



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

UNIDAD ZACATENCO  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

**“Efecto del péptido  $\beta$ -amiloide y el óxido nítrico en la coordinación de  
cobre a la proteína prion: Hallazgos relevantes sobre el papel de estas  
proteínas en la enfermedad de Alzheimer”**

**T E S I S**

Que presenta

YANAHI POSADAS TORRENTERA

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE FARMACOLOGÍA

Directoras de la Tesis:

Dra. Claudia Pérez Cruz

Dra. Lilitiana Quintanar Vera

CIUDAD DE MÉXICO

29 DE JUNIO DE 2022





El presente trabajo se realizó en los Departamentos de Farmacología y Química del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de las doctoras Claudia Pérez Cruz y Liliana Quintanar Vera, con el apoyo de la Secretaría de Educación Pública a través del fondo SEP-CINVESTAV y con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través de la beca doctoral 308512 y el proyecto 221134.

## AGRADECIMIENTOS

### Gracias a:

- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por los recursos otorgados a través del proyecto 221134 y la beca de doctorado 308512.

- De forma especial a mis asesoras:

A la Dra. Liliana Quintanar Vera por acompañarme con gran entusiasmo en este largo camino, por su confianza, su asesoría y comprensión.

A la Dra. Claudia Pérez Cruz por darme la libertad de explorar nuevos caminos, por su paciencia y apoyo.

- A todos los miembros de mi comité tutorial:

Dr. Ranier Gutiérrez Mendoza, Carlos Martín Cerda García Rojas, Dr. José Víctor Segovia Vila, Dra. Ma. De Jesús Rosales Hoz y Dra. Lourdes Massieu Trigo por sus enseñanzas y valiosos aportes a este proyecto.

- A la Q. Atenea Christial Villegas Vargas y al Q. Géiser Cuellar por su apoyo en las técnicas de cromatografía de líquidos y espectrometría de masas.

- A la técnica Gabina Dionocio Cadena por su apoyo diario durante la realización de esta Tesis.

- A todos mis compañeros de laboratorio a la Dra. Carolina Sanchez López, al Dr. Giovanni Palomino Vizcaíno, al M. en C. Víctor Eulogio López Guerrero, al biólogo Martín Eduardo Tovar y al Q. José Antonio Domínguez Calva por su apoyo y por todas las discusiones científicas que entablamos.

- A mis estudiantes de licenciatura la I.Q.I. Esmeralda Ruth Frías, la I.Q.I. Nataly Ramos y la Q.F.I. Lili Parra Ojeda por su entusiasmo y trabajo constante.

*Dedicada a mis padres y a mi hermana:  
Ustedes fueron y serán el pilar más valioso de mi existencia,  
gracias por su apoyo incondicional*

## Publicaciones derivadas de esta Tesis:

### 1) Artículo original:

*Amyloid  $\beta$  Perturbs Cu(II) Binding to the Prion Protein in a Site-Specific Manner: Insights into Its Potential Neurotoxic Mechanisms*

**Posadas Y**, Parra-Ojeda L, Perez-Cruz C, Quintanar L.

Inorg Chem 2021, 60:8958-8972.

<https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.1c00846>

### 2) Artículo de opinión:

*Dissecting the copper bioinorganic chemistry of the functional and pathological roles of the prion protein: Relevance in Alzheimer's disease and cancer.*

**Posadas Y**, Lopez-Guerrero VE, Segovia J, Perez-Cruz C, Quintanar L.

Curr Opin Chem Biol 2022, 66:102098

<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2021.102098>

### 3) Capítulo de libro:

*The role of d-block metal ions in neurodegenerative diseases.*

**\*Posadas Y**, **\*Lopez-Guerrero VE**, Arcos-Lopez T, Sayler I. R, Sanchez-Lopez C, Segovia J, Perez-Cruz C, Quintanar L.

**\*Autores con igual contribución**

Comprehensive Inorganic Chemistry III

*Manuscrito aceptado, en proceso de impresión.*

### 4) Artículo de revisión:

*Neurotoxicity Linked to Dysfunctional Metal Ion Homeostasis and Xenobiotic Metal Exposure: Redox Signaling and Oxidative Stress.*

**\*Garza-Lombo C**, **\*Posadas Y**, Quintanar L, Gonsebatt M E, Franco R.

**\*Autores con igual contribución**

Antioxid Redox Signal 2018, 28 (18), 1669-1703

<https://doi.org/10.1089/ars.2017.7272>

## **Publicaciones en preparación:**

### **1) Artículo de revisión:**

*The role of d-block metal ions in neurodegenerative diseases.*

**\*Lopez-Guerrero VE, \*Posadas Y, Segovia J, Perez-Cruz C, Quintanar L.**

**\*Autores con igual contribución**

### **2) Artículo original:**

*Site-specific reactivity of nitric oxide with Cu(II)-prion protein complexes: Insights into S-nitrosylation mechanisms*

**Posadas Y, Lopez-Guerrero V E, Perez-Cruz C, Quintanar L.**

## **Participaciones en congresos nacionales e internacionales:**

- 2021: Site-specific interactions between amyloid beta and copper-prion complexes: Novel insights into the molecular mechanisms of amyloid beta neurotoxicity  
LatinXChem, conferencia en twitter
- 2018: Beyond the competition for Cu(II) between A $\beta$  and PrP: Site-specific formation of ternary complexes  
11th International Copper meeting  
Sorrento, Italia
- 2018: Beyond the competition for Cu(II) between A $\beta$  and PrPC: Formation of ternary complexes relevant in Alzheimer's Disease.  
62nd Annual Meeting Biophysical Society  
San Francisco, California
- 2018: Spectroscopic study of Cu(II)-induced interactions between A $\beta$  and PrPC: From the battle for Cu(II) to formation of ternary complexes.  
Frontiers in Metallobiochemistry symposia

The Pennsylvania State University

- 2017: Studying Cu(II) interactions with amyloid- $\beta$  peptide and Prion Protein: Insights into the molecular battle for Cu(II) in Alzheimer's disease.  
2nd Neurobiology meeting  
Querétaro, México
- 2017: Studying Cu(II) interactions with amyloid- $\beta$  peptide and Prion Protein: Insights into the molecular features of the fight for Cu(II) in Alzheimer's disease.  
6th Congress of physic-chemistry, structure, and function of proteins.  
Durango, México
- 2016: Bioavailability of a bifunctional molecule in a blood-brain barrier model.  
V Latin American Meeting on Biological Inorganic Chemistry.  
Querétaro, México  
**Premio a la major presentación de poster**
- 2016: Bioavailability of a bifunctional molecule in a blood-brain barrier model.  
1st Neurobiology meeting  
Puebla, México

#### **Participaciones en cursos nacionales e internacionales:**

- 2018: Single Molecule Workshop: Applications for studying proteins.  
IBT-UNAM, October 2018.
- 2018: Bioinorganic Workshop.  
The Pennsylvania State University
- 2017: Curso teórico-práctico "Cultivo de células y tejidos animales".  
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas/IPN



- 2016: Redox biology in health and disease.

UNAM-University of Nebraska-Lincoln

- 2016: Calorimetry Workshop: Applications for studying proteins.

CINVESTAV

## CONTENIDO

ABREVIATURAS.....	17
RESUMEN.....	19
ABSTRACT.....	21
INTRODUCCIÓN.....	23
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES.....	26
1.1. La enfermedad de Alzheimer.....	26
1.2. El ion cobre en la enfermedad de Alzheimer.....	29
1.3. Proteínas que unen cobre y están implicadas en la enfermedad de Alzheimer.....	35
1.4. La química detrás de la unión de cobre a proteínas.....	57
1.5. La espectroscopia como herramienta para estudiar los complejos metal-proteína... 58	
1.6. Características espectroscópicas de los complejos Cu <sup>2+</sup> -β-amiloide y Cu <sup>2+</sup> -PrP.....	70
1.7. Formación de complejos ternarios PrP-Cu <sup>2+</sup> -βA.....	75
1.8. Reactividad de los complejos Cu <sup>2+</sup> -PrP con óxido nítrico.....	76
CAPÍTULO II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	77
2.1. Justificación.....	77
2.2. Hipótesis.....	79
2.3. Objetivos.....	80
CAPÍTULO III. RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	81
3.1. Efecto del βA en la coordinación de Cu <sup>2+</sup> a la proteína prion.....	81
3.2. Efecto de βA(1–16) en la coordinación de Cu <sup>2+</sup> al sitio de la α-His111 generado tras el procesamiento de la proteína prion por la α-secretasa.....	97
3.3. Reactividad de óxido nítrico con los complejos Cu <sup>2+</sup> -PrP formados en la región del <i>non-octarepeat</i> de la proteína prion.....	112
3.4. Reactividad de óxido nítrico con el complejo Cu <sup>2+</sup> -PrP formado en el sitio de la α-His111 generado tras el procesamiento de la proteína prion por la α-secretasa.....	120
CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN.....	124
4.1. Implicaciones funcionales del efecto del péptido βA en la unión de Cu <sup>2+</sup> a la PrP y la reactividad de óxido nítrico con los complejos Cu <sup>2+</sup> -PrP.....	125
4.2. Implicaciones funcionales del efecto del péptido βA en la unión de Cu <sup>2+</sup> al sitio de la α-His111 y de la reactividad de óxido nítrico con los complejos Cu <sup>2+</sup> -α-His111.....	131
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES.....	135
CAPÍTULO VI. PERSPECTIVAS.....	138
CAPÍTULO VII. REACTIVOS, MATERIALES Y MÉTODOS.....	143
7.1. Obtención de péptidos.....	143
7.2. Competencia por Cu <sup>2+</sup> entre el péptido βA(1–16) y la proteína prion.....	149
7.3. Reactividad de los complejos Cu <sup>2+</sup> -PrP con óxido nítrico.....	151
REFERENCIAS.....	153

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Características macroscópicas de un cerebro con EA.....	27
Figura 1.2 El péptido $\beta$ A: producción a partir de la proteína precursora amiloide y formación de un nuevo sitio de unión a $\text{Cu}^{2+}$ .....	37
Figura 1.3 Unión de $\text{Cu}^{2+}$ al péptido $\beta$ A.....	38
Figura 1.4 Representación lineal (a) y tridimensional de la proteína prion celular (b). .....	41
Figura 1.5 Unión de $\text{Cu}^{2+}$ a la proteína prion celular.....	43
Figura 1.6 Complejos de $\text{Cu}^+$ formados en el sitio de His111 tras la reducción de $\text{Cu}^{2+}$ .....	44
Figura 1.7 Corte proteolítico de la PrP <sup>C</sup> por la ADAM8 y su impacto en las propiedades de unión a $\text{Cu}^{2+}$ .....	46
Figura 1.9. Receptores NMDA: estructura y subunidades.....	53
Figura 1.10. Modulación de los receptores NMDA dependiente de $\text{Cu}^{2+}$ .....	55
Figura 1.11. Modulación de la actividad de los receptores NMDA dependiente de óxido nítrico.....	56
Figura 1.12. S-nitrosación de los NMDAR dependiente de PrP <sup>C</sup> y $\text{Cu}^{2+}$ .....	57
Figura 1.11. Átomos donadores presentes en las proteínas (bases de Lewis) y dureza del Cu (ácido de Lewis) en función de su estado de oxidación.....	58
Figura 1.13 Fundamentos de espectroscopia.....	59
Figura 1.14 Diferentes tipos de espectroscopias en función del tipo de radiación electromagnética y el tipo de transiciones promovidas. ....	60
Figura 1.15 Transiciones electrónicas observadas en los complejos metal-proteína (a) y bandas asociadas a estas transiciones electrónicas. ....	62
Figura 1.16. Uso de la espectroscopia de absorción electrónica para estudiar la cinética de reacciones de oxido-reducción de $\text{Cu}^{2+}$ a $\text{Cu}^+$ .....	63
Figura 1.17 Estudio de complejos metal-proteína por dicroísmo circular electrónico.....	65
Figura 1.18 Espectros de absorción electrónica (a y c) y dicroísmo circular electrónico de un complejo $\text{Cu}^{2+}$ -péptido (b y d). ....	66
Figura 1.19 Efecto Zeeman entre estados de espín de una especie paramagnética sometida a un campo magnético externo (a) y espectro de ESR (b). ....	67
Figura 1.20 Acoplamiento hiperfino del espín electrónico de $\text{Cu}^{2+}$ con su espín nuclear.....	68
Figura 1.21 Correlación de Peisach y Blumberg para identificar modos de coordinación de complejos de $\text{Cu}^{2+}$ a partir de los espectros de ESR. ....	69
Figura 1.22 Acoplamiento hiperfino del espín electrónico de $\text{Cu}^{2+}$ con su espín nuclear.....	70

Figura 1.23 Espectros de CD de los complejos $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A}$ y $\text{Cu}^{2+}$ -PrP.....	71
Figura 1.24 Espectros de ESR de los complejos $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A}$ y $\text{Cu}^{2+}$ -PrP.....	73
Figura 3.1. Los espectros del componente 3 y el complejo $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A}(1-16)$ se muestran en color verde oliva y negro. ....	82
Figura 3.2. Titulación del componentes 1 y 2 del complejo $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(60-91) con $\beta\text{A}(1-16)$ seguido por CD (a) y ESR (b). ....	84
Figura 3.3. Comparación de los espectros de CD (a) y ESR (b) para evidenciar la formación del componente 3 tras titular los componentes 1 y 2 con 0.4 equivalentes de $\beta\text{A}(1-16)$ .....	85
Figura 3.4. Comparación de espectros de ESR para evidenciar la formación del componente 3 tras titular los modos de alta ocupación (componente 1 y 2) con 2.0 equiv de $\beta\text{A}(1-16)$ . ....	87
Figura 3.5. Efecto del $\beta\text{A}(1-16)$ en la coordinación de $\text{Cu}^{2+}$ a la región OR de la proteína prion.....	88
Figura 3.6. En los espectros de CD (a) y ESR (b-c) de la titulación de los modos de alta ocupación (componentes 1 y 2) con 0.4 equiv de $\beta\text{A}(1-16)$ es evidente la formación del complejo ternario $\text{OR}_4\text{-Cu}^{2+}\text{-}\beta\text{A}(1-16)$ y el componente 3.....	90
Figura 3.7. La relación entre el efecto Cotton del Modo II de $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A}(1-16)$ y el componente 1 (a) y sus modos de coordinación (b-c) revela algunos de los componentes de la esfera de coordinación del complejo $\text{OR}_4\text{-Cu}^{2+}\text{-}\beta\text{A}(1-16)$ .....	91
Figura 3.8. Modo de coordinación propuesto para el complejo ternario $\text{OR}_4\text{-Cu}^{2+}\text{-}\beta\text{A}(1-16)$ . El modo de coordinación propuesto para el complejo ternario $\text{OR}_4\text{-Cu}^{2+}\text{-}\beta\text{A}(1-16)$ formado a partir del componente 1 involucra los siguientes ligantes: el nitrógeno del grupo amino terminal y la amida desprotonada de la Ala-2 del $\beta\text{A}(1-16)$ , el imidazol del un <i>octarepeat</i> de la PrP y otro ligante (nitrógeno u oxígeno) que puede provenir del $\beta\text{A}(1-16)$ o del <i>octarepeat</i> de la PrP. ....	92
Figura 3.9 Titulación del complejo $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(92-99) con $\beta\text{A}(1-16)$ seguido por CD (a) y ESR (b).....	94
Figura 3.10. Titulación del el complejo $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(106-115) con $\beta\text{A}(1-16)$ seguido por CD (a) y ESR (b).....	95
Figura 3.12. Titulación del Modo I del complejo $\text{Cu}^{2+}$ - $\alpha$ -His111 con $\beta\text{A}(1-16)$ seguido por CD (a) y ESR (b). ....	98
Figura 3.13. Titulación del Modo II del complejo $\text{Cu}^{2+}$ - $\alpha$ -His111 con $\beta\text{A}(1-16)$ seguido por CD (a) y ESR (b). ....	99
Figura 3.14. Titulación del Modo II del complejo $\text{Cu}^{2+}$ - $\alpha$ -His111 con 0.6 equiv de $\beta\text{A}(1-16)$ produce una mezcla compleja de especies $\text{Cu}^{2+}$ -PrP y $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A}(1-16)$ .....	101
Figura 3.15. Titulación del Modo II del complejo $\text{Cu}^{2+}$ - $\alpha$ -His111 con 2.0 equiv de $\beta\text{A}(1-16)$ produce una mezcla compleja de especies $\text{Cu}^{2+}$ -PrP y $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A}(1-16)$ .....	102

Figura 3.16. Efecto de $\beta$ A(1–16) en la coordinación de $\text{Cu}^{2+}$ al sitio $\alpha$ -H111 .....	103
Figura 3.17. Comparación de los espectros de CD de Modo I del complejo $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(111–116) y el complejo ternario $\alpha$ -H111- $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta$ A(1–16) (a) y sus propuestas de los modos de coordinación (b-c).....	105
Figura 3.18. Comparación del Modo I del complejo $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(111–116) y el complejo ternario $\alpha$ -H111- $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta$ A(1–16): espectros de ESR (a), su derivada (b) y la correlación de Peisach and Blumberg (c).....	106
Figura 3.19. Simulaciones de los espectros de ESR del Modo I del complejo $\text{Cu}^{2+}$ - $\alpha$ -H111 (a) y el complejo ternario tipo Modo I (c), así como su derivada (b y d).....	106
Figura 3.20. La titulación del Modo II del complejo $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(111–116) con 0.2 equiv de $\beta$ A(1–16) forma un complejo ternario transitorio.....	109
Figura 3.21. Comparación de los complejos ternarios $\text{OR}_4$ - $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta$ A(1–16) y el complejo ternario transitorio $\alpha$ -H111- $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta$ A(1–16) en (a) y propuestas de modo de coordinación para el complejo ternario transitorio $\alpha$ -H111- $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta$ A(1–16) en (b). .....	109
Figura 3.22. Efecto de $\beta$ A(1–16) en la coordinación de $\text{Cu}^{2+}$ a la PrP (a) y el fragmento PrPC1 resultado del corte proteolítico $\alpha$ (b).....	111
Figura 3.23 Liberación de óxido nítrico a partir de NOC-12 y NOC-9 en solución (a-b) y posibles complejos de $\text{Cu}^{2+}$ formados con las diaminas derivadas de NOC-12 y NOC-9 (c-d).....	113
Figura 3.24. Espectros de absorción electrónica de los complejos de $\text{Cu}^{2+}$ formados durante la liberación de óxido nítrico a partir de NOC-12 (a) y NOC-9 (b).....	114
Figura 3.25. Espectros de absorción electrónica (a) y cambios en la absorbancia a 510 nm en función del tiempo (b) durante la reacción del complejo $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(92–99) con NOC-12 en condiciones anaeróbicas.....	115
Figura 3.26. Espectros de absorción electrónica (a) y cambios en la absorbancia a 510 nm (b) durante la reacción del complejo $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(92–99) con NOC-12 (de 2 a 9 horas de reacción).....	116
Figura 3.27. Espectros de absorción electrónica (a) y cambios en la absorbancia a 510 y 587 nm en función del tiempo (b) durante la reacción del complejo $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(106–115) con NOC-12 en condiciones anaeróbicas.....	117
Figura 3.28. Espectros de absorción electrónica (a) y cambios en la absorbancia a 510 nm (b) durante la reacción del complejo $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(106–115) con NOC-12 (de 3 a 9 horas de reacción).....	117
Figura 3.29. Espectros de absorción electrónica (a) y cambios en la absorbancia a 565 nm en función del tiempo (b), durante la reacción del complejo $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(106–115) con NOC-12, en condiciones anaeróbicas.....	118
Figura 3.30. Espectros de absorción electrónica (a) y cambios en la absorbancia a 510 y 565 nm en función del tiempo (b) durante la reacción del complejo $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(106–115) Met/Ile con NOC-12 en condiciones anaeróbicas. ....	119

Figura 3.31. Espectros de absorción electrónica (a) y cambios en la absorbancia a 510 nm (b) durante la reacción del complejo Cu <sup>2+</sup> -PrP(106–115) Met/Ile con NOC-12 (de 3 a 9 horas de reacción).....	120
Figura 3.32. Espectros de absorción electrónica durante la reacción del Modo II del complejo Cu <sup>2+</sup> -PrP(111–116) con NOC-12 en condiciones anaeróbicas. El espectro del complejo Cu <sup>2+</sup> -DEDA se incluye como control (línea color verde). .....	121
Figura 3.33. Efecto de βA y óxido nítrico en la coordinación de Cu <sup>2+</sup> a la PrP (a) y con el sitio de la α-His111 presente en el fragmento PrPC1 (b).....	123
Figura 4.1 Efecto de Cu <sup>2+</sup> en la conformación de la PrP <sup>C</sup> . En ausencia de Cu <sup>2+</sup> se favorece la conformación <i>trans</i> de la PrP <sup>C</sup> (A), donde el extremo <i>N</i> -terminal se encuentra libre y funciona como efecto neurotóxico. En presencia de Cu <sup>2+</sup> , el metal estabiliza la conformación <i>cis</i> a través de la formación de un complejo multi-His de entre la región OR y el dominio <i>C</i> -terminal de la PrP <sup>C</sup> . .....	126
Figura 4.2 Efecto del βA en la unión de Cu <sup>2+</sup> a la PrP <sup>C</sup> . En los escenarios I.A, II.A, III.A y IV.A se muestran los diferentes niveles de ocupación de los sitios de unión a Cu <sup>2+</sup> en el PrP <sup>C</sup> , mientras que en los escenarios I.B, II.B, III.B y IV.B se muestra el efecto del péptido βA en la unión de Cu <sup>2+</sup> a la PrP <sup>C</sup> .....	127
Figura 4.3 Posibles papel de cada sitio de unión a Cu <sup>2+</sup> de la PrP <sup>C</sup> en la modulación de los receptores NMDA. La modulación de los receptores NMDA dependiente de Cu <sup>2+</sup> y PrP <sup>C</sup> requiere de la región OR y non-OR. Las His de la región OR podrían participar en la estabilización de la conformación <i>cis</i> de la PrP <sup>C</sup> ; mientras que, las His de la región non-OR podrían participar en la unión PrP <sup>C</sup> -NMDAR o en la S-nitrosilación. ....	131
Figura 4.4 Unión de Cu <sup>2+</sup> a los fragmentos PrPN1 y PrPC1 de la PrP <sup>C</sup> y efecto del βA. En los escenarios I.A, II.A, se muestran los diferentes niveles de ocupación de los sitios de unión a Cu <sup>2+</sup> en el PrP <sup>C</sup> ; mientras que, en los escenarios I.B, II.B y II.C se muestra el efecto del péptido βA en la unión de Cu <sup>2+</sup> a la PrP <sup>C</sup> .....	132

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Características histopatológicas observadas en algunos modelos murinos transgénicos de la EA.....	28
Tabla 1.2 Estudios en los que se mide <i>cobre en suero</i> de pacientes con EA. ....	31
Tabla 1.3 Estudios en los que se mide <i>cobre en muestras de tejido cerebral</i> de pacientes con EA. ....	32
Tabla 1.4 Estudios que demuestran la acumulación de <i>cobre en las placas amiloides</i> de pacientes y modelos murinos de la EA.....	33
Tabla 1.5 Estudios preclínicos y clínicos en los que se explora el potencial terapéutico de quelantes de cobre en la EA.....	34
Tabla 1.6 Estudios en los que se demuestra la unión de cobre a las proteínas clave en la patología de la EA y su posible papel en la función y homeostasis de este metal.....	36
Tabla 1.7 Estudios donde se analiza la expresión de la PrP <sup>C</sup> en la EA y su acumulación en placas amiloides.....	45
Tabla 1.8 Estudios en los que se caracteriza la interacción de la PrP <sup>C</sup> y el $\beta$ A.....	48
Tabla 1.9 Estudios que relacionan la unión PrP <sup>C</sup> - $\beta$ A con <i>mecanismos neurotóxicos</i> de la EA y exploran el potencial terapéutico de la inhibición de esta interacción. ....	49
Tabla 1.10 Estudios que relacionan la unión PrP <sup>C</sup> - $\beta$ A con <i>mecanismos neuroprotectores</i> asociados a la EA.....	51
Tabla 1.11. Energía/longitud de onda a la cual se observan las bandas asociadas a las transferencias de carga metal-ligante.....	62
Tabla 1.12 Transiciones electrónicas observadas en los espectros de CD de los complejo Cu <sup>2+</sup> - $\beta$ A y Cu <sup>2+</sup> -PrP.....	72
Tabla 1.13 Espectro de ESR del complejo Cu <sup>2+</sup> - $\beta$ A.....	73
Tabla 1.14 Transiciones electrónicas de los complejos Cu <sup>2+</sup> - $\beta$ A(1-16), Cu <sup>2+</sup> -OR <sub>1</sub> y el complejo ternario OR <sub>1</sub> -Cu <sup>2+</sup> - $\beta$ A(1-16).....	75
Tabla 3.1. Parámetros de ESR de las diferentes muestras analizadas en la titulación del componente 3 con $\beta$ A(1-16). ....	82
Tabla 3.2. Parámetros de ESR de las diferentes muestras analizadas en la titulación de los modos de alta ocupación (componente 1 y 2) con $\beta$ A(1-16). ....	84
Tabla 3.3. Transiciones electrónicas observadas en el espectro de CD de las especies ternarias OR <sub>1</sub> -Cu <sup>2+</sup> - $\beta$ A(1-16) y OR <sub>4</sub> -Cu <sup>2+</sup> - $\beta$ A(1-16).....	90
Tabla 3.4. Parámetros de ESR de las diferentes muestras analizadas en la titulación del complejo Cu <sup>2+</sup> -PrP(92-99) con $\beta$ A(1-16). ....	94
Tabla 3.5. Parámetros de ESR de las diferentes muestras analizadas en la titulación del complejo Cu <sup>2+</sup> -PrP(106-115) con $\beta$ A(1-16).....	96

Tabla 3.6. Parámetros de ESR de las diferentes muestras analizadas en la titulación Modo I del complejo Cu <sup>2+</sup> -PrP(111–116) con βA(1–16).....	97
Tabla 3.7. Parámetros de ESR de las diferentes muestras analizadas en la titulación del complejo Cu <sup>2+</sup> -PrP(111–116) con βA(1–16). .....	100
Tabla 3.8. Parámetros de ESR utilizados en las simulaciones del Modo I y el complejo ternario tipo Modo I.....	107
Tabla 7.1. Fragmentos de la PrP y del péptido βA utilizados en el presente trabajo. ....	143
Tabla 7.2. Condiciones para el acople de Fmoc-aa asistido por microonda .....	145
Tabla 7.3. Programas cromatográficos (HPLC) utilizados para purificar los diferentes fragmentos de la PrP y el péptido βA sintetizados.. .....	146
Tabla 7.4. Condiciones para la liofilización de péptidos.....	147
Tabla 7.5. Programas cromatográficos (HPLC) utilizados para determinar el porcentaje de pureza los diferentes fragmentos de la PrP y el péptido βA sintetizados. ...	148
Tabla 7.6. Pureza de los péptidos sintetizados.....	149
Tabla 7.7. Concentraciones de PrP y sulfato de Cu <sup>2+</sup> utilizadas para formar los diferentes modos de coordinación Cu <sup>2+</sup> -PrP.....	150
Tabla 7.8. Condiciones empleadas para medir los espectros de ESR.....	151



## ABREVIATURAS

5-HT	5-hidroxitriptamina
ACN	Acetonitrilo
ADAM	Desintegrina y metaloproteasa
ALCP <sub>der</sub>	Absorbancia de la luz circularmente polarizada hacia la derecha
ALCP <sub>izq</sub>	Absorbancia de la luz circularmente polarizada hacia la izquierda
AMPA	Ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico
APP	Proteína precursora amiloide
ATP7A	ATPasa transportadora de cobre tipo A
ATP7B	ATPasa transportadora de cobre tipo B
BACE1	Enzima que corta a la proteína precursora amiloide en el sitio- $\beta$
BHE	Barrera hemato-encefálica
CAA	Angiopatía amiloide
CaM	Calcio-calmodulina
CD	Dicroísmo circular electrónico
Cp	Ceruloplasmina
cPLA2	Fosfolipasa A2 citosólica
CQ	Clioquinol
Cryo-EM	Microscopía electrónica criogénica
DBU	1,8-Diazobicyclo[5.4.0]undeca-7-eno
DCM	Diclorometano
DEDA	Dietilendiamina
DIC	N, N'-Diisopropilcarbodiimida
DMHDA	Dimetilhexdiamina
EA	Enfermedad de Alzheimer
EDT	Etano-1,2-ditiol
EOAD	Alzheimer de inicio temprano
ESR	Resonancia de espín electrónico
FAD	Alzheimer familiar
FDA	Administración de fármacos y alimentos
FTIRM	Micro-espectroscopia intrarroja con transformada de Fourier
GABA	Ácido gamma-amino butírico
GPI	Glicofosfatidilinositol
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
ICP-MS	Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente
INAA	Análisis instrumental de activación de neutrones
IPA	Isopropanol
$K_d$	Constante de disociación
LCP <sub>der</sub>	Luz circularmente polarizada hacia la derecha
LCP <sub>izq</sub>	Luz circularmente polarizada hacia la izquierda
LMCT	Transferencias de carga ligante-metal
LPR1	Receptor relacionado con lipoproteínas de baja densidad
LTD	Depresión a largo plazo, por sus siglas en inglés
LTP	Potenciación a largo plazo
MeOH	Metanol

mGluR5	Receptor glutamatérgico metabotrópico tipo 5
MS	Espectrometría de masas
NCAM	Molécula de adhesión de células neuronales
NEM	N-etilmofolina
NHE	Electrodo normal de hidrógeno
NMDA	N-metil-D-aspartato
NMDAR	Receptor para N-metil-D-aspartato
nNOS	Óxido nítrico sintasa neuronal
NO•	Óxido nítrico
NOC-12	Donador de óxido nítrico 12
NOC-9	Donador de óxido nítrico 9
non-OR	non-octarepeat
OMS	Organización mundial de la salud
OR	Octarepeat
OR <sub>1</sub>	Péptido (PHGGGWGQ) <sub>1</sub>
OR <sub>2</sub>	Péptido (PHGGGWGQ) <sub>2</sub>
OR <sub>3</sub>	Péptido (PHGGGWGQ) <sub>3</sub>
OR <sub>4</sub>	Péptido (PHGGGWGQ) <sub>4</sub>
oβA	Oligómeros de β-amiloide
PDB	Base de datos de proteínas
PrP	Proteína prion
PrP <sup>C</sup>	Proteína prion celular
PrPC1	Fragmento C1 de la proteína prion
PrPN1	Fragmento N1 de la proteína prion
PS1	Presenilina-1
PS2	Presenilina-2
PSD-95	Proteína de densidad post-sináptica 95
PVDF	Poli(vinil)fluoruro
rPrP	Proteína prion recombinante
SAM	Modulador de los mGluR5
SNC	Sistema nervioso central
STI1	Proteína inducida por estrés
SXRF	Fluorescencia de rayos-X
TFA	Ácido trifluoroacético
TIS	Triisopropilsilano
UV-vis	Ultravioleta-visible
Vn	Vibronectina
XAS	Espectroscopia de absorción de rayos-X
ZnT3	Transportador de zinc 3
βA	β-amiloide

## RESUMEN

El  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ A) es un péptido de 38–43 aminoácidos que une  $\text{Cu}^{2+}$  con alta afinidad en el extremo *N*-terminal. La acumulación del  $\beta$ A y la alteración de la homeostasis de cobre son dos características observadas en cerebros afectados por la Enfermedad de Alzheimer. Estudios recientes demostraron que el  $\beta$ A inhibe dos mecanismos neuroprotectores que requieren de  $\text{Cu}^{2+}$  y de la proteína prion celular ( $\text{PrP}^{\text{C}}$ ). El  $\beta$ A y otros quelantes de  $\text{Cu}^{2+}$  previenen la unión de la  $\text{PrP}^{\text{C}}$  a los receptores para *N*-metil-D-aspartato (NMDAR) y también reducen la S-nitrosilación de los residuos de Cys del NMDAR. En ambos casos, el efecto del  $\beta$ A y otros quelantes provoca la sobreactivación del receptor y hace vulnerables a las neuronas a sufrir lesiones por exitotoxicidad. En este contexto, se ha propuesto que los complejos  $\text{Cu}^{2+}$ - $\text{PrP}^{\text{C}}$  pueden catalizar la reacción de S-nitrosilación y se ha asociado la toxicidad del  $\beta$ A a su capacidad para competir por  $\text{Cu}^{2+}$  con la  $\text{PrP}^{\text{C}}$ .

