coordination to Amyloid-beta Peptide: Impact of Sequence Alterations, Including the H6R and D7N Familial Mutations. *Inorg. Chem.* **2011**, *50* (21), 11192-11201.
118. Karr, J. W.; Szalai, V. A., Role of aspartate-1 in Cu(II) binding to the amyloid-beta peptide of Alzheimer's disease. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (13), 3796-3797.
119. Drew, S. C.; Noble, C. J.; Masters, C. L.; Hanson, G. R.; Barnham, K. J., Pleomorphic Copper Coordination by Alzheimer's Disease Amyloid-beta Peptide. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (3), 1195-1207.
120. Drew, S. C.; Barnham, K. J., The heterogeneous nature of Cu²⁺ interactions with Alzheimer's amyloid-β peptide. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44* (11), 1146-1155.
121. Shin, B.-k.; Saxena, S., Substantial Contribution of the Two Imidazole Rings of the His13-His14 Dyad to Cu(II) Binding in Amyloid-beta(1-16) at Physiological pH and Its Significance. *J. Phys. Chem. A* **2011**, *115* (34), 9590-9602.
122. Drew, S. C.; Masters, C. L.; Barnham, K. J., Alanine-2 Carbonyl is an Oxygen Ligand in Cu²⁺ Coordination of Alzheimer's Disease Amyloid-beta Peptide - Relevance to N-Terminally Truncated Forms. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (25), 8760-8761.
123. Dorlet, P.; Gambarelli, S.; Faller, P.; Hureau, C. Pulse EPR Spectroscopy Reveals the Coordination Sphere of Copper(II) Ions in the 1-16 Amyloid-beta Peptide: A Key Role of the First Two N-Terminus Residues. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 9273-9276.
124. El Khoury, Y.; Dorlet, P.; Faller, P.; Hellwig, P., New Insights into the Coordination of Cu(II) by the Amyloid-B 16 Peptide from Fourier Transform IR Spectroscopy and Isotopic Labeling. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115* (49), 14812-14821.
125. Hureau, C.; Coppel, Y.; Dorlet, P.; Solari, P. L.; Sayen, S.; Guillon, E.; Sabater, L.; Faller, P., Deprotonation of the Asp1-Ala2 Peptide Bond Induces Modification of the Dynamic Copper(II) Environment in the Amyloid-beta Peptide near Physiological pH. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48* (50), 9522-9525.
126. Drew, S. C.; Masters, C. L.; Barnham, K. J., Alzheimer's A beta Peptides with Disease-Associated N-Terminal Modifications: Influence of Isomerisation, Truncation and Mutation on Cu(2+) Coordination. *PLoS ONE* **2010**, *5* (12), e15875.

127. Hureau, C.; Dorlet, P., Coordination of redox active metal ions to the amyloid precursor protein and to amyloid-beta peptides involved in Alzheimer disease. Part 2: Dependence of Cu(II) binding sites with A beta sequences. *Coord. Chem. Rev.* **2012**, *256* (19-20), 2175-2187.
128. Furlan, S.; La Penna, G., Modeling of the Zn²⁺ binding in the 1-16 region of the amyloid beta peptide involved in Alzheimer's disease. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11* (30), 6468-6481.
129. Furlan, S.; Hureau, C.; Faller, P.; La Penna, G., Modeling the Cu⁺ Binding in the 1-16 Region of the Amyloid-beta Peptide Involved in Alzheimer's Disease. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114* (46), 15119-15133.
130. Azimi, S.; Rauk, A., On the involvement of copper binding to the N-terminus of the amyloid beta peptide of Alzheimer's disease: A study on model systems. *Int. J. Alzheimer's Dis.* **2011**, 539762, DOI: 10.4061/2011/539762.
131. Ali-Torres, J.; Marechal, J. D.; Rodriguez-Santiago, L.; Sodupe, M., Three Dimensional Models of Cu²⁺-A beta(1-16) Complexes from Computational Approaches. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (38), 15008-15014.
132. Furlan, S.; Hureau, C.; Faller, P.; La Penna, G., Modeling Copper Binding to the Amyloid-beta Peptide at Different pH: Toward a Molecular Mechanism for Cu Reduction. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116* (39), 11899-11910.
133. La Penna, G.; Hureau, C.; Andreussi, O.; Faller, P., Identifying, By First-Principles Simulations, Cu Amyloid-beta Species Making Fenton-Type Reactions in Alzheimer's Disease. *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117* (51), 16455-16467.
134. Ali-Torres, J.; Mirats, A.; Marechal, J. D.; Rodriguez-Santiago, L.; Sodupe, M., 3D Structures and Redox Potentials of Cu²⁺-A beta(1-16) Complexes at Different pH: A Computational Study. *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118* (18), 4840-4850.
135. Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Halliday, R. S.; Huey, R.; Hart, W. E.; Belew, R. K.; Olson, A. J., Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comput. Chem.* **1998**, *19* (14), 1639-1662.
136. Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J., AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30* (16), 2785-2791.
137. Koster, A. M.; Reveles, J. U.; del Campo, J. M., Calculation of exchange-correlation potentials with auxiliary function densities. *J. Chem. Phys.* **2004**, *121* (8), 3417-3424.
138. Köster, A. M.; del Campo, J. M.; Janetzko, F.; Zuniga-Gutierrez, B., A MinMax self-consistent-field approach for auxiliary density functional theory. *J. Chem. Phys.* **2009**, *130* (11), 114106.
139. Köster, A. M.; Calaminici, P.; Casida, M. E.; Dominguez, V. D.; Flores-Moreno, R.; Geudtner, G.; Goursot, A.; Heine, T.; Ipatov, A.; Janetzko, F.; del Campo, J. M.; Reveles, J. U.; Vela, A.; Zuniga, B.; Salahub, D. R. deMon2k, Version 2, The deMon developers, Cinvestav, Mexico City, **2006**.
140. Geudtner, G.; Calaminici, P.; Carmona-Espindola, J.; Martin del Campo, J.; Daniel Dominguez-Soria, V.; Flores Moreno, R.; Ulises Gamboa, G.; Goursot, A.; Koester, A. M.; Reveles, J. U.; Mineva, T.; Manuel Vasquez-Perez, J.; Vela, A.; Zuniga-Gutierrez, B.; Salahub, D. R., deMon2k. *WIREs Comput. Mol. Sci.* **2012**, *2* (4), 548-555.
141. Perdew, J. P.; Burke, K.; Ernzerhof, M., Comment on "Generalized gradient approximation made simple" - Reply. *Phys. Rev. Lett.* **1998**, *80* (4), 891-891.
142. Lee, C. T.; Yang, W. T.; Parr, R. G., Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron-density. *Phys. Rev. B* **1988**, *37* (2), 785-789.
143. Goursot, A.; Mineva, T.; Kevorkyants, R.; Talbi, D., Interaction between n-alkane chains: Applicability of the empirically corrected density functional theory for van der Waals complexes. *J. Chem. Theory Comput.* **2007**, *3* (3), 755-763.
144. Godbout, N.; Salahub, D. R.; Andzelm, J.; Wimmer, E., Optimization of gaussian-type basis-sets for local spin-density functional calculations. 1. Boron through neon, optimization technique and validation. *Can. J. Chem.* **1992**, *70* (2), 560-571.
145. Calaminici, P.; Janetzko, F.; Koster, A. M.; Mejia-Olvera, R.; Zuniga-Gutierrez, B., Density functional theory optimized basis sets for gradient corrected functionals: 3d transition metal systems. *J. Chem. Phys.* **2007**, *126* (4), 044108-10.
146. Neese, F. The ORCA program system. *WIREs Comput. Mol. Sci.* **2012**, *2* (1), 73-78.

-
147. Adamo, C.; Barone, V., Toward reliable density functional methods without adjustable parameters: The PBE0 model. *J. Chem. Phys.* **1999**, *110* (13), 6158-6170.
148. Conjunto de funciones de base 'CoreProp' de ORCA. Obtenida a partir de la base DZ de TurboMole diseñada por Ahlrichs y colaboradores. Disponible en la librería de conjuntos de funciones de base en: ftp.chemie.unikarlsruhe.de/pub/basen.
149. Barone, V. In *Recent Advances in Density Functional Methods, Part I*; Chong, D. P., Ed.; World Scientific Pub. Co.: Singapore, **1996**.
150. Klamt, A.; Schuurmann, G., COSMO - A new approach to dielectric screening in solvents with explicit expressions for the screening energy and its gradient. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1993**, (5), 799-805.
151. Sinnecker, S.; Rajendran, A.; Klamt, A.; Diedenhofen, M.; Neese, F., Calculation of solvent shifts on electronic g-tensors with the conductor-like screening model (COSMO) and its self-consistent generalization to real solvents (Direct COSMO-RS). *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110* (6), 2235-2245.
152. Eury, H.; Bijani, C.; Faller, P.; Hureau, C., Copper(II) Coordination to Amyloid beta: Murine versus Human Peptide. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50* (4), 901-905.
153. Kim, D.; Kim, N. H.; Kim, S. H., 34 GHz Pulsed ENDOR Characterization of the Copper Coordination of an Amyloid beta Peptide Relevant to Alzheimer's Disease. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52* (4), 1139-1142.
154. Zirah, S.; Kozin, S. A.; Mazur, A. K.; Blond, A.; Cheminant, M.; Segalas-Milazzo, I.; Debey, P.; Rebuffat, S., Structural changes of region 1-16 of the Alzheimer disease amyloid beta-peptide upon zinc binding and in vitro aging. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (4), 2151-2161.
155. Karr, J. W.; Szalai, V. A., Cu(II) binding to monomeric, oligomeric, and fibrillar forms of the Alzheimer's disease amyloid-beta peptide. *Biochemistry* **2008**, *47* (17), 5006-5016.
156. Shearer, J.; Szalai, V. A., The Amyloid-beta Peptide of Alzheimer's Disease Binds Cu-I in a Linear Bis-His Coordination Environment: Insight into a Possible Neuroprotective Mechanism for the Amyloid-beta Peptide. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (52), 17826-17835.
157. Alies, B.; Bijani, C.; Sayen, S.; Guillon, E.; Faller, P.; Hureau, C., Copper coordination to native N-terminally modified versus full-length amyloid- β : second-sphere effects determine the species present at physiological pH. *Inorg. Chem.* **2012**, *51* (23), 12988-3000.
158. Streltsov, V. A.; Titmuss, S. J.; Epa, V. C.; Barnham, K. J.; Masters, C. L.; Varghese, J. N., The structure of the amyloid-beta peptide high-affinity copper II binding site in Alzheimer disease. *Biophys. J.* **2008**, *95* (7), 3447-3456.
159. Hong, L.; Carducci, T. M.; Bush, W. D.; Dudzik, C. G.; Millhauser, G. L.; Simon, J. D., Quantification of the Binding Properties of Cu(2+) to the Amyloid Beta Peptide: Coordination Spheres for Human and Rat Peptides and Implication on Cu(2+)-Induced Aggregation. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114* (34), 11261-11271.
160. Abriata, L. A., Analysis of copper-ligand bond lengths in X-ray structures of different types of copper sites in proteins. *Acta Crystallogr., Sect. D* **2012**, *68*, 1223-1231.
161. Harding, M. M., Small revisions to predicted distances around metal sites in proteins. *Acta Crystallogr., Sect. D* **2006**, *62*, 678-682.
162. Freeman, H. C. Crystal structures of metal-peptide complexes. *Adv. Protein Chem.* **1967**, *22*, 257-424.
163. Camerman, N.; Camerman, A.; Sarkar, B., Molecular Design to Mimic Copper(II) Transport Site of Human-Albumin - Crystal and Molecular-Structure of Copper(II) - Glycylglycyl-L-Histidine-N-Methyl Amide Monoquo Complex. *Can. J. Chem.* **1976**, *54* (8), 1309-1316.
164. Hureau, C.; Eury, H.; Guillot, R.; Bijani, C.; Sayen, S.; Solari, P. L.; Guillon, E.; Faller, P.; Dorlet, P., X-ray and Solution Structures of Cu(II)GHK and Cu(II)DAHK Complexes: Influence on Their Redox Properties. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17* (36), 10151-10160.
165. Blount, J. F.; Fraser, K. A.; Freeman, H. C.; Szymanski, J.; Wang, C. H., Crystallographic Studies of Metal-Peptide Complexes .4. (Glycyl-L-histidinato)copper(2) Sesquihydrate. *Acta Crystallogr.* **1967**, *22*, 396-405.
166. Sarell, C. J.; Syme, C. D.; Rigby, S. E. J.; Viles, J. H. Copper(II) Binding to Amyloid-beta Fibrils of Alzheimer's Disease Reveals a Picomolar Affinity: Stoichiometry and Coordination Geometry Are Independent of A beta Oligomeric Form. *Biochemistry* **2009**, *48*, 4388-4402.
-