La  $\text{PrP}^{\text{C}}$  une hasta seis átomos de  $\text{Cu}^{2+}$  en su extremo *N*-terminal: de uno a cuatro en la región *octarepeat* (OR)—dando lugar a tres modos de coordinación (componentes 1, 2 y 3)—y dos en los sitios de His96 e His111 de la región *non-octarepeat* (non-OR). Además, el procesamiento proteolítico de la  $\text{PrP}^{\text{C}}$  por las  $\alpha$ -secretasas produce un nuevo sitio de unión a  $\text{Cu}^{2+}$  conocido como  $\alpha$ -His111. Previamente, se demostró que la afinidad y reactividad de los complejos  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP dependen del modo de coordinación. Por lo que, en este trabajo se evaluó el efecto del  $\beta$ A sobre la coordinación de  $\text{Cu}^{2+}$  en cada sitio de unión a metal presente en la  $\text{PrP}^{\text{C}}$  y la reactividad de óxido nítrico de los complejos  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP, utilizando diferentes técnicas espectroscópicas.

Los resultados obtenidos demuestran que el efecto del  $\beta$ A en la coordinación de  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP y la reactividad de los complejos  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP son sitio-específicos. En la región OR, el  $\beta$ A no puede remover al  $\text{Cu}^{2+}$  del componente 3, forma complejos ternarios OR- $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta$ A con el componente 1 y altera el equilibrio entre los componentes 1, 2, y 3 en favor del componente 3. Por otra parte, el  $\beta$ A remueve completamente el  $\text{Cu}^{2+}$  de los sitios de His96 e His111 en la región non-OR y forma dos complejos ternarios distintos en el sitio de la  $\alpha$ -His111. De forma similar, la reactividad de los complejos  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP frente al óxido nítrico es diferente para cada

sitio de unión: el óxido nítrico reacciona con mayor rapidez con el complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -His111 en comparación con el complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -His96 y es inerte ante el complejo  $\text{Cu}^{2+}$ - $\alpha$ -His111.

En conjunto, los resultados de este trabajo sugieren que el  $\beta$ A puede afectar las funciones de la PrP<sup>C</sup> que dependen de  $\text{Cu}^{2+}$  a través de varios mecanismos: por competencia por el metal, por la formación de especies ternarias PrP<sup>C</sup>- $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta$ A y por el cambio en los equilibrios entre las diferentes especies  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP<sup>C</sup>. Además, los resultados de este estudio señalan al sitio de la His111 como el mejor candidato para catalizar la reacción de S-nitrosilación. Estos hallazgos contribuyen al entendimiento de la química detrás de la modulación del receptor NMDA dependiente de  $\text{Cu}^{2+}$  y PrP<sup>C</sup> y de cómo ésta se podría ver afectada por la acumulación del péptido  $\beta$ A observada en la enfermedad de Alzheimer.

## ABSTRACT

The amyloid-beta ( $A\beta$ ) is a peptide of 38–43 amino acids that binds  $Cu^{2+}$  with high affinity at its *N*-terminal region. Accumulation of  $A\beta$  and disruption of copper homeostasis are two hallmarks of Alzheimer's disease. Recent studies demonstrated that  $A\beta$  inhibits two neuroprotective mechanisms dependent on  $Cu^{2+}$  and the cellular prion protein (PrP<sup>C</sup>).  $A\beta$  and other copper chelators can interfere with the binding between PrP<sup>C</sup> and N-methyl-D-aspartate receptors (NMDAR) and reduce S-nitrosylation of Cys residues at NMDAR. In both cases,  $A\beta$  and copper chelators induce overactivation of the NMDAR receptor and excitotoxicity. In this context, it has been proposed that the complexes  $Cu^{2+}$ -PrP<sup>C</sup> catalyze the S-nitrosylation, and the  $A\beta$  toxicity is associated with its ability to remove  $Cu^{2+}$  from PrP<sup>C</sup>.

The PrP<sup>C</sup> binds up to six  $Cu^{2+}$  ions at its *N*-terminal region: from one to four at the *octarepeat* region (OR)—yielding three coordination modes (components 1, 2, and 3)—and two at the His96 and His111 sites in the non-OR region. Additionally, a new  $Cu^{2+}$  binding site, termed  $\alpha$ -His111, is formed after the proteolytic processing of PrP<sup>C</sup> by  $\alpha$ -secretases at Lys110/His111. Previously, it has been demonstrated that the affinity and reactivity of the  $Cu^{2+}$ -PrP complexes depend on the coordination mode. Therefore, in this study, we evaluated the effect of  $A\beta$  on  $Cu^{2+}$  coordination at each metal-binding site of PrP<sup>C</sup> and the reactivity of nitric oxide with the complexes  $Cu^{2+}$ -PrP using different spectroscopic techniques.

Our results show that both, the effect of  $A\beta$  and the reactivity with nitric oxide, are site-specific. At the OR region,  $A\beta$  cannot remove  $Cu^{2+}$  from component 3, while it forms ternary complexes OR- $Cu^{2+}$ - $\beta A$  with component 1 and perturbs the equilibrium between components 1, 2, and 3. On the other hand,  $A\beta$  removes all the  $Cu^{2+}$  from His96 and His111 sites at the non-OR region, while it forms two different ternary complexes at the  $\alpha$ -His111 site. Similarly, the reactivity of  $Cu^{2+}$ -PrP complexes depends on the metal-binding site: nitric

oxide reacts faster with the  $\text{Cu}^{2+}$ -His111 than with the  $\text{Cu}^{2+}$ -His96 complex, and it cannot react with the  $\text{Cu}^{2+}$ - $\alpha$ -His111 complex.

Overall, the spectroscopic results suggest that  $\text{A}\beta$  can affect the  $\text{Cu}^{2+}$ -dependent functions of  $\text{PrP}^{\text{C}}$  through several mechanisms, including removal of the metal ion, formation of ternary complexes  $\text{PrP}^{\text{C}}\text{-Cu}^{2+}\text{-A}\beta$ , and perturbing the equilibrium between the different  $\text{Cu}^{2+}$ - $\text{PrP}^{\text{C}}$  species. Moreover, this study points to the His111 site as the best candidate site to catalyze the S-nitrosylation reaction. Taken together, in this report, we provide new insights into the chemistry involved in the  $\text{Cu}^{2+}$ -dependent modulation of NMDAR by  $\text{PrP}^{\text{C}}$  and how it is affected by the accumulation of  $\text{A}\beta$  observed in Alzheimer's disease.

## INTRODUCCIÓN

A lo largo de la historia, uno de los grandes retos de la humanidad ha sido entender cómo funciona el cerebro, cuáles son las bases moleculares de la consciencia, el aprendizaje y la memoria.<sup>1,2</sup> A este reto se ha sumado la necesidad de comprender aquellos mecanismos que dañan y destruyen el sistema nervioso central (SNC), entre ellos los asociados a la neurodegeneración.<sup>3</sup> En este contexto, la enfermedad de Alzheimer (EA) es todo un enigma, ya que afecta de forma severa el aprendizaje, la memoria y la consciencia—procesos cuya fisiología aún no se comprende—e involucra procesos patológicos progresivos que parecen imposibles de detener.

En 1906 el psiquiatra Alois Alzheimer describió por primera vez clínica, anatómica e histológicamente la enfermedad que hoy lleva su nombre.<sup>4,5</sup> En el reporte de Alzheimer se documentó el caso de una mujer de 50 años con desordenes del sueño, problemas de memoria, agresividad, llanto y confusión progresiva.<sup>4,5</sup> En el análisis *postmortem* del cerebro de esta paciente, se asoció esta sintomatología con la presencia de dos tipos de lesiones: las placas amiloides y las marañas neurofibrilares.<sup>4,5</sup> Después de un siglo de investigación se ha acumulado una gran cantidad de conocimiento sobre la EA: actualmente se conoce que los principales componentes de las placas amiloides y las marañas neurofibrilares son el péptido  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ A) y la proteína tau hiperfosforilada, se han obtenido imágenes con resolución atómica de la estructura que adoptan estas proteínas en muestras derivadas de cerebros humanos,<sup>6,7</sup> e incluso en estudios recientes se ha logrado monitorear la presencia de estos marcadores en el cerebro de pacientes vivos.<sup>8</sup> De igual forma, se han identificado varias vías de señalización involucradas en el desarrollo de la patología y se ha estudiado con gran detalle cómo cada componente del SNC se ve afectado en la EA: neuronas, microglia,

astrocitos y vasos sanguíneos.<sup>9-12</sup> Sin embargo, a pesar de todo este conocimiento generado sobre la EA seguimos sin entender por completo los cambios bioquímicos que determinan la transición entre un cerebro sano y un cerebro con EA, cómo estos cambios se traducen en adaptaciones estructurales y funcionales observadas en los principales tipos celulares del SNC y finalmente cómo se desencadena la neurodegeneración descontrolada. Éste ha sido el mayor obstáculo para desarrollar una terapia efectiva que detenga o revierta el curso de la enfermedad.<sup>13</sup>

En este punto, es importante recordar que cada red neuronal, axón, dendrita, sinapsis, proteína, y ácido nucleico está formado por átomos. La organización de estos átomos determina la estructura de las proteínas y los cambios conformacionales que dan lugar a la activación de vías de señalización, y también determina las modificaciones estructurales y funcionales que sufren las estructuras celulares. Por lo que, a la par del estudio del impacto de la EA a nivel anatómico, estructural y funcional, es necesario estudiar la dinámica de los mecanismos asociados con patología a una escala atómica. Esto con la finalidad de elucidar con precisión cuáles son los elementos clave en la transición de un cerebro sano a un cerebro con EA.

En las células, la mayor parte de la señalización está gobernada por los cambios en el potencial de membrana, las interacciones proteína-proteína, la unión de moléculas de señalización a receptores y la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  a proteínas. El potencial de membrana de las células a su vez está determinado por la concentración de metales alcalinos/alcalinoterreos ( $\text{Na}^{1+}$ ,  $\text{K}^{+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$ ) en cada compartimento y su movimiento a través de canales iónicos.<sup>14-16</sup> Por otra parte, el  $\text{Ca}^{2+}$  es un mediador clave en la señalización celular, ya que se une a diferentes proteínas y provoca cambios conformacionales que activan o inhiben vías de señalización.<sup>17</sup> En estudios recientes se ha propuesto que otros metales como el  $\text{Cu}^{2+}$  pueden participar en la comunicación celular al promover modificaciones postraduccionales como la S-nitrosilación.<sup>18</sup> Sin embargo, es importante destacar que las propiedades químicas del  $\text{Cu}^{2+}$  son muy diferentes a las de los metales alcalino/alcalinoterreos ( $\text{Na}^{+}$ ,  $\text{K}^{+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$ ).<sup>19-22</sup> Los metales como  $\text{Na}^{+}$ ,  $\text{K}^{+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$  tienen una alta solubilidad en agua y su unión a proteínas ocurre a través de interacciones débiles (principalmente electrostáticas). Estas propiedades



permiten que el  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  se puedan mover rápidamente entre los compartimentos celulares y transmitan señales eléctricas.<sup>19-22</sup> Por el contrario, el  $\text{Cu}^{2+}$  es un metal de transición, poco soluble en agua y cuya distribución en las células está estrictamente regulada por su unión a una red de proteínas.<sup>19-22</sup> A diferencia del  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , el  $\text{Cu}^{2+}$  es altamente reactivo: puede aceptar electrones y promover reacciones de óxido-reducción como la activación de oxígeno y la S-nitrosilación.<sup>19-22</sup> En este trabajo se estudió la interacción entre  $\text{Cu}^{2+}$  y dos de las proteínas señaladas como clave en la patología de la EA—la proteína prion celular y el péptido  $\beta\text{A}$ —con la finalidad de entender cómo las propiedades químicas del metal pueden contribuir a la función de estas proteínas y/o a su toxicidad.

En el Capítulo I de esta Tesis se analiza la evidencia que señala al  $\text{Cu}^{2+}$ , al péptido  $\beta\text{A}$  y a la PrP<sup>C</sup> como elementos clave en la EA y se explica cómo la espectroscopia puede ayudar a entender el papel del  $\text{Cu}^{2+}$  y estas proteínas en la EA. En el Capítulo II se delimitan los objetivos de esta investigación y su metodología. En el Capítulo III se presentan y analizan los resultados obtenidos. Finalmente, en los capítulos IV V y VI se discute la relevancia de dichos resultados y se delinea el camino a seguir para estudiar estas interacciones en sistemas más complejos, donde aún es complicado elucidar con detalle atómico la interacción proteína-proteína e interacción metal-proteína.

*“Un equipo interdisciplinario no es aquel donde el biólogo hace biología, el físico hace física y el químico hace química. Es aquel donde el biólogo ve el mundo a través de los ojos de físico y el químico y permite que ellos lo vean a través de los suyos, para juntos tener una visión más completa de la realidad”*

*“La vida no conoce las fronteras de la ciencia”*

*Yanahi Posadas*

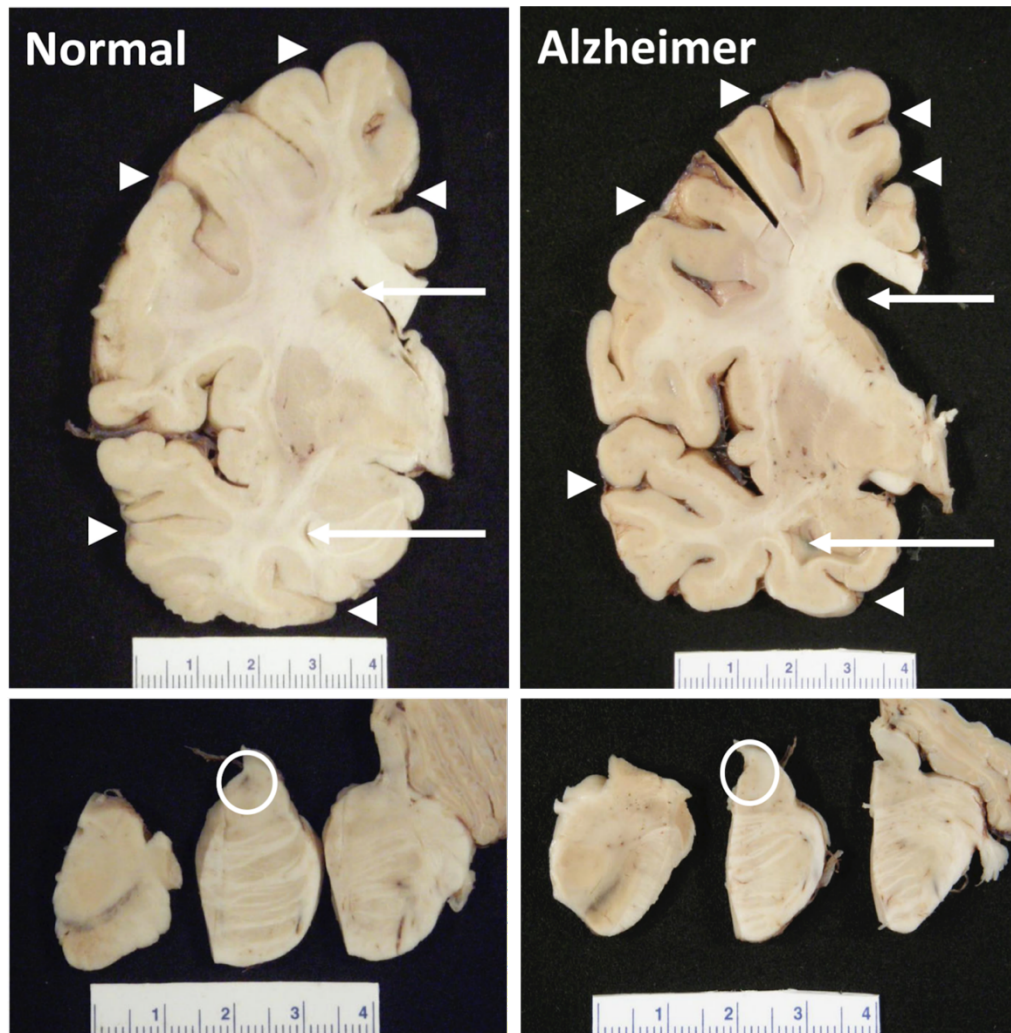
## CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

### 1.1. La enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un desorden crónico-neurodegenerativo observado exclusivamente en humanos y asociado con el envejecimiento.<sup>23</sup> Clínicamente, la EA se caracteriza por la pérdida gradual de memoria, la cual progresa a deterioro cognitivo severo, afectando el comportamiento, el habla, la orientación visual y espacial, y en etapas tardías el sistema motor.<sup>24, 25</sup> El daño en el cerebro de los pacientes afectados por EA se distingue a nivel macroscópico *post-mortem*, donde se observa una disminución de la masa total del cerebro, los ventrículos y los surcos corticales se encuentran agrandados y el *locus coeruleus* hipopigmentado (Ver Figura 1.1).<sup>24</sup> Las regiones más atrofiadas son la amígdala, el hipocampo y la corteza cerebral, principalmente en las zonas temporal y frontal, las áreas de asociación y el lóbulo límbico.<sup>24</sup> En el examen microscópico del cerebro con EA, se detectan dos tipos lesiones: en el espacio extracelular, las placas amiloides formadas principalmente por el péptido  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ A), y dentro de las neuronas, las marañas neurofibrilares compuestas esencialmente por la proteína tau hiperfosforilada.<sup>24</sup> Este tipo de lesiones están frecuentemente asociadas a neuritas distróficas y cuerpos neuronales dañados.<sup>24, 26</sup> Aunque la relación entre los agregados proteicos y los mecanismos que desencadenan la neurodegeneración aún está en controversia, la evidencia indica que sus principales componentes—el péptido  $\beta$ A y la proteína tau—desempeñan un papel clave en el desarrollo de la patología de la EA.<sup>27</sup>

El péptido  $\beta$ A es un fragmento de 40–43 aminoácidos secretado al espacio extracelular después del corte proteolítico de la proteína precursora amiloide (APP) por las  $\beta$ -,  $\gamma$ -secretasas.<sup>28</sup> Por otra parte, tau es una proteína intracelular que se une a los microtúbulos y regula el transporte axonal.<sup>28</sup> Mutaciones específicas en los genes que codifican para la APP y para las proteínas que forman el complejo de la  $\gamma$ -secretasa—presenilina-1 (PS1) y presenilina-2 (PS2)—son suficientes para causar la EA.<sup>29</sup> En estudios *in vitro* con células troncales neuronales humanas, se demostró que las mutaciones en APP, PS1 y PS2 desencadenan la agregación de la proteína tau, la cual se ve disminuida tras inhibir la

producción del  $\beta A$ .<sup>30</sup> En conjunto, esto sustenta el papel central de APP y el péptido  $\beta A$  en los mecanismos patológicos de la EA.



**Figura 1.1 Características macroscópicas de un cerebro con EA.** En el panel superior izquierdo se muestra la vista lateral de un cerebro sano y en el panel superior derecho la de un cerebro con EA. En esta comparación, se aprecia un agrandamiento en surcos corticales (puntas de flecha) y los ventrículos laterales (flechas completas). En los paneles inferiores derecho e izquierdo se muestra el tegumento pontino, donde se encuentra las neuronas pigmentadas del *locus coeruleus* (círculo blanco), cuya pérdida es característica distintiva del cerebro con EA. Adaptado de la referencia (24).

Hasta el momento se han identificado más de 272 mutaciones asociadas con la EA, la mayoría de ellas se encuentran en el gen que codifica para PS1 (233 mutaciones), 32 mutaciones en el gen que codifica para APP, y 20 en el gen que codifica para PS2.<sup>29</sup> Los pacientes portadores de alguna de estas mutaciones presentan un cuadro agresivo de la enfermedad caracterizado por el inicio temprano de los síntomas, los cuales se pueden

manifestar desde los 25 años en algunos casos y en promedio a los 46 años.<sup>29, 31</sup> A este tipo de EA se le conoce como Alzheimer Familiar (FAD, por sus siglas en inglés) o Alzheimer de inicio temprano (EOAD, por sus siglas en inglés).<sup>24</sup> Los casos de FAD representan menos del 5% del total de los diagnósticos de la EA, el 95% restante tiene una etiología esporádica y se observan principalmente en personas mayores de 65 años.<sup>24, 31</sup> Aunque los pacientes con EA de origen esporádico no presentan las mutaciones asociadas con FAD en su línea genética germinal, al analizar *post-mortem* las neuronas dañadas de los cerebros de este tipo de pacientes se han identificado una gran diversidad de transcritos (mRNA) que no se observan en neuronas sanas.<sup>32</sup> Entre estos transcritos se encuentran varias de las mutaciones de APP asociadas con FAD, las cuales podrían provenir de un proceso de recombinación.<sup>32</sup> Lo anterior resalta la importancia de APP no solo en los casos de FAD, sino también en aquellos casos de etiología esporádica.<sup>32</sup> De forma consistente, a pesar de que la EA parece afectar únicamente a humanos, se han generado modelos murinos transgénicos en los que se sobreexpresan las secuencias humanas de las proteínas APP, PS1 o PS2 con las mutaciones asociadas a los casos de FAD.<sup>23, 33-36</sup> Estos modelos transgénicos reproducen, al menos en cierta medida, las características histopatológicas observadas en la EA y el deterioro progresivo en la memoria (Ver Tabla 1.1).<sup>23, 33-36</sup>

**Tabla 1.1 Características histopatológicas observadas en algunos modelos murinos transgénicos de la EA.**

Modelo	Mutaciones	Características histopatológicas	Ref.
APP <sup>swe</sup> / PS1 <sup>dE9</sup>	APP: K970N/M671L PS1: Eliminación del exón 9	Presenta depósitos de $\beta$ A en el parénquima desde los 4 meses y la activación de glia a partir de los 6 meses. No presenta marañas neurofibrilares.	<sup>33</sup>
APPV717I	APP: V717I	Las placas amiloides se observan hasta los 12 meses. En las placas amiloides se detecta tau hiperfosforilada, pero no se observan marañas neurofibrilares.	<sup>34</sup>
5xFAD	APP: K670N/M671L, I716V, V717I PS1: M146L, L286V	Presenta placas amiloides y gliosis desde los 1.5 meses. También presenta $\beta$ A intraneuronal en dendritas y soma, acompañada de pérdida neuronal en corteza y subiculum. No presenta marañas neurofibrilares.	<sup>35, 36</sup>
Tg2576	APP: K670/M671L	Presenta placas amiloides, se observa tau fosforilada en placas con neuríticas distróficas, pero no fibras de tau. No se observan marañas neurofibrilares.	<sup>37</sup>
APP751SL	APP: K670N/M671L, V717I	Presenta placas amiloides desde los 3–4 meses, la edad a la que aparecen las placas depende de los niveles de expresión de la APP mutante. Se observan neuritas distróficas positivas para APP y tau. No se observan marañas neurofibrilares.	<sup>38</sup>

Debido al papel central del  $\beta$ A, APP y las presenilinas (PS1 y PS2) en la patología de la EA, gran parte de las estrategias terapéuticas propuestas tienen como objetivo inhibir el procesamiento proteolítico de la APP que da lugar al péptido  $\beta$ A, o bien facilitar la eliminación del  $\beta$ A,<sup>39</sup> dejando de lado la comprensión de la función de APP y las implicaciones del  $\beta$ A en dicha función. Estudios con ratones que carecen de los genes que codifican para APP han demostrado que esta proteína participa en el desarrollo del sistema nervioso central (SNC), la formación de sinapsis, la diferenciación neuronal y la plasticidad sináptica.<sup>40</sup> Además, en este mismo tipo de investigaciones, se ha observado que la ausencia de APP provoca alteraciones importantes en la homeostasis de metales de transición, tales como hierro y cobre.<sup>41</sup> Por otra parte, al reducir la expresión del gen que codifica para PS1 en cultivo celular disminuye la entrada de cobre y zinc.<sup>42</sup> En general, esta evidencia indica que existe un vínculo entre las principales proteínas asociadas a la EA—APP y PS1—y la homeostasis de metales de transición como el cobre. Lo anterior es consistente con las alteraciones de la homeostasis de cobre observadas en los ratones transgénicos 5xFAD y Tg2576 utilizados para el estudio de la EA (Ver Tabla 1.1).<sup>43, 44</sup> En la siguiente sección se analiza la evidencia científica que demuestra una relación entre la homeostasis de cobre y la EA.

## **1.2. El ion cobre en la enfermedad de Alzheimer**

El cobre es un metal indispensable para el desarrollo, maduración y funcionamiento del SNC.<sup>45</sup> Este metal participa en varios procesos importantes para las células neuronales, tales como: la transmisión sináptica, la neurogénesis, la neuritogénesis y la mielinización.<sup>45</sup> En los seres vivos, el cobre se puede encontrar en dos estados de oxidación,  $\text{Cu}^+$  y  $\text{Cu}^{2+}$ , lo cual le confiere la capacidad de catalizar reacciones de óxido-reducción y participar en procesos que requieren transferencia de electrones.<sup>46</sup> Estas propiedades químicas del cobre son aprovechadas por sistemas enzimáticos implicados en el metabolismo energético (citocromo c oxidasa), la detoxificación de radicales libres (superóxido dismutasa), la pigmentación (tirosinasa), la maduración de neuropéptidos (peptidil- $\alpha$ -monooxigenasa), y la síntesis de neurotransmisores (dopamina  $\beta$ -hidroxilasa).<sup>46</sup> En el cerebro, el cobre además de ser un cofactor enzimático participa en la modulación de canales iónicos sensibles a neurotransmisores (receptores  $\text{GABA}_A$ , AMPA y NMDA), y canales de calcio activados por

voltaje, ambos indispensables para la transmisión sináptica.<sup>18, 47-51</sup> Dada la importancia funcional del cobre, la alteración de su homeostasis puede provocar un desbalance en las catecolaminas, mielinización aberrante de las neuronas, pérdida de la arquitectura cerebral y un amplio espectro de síntomas neurológicos y psiquiátricos.<sup>45</sup> Tanto el exceso como la deficiencia de cobre pueden causar neurodegeneración. Un claro ejemplo de lo anterior es: la enfermedad de Menkes—deficiencia de cobre en el cerebro provocada por mutaciones en el transportador de cobre ATP7A—y la enfermedad de Wilson—acumulación de cobre en el cerebro asociada a mutaciones en la ATP7B—, ambas enfermedades provocan una disfunción neurológica progresiva.<sup>52, 53</sup>

En pacientes con EA y en algunos modelos murinos se han documentado alteraciones en la homeostasis de cobre: los niveles de este metal son deficientes en el tejido cerebral (Ver Tabla 1.3),<sup>44, 54-60</sup> mientras que se acumula en suero (ver Tabla 1.2),<sup>61-66</sup> y en las placas amiloides (Ver Tabla 1.4).<sup>43, 67-69</sup> En la sangre de individuos sanos aproximadamente entre el 85–95% del cobre se encuentra unido a ceruloplasmina (Cp). Sin embargo, en pacientes con EA se incrementa la proporción de cobre no unido a Cp, también conocido como cobre lábil. Los niveles de cobre lábil observados en suero de pacientes con EA son comparables con los detectados en la enfermedad de Wilson.<sup>66</sup> Recientemente, se identificaron dos variantes en el gen del transportador de cobre asociado con la enfermedad de Wilson (ATP7B), cuya presencia incrementa el riesgo de pacientes con EA para acumular cobre lábil en el suero.<sup>65</sup> Aunque a nivel periférico la afectación en la homeostasis de cobre en los pacientes con EA es similar a la observada en la enfermedad de Wilson, a nivel central se presenta una deficiencia de este metal (Ver Tabla 1.3), contrario a la acumulación de cobre en el cerebro característica de la enfermedad de Wilson y similar a lo observado en la enfermedad de Menkes.<sup>70</sup> Las características del desbalance de la homeostasis de cobre en la EA, comparables con lo que ocurre en la enfermedad de Wilson y Menkes, sugieren que este metal podría estar implicado en los mecanismos patológicos que afectan el tejido cerebral en la EA.