167. Karr, J. W.; Kaupp, L. J.; Szalai, V. A. Amyloid-beta binds Cu^{2+} in a mononuclear metal ion binding site. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13534-13538.
168. Syme, C. D.; Nadal, R. C.; Rigby, S. E. J.; Viles, J. H., Copper binding to the amyloid-beta (A beta) peptide associated with Alzheimer's disease - Folding, coordination geometry, pH dependence, stoichiometry, and affinity of A beta-(1-28): Insights from a range of complementary spectroscopic techniques. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279* (18), 18169-18177.
169. Kowalik-Jankowska, T.; Ruta, M.; Wisniewska, K.; Lankiewicz, L., Coordination abilities of the 1-16 and 1-28 fragments of beta-amyloid peptide towards copper(II) ions: a combined potentiometric and spectroscopic study. *J. Inorg. Biochemistry* **2003**, *95* (4), 270-282.
170. Brauer, B.; Weigend, F.; Fittipaldi, M.; Gatteschi, D.; Reijerse, E. J.; Guerri, A.; Ciattini, S.; Salvan, G.; Ruffer, T., Electron paramagnetic resonance and density-functional theory studies of Cu(II)-bis(oxamato) complexes. *Inorg. Chem.* **2008**, *47* (15), 6633-6644.
171. Bruschi, M.; De Gioia, L.; Mitric, R.; Bonacic-Koutecky, V.; Fantucci, P., A DFT study of EPR parameters in Cu(II) complexes of the octarepeat region of the prion protein. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2008**, *10* (31), 4573-4583.
172. Grande-Aztatzi, R.; Rivillas-Acevedo, L.; Quintanar, L.; Vela, A., Structural Models for Cu(II) Bound to the Fragment 92-96 of the Human Prion Protein. *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117* (3), 789-799.
173. Kaupp, M.; Reviakine, R.; Malkina, O. L.; Arbuznikov, A.; Schimmelpfennig, B.; Malkin, V. G., Calculation of electronic g-tensors for transition metal complexes using hybrid density functionals and atomic meanfield spin-orbit operators. *J. Comput. Chem.* **2002**, *23* (8), 794-803.
174. Malkina, O. L.; Vaara, J.; Schimmelpfennig, B.; Munzarova, M.; Malkin, V. G.; Kaupp, M., Density functional calculations of electronic g-tensors using spin-orbit pseudopotentials and mean-field all-electron spin-orbit operators. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122* (38), 9206-9218.
175. Neese, F., Prediction of electron paramagnetic resonance g values using coupled perturbed Hartree-Fock and Kohn-Sham theory. *J. Chem. Phys.* **2001**, *115* (24), 11080-11096.
176. Neese, F., Metal and ligand hyperfine couplings in transition metal complexes: The effect of spin-orbit coupling as studied by coupled perturbed Kohn-Sham theory. *J. Chem. Phys.* **2003**, *118* (9), 3939-3948.
177. Patchkovskii, S.; Ziegler, T., Prediction of EPR g tensors in simple d(1) metal porphyrins with density functional theory. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122* (14), 3506-3516.
178. Rivillas-Acevedo, L.; Grande-Aztatzi, R.; Lomeli, I.; Garcia, J. E.; Barrios, E.; Teloxa, S.; Vela, A.; Quintanar, L., Spectroscopic and Electronic Structure Studies of Copper(II) Binding to His111 in the Human Prion Protein Fragment 106-115: Evaluating the Role of Protons and Methionine Residues. *Inorg. Chem.* **2011**, *50* (5), 1956-1972.
179. Mentler, M.; Weiss, A.; Grantner, K.; del Pino, P.; Deluca, D.; Fiori, S.; Renner, C.; Klauke, W. M.; Moroder, L.; Bertsch, U.; Kretschmar, H. A.; Tavan, P.; Parak, F. G., A new method to determine the structure of the metal environment in metalloproteins: investigation of the prion protein octapeptide repeat Cu^{2+} complex. *Eur. Biophys. J.* **2005**, *34* (2), 97-112.
180. Riihimaeki, E.-S.; Martinez, J. M.; Kloo, L., Molecular dynamics Simulations of Cu(II) and the PHGGGWGQ octapeptide. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111* (35), 10529-10537.
181. Riihimaki, E.-S.; Manuel Martinez, J.; Kloo, L., Structural effects of Cu(II)-coordination in the octapeptide region of the human prion protein. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2008**, *10* (18), 2488-2495.
182. Pushie, M. J.; Vogel, H. J., Molecular dynamics simulations of two tandem octarepeats from the mammalian prion protein: Fully Cu^{2+} -bound and metal-free forms. *Biophys. J.* **2007**, *93* (11), 3762-3774.
183. Valensin, G.; Molteni, E.; Valensin, D.; Taraszkievicz, M.; Kozłowski, H., Molecular Dynamics Study of the Cu(2+) Binding-Induced "Structuring" of the N-Terminal Domain of Human Prion Protein. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113* (11), 3277-3279.
184. Hodak, M.; Chisnell, R.; Lu, W.; Bernholc, J., Functional implications of multistage copper binding to the prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106* (28), 11576-11581.
185. Pushie, M. J.; Vogel, H. J., Modeling by Assembly and Molecular Dynamics Simulations of the Low Cu^{2+} Occupancy Form of the Mammalian Prion Protein Octarepeat Region: Gaining Insight into Cu^{2+} -Mediated beta-Cleavage. *Biophys. J.* **2008**, *95* (11), 5084-5091.

186. Pushie, M. J.; Vogel, H. J., A Potential Mechanism for Cu²⁺ Reduction, β -Cleavage, and β -Sheet Initiation Within The N-Terminal Domain of the Prion Protein: Insights from Density Functional Theory and Molecular Dynamics Calculations. *J. Toxicol. Environ. Health A* **2009**, *72* (17-18), 1040-1059.
187. Pushie, M. J.; Rauk, A.; Jirik, F. R.; Vogel, H. J., Can copper binding to the prion protein generate a misfolded form of the protein? *Biometals* **2009**, *22* (1), 159-175.
188. Uniprot Knowledgebase. Major prion protein (PRIO_HUMAN). <http://www.uniprot.org/uniprot/P04156>.
189. Biverstahl, H.; Andersson, A.; Graslund, A.; Maler, L., NMR solution structure and membrane interaction of the N-terminal sequence (1-30) of the bovine prion protein. *Biochemistry* **2004**, *43* (47), 14940-14947.
190. Zahn, R., The octapeptide repeats in mammalian prion protein constitute a pH-dependent folding and aggregation site. *J. Mol. Biol.* **2003**, *334* (3), 477-488.
191. James, T. L.; Liu, H.; Ulyanov, N. B.; FarrJones, S.; Zhang, H.; Donne, D. G.; Kaneko, K.; Groth, D.; Mehlhorn, I.; Prusiner, S. B.; Cohen, F. E., Solution structure of a 142-residue recombinant prion protein corresponding to the infectious fragment of the scrapie isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94* (19), 10086-10091.
192. Schaftenaar, G.; Noordik, J. H., Molden: a pre- and post-processing program for molecular and electronic structures. *J. Comput.-Aided Mol. Design* **2000**, *14* (2), 123-134.
193. Perdew, J. P.; Burke, K.; Ernzerhof, M., Generalized gradient approximation made simple. *Phys. Rev. Lett.* **1996**, *77* (18), 3865-3868.
194. Burns, C. S.; Aronoff-Spencer, E.; Dunham, C. M.; Lario, P.; Avdievich, N. I.; Antholine, W. E.; Olmstead, M. M.; Vrielink, A.; Gerfen, G. J.; Peisach, J.; Scott, W. G.; Millhauser, G. L., Molecular features of the copper binding sites in the octarepeat domain of the prion protein. *Biochemistry* **2002**, *41* (12), 3991-4001.
195. Barry, S. D.; Rickard, G. A.; Pushie, M. J.; Rauk, A., The affinity of HGGG, GHGG, GGHG, and GGGH peptides for copper(II) and the structures of their complexes - An ab initio study(1). *Can. J. Chem.* **2009**, *87* (7), 942-953.
196. Babu, C. S.; Lim, C., Empirical force fields for biologically active divalent metal cations in water. *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110* (2), 691-699.
197. Gaussian 03, Revision C.02, Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery, Jr., J. A.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C.; and Pople, J. A.; Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2004**.
198. Singh, U. C.; Kollman, P. A., An approach to computing electrostatic charges for molecules. *J. Comput. Chem.* **1984**, *5* (2), 129-145.
199. O'Boyle, N. M.; Banck, M.; James, C. A.; Morley, C.; Vandermeersch, T.; Hutchison, G. R., Open Babel: An open chemical toolbox. *J. Cheminf.* **2011**, *3*, 33-1-33-14.
200. Chang, C. E.; Gilson, M. K., Tork: Conformational analysis method for molecules and complexes. *J. Comput. Chem.* **2003**, *24* (16), 1987-1998.
201. Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C.; Ferrin, T. E., UCSF chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25* (13), 1605-1612.
202. Mayo, S. L.; Olafson, B. D.; Goddard, W. A., DREIDING - A generic force-field for molecular simulations. *J. Phys. Chem.* **1990**, *94* (26), 8897-8909.
203. Wang, J. M.; Wolf, R. M.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A.; Case, D. A., Development and testing of a general amber force field. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25* (9), 1157-1174.
204. Qiu, D.; Shenkin, P. S.; Hollinger, F. P.; Still, W. C., The GB/SA continuum model for solvation. A fast analytical method for the calculation of approximate Born radii. *J. Phys. Chem. A* **1997**, *101* (16), 3005-3014.

Referencias

205. CHARMM Force Field Files. http://mackerell.umaryland.edu/charmm_ff.shtml.
206. Cornell, W. D.; Cieplak, P.; Bayly, C. I.; Gould, I. R.; Merz, K. M.; Ferguson, D. M.; Spellmeyer, D. C.; Fox, T.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A., A 2nd generation force-field for the simulation of proteins, nucleic-acids, and organic-molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117* (19), 5179-5197.
207. Ramachandran, G. N.; Ramakrishnan, C.; Sasisekharan, V., Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *J. Mol. Biol.* **1963**, *7* (1), 95-99.
208. Scott, K. A.; Alonso, D. O. V.; Sato, S.; Fersht, A. R.; Daggett, V., Conformational entropy of alanine versus glycine in protein denatured states. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104* (8), 2661-2666.
209. Lovell, S. C.; Davis, I. W.; Adrendall, W. B.; de Bakker, P. I. W.; Word, J. M.; Prisant, M. G.; Richardson, J. S.; Richardson, D. C., Structure validation by C alpha geometry: phi,psi and C beta deviation. *Proteins* **2003**, *50* (3), 437-450.

Anexos

Anexo 1. Creación de estructuras para cálculos de dinámica molecular e implementación de protocolos de simulación

En este anexo se incluyen detalles complementarios a la metodología descrita en cada capítulo. Es importante mencionar que no se pretende dar una secuencia exhaustiva de los pasos a seguir para crear los modelos utilizados ni para ejecutar los cálculos realizados, principalmente por motivos de espacio. El objetivo de este anexo es orientar al lector que desee utilizar metodologías y estrategias similares a las desarrolladas en esta tesis.

A1.1. Creación de estructuras con PSFGEN y VMD

La utilidad PSFGEN forma parte del paquete de programas de NAMD y de VMD, la cual utiliza las definiciones de topología del campo de fuerzas de CHARMM para crear estructuras de proteínas con las definiciones necesarias para correr una dinámica molecular con NAMD. Por lo regular se requiere un archivo en formato PDB por cada molécula de proteína, del cual PSFGEN toma la secuencia de aminoácidos y las coordenadas cartesianas de los átomos para generar cada segmento del sistema. En el Recuadro 1 se muestra un ejemplo de la secuencia de comandos para PSFGEN (en lenguaje tcl) que se utilizó para generar la estructura de los modelos II, III y IV de fibra amiloide analizados en el Capítulo 2.

<p><i>Recuadro 1. Secuencia de comandos para la obtención de estructuras proteicas usando PSFGEN</i></p> <pre> 1 # reading topology file and applying aliases 2 topology top_all27_prot_lipid.rtf 3 pdbalias residue HIS HSD 4 pdbalias atom ILE CD1 CD 5 6 # building segments for each monomer 7 foreach c {A B} { 8 for {set sn 1} {\$sn <= 24} {incr sn} { 9 if {\$sn < 10} { 10 set segn \${c}0\$sn 11 } else { 12 set segn \$c\$sn 13 } </pre>	<pre> 14 segment \$segn { 15 pdb fibril_strand.\$segn.pdb 16 first NTER 17 last CTER 18 } 19 coordpdb fibril_strand.\$segn.pdb \$segn 20 } 21 } 22 23 # guess missing atom coordinates 24 guesscoord 25 26 # writing structure files 27 writepsf fibril.psf 28 writepdb fibril.pdb 29 30 exit </pre>
--	--

Esta secuencia de comandos requiere el archivo de topología de CHARMM `top_all27_prot_lipid.rtf` y los archivos PDB individuales para cada una de las hebras de la fibra (moléculas de la proteína $A\beta_{42}$) `fibril_strand.A01.pdb`, `fibril_strand.A02.pdb`, ..., `fibril_strand.B24.pdb`. En este caso cada hebra se alineó a partir de la estructura final del modelo I, como se describió en la sección 2.3.3 (ver también Recuadro 2). Al final se escribe el archivo de estructura y de coordenadas PDB para la fibra ensamblada (`fibril.psf` y `fibril.pdb`, respectivamente). Para mayor información sobre los comandos específicos de PSFGEN se puede consultar las guías de usuario de NAMD y VMD.

Para alinear las hebras de los modelos de fibras y almacenar las coordenadas cartesianas en los archivos PDB requeridos por la secuencia de comandos del Recuadro 1, se puede utilizar un procedimiento como el mostrado en el Recuadro 2, en donde se describe como, a partir de una fibra de 24 hebras por capa, se generó otro modelo más grande reproduciendo la estructura repetidas veces sobre el eje de la fibra. Esta secuencia se aplicó para obtener los archivos PDB de las hebras que formaron el modelo V de fibra amiloide. El ensamblaje del modelo V (aplicando una secuencia de comandos similar al ejemplo mostrado en el Recuadro 1), requirió además de una alineación de las componentes principales del tensor de inercia de la fibra, siguiendo el procedimiento descrito en http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/script_library/scripts/orient/.

Recuadro 2. Secuencia de comandos utilizada para generar el modelo V de fibra amiloide a partir del modelo III en VMD

```

1 # VMD script to align several fibril molecules
  into a bigger one
2
3 # number of fibril molecules to align
4 set nMolec 5
5 # fibril molecule psf file
6 set psfFile baoli.psf
7 # structure coordinates with format consistent
  with the file extension
8 set coord fibIII-sim.restart.coor
9 # selection text for the base atoms for the
  alignment
10 set refSelTxt "segid A21 to A24 B21 to B24 and
  resid 10 to 42 and noh"
11 # selection text for the atoms to be moved to
  align with the base atoms
12 set molSelTxt "segid A01 to A04 B01 to B04 and
  resid 10 to 42 and noh"
13 # output prefix for each pdb segment
14 set outPref "fibV_strand."
15
16 # load the fibril molecules to align
17 set mids ""
18 for {set i 1} {$i <= $nMolec} {incr i} {
19   set id [mol new $psfFile]
20   mol addfile $coord molid $id
21   lappend mids $id
22 }
23
24 # align the molecules
25 for {set i 1} {$i < $nMolec} {incr i} {
26   set selRef [atomselect [lindex $mids [expr
  $i-1]] $refSelTxt]
27   set selMol [atomselect [lindex $mids $i]
  $molSelTxt]
28   set selTot [atomselect [lindex $mids $i] all]
29   $selTot move [measure fit $selMol $selRef]
30   $selRef delete
31   $selMol delete
32   $selTot delete
33 }
34
35 #generate labels and write pdb segments
36 set l_labA ""
37 set l_labB ""
38 # segment ids to be saved
39 for {set i 3} {$i <= 22} {incr i} {
40   if {$i < 10} {
41     lappend l_labA A0$i
42     lappend l_labB B0$i
43   } else {
44     lappend l_labA A$i
45     lappend l_labB B$i
46   }
47 }
48 set segi 1
49 foreach id [molinfo list] {
50   for {set i 0} {$i < [llength $l_labA]} {incr
  i} {
51     set monA [atomselect $id "segid [lindex
  $l_labA $i]"]
52     set monB [atomselect $id "segid [lindex
  $l_labB $i]"]
53     if {$segi < 10} {
54       set lseg 0$segi
55     } else {
56       set lseg $segi
57     }
58     $monA writepdb ${outPref}A$lseg.pdb
59     $monB writepdb ${outPref}B$lseg.pdb
60     $monA delete
61     $monB delete
62     incr segi
63   }
64 }

```

La construcción del modelo de la proteína prion completa (23-230) (Figura 4.15, página 110), también se llevó a cabo utilizando PSFGEN, sin embargo, en este caso se partió de varios fragmentos independientes que se unieron para formar una cadena peptídica única (sección 4.3.1, página 88). Además fueron necesarias varias mutaciones de residuos específicos señaladas en la Figura 4.1 (página 89), y la formación de un puente disulfuro mediante un parche. Para esto se aplicó la secuencia de comandos para PSFGEN que se muestra en el Recuadro 3.

Recuadro 3. Secuencia de comandos para construir el modelo de la proteína prion completa (23-230) utilizando PSFGEN

```

1 topology top_all127_prot_lipid.rtf
2 pdbalias residue HIS HSE
3 pdbalias atom ILE CD1 CD
4
5 segment FA {
6   pdb prph.23-40.pdb
7   first ACE
8   last NONE
9 }
10 coordpdb prph.23-40.pdb FA
11
12 segment FB {
13   pdb prph.41-60.pdb
14   first NONE
15   last NONE
16 }
17 coordpdb prph.41-60.pdb FB
18
19 segment FC {
20   pdb prph.61-89.pdb
21   first NONE
22   last NONE
23 }
24 coordpdb prph.61-89.pdb FC
25
26 segment FD {
27   pdb prph.90-230.pdb
28   mutate 97 SER
29   mutate 138 ILE
30   mutate 139 ILE
31   mutate 143 SER
32   mutate 145 TYR
33   mutate 155 HSE
34   mutate 166 MET
35   mutate 168 GLU
36   mutate 170 SER
37   mutate 203 VAL
38   mutate 205 MET
39   mutate 215 ILE
40   mutate 219 GLU
41   mutate 220 ARG
42   mutate 227 GLN
43   mutate 228 ARG
44   mutate 229 GLY
45   mutate 230 SER
46   first NONE
47   last CT3
48 }
49 coordpdb prph.90-230.pdb FD
50
51 patch DISU FD:179 FD:214
52
53 patch LINK FA:40 FB:41
54 patch LINK FB:60 FC:61
55 patch LINK FC:89 FD:90
56
57 regenerate angles dihedrals
58
59 patch listall
60 guesscoord
61
62 writepdb prph.pdb
63 writepsf prph.psf
64
65 exit

```

La construcción del modelo de la proteína prion completa en el estado de alta ocupación de cobre (saturada con 6 iones Cu^{2+} coordinados) utilizó esta misma estructura, a la que se adicionaron las topologías de enlace creadas en el presente trabajo, de acuerdo a la metodología descrita en la sección 4.3.2 (página 90). Ver también sección 4.4. En el Recuadro 4 se muestra la forma en la que se incorporan las topologías (mediante el comando `patch`), mientras que las definiciones en formato del campo de fuerza de CHARMM (declaradas en el archivo `prp-Cu005.top`) se muestra más adelante.

Recuadro 4. Secuencia de comandos para construir el modelo de la proteína prion completa coordinada a seis iones Cu^{2+} utilizando PSFGEN

```

1 topology top_all127_prot_lipid.rtf
2 topology prp-Cu005.top
3 pdbalias residue HIS HSE
4 pdbalias atom ILE CD1 CD
5
6 segment PR {
7   pdb prph.pdb
8   first ACE
9   last CT3
10 }
11
12 patch DISU PR:179 PR:214
13 patch S1PR PR:61 PR:62 PR:63
14 patch S1PR PR:69 PR:70 PR:71
15 patch S1PR PR:77 PR:78 PR:79
16 patch S1PR PR:85 PR:86 PR:87
17 patch S2PR PR:93 PR:94 PR:95 PR:96
18 patch S3PR PR:108 PR:109 PR:110 PR:111
19
20 coordpdb prph.pdb PR
21 guesscoord
22
23 patch listall
24
25 writepdb prph-6Cu.pdb
26 writepsf prph-6Cu.psf
27
28 exit

```

A1.2. Adición de solvente y de iones a la estructura proteica

Las estructuras proteicas ensambladas mediante PSFGEN fueron embebidas en un cubo lleno de moléculas de agua a la cual además se le agregaron diferentes números y tipos iones en cada uno de los modelos. Este paso se llevó a cabo utilizando el programa VMD, mediante su consola de texto TkConsole utilizando los comandos `solvate` y `autoionize`; aunque VMD cuenta con interfaces gráficas que pueden ayudar a realizar estas tareas. Para obtener información sobre la forma de correr estos comandos se puede escribir en la TkConsole de VMD el nombre comando sin ningún argumento. Como ejemplo, la secuencia de comandos mostrada en el Recuadro 5 se aplicó para agregar las moléculas de agua de solvatación y así obtener el modelo II de fibra amiloide, luego se agregaron los iones obteniendo los modelos III y IV (ver Tabla 2.1, página 14). El modelo III incluye una concentración de iones Na^+ y Cl^- de 0.1 M, mientras que el modelo IV además de éstos incluye 48 iones Zn^{2+} . Esta secuencia requiere de los archivos `fibII.psf` y `fibII.pdb` que se supone incluyen al modelo de fibra amiloide ensamblado en el vacío.

Recuadro 5. Secuencia de comandos para agregar agua e iones a los modelos II, III y IV de fibras amiloides

```

1 # add waters to fibril model II
2 solvate fibII.psf fibII.pdb -x 16 +x 16 -y 18 +y 18 -z 14 +z 14 -o fibII-solv
3 # add 0.1 mol/l of Na+ and Cl- and neutralizing the total charge of the system (model III)
4 autoionize -psf fibII-solv.psf -pdb fibII-solv.pdb -sc 0.1 -o fibIII-ions
5 # add 1 eq (48 ions) of Zn2+ to the model II (solvated only)
6 autoionize -psf fibII-solv.psf -pdb fibII-solv.pdb -nions {{ZN2 48}} -o fibII-48Zn
7 # add 0.1 mol/l of Na+ and Cl- and neutralizing the total charge of the system (model IV)
8 autoionize -psf fibII-48Zn.psf -pdb fibII-48Zn.pdb -sc 0.1 -o fibIV-ions

```

A1.3. Calentamiento y enfriamiento del sistema durante los protocolos de equilibración y de recocido simulado (SA)

Como se describió en las secciones 2.3.2 y 3.3.2, las simulaciones de producción de los modelos de fibras amiloides y las optimizaciones de la estructura de los modelos de complejos de la proteína $A\beta_{17}$ con cobre fueron pretratados a través de una serie de minimizaciones y simulaciones de DM cortas. En el primero caso se tuvo la finalidad de equilibrar el sistema, mientras que en el caso de los complejos se realizó una búsqueda conformacional utilizando un protocolo de SA. En estos casos es necesario calentar o enfriar el sistema con ayuda de alguno de los termostatos o métodos que ofrece NAMD. Para el calentamiento del sistema durante las equilibraciones se utilizó el método de reasignación de velocidades, el cual puede activarse mediante los parámetros `reassign` en el archivo de configuración utilizado por NAMD (ver ejemplo en el Recuadro 6).

Recuadro 6. Parámetros en el archivo de configuración de NAMD para calentar el sistema de 10.15 a 310.15 K por el método de reasignación de velocidades

```

reassignFreq 50      ;# number of timesteps steps between velocity reassignment
reassignTemp 10.15  ;# initial temperature
reassignIncr 1      ;# temperature increment
reassignHold 310.15 ;# final temperature

```

Nótese que al asignar 50 al parámetro `reassignFreq` y 1 a `reassignIncr`, si se considera un paso de integración (`timeStep`) de 2 fs/paso y partiendo de una temperatura de 10.15 K, este método calentaría el sistema a una velocidad de 1 K/100 fs, por lo que se requerirían de 30 ps de simulación para alcanzar la temperatura final de 310.15 K, determinada por el parámetro `reassignHold`.

En el caso de las búsquedas conformacionales dirigidas mediante SA, el sistema fue sometido a ciclos de calentamiento y enfriamiento durante simulaciones más largas (Figura 3.3, página 46). En el Recuadro 7 se muestra un ejemplo de la implementación de este tipo de protocolo, el cual se incorporó al archivo de configuración de NAMD para ejecutarlo.