**Tabla 1.2 Estudios en los que se mide cobre en suero de pacientes con EA.**

Año	Nombre del estudio	Hallazgo principal	Técnica utilizada	Ref.
2011	Copper in Alzheimer's disease: a meta-analysis of serum, plasma, and cerebrospinal fluid studies	Niveles elevados de cobre en suero de pacientes con EA.	Diferentes técnicas (Meta-análisis)	61
2013	ATP7B variants as modulators of copper dyshomeostasis in Alzheimer's disease	Niveles altos de cobre unido a ceruloplasmina (Cp) y cobre no unido a Cp, en suero de pacientes con EA. Pacientes con EA y el polimorfismo de un solo nucleótido ATP7B rs7323774 presentan mayores niveles de cobre no unido a Cp en suero.	Método colorimétrico y espectrometría de absorción atómica.	62
2014	Meta-analysis of serum non-ceruloplasmin copper in Alzheimer's disease	Niveles altos de cobre total y cobre no unido a Cp, en suero de pacientes con EA.	Diferentes técnicas (Meta-análisis)	63
2016	Electroencephalographic fractal dimension in healthy ageing and Alzheimer's disease	Niveles altos de cobre no unido a Cp aparentemente aceleran la reducción de actividad neuronal compleja observada en individuos con EA.	Método bioquímico (no se especifican detalles)	64
2017	Measurements of serum non-ceruloplasmin copper by a direct fluorescent method specific to Cu <sup>2+</sup>	Se validó un método directo para determinar cobre no unido a Cp por fluorescencia. Los niveles de cobre no unido a Cp son 1.5 veces mayores en pacientes con EA.	Sensor fluorescente específico para Cu <sup>2+</sup> .	71
2017	Non-ceruloplasmin copper distincts subtypes in Alzheimer's disease: a genetic study of ATP7B frequency	Los pacientes con la variante genética de ATP7B (rs732774 genotipo GG y TT) tienen 1.7–1.8 veces más riesgo de tener niveles de cobre no unido a Cp alto, en comparación con quienes no tienen esta variante.	Sensor fluorescente específico para Cu <sup>2+</sup> .	65
2018	Copper dyshomeostasis in Wilson disease and Alzheimer's disease as shown by serum and urine copper indicators	El nivel de cobre no unido a Cp en suero es similar en pacientes con enfermedad de Wilson y EA.	Espectrometría de absorción atómica.	66

Además de la deficiencia de cobre en el tejido cerebral y la acumulación de cobre lábil en suero de pacientes con la EA, este metal se acumula en las placas amiloides, particularmente en aquellas que rodean los vasos sanguíneos.<sup>43, 44, 58-60, 67-69</sup> Por lo cual, el uso de quelantes para remover al metal acumulado en plasma y/o en las placas amiloides se ha propuesto como estrategia terapéutica para restaurar la homeostasis de cobre en pacientes con EA. Algunas moléculas con este blanco farmacológico se han probado en estudios preclínicos y clínicos, tal es el caso de la D-penicilamina, el clioquinol y el PBT2 (Ver Tabla 1.5).<sup>66, 72-83</sup>

**Tabla 1.3 Estudios en los que se mide cobre en muestras de tejido cerebral de pacientes con EA.**

Año	Nombre del estudio	Hallazgo principal	Técnica utilizada	Ref.
1996	Copper, iron and zinc imbalance in severely degenerated brain regions in Alzheimer's disease: possible relation to oxidative stress	Disminución de los niveles de cobre en hipocampo y amígdala, en muestras de pacientes con EA.	Análisis instrumental de activación de neutrones (INAA)	<sup>54</sup>
2011	Effect of cerebral amyloid angiopathy on brain iron, and zinc in Alzheimer's disease	Disminución de los niveles de cobre en el tejido de pacientes con EA, con y sin angiopatía amiloide (CAA). Acumulación de cobre en la vasculatura de aquellos pacientes con EA que presentan CAA.	Espectrometría de absorción atómica	<sup>55</sup>
2011	Iron, zinc and copper in the Alzheimer's disease brain: a quantitative meta-analysis. Some insight on the influence of citation bias on scientific opinion	Niveles de cobre disminuidos en la neocorteza de pacientes con EA.	Diferentes técnicas (Meta-análisis)	<sup>56</sup>
2012	Elevated labile Cu is associated with oxidative pathology in Alzheimer disease	Niveles elevados de cobre lábil en la corteza temporal y frontal de pacientes con EA. Disminución de la cantidad total de cobre en la corteza; sin embargo, al normalizar por el contenido de proteína no se encontraron diferencias significativas.	Espectrometría de masas por plasma acoplado inductivamente (ICP-MS), para distinguir el Cu lábil se utilizó el ensayo de fenantrolina	<sup>57</sup>
2016	Elevation of brain glucose and polyol-pathway intermediates with accompanying brain-copper deficiency in patients with Alzheimer's disease: metabolic basis for dementia	Deficiencia de cobre en el cerebro de pacientes con EA.	Espectrometría de masas por plasma acoplado inductivamente (ICP-MS).	<sup>84</sup>
2017	Evidence for widespread, severe brain copper deficiency in Alzheimer's dementia	Niveles de cobre disminuidos del 50–70% en hipocampo, corteza entorrinal, giro medial-temporal, corteza sensorial, corteza motora, giro cingulado y cerebelo.	Espectrometría de masas por plasma acoplado inductivamente (ICP-MS).	<sup>70</sup>

La D-penicilamina es un quelante de  $\text{Cu}^+$  utilizado en el tratamiento de la enfermedad de Wilson e incapaz de atravesar la barrera hemato-encéflica (BHE). El potencial terapéutico de este compuesto en la EA se evaluó en un estudio clínico piloto fase II, donde se observó que disminuye la actividad de superóxido dismutasa en glóbulos rojos en suero, y aumenta la excreción de cobre en orina en pacientes con EA, pero no produce mejoría a nivel cognitivo.<sup>66, 72, 73</sup> Debido a su aparente limitado potencial terapéutico, el estudio de la D-penicilamina para tratar la EA se abandonó por muchos años; sin embargo, un trabajo reciente, en el cual se utiliza una formulación nasal de D-penicilamina en hidrogel, mostró resultados prometedores a nivel conductual en el modelo murino APP<sup>swe</sup>/PS1dE9.<sup>74</sup>



**Tabla 1.4 Estudios que demuestran la acumulación de cobre en las placas amiloides de pacientes y modelos murinos de la EA.**

Año	Nombre del estudio	Hallazgo principal	Técnica utilizada	Ref.
1998	Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques	Acumulación de cobre en placas seniles de pacientes con EA.	Emisión de rayos-X inducida por micro-partículas	67
2006	Synchrotron-based infrared and X-ray imaging shows focalized accumulation of Cu and Zn co-localized with $\beta$ -amyloid deposits in Alzheimer's disease	El péptido $\beta$ A co-localiza con el cobre en las placas amiloides de pacientes con EA.	Micro-espectroscopia intrarroja con transformada de Fourier (FTIRM) y fluorescencia de rayos-X (SXRF)	68
2009	Amyloid plaques in PSAPP mice bind less metal than plaques in human Alzheimer's disease	Las placas amiloides del modelo murino de AD APPswe/PS1dE9 no acumulan cobre.	Microscopia de fluorescencia de rayos-X (SXRF)	69
2012	Immunogold labeling and X-ray fluorescence microscopy reveal enrichment ratios of Cu and Zn, metabolism of APP and amyloid- $\beta$ plaque formation in a mouse model of Alzheimer's disease	Cobre y el péptido $\beta$ A42 co-localizan durante la formación de las placas amiloides en el modelo murino APPV717I.	Microscopia de fluorescencia de rayos-X (SXRF) utilizando anticuerpos anti- $\beta$ A42 marcados con oro	43
2013	Elevated copper in the amyloid plaques and iron in the cortex are observed in mouse models of Alzheimer's disease that exhibit neurodegeneration	En el modelo murino de AD 5xFAD, se acumula ~25% más cobre en las placas amiloides en comparación con APPswe/PS1dE9, siendo el modelo 5xFAD el que presenta mayor neurodegeneración.	Microscopia de fluorescencia de rayos-X (SXRF) y espectroscopia de absorción de rayos-X (XAS)	58
2017	Iron, copper, and zinc concentration in $A\beta$ plaques in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease correlates with metal levels in the surrounding neuropil	En el modelo APPswe/PS1dE9 la cantidad de cobre en las placas amiloides es equivalente a la encontrada en la materia gris circundante.	Microscopia de fluorescencia de rayos-X (SXRF)	59
2019	Activatable small-molecule photoacoustic probes that cross the blood-brain barrier for visualization of copper(II) in mice with Alzheimer's disease	Se validó el primer sensor de $Cu^{2+}$ capaz de detectar este metal en un modelo <i>in vivo</i> no transgénico de la EA. El $Cu^{2+}$ se acumula principalmente alrededor de los vasos sanguíneos donde también se acumula $\beta$ A.	Fluorescencia utilizando un sensor activado por foto-acústica	60
2020	Copper accumulation and the effect of chelation treatment on cerebral amyloid angiopathy compared to parenchymal amyloid plaques	En pacientes con AD, se acumula más cobre en las placas amiloides que rodean los vasos sanguíneos en comparación con las placas ubicadas en el parénquima cerebral. Las placas amiloides del modelo transgénico Tg2576 también acumulan cobre, pero en menor cantidad en comparación con las placas de pacientes con EA.	Microscopia de fluorescencia de rayos-X (SXRF)	44

**Tabla 1.5 Estudios preclínicos y clínicos en los que se explora el potencial terapéutico de quelantes de cobre en la EA.**

Molécula en estudio	Año	Tipo de estudio o modelo	Título de la publicación	Hallazgos principales	Ref.
D-penicilamina	2002/ 2017*	Estudio clínico aleatorizado, doble ciego, controlado por placebo (59 pacientes)	D-penicillamine reduces serum oxidative stress in Alzheimer's disease patients	Reducción de marcadores de estrés oxidante en suero. No se observan cambios en el deterioro cognitivo. La excreción de cobre en orina se incrementa en 77% de los pacientes con EA.	66, 72, 73
	2021	APPswe/ PS1dE9	Nasal delivery of D-penicillamine hydrogel upregulates A Disintegrin and Metalloprotease 10 expression via melatonin receptor 1 in AD models	Reduce los depósitos de $\beta$ A al activar a la metaloproteasa ADAM10 a través de receptor para melatonina 1. Hay mejoría en pruebas cognitivas.	74
Clioquinol (CQ)	2001	Tg2576	Treatment with a copper zinc chelator markedly and rapidly inhibits amyloid accumulation in Alzheimer's disease transgenic mice	El CQ disuelve agregados de $\beta$ A que contienen cobre y zinc <i>in vitro</i> , mientras que <i>in vivo</i> reduce la acumulación de $\beta$ A en corteza.	75
	2003	Estudio clínico aleatorizado fase II (piloto) 36 pacientes	Metal-protein attenuation with CQ targeting A $\beta$ amyloid deposition and toxicity in Alzheimer's disease	Los niveles plasmáticos de $\beta$ A disminuyen. No se observan cambios en el deterioro cognitivo. No se observa neurotoxicidad.	76
	2005	Reporte de caso 2 pacientes con FAD	CQ treatment in familial early onset of Alzheimer's disease	Aumenta el metabolismo de glucosa, hay estabilización, pero no mejora de los síntomas. Solo en un caso cambian los niveles de $\beta$ A y tau en líquido cerebroespinal. No hay signos de neurotoxicidad.	77
	2007	APP751SL	Copper and CQ treatment in young APP transgenic and wild-type mice: effects on life expectancy, body weight, and metal-ion levels	Los niveles plasmáticos de cobre se reducen, pero los niveles de cobre en el cerebro no cambian. No hay cambios en la sobrevivencia, ni en el procesamiento de APP.	78
PBT2	2008/ 2010*	Estudio clínico, aleatorizado, doble ciego, controlado por placebo, fase IIa (78 pacientes)	Safety, efficacy, and biomarker findings of PBT2 in targeting A $\beta$ as a modifying therapy for Alzheimer's disease: a phase IIa, double-blind, randomised, placebo-controlled trial	Disminución de $\beta$ A en líquido cerebroespinal, sin cambios en biomarcadores en plasma. Mejoría en pruebas de función cognitiva. No hay correlación entre los cambios en $\beta$ A y tau y la mejora cognitiva.	79, 80
	2008	APPswe/ PS1dE9 Tg2576	Rapid restoration of cognition in Alzheimer's transgenic mice with 8-hydroxy quinoline analogs is associated with decreased interstitial A $\beta$	Disminución de $\beta$ A en líquido intersticial de cerebro. Reducción de la presencia de placas amiloides hasta en un 80% en el ratón Tg2576. Revierte el efecto de $\beta$ A en el LTP. Disminuye la fosforilación de tau en S396. Mejora el desempeño cognitivo de los animales transgénicos.	81

**Tabla 1.5 Estudios preclínicos y clínicos en los que se explora el potencial terapéutico de quelantes de cobre en la EA (continuación).**

Molécula en estudio	Año	Tipo de estudio o modelo	Título de la publicación	Hallazgos principales	Ref.
PBT2	2017	Estudio clínico aleatorizado, doble ciego (30 pacientes)	A randomized, exploratory molecular imaging study targeting amyloid $\beta$ with a novel 8-OH quinoline in Alzheimer's disease: The PBT2-204 IMAGINE study	La señal de $\beta$ A-PET disminuye significativamente en 12 meses.	<sup>82</sup>
	2018	Modelo de taupatía Tg(TauP301L) <sub>4</sub> 510	Targeting metals rescues the phenotype in an animal model of tauopathy	Disminuye los agregados de tau y otras formas patológicas, se observa mejora cognitiva.	<sup>83</sup>

El clioquinol es un quelante de  $\text{Cu}^{2+}$  cuyo potencial terapéutico para la EA se ha evaluado en estudios clínicos piloto fase II.<sup>76</sup> Este compuesto se utilizó ampliamente entre 1950–1970 para tratar y prevenir la amibiasis, y fue discontinuado debido a que su uso crónico en altas dosis incrementa la incidencia de neuropatía mielo-óptica subaguda.<sup>85, 86</sup> Los resultados del estudio clínico con pacientes con la EA indican que el clioquinol disminuye los niveles de  $\beta$ A en sangre, pero no produce cambios en el deterioro cognitivo.<sup>76</sup> La evaluación clínica del clioquinol fue suspendida al detectarse una impureza en la formulación con potencial tóxico, para solucionar este inconveniente se produjo un compuesto de segunda generación con el mismo motivo de unión a metal que el clioquinol, conocido como PBT2.<sup>86</sup> Tanto en estudios *in vitro* como *in vivo* el PBT2 mostró mayor potencial terapéutico en comparación con el clioquinol,<sup>81</sup> incluso reportes recientes sugieren que el PBT2 regula la homeostasis de cobre a través de mecanismos diferentes a los del clioquinol.<sup>87</sup> En estudios clínicos fase II, los pacientes que recibieron PBT2 mostraron una disminución de  $\beta$ A en líquido cerebrospinal, además de mejoría significativa en algunas pruebas cognitivas.<sup>79, 80</sup> Hasta el momento no se ha iniciado un estudio clínico fase III con el PBT2, pero su caracterización clínica y pre-clínica continúa.<sup>82, 83</sup> A pesar de los resultados positivos del PBT2 en la clínica, la viabilidad de la terapia de quelantes de  $\text{Cu}^{2+}$  en la EA aún está en controversia, puesto que el papel de este metal en el aprendizaje y la memoria sigue sin comprenderse, al igual que las implicaciones de la interacción  $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta$ A en condiciones fisiológicas y patológicas.<sup>88</sup>

### 1.3. Proteínas que unen cobre y están implicadas en la enfermedad de Alzheimer

En los organismos vivos, la homeostasis de cobre está regulada por la unión de este metal a una red de péptidos y proteínas, los cuales administran estrictamente su distribución y

función. Cuando un elemento de esta maquinaria falla, los organismos pueden presentar daños, ya sea por pérdida de función de metaloproteínas o por la actividad redox descontrolada del cobre.<sup>46</sup> Curiosamente, además del papel de APP y PS1 en la homeostasis de cobre, APP y otras proteínas señaladas como clave en la patología de la EA—la  $\beta$ -secretasa (BACE1), el péptido  $\beta$ A y la PrP<sup>C</sup>—albergan sitios de unión para Cu<sup>2+</sup> y/o Cu<sup>+</sup> (Ver Tabla 1.6).<sup>42, 89-96</sup> Los sitios de unión para Cu<sup>2+</sup> se caracterizan por la presencia de residuos de His, los cuales permiten el anclaje del metal a la proteína; mientras que, los sitios de unión para Cu<sup>+</sup> se caracterizan por la presencia de residuos de Met o en algunos casos dos residuos de His.<sup>42, 89-96</sup> Dado que el  $\beta$ A y la PrP<sup>C</sup> son de especial interés para este proyecto, en las secciones 1.3.1 y 1.3.2 se profundiza en las características de la interacción Cu<sup>2+</sup>- $\beta$ A y Cu<sup>2+</sup>-PrP, así como en el papel de estas dos metaloproteínas en la EA.

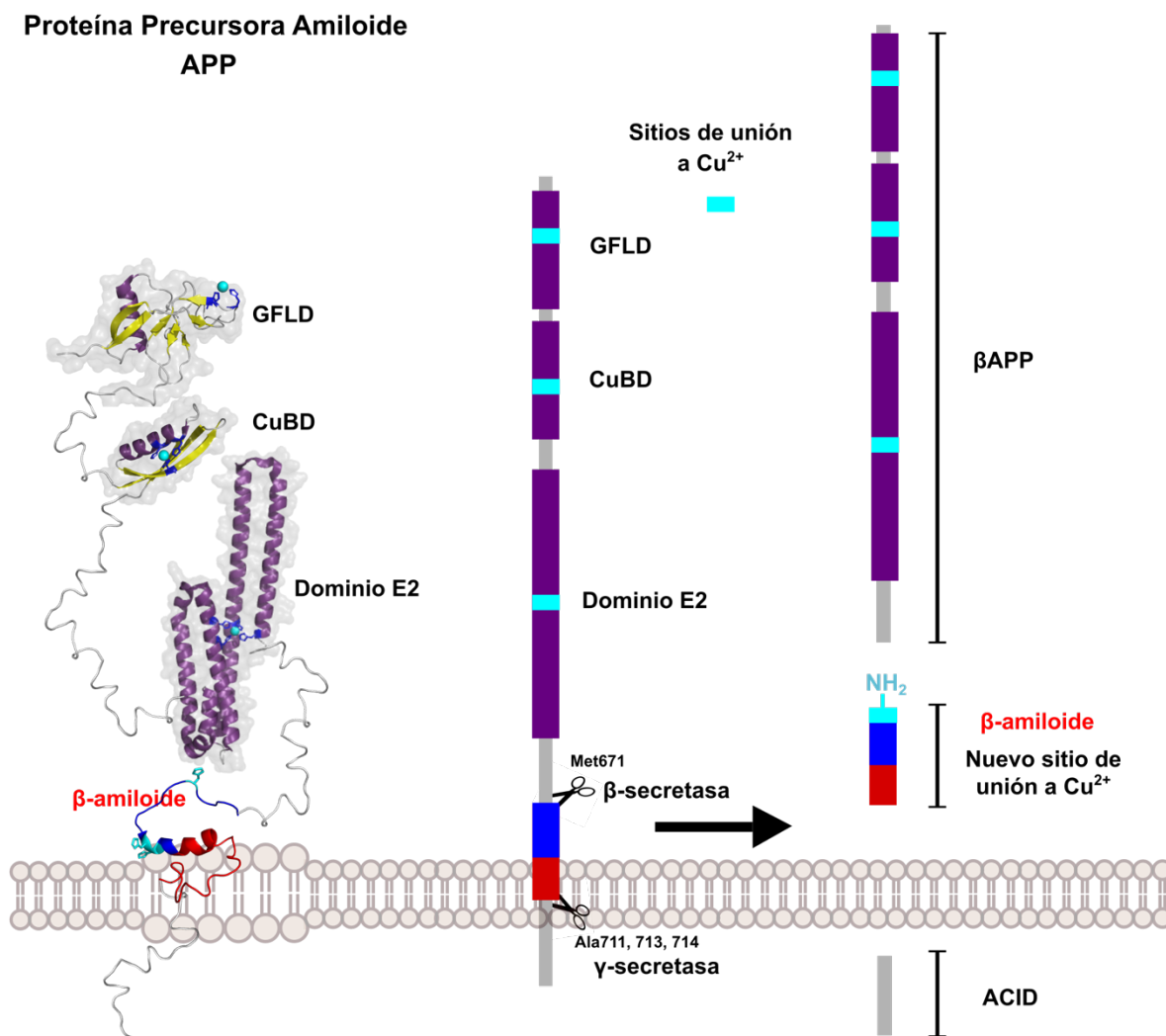
**Tabla 1.6 Estudios en los que se demuestra la unión de cobre a las proteínas clave en la patología de la EA y su posible papel en la función y homeostasis de este metal.**

Proteína	Sitios de unión a cobre	Relación con la homeostasis o función de cobre	Ref.
APP	Una hasta tres átomos de Cu <sup>2+</sup> en los dos dominios extracelulares: uno en el dominio E2 y dos en el dominio E1.	La unión de Cu <sup>2+</sup> al dominio E1 induce la dimerización de APP y está asociada con el papel de APP en la adhesión celular y sinaptogénesis. La unión de Cu <sup>2+</sup> al dominio E2 provoca cambios conformacionales, pero se desconoce su relevancia funcional.	<sup>89-92</sup>
BACE1	Una Cu <sup>+</sup> en el dominio intracelular. Los trímeros de BACE1 poseen un motivo de unión a Cu <sup>+</sup> presente en transportadores como el CTR1.	BACE1 forma trímeros en cultivo celular y participa en la distribución de cobre intracelular de forma similar a la ATP7B.	<sup>93-95</sup>
PS1	No se han identificado sitios de unión a cobre.	Estudios en cultivo celular sugieren que la expresión de PS1 promueve la entrada de cobre a las células.	<sup>42</sup>
$\beta$ A	Puede unir dos átomos de Cu <sup>2+</sup> : uno con alta afinidad (10 <sup>10</sup> M <sup>-1</sup> ) y otro con una afinidad dos órdenes de magnitud menor (10 <sup>8</sup> M <sup>-1</sup> ). También, puede unir un átomo de Cu <sup>+</sup> formando un complejo bis-His.	La unión Cu <sup>2+</sup> - $\beta$ A se ha asociado con la producción de especies reactivas de oxígeno en cuya formación se forma un complejo Cu <sup>+</sup> - $\beta$ A. El Cu <sup>2+</sup> tiene un efecto concentración dependiente en la agregación del $\beta$ A, modificando el equilibrio de monómeros, oligómeros y fibras.	<sup>96</sup>
PrP <sup>C</sup>	Una hasta seis átomos de Cu <sup>2+</sup> en el extremo N-terminal. Posee dos sitios de unión a Cu <sup>+</sup>	La unión de Cu <sup>2+</sup> a la PrP <sup>C</sup> es importante para la neuritogénesis, neurogénesis, modulación de receptores glutamatérgicos, migración celular y homeostasis de cobre.	<sup>97</sup>

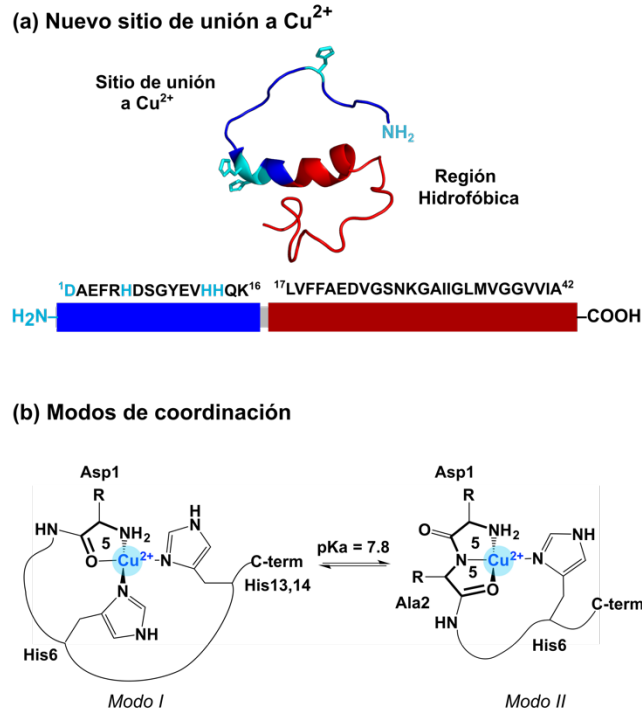
### 1.3.1. El péptido $\beta$ -amiloide

Como se mencionó anteriormente, el péptido  $\beta$ A es un fragmento de 40 a 43 aminoácidos derivado del corte proteolítico de la APP por las  $\beta$ -,  $\gamma$ -secretasas (ver Figura 1.2).<sup>98</sup> La  $\beta$ -secretasa (BACE1) corta el dominio extracelular de la APP entre la Met671↓Asp672 y la  $\gamma$ -

secretasa corta APP en tres puntos de la región transmembranal: Val711↓Ile712, Ala713↓Thr714 o Thr714↓Val715 para producir los péptidos  $\beta$ A(1–40),  $\beta$ A(1–42) y  $\beta$ A(1–43) (Ver Figura 1.2).<sup>40</sup> El corte de BACE1 deja libre el grupo NH<sub>2</sub> del Asp1 en el extremo N-terminal del  $\beta$ A, el cual junto con los residuos de His de las posiciones 6, 13 y 14 dan lugar a un sitio de unión a Cu<sup>2+</sup> de alta afinidad ( $K_d = 0.1$  nM) y diferente a los encontrados en la APP (Ver Figura 1.2).<sup>96, 99</sup> A pH fisiológico, la unión de Cu<sup>2+</sup> a este sitio forma dos modos de coordinación conocidos como Modo I y Modo II, ver Figura 1.3.<sup>100</sup>



**Figura 1.2** El péptido  $\beta$ A: producción a partir de la proteína precursora amiloide y formación de un nuevo sitio de unión a Cu<sup>2+</sup>.



**Figura 1.3 Unión de  $\text{Cu}^{2+}$  al péptido  $\beta\text{A}$ .** (a) Estructura de RMN en solución y representación lineal del péptido  $\beta\text{A}$  en la que se resalta de color azul la región involucrada en la unión de  $\text{Cu}^{2+}$  y de color rojo la región hidrofóbica (b) Modos de coordinación propuestos para el complejo  $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A}$ .

El péptido  $\beta\text{A}$  es poco soluble en ambientes acuosos debido a las características anfipáticas de su secuencia. El extremo *N*-terminal—derivado de la región extracelular de la APP—está formado principalmente por aminoácidos hidrofílicos; mientras que, el extremo *C*-terminal—derivado de la región transmembranal de la APP—es rico en aminoácidos hidrofóbicos ver Figura 1.3. Dadas estas propiedades, en solución acuosa el  $\beta\text{A}$  tiende a auto-ensamblarse para formar oligómeros ( $\alpha\beta\text{A}$ ) y fibras dependiendo de su concentración.<sup>101</sup> A concentraciones menores de 90 nM (*in vitro*) predominan los monómeros del  $\beta\text{A}$ , los cuales se caracterizan por tener extremos *N*- y *C*-terminal intrínsecamente desordenados, con una hélice en el centro de la región hidrofóbica, entre His13 y Asp23.<sup>102, 103</sup> Aunque el *N*- y *C*-terminal carecen de estructura secundaria, estudios de RMN muestran que algunas de sus cadenas laterales interaccionan con la hélice  $\alpha$  central a través de los residuos hidrofóbicos.<sup>103</sup> Cuando la concentración de  $\beta\text{A}$  es igual o mayor a 90 nM (*in vitro*) predominan los oligómeros.<sup>102</sup> Durante la formación de oligómeros y fibras, el  $\beta\text{A}$  adquiere diferentes tipos de estructura secundaria: en las primeras etapas del proceso de agregación (formación de hexámeros y

dodecámeros), se observa un tipo de estructura secundaria poco convencional conocida como “hoja  $\alpha$ ”, mientras que al incrementarse el tamaño de los oligómeros se adopta estructura de hoja  $\beta$ .<sup>104</sup> Los cambios observados en estructura secundaria correlacionan con la toxicidad de los oligómeros en cultivo celular, siendo más tóxicos aquellos con estructura tipo hoja  $\alpha$ .<sup>104</sup> La unión de  $\text{Cu}^{2+}$  al extremo *N*-terminal no previene la agregación del  $\beta\text{A}$ , pero induce vías de agregación diferentes dependiendo de la relación metal/proteína.<sup>105</sup> A concentraciones sub-estequiométricas, el  $\text{Cu}^{2+}$  acelera la formación de fibras, mientras que a concentraciones de  $\text{Cu}^{2+}$  iguales o mayores a las de  $\beta\text{A}$  se favorece la formación de oligómeros amorfos y se retrasa la formación de fibras amiloides.<sup>105-108</sup> En cultivos de células neuronales, se ha observado que los oligómeros formados en presencia de  $\text{Cu}^{2+}$  son más tóxicos en comparación con los formados en ausencia del metal.<sup>109, 110</sup>

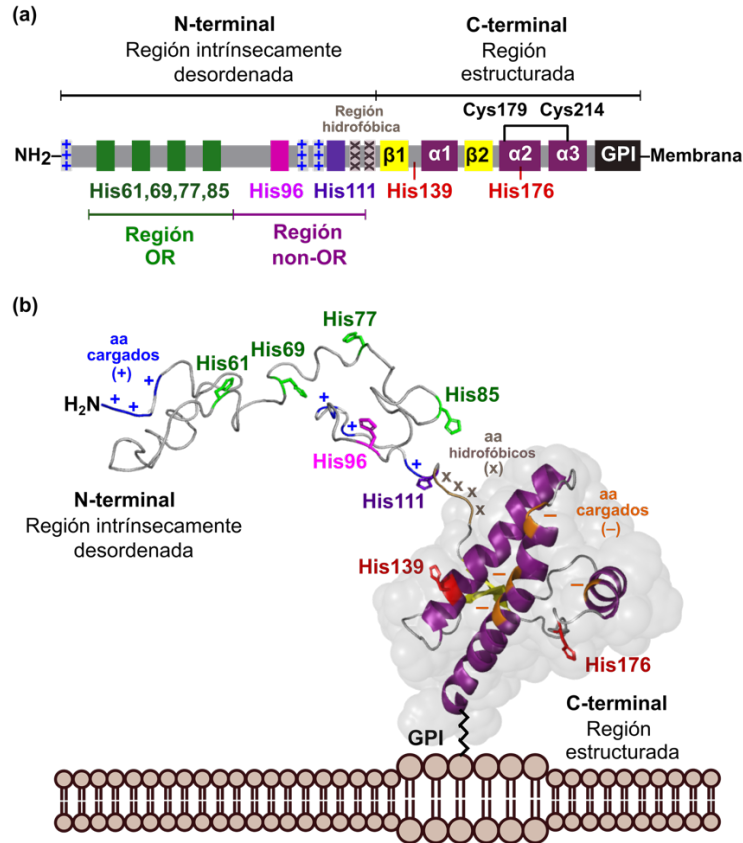
La producción del  $\beta\text{A}$  está estrechamente vinculada con la actividad neuronal, de tal forma que las regiones con mayor actividad neuronal son las más vulnerables a acumular este péptido.<sup>111-113</sup> En varios estudios *in vitro* e *in vivo* se ha demostrado que el  $\beta\text{A}$  tiene un efecto concentración dependiente en el aprendizaje y la memoria.<sup>114-119</sup> A bajas concentraciones ( $\sim 200$  pM *in vitro*), el  $\beta\text{A}$  favorece la liberación de neurotransmisores, induce la expresión de proteínas asociadas con plasticidad neuronal e impacta positivamente la formación de la memoria.<sup>114-117</sup> Por el contrario, a concentraciones de  $\sim 100$  nM *in vitro* y  $\sim 100$   $\mu\text{M}$  *in vivo*, el  $\beta\text{A}$  reduce la liberación de neurotransmisores y tiene un impacto negativo en los mecanismos moleculares asociados con la memoria.<sup>114, 118, 120, 121</sup> Al igual que el  $\beta\text{A}$ , el cobre se libera al espacio extracelular durante la transmisión sináptica, donde puede modular la actividad de tres de los principales receptores involucrados en los mecanismos moleculares del aprendizaje y la memoria, tales como los receptores sensibles a NMDA, AMPA y GABA.<sup>18, 47-51, 111-113</sup> A pesar de esta conexión entre la actividad neuronal, la producción de  $\beta\text{A}$  y la liberación de cobre, la mayor parte de la investigación de la interacción  $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A}$  se ha enfocado en evaluar su potencial neurotóxico, dejando de lado el estudio del papel de la unión  $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A}$  en condiciones fisiológicas. En estudios *in vitro* se ha demostrado que el complejo  $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A}$  puede producir especies reactivas de oxígeno (anión superóxido  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , peróxido de hidrógeno  $\text{H}_2\text{O}_2$ , y radical hidroxilo  $\text{OH}^{\bullet}$ ) en presencia de  $\text{O}_2$  y ascorbato, a expensas de varios ciclos de reducción de  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$ .<sup>122</sup> De tal forma que, bajo ciertas

condiciones, la producción de especies reactivas de oxígeno por los monómeros, los oligómeros y las placas que contienen  $\beta$ A y  $\text{Cu}^{2+}$  podría contribuir al daño oxidativo observado en pacientes con EA.<sup>122</sup> Sin embargo, el daño oxidativo es solo uno de los mecanismos neurotóxicos propuestos para el  $\beta$ A. Estudios recientes demostraron que la interacción del  $\beta$ A con otra metaloproteína—la PrP<sup>C</sup>—desencadena mecanismos neurotóxicos,<sup>123, 124</sup> los cuales serán abordados con mayor detalle en la siguiente sección.

### 1.3.2. La proteína prion celular

La proteína prion celular (PrP<sup>C</sup>) es una metaloproteína anclada a la cara extracelular de las membranas celulares a través de un grupo glicosilfosfatodilinositol (GPI).<sup>125</sup> La PrP<sup>C</sup> se expresa principalmente en el cerebro, donde se localiza en neuronas, células gliales y células endoteliales de la barrera hemato-encéfalica (BHE).<sup>126, 127</sup> Esta proteína tiene un papel central en procesos celulares necesarios para el desarrollo y funcionamiento del SNC, tales como: adhesión celular, modulación de receptores glutamatérgicos, la neuritogénesis y la neurogénesis.<sup>128</sup> En su forma madura, la PrP<sup>C</sup> tiene un extremo *N*-terminal intrínsecamente desordenado que comprende del aminoácido 23 al 127 y un extremo *C*-terminal globular formado por tres  $\alpha$ -hélices y dos hojas  $\beta$  estabilizadas por un puente disulfuro entre las hélices 2 y 3, ver Figura 1.4.<sup>129</sup> En el extremo *N*-terminal de la PrP<sup>C</sup> se encuentran dos regiones ricas en aminoácidos positivamente cargados (23–30 y 101–110) y una región rica en aminoácidos hidrofóbicos (119–136) (ver Figura 1.4), las cuales son de gran importancia para la interacción de PrP<sup>C</sup> con otras proteínas.<sup>130, 131</sup> Asimismo, la PrP<sup>C</sup> puede unir hasta seis iones  $\text{Cu}^{2+}$  de manera simultánea en el dominio *N*-terminal, dependiendo de la relación  $\text{Cu}^{2+}/\text{PrP}$ : de uno a cuatro en la región conocida como *octarepeat* y dos más en la región *non-octarepeat*, ver Figura 1.4.<sup>132, 133</sup> La PrP<sup>C</sup> puede ser cortada por la  $\alpha$ -secretasa (ADAM8) en medio de la región *non-octarepeat*, entre Lys110/His111.<sup>134-136</sup> Este corte proteolítico genera dos fragmentos: PrPN1 y PrPC1 ambos capaces de unir  $\text{Cu}^{2+}$ . Los productos de la proteólisis de la PrP<sup>C</sup> son muy abundantes en el cerebro humano, donde el fragmento PrPC1 llega a representar hasta el 45% del total de la PrP<sup>C</sup> dependiendo de la expresión de las  $\alpha$ -secretasas.<sup>134, 135</sup>





**Figura 1.4 Representación lineal (a) y tridimensional de la proteína prion celular (b).** En la región *N*-terminal, se resalta de color verde los sitios de unión a  $\text{Cu}^{2+}$  en la región octarepeat, de color rosa el sitio de His96 y de color morado el sitio de His111, las cruces de color azul señalan las regiones ricas en aminoácidos positivamente cargados, las cruces de color café señalan las regiones ricas en aminoácidos hidrofóbicos. En la región *C*-terminal, se resaltan de color rojo las His que estabilizan la interacción interdominio mediada por  $\text{Cu}^{2+}$  y de color naranja las regiones con aminoácidos con carga negativa que también estabilizan la interacción interdominio.

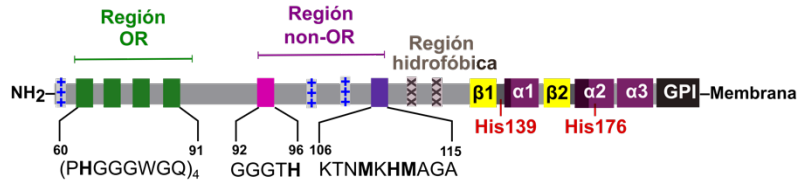
### A. Unión de cobre a la proteína prion

La unión de  $\text{Cu}^{2+}$  a la región *N*-terminal de la  $\text{PrP}^{\text{C}}$  es muy dinámica: involucra varios sitios de unión, los cuales forman varios modos de coordinación con un amplio rango de afinidades por el metal.<sup>97</sup> La región *octarepeat* comprende del aminoácido 60 al 91 y está formada por cuatro repeticiones de la secuencia PHGGGWGQ (ver Figura 1.5). La unión de  $\text{Cu}^{2+}$  en esta región depende de la relación estequiométrica  $\text{Cu}^{2+}/\text{PrP}$ . Cuando la concentración de  $\text{Cu}^{2+}$  es igual o menor a la de  $\text{PrP}$ , las cuatro His de la región *octarepeat* unen un ion  $\text{Cu}^{2+}$  con alta afinidad ( $K_d = 10 \text{ nM}$ ), formando un macroquelato conocido como modo de baja ocupación o componente 3 (ver Figura 1.5b).<sup>133, 137</sup> En cambio, cuando la concentración de  $\text{Cu}^{2+}$  es mayor a la de  $\text{PrP}$ , se unen cuatro iones  $\text{Cu}^{2+}$  a la región *octarepeat* con baja afinidad ( $K_d = 7\text{--}12 \text{ }\mu\text{M}$ ), uno en cada octapéptido (PHGGGWGQ), adoptando dos modos de coordinación

conocidos como modos de alta ocupación o componentes 1 y 2 (ver Figura 1.5b).<sup>133, 137</sup> Por otra parte, la región *non-octarepeat* comprende del aminoácido 92 al 115 y contiene dos sitios de unión a  $\text{Cu}^{2+}$  ubicados en la His96 e His111, cuya afinidad por el metal se encuentra en valores intermedios ( $K_d = 0.4\text{--}0.7 \mu\text{M}$ ) (ver Figura 1.5b) entre las afinidades de los modos de baja y alta ocupación ( $K_d = 10 \text{ nM}$  y  $K_d = 7\text{--}12 \mu\text{M}$ , respectivamente). A pH fisiológico cada sitio de la región *non-octarepeat* forma dos modos de coordinación (Modo 3N1O y Modo 4N) (ver Figura 1.5b).<sup>138-140</sup> Recientemente, se demostró que la unión de  $\text{Cu}^{2+}$  a la región del *octarepeat* favorece la interacción del dominio *N*- y *C*-terminal, al formar un macroquelato que involucra tres residuos de His del *N*-terminal y uno del *C*-terminal (His139/His176) (ver Figura 1.5c). Esta interacción también está estabilizada por la atracción electrostática entre los residuos positivamente cargados del *N*-terminal (23–30) y los residuos negativamente cargados del *C*-terminal (Glu145, 199, 206 y 210) (ver Figura 1.5c).<sup>141</sup>

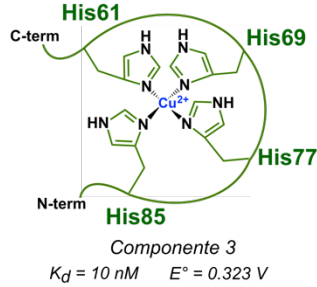
Además de coordinar  $\text{Cu}^{2+}$  con diferentes afinidades, los sitios de las regiones *octarepeat* y *non-octarepeat* de la PrP<sup>C</sup> pueden reducir  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$  en presencia de ascorbato de sodio. De acuerdo con los potenciales de reducción, el orden de reactividad es el siguiente: componente 3 > componente 1 y 2  $\cong$  His96/His111 (ver Figura 1.5).<sup>142</sup> La facilidad del componente 3 para reducir  $\text{Cu}^{2+}$  está asociada a la alta afinidad de este sitio por  $\text{Cu}^+$ , la cual se estima que es tres órdenes de magnitud mayor a su afinidad por  $\text{Cu}^{2+}$ .<sup>142</sup> Sin embargo, la gran estabilidad al complejo  $\text{Cu}^+$ -OR dificulta la re-oxidación del metal en presencia de  $\text{O}_2$ .<sup>142</sup> Por lo que, el componente 3 puede reducirse fácilmente, pero difícilmente participar en ciclos de reducción y oxidación.<sup>142</sup> Por el contrario, la afinidad por  $\text{Cu}^+$  de los modos de alta ocupación y los sitios de la región *non-octarepeat* se estima en el mismo orden de magnitud que su afinidad por  $\text{Cu}^{2+}$ :  $0.4\text{--}0.7 \mu\text{M}$  para el *non-octarepeat* y  $7\text{--}12 \mu\text{M}$  para los componentes 1 y 2.<sup>142</sup> Esto facilita la re-oxidación en presencia de oxígeno y permite ciclos de oxidación-reducción.<sup>142</sup> En estudios *in vitro* se ha demostrado que el sitio de His111 puede reducir  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$  en presencia de ascorbato de sodio con una constante de reducción de  $0.13\text{--}0.28 \text{ s}^{-1}$  y una de re-oxidación de  $0.21 \text{ min}^{-1}$ .<sup>142, 143</sup> Cabe destacar que el sitio de His111 en la secuencia humana se distingue por la presencia de dos residuos de Met en las posiciones 109 y 112 (Ver Figura 1.5), los cuales estabilizan el  $\text{Cu}^+$  formado tras la reducción en presencia de ascorbato de sodio, sin impedir la re-oxidación en presencia de  $\text{O}_2$  (Ver Figura 1.6).<sup>143</sup>

(a) Sitios de unión a  $\text{Cu}^{2+}$

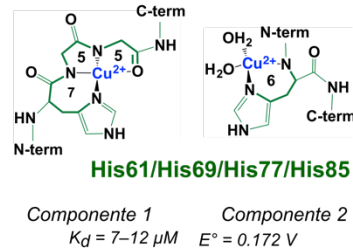


(b) Modos de coordinación

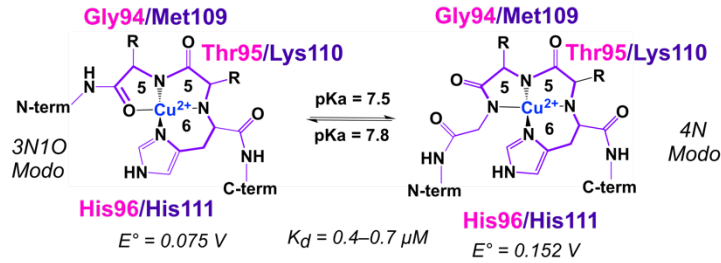
*Región OR / Cu bajo*



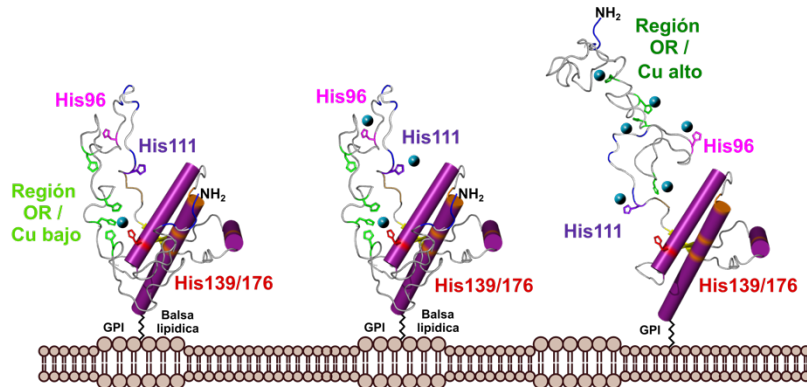
*Región OR / Cu alto*



*Región non-OR*



(c) Interacción interdominio estabilizada por  $\text{Cu}^{2+}$



**Figura 1.5 Unión de  $\text{Cu}^{2+}$  a la proteína prion celular.** (a) Representación lineal donde se resaltan los sitios de unión a  $\text{Cu}^{2+}$  y secuencias mínimas que reproducen la coordinación del metal en cada uno de estos sitios (b) Propuestas de los modos de coordinación para cada sitio de unión a  $\text{Cu}^{2+}$  y (c) Interacción interdominio estabilizada por  $\text{Cu}^{2+}$ .

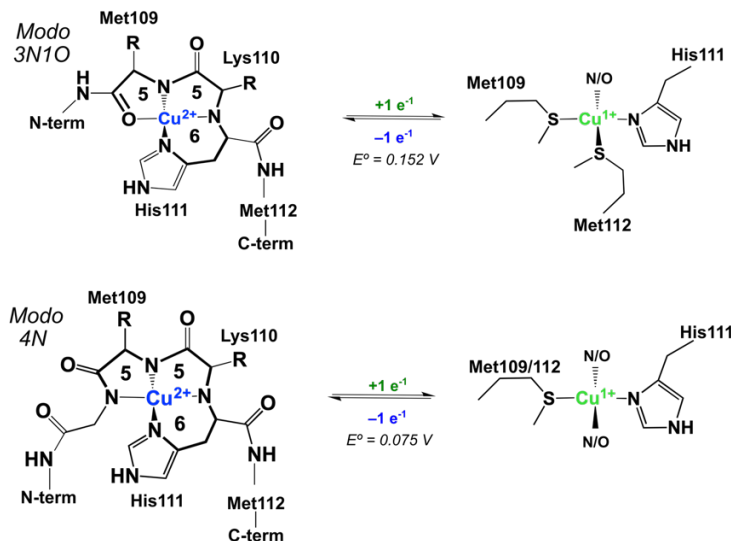


Figura 1.6 Complejos de Cu<sup>+</sup> formados en el sitio de His111 tras la reducción de Cu<sup>2+</sup>.

## B. Impacto del corte proteolítico de la PrP<sup>C</sup> por la $\alpha$ -secretasa en la unión de Cu<sup>2+</sup> al sitio de la His111.

El corte proteolítico de la PrP<sup>C</sup> por la  $\alpha$ -secretasa (ADAM8) en Lys110/His111 genera dos fragmentos: el fragmento PrPN1 (Lys23–Lys110) y el fragmento PrPC1 (His111–Lys110).<sup>134-136</sup> El PrPN1 es liberado al espacio extracelular y conserva intactos los sitios de unión a Cu<sup>2+</sup> de la región *octarepeat* y la His96 (Ver Figura 1.7a).<sup>134-136, 144</sup> Por otra parte, el PrPC1 permanece anclado a la membrana celular y aunque conserva la His111 carece de los residuos de Met109 y la Lys110, cuyos grupos amida y carbonilo son necesarios para completar la esfera de coordinación de los modos 3N1O y 4N. Además, el corte proteolítico por la  $\alpha$ -secretasa deja libre el grupo NH<sub>2</sub>, el cual puede funcionar como un nuevo sitio de anclaje para Cu<sup>2+</sup> (Ver Figura 1.7a).<sup>144</sup> En un estudio previo utilizando el modelo PrP(111–115), se demostró que los cambios derivados del corte proteolítico de la PrP<sup>C</sup> en el sitio de la His111 dan lugar a un nuevo sitio de unión de Cu<sup>2+</sup>, identificado en esta Tesis como  $\alpha$ -His111.<sup>144</sup> La unión de Cu<sup>2+</sup> al sitio de la  $\alpha$ -His111 produce dos modos de coordinación, conocidos como Modo I y Modo II, cuya abundancia relativa depende de la relación estequiométrica Cu<sup>2+</sup>/PrP (Ver Figura 1.7b).<sup>144</sup> El Modo I se favorece a bajos equivalentes de Cu<sup>2+</sup> (relación Cu<sup>2+</sup>/PrP, 1:5) e involucra un átomo de Cu<sup>2+</sup> unido a dos grupos NH<sub>2</sub> y dos residuos de His provenientes de dos moléculas de PrP (Ver Figura 1.7b-c).<sup>144</sup> Este modo de coordinación es común en moléculas donde un grupo NH<sub>2</sub> libre se encuentra cercano a un anillo de imidazol, el

complejo 4N (2N<sub>Im</sub>, 2N<sub>NH2</sub>) resultante se conoce como modo tipo “Histamina”.<sup>145</sup> Por otra parte, el Modo II se forma después de 0.5 equivalentes de Cu<sup>2+</sup> (relación Cu<sup>2+</sup>/PrP, 1:2) y se distingue del Modo I por la presencia de amidas desprotonadas en la esfera de coordinación, las propuestas de modos de coordinación para este complejo se muestran en la Figura 1.7b.<sup>144</sup> Además del impacto del corte proteolítico de la PrP<sup>C</sup> por ADAM8 en la unión a Cu<sup>2+</sup> en el sitio de la His111, la capacidad de este sitio para reducir Cu<sup>2+</sup> también podría verse afectada debido a la escisión de la Met109.

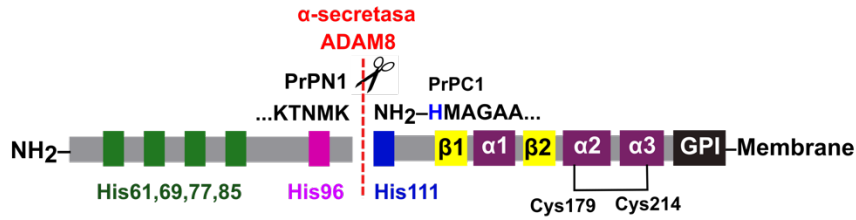
### C. La proteína prion en la enfermedad de Alzheimer

En cerebros de pacientes con EA, la PrP<sup>C</sup> está presente en las placas amiloides (ver Tabla 1.7)<sup>146-151</sup> y co-inmunoprecipita con βA y con la proteína tau fosforilada.<sup>151</sup> Los niveles de PrP<sup>C</sup> cambian durante la evolución de la patología: en etapas tempranas, se incrementa la expresión de PrP<sup>C</sup> (Braak I, II y III en humanos, y 3 meses en ratones APP<sup>swe</sup>/PS1dE9), mientras en etapas tardías disminuye (Braak IV, V y VI en humanos, y 6–9 meses en ratones APP<sup>swe</sup>/PS1dE9).<sup>150</sup> Estos cambios correlacionan directamente con la expresión de la proteína tau, sugiriendo que existe un mecanismo que vincula la expresión de la PrP<sup>C</sup> y tau.<sup>150</sup> Recientemente, se demostró que tau induce la expresión de la PrP<sup>C</sup> a través de la vía JNK-c-jun-AP-1, mientras que la sobre-expresión de PrP<sup>C</sup> reduce la expresión de tau.<sup>152</sup> En general, los estudios histológicos asocian a la PrP<sup>C</sup> con las dos proteínas principales en patología de la EA—el péptido βA y la proteína tau.

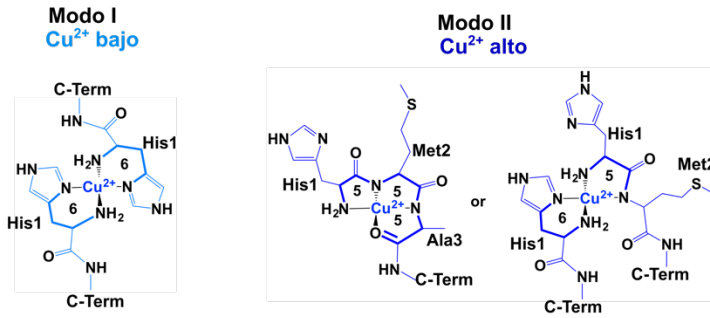
**Tabla 1.7 Estudios donde se analiza la expresión de la PrP<sup>C</sup> en la EA y su acumulación en placas amiloides.**

Año	Nombre del estudio	Hallazgo principal	Ref.
2001	Prion protein expression in senile plaques in Alzheimer’s disease	Las placas amiloides difusas presentan inmunoreactividad para PrP <sup>C</sup> en forma de puntos, mientras que en las placas neuríticas la marca de PrP <sup>C</sup> se concentra en gránulos densos y aislados. No se observa marca de PrP <sup>C</sup> en las placas que rodean vasos sanguíneos.	<sup>146</sup>
2005	Prion protein (PrP <sup>C</sup> ) promotes amyloid plaque formation	Se observa un mayor número de placas amiloides en ratones que sobre-expresan los genes que codifican para APP(K670N/M671LV717I) y para la PrP <sup>C</sup> de hámster, en comparación con aquellos que solo sobre-expresan APP(K670N/M671LV717I).	<sup>153</sup>
2009	The cellular prion protein and its role in Alzheimer’s disease	La expresión de PrP <sup>C</sup> no glicosilada es mayor en pacientes con EA que en individuos sanos. Se observa marca de PrP <sup>C</sup> en las placas amiloides de individuos con EA y de ratones transgénicos que mimetizan la EA.	<sup>147</sup>

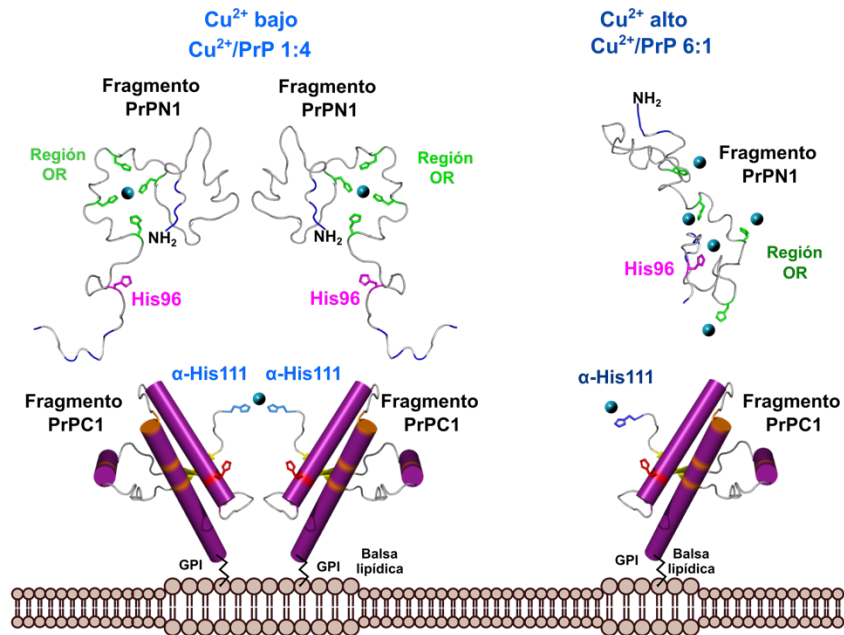
(a) Corte proteolítico de la proteína prion por ADAM8



(b) Modos de coordinación



(c) Sitios de unión a  $\text{Cu}^{2+}$  en los fragmentos PrPN1 y PrPC1



**Figura 1.7** Corte proteolítico de la PrP<sup>C</sup> por la ADAM8 y su impacto en las propiedades de unión a  $\text{Cu}^{2+}$ . (a) Representación lineal de la PrP<sup>C</sup> donde se resalta la composición de los fragmentos (PrPN1 y PrPC1) generados después del corte proteolítico por ADAM8. (b) Modos de coordinación propuestos para sitio  $\alpha$ -His111 del fragmento PrPC1: Modo I (especie predominante cuando la concentración de  $\text{Cu}^{2+}$  es menor a la de PrPC1) y Modo II (especie principal cuando la concentración de  $\text{Cu}^{2+}$  es igual o mayor a la de PrPC1). (c) Representación del grado de ocupación esperado en los fragmentos de PrPC1 y PrPN1 en función de la concentración de cobre.

**Tabla 1.7 Expresión de la PrP<sup>C</sup> en la EA y su acumulación en placas amiloides (continuación).**

Año	Nombre del estudio	Hallazgo principal	Ref.
2011	Unaltered prion protein expression in Alzheimer disease patients	No se observa diferencia significativa en los niveles de expresión de PrP <sup>C</sup> en corteza e hipocampo.	<sup>154</sup>
2011	Accumulation of cellular prion protein within dystrophic neurites of amyloid plaques in the Alzheimer's disease brain	A diferencia de $\beta$ A y tau, la PrP <sup>C</sup> se acumula en las neuritas distróficas que rodean la placa y no en el núcleo rico en hojas $\beta$ .	<sup>148</sup>
2014	High molecular mass assemblies of amyloid- $\beta$ oligomers bind prion protein in patients with Alzheimer's disease	Se detectaron por co-inmunoprecipitación o $\beta$ A de alto peso molecular unidos a PrP <sup>C</sup> en tejido de pacientes con EA, pero no en individuos sanos. Los complejos o $\beta$ A-PrP <sup>C</sup> se encontraron principalmente en la fracción no soluble del homogenado de cerebro.	<sup>155</sup>
2014	A $\beta$ induces its own prion protein N-terminal fragment (PrPN1)-mediated neutralization in amorphous aggregates	En cerebros de pacientes con EA, también se detectaron agregados PrPN1/ $\beta$ A. Los fragmentos N1 y C1 de la PrP <sup>C</sup> son más abundantes en muestras de cerebros de pacientes con EA.	<sup>156</sup>
2015	Role of PrP <sup>C</sup> Expression in Tau Protein Levels and Phosphorylation in Alzheimer's Disease Evolution	La expresión de la PrP <sup>C</sup> se incrementa en las primeras etapas de la EA (Braak I, II y III) y disminuye en etapas tardías (Braak IV, V y VI). El incremento en la expresión de PrP <sup>C</sup> correlaciona con el incremento en la expresión de tau. Resultados similares se observan en el modelo APP/PS1.	<sup>149</sup>
2019	A $\beta$ -induced acceleration of Alzheimer-related $\tau$ -pathology spreading and its association with prion protein	En ratones transgénicos que expresan la mutante APP <sup>swe</sup> (K670N, M671L) y Tau P301S, co-inmunoprecipitan $\beta$ A, tau fosforilada y PrP <sup>C</sup> . Esta interacción p-tau-PrP <sup>C</sup> también se observa <i>in vitro</i> .	<sup>151</sup>
2020	Evidence for aggregation-independent, PrP <sup>C</sup> -mediated A $\beta$ cellular internalization	$\beta$ A puede ser internalizada a células neuronales a través de PrP <sup>C</sup> en su forma no fibrilar.	<sup>157</sup>
2020	Tau Protein as a New Regulator of Cellular Prion Protein Transcription	Tau modula la expresión de PrP <sup>C</sup> a través de la vía JNK/c-jun-AP-1, aún en ausencia de o $\beta$ A y de forma independiente de ROS.	<sup>152</sup>
2021	Accumulation of cellular prion protein within $\beta$ -amyloid oligomer plaques in aged human brains	PrP <sup>C</sup> se acumula en las placas difusas en individuos sin demencia. En individuos con demencia avanzada se observa menos inmunoreactividad para PrP <sup>C</sup> en las placas amiloides.	<sup>150</sup>

La PrP<sup>C</sup> es capaz de unirse al  $\beta$ A en todos sus estados de agregación: los monómeros del  $\beta$ A se unen en las regiones 93–113 y 123–166,<sup>158</sup> los oligómeros solubles se unen a los residuos 23–27 y 95–110,<sup>159, 160</sup> y los oligómeros fibrilares se unen a las regiones 95–113 y 122–231 (ver Tabla 1.8).<sup>161</sup> Aunque la mayor parte de los estudios funcionales sugieren que la unión del  $\beta$ A a la PrP<sup>C</sup> es la responsable del daño cognitivo observado en los modelos murinos que mimetizan la EA (ver Tabla 1.9);<sup>159, 162-173</sup> también se ha demostrado que la formación del complejo  $\beta$ A-PrP<sup>C</sup> puede neutralizar la toxicidad de los o $\beta$ A bajo condiciones específicas (ver Tabla 1.10).<sup>174-178</sup> Particularmente, cuando dicha interacción ocurre fuera de la membrana celular, ya sea con la PrP<sup>C</sup> presente en exosomas, la PrP<sup>C</sup> soluble derivada del corte del GPI por la ADAM10, o bien con el fragmento PrPN1 derivado del corte proteolítico

de la PrP<sup>C</sup> por ADAM8 (ver Tabla 1.10).<sup>174-178</sup> Esto sugiere que la unión del βA con la PrP<sup>C</sup> es relevante tanto en mecanismos neuroprotectores como neurotóxicos. A pesar de que la región *non-octarepeat* (92–115) de la PrP<sup>C</sup> es necesaria para la interacción con el βA en todos sus estados de agregación, el papel del Cu<sup>2+</sup> en esta interacción ha sido poco explorado. Curiosamente, tanto los monómeros como los oligómeros del βA inhiben la modulación de los receptores NMDA dependiente de Cu<sup>2+</sup> y PrP<sup>C</sup>.<sup>48</sup> Cabe destacar que en condiciones fisiológicas, la activación de este tipo de receptores es de gran importancia para la plasticidad sináptica, la memoria y el aprendizaje; mientras que su sobre-activación esta asociada a mecanismos de muerte celular conocidos como excitotoxicidad y a la hiperactividad neuronal observada en pacientes con EA y modelos murinos.<sup>179-181</sup> Por lo que, la habilidad del βA para interferir en la unión Cu<sup>2+</sup>-PrP<sup>C</sup>-NMDAR y las alteraciones en la homeostasis de cobre observadas en los pacientes con EA descritas previamente, ponen en evidencia la necesidad de estudiar el papel del Cu<sup>2+</sup> en la interacción entre el βA y la PrP<sup>C</sup> como un posible mecanismo asociado a la etiología de la EA.