<i>Recuadro 7. Protocolo de recocido simulado implementado para NAMD</i>	
<pre> 1 # Prefix for simulated annealing (SA) output 2 set SName out/complex.SA 3 # Number of SA warming-cooling cycles 4 set SAcycles 10 5 # number of warming steps 6 set warmSteps 500000 7 # number of cooling steps 8 set coolSteps 500000 9 # initial temperature 10 set tempIni 10.15 11 # final temperature 12 set tempFin 10.15 13 # Maximum temperature (warming stage) 14 set tempMax 333.15 15 # Minimum temperature (cooling stage) 16 set tempMin 10.15 17 # frequency for temperature increasing 18 set warmFreq 1000 19 # frequency for temperature decreasing 20 set coolFreq 1000 21 # temperature increments 22 set tempIncr 1 23 # temperature decrements 24 set tempDecr 1 25 set temp \$tempIni 26 for {set iSA 1} {\$iSA <= \$SAcycles} {incr iSA} { 27 set Nreas 0 28 while {\$temp < \$tempMax} { 29 incr Nreas 30 set temp [expr \$temp+\$tempIncr] 31 langevinTemp \$temp </pre>	<pre> 32 langevinPistonTemp \$temp 33 run \$warmFreq 34 } 35 set constSteps [expr \$warmSteps- \$Nreas*\$warmFreq] 36 set temp \$tempMax 37 if {\$constSteps > 0} { 38 langevinTemp \$temp 39 langevinPistonTemp \$temp 40 run \$constSteps 41 } 42 set Nreas 0 43 while {\$temp > \$tempMin} { 44 incr Nreas 45 set temp [expr \$temp-\$tempDecr] 46 langevinTemp \$temp 47 langevinPistonTemp \$temp 48 run \$coolFreq 49 } 50 set constSteps [expr \$coolSteps- \$Nreas*\$coolFreq] 51 set temp \$tempMin 52 if {\$constSteps > 0} { 53 langevinTemp \$temp 54 langevinPistonTemp \$temp 55 run \$constSteps 56 } 57 output \$SName\$iSA 58 } 59 while {\$temp < \$tempFin} { 60 set temp [expr \$temp+\$tempIncr] 61 langevinTemp \$temp 62 langevinPistonTemp \$temp 63 run \$warmFreq 64 } </pre>

Esta implementación puede aplicarse en conjunto con el método de Langevin para controlar la temperatura y la presión de sistema. Además tiene la ventaja de que cada etapa del ciclo SA puede tener longitudes diferentes y velocidades de calentamiento y enfriamiento independientes, las cuales se controlan ajustando la frecuencia y magnitud del incremento o decremento de la temperatura.

A1.4. Restricciones de átomos fijos en equilibraciones

En varias etapas de los cálculos de DM realizados fue necesario aplicar restricciones en las coordenadas cartesianas de subconjuntos de átomos en un modelo, p. ej., en los protocolos de equilibración algunas etapas se

llevan a cabo con los átomos de las proteínas fijos mientras se optimizan o modifican las posiciones de las moléculas de agua y de los iones. Así mismo, la búsqueda conformacional aplicada a los complejos $\text{Cu}^{2+}\text{-A}\beta$ se llevó a cabo liberando de restricciones de manera progresiva y secuencial a las regiones de la proteína que se coordinan al ión metálico. Estas restricciones se incorporan en una simulación de NAMD a través de el comando `fixedAtoms` en el archivo de configuración, como se ejemplifica en el Recuadro 8.

<p><i>Recuadro 8. Parámetros del archivo de configuración de NAMD para definir átomos fijos</i></p> <pre> 1 # Fixed Atoms Constraint 2 fixedAtoms on </pre>	<pre> 3 # set PDB beta-column to 1 to constraint atoms 4 fixedAtomsFile fixProt-colB.pdb 5 # specify which PDB column contains the flags 6 fixedAtomsCol B </pre>
---	---

El archivo `fixAt-colB.pdb` es idéntico al archivo PDB creado por PSFGEN, con la diferencia que en la columna correspondiente al factor térmico beta (B) se indican con un valor de 1 aquellos átomos que estarán fijos, mientras que los átomos móviles tendrían un valor de 0. Cabe mencionar que el parámetro `fixedAtomsCol` permitiría utilizar otras columnas del archivo PDB (p. ej. O, X, Y o Z). Mediante VMD (TkConsole) es posible crear el archivo PDB para especificar los átomos fijos utilizando el procedimiento mostrado en el Recuadro 9, donde se asigna a los átomos de la proteína el valor del factor B como 1, mientras que al resto (agua, iones, etc.) se les asigna el valor de 0.

<p><i>Recuadro 9. Secuencia de comandos de VMD para crear un archivo PDB especificando átomos fijos en la columna B</i></p> <pre> 1 set prot [atomselect top "protein"] </pre>	<pre> 2 set allAtm [atomselect top "all"] 3 \$allAtm set beta 0 4 \$allAtm set occupancy 0 5 \$prot set beta 1 6 \$allAtm writepdb fixProt-colB.pdb </pre>
--	--

Nótese que antes de especificar los átomos fijos en la columna beta, se "inicializaron" los campos beta y occupancy de todos los átomos de la molécula top con el valor de 0, y luego sólo se cambiaron los valores beta para los átomos de la proteína; en la línea 6 se escribe el archivo PDB con los cambios realizados.

Nota: El modo de instalar y ejecutar NAMD se puede consultar en la guía de usuario o mediante los tutoriales disponibles en <http://www.ks.uiuc.edu/Training/Tutorials/index-all.html#namd>.

Anexo 2. Parámetros estructurales empleados en el análisis de modelos atómicos

En este anexo se definen algunos de los parámetros empleados para analizar los cambios estructurales que sufrieron los diferentes modelos proteicos durante las simulaciones u optimizaciones. También se describe brevemente el procedimiento seguido para su cálculo e implementación. La mayoría de las secuencias de comandos (*scripts*) están escritos en lenguaje tcl y son ejecutados directamente desde la TkConsole de VMD.

A2.1. Mediciones estructurales de geometrías

Las distancias (d , r) entre dos átomos se reportaron en Å, mientras que los ángulos de enlace (θ) entre tres átomos y los ángulos diedros e impropios (ϕ) entre cuatro átomos se reportaron ambos en ° (grados). En todos los casos se utilizó VMD para calcularlos, ya sea su interfaz gráfica o mediante los comandos `measure bonds`, `measure angle` y `measure dihed`, en la TkConsole.

En el caso de las mediciones de ángulo de giro de las hebras en los modelos de fibras amiloides en donde se cuantificó su grado de torcimiento, se midieron los ángulos diedros considerando los átomos C_α de los residuos Ile31 y Val40, los cuales se encuentran en las hojas β más internas del núcleo hidrofóbico de los modelos de las fibras. El ángulo promedio de giro se obtuvo por pares de hebras sin que necesariamente fuesen consecutivas; en tales casos el ángulo se dividió entre el número de hebras intermedias. En el mejor de los casos se calcularon todos los posibles pares de hebras para cada cuadro o paso de la trayectoria, aunque la secuencia de comandos utilizada admite un "muestreo" que omitiría ciertos pares de hebras y ciertos cuadros de la trayectoria para obtener un cálculo más veloz. Esto se controló con los parámetros `frameStep` y `samplingStep` (líneas 2 y 5) en la secuencia de comandos del Recuadro 10.

Recuadro 10. Fragmento de la secuencia de comandos utilizada para cuantificar el ángulo de giro de las hebras (torcimiento) en los modelos de fibras amiloides

```

1 # ...
2 for {set f $firstFrm} {$f < $lastFrm} {incr f $frameStep} {
3   set cntr 0
4   set angSeg 0.0
5   for {set ci $iniSeg} {$ci < $finSeg} {incr ci $samplingStep} {
6     if {$ci <= 9} {set segI ${segLetter}0$ci} else {set segI $segLetter$ci}
7     set at1 [atomselect $tId "protein and segid $segI and resid 41 and name CA"]
8     set at2 [atomselect $tId "protein and segid $segI and resid 30 and name CA"]
9     for {set cf [expr $ci+1]} {$cf <= $finSeg} {incr cf} {
10      if {$cf <= 9} {set seg ${segLetter}0$cf} else {set seg $segLetter$cf}
11      set at3 [atomselect $tId "protein and segid $seg and resid 30 and name CA"]
12      set at4 [atomselect $tId "protein and segid $seg and resid 41 and name CA"]
13      set angSeg [expr $angSeg+[measure dihed \
14        "[${at1 get index} [${at2 get index} [${at3 get index} [${at4 get index}]" frame $f]/($cf-$ci)]
15      if {($ci == $iniSeg)&&($cf == $finSeg)} {
16        set angMax [measure dihed "[${at1 get index} [${at2 get index} [${at3 get index} [${at4 get
17        index]" frame $f]
18      }
19      $at3 delete
20      $at4 delete
21      incr cntr
22    }
23    $at1 delete
24    $at2 delete
25  }
26  set tLen $trajInfo($tId,length)
27  puts "$f [simTime $f $tId] ns [expr $angSeg/$cntr] $angMax \
28    [expr ($maxFibDepth-1.0)*$angSeg/$cntr]"
29  lappend tDat [simTime $f $tId]
30  lappend avDat [expr $angSeg/$cntr]
31  lappend maxDat $angMax
32  lappend cMaxDat [expr ($maxFibDepth-1.0)*$angSeg/$cntr]
33 }
34 # ...

```

A2.2. Parámetros que miden cambios y fluctuaciones estructurales

La raíz cuadrada de la desviación cuadrática media (*RMSD*) es una medida de la superposición de dos estructuras, generalmente se considera la comparación de la una molécula con síg misma después de que ha sido sujeta a un cambio de conformación o deformación en sus coordenadas internas, como ocurre por ejemplo a lo largo del tiempo de una DM. El *RMSD* para dos conjuntos con n puntos o átomos \vec{v} y \vec{w} se define como:

$$RMSD(\vec{v}, \vec{w}) = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \|\vec{v}_i - \vec{w}_i\|^2}.$$

Por lo regular, previo al cálculo de este parámetro, suelen aplicarse rotaciones y traslaciones de las estructuras con respecto a la referencia (alineamiento estructural) de tal forma que se minimice el *RMSD* final (*best fit*). En el Recuadro 11 se puede observar un fragmento de la secuencia de comandos que se utilizó para calcular el *RMSD* utilizando VMD y los comandos `measure fit` y `measure rmsd`, para mayor información se puede consultar la guía de usuario de VMD.

Recuadro 11. Fragmento de la secuencia de comandos aplicada a calcular el RMSD con respecto al tiempo.

```

1 # ...
2 # reference atom selection
3 set refSel [atomselect $refId $refTxt frame
  $refFrame]
4 # trajectory atom selection
5 set molSel [atomselect $molId $selTxt]
6 # total atom selection
7 set molTotSel [atomselect $molId all]
8 for {set ifrm $first} {$ifrm <= $last} {incr
  ifrm $step} {
9   $molSel frame $ifrm
10  $molTotSel frame $ifrm
11  $molTotSel move [measure fit $molSel $refSel
  weight mass]
12  lappend l_xDat [simTime $ifrm $molId]
13  lappend l_yDat [measure rmsd $molSel $refSel
  weight mass]
14 }
15 $refSel delete
16 $molSel delete
17 $molTotSel delete
18 # ...

```

Esta secuencia considera una selección de átomos de referencia fija (`refSel`, línea 3) y una segunda selección con el mismo número de átomos (`molSel`, línea 5) para la cual se actualiza su estructura con respecto al tiempo en una trayectoria (líneas 9 y 10). Las variables `first`, `last` y `step` definen qué pasos de la trayectoria se considerarían para calcular el *RMSD* respecto a la estructura de referencia en el cuadro `refFrame`. El comando `measure fit` devuelve la matriz de rotación necesaria llevar a cabo el ajuste estructural de la selección `molSel` respecto a `refSel`, y, en la misma línea 10, se aplica el método `move` para aplicar tal rotación a la molécula completa (especificada en `molTotSel`). La función `simFrame` (línea 12) se utiliza para determinar el tiempo de simulación (en ns) correspondiente a un cuadro o punto de la trayectoria. Los valores resultantes se almacenan en las listas `l_xDat` y `l_yDat` para después graficarse. Nótese que el alineamiento de las estructuras y el calculando los *RMSD* se realizan "pesados" por la masa de los átomos (*mass weighted*).

La raíz cuadrada de la fluctuación cuadrática media (*RMSF*) es una medida de la desviación de la posición de un átomo i respecto a una posición de referencia, por lo regular, la posición promediada en el tiempo de una

simulación de DM, \bar{x}_i . Este parámetro se puede definir como:

$$RMSF_i = \sqrt{\frac{1}{T} \sum_{t_j=1}^T (x_i(t_j) - \bar{x}_i)^2},$$

en donde T corresponde al tiempo sobre el que se considera el promedio de la posición (de un sólo átomo) en el tiempo, a diferencia del $RMSD$, donde el promedio se aplica sobre los átomos de la molécula o sobre un grupo de átomos. El $RMSF$ por átomo se calculó mediante el comando `measure rmsf` de VMD después de hacer el ajuste estructural `measure fit, move` (como se aplicó en el Recuadro 11). Tanto el $RMSD$ como $RMSF$ se reportaron en Å, los valores de $RMSD$ cercanos a cero indican que dos estructuras se pueden superponer al tender a ser idénticas, mientras que, al cambiar su estructura o conformación, (excluyendo grados de libertad rotacionales y traslacionales mediante el ajuste estructural), se incrementa el $RMSD$ indicando mayor distancia entre cada átomo al tratar de superponer las estructuras. En el caso del $RMSF$, los valores cercanos a cero significa que existió una muy pequeña (o nula) fluctuación de la posición de un átomo en el tiempo, y el incremento de sus valores indica que a lo largo de la trayectoria el átomo en cuestión se alejó de su posición promediada en el tiempo.