**Tabla 1.8 Estudios en los que se caracteriza la interacción de la PrP<sup>C</sup> y el βA.**

Año	Nombre del estudio	Hallazgo principal	Ref.
2009	Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-β oligomers	Los oβA se unen con afinidad nanomolar a las PrP <sup>C</sup> . La región 95–110 es indispensable para la interacción PrP <sup>C</sup> -oβA.	<sup>159</sup>
2010	Interaction between human prion protein and amyloid-β (Aβ) oligomers. ROLE OF N-TERMINAL RESIDUES.	Además de la región 95–105, la región 23–27 también es de gran importancia para participa en la interacción de los oβA con la PrP <sup>C</sup> .	<sup>160</sup>
2012	Soluble prion protein inhibits amyloid-β (Aβ) fibrillization and toxicity.	La PrP <sup>C</sup> soluble (PrP <sup>C</sup> sin GPI) y su fragmento PrP <sup>N1</sup> inhiben el ensamble de oβA tóxicos. Las regiones importantes para la interacción PrP <sup>N1</sup> -oβA son la 23–32 y la 94–110.	<sup>174</sup>
2013	Characterizing affinity epitopes between prion protein and β-amyloid using an epitope mapping immunoassay.	Los residuos 23–39 y 93–113 participan en la interacción oβA-PrP <sup>C</sup> . Los monómeros de βA también pueden unirse a la PrP <sup>C</sup> a través de las regiones 93–113 y 123–166.	<sup>158</sup>
2013	The cellular prion protein traps Alzheimer's Aβ in an oligomeric form and disassembles amyloid fibers.	Cantidades sub-estequiométricas de PrP <sup>C</sup> (1/20, PrP <sup>C</sup> /βA) inhiben la formación de fibras amiloides. Este efecto es específico del N-terminal de PrP <sup>C</sup> . Los oβA ricos en estructura de hoja β anti-paralela se unen a PrP <sup>C</sup> a través de los residuos 95–113.	<sup>182</sup>
2014	Aβ induces its own prion protein N-terminal fragment (PrP <sup>N1</sup> )-mediated neutralization in amorphous aggregates	El fragmento PrP <sup>N1</sup> recombinante forma agregados amorfos PrP <sup>N1</sup> /βA, los cuales carecen de estructura de hoja β y detienen el autoensamble de βA.	<sup>156</sup>
2014	Interaction between prion protein and Aβ amyloid fibrils revisited	La PrP <sup>C</sup> puede unir fibras maduras de βA involucrando las regiones 95–113 y 122–231. El fragmento PrP <sup>N1</sup> no une fibras maduras de βA.	<sup>161</sup>



**Tabla 1.8 Estudios en los que se caracteriza la interacción de la PrP<sup>C</sup> y el  $\beta$ A (continuación).**

Año	Nombre del estudio	Hallazgo principal	Ref.
2015	Soluble prion protein binds isolated low molecular weight amyloid- $\beta$ oligomers causing cytotoxicity inhibition	La adición de rPrP durante la agregación del $\beta$ A provoca un cambio en el tamaño y la distribución de los $\beta$ A: disminuye la población de tetrámeros y oligómeros de mayor tamaño (asociados con neurotoxicidad), y aumenta la población de monómeros (posiblemente neuroprotectores).	<sup>183</sup>
2017	Cellular prion protein targets amyloid- $\beta$ fibril ends via its C-terminal domain to prevent elongation.	PrP <sup>C</sup> inhibe la elongación de las fibras de $\beta$ A, al unirse a las a las fibras en crecimiento durante el proceso de agregación. Este efecto inhibitorio requiere del dominio C-terminal de la PrP <sup>C</sup> , a diferencia de lo observado para los $\beta$ A solubles.	<sup>184</sup>
2018	Identification of prion protein-derived peptides of potential use in Alzheimer's disease therapy.	Los fragmentos PrP23–50 y PrP90–112 reducen la velocidad inicial de agregación del $\beta$ A, inhiben la formación de oligómeros fibrilares y promueven la formación de agregados amorfos.	<sup>185</sup>
2020	Preferential recruitment of conformationally distinct amyloid- $\beta$ oligomers by the intrinsically disordered region of the human prion protein.	PrP <sup>C</sup> une con mayor afinidad los $\beta$ A fibrilares (positivos al anticuerpo OC), en comparación con los pre-fibrilares (positivos al anticuerpo A11).	<sup>186</sup>

**Tabla 1.9 Estudios que relacionan la unión PrP<sup>C</sup>- $\beta$ A con *mecanismos neurotóxicos* de la EA y exploran el potencial terapéutico de la inhibición de esta interacción.**

Año	Nombre del estudio	Hallazgo principal	Ref.
2009	Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid- $\beta$ oligomers	Los $\beta$ A se unen con afinidad nanomolar a las PrP <sup>C</sup> . La inhibición de la unión PrP <sup>C</sup> - $\beta$ A evita el bloqueo del LTP y rescata la plasticidad neuronal en rebanadas de hipocampo tratadas con $\beta$ A. La región 95–110 es indispensable para la interacción PrP <sup>C</sup> - $\beta$ A.	<sup>159</sup>
2010	Memory impairment in transgenic Alzheimer mice requires cellular prion protein	La incorporación de los genes APP <sup>sw</sup> /PS1 <sup>dE9</sup> al ratón knockout para PrP (PRNP <sup>-/-</sup> ) no afecta la expresión de APP, los niveles de $\beta$ A, y la astrogliosis observada en el modelo APP <sup>sw</sup> /PS1 <sup>dE9</sup> . Sin embargo, rescata la degeneración de los axones serotoninérgicos (5-HT), la pérdida de marcadores sinápticos y la muerte temprana del ratón APP <sup>sw</sup> /PS1 <sup>dE9</sup> . Aunque en estos animales se observan placas amiloides, no se detecta daño en la memoria espacial y temporal.	<sup>187</sup>
2010	Synthetic amyloid- $\beta$ oligomers impair long-term memory independently of cellular prion protein	La inyección intraventricular de $\beta$ A sintéticos daña los mecanismos de consolidación de la memoria (LTP) de forma independiente de PrP <sup>C</sup> , a pesar de que este tipo de $\beta$ A son capaces de unirse a la PrP <sup>C</sup>	<sup>188</sup>
2011	Amyloid- $\beta$ -induced synapse damage is mediated via cross-linkage of cellular prion proteins.	La unión de PrP <sup>C</sup> a los $\beta$ A induce daño sináptico a través de la activación anormal de la fosfolipasa A2 citoplasmática (cPLA2)	<sup>162</sup>
2011	Alzheimer's disease brain-derived amyloid- $\beta$ -mediated inhibition of LTP <i>in vivo</i> is prevented by immunotargeting cellular prion protein.	La inhibición del LTP causada por la administración intraventricular de extractos de $\beta$ A provenientes de pacientes con EA, se previene al administrar un anticuerpo que inhibe la interacción $\beta$ A-PrP <sup>C</sup> .	<sup>163</sup>
2011	Amyloid- $\beta$ oligomers increase the localization of prion protein at cell surface.	El tratamiento con $\beta$ A incrementa la localización de PrP <sup>C</sup> en la superficie de varias líneas celulares y en cultivo de neuronas de hipocampo. Además, los $\beta$ A inhiben la endocitosis de la PrP <sup>C</sup> e inducen la formación de clústeres en la superficie celular.	<sup>189</sup>

**Tabla 1.9 Estudios que relacionan la unión PrP<sup>C</sup>- $\beta$ A con *mecanismos neurotóxicos* de la EA y exploran el potencial terapéutico de la inhibición de esta interacción (continuación).**

Año	Nombre del estudio	Hallazgo principal	Ref.
2012	Cellular prion protein is essential for oligomeric amyloid- $\beta$ -induced neuronal cell death.	El ratón knockout para PrP <sup>C</sup> (PRNP <sup>-/-</sup> ) es resistente a la neurotoxicidad de los $\beta$ A <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> . Asimismo, la administración de un anticuerpo que inhibe la interacción $\beta$ A-PrP <sup>C</sup> previene la neurotoxicidad inducida por los oligómeros de $\beta$ A.	164
2012	A $\beta$ neurotoxicity depends on interactions between copper ions, prion protein, and NMDA.	$\beta$ A (10 nM–5 $\mu$ M) evita la interacción de PrP <sup>C</sup> con los receptores NMDA de la misma forma que un quelante de cobre.	48
2012	The complex PrP <sup>C</sup> -Fyn couples human oligomeric $\beta$ with pathological tau changes in Alzheimer's disease.	La unión de los $\beta$ A solubles a la PrP <sup>C</sup> ocurre en las espinas dendríticas <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> , donde forma un complejo con la cinasa Fyn, lo cual resulta en la activación de ésta última. El bloqueo de la unión de los $\beta$ A evita la activación de Fyn y la hiperfosforilación de tau inducida por los $\beta$ A.	165
2013	Metabotropic glutamate receptor 5 is a coreceptor for Alzheimer A $\beta$ oligomer bound to cellular prion protein.	El complejo $\beta$ A-PrP <sup>C</sup> utiliza como co-receptor al receptor mGluR5 para activar a la cinasa Fyn, formando un complejo $\beta$ A-PrP <sup>C</sup> -mGluR5-Fyn. En el modelo APPswe/PS1dE9 la administración de antagonistas de los mGluR5 revierte los cambios en la densidad de espinas y el déficit en la memoria y el aprendizaje.	166
2013	Alzheimer's amyloid- $\beta$ oligomers rescue cellular prion protein induced tau reduction via the Fyn pathway.	La sobreexpresión de PrP <sup>C</sup> regula la expresión de tau a la baja. La unión de los $\beta$ A a la PrP <sup>C</sup> evita la reducción de los niveles de tau ocasionada por la sobreexpresión de PrP <sup>C</sup> . La mutante M128V de la PrP <sup>C</sup> , identificada como factor de riesgo para la EA, no puede rescatar la expresión de tau en presencia de los $\beta$ A.	190
2014	High molecular mass assemblies of amyloid- $\beta$ oligomers bind prion protein in patients with Alzheimer's disease.	En tejido de pacientes con EA, se detectan oligómeros $\beta$ A de alto peso que co-immunoprecipitan con PrP <sup>C</sup> , pero no en individuos sanos. Los complejos $\beta$ A-PrP <sup>C</sup> detectados corresponden principalmente a la fracción no soluble del homogenado de cerebro.	155
2014	mGlu5 receptors and cellular prion protein mediate amyloid- $\beta$ -facilitated synaptic long-term depression <i>in vivo</i> .	$\beta$ A facilita la depresión a largo plazo (LTD) durante la transmisión sináptica en neuronas de hipocampo de manera dependiente de la interacción $\beta$ A-PrP <sup>C</sup> -mGluR5.	168
2015	Prion protein and copper cooperatively protect neurons by modulating NMDA receptor through S-nitrosylation.	La PrP <sup>C</sup> y el cobre son necesarios para la S-nitrosilación del receptor NMDA. Los quelantes de cobre inhiben este mecanismo. La S-nitrosilación de los receptores NMDA reduce la susceptibilidad a daño por excitotoxicidad.	18
2015	Soluble prion protein binds isolated low molecular weight amyloid- $\beta$ oligomers causing cytotoxicity inhibition	La adición de rPrP durante la agregación del $\beta$ A provoca un cambio en el tamaño y la distribución de los $\beta$ A: disminuye la población de tetrámeros y oligómeros de mayor tamaño (asociados con neurotoxicidad), y aumenta la población de monómeros (posiblemente neuroprotectores).	183
2016	Chronic pharmacological mGluR5 inhibition prevents cognitive impairment and reduces pathogenesis in an Alzheimer's disease mouse model.	La administración crónica de un modulador alostérico negativo de los mGluR5 reduce la acumulación de $\beta$ A en placas y la cantidad de $\beta$ A, y además restaura el déficit cognitivo en los modelos APPswe/PS1dE9 y el 3xTgAD.	169
2016	Oligomers of amyloid prevent physiological activation of the cellular prion protein-metabotropic glutamate receptor 5 complex by glutamate in Alzheimer disease.	La unión de los $\beta$ A al complejo PrP <sup>C</sup> -mGluR5 inhibe las interacciones proteína-proteína activadas por la unión de glutamato al mGluR5, las cuales incluyen la señalización de las cinasas activadas por Ca <sup>2+</sup> /calmodulina.	170

**Tabla 1.9 Estudios que relacionan la unión PrP<sup>C</sup>-βA con *mecanismos neurotóxicos* de la EA y exploran el potencial terapéutico de la inhibición de esta interacción (continuación).**

Año	Nombre del estudio	Hallazgo principal	Ref.
2016	Regulation of amyloid oligomer binding to neurons and neurotoxicity by the prion protein-mGluR5 complex.	Los oβA inhiben la señalización inducida por la unión de laminina al complejo PrP <sup>C</sup> -mGluR5, la cual es importante durante la diferenciación celular.	<sup>171</sup>
2017	Silent allosteric modulation of mGluR5 maintains glutamate signaling while rescuing Alzheimer's mouse phenotypes.	SAM, un modulador de los mGluR5, no interfiere con la señalización inducida por la unión de Glu al mGluR5, pero reduce la unión de los oβA al complejo PrP <sup>C</sup> -mGluR5 y evita el déficit cognitivo en el modelo APP <sup>swe</sup> /PS1 <sup>dE9</sup> evita.	<sup>172</sup>
2018	Cellular prion protein mediates the disruption of hippocampal synaptic plasticity by soluble tau <i>in vivo</i> .	Anticuerpos que se unen a región hidrofóbica de la PrP <sup>C</sup> y su N-terminal evitan la inhibición del LTP causada por la administración cerebroventricular de agregados de tau P301S.	<sup>191</sup>
2020	Preferential recruitment of conformationally distinct amyloid-β oligomers by the intrinsically disordered region of the human prion protein.	PrP <sup>C</sup> une con mayor afinidad los oβA fibrilares (positivos al anticuerpo OC), en comparación con los pre-fibrilares (positivos al anticuerpo A11). La unión de los oβA fibrilares a PrP <sup>C</sup> exagera su toxicidad, mientras que la toxicidad de los anticuerpos pre-fibrilares no se ve modificada por la unión con PrP <sup>C</sup> .	<sup>186</sup>
2020	Aβ oligomers induce pathophysiological mGluR5 signaling in Alzheimer's disease model mice in a sex-selective manner.	Los mecanismos patológicos asociados a la unión de los oβA al complejo PrP <sup>C</sup> -mGluR5 contribuye a la patología tipo EA en ratones transgénicos APP <sup>swe</sup> /PS1 <sup>dE9</sup> machos, pero no en hembras. Los mGluR5 aislados de cerebros de ratones hembra no unen a los oβA.	<sup>173</sup>

**Tabla 1.10 Estudios que relacionan la unión PrP<sup>C</sup>-βA con *mecanismos neuroprotectores* asociados a la EA.**

Año	Nombre del estudio	Hallazgo principal	Ref.
2010	Prion protein and Aβ-related synaptic toxicity impairment	La sobreexpresión de la PrP <sup>C</sup> (sin GPI, no anclada a membrana) en el modelo APP <sup>swe</sup> /PS1L166P reduce significativamente el daño en el LTP.	<sup>192</sup>
2012	Soluble prion protein inhibits amyloid-β (Aβ) fibrillization and toxicity.	La PrP <sup>C</sup> soluble (PrP <sup>C</sup> sin GPI) y su fragmento N-terminal inhiben el ensamble de βA en oligómeros tóxicos. Las regiones importantes para la interacción PrPN1-oβA son la 23-32 y la 94-110.	<sup>174</sup>
2013	An N-terminal fragment of the prion protein binds to amyloid-β oligomers and inhibits their neurotoxicity <i>in vivo</i> .	El fragmento PrPN1, producto del corte proteolítico de la PrP <sup>C</sup> , une oβA, evita su polimerización en fibras, y suprime los efectos neurotóxicos de los oβA <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .	<sup>175</sup>
2016	Soluble prion protein and its N-terminal fragment prevent impairment of synaptic plasticity by Aβ oligomers: implications for novel therapeutic strategy in Alzheimer's disease.	La rPrP y el PrPN1 bloquea la inhibición del LTP inducida por los oβA y la citotoxicidad en cultivos primarios de neuronas. El efecto neuroprotector asociado a la administración de rPrP y el PrPN1 también se observa en los cultivos celulares y rebanadas de hipocampo del ratón <i>knockout</i> para PrP <sup>C</sup> (PRNP <sup>-/-</sup> ), lo cual sugiere que es un efecto independiente a la PrP <sup>C</sup> anclada a la membrana celular.	<sup>176</sup>
2016	Exosomal cellular prion protein drives fibrillization of amyloid beta and counteracts amyloid β-mediated neurotoxicity.	oβA (dímeros, pentámeros y otros oligómeros) se unen a exosomas que contienen PrP <sup>C</sup> con alta afinidad, acelerando la agregación de βA, lo cual reduce la neurotoxicidad de los oβA en cultivo celular.	<sup>177</sup>

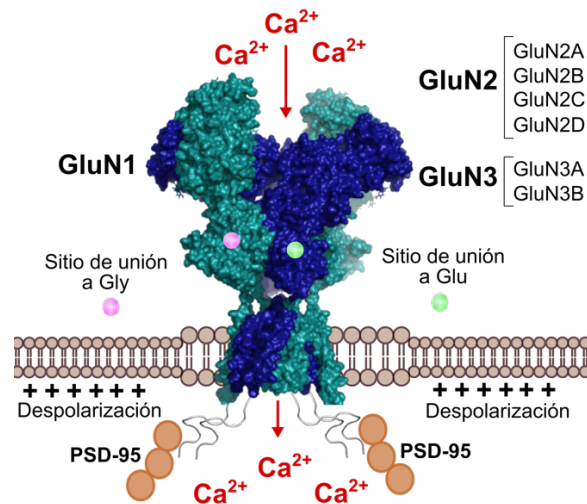
**Tabla 1.10 Estudios que relacionan la unión PrP<sup>C</sup>-βA con mecanismos neuroprotectores asociados a la EA (continuación).**

Año	Nombre del estudio	Hallazgo principal	Ref.
2018	Identification of prion protein-derived peptides of potential use in Alzheimer's disease therapy.	Los fragmentos PrP23–50 y PrP90–112 reducen la velocidad inicial de agregación de βA y alteran la vía de agregación, inhibiendo la formación de oligómeros fibrilares y promoviendo la formación de agregados amorfos. Este efecto protege a las neuronas hipocampales en cultivo de los efectos neurotóxicos de los oβA, previene la retracción de neuritas y la pérdida de la integridad membranal.	<sup>185</sup>
2019	Proteolytic shedding of the prion protein via activation of metallopeptidase ADAM10 reduces cellular binding and toxicity of amyloid-β oligomers.	El desanclaje de PrP <sup>C</sup> de la membrana celular a través del corte proteolítico del GPI por ADAM10 reduce la unión de oβA a la membrana celular, mientras que una disminución en la expresión de ADAM10 incrementa la unión de los oβA a la membrana celular vía PrP <sup>C</sup> . Además, la activación de ADAM10 previene los mecanismos neurotóxicos asociados a la unión oβA-PrP <sup>C</sup> .	<sup>178</sup>

#### **D. La PrP<sup>C</sup> y cobre como moduladores de los receptores para NMDA y su relevancia en la Enfermedad de Alzheimer**

Los receptores NMDA son tetrámeros de proteínas transmembranales, en cuya interfaz forman un canal permeable a Ca<sup>2+</sup> (Ver Figura 1.9).<sup>179</sup> Estos tetrámeros se integran a partir de siete tipos de subunidades: GluN1, GluN2A, GluN2B, GluN2C, GluN2D, GluN3A y GluN3B (Ver Figura 1.9).<sup>179</sup> Todos los receptores NMDA tienen obligatoriamente dos subunidades GluN1 y dos subunidades variables que pueden ser GluN2A-D o GluN3A-B.<sup>179</sup> A diferencia de otros canales iónicos activados por neurotransmisores, la apertura de los receptores NMDA requiere además de la unión del agonista (NMDA, D-aspartato o glutamato), la despolarización de la membrana celular, y la unión del co-agonista (glicina o D-serina) (Ver Figura 1.9).<sup>179</sup> En los receptores GluN1/GluN2, el agonista se une al dominio extracelular de las subunidades GluN2, mientras el co-agonista se une a las subunidades GluN1. Cada subunidad de los receptores NMDA tienen un extremo C-terminal intracelular, donde son reclutadas una serie de proteínas, las cuales tras la apertura del canal pueden activar una amplia gama de cascadas de señalización dependiendo de las características de la corriente de Ca<sup>2+</sup>.<sup>193-195</sup> Algunas de estas vías de señalización participan en el control de la plasticidad de las espinas dendríticas—formación de nuevas espinas, la estabilización de las espinas existentes o la desaparición de las mismas—proceso esencial para el aprendizaje y la memoria.<sup>196-199</sup> Sin embargo, cuando las corrientes de Ca<sup>2+</sup> se mantienen por tiempo prolongado, también pueden activar mecanismos involucrados en la atrofia y muerte celular.<sup>200</sup> De tal forma que, el control fino de la actividad de los receptores NMDA es crucial

para mantener la homeostasis entre la plasticidad y la muerte neuronal. La sobre-activación de los receptores NMDA se ha vinculado con los mecanismos patológicos de la EA, siendo la memantina—un antagonista los receptores NMDA—uno de los seis fármacos aprobados por la FDA para el tratamiento de la EA.<sup>201</sup>



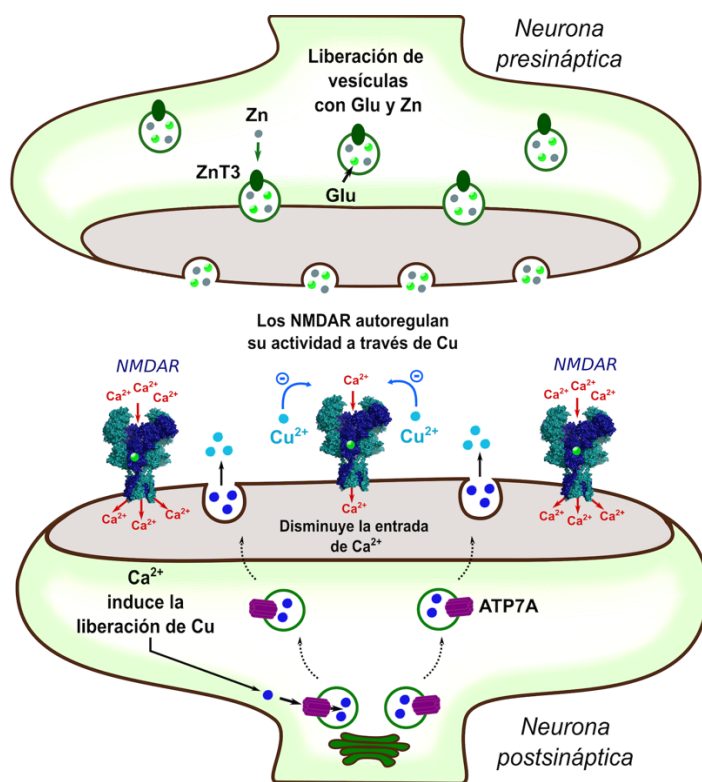
**Figura 1.9. Receptores NMDA: estructura y subunidades.** Representación esquemática de los receptores NMDA construida a partir de la estructura Cryo-EM de los receptores GluN1/GluN2A (PDB: 6IRA) embebida en la representación esquemática de una membrana celular. De color azul claro se muestran las subunidades GluN1 y de color azul oscuro las subunidades GluN2, con esferas de color rosa se ilustra al co-agonista glicina y de color verde al agonista glutamato. En el extremo superior izquierdo se enlistan los tipos de subunidades GluN2. En la cara intracelular del receptor se agregan representaciones esquemáticas de los dominios intracelulares del receptor y de la proteína PSD-95.

Las características de las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  que entran a través de los receptores NMDA y en consecuencia las vías de señalización que activan dependen de varios factores, tales como: el tipo de subunidades que conforman el receptor, la concentración de agonistas y co-agonistas en la sinapsis, y la unión de moduladores a los dominios extracelulares del receptor.<sup>179</sup> En varios estudios *in vitro*, se ha demostrado que el  $\text{Cu}^{2+}$  puede modular la actividad de los receptores NMDA.<sup>49, 202-204</sup> Esto es consistente con la rápida liberación de este metal al espacio extracelular tras la activación de dichos receptores, a través de un mecanismo que involucra la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y el movimiento de vesículas de la vía secretora que contienen al transportador de cobre ATP7A hacia las dendritas (Ver Figura 1.10).<sup>205</sup> Aunque hasta el momento no se ha identificado algún sitio de unión a  $\text{Cu}^{2+}$  en los receptores NMDA, la administración de quelantes de  $\text{Cu}^{2+}$  o el *knockout* del gen que codifica para PrP<sup>C</sup> prolonga la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  asociada a la activación de los receptores

NMDA.<sup>48</sup> En estudios *in vitro* se demostró que la PrP<sup>C</sup> se une directamente a los receptores NMDA de forma dependiente de Cu<sup>2+</sup>. La formación de este complejo PrP<sup>C</sup>-NMDAR provoca la reducción de la afinidad de Gly por el receptor NMDA, la disminución de la entrada de Ca<sup>2+</sup> y la prevención de la muerte celular por exposición excesiva a NMDA.<sup>48</sup> En conjunto, esta evidencia indica que el Cu<sup>2+</sup> y la PrP<sup>C</sup> participan en un mecanismo neuroprotector que regula la cantidad de Ca<sup>2+</sup> que entra a través de los receptores NMDA (Ver Figura 1.10).<sup>48</sup> Este mecanismo puede ser inhibido por el βA—otra de las metaloproteínas involucradas en la EA—tanto en su forma monómerica como oligomérica.<sup>48</sup> El βA interfiere en la unión PrP<sup>C</sup>-NMDAR, prolonga la entrada de Ca<sup>2+</sup> y aumenta la excitotoxicidad.<sup>48</sup> Es importante destacar que el efecto del βA en la corriente de Ca<sup>2+</sup> se revierte totalmente al cambiar el medio de cultivo,<sup>48</sup> sugiriendo que dicho efecto neurotóxico depende de la capacidad de este péptido para quelar Cu<sup>2+</sup> y no de la unión βA-PrP<sup>C</sup>. Con base en estas observaciones, se ha propuesto que parte de la toxicidad del βA se debe a su capacidad para competir por Cu<sup>2+</sup> con la PrP<sup>C</sup> e inhibir la modulación de los receptores NMDA dependiente de Cu<sup>2+</sup> y PrP<sup>C</sup>.<sup>48</sup>

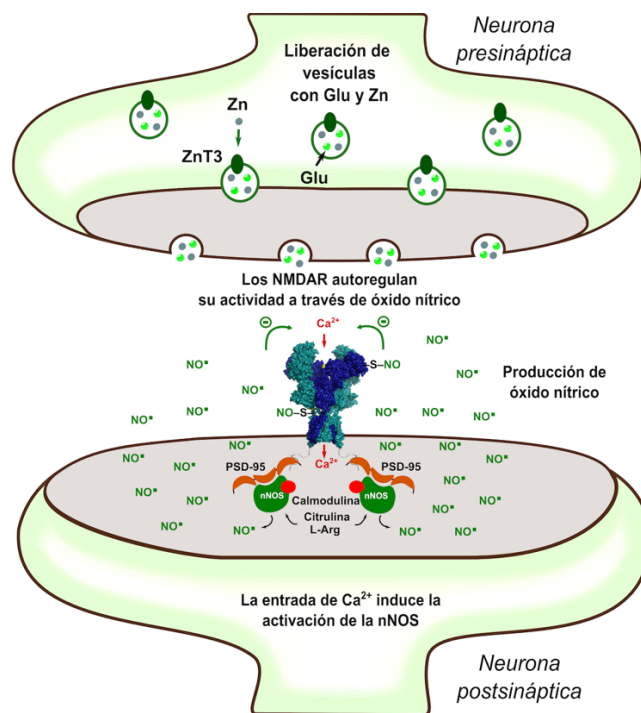
Por otra parte, tanto la PrP<sup>C</sup> como el Cu<sup>2+</sup> se han asociado a otro mecanismo de regulación de los NMDAR.<sup>18</sup> Este mecanismo involucra la modificación postraducional conocida como S-nitrosilación,<sup>18</sup> la cual consiste en la unión selectiva y reversible de una molécula de óxido nítrico (NO•) a un residuo de Cys para formar un S-nitrosotiol (-SNO).<sup>206, 207</sup> Aunque el receptor NMDA tiene varios sitios de nitrosilación, únicamente se han identificado tres residuos de Cys, cuya nitrosilación disminuye las corrientes de Ca<sup>2+</sup>: las Cys744 y Cys798 en la subunidad GluN1 y la Cys399 en la subunidad GluN2A.<sup>208, 209</sup> En las células neuronales, la producción de NO• está estrechamente asociada a la actividad de los receptores NMDA (Ver Figura 1.11). El dominio C-terminal de las subunidades Glu2NB forma un complejo con la proteína de densidad postsináptica (PSD-95) y la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS)—enzima que sintetiza NO• a partir de L-arginina (Ver Figura 1.11).<sup>210</sup> Aunque la formación del complejo NMDAR-PSD-95-nNOS no depende de la apertura de los receptores NMDA, la activación de la nNOS requiere de la unión de Ca<sup>2+</sup> a la proteína calmodulina (CaM), lo cual ocurre tras activarse los receptores NMDA.<sup>207</sup> Lo anterior indica que al igual de que el Cu<sup>2+</sup>, el NO• participa en un mecanismo de retroalimentación negativa de los

receptores NMDA (Ver Figura 1.11). A pesar de que la S-nitrosilación de los residuos de Cys es una modificación post-traduccional común, la química detrás de la formación de los nitrosotioles ( $-SNO$ ) en condiciones fisiológicas no está clara.<sup>211</sup> El  $NO^{\bullet}$  es una molécula gaseosa con un electrón desapareado; pero a diferencia de otros radicales libres, el  $NO^{\bullet}$  difícilmente puede aceptar o donar un electrón, tal como se reflejan en su potencial de reducción ( $-0.8$  V vs NHE) y de oxidación ( $1.2$  V vs NHE).<sup>212</sup> Además, el  $NO^{\bullet}$  carece de una carga formal negativa, por lo que tampoco es un buen nucleófilo.<sup>212</sup> Estas características hacen al  $NO^{\bullet}$  un radical libre relativamente estable en condiciones fisiológicas, que reacciona únicamente con otros radicales libres como superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) y con metales de transición como  $Fe^{3+}$  y  $Cu^{2+}$  (ver Figura 1.11).<sup>212, 213</sup>



**Figura 1.10. Modulación de los receptores NMDA dependiente de  $Cu^{2+}$ .** Representación esquemática de una sinapsis glutamatergica en la que se liberan zinc con glutamato de las neuronas presinápticas y cobre de las neuronas postsinápticas. En las neuronas presinápticas el zinc es cargado en las vesículas de glutamato por el transportador ZnT3. Por otra parte, la entrada de calcio a través de los receptores NMDA en las neuronas postsinápticas promueve que vesículas de vía secretora que expresan al transportador de  $Cu^+$  ATP7A sean cargadas dicho metal y exportadas a las dendritas, donde liberan el metal al espacio extracelular y se reciclan las vesículas. El cobre en el espacio extracelular podría encontrarse como  $Cu^{2+}$  y modular de manera negativa la activación de los receptores NMDAR.