A2.3. Parámetros de formación de motivos estructurales repetitivos estabilizados por puentes de hidrógeno (estructura secundaria de proteínas)

Como se comentó anteriormente, la asignación de estructuras secundarias por residuo de proteína se llevó a cabo mediante el programa STRIDE, incluido en VMD mediante la aplicación gráfica de análisis Timeline (versión 1.4), accesible a partir del menú de la ventana principal de VMD (versión 1.9.x) (Extensions > Analysis > Timeline > Calculate > Calc. Sec. Struct). Esta aplicación permite almacenar un archivo de datos que reporta el código de estructura secundaria para cada residuo en cada cadena de cada segmento y para cada cuadro de la trayectoria de DM. Esta aplicación es útil para visualizar la evolución en el tiempo de la estructura secundaria de una cadena peptídica (ver por ejemplo Figura 4.13 en la página 108). Sin embargo, la visualización de esta información para los modelos de fibras amiloides es complicada ya que cada modelo incluye decenas de cadenas peptídicas. Por este motivo se decidió cuantificar la incidencia de cada motivo de estructura secundaria en el tiempo y considerando cada hebra de los modelos de fibra amiloide. Para conseguir esto se escribió un programa en lenguaje de FORTRAN que extrajera la información del archivo de datos de la aplicación Timeline y reportara los promedios de las incidencias de estructura secundaria deseados. En los recuadros 12 y 13 se muestran dos subrutinas como parte del programa que lleva a cabo dicha cuantificación, `calc_ssTrajPerRes` y `calc_ssTrajSegRes`. La primera calcula la incidencia de los diferentes motivos de estructura secundaria durante la trayectoria para cada residuo, mientras que la segunda calcula la misma incidencia pero para cada residuo por hebra del modelo de fibra amiloide. En las Figuras 2.7 y 2.8 se muestra un ejemplo de estas cuantificaciones, en el segundo caso únicamente para el motivo de hoja β .

Recuadro 12. Fragmento de un programa para FORTRAN que calcula las incidencias de los motivos de estructura secundaria determinados por la aplicación Timeline de VMD.

```

1 ! ...
2 !|-subroutine calc_ssTrajPerRes
  (inpUnit,ssHdr,outFile) :
3 !| -Calculates the percentage of occurrence of
4 !| _ each secondary structure code along a
5 !| _ trajectory .
6 !| -arguments :
7 !| -inpUnit :
8 !| -unit number connected to the timeline
9 !| _ ss output file .
10 !| -the unit must be still connected and
11 !| _ open for reading ;
12 !| -ssHdr :
13 !| -record with the header information of
14 !| _ the secStruct timeline file .
15 !| -must be previously obtained with the
16 !| _ read_ssHdr subroutine ;
17 !| -outFile :
18 !| -name of the file for writing output ; ;
19 !| -internal variables :
20 !| -ssRatio :
21 !| -stores sum and ratio of occurrence of
22 !| _ each secondary structure ;
23 !| -itemResid, itemChain, itemSegid :- ;
24 !| -ssInfo :- ;
25 !| -f,i :- ; ;
26 subroutine calc_ssTrajPerRes
  (inpUnit,ssHdr,outFile)
27 implicit none
28 integer, intent(in) :: inpUnit
29 type(t_ssHdr), intent(in) :: ssHdr
30 character(len=*), intent(in) :: outFile
31 type(t_ssRatio), dimension(ssHdr%nItms) ::
  ssRatio
32 integer, dimension(ssHdr%nItms) :: itemResid
33 character, dimension(ssHdr%nItms) ::
  itemChain
34 character(len=4), dimension(ssHdr%nItms) ::
  itemSegid
35 type(t_ssInfo) :: ssInfo
36 integer :: outUnit
37 integer :: f, i ! for frames, items
38 ! calculate occurrence ratios for each secStruct
39 ssRatio(:) = t_ssRatio(0.0, 0.0, 0.0, 0.0,
  0.0, 0.0, 0.0)
40 do f = 1, ssHdr%nFrm
41 do i = 1, ssHdr%nItms
42 read (unit=inpUnit, fmt=*, end=1000)
  ssInfo%resid, ssInfo%chain, ssInfo%segid,
  ssInfo%frame, ssInfo%ssCode
43 if (f .eq. 1) then
44 itemResid(i) = ssInfo%resid
45 itemChain(i) = ssInfo%chain
46 itemSegid(i) = ssInfo%segid
47 end if
48 select case (ssInfo%ssCode)
49 case ('T')
50 ssRatio(i)%T = ssRatio(i)%T + 1
51 case ('E')
52 ssRatio(i)%E = ssRatio(i)%E + 1
53 case ('B')
54 ssRatio(i)%B = ssRatio(i)%B + 1
55 case ('H')
56 ssRatio(i)%H = ssRatio(i)%H + 1
57 case ('G')
58 ssRatio(i)%G = ssRatio(i)%G + 1
59 case ('I')
60 ssRatio(i)%I = ssRatio(i)%I + 1
61 case ('C')
62 ssRatio(i)%C = ssRatio(i)%C + 1
63 end select
64 end do
65 end do
66 ssRatio(:)%T = ssRatio(:)%T/ssHdr%nFrm
67 ssRatio(:)%E = ssRatio(:)%E/ssHdr%nFrm
68 ssRatio(:)%B = ssRatio(:)%B/ssHdr%nFrm
69 ssRatio(:)%H = ssRatio(:)%H/ssHdr%nFrm
70 ssRatio(:)%G = ssRatio(:)%G/ssHdr%nFrm
71 ssRatio(:)%I = ssRatio(:)%I/ssHdr%nFrm
72 ssRatio(:)%C = ssRatio(:)%C/ssHdr%nFrm
73 ! write results to the output file
74 unitsUsed = unitsUsed + 1 ! new unit number
75 outUnit = startingUnit + unitsUsed
76 open (unit=outUnit, file=outFile)
77 write (unit=outUnit, fmt=100) ssHdr%nItms,
  ssHdr%nFrm
78 100 format (3X,'Summary of secondary
  structure motifs occurrence:',/,',Number of
  items: ',I5,/,',Number of frames: ',I5,/)
79 write (unit=outUnit, fmt='(4A6,8A7)')
  'It:', 'res:', 'chain:', 'seg:', 'T:', 'E:', 'B:', 'H:
  ', 'G:', 'I:', 'C:', '(%)'
80 do i = 1, ssHdr%nItms
81 write (unit=outUnit, fmt=200) i,
  itemResid(i), itemChain(i), itemSegid(i),
  ssRatio(i)%T*100, ssRatio(i)%E*100, ssRatio(i)
  %B*100, ssRatio(i)%H*100, ssRatio(i)%G*100,
  ssRatio(i)%I*100, ssRatio(i)%C*100, '%'
82 end do
83 200 format (I4, I6, A6, A6, X, F7.1, F7.1,
  F7.1, F7.1, F7.1, F7.1, F7.1, A3)
84 close (unit=outUnit, status='KEEP')
85 unitsUsed = unitsUsed - 1
86 print *, 'output file written: ', outFile
87 1000 return
88 end subroutine calc_ssTrajPerRes
89 ! ...

```

Como se puede observar, la subrutina requiere varios pasos previos de preparación, pero permite observar la manera en que se extrae y recopila la información para obtener los porcentajes de estructura secundaria que se reportaron en este trabajo. En el caso de la subrutina `calc_ssTrajSegRes`, para discriminar entre cada una de las hebras, se cuantifica por separado cada uno de los segmentos reportados en el archivo de datos de salida de la aplicación Timeline.

Recuadro 13. Fragmento de un programa para FORTRAN que calcula las incidencias de los motivos de estructura secundaria por hebra y por residuo determinados por la aplicación Timeline de VMD.

```

1 ! ...
2 !|-subroutine calc_ssTrajSegRes
   (inpUnit,ssHdr,outFile) :
3 !| -calculates the occurrence ratio of each
4 !| _ secondary structure for each residue
5 !| _ along the segment and chain lists .
6 !| -arguments :
7 !| -inpUnit :
8 !| -unit number connected to the timeline
9 !| _ ss output file .
10 !| -the unit must be still connected and
11 !| _ open for reading ;
12 !| -ssHdr :
13 !| -record with the header information of
14 !| _ the secStruct timeline file .
15 !| -must be previously obtained with the
16 !| _ read_ssHdr subroutine ;
17 !| -outFile :
18 !| -name of the file for writing output ;;
19 !| -variables :
20 !| -ssRatio :
21 !| -stores the fractions of secStructs
22 !| _ for each residue .
23 !| -size of nItms as maximum (depends
24 !| _ on how many segids and chains
25 !| _ have the same residues) ;
26 !| -itemResid :
27 !| -array storing all different resid
28 !| _ found in the timeline file ;
29 !| -numRes :
30 !| -number of different resid found
31 !| _ in the timeline file ;;
32 subroutine calc_ssTrajSegRes
   (inpUnit,ssHdr,outFile)
33 implicit none
34 integer, intent(in) :: inpUnit
35 type(t_ssHdr), intent(in) :: ssHdr
36 character(len=*), intent(in) :: outFile
37 type(t_ssRatio), dimension(ssHdr%nItms) ::
   ssRatio
38 integer, dimension(ssHdr%nItms) :: itemResid
39 character, dimension(ssHdr%nItms) ::
   itemChain
40 character(len=4), dimension(ssHdr%nItms) ::
   itemSegid
41 integer :: numRes = 0, numChain = 0, numSeg =
   0
42 integer :: outUnit
43 integer :: f, i, ind, res, seg, chain
44
45 ! calculate occurrence ratios for each secStruct
46 ssRatio(:) = t_ssRatio(0.0, 0.0, 0.0, 0.0,
   0.0, 0.0, 0.0)
47 do f = 1, ssHdr%nFrm
48   do i = 1, ssHdr%nItms
49     read (unit=inpUnit, fmt=*, end=2000)
       ssInfo%resid, ssInfo%chain, ssInfo%segid,
       ssInfo%frame, ssInfo%ssCode
50 ! record # of residues, segments and chains
51   do ind = 1, numSeg
52     if (itemSegid(ind) .eq. ssInfo%segid)
       goto 1100
53   end do
54   numSeg = numSeg + 1
55   itemSegid(numSeg) = ssInfo%segid
56   1100 do ind = 1, numChain
57     if (itemChain(ind) .eq. ssInfo%chain)
       goto 1200
58   end do
59   numChain = numChain + 1
60   itemChain(numChain) = ssInfo%chain
61   1200 do ind = 1, numRes
62     if (itemResid(ind) .eq. ssInfo%resid)
       goto 1300
63   end do
64   numRes = numRes + 1
65   itemResid(numRes) = ssInfo%resid
66 !count occurrences for each secStruct
67   1300 select case (ssInfo%ssCode)
68     case ('T')
69       ssRatio(ind)%T = ssRatio(ind)%T + 1
70     case ('E')
71       ssRatio(ind)%E = ssRatio(ind)%E + 1
72     case ('B')
73       ssRatio(ind)%B = ssRatio(ind)%B + 1
74     case ('H')
75       ssRatio(ind)%H = ssRatio(ind)%H + 1
76     case ('G')
77       ssRatio(ind)%G = ssRatio(ind)%G + 1
78     case ('I')
79       ssRatio(ind)%I = ssRatio(ind)%I + 1
80     case ('C')
81       ssRatio(ind)%C = ssRatio(ind)%C + 1
82   end select
83   end do
84 end do
85 ssRatio(:)%T = ssRatio(:)%T/ssHdr%nFrm/numSeg
86 ssRatio(:)%E = ssRatio(:)%E/ssHdr%nFrm/numSeg
87 ssRatio(:)%B = ssRatio(:)%B/ssHdr%nFrm/numSeg
88 ssRatio(:)%H = ssRatio(:)%H/ssHdr%nFrm/numSeg
89 ssRatio(:)%G = ssRatio(:)%G/ssHdr%nFrm/numSeg
90 ssRatio(:)%I = ssRatio(:)%I/ssHdr%nFrm/numSeg
91 ssRatio(:)%C = ssRatio(:)%C/ssHdr%nFrm/numSeg
92 ! write results to the output file
93 unitsUsed = unitsUsed + 1 !new unit number
94 outUnit = startingUnit + unitsUsed
95 open (unit=outUnit, file=outFile)
96 write (unit=outUnit, fmt=100) numRes, ssHdr
   %nFrm, numChain, numSeg
97 100 format (3X,'Summary of secondary
   structure motifs along fibril:',//,'Number of
   residues: ',I5,/, 'Number of frames:
   ',I5,/, 'Number of chains: ',I5,/, 'Number of
   segments: ',I5,/)
98 write (unit=outUnit, fmt='(A6,8A7)')
   'res:', 'T:', 'E:', 'B:', 'H:', 'G:', 'I:', 'C:', '(%)'
99 do i = 1, numRes
100   write (unit=outUnit, fmt=200) itemResid(i),
       ssRatio(i)%T*100, ssRatio(i)%E*100, ssRatio(i)
       %B*100, ssRatio(i)%H*100,ssRatio(i)%G*100,
       ssRatio(i)%I*100, ssRatio(i)%C*100, '%'
101   end do
102 200 format (I4, ', ', X, F7.1, ', ', F7.1, ', ',
   F7.1, ', ', F7.1, ', ', F7.1, ', ', F7.1, ', ',
   F7.1, ', ', A3)
103 close (unit=outUnit, status='KEEP')
104 unitsUsed = unitsUsed - 1
105 print *, 'output file written: ', outFile
106 2000 stop
107 end subroutine calc_ssTrajSegRes
108 ! ...

```

A2.4. Histogramas de frecuencias y funciones de distribución radial

En varias partes de esta tesis se recurrió a la estrategia de cuantificar el número o frecuencia de aparición de algún evento en particular. Por ejemplo, para los modelos de fibras amiloides se contaron los números de átomos correspondientes a los iones que entraron en contacto con la fibra. También se cuantificaron el número de moléculas de agua que entraron a un canal en el interior del núcleo hidrofóbico. En los complejos metal-proteína también se contaron el número de puentes de hidrógeno intramoleculares formados. Así mismo, para el análisis conformacional del pentapéptido HGGGW de la proteína prion se generaron histogramas de frecuencias que contaron el número de conformeros que con una energía dentro de un intervalo determinado. También se determinó la "densidad" relativa al número de conformaciones que mostraron características estructurales similares.

La generación de los histogramas de frecuencias o de densidad (cuando están normalizados) se llevó a cabo mediante el programa xmGrace (con el cual se generaron la mayoría de las gráficas presentadas); sin embargo, para obtener las cuentas en cada observación se requirieron varias secuencias de comandos similares a las mostradas en las secciones anteriores. Para este objetivo son de particular utilidad los comandos `atomselect` y `measure` de VMD, así como el método `get` de `atomselect`. Por ejemplo, en el listado mostrado en el Recuadro 14 se muestra el procedimiento utilizado para contar el número de átomos presentes en una selección particular, pero que además permite monitorear otras propiedades de una selección de átomos, como es la posición en el espacio o algún otro atributo definido por el usuario que varíe respecto al tiempo (especificado por los parámetros `attrib` y `upd`).

<p><i>Recuadro 14. Fragmento de una secuencia de comandos de VMD para determinar atributos que varíen en el tiempo para una selección de átomos determinada</i></p> <pre> 1 # ... 2 set molSel [atomselect \$molId \$selTxt] 3 if {\$attrib == "num"} { 4 for {set frm \$firstFrm} {\$frm <= \$lastFrm} 5 {incr frm \$stpFrm} { 6 \$molSel frame \$frm 7 \$molSel update 8 } 9 } 10 } else { 11 for {set frm \$firstFrm} {\$frm <= \$lastFrm} 12 {incr frm \$stpFrm} { 13 \$molSel frame \$frm 14 if {\$upd} {\$molSel update} 15 lappend l_xDat [simTime \$frm \$molId] 16 lappend l_yDat [\$molSel get \$attrib] 17 } 18 } 19 # ... </pre>	<pre> 7 lappend l_xDat [simTime \$frm \$molId] 8 lappend l_yDat [\$molSel num] 9 } 10 } else { 11 for {set frm \$firstFrm} {\$frm <= \$lastFrm} 12 {incr frm \$stpFrm} { 13 \$molSel frame \$frm 14 if {\$upd} {\$molSel update} 15 lappend l_xDat [simTime \$frm \$molId] 16 lappend l_yDat [\$molSel get \$attrib] 17 } 18 } 19 # ... </pre>
--	---

Nótese que cuando se solicita contar los átomos pertenecientes a una selección (`$attrib == "num"`), la secuencia siempre actualiza la selección de átomos para cada cuadro de la trayectoria (línea 6), mientras que en el caso de otros atributos el usuario puede elegir actualizar la selección de átomos en cada cuadro o no. En el caso por ejemplo de la cuantificación iones de cualquier tipo en contacto con la fibra basta con declarar `molSel` con el siguiente comando: `set molSel [atomselect $molId "ion within 3.5 of protein"]`, donde se utiliza un radio de corte de 3.5 Å. De esta manera la selección de átomos puede revelar

comportamientos muy interesantes cuando esto se combina con el cálculo de diferentes parámetros mediante el comando `measure`. Otro ejemplo es la cuantificación de moléculas de agua en el interior del canal formado en el interior del núcleo hidrofóbico de la fibra (ver sección 2.5.4), la selección de átomos utilizada (segundo argumento del comando `atomselect`) fue "same residue as water within 3.0 of (protein and resid 21 23 28 32 34 and sidechain)". La posibilidad de hacer selecciones de átomos muy específicas es una de las fortalezas de VMD que vale la pena revisar cuidadosamente en la guía de usuario.

La función de distribución radial, $g(r)$, también se utilizó para observar las distribuciones de distancias entre átomos particulares, por ejemplo, entre los C_α 's de los residuos dentro del núcleo hidrofóbico de la fibra y entre los C_α 's de los extremos N-ter y C-ter para evaluar el plegamiento del dominio N-terminal de las fibras. La función $g(r)$ se define como

$$g(r) = 4\pi r^2 \rho dr,$$

en donde $\rho = N/V$, es el promedio de la densidad de partículas (N , número de partículas; V , volumen); y describe como varía la densidad respecto a la distancia de una partícula de referencia. La $g(r)$ también ofrece información sobre el "empaquetamiento" de las partículas en una fase. En el caso de muchas partículas heterogéneas en una trayectoria temporal, VMD permite el cálculo de esta función utilizando el comando `measure gofr`, la cual, en consideración de los métodos de selección como los descritos arriba, permite generar las gráficas reportadas en las Figuras 2.10 y 2.15 (páginas 27 y 34, respectivamente).

El comando `measure hbonds` de VMD permite identificar, especificando una selección de átomos que puedan participar como donadores (D) de H y otra en donde los átomos puedan aceptar (A) átomos H en un puente de hidrógeno, los átomos involucrados en estas interacciones, de acuerdo con criterios geométricos de distancia D...A y de ángulo D-H...A. El comando regresa como resultado listas de los átomos formando estas interacciones, las cuales con algunas instrucciones de `tcl` como `llength` se utilizaron para cuantificar el número de puentes de hidrógeno.

A2.5. Otras propiedades estructurales calculadas

El radio de giro, r_{gyr}^2 , calculado para varios modelos, se define como:

$$r_{gyr}^2 = \frac{\left(\sum_{i=1}^n w_i (r_i - \bar{r})^2 \right)}{\left(\sum_{i=1}^n w_i \right)},$$

donde \bar{r} es el centro de masa y w_i son las masas de los átomos, y es una medida del grado en que una estructura se encuentra compactada o en una conformación ya sea más "globular" o más desplegada. Los valores altos de

r_{gyr}^2 indican que la estructura se encuentra más extendida (menos globular). Este parámetro se calculó con el comando `measure rgyr` de VMD, aplicando secuencias de comandos similares a las ya explicadas.

El área superficial accesible al disolvente (*SASA*) se calcula extendiendo a cada uno de los átomos de una selección en un radio para ubicar los puntos en la superficie de una esfera que se encuentran expuestos al disolvente, el procedimiento particular para calcularlo en VMD se muestra en el Recuadro 15. El procedimiento permite calcular para una serie de moléculas el *SASA* aplicando varios parámetros definidos por el usuario. El parámetro `srad` es el radio que se agrega a cada átomo, y se utilizó en nuestro caso con un valor de 1.4 Å.

<p><i>Recuadro 15. Fragmento de una secuencia de comandos para VMD para calcular el área superficial accesible al disolvente</i></p> <pre> 1 # ... 2 foreach sr \$srad { 3 foreach psel \$protSelTxt { 4 foreach sel \$selTxt { 5 puts "molSasa: sel: \$sel protSel: \$psel srad: \$sr" 6 } </pre>	<pre> 7 set molSel [atomselect \$id \$psel] 8 set restSel [atomselect \$id \$sel] 9 puts "\$id\t[measure sasa \$srad \$molSel -restrict \$restSel]" 10 \$molSel delete 11 \$restSel delete 12 } 13 } 14 } 15 } 16 # ... </pre>
--	--

El comando `measure sasa` también considera una selección de restricción en la que se pueden incluir todos los átomos de una proteína para calcular el área de alguna región particular de la proteína sin que los huecos que pueda haber en el interior de la estructura afecten el cálculo.

Anexo 3. Definiciones de topología y parámetros para describir la coordinación del cobre a la proteína prion

En este anexo se presentan los archivos de topología y de parámetros en formato del campo de fuerza de CHARMM, explicados en el Capítulo 4, que se utilizaron para describir la unión del cobre a los diferentes sitios de coordinación presentes en la proteína prion humana en el estado de alta ocupación de cobre (alta concentración del metal), en donde hasta seis iones metálicos se coordinan y saturan el dominio N-terminal de esta proteína.

A3.1. Archivo de topología para los tres sitios de coordinación al Cu de la PrP

En los recuadros 16-18 se muestran las definiciones de topología en formato CHARMM para los tres sitios de coordinación al cobre estudiados en esta tesis (ver Figura 4.3, página 91). Nótese que en realidad estos tres recuadros deberían estar incluidos en un solo archivo para poder utilizarse. En el Recuadro 4 ya se había incluido un ejemplo de cómo se aplicarían las definiciones de topología utilizando el programa PSFGEN para generar la estructura correctamente descrita.

Recuadro 16. Definiciones de topología para el sitio 1 de coordinación de cobre a la PrP

```

1 MASS 200 CUP1 63.54600 CU ! Cu(II) Bounded to a peptide HGG
2 MASS 201 CUP2 63.54600 CU ! Cu(II) Bounded to a peptide GGTH
3 MASS 202 CUP3 63.54600 CU ! Cu(II) Bounded to a peptide NMKH
4 MASS 203 NM1 14.00670 N ! N from first Gly bounded to Cu
5 MASS 204 NM2 14.00670 N ! N from second Gly bounded to Cu
6 !
7 !
8 PRES S1PR -1.53 ! patch for Cu(II) bounded to the sequence HGG.
9 ! use in a patch statement and
10 ! follow with AUTOgenerate ANGLes DIHEdrals command
11 ! \ | || |
12 GROUP ! 1CB---1CG 1CE1- | 3C
13 ATOM 1CUP CUP1 0.235 ! \ / \ // \ / // \ /
14 ATOM 1ND1 NR2 -0.341 ! -1CA 1ND1 1CE1 3O 3CA-
15 ATOM 2N NM1 -0.656 ! | | \ \ || | |
16 ATOM 3N NM2 -0.354 ! 1C---2N---1CUP---3O 1CG--1ND1--1CUP---3N
17 ATOM 3O O -0.414 ! // | | || | |
18 DELETE ATOM 2HN ! -2CA 3N 3C -1CB 2N 2C=
19 DELETE ATOM 3HN ! / \ / \ / \ / \ / \ /
20 ! 2C 3CA 1CA---1C 2CA
21 ! | | | \ / | | / \
22 BOND 1CUP 1ND1 1CUP 2N 1CUP 3N 1CUP 3O
23 ANGLE 1CUP 1ND1 1CG 1CUP 1ND1 1CE1
24 ANGLE 1CUP 2N 1C 1CUP 2N 2CA
25 ANGLE 1CUP 3N 2C 1CUP 3N 3CA
26 ANGLE 1CUP 3O 3C
27 ANGLE 1ND1 1CUP 2N 1ND1 1CUP 3N 1ND1 1CUP 3O
28 ANGLE 2N 1CUP 3N 2N 1CUP 3O
29 ANGLE 3N 1CUP 3O
30 IMPR 1CUP 2N 3O 1ND1 1CUP 1ND1 3N 2N 1CUP 2N 3O 3N 1CUP 1ND1 3N 3O
31 IMPR 1CUP 3O 2N 1ND1 1CUP 3N 1ND1 2N 1CUP 3O 2N 3N 1CUP 3N 1ND1 3O
32 IMPR 1ND1 1CG 1CE1 1CUP 2N 1C 2CA 1CUP 3N 2C 3CA 1CUP
33 IMPR 1ND1 1CE1 1CG 1CUP 2N 2CA 1C 1CUP 3N 3CA 2C 1CUP
34 IC 1CG 1CE1 *1ND1 1CUP 1.3768 107.537 179.0190 124.5360 1.9111