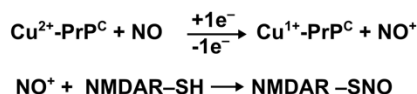
El papel de la PrP<sup>C</sup> y Cu<sup>2+</sup> en la S-nitrosilación se ha puesto en evidencia utilizando cultivos de células neuronales de ratones *knockout* para PrP<sup>C</sup> y administrando quelantes de cobre (cuprizona) en cultivos de células neuronales que expresan PrP<sup>C</sup>.<sup>18</sup> En ambos casos, la S-nitrosilación de la subunidad GluN1 y GluN2A disminuye y esto se asocia con una mayor susceptibilidad de las neuronas a sufrir muerte celular por estimulación excesiva con NMDA.<sup>18</sup> En este contexto, se ha propuesto que los complejos Cu<sup>2+</sup>-PrP<sup>C</sup> pueden favorecer la formación de los S-nitrosotioles, a partir de la reducción de Cu<sup>2+</sup> para producir el catión nitrosonio (NO<sup>+</sup>), especie química que puede reaccionar rápidamente con los tiolatos de las Cys (Ver Figura 1.12).<sup>18</sup> Aunque experimentalmente no se ha evaluado el efecto del βA en la S-nitrosilación de los NMDAR, se asume que dicho péptido puede interferir en este mecanismo debido a su capacidad para quelar Cu<sup>2+</sup>.<sup>18</sup>



**Figura 1.11. Modulación de la actividad de los receptores NMDA dependiente de óxido nítrico.** Representación esquemática de una sinapsis glutamatergica en la que se liberan zinc con glutamato de las neuronas presinápticas y oxido nítrico de las neuronas postsinápticas. En las neuronas presinápticas el zinc es cargado en las vesículas de glutamato por el transportador ZnT3. Por otra parte, en las neuronas postsinápticas se encuentra la proteína de andamiaje, PSD-95, anclada los dominios intracelulares de los receptores NMDA GluN1/GluN2B e interaccionando de manera simultánea con la oxido nítrico sintasa neuronal (nNOS). La entrada de calcio a través de los receptores NMDA induce la activación de la nNOS al promover la unión de Ca<sup>2+</sup> a calmodulina. La nNOS produce oxido nítrico a partir de citrulina y L-Arginina y utilizando zinc como cofactor.



**Oxidación de óxido nítrico  
promovida por los complejos  
Cu<sup>2+</sup>-PrP<sup>C</sup>**



**Figura 1.12. S-nitrosación de los NMDAR dependiente de PrP<sup>C</sup> y Cu<sup>2+</sup>.** Se muestra el mecanismo propuesto para la formación de S-nitrosotioles dependiente de los complejos Cu<sup>2+</sup>-PrP<sup>C</sup>.

En general, los estudios descritos en esta sección indican que tanto la formación del complejo PrP<sup>C</sup>-NMDAR como la S-nitrosilación del receptor NMDA promovida por la PrP<sup>C</sup> dependen de Cu<sup>2+</sup>. Por lo que, ambos mecanismos pueden ser afectados por el βA. Sin embargo, dado que la PrP<sup>C</sup> posee varios sitios de unión a metal que dan lugar a diferentes modos de coordinación con afinidades diferentes por el metal, es de gran importancia identificar cuáles de los modos de coordinación de los complejos Cu<sup>2+</sup>-PrP pueden promover la unión PrP<sup>C</sup>-NMDAR y cuáles la S-nitrosilación de los receptores NMDA. Asimismo, es importante caracterizar el efecto del βA en la coordinación de Cu<sup>2+</sup> a la PrP<sup>C</sup>, a fin de entender como este péptido puede interrumpir la modulación del NMDAR que depende de Cu<sup>2+</sup> y PrP<sup>C</sup>.

#### **1.4. La química detrás de la unión de cobre a proteínas**

En los seres vivos la cantidad de Cu<sup>2+</sup> y Cu<sup>+</sup> unido a moléculas de agua es cercana a cero, ya que prácticamente todo el metal está unido a péptidos y proteínas.<sup>214, 215</sup> Dicha unión ocurre a través de enlaces covalentes coordinados, donde el metal actúa como un ácido de Lewis (especie capaz de aceptar pares de electrones) y algunos grupos presentes en los péptidos y proteínas funcionan como bases de Lewis (especies donadoras de electrones) (Ver Figura 1.11).<sup>20, 22, 216, 217</sup> De acuerdo con sus propiedades y reactividad, los ácidos y bases de Lewis se pueden clasificar en suaves y duros: los ácidos y bases suaves son átomos grandes con nubes electrónicas fácilmente polarizables, mientras los ácidos y bases duros son átomos de menor tamaño con nubes electrónicas menos polarizables.<sup>22, 216, 217</sup> Los complejos más estables se forman entre ácidos y bases de similar dureza, por ejemplo: un ácido duro forma complejos más estables con una base dura que con una blanda.<sup>22, 216</sup> En este contexto, el Cu<sup>+</sup> es un ácido más suave que el Cu<sup>2+</sup>, ya que el Cu<sup>+</sup> tiene un electrón adicional en la capa de valencia (3d<sup>10</sup>) en comparación con el Cu<sup>2+</sup> (3d<sup>9</sup>), esto le confiere un mayor radio iónico, una

menor carga y en consecuencia mayor polarizabilidad.<sup>22,216</sup> Lo anterior explica porqué el  $\text{Cu}^+$  se coordina principalmente a bases suaves, como el tiolato ( $\text{S}^-$ ) de los residuos de Cys y el azufre los residuos de Met ( $\text{CH}_2\text{-S-CH}_3$ ) (Ver figura 1.11); mientras que, el  $\text{Cu}^{2+}$  se coordina preferentemente a átomos donde la densidad electrónica es menos polarizable, es decir más dura, tal es el caso de los nitrógenos de los residuos de His, los grupos  $\text{NH}_2$  del extremo *N*-terminal y las amidas desprotonadas de los enlaces peptídicos (Ver figura 1.11).<sup>22,216</sup> El tipo de átomos a los que se une el cobre determina la estabilidad y reactividad de los complejos metal-proteína y en consecuencia su capacidad para formar complejos metálicos capaces de estabilizar ciertas conformaciones de las proteínas, o bien para catalizar reacciones de oxido-reducción, como la S-nitrosilación.<sup>142, 143, 216, 218</sup> Los sitios de unión a cobre que están involucrados en reacciones de oxido-reducción controladas, comúnmente poseen átomos que pueden estabilizar al metal en sus dos estados de oxidación.<sup>216</sup>

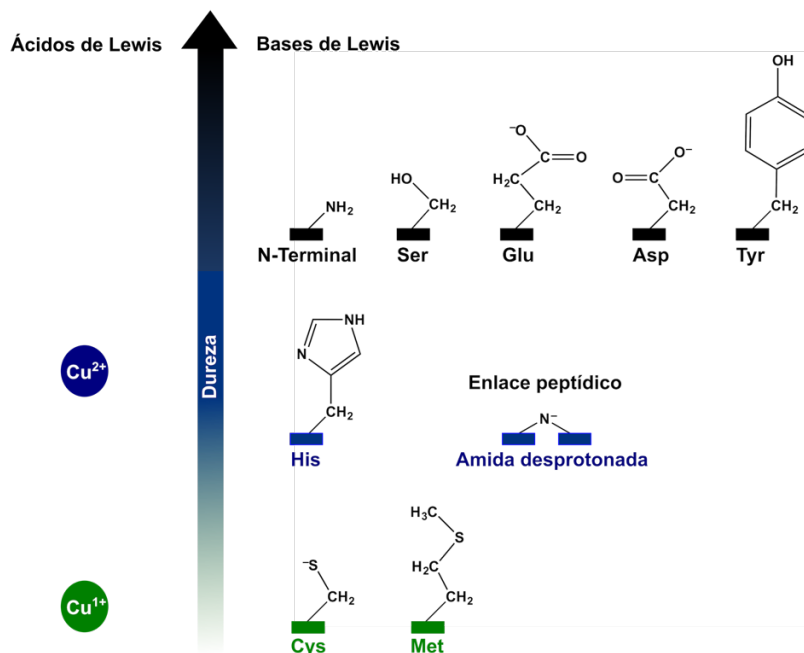


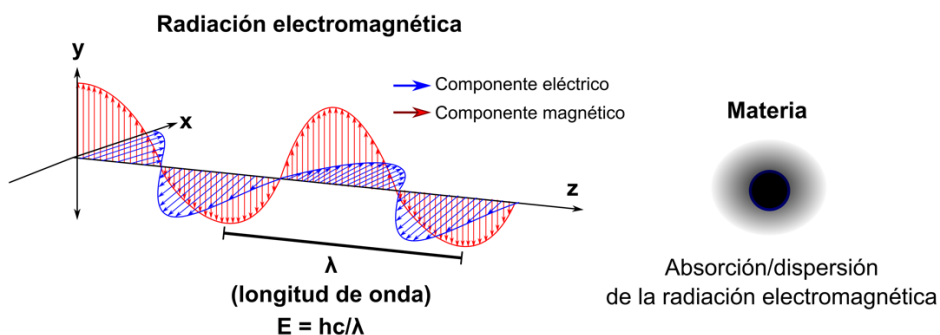
Figura 1.11. Átomos donadores presentes en las proteínas (bases de Lewis) y dureza del Cu (ácido de Lewis) en función de su estado de oxidación.

### 1.5. La espectroscopia como herramienta para estudiar los complejos metal-proteína

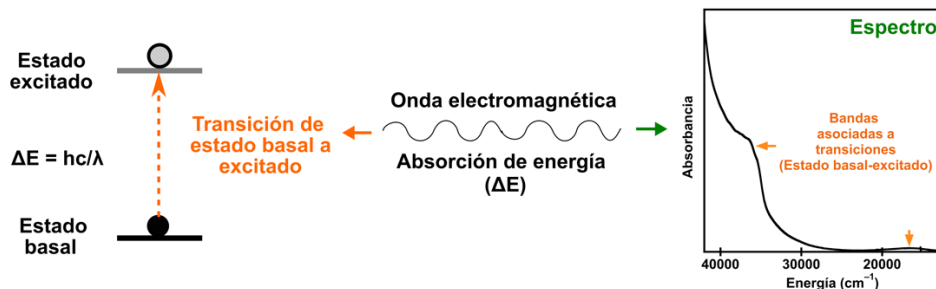
La espectroscopia es una de las herramientas más utilizadas para elucidar el tipo de átomos que forman la esfera de coordinación de los complejos metal-proteína, así como para estudiar su reactividad. Por definición, la espectroscopia es el estudio de la interacción de la radiación

electromagnética con la materia.<sup>219</sup> En todas las técnicas espectroscópicas, la muestra se expone a radiación electromagnética, es decir ondas de campos eléctricos y magnéticos oscilantes que propagan a través del espacio (ver Figura 1.13a).<sup>219</sup> La muestra (materia) puede absorber, difractar, reflejar, dispersar o transmitir la radiación electromagnética dependiendo de su estructura y de la longitud de la radiación electromagnética incidente.<sup>219</sup> La materia absorbe ondas electromagnéticas cuando éstas le proveen la energía necesaria para experimentar una transición de un estado basal a un estado excitado (ver Figura 1.13b).<sup>220</sup>

(a) Interacción de la radiación electromagnética con la materia



(b) Transiciones asociadas a la absorción de ondas electromagnéticas



**Figura 1.13 Fundamentos de espectroscopia.** (a) Radiación electromagnética y su interacción con la materia (b) Transiciones asociadas a la absorción de radiación electromagnética.

Los espectrofotómetros miden los cambios que sufre la radiación electromagnética al contacto con la materia, dando como resultado un gráfico conocido como espectro. A partir del análisis de los espectros se puede inferir el tipo de transiciones que experimenta la materia y en consecuencia la organización de la misma.<sup>221</sup> Dependiendo de la energía de la radiación electromagnética utilizada, se pueden producir transiciones entre estados vibracionales (espectroscopia infrarroja), estados electrónicos (espectroscopia de absorción electrónica y

dicroísmo circular electrónico), y estados de espín (resonancia de espín electrónico y resonancia magnética nuclear), ver Figura 1.14.<sup>219, 221</sup> A continuación, se describe brevemente en que consisten las técnicas espectroscópicas empleadas en este proyecto—absorción electrónica, dicroísmo circular electrónico (CD, por sus siglas en inglés) y resonancia de espín electrónico (ESR, por sus siglas en inglés)—y el tipo de información que se obtiene de los complejos  $\text{Cu}^{2+}$ -proteína a partir del análisis de los espectros correspondientes.

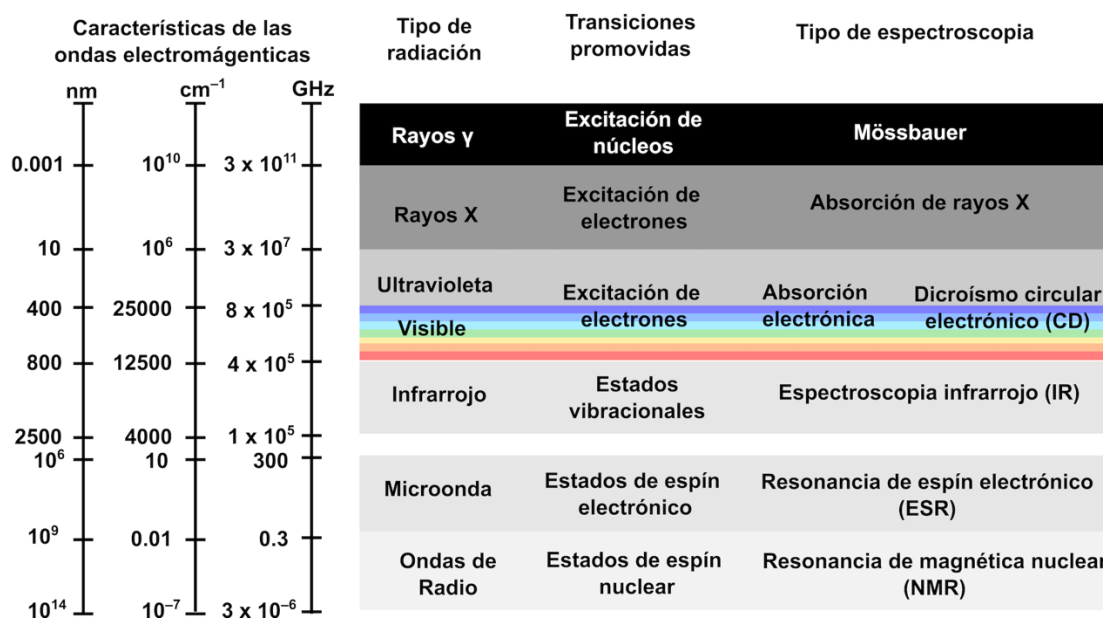


Figura 1.14 Diferentes tipos de espectroscopias en función del tipo de radiación electromagnética y el tipo de transiciones promovidas.

### A. Espectroscopia de absorción electrónica

Al estudiar complejos  $\text{Cu}^{2+}$ -proteína por espectroscopia de absorción electrónica, se hace incidir radiación electromagnética de entre 210–800 nm equivalente a  $47\,600$ – $12\,500\text{ cm}^{-1}$ —región ultravioleta-visible—sobre el complejo metálico en solución (Ver Figura 1.14).<sup>221</sup> En este rango de energías, los complejos metal-proteína experimentan transiciones entre estados electrónicos. Para entender este tipo de transiciones, es necesario analizar cómo se organizan los electrones dentro de los complejos metal-proteína. La teoría orbital-molecular provee una descripción de la estructura electrónica particularmente útil para entender las transiciones entre estados electrónicos (Ver Figura 1.15a).<sup>222</sup> De acuerdo con esta teoría, los

electrones de un átomo están organizados en orbitales, los cuales son descripciones matemáticas de la región del espacio donde es probable encontrar los electrones alrededor del núcleo atómico (densidad o nube electrónica).<sup>223</sup> La energía de los electrones en los orbitales es variable dependiendo de su interacción con otras partículas cargadas (electrones o protones). Al formarse un enlace, dos orbitales atómicos se combinan para dar lugar a un par de orbitales moleculares, donde se alojan los dos electrones que participan en un enlace.<sup>224</sup> En la Figura 1.15a se muestra la representación gráfica de los orbitales moleculares del enlace de coordinación formado entre  $\text{Cu}^{2+}$  y un ligante. En este diagrama, cada orbital se representa con una línea horizontal gruesa y los electrones con flechas; todos los orbitales están distribuidos en el eje de las  $y$  de acuerdo con su energía relativa. Los orbitales atómicos de la capa de valencia del  $\text{Cu}^{2+}$  se encuentran del lado izquierdo y los del ligante ( $\text{His}$ ,  $\text{N}^-$ ,  $\text{NH}_2$ , etcétera) del lado derecho; mientras que, en el centro se encuentran los orbitales moleculares del enlace metal-ligante (Ver Figura 1.15). En el diagrama de orbitales moleculares es importante resaltar que los cinco orbitales  $d$  en el átomo de  $\text{Cu}^{2+}$  tienen la misma energía, pero al formar el complejo metal-proteína sufren un desdoblamiento energético conocido como efecto campo-ligante (Ver Figura 1.15).<sup>225</sup> La magnitud de este desdoblamiento depende de la geometría del complejo—la cual está determinada por la posición de los ligantes con respecto al metal—y la fuerza de las interacciones metal-ligante. Otro detalle que cabe resaltar es que, el  $\text{Cu}^{2+}$  solo tiene nueve electrones en la capa de valencia, por lo cual uno de sus orbitales  $d$  está parcialmente desocupado.<sup>225</sup> Lo anterior da lugar a dos tipos de transiciones electrónicas en los complejos  $\text{Cu}^{2+}$ -proteína:

**1) Las transferencias de carga ligante-metal (LMCT, por sus siglas en inglés)**, donde un electrón ubicado en un orbital con carácter predominante del ligante (configuración electrónica basal) pasa al orbital  $d$  desocupado (configuración electrónica excitada), ver línea punteada de color rojo en la Figura 1.15a.

**2) Las transiciones  $d-d$** , donde un electrón ubicado en alguno de los orbitales  $d$  llenos (estado electrónico basal) pasa al orbital  $d$  desocupado (estado electrónico excitado), ver líneas punteadas de color azul en la Figura 1.15a.

Durante la medición del espectro de absorción electrónica, el complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -proteína absorbe las ondas cuya energía es igual a la diferencia de energías entre la configuración electrónica basal y excitada. De tal forma que, a partir de la longitud de onda en la cual se observan los máximos de absorción se pueden identificar el tipo de transiciones LMCT que experimenta el complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -proteína (Figura 1.15b y Tabla 1.10), y por consiguiente se puede inferir el tipo de ligantes presentes en la esfera de coordinación.<sup>225</sup> La energía donde se observan las transiciones  $d-d$  también proporciona información sobre la esfera de coordinación. En los complejos que involucran ligantes de alta covalencia como es el caso de las amidas desprotonadas, el desdoblamiento de los orbitales  $d$  es de mayor magnitud y en consecuencia las transiciones  $d-d$  se observan a mayores energías.<sup>225</sup>

(a) Diagrama de orbitales moleculares

(b) Espectro de absorción electrónica

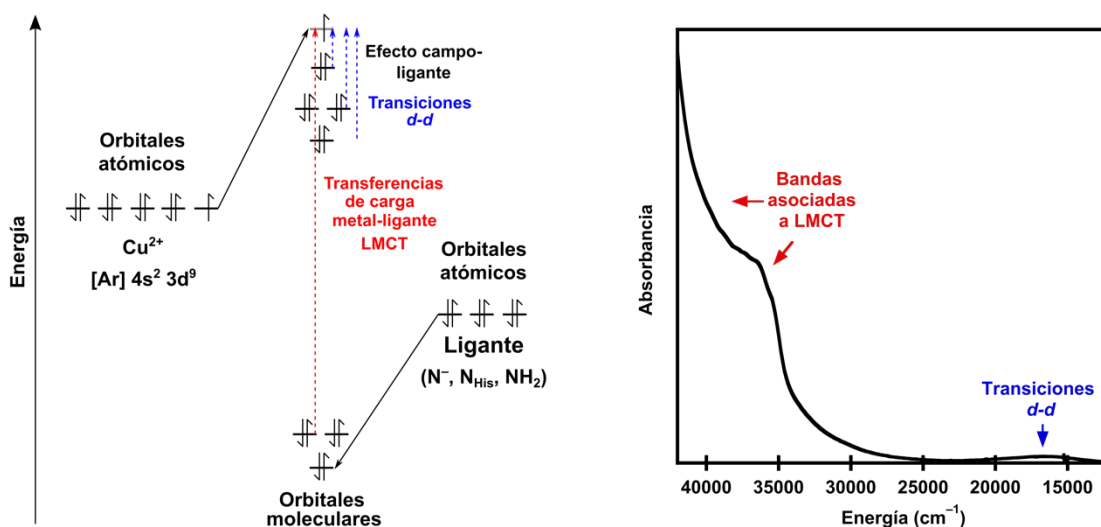
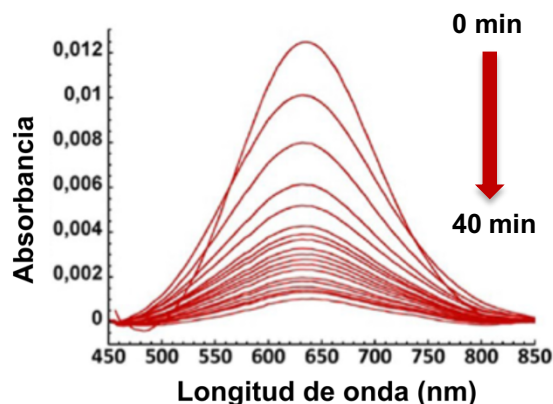


Figura 1.15 Transiciones electrónicas observadas en los complejos metal-proteína (a) y bandas asociadas a estas transiciones electrónicas.

Tabla 1.11. Energía/longitud de onda a la cual se observan las bandas asociadas a las transferencias de carga metal-ligante.

Transferencia de carga metal-ligante (LMCT)	Longitud de onda (nm)	Energía ( $\text{cm}^{-1}$ )
$\text{NH}_2 \rightarrow \text{Cu}^{2+}$	238–250	40 000–42 000
$\text{N}_{\text{im}} \pi 2 \rightarrow \text{Cu}^{2+}$ (originada en el orbital molecular con mayor contribución de nitrógeno)	245–308	32 500–40 800
$\text{N}^- \rightarrow \text{Cu}^{2+}$	323–294	31 000–34 000
$\text{N}_{\text{im}} \pi 1 \rightarrow \text{Cu}^{2+}$ (originada en el orbital molecular con mayor contribución de carbono)	280–370	27 000–35 700

Además de su importancia para identificar el tipo de transiciones electrónicas en los complejos-metal proteína, la espectroscopia de absorción electrónica también es muy útil para estudiar la cinética de algunas reacciones. Lo anterior debido a que los espectros de absorción electrónica se puede obtener en fracciones de segundos y esto facilita la evaluación de los cambios en dichos espectros en función del tiempo.<sup>221</sup> En el caso de los complejos  $\text{Cu}^{2+}$ -proteína, la cinética de reducción de  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$  se puede estudiar al analizar los cambios en la banda  $d-d$  en función del tiempo. El  $\text{Cu}^+$  al tener sus cinco orbitales  $d$  llenos no puede experimentar transiciones  $d-d$  (Ver Figura 1.15). Por lo anterior, la cinética de desaparición de la banda  $d-d$  durante permite monitorear la reducción de  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$  (Ver Figura 1.16).<sup>143, 226</sup>



**Figura 1.16.** Uso de la espectroscopia de absorción electrónica para estudiar la cinética de reacciones de oxido-reducción de  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$ . Espectro de absorción electrónica del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ - $\alpha$ -sinucleína (1–6) en la región  $d-d$  en función del tiempo, después de agregar un agente reductor (ácido ascórbico). Resultados obtenidos previamente en el laboratorio de la Dra. Liliana Quintanar, ver referencia <sup>226</sup>.

## B. Espectroscopia de dicroísmo circular electrónico

Aunque la espectroscopia de absorción electrónica es una técnica muy útil para estudiar los complejos metal-proteína, en muchas ocasiones las bandas se traslapan, lo cual dificulta la identificación del tipo de transiciones electrónicas. La técnica de dicroísmo circular electrónico (CD, por sus siglas en inglés) es una alternativa que resuelve por lo menos en parte estas limitaciones.<sup>225, 227</sup> Al estudiar los complejos  $\text{Cu}^{2+}$ -proteína por CD se utilizan ondas electromagnéticas en el mismo rango de energía que en la espectroscopia de absorción electrónica (luz de 210–800 nm equivalente a  $47\,600$ – $12\,500\text{ cm}^{-1}$ ), por lo que se observan el mismo tipo de transiciones entre estados electrónicos.<sup>225</sup> Sin embargo, en el equipo de CD, el componente eléctrico del rayo de luz se polariza circularmente hacia la izquierda y hacia

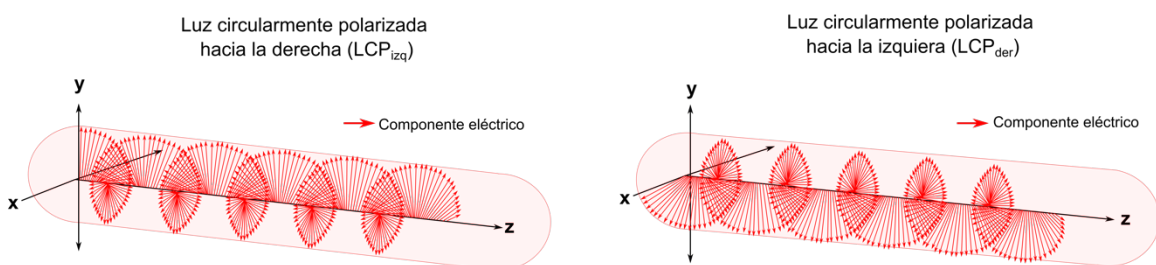
la derecha en la dirección de propagación (ver Figura 1.17a).<sup>227</sup> Esto es útil para el estudio de complejos metal-proteína con imágenes especulares que no son superponibles (complejos quirales), ya que dichas especies absorben en diferente magnitud la luz polarizada hacia la izquierda ( $LCP_{izq}$ ) y la luz polarizada hacia la derecha ( $LCP_{der}$ ) (ver Figura 1.17c).<sup>225, 227</sup> La señal de CD es igual a esta diferencia de absorbancias de la  $LCP_{izq}$  y la  $LCP_{der}$  ( $CD = \Delta A = ALCP_{izq} - ALCP_{der}$ ).<sup>225, 227</sup> De tal forma que, cuando un compuesto quiral absorbe en mayor magnitud la  $LCP_{izq}$  se observa una señal de CD positiva; por el contrario, cuando la absorción de la  $LCP_{der}$  es mayor, la señal de CD es negativa; y para los complejos no quirales la señal de CD igual a cero (ver Figura 1.17).<sup>225</sup> La quiralidad de los complejos metal-proteína depende de varios factores, entre ellos: la presencia de ligantes no equivalentes en la esfera de coordinación, la geometría del complejo, y la presencia de centros quirales en átomos cercanos al ligante.<sup>228</sup> Por ejemplo, en los complejos que involucran amidas desprotonadas, el centro quiral presente en el carbono alfa de todos aminoácidos (con excepción de la glicina) se encuentra adyacente a la amida desprotonada (ligante) y contribuye a la quiralidad del complejo (Figura 1.17b).<sup>228</sup> Cabe resaltar que existen algunos complejos metal-proteína que no son quirales, por lo que su señal de CD es igual a cero. En la Figura 1.17c se muestra un ejemplo de un complejo metal-proteína no quiral, en este complejo los cuatro átomos que unen al  $Cu^{2+}$  y las cadenas laterales de los aminoácidos a los que pertenecen son idénticos.<sup>133</sup>

Aunque las transiciones electrónicas en los espectros de CD y absorción electrónica se observan en el mismo valor de energía, en los espectros de CD, las señales cambian de signo positivo/negativo o negativo/positivo en función de la longitud de onda. A este fenómeno se le conoce como Efecto Cotton y es de gran utilidad para discernir entre transiciones electrónicas que ocurren en valores cercanos de energía (ver Figura 1.18a-d).<sup>225</sup> Un ejemplo de lo anterior se observa al comparar los espectros de absorción electrónica y CD del complejo  $Cu^{2+}$ -PrP(106–115) (ver Figura 1.18a-d).<sup>225</sup> En el espectro de absorción electrónica se traslapan varias bandas correspondientes a las LMCT del complejo  $Cu^{2+}$ -PrP(106–115), y se observa únicamente una banda *d-d* alrededor de los  $17\ 000\ cm^{-1}$  (ver Figura 1.18 a y c).<sup>225</sup> Por el contrario, en el espectro de CD, se distinguen claramente dos bandas asociadas a transiciones LMCT en  $38\ 000\ cm^{-1}$  y  $31\ 500\ cm^{-1}$  y dos de las transiciones *d-d* (Ver figura 1.18b y d).<sup>225</sup> Además de la utilidad de la técnica de CD para identificar el tipo de transiciones

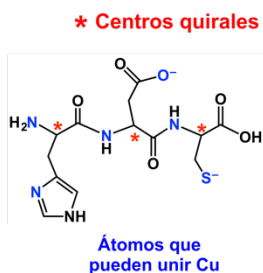


que experimenta con complejo metal-proteína, la intensidad y el signo del efecto Cotton también provee información sobre la esfera de coordinación.<sup>228-230</sup> Por lo general, la intensidad del efecto Cotton es mayor en aquellos complejos que involucran amidas desprotonadas, ya que en estos casos la presencia del centro quiral en el carbono alfa de los aminoácidos tiene un impacto importante en la quiralidad del complejo metal-proteína.<sup>228-230</sup> Por otra parte, el signo del efecto Cotton de este mismo tipo de complejos está asociado el impedimento estérico de las cadenas laterales de los aminoácidos involucrados en la coordinación y la distorsión que esto causa en la geometría del complejo (ver Figura 1.18).<sup>228-230</sup> En general, la técnica de CD es muy útil para distinguir complejos metálicos quirales con esferas de coordinación similares (ver Figura 1.18a-d).<sup>225</sup>

**(a) El equipo de CD utiliza luz polarizada hacia la izquierda y hacia la derecha**

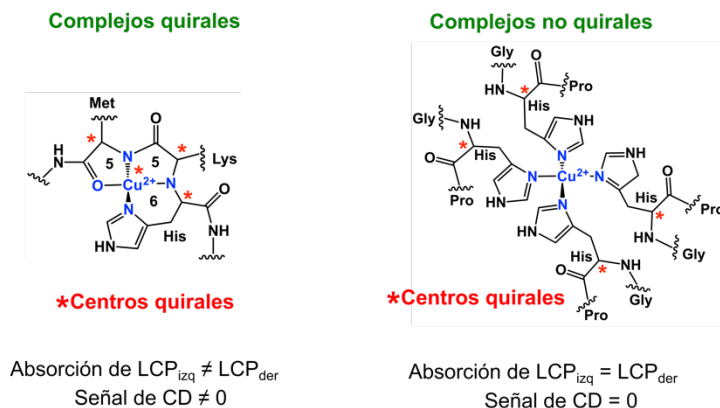


**(b) Las cadenas peptídicas poseen varios centros quirales**

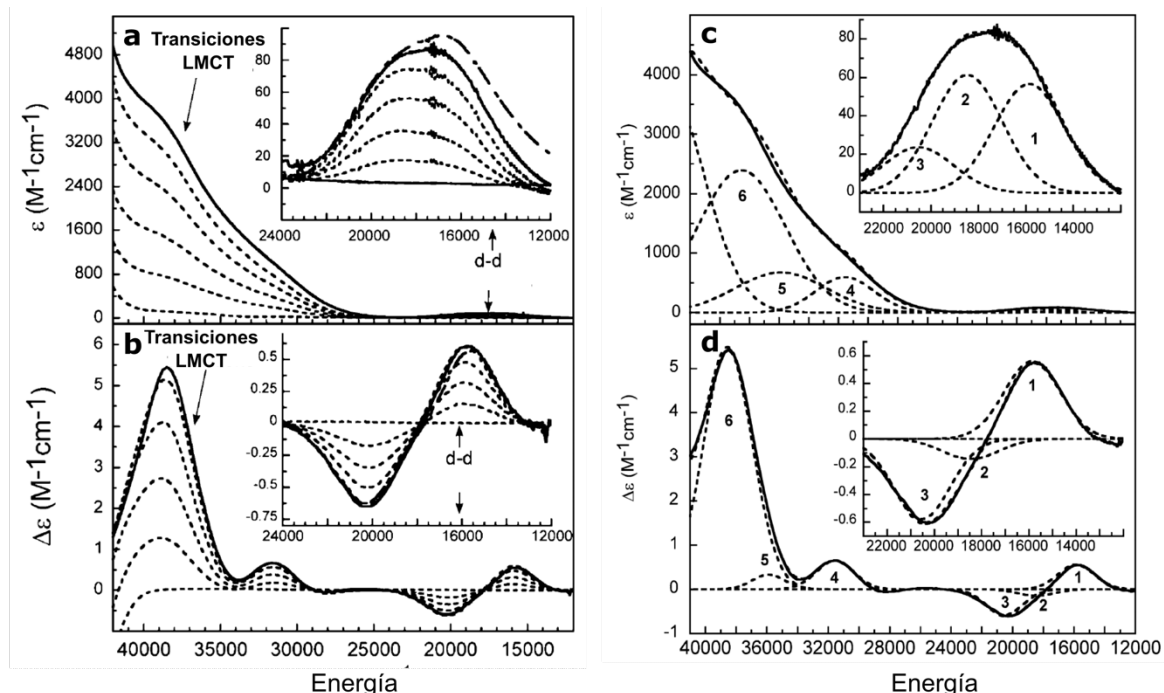


La quiralidad de la cadena peptídica puede contribuir en algunos casos a la quiralidad de los complejos metal-proteína

**(c) Los complejos metal-proteína quirales absorben en diferente magnitud la LCP<sub>izq</sub> y la LCP<sub>der</sub>**



**Figura 1.17 Estudio de complejos metal-proteína por dicroísmo circular electrónico.** (a) El equipo de CD utiliza luz circularmente polarizada hacia la izquierda (LCP<sub>izq</sub>) y luz circularmente polarizada hacia la derecha (LCP<sub>der</sub>) (b) Los centros quirales de las cadenas peptídicas pueden contribuir a la quiralidad de los complejos metal-proteína cuando los átomos que participan en la coordinación están cerca de dichos centros (c) Los complejos metal-proteína quirales absorben en diferente magnitud la LCP<sub>izq</sub> y la LCP<sub>der</sub>, por lo que únicamente los complejos metal-proteína quirales tienen una señal de CD diferente de cero.