```

Recuadro 17. Definiciones de topología para el sitio 2 de coordinación de cobre a la PrP

```

1 PRES S2PR -1.53 ! patch for Cu(II) bounded to the sequence GGTH.
2 ! use in a patch statement and
3 ! follow with AUTOgenerate ANGLes DIHEdrals command
4 ! | | | /
5 GROUP ! -4CE1 4CG--4CB-
6 ATOM 4CUP CUP2 0.235 ! \ // |
7 ATOM 4ND1 NR2 -0.341 ! 4ND1 4CA-
8 ATOM 3N NM1 -0.656 ! \ | / \
9 ATOM 4N NM2 -0.354 ! 1C==1O--4CUP---4N
10 ATOM 1O O -0.414 ! | | |
11 DELETE ATOM 3HN ! -2N 3N 3C=
12 DELETE ATOM 4HN ! \ / \ /
13 ! -2CA--2C 3CA
14 ! / || | \
15 BOND 4CUP 1O 4CUP 3N 4CUP 4N 4CUP 4ND1
16 ANGLE 4CUP 1O 1C
17 ANGLE 4CUP 3N 2C 4CUP 3N 3CA
18 ANGLE 4CUP 4N 3C 4CUP 4N 4CA
19 ANGLE 4CUP 4ND1 4CG 4CUP 4ND1 4CE1
20 ANGLE 1O 4CUP 3N 1O 4CUP 4N 1O 4CUP 4ND1
21 ANGLE 3N 4CUP 4N 3N 4CUP 4ND1
22 ANGLE 4N 4CUP 4ND1
23 IMPR 4CUP 4ND1 3N 1O 4CUP 1O 4N 3N 4CUP 3N 4ND1 4N 4CUP 4N 1O 4ND1
24 IMPR 4CUP 3N 4ND1 1O 4CUP 4N 1O 3N 4CUP 4ND1 3N 4N 4CUP 1O 4N 4ND1
25 IMPR 3N 2C 3CA 4CUP 4N 3C 4CA 4CUP 4ND1 4CG 4CE1 4CUP
26 IMPR 3N 3CA 2C 4CUP 4N 4CA 3C 4CUP 4ND1 4CE1 4CG 4CUP
27 IC 4CG 4CE1 *4ND1 4CUP 1.3759 107.614 173.099 125.892 1.9549

```

Recuadro 18. Definiciones de topología para el sitio 3 de coordinación de cobre a la PrP

```

1 PRES S3PR          -1.53 ! patch for Cu(II) bounded to the sequence NMKH.
2                   ! use in a patch statement and
3                   ! follow with AUTOgenerate ANGLEs DIHEdralS command
4                   !
5 GROUP              !
6 ATOM 4CUP CUP3     0.235 !
7 ATOM 4ND1 NR2      -0.341 !
8 ATOM 3N  NM1       -0.656 !
9 ATOM 4N  NM2       -0.354 !
10 ATOM 1O  O        -0.414 !
11 DELETE ATOM 3HN   !
12 DELETE ATOM 4HN   !
13                   !
14                   !
15 BOND 4CUP 1O 4CUP 3N 4CUP 4N 4CUP 4ND1
16 ANGLE 4CUP 1O 1C
17 ANGLE 4CUP 3N 2C 4CUP 3N 3CA
18 ANGLE 4CUP 4N 3C 4CUP 4N 4CA
19 ANGLE 4CUP 4ND1 4CG 4CUP 4ND1 4CE1
20 ANGLE 1O 4CUP 3N 1O 4CUP 4N 1O 4CUP 4ND1
21 ANGLE 3N 4CUP 4N 3N 4CUP 4ND1
22 ANGLE 4N 4CUP 4ND1
23 IMPR 4CUP 4ND1 3N 1O 4CUP 1O 4N 3N 4CUP 3N 4ND1 4N 4CUP 4N 1O 4ND1
24 IMPR 4CUP 3N 4ND1 1O 4CUP 4N 1O 3N 4CUP 4ND1 3N 4N 4CUP 1O 4N 4ND1
25 IMPR 3N 2C 3CA 4CUP 4N 3C 4CA 4CUP 4ND1 4CG 4CE1 4CUP
26 IMPR 3N 3CA 2C 4CUP 4N 4CA 3C 4CUP 4ND1 4CE1 4CG 4CUP
27 IC 4CG 4CE1 *4ND1 4CUP 1.3780 107.484 -173.014 130.191 1.9339

```

A3.2. Archivo de parámetros para los tres sitios de coordinación al Cu de la PrP

Aquí se presentan los archivos de parámetros en formato CHARMM separados en parámetros de enlace, de ángulos, impropios, etc. Ver Recuadros 19-23. De igual manera, para poder utilizarse tendrían que unirse en un sólo archivo. Estos parámetros serían necesarios para llevar a cabo una simulación de DM u optimización con NAMD empleando las estructuras que se creen mediante las definiciones de topología de la sección anterior.

Recuadro 19. Parámetros de enlace entre Cu^{2+} -PrP para el campo de fuerza CHARMM

```

1 BONDS
2 !
3 !V(bond) = Kb(b - b0)**2
4 !
5 !Kb: kcal/mole/A**2
6 !b0: A
7 !
8 !atom type      Kb          b0
9 !
10 !
11 ! Site 1
12 CUP1 NR2      129.510 1.9118 ! Cu-ND1(His1)
13 CUP1 NM1      96.184 1.9711 ! Cu-N(Gly2)
14 CUP1 NM2     192.420 1.8585 ! Cu-N(Gly3)
15 CUP1 O        34.747 2.1569 ! Cu-O(Gly3)
16 !
17 ! Site 2
18 CUP2 O        44.751 2.043 ! Cu-O(Gly93)
19 CUP2 NM1     127.050 1.917 ! Cu-N(Thr95)
20 CUP2 NM2     139.960 1.917 ! Cu-N(His96)
21 CUP2 NR2      79.428 1.957 ! Cu-ND1(His96)
22 !
23 ! Site 3
24 CUP3 O        81.369 1.998 ! Cu-O(Asn108)
25 CUP3 NM1     128.440 1.884 ! Cu-N(Lys110)
26 CUP3 NM2     108.680 1.939 ! Cu-N(His111)
27 CUP3 NR2     109.440 1.936 ! Cu-ND1(His111)
28 !
29 ! Sites 1, 2 and 3
30 NM1 C         370.000 1.3450 ! from NH1 C
31 NM1 CT1      320.000 1.4300 ! from NH1 CT1
32 NM1 CT2      320.000 1.4300 ! from NH1 CT2
33 NM2 C         370.000 1.3450 ! from NH1 C
34 NM2 CT1      320.000 1.4300 ! from NH1 CT1
35 NM2 CT2      320.000 1.4300 ! from NH1 CT2

```

Recuadro 20. Parámetros de ángulos de enlace entre Cu^{2+} -PrP para el campo de fuerza CHARMM

```

1 ANGLES
2 !
3 !V(angle) = Ktheta(Theta - Theta0)**2
4 !
5 !V(Urey-Bradley) = Kub(S - S0)**2
6 !
7 !Ktheta: kcal/mole/rad**2
8 !Theta0: degrees
9 !Kub: kcal/mole/A**2 (Urey-Bradley)
10 !S0: A
11 !
12 !atom types      Ktheta      Theta0      Kub      S0
13 !
14 ! Site 1
15 CUP1 NR2 CPH1 66.724 127.328 ! Cu-ND1(H1)-CG(H1)
16 CUP1 NR2 CPH2 61.709 124.578 ! Cu-ND1(H1)-CE1(H1)
17 CUP1 NM1 C 43.323 131.368 ! Cu-N(G2)-C(H1)
18 CUP1 NM1 CT2 135.150 112.747 ! Cu-N(G2)-CA(G2)
19 CUP1 NM2 C 127.900 120.081 ! Cu-N(G3)-C(G2)
20 CUP1 NM2 CT2 120.900 121.650 ! Cu-N(G3)-Ca(G3)
21 CUP1 O C 93.587 110.478 ! Cu-O(G3)-C(G3)
22 NM1 CUP1 NR2 78.599 108.730 ! N(G2)-Cu-ND1(H1)
23 NM2 CUP1 NM1 170.200 83.325 ! N(G3)-Cu-N(G2)
24 O CUP1 NM2 165.670 79.567 ! O(G3)-Cu-N(G3)
25 NR2 CUP1 O 86.502 88.396 ! ND1(H1)-Cu-O(G3)
26 NR2 CUP1 NM2 110.470 168.031 ! ND1(H1)-Cu-N(G3)
27 O CUP1 NM1 88.574 162.720 ! O(G3)-Cu-N(G2)
28 ! Site 2
29 CUP2 O C 22.529 100.325 ! Cu-O(G93)-C(G93)
30 CUP2 NM1 C 82.884 132.101 ! Cu-N(T95)-C(G94)
31 CUP2 NM1 CT1 130.250 112.626 ! Cu-N(T95)-CA(T95)
32 CUP2 NM2 C 132.020 115.165 ! Cu-N(H96)-C(T95)
33 CUP2 NM2 CT1 96.164 127.157 ! Cu-N(H96)-CA(H96)
34 CUP2 NR2 CPH1 86.480 125.959 ! Cu-ND1(H96)-CG(H96)
35 CUP2 NR2 CPH2 90.417 125.867 ! Cu-ND1(H96)-CE1(H96)
36 O CUP2 NM1 67.627 99.024 ! O(G93)-Cu-N(T95)

```

```

37 O CUP2 NM2 30.838 161.351 ! O(G93)-Cu-N(H96)
38 O CUP2 NR2 77.570 84.746 ! O(G93)-Cu-ND1(H96)
39 NM1 CUP2 NM2 180.200 84.769 ! N(T95)-Cu-N(H96)
40 NM1 CUP2 NR2 85.037 159.683 ! N(T95)-Cu-ND1(H96)
41 NM2 CUP2 NR2 113.630 93.868 ! N(H96)-Cu-ND1(H96)
42 ! Site 3
43 CUP3 O C 22.529 131.694 ! Cu-O(N108)-C(N108)
44 CUP3 NM1 C 77.270 127.025 ! Cu-N(K110)-C(Met109)
45 CUP3 NM1 CT1 153.910 115.921 ! Cu-N(K110)-CA(K110)
46 CUP3 NM2 C 120.270 114.912 ! Cu-N(H111)-C(K110)
47 CUP3 NM2 CT1 70.240 125.787 ! Cu-N(H111)-CA(H111)
48 CUP3 NR2 CPH1 73.380 121.966 ! Cu-ND1(H111)-CG(H111)
49 CUP3 NR2 CPH2 86.240 130.016 ! Cu-ND1(H111)-CE1(H111)
50 O CUP3 NM1 56.221 99.683 ! O(N108)-Cu-N(K110)
51 O CUP3 NM2 59.689 137.796 ! O(N108)-Cu-N(H111)
52 O CUP3 NR2 33.861 93.776 ! O(N108)-Cu-ND1(H111)
53 NM1 CUP3 NM2 166.310 84.110 ! N(K110)-Cu-N(H111)
54 NM1 CUP3 NR2 85.037 159.683 ! N(K110)-Cu-ND1(H111)
55 NM2 CUP3 NR2 99.560 95.747 ! N(H111)-Cu-ND1(H111)
56 ! Sites 1, 2 and 3
57 NM1 C CT1 80.000 116.500 ! from NH1 C CT1
58 NM1 C CT2 80.000 116.500 ! from NH1 C CT2
59 NM1 C O 80.000 122.500 ! from NH1 C O
60 NM1 CT1 HB 48.000 108.000 ! from NH1 CT1 HB
61 NM1 CT1 C 50.000 107.000 ! from NH1 CT1 C
62 NM1 CT1 CT1 70.000 113.500 ! from NH1 CT1 CT1
63 NM1 CT1 CT2 70.000 113.500 ! from NH1 CT1 CT2
64 NM1 CT2 HB 48.000 108.000 ! from NH1 CT2 HB
65 NM1 CT2 C 50.000 107.000 ! from NH1 CT2 C
66 C NM1 CT1 50.000 120.000 ! from CT1 NH1 C
67 C NM1 CT2 50.000 120.000 ! from CT2 NH1 C
68 NM2 C CT1 80.000 116.500 ! from NH1 C CT1
69 NM2 C CT2 80.000 116.500 ! from NH1 C CT2
70 NM2 C O 80.000 122.500 ! from NH1 C O
71 NM2 CT1 HB 48.000 108.000 ! from NH1 CT1 HB
72 NM2 CT1 C 50.000 107.000 ! from NH1 CT1 C
73 NM2 CT1 CT2 70.000 113.500 ! from NH1 CT1 CT2
74 NM2 CT2 HB 48.000 108.000 ! from NH1 CT2 HB
75 NM2 CT2 C 50.000 107.000 ! from NH1 CT2 C
76 C NM2 CT1 50.000 120.000 ! from CT1 NH1 C
77 C NM2 CT2 50.000 120.000 ! from CT2 NH1 C