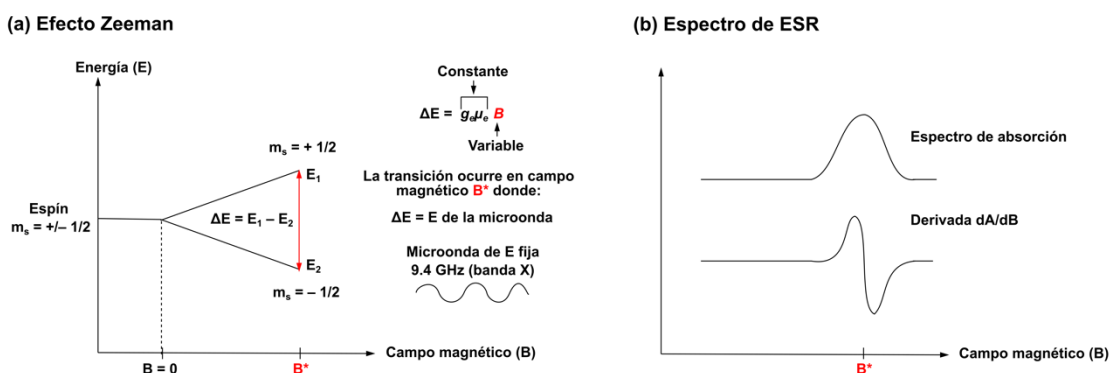


**Figura 1.18** Espectros de absorción electrónica (a y c) y dicroísmo circular electrónico de un complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -péptido (b y d). En la región de alta energía de los espectros de absorción electrónica (a) y CD (b) se observan bandas asociadas a las transiciones LMCT (señaladas con la punta de la flecha) y en la región de baja energía las bandas  $d-d$  (ampliación en el extremo superior izquierdo del espectro). En c y d se muestran lo deconvolución de las bandas de ambos espectros resultado de un ajuste gaussiano. A diferencia del espectro de absorción electrónica (a y c), en el espectro de CD (b y d) se pueden distinguir los máximos de absorción de estas bandas en  $38\,000\text{ cm}^{-1}$  y  $31\,500\text{ cm}^{-1}$ . Esto permite asignar estas señales a las transferencias LMCT de  $N_{\text{im}} \pi 2 \rightarrow \text{Cu}^{2+}$  y  $N^- \rightarrow \text{Cu}^{2+}$  (bandas 4 y 6), respectivamente. Por otra parte, en la región de baja energía, en el espectro de absorción electrónica la banda  $d-d$  tiene un máximo de absorción en  $17\,000\text{ cm}^{-1}$ , mientras que en el espectro de CD esta banda presenta un mínimo en  $20\,500\text{ cm}^{-1}$  y un máximo en  $16\,000\text{ cm}^{-1}$ . Esto permite distinguir claramente dos de las tres transiciones  $d-d$  posibles a pesar de su cercanía en energía. Resultados obtenidos previamente en el laboratorio de la Dra. Liliana Quintanar, ver referencia <sup>225</sup>.

### C. Resonancia de espín electrónico

Otra de las técnicas más utilizadas para caracterizar los complejos de especies paramagnéticas como el  $\text{Cu}^{2+}$  es la espectroscopia de ESR. En esta técnica como su nombre lo indica se observan transiciones de espín electrónico. El espín es una propiedad física de las partículas subatómicas con carga (electrón y núcleo), la cual se deriva del campo magnético (momento magnético) producido por el movimiento de dichas partículas sobre sí mismas (momento angular).<sup>223, 231</sup> Tanto los electrones como los núcleos tienen un valor finito de estados de espín.<sup>223, 231</sup> Para que dos electrones puedan ocupar un mismo orbital atómico/molecular deben tener estados de espín opuestos ( $+\frac{1}{2}$  y  $-\frac{1}{2}$ ), en este caso se dice que los electrones están apareados.<sup>223, 231</sup> En una especie química que tiene sus orbitales atómicos/moleculares llenos (todos sus electrones apareados), los momentos magnéticos de

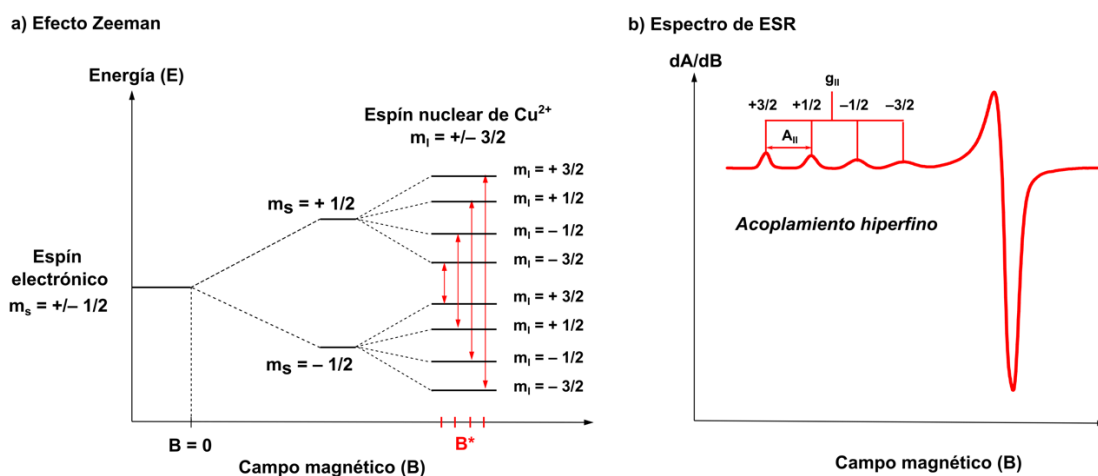
sus electrones se cancelan y por lo tanto el valor de espín es igual a cero. Por el contrario, en las especies químicas con al menos un electrón desapareado el valor de espín es diferente de cero. Estas últimas se conocen como especies paramagnéticas y se caracterizan porque en presencia de un campo magnético externo pueden experimentar transiciones entre estados de espín (Efecto Zeeman).<sup>225, 231</sup> Para las especies paramagnéticas con un solo electrón desapareado el efecto Zeeman da lugar a dos estados de espín:  $+1/2$  (cuando el espín se orienta en la misma dirección del campo magnético externo) y  $-1/2$  (cuando el espín se orienta en dirección opuesta al campo magnético externo), ver Figura 1.22.<sup>225, 231</sup> Como se puede observar en el diagrama de orbitales moleculares (Figura 1.15), los complejos de  $\text{Cu}^{2+}$  son especies paramagnéticas, de tal forma que pueden experimentar transiciones de espín electrónico en presencia de un campo magnético externo.<sup>225, 231</sup>



**Figura 1.19** Efecto Zeeman entre estados de espín de una especie paramagnética sometida a un campo magnético externo (a) y espectro de ESR (b).

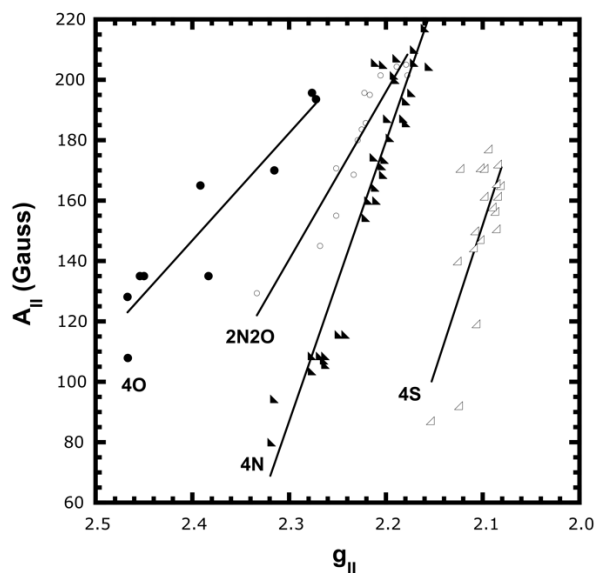
Durante los experimentos de ESR, se utiliza radiación electromagnética para promover la transición del estado de espín electrónico de menor energía  $-1/2$  (estado basal) al estado de espín electrónico de mayor energía  $+1/2$  (estado excitado) (ver Figura 1.19).<sup>225, 231</sup> A diferencia de otras espectroscopias, en la ESR, la muestra se irradia con ondas electromagnéticas de frecuencia y energía constante (9.4 GHz para ESR banda X) y se varía la magnitud del campo magnético externo, con la finalidad de modificar la magnitud del efecto Zeeman, ver Figura 1.19.<sup>225, 231</sup> La transición entre los estados de espín se observa cuando la diferencia de energías entre el estado basal y el excitado es igual a la energía de las ondas electromagnéticas con las que se irradia la muestra (microondas) (ver Figura 1.19).<sup>225, 231</sup> El  $\text{Cu}^{2+}$  además de tener un espín electrónico diferente de  $+1/2$ , tiene un espín nuclear de  $+3/2$ .<sup>225</sup> Por lo que, en

el experimento de ESR, la energía del estado de espín del electrón desapareado del  $\text{Cu}^{2+}$  no solo depende del valor del campo magnético externo, sino también de la interacción del espín electrónico con el espín nuclear. Esta interacción entre el espín electrónico y el espín nuclear del cobre provoca un desdoblamiento energético que da lugar a cuatro sub-estados de espín:  $2I + 1$ , donde  $I$  es el valor del espín nuclear (Figura 1.20).<sup>225, 231</sup> A este fenómeno se le conoce como desdoblamiento hiperfino y se refleja en la región paralela del espectro de ESR; donde cada una de las cuatro señales observadas corresponde a la transición de un sub-estado de espín basal a un sub-estado de espín excitado (ver Figura 1.20).<sup>225, 231</sup>



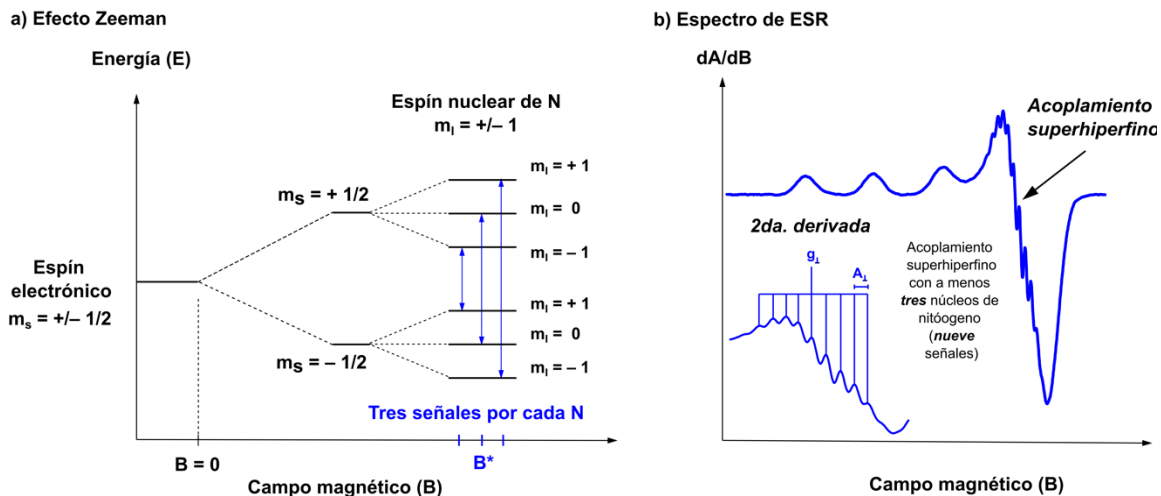
**Figura 1.20 Acoplamiento hiperfino del espín electrónico de  $\text{Cu}^{2+}$  con su espín nuclear.** (a) Efecto Zeeman: este acoplamiento produce ocho sub-estados de espín entre los cuales se pueden observar cuatro transiciones (flechas de color rojo) (b) Espectro de ESR: en la región paralela del espectro de ESR se observan cuatro señales que corresponden a las cuatro transiciones entre los sub-estados de espín.

El valor de campo al cual se observan las cuatro señales del  $\text{Cu}^{2+}$  en la región paralela del espectro de ESR depende del tipo de átomos que forman la esfera de coordinación. Esta región del espectro se puede describir con dos parámetros: los valores  $g$  y  $A$  paralelos ( $g_{\parallel}$  y  $A_{\parallel}$ ), también conocidos como  $g_z$  y  $A_z$  (ver Figura 1.21).<sup>225</sup> La composición de la esfera de coordinación de un complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -proteína se puede estimar a partir de los parámetros  $g_{\parallel}$  y  $A_{\parallel}$  (ver Figura 1.21) por interpolación en un gráfico conocido como correlación de Peisach-Blumberg.<sup>232</sup> Este gráfico incluye los valores parámetros  $g_{\parallel}$  y  $A_{\parallel}$  de varios complejos metal-proteína cuya esfera de coordinación fue elucidada por otras técnicas espectroscópicas. En él se pueden observar tendencias en los valores  $g_{\parallel}$  y  $A_{\parallel}$  dependiendo del tipo de átomos (N, O, o S) que forman el complejo metálico (ver Figura 1.21).



**Figura 1.21** Correlación de Peisach y Blumberg para identificar modos de coordinación de complejos de  $\text{Cu}^{2+}$  a partir de los espectros de ESR. Las líneas de color negro muestran la tendencia de valores  $g_{||}$  y  $A_{||}$  de acuerdo al modo de coordinación de complejos  $\text{Cu}^{2+}$ -proteínas. Gráfica construida a partir de los resultados de la referencia <sup>232</sup>.

Por otra parte, la región perpendicular del espectro de ESR también proporciona información sobre la esfera de coordinación del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -proteína. La forma del espectro en esta región depende de la geometría del complejo y de la presencia de otros espines nucleares diferentes de cero, ya sea en la esfera de coordinación o en su vecindad.<sup>225, 233</sup> En los complejos de  $\text{Cu}^{2+}$ -proteína, la presencia de nitrógenos en la esfera de coordinación provoca un desdoblamiento conocido como acoplamiento superhiperfino.<sup>225, 233</sup> Este se debe a la interacción del espín electrónico del  $\text{Cu}^{2+}$  con el espín nuclear de los átomos de nitrógeno ( $I = 1$ ); de tal forma que, por cada nitrógeno presente en la esfera de coordinación se pueden observar hasta tres transiciones de espín en diferentes valores de campo ( $2I + 1$ ) (ver Figura 1.22).<sup>225, 233</sup> Debido a que el acoplamiento superhiperfino ocurre a mayor distancia que el acoplamiento hiperfino, requiere valores de campo mayores, esto dificulta observar el acoplamiento superhiperfino de nitrógeno en los espectros de ESR banda X. Sin embargo, una estrategia útil para comparar los acoplamientos superhiperfinos de dos complejos  $\text{Cu}^{2+}$ -proteína es calcular la derivada del espectro de ESR y con ello evidenciar las diferencias de la región perpendicular (ver Figura 1.22).<sup>234</sup>



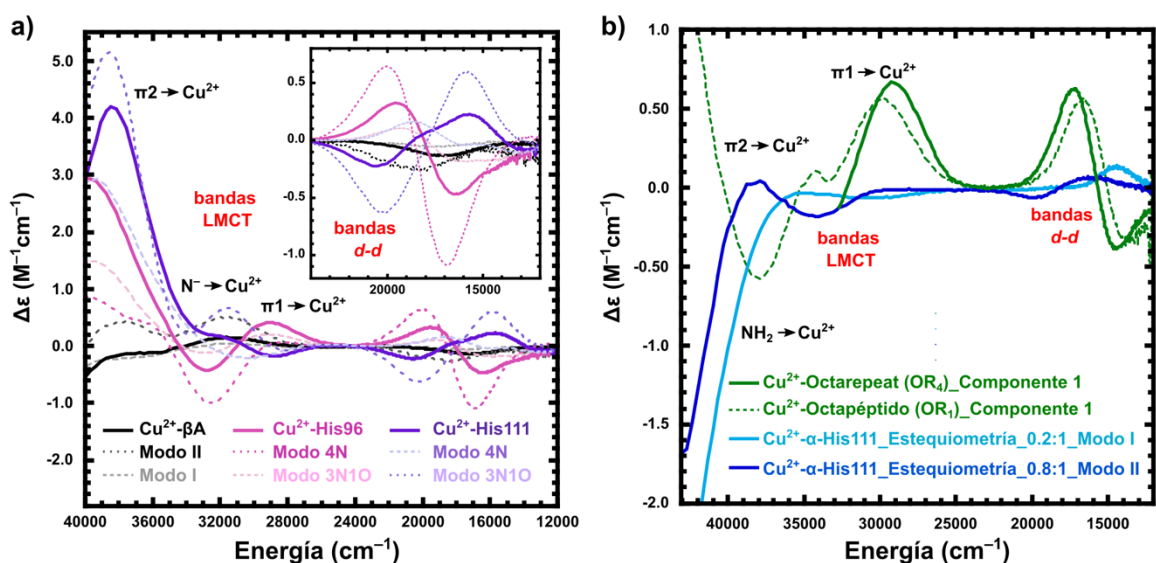
**Figura 1.22 Acoplamiento hiperfino del espín electrónico de  $\text{Cu}^{2+}$  con su espín nuclear.** (a) Efecto Zeeman: este acoplamiento produce ocho sub-estados de espín entre los cuales se pueden observar cuatro transiciones (flechas de color azul) (b) Espectro de ESR: en la región paralela del espectro de ESR se observan cuatro señales que corresponden a las cuatro transiciones entre los sub-estados de espín.

### 1.6. Características espectroscópicas de los complejos $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta$ -amiloide y $\text{Cu}^{2+}$ -PrP

Los complejos  $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A}$  y  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP se han estudiado previamente por varias técnicas espectroscópicas, incluidas CD y ESR. Cabe recordar que la unión de  $\text{Cu}^{2+}$  al  $\beta\text{A}$  y a la PrP da lugar a varios modos de coordinación con diferentes afinidades por el metal y cuya abundancia depende del pH y de la relación estequiométrica  $\text{Cu}^{2+}$ /PrP. Esta dinámica química de coordinación se ve reflejada en la espectroscopia de dichas especies. En esta sección se muestran los espectros de CD (Figura 1.23) y de ESR (Figura 1.24) de cada uno de los modos de coordinación de los complejos previamente identificados para los complejos  $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A}$  y  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP. Además, se muestra un resumen de las transiciones electrónicas observadas por CD (ver Tabla 1.12) y se comparan los valores  $g_{\parallel}$  y  $A_{\parallel}$  de cada modo de coordinación y sus respectivas constantes de disociación (ver Tabla 1.13).

Para los complejos cuya coordinación depende del pH— $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ -His96 y  $\text{Cu}^{2+}$ -His111—se incluyen las características espectroscópicas a pH 7.5, 8.5 y 6.5. Aunque los espectros reportados a un pH de 7.5 reflejan la mezcla de modos de coordinación fisiológicamente relevante (Ver Figura 1.23a y 1.24a, líneas continuas negra, rosa y morada), los espectros obtenidos a valores de pH bajo (~6.5) y alto (~8.5) permiten aislar las transiciones electrónicas y los parámetros de ESR de cada uno de los modos de coordinación

que se encuentran en mezcla a pH fisiológico (Ver Figura 1.23a y 1.24a, líneas punteadas): Modo I (línea punteada gris) y Modo II (línea punteada negra) para el complejo  $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A}$ , los modos 3N1O (línea punteada rosa claro) y 4N (línea punteada rosa oscuro) del sitio de His96, y los modos 3N1O (línea punteada morado claro) y 4N (línea punteada morado oscuro) del sitio de His111.<sup>235-237</sup> Dado que las señales de CD y ESR son aditivas, los espectros observados a  $\text{pH} = 7.5$  se pueden reproducir a partir de la suma de los espectros de los modos de coordinación que se encuentran en mezcla. Para los complejos  $\text{Cu}^{2+}$ -His96 y  $\text{Cu}^{2+}$ -His111 es importante destacar que, a pesar de la similitud de sus esferas de coordinación, sus espectros de CD y ESR permiten diferenciar entre estas especies.<sup>225, 235, 236</sup> Esto pone en evidencia la sensibilidad de estas técnicas para caracterizar los complejos metal-proteína.

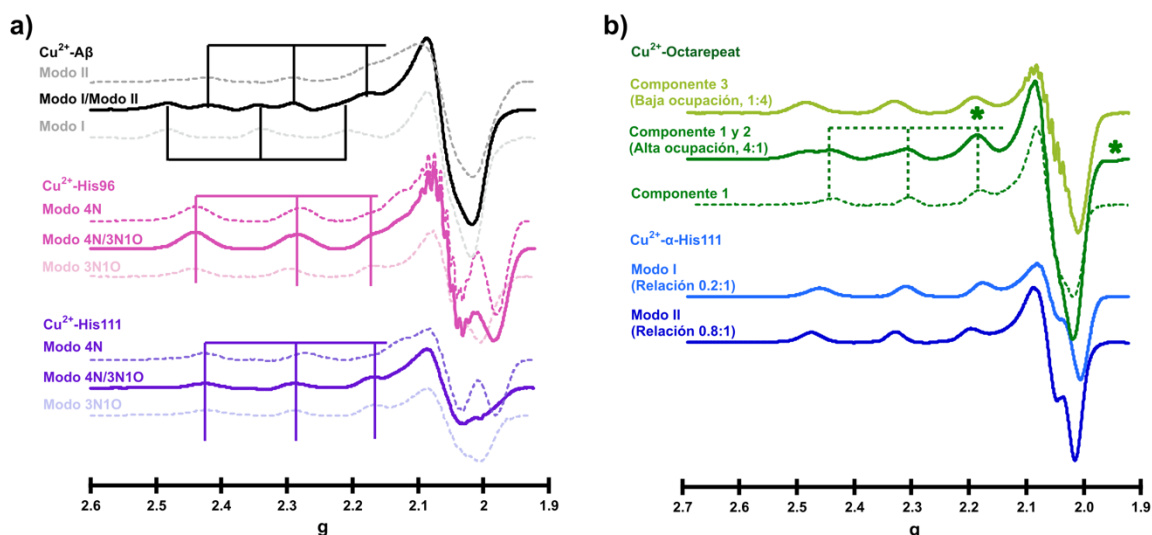


**Figura 1.23** Espectros de CD de los complejos  $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A}$  y  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP. En (a) se muestran los espectros de los sitios cuyos modos de coordinación depende del pH:  $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A}$  (color negro/gris),  $\text{Cu}^{2+}$ -His96 (rosa) y  $\text{Cu}^{2+}$ -His111 (morado). En (b) se presentan los espectros de los sitios que forman diferentes modos de coordinación dependiendo de la relación estequiométrica  $\text{Cu}^{2+}$ /PrP:  $\text{Cu}^{2+}$ -OR<sub>4</sub> (verde oscuro),  $\text{Cu}^{2+}$ -OR<sub>4</sub> (verde oscuro línea punteada) y  $\text{Cu}^{2+}$ - $\alpha$ -His111 (Azul claro y oscuro). Resultados del laboratorio de la Dra. Liliana Quintanar publicados en las referencias<sup>144, 235-237</sup>.

**Tabla 1.12 Transiciones electrónicas observadas en los espectros de CD de los complejo Cu<sup>2+</sup>-βA y Cu<sup>2+</sup>-PrP.**

Complejo/ Condiciones experimentales	-NH <sub>2</sub>	π2 a Cu <sup>2+</sup>	N <sup>-</sup> a Cu <sup>2+</sup>	π1 a Cu <sup>2+</sup>	<i>d-d</i>	<i>d-d</i>	Ref.
<b>Cu<sup>2+</sup>-βA(1-16)</b>							
pH 7.5 <b>Modo I/Modo II</b>	40 000 cm <sup>-1</sup> 245 nm	--- ---	~31 900 cm <sup>-1</sup> 310-313 nm	--- ---	--- ---	~17 000 580-590 nm	237-239
pH 8.5 <b>Modo II</b>	---	~38 000 cm <sup>-1</sup> 260-280 nm	~31 900 cm <sup>-1</sup> 310-313 nm	---	20,000 cm <sup>-1</sup> 500-510 nm	~15 000 cm <sup>-1</sup> 650-670 nm	237-239
pH 6.5 <b>Modo I</b>	~40 000 cm <sup>-1</sup> 245 nm	---	---	---	---	~17 000 580-590 nm	237-239
<b>Cu<sup>2+</sup>-His96</b>							
pH 7.5 <b>3N1O/4N</b>	---	39 700 cm <sup>-1</sup> 252 nm	32 500 cm <sup>-1</sup> 308 nm	29 000 cm <sup>-1</sup> 345 nm	19 500 cm <sup>-1</sup> 512 nm	16 500 cm <sup>-1</sup> 606 nm	236
pH 8.5 <b>4N</b>	---	40 600 cm <sup>-1</sup> 246 nm 36 200 cm <sup>-1</sup> 276 nm	32 500 cm <sup>-1</sup> 308 nm	29 000 cm <sup>-1</sup> 345 nm	---	17 700 cm <sup>-1</sup> 565 nm	236
pH 6.5 <b>3N1O</b>	---	39 700 cm <sup>-1</sup> 252 nm	32 500 cm <sup>-1</sup> 308 nm	29 000 cm <sup>-1</sup> 345 nm	---	17 700 cm <sup>-1</sup> 565 nm	236
<b>Cu<sup>2+</sup>-His111</b>							
pH 7.5 <b>3N1O/4N</b>	---	38 500 cm <sup>-1</sup> 260 nm	31 500 cm <sup>-1</sup> 318 nm	29 000 cm <sup>-1</sup> 345 nm	18 000 cm <sup>-1</sup> 556 nm 20 500 cm <sup>-1</sup> 488 nm	12 900 cm <sup>-1</sup> 775 nm 15 800 cm <sup>-1</sup> 632 nm	235
pH 8.5 <b>4N</b>	---	38 500 cm <sup>-1</sup> 260 nm	31 600 cm <sup>-1</sup> 316 nm	---	20 200 cm <sup>-1</sup> 495 nm	15 800 cm <sup>-1</sup> 633 nm	235
pH 6.5 <b>3N1O</b>	---	39 000 cm <sup>-1</sup> 256 nm	---	30 400 cm <sup>-1</sup> 329 nm	18 500 cm <sup>-1</sup> 540 nm	13 000 cm <sup>-1</sup> 769 nm	235
<b>Cu<sup>2+</sup>-octarepeat</b>							
<b>Componente 1</b> (alta ocupación) 4:1	---	---	---	30 303 cm <sup>-1</sup> 330 nm	17 241 cm <sup>-1</sup> 580 nm	14 706 cm <sup>-1</sup> 680 nm	240
<b>Componente 2</b> (alta ocupación) 4:1	Complejo no quiral, la señal de CD = 0						137, 139
<b>Componente 3</b> (baja ocupación) 1:4	Complejo no quiral, la señal de CD = 0						137, 139
<b>Cu<sup>2+</sup>-α-H111</b>							
<b>Modo I</b> 0.2:1	43 000 cm <sup>-1</sup> 233 nm	---	---	30 600 cm <sup>-1</sup> 327 nm	---	14 400 cm <sup>-1</sup> 695 nm	144
<b>Modo II</b> 0.8:1	43 000 cm <sup>-1</sup> 233 nm	---	---	34 100 cm <sup>-1</sup> 293 nm	19 500 cm <sup>-1</sup> 512 nm	16 200 cm <sup>-1</sup> 617 nm	144





**Figura 1.24** Espectros de ESR de los complejos  $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A}$  y  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP. En (a) se muestran los espectros de los sitios cuyos modos de coordinación depende del pH:  $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A}$  (color negro/gris),  $\text{Cu}^{2+}$ -His96 (rosa) y  $\text{Cu}^{2+}$ -His111 (morado). En (b) se presentan los espectros de los sitios que forman diferentes modos de coordinación dependiendo de la relación estequiométrica  $\text{Cu}^{2+}$ /PrP:  $\text{Cu}^{2+}$ -OR<sub>4</sub> (verde oscuro y verde claro),  $\text{Cu}^{2+}$ -OR<sub>1</sub> (verde oscuro, línea punteada) y  $\text{Cu}^{2+}$ - $\alpha$ -His111 (Azul claro y oscuro). Imágenes modificadas con permiso de la Dra. Liliana Quintanar, a partir de los resultados publicados en las referencias <sup>144, 235-237</sup>.