```

Recuadro 21. Parámetros de ángulos diedros entre Cu^{2+} -PrP para el campo de fuerza CHARMM

```

1 DIHEDRALS
2 !
3 !V(dihedral) = Kchi(1 + cos(n(chi) - delta))
4 !
5 !Kchi: kcal/mole
6 !n: multiplicity
7 !delta: degrees
8 !
9 !atom types      Kchi      n      delta
10 !
11 ! Sites 1, 2 and 3
12 NM1 C CT1 HB 0.000 1 0.00 !from NH1 C CT1 HB
13 NM1 C CT1 CT2 0.000 1 0.00 !from NH1 C CT1 CT2
14 NM1 C CT1 NH1 0.600 1 0.00 !from NH1 C CT1 NH1
15 NM1 C CT2 HB 0.000 1 0.00 !from NH1 C CT2 HB
16 NM1 C CT2 NH1 0.600 1 0.00 !from NH1 C CT2 NH1
17 NM1 CT1 C NM2 0.600 1 0.00 !from NH1 C CT2 NH1
18 NM1 CT1 C O 0.000 1 0.00 !from O C CT1 NH1
19 NM1 CT2 C O 0.000 1 0.00 !from O C CT2 NH1
20 NM1 CT2 C NM2 0.600 1 0.00 !from NH1 C CT2 NH1
21 C NM1 CT1 HB 0.000 1 0.00 !from HB CT1 NH1 C
22 C NM1 CT1 C 0.200 1 180.00 !C CT1 NH1 C
23 C NM1 CT1 CT1 1.800 1 0.00 !from CT1 CT1 NH1 C

```

```

24 C NM1 CT1 CT2 1.800 1 0.00 !from CT2 CT1 NH1 C
25 C NM1 CT2 HB 0.000 1 0.00 !from HB CT2 NH1 C
26 C NM1 CT2 C 0.200 1 180.00 !from C CT2 NH1 C
27 CT1 NM1 C O 2.500 2 180.00 !from O C NH1 CT1
28 CT1 NM1 C CT1 1.600 1 0.00 !from CT1 C NH1 CT1
29 CT1 NM1 C CT1 2.500 2 180.00 !from CT1 C NH1 CT1
30 CT1 NM1 C CT2 1.600 1 0.00 !from CT2 C NH1 CT1
31 CT1 NM1 C CT2 2.500 2 180.00 !from CT2 C NH1 CT1
32 CT2 NM1 C CT1 1.600 1 0.00 !from CT2 NH1 C CT1
33 CT2 NM1 C CT1 2.500 2 180.00 !from CT2 NH1 C CT1
34 CT2 NM1 C O 2.500 2 180.00 !from O C NH1 CT2
35 NM2 C CT1 HB 0.000 1 0.00 !from NH1 C CT1 HB
36 NM2 C CT1 CT1 0.000 1 0.00 !from NH1 C CT1 CT1
37 NM2 C CT1 CT2 0.000 1 0.00 !from NH1 C CT1 CT2
38 NM2 C CT2 HB 0.000 1 0.00 !from NH1 C CT2 HB
39 NM2 CT1 C O 0.000 1 0.00 !from O C CT1 NH1
40 NM2 CT1 C NH1 0.600 1 0.00 !from NH1 C CT1 NH1
41 NM2 CT2 C NH1 0.600 1 0.00 !from NH1 C CT2 NH1
42 NM2 CT2 C O 0.000 1 0.00 !from O C CT2 NH1
43 C NM2 CT1 HB 0.000 1 0.00 !from HB CT1 NH1 C
44 C NM2 CT1 CT2 1.800 1 0.00 !from CT2 CT1 NH1 C
45 C NM2 CT1 C 0.200 1 180.00 !C CT1 NH1 C
46 C NM2 CT2 HB 0.000 1 0.00 !from HB CT2 NH1 C
47 C NM2 CT2 C 0.200 1 180.00 !from C CT2 NH1 C
48 CT1 NM2 C O 2.500 2 180.00 !from O C NH1 CT1
49 CT1 NM2 C CT1 1.600 1 0.00 !from CT2 C NH1 CT1
50 CT1 NM2 C CT1 2.500 2 180.00 !from CT2 C NH1 CT1
51 CT2 NM2 C CT2 1.600 1 0.00 !from CT2 C NH1 CT2
52 CT2 NM2 C O 2.500 2 180.00 !from O C NH1 CT

```

Recuadro 22. Parámetros de ángulos impropios entre Cu^{2+} -PrP para el campo de fuerza CHARMM

```

1 IMPROPER
2 !
3 !V(improper) = Kpsi(psi - psi0)**2
4 !
5 !Kpsi: kcal/mole/rad**2
6 !psi0: degrees
7 !note that the second column of numbers (0) is ignored
8 !
9 !atom types      Kpsi      psi0
10 !
11 ! Site 1
12 CUP1 NM1 O NR2 0.000 0 -7.507 ! Cu-N(G2)-O(G2)-ND1(H1)
13 CUP1 O NM1 NR2 0.000 0 7.507 ! Cu-O(G2)-N(G2)-ND1(H1)
14 CUP1 NR2 NM2 NM1 3.661 0 -5.772 ! Cu-ND1(H1)-N(G3)-N(G2)
15 CUP1 NM2 NR2 NM1 3.661 0 5.772 ! Cu-N(G3)-ND1(H1)-N(G2)
16 CUP1 NM1 O NM2 0.000 0 167.554 ! Cu-N(G2)-O(G3)-N(G3)
17 CUP1 O NM1 NM2 0.000 0 -167.554 ! Cu-O(G3)-N(G2)-N(G3)
18 CUP1 NR2 NM2 O 0.000 0 169.720 ! Cu-ND1(H1)-N(G3)-O(G3)
19 CUP1 NM2 NR2 O 0.000 0 -169.720 ! Cu-N(G3)-ND1(H1)-O(G3)
20 NR2 CPH1 CPH2 CUP1 32.743 0 0.361 ! ND1(H1)-CG(H1)-CE1(H1)-Cu
21 NR2 CPH2 CPH1 CUP1 25.410 0 -0.956 ! ND1(H1)-CE1(H1)-CG(H1)-Cu
22 NM1 C CT2 CUP1 7.162 0 -6.366 ! N(G2)-C(H1)-CA(G2)-Cu
23 NM1 CT2 C CUP1 7.162 0 6.366 ! N(G2)-CA(G2)-C(H1)-Cu
24 NM2 C CT2 CUP1 4.298 0 -0.190 ! N(G3)-C(G2)-CA(G3)-Cu
25 NM2 CT2 C CUP1 4.298 0 0.190 ! N(G3)-CA(G3)-C(G2)-Cu
26 ! Site 2
27 CUP2 NR2 NM1 O 14.465 0 52.731 ! Cu-ND1(H96)-N(T95)-O(G93)
28 CUP2 NM1 NR2 O 14.465 0 -52.731 ! Cu-N(T95)-ND1(H96)-O(G93)
29 CUP2 O NM2 NM1 33.863 0 -71.413 ! Cu-O(G93)-N(H96)-N(T95)
30 CUP2 NM2 O NM1 33.863 0 71.413 ! Cu-N(H96)-O(G93)-N(T95)
31 CUP2 NM1 NR2 NM2 8.112 0 103.547 ! Cu-N(T95)-ND1(H96)-N(H96)
32 CUP2 NR2 NM1 NM2 8.112 0 -103.547 ! Cu-ND1(H96)-N(T95)-N(H96)
33 CUP2 NM2 O NR2 19.599 0 -84.710 ! Cu-N(H96)-O(G93)-ND1(H96)
34 CUP2 O NM2 NR2 19.599 0 84.710 ! Cu-O(G93)-N(H96)-ND1(H96)
35 NM1 C CT1 CUP2 21.004 0 9.551 ! N(T95)-C(G94)-CA(T94)-Cu
36 NM1 CT1 C CUP2 21.004 0 -9.551 ! N(T95)-CA(T94)-C(G94)-Cu
37 NM2 C CT1 CUP2 19.484 0 4.776 ! N(H96)-C(T95)-CA(H96)-Cu
38 NM2 CT1 C CUP2 19.484 0 -4.776 ! N(H96)-CA(H96)-C(T95)-Cu
39 NR2 CPH1 CPH2 CUP2 23.492 0 3.599 ! ND1(H96)-CG(H96)-CE1(H96)-Cu
40 NR2 CPH2 CPH1 CUP2 23.492 0 -3.599 ! ND1(H96)-CE1(H96)-CG(H96)-Cu
41 ! Site 3
42 CUP3 NR2 NM1 O 14.465 0 41.431 ! Cu-ND1(H111)-N(K110)-O(N108)
43 CUP3 NM1 NR2 O 14.465 0 -41.431 ! Cu-N(K110)-ND1(H111)-O(N108)
44 CUP3 O NM2 NM1 33.863 0 -64.721 ! Cu-O(N108)-N(H111)-N(K110)
45 CUP3 NM2 O NM1 33.863 0 64.721 ! Cu-N(H111)-O(N108)-N(K110)
46 CUP3 NM1 NR2 NM2 8.112 0 80.661 ! Cu-N(K110)-ND1(H111)-N(H111)
47 CUP3 NR2 NM1 NM2 8.112 0 -80.661 ! Cu-ND1(H111)-N(K110)-N(H111)
48 CUP3 NM2 O NR2 19.599 0 -58.848 ! Cu-N(H111)-O(N108)-ND1(H111)
49 CUP3 O NM2 NR2 19.599 0 58.848 ! Cu-O(N108)-N(H111)-ND1(H111)
50 NM1 C CT1 CUP3 18.583 0 1.316 ! N(K110)-C(M109)-CA(K110)-Cu
51 NM1 CT1 C CUP3 18.583 0 -1.316 ! N(K110)-CA(K110)-C(M109)-Cu
52 NM2 C CT1 CUP3 15.784 0 -5.773 ! N(H111)-C(K110)-CA(H111)-Cu
53 NM2 CT1 C CUP3 15.784 0 5.773 ! N(H111)-CA(H111)-C(K110)-Cu
54 NR2 CPH1 CPH2 CUP3 26.891 0 -3.373 ! ND1(H111)-CG(H111)-CE1(H111)-Cu
55 NR2 CPH2 CPH1 CUP3 26.891 0 3.373 ! ND1(H111)-CE1(H111)-CG(H111)-Cu

```

Recuadro 23. Parámetros de Lennard-Jones entre Cu^{2+} -PrP para el campo de fuerza CHARMM

```

1 NONBONDED nbxmod 5 atom cdiel shift vatom vdistance vswitch -
2 cutnb 14.0 ctofnb 12.0 ctonnb 10.0 eps 1.0 e14fac 1.0 wmin 1.5
3 !adm jr., 5/08/91, suggested cutoff scheme
4 !
5 !V(Lennard-Jones) = Eps,i,j[(Rmin,i,j/ri,j)**12 - 2(Rmin,i,j/ri,j)**6]
6 !
7 !epsilon: kcal/mole, Eps,i,j = sqrt(eps,i * eps,j)
8 !Rmin/2: A, Rmin,i,j = Rmin/2,i + Rmin/2,j
9 !
10 !atom ignored epsilon Rmin/2 ignored eps,1-4 Rmin/2,1-4
11 !
12 CUP1 0.0 -0.0427 1.033 ! From [JPhysChemA.110.691]
13 CUP2 0.0 -0.0427 1.033 ! From [JPhysChemA.110.691]
14 CUP3 0.0 -0.0427 1.033 ! From [JPhysChemA.110.691]
15 NM1 0.0 -0.2000 1.850 0.0 -0.2000 1.550 ! From NH1
16 NM2 0.0 -0.2000 1.850 0.0 -0.2000 1.550 ! From NH1
17 !
18 !
19 !
20 END

```

Nota: Por motivos de espacio no se incluyeron los parámetros CMAP.

Anexo 4. Estructuras XYZ de los modelos 1 y 4 de complejos entre el cobre y la proteína β amiloide

Se eligió incluir estas dos modelos ya que se encuentran entre los más estables y congruentes con las mediciones experimentales.