**Tabla 1.13** Espectro de ESR del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A}$

Complejo	Condiciones experimentales	Modo de coordinación	$g_{\parallel}$	$A_{\parallel}$ ( $1 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ )	$K_d$	Ref.
$\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A}$ (1-16)	pH 7.5	Modo I/II	2.27/2.23	180/157	0.1–10 nM	96, 237
	pH 8.5	Modo II	2.23	157	---	237
	pH 6.5	Modo I	2.27	180	---	237
$\text{Cu}^{2+}$ -His96	pH 7.5	3NO/4N	2.21	196	---	236
	pH 8.5	4N	2.21	206	0.7 $\mu\text{M}$	236
	pH 6.5	3N1O	2.23	180	---	236
$\text{Cu}^{2+}$ -His111	pH 7.5	3NO/4N	2.22	180	---	235
	pH 8.5	4N	2.20	191	0.5 $\mu\text{M}$	235
	pH 6.5	3NO	2.23	167	---	235
$\text{Cu}^{2+}$ -octarepeat	4:1 (alta ocupación)	Componente 1	2.24	164	7 $\mu\text{M}$	133, 137
		Componente 2	2.27	177	12 $\mu\text{M}$	
	1:4 (baja ocupación)	Componente 3	2.25	192	10 nM	133, 137
$\text{Cu}^{2+}$ - $\alpha$ -H111	0.2:1	Modo I	2.24	181	---	144
	0.8:1	Modo II	2.26	178	---	144

Asimismo, en las Figuras 1.26b/1.27b se muestran los espectros de CD y ESR característicos de los sitios cuya coordinación depende de la relación estequiométrica  $\text{Cu}^{2+}$ /PrP—la región *octarepeat* y el sitio de la  $\alpha$ -His111.<sup>133, 137, 144</sup> Particularmente, para la región *octarepeat* se

incluyen los espectros reportados de los modelos peptídicos: OR<sub>4</sub> y el OR<sub>1</sub>, cuya principal diferencia es el número de repeticiones del octapéptido PHGGGWGQ que incluyen en su secuencia. La unión de Cu<sup>2+</sup> al OR<sub>4</sub> (PHGGGWGQ PHGGGWGQ PHGGGWGQ PHGGGWGQ) da lugar a la formación de los modos de alta ocupación (componentes 1 y 2) y el modo de baja ocupación (componente 3) en función de la relación estequiométrica Cu<sup>2+</sup>/PrP, lo cual es característico de la unión de Cu<sup>2+</sup> a la PrP<sup>C</sup>.<sup>137, 139</sup> Por el contrario, el modelo OR<sub>1</sub> (PHGGGWGQ) únicamente puede formar el componente 1.<sup>137</sup> Aunque este modelo no reproduce la coordinación de Cu<sup>2+</sup> dependiente de la estequiometría, permite aislar las características espectroscópicas del componente 1.<sup>137</sup> Como se puede observar en la Tabla 1.12 dos de los tres modos de coordinación formados en la región *octarepeat* son inactivos por CD (el componente 2 y 3).<sup>133</sup> De tal forma que, el espectro del complejo Cu<sup>2+</sup>-OR<sub>1</sub> es muy similar al del complejo Cu<sup>2+</sup>-OR<sub>4</sub> a una relación estequiométrica 4:1 (Ver Figura 1.23b, espectros color verde oscuro). Sin embargo, en los espectros de ESR del complejo Cu<sup>2+</sup>-OR<sub>4</sub> se pueden distinguir los modos de alta ocupación (componentes 1 y 2) a una relación estequiométrica 4:1 (espectro color verde oscuro) y el modo de baja ocupación (componente 3) a una relación estequiométrica 1:4 (espectro color verde oliva). El espectro de ESR del componente 3 se caracteriza por el evidente acoplamiento superhiperfino de N observado en la región perpendicular del espectro de ESR; mientras que, el espectro de los modos de alta ocupación (componente 1 y 2) se caracteriza por la presencia del acoplamiento dipolar asignado entre los átomos de Cu<sup>2+</sup> de dos complejos tipo componente 1 (Ver asteriscos en la Figura 1.24b).<sup>137</sup>

Finalmente, para el sitio de la  $\alpha$ -His111 se muestran los espectros del Modo I (formado a una relación 0.2:1.0) y del Modo II (formado a una relación 0.8:1.0). En estos espectros se observa que los Modos I y II tienen valores de  $g_{\parallel}$  y  $A_{\parallel}$  similares, pero sus señales de CD son completamente diferentes.<sup>144</sup> En general, toda la información presentada en esta sección pone en evidencia que el uso combinado de las técnicas de CD y ESR permite distinguir entre los diferentes modos de coordinación de los complejos Cu<sup>2+</sup>- $\beta$ A y Cu<sup>2+</sup>-PrP. Por lo que, dichas técnicas espectroscópicas podrían ser de gran utilidad para evaluar el efecto del péptido  $\beta$ A en la unión de Cu<sup>2+</sup> a la PrP.

### 1.7. Formación de complejos ternarios PrP-Cu<sup>2+</sup>-βA.

Además de la detallada caracterización de la química de coordinación de los complejos Cu<sup>2+</sup>-βA y Cu<sup>2+</sup>-PrP realizada en las últimas décadas, en un estudio reciente se identificó la formación de un *complejo ternario* OR<sub>1</sub>-Cu<sup>2+</sup>-βA(1-16) utilizando las técnicas de absorción electrónica (UV-visible), CD y espectrometría de masas.<sup>241</sup> Las características del espectro de CD de la especie ternaria formada a pH cercano al fisiológico se resumen en la Tabla 1.14.<sup>241</sup> Esta especie ternaria se formó al agregar Cu<sup>2+</sup> a una solución con el octapéptido OR<sub>1</sub> y el péptido βA(1-16) mezclados a una relación estequiométrica 1:1.<sup>241</sup> En estas condiciones prácticamente todo el péptido βA(1-16) se encuentra unido al *complejo ternario* OR<sub>1</sub>-Cu<sup>2+</sup>-βA(1-16).<sup>241</sup> Es importante recordar que el octapéptido OR<sub>1</sub> únicamente puede formar al componente 1, por lo que la formación de los componentes 2 y 3 podría afectar la formación del *complejo ternario* OR<sub>1</sub>-Cu<sup>2+</sup>-βA(1-16).

**Tabla 1.14 Transiciones electrónicas de los complejos Cu<sup>2+</sup>-βA(1-16), Cu<sup>2+</sup>-OR<sub>1</sub> y el complejo ternario OR<sub>1</sub>-Cu<sup>2+</sup>-βA(1-16)**

Complejo/ Condiciones experimentales	-NH <sub>2</sub>	π2 a Cu <sup>2+</sup>	N <sup>-</sup> a Cu <sup>2+</sup>	π1 a Cu <sup>2+</sup>	d-d	d-d	Ref.
<b>Cu<sup>2+</sup>-βA(1-16)</b>							
pH 7.5 Modo I/Modo II	40 000 cm <sup>-1</sup> 245 nm	---	~31 900 cm <sup>-1</sup> 310-313 nm	---	---	~17 000 580-590 nm	237-239
<b>Cu<sup>2+</sup>-OR<sub>1</sub></b>							
<b>Componente 1</b> (alta ocupación) 4:1	---	---	---	30 303 cm <sup>-1</sup> 330 nm	17 241 cm <sup>-1</sup> 580 nm	14 706 cm <sup>-1</sup> 680 nm	240
<b>Complejo ternario OR<sub>1</sub>-Cu<sup>2+</sup>-βA(1-16)</b>							
OR <sub>1</sub> -Cu <sup>2+</sup> -βA(1-16)	43 000 cm <sup>-1</sup> 233 nm	---	---	34 100 cm <sup>-1</sup> 293 nm	19 500 cm <sup>-1</sup> 512 nm	16 200 cm <sup>-1</sup> 617 nm	144

El componente 1 es uno de los modos de coordinación con menor afinidad por cobre de la PrPC (7 μM).<sup>133</sup> Por lo cual, la formación de especies ternarias PrP-Cu<sup>2+</sup>-βA sugiere que la interacción del péptido PrP y βA podría ir más allá de una simple competencia por el metal. Además, la interacción del péptido βA mediada por el Cu<sup>2+</sup> con una proteína de membrana como la PrP<sup>C</sup>, podría tener varias implicaciones fisiológicas similares a las observadas para la interacción de los oβA con la PrP<sup>C</sup>.<sup>159, 162-173</sup>

## 1.8. Reactividad de los complejos $\text{Cu}^{2+}$ -PrP con óxido nítrico

El óxido nítrico ( $\text{NO}^\bullet$ ) es una molécula de señalización importante para varios procesos fisiológicos como: la neurotransmisión, la respuesta inmune y el control del flujo sanguíneo.<sup>242</sup> Dadas sus propiedades químicas, el  $\text{NO}^\bullet$  puede participar como ligante en la esfera de coordinación de los centros metálicos de algunas proteínas e incluso reaccionar con metal.<sup>212, 242</sup> Tal es el caso de la unión de  $\text{NO}^\bullet$  al hierro presente en los grupos hemo de la hemoglobina y la guanilil ciclasa.<sup>243-245</sup> La PrP<sup>C</sup> también se ha propuesto como una de las metaloproteínas capaces de interactuar con el  $\text{NO}^\bullet$  debido a su papel en la S-nitrosilación de las cadenas de heparan sulfato (glicicano-1), el receptor relacionado con lipoproteínas de baja densidad (LPR1) y los receptores NMDA.<sup>18, 246, 247</sup> Hasta el momento únicamente un par de estudios espectroscópicos han estudiado la reactividad de los complejos  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP con el  $\text{NO}^\bullet$ .<sup>248, 249</sup> En estos trabajos se utilizaron dos modelos peptídicos que reproducen los modos de alta ocupación de la región *octarepeat*: el OR<sub>1</sub> (PHGGGWGQ) que forma únicamente al componente 1, y el OR<sub>2</sub> (PHGGGWGQ PHGGGWGQ) capaz de formar los componentes 1 y 2. Como fuente de  $\text{NO}^\bullet$  se emplearon los compuestos NOC-12 (donador lento de  $\text{NO}^\bullet$ ,  $t_{1/2} = 5.45$  h) y NOC-9 (donador rápido de  $\text{NO}^\bullet$ ,  $t_{1/2} = 3$  min).<sup>248, 249</sup> Tanto el NOC-12 como el NOC-9 contienen un grupo ONNO, el cual se libera en solución dando lugar a dos moléculas de  $\text{NO}^\bullet$ . Aunque ambos experimentos demuestran que los complejos  $\text{Cu}^{2+}$ -OR<sub>1</sub> se pueden reducir en presencia de  $\text{NO}^\bullet$ , aún con el donador rápido (NOC-9,  $t_{1/2} = 3$  min) la reacción de reducción ocurre en 1 h, tiempo bastante largo para una reacción que el contexto celular debe ocurrir en fracciones de segundo.

Por otra parte, con el complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -OR<sub>2</sub>, la adición de NOC-12 provoca cambios en forma y máximos de absorción de las bandas *d-d*, pero no hay una disminución importante en la intensidad de dichas bandas. Esto sugiere que el  $\text{NO}^\bullet$  podría coordinarse al complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -OR<sub>2</sub> sin promover la reducción de  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$ .<sup>249</sup> En conjunto, los antecedentes descritos en esta sección indican que la reactividad de los complejos  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP con  $\text{NO}^\bullet$  depende del modo de coordinación. Por lo que, es de gran importancia evaluar la reactividad de  $\text{NO}^\bullet$  con los otros sitios de unión presentes en la PrP<sup>C</sup>, con la finalidad de identificar cuáles de estos sitios podrían catalizar las reacciones de S-nitrosilación que involucran a esta metaloproteína.

## CAPÍTULO II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

### 2.1. Justificación

La enfermedad de Alzheimer (EA) podría ser uno de los problemas de salud pública más subestimados en este siglo. De acuerdo con la OMS, actualmente hay más de 55 millones de personas con demencia en el mundo, de las cuales entre el 60 y 70% padecen EA.<sup>250</sup> En 2019, la EA y otras demencias se reportaron como la séptima causa de muerte a nivel mundial, por encima de la Diabetes tipo II (novena causa de muerte) y las enfermedades renales (décima causa de muerte).<sup>251</sup> De acuerdo con un estudio realizado en 2008, en México se estima que la prevalencia de la demencia es de 7.3–7.4% en población mayor de 65 años.<sup>252</sup> Con base en estas estadísticas, se calcula que existen más de un millón de mexicanos con demencia, cifra que podría aumentar drásticamente en los próximos años debido al envejecimiento esperado de la población mexicana y a la alta incidencia de factores de riesgo asociados a esta enfermedad.<sup>253</sup>

Actualmente solo existen seis terapias aprobadas por la FDA para el tratamiento de la EA: cuatro inhibidores de acetilcolinesterasa, un antagonista de los receptores NMDA y un anticuerpo monoclonal (Aducanumab) que reconoce formas insolubles de  $\beta$ A.<sup>201</sup> De estas terapias, solo el Aducanumab promete modificar el curso de la enfermedad al disminuir la acumulación del péptido  $\beta$ A;<sup>254</sup> sin embargo, su efectividad no ha sido demostrada y su aprobación aún está en controversia.<sup>255, 256</sup> Por lo que, es de gran importancia profundizar en el estudio de los mecanismos fisiológicos y patológicos que involucran al péptido  $\beta$ A, a fin de proponer y validar nuevos blancos terapéuticos.

Uno de los aspectos menos explorados en el estudio de la EA es papel de los metales de transición, esto a pesar de que las proteínas clave para el desarrollo de la EA— $\beta$ A, la APP, la BACE1 y la PrP<sup>C</sup>—se han identificado como metaloproteínas, con un importante papel en la plasticidad neuronal y en la homeostasis de iones metálicos.<sup>89-97, 114-119</sup> En la última década se ha acumulado evidencia que señala a la PrP<sup>C</sup> como un mediador de la toxicidad  $\beta$ A y como un blanco terapéutico prometedor para la EA.<sup>159, 162-173</sup> Desafortunadamente en la caracterización de los mecanismos patológicos que involucran a la PrP<sup>C</sup> prácticamente se ha

ignorado su compleja y dinámica química de coordinación a cobre y su interacción con diversas proteínas involucradas en la comunicación sináptica y el funcionamiento neuronal.<sup>97</sup> Esto podría deberse, al menos en parte, a la complejidad de integrar el vasto conocimiento sobre la química y la biología detrás de la EA y a las limitaciones experimentales para trasladar el conocimiento de la química de coordinación del péptido  $\beta$ A y la PrP<sup>C</sup> a modelos celulares y animales.

Después del análisis minucioso de la evidencia que vincula al péptido  $\beta$ A y la PrP<sup>C</sup> con mecanismos patológicos asociados con la EA (sección 1.3.2C, Capítulo I: antecedentes), solamente se identificaron dos mecanismos que involucran al  $\beta$ A y la PrP<sup>C</sup> y donde se ha explorado el papel de  $\text{Cu}^{2+}$  utilizando modelos celulares y animales.<sup>18, 48, 257</sup> Estos mecanismos son: la S-nitrosilación de los receptores NMDA y la formación del complejo PrP<sup>C</sup>-NMDAR.<sup>18,48,257</sup> A pesar de que en estos estudios se demostró la importancia del metal en la función de los receptores NMDA, el papel de la pleomórfica química de coordinación del péptido  $\beta$ A y la PrP<sup>C</sup> no ha sido evaluado, dejando varias interrogantes sobre la química detrás de dichos mecanismos.<sup>18,48,97,257</sup> En este proyecto se abordan dos de estos paradigmas: el efecto del péptido  $\beta$ A sobre la unión de  $\text{Cu}^{2+}$  a los diferentes sitios presentes en la PrP; y la reactividad de los complejos de  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP con óxido nítrico. Lo anterior, con la finalidad de identificar los sitios de unión a  $\text{Cu}^{2+}$  de la PrP con potencial para participar en la interacción de la PrP<sup>C</sup> con el receptor NMDA y catalizar la S-nitrosilación de los receptores NMDA. Los datos recabados en este estudio ayudarán a sentar las bases para elucidar la química de coordinación detrás de estos mecanismos patológicos vinculados con la EA y diseñar nuevas terapias farmacológicas enfocadas en modificar el curso de la enfermedad.

## **2.2. Hipótesis**

Considerando que la unión de  $\text{Cu}^{2+}$  a la PrP involucra al menos siete sitios de unión a metal y nueve modos de coordinación con afinidades y reactividades diferentes, se espera que el efecto del péptido  $\beta\text{A}$  sobre la unión de  $\text{Cu}^{2+}$  a la PrP y la reactividad de los complejos  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP con óxido nítrico sean sitio-específicos.

## 2.3. Objetivos

### *Objetivos generales*

- Evaluar el efecto del péptido  $\beta A$  en la coordinación de  $Cu^{2+}$  a la PrP y al sitio  $\alpha$ -H111 del fragmento PrPC1.
- Evaluar la reactividad de óxido nítrico con los complejos  $Cu^{2+}$ -PrP formados en los sitios de la región del *non-octarepeat* de la PrP y en el sitio  $\alpha$ -H111 del fragmento PrPC1.

### *Objetivos particulares*

- Sintetizar, purificar, liofilizar y caracterizar los péptidos:  $\beta A(1-16)$ , PrP(60-91), PrP(92-99), PrP(106-115) y PrP(111-116).
- Evaluar la capacidad del péptido  $\beta A(1-16)$  para remover al ion  $Cu^{2+}$  de los complejos  $Cu^{2+}$ -PrP(60-91),  $Cu^{2+}$ -PrP(92-99),  $Cu^{2+}$ -PrP(106-115) y  $Cu^{2+}$ -PrP(111-116) utilizando dicroísmo circular electrónico y resonancia de espín electrónico.
- Evaluar la reactividad de los complejos  $Cu^{2+}$ -PrP(92-99),  $Cu^{2+}$ -PrP(106-115) y  $Cu^{2+}$ -PrP(111-116) con óxido nítrico utilizando espectroscopia de absorción electrónica en la región UV-vis.



## CAPÍTULO III. RESULTADOS Y ANÁLISIS

Los resultados de este trabajo se organizaron en cuatro secciones: las primeras dos corresponden a la evaluación del efecto del péptido  $\beta A(1-16)$  en la coordinación de  $Cu^{2+}$  a la proteína prion (**sección 3.1**) y al sitio de la  $\alpha$ -His111 generado tras el procesamiento de la proteína prion por la  $\alpha$ -secretasa (**sección 3.2**); mientras que las secciones tercera y cuarta incluyen los resultados de la evaluación de la reactividad de óxido nítrico con los complejos  $Cu^{2+}$ -PrP formados en la región del *non-octarepeat* de la proteína prion (**sección 3.3**) y en el sitio de la  $\alpha$ -His111 generado tras el procesamiento de la proteína prion por la  $\alpha$ -secretasa (**sección 3.4**).

### 3.1. Efecto del $\beta A$ en la coordinación de $Cu^{2+}$ a la proteína prion

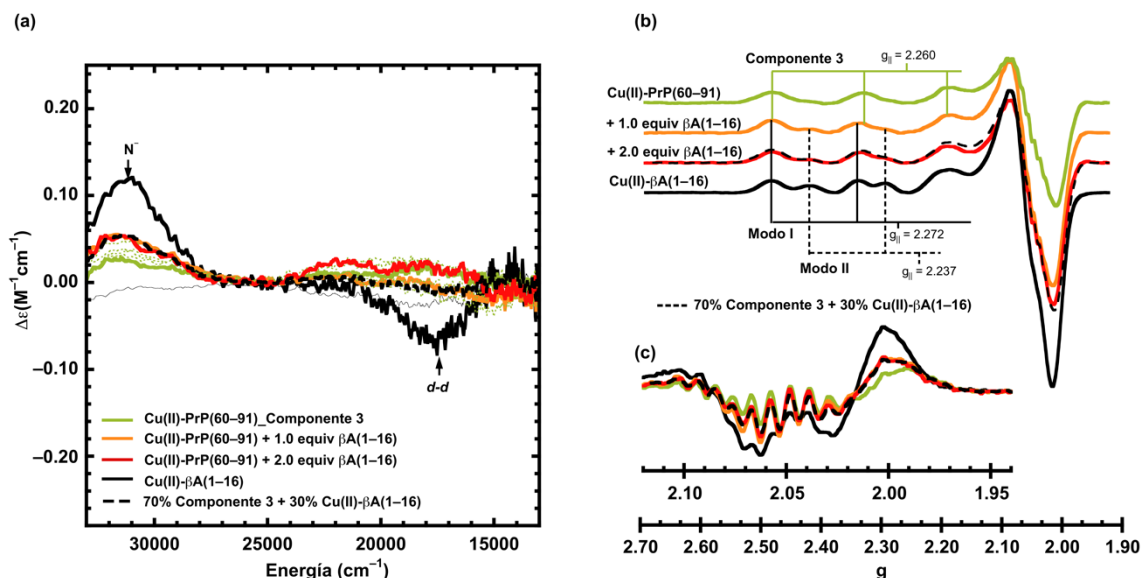
#### 3.1.1. Región del *octarepeat* (OR)

Para evaluar el impacto del  $\beta A$  en la unión de  $Cu^{2+}$  a la región del OR se realizaron ensayos de competencia, en los cuales se enfrentó al complejo  $Cu^{2+}$ -PrP(60–91) con el péptido  $\beta A(1-16)$ . Dado que la coordinación de  $Cu^{2+}$  a la región del OR depende de la relación estequiométrica  $Cu^{2+}/PrP$ , el efecto del péptido  $\beta A(1-16)$  se estudió en dos condiciones diferentes: **A**) A una relación 1:4 de  $Cu^{2+}/PrP$  para favorecer la formación del modo de baja ocupación o componente 3, y **B**) A una relación estequiométrica 2:1 de  $Cu^{2+}/PrP$  para favorecer la formación de los modos de alta ocupación, también conocidos como componentes 1 y 2.

#### **A. Competencia por $Cu^{2+}$ entre el péptido $\beta A(1-16)$ y el modo de baja ocupación**

El modo de baja ocupación o componente 3 se formó a partir de una solución de PrP(60–91) a una concentración de 0.85 mM, a la cual se agregaron 0.17 mM de  $CuSO_4$  para alcanzar una relación estequiométrica 1:4 de  $Cu^{2+}/PrP$ . Los espectros de CD y ESR del componente 3 se muestran de color verde oliva en la Figura 3.1. En el espectro de CD la señal del componente 3 es prácticamente cero (Figura 3.1a, color verde oliva), mientras que en el espectro de ESR (Figura 3.1b, color verde oliva) se observa un juego de señales con valores  $g_{\parallel} = 2.260$  y  $A_{\parallel} = 190 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$  (Tabla 3.1). Una característica distintiva del espectro ESR del componente 3 (Figura 3.1b) y su derivada (Figura 3.1c) son las nueve señales que se

aprecian en la región perpendicular, las cuales están asociadas al acoplamiento superhiperfino del espín electrónico del  $\text{Cu}^{2+}$  con el espín nuclear de los átomos de nitrógeno presentes en la esfera de coordinación. Estos espectros de CD y ESR son consistentes con los previamente reportados para el componente 3 (ver Capítulo I: Antecedentes, sección 1.6).<sup>137</sup>



**Figura 3.1.** Los espectros del componente 3 y el complejo  $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A}(1-16)$  se muestran en color verde oliva y negro. En (a) las líneas punteadas de color verde oliva corresponden a la titulación del componente 3 con alícuotas de 0.2 en 0.2 equiv hasta 0.8 equiv de  $\beta\text{A}(1-16)$ . Los espectros de color naranja y rojo corresponden a la titulación del componente 3 con 1.0 y 2.0 equivalentes de  $\beta\text{A}(1-16)$ . La línea punteada negra es el resultado de sumar los espectros del componente 3 y del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A}(1-16)$  en una proporción 70:30. En (c) se muestra la derivada de la región perpendicular del espectro de ESR.

**Tabla 3.1.** Parámetros de ESR de las diferentes muestras analizadas en la titulación del componente 3 con  $\beta\text{A}(1-16)$ .

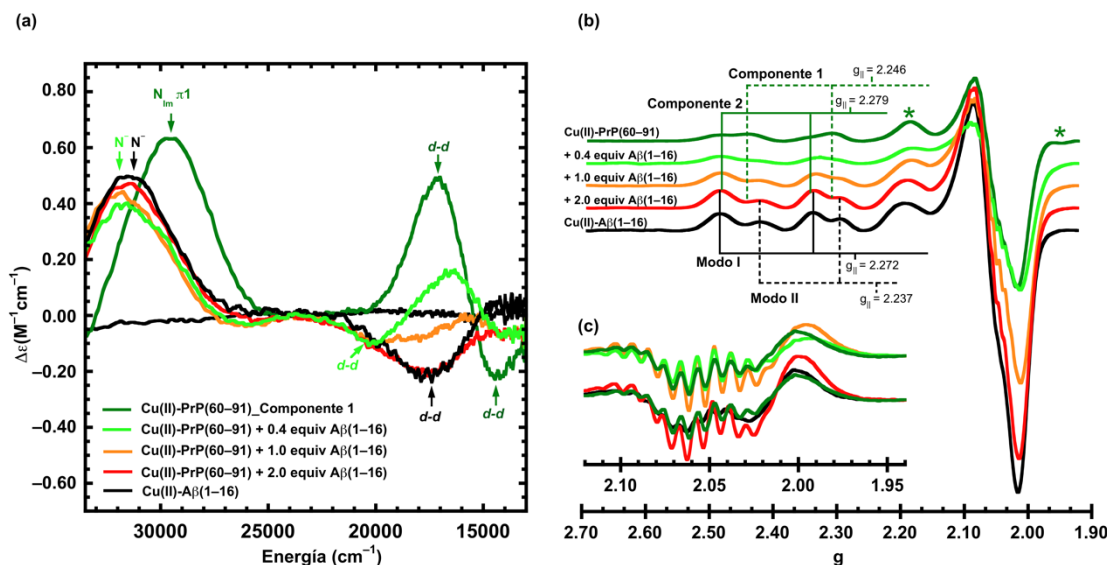
Nombre de la muestra	Especie identificada	$g_{  }$	$A_{  }$ ( $1 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ )
$\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A}(1-16)$	Modo I	2.272	179
	Modo II	2.237	157
$\text{Cu}^{2+}$ -PrP(60-91) modo de baja ocupación	Componente 3	2.260	190
+ 2.0 equivalentes $\beta\text{A}(1-16)$	Componente 3	2.260	190
	$\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A}(1-16)$ Modo II	2.240	157

Después de su caracterización, el componente 3 fue titulado con alícuotas de 0.2 equivalentes de  $\beta\text{A}(1-16)$ . Como se puede observar en la Figura 3.1, la espectros de CD y ESR presentan cambios sutiles tras la adición de 1.0 y 2.0 equivalentes de  $\beta\text{A}(1-16)$ . En el espectro de CD se observa una señal de baja intensidad a  $31\,400 \text{ cm}^{-1}$ , la cual corresponde a la banda de

LMCT de amida desprotonada a  $\text{Cu}^{2+}$  observada en el complejo  $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A}(1-16)$ . De igual forma, en el espectro de ESR predominan las características del componente 3 y se observa un segundo juego de señales con valores  $g_{\parallel} = 2.240$  y  $A_{\parallel} = 157 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$  que revela la formación de una pequeña cantidad del Modo II de complejo  $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A}(1-16)$ . La contribución del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A}(1-16)$  en los espectros de CD y ESR correspondientes a 2.0 equivalentes de  $\beta\text{A}(1-16)$  se estimó a partir de la suma de los espectros de componente 3 y  $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A}(1-16)$ . El mejor ajuste se obtuvo al sumar el 30% del espectro de  $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A}(1-16)$  y el 70% del espectro del componente 3 (Figura 3.1, línea punteada negra). Estos resultados nos permiten concluir que el péptido  $\beta\text{A}(1-16)$  remueve  $\sim 30\%$  del  $\text{Cu}^{2+}$  unido al componente 3, aún cuando la concentración de  $\beta\text{A}(1-16)$  es el doble de la PrP(60-91).

### **B. Competencia por $\text{Cu}^{2+}$ entre los modos de alta ocupación de la PrP y el péptido $\beta\text{A}(1-16)$**

Los modos de alta ocupación (componentes 1 y 2) se formaron a partir de una solución de PrP(60-91) a una concentración de 0.3 mM, a la cual se agregaron 0.6 mM de  $\text{CuSO}_4$  para alcanzar una relación estequiométrica 2:1 de  $\text{Cu}^{2+}$ /PrP. Los espectros de CD y ESR correspondientes a esta muestra se presentan de color verde oscuro en la Figura 3.2. En el espectro de CD (Figura 3.2a), se observan las señales características del componente 1: una banda de LMCT del nitrógeno  $\pi 1$  del imidazol a  $\text{Cu}^{2+}$  en  $29\,380 \text{ cm}^{-1}$  ( $\Delta\epsilon = +0.63 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) y dos bandas  $d-d$ , una positiva de gran intensidad en  $17\,330 \text{ cm}^{-1}$  ( $\Delta\epsilon = +0.49 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) y otra negativa de baja intensidad en  $14\,500 \text{ cm}^{-1}$  ( $\Delta\epsilon = -0.23 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) (ver Capítulo I: Antecedentes, sección 1.6).<sup>139, 240</sup> Aunque el componente 2 también se forma en estas condiciones, previamente se demostró que dicho complejo es inactivo por CD.<sup>133</sup> Sin embargo, la formación del componente 2 queda de manifiesto en el espectro de ESR, donde se observan dos juegos de señales: el primero con valores  $g_{\parallel} = 2.246$  y  $A_{\parallel} = 169 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$  y el segundo con valores  $g_{\parallel} = 2.279$  y  $A_{\parallel} = 170 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$  correspondientes a los componentes 1 y 2, respectivamente (ver Tabla 3.2). Estos espectros de CD y ESR son consistentes con los previamente reportados para los modos de alta ocupación (ver Capítulo I: Antecedentes, sección 1.6).<sup>133, 137</sup>



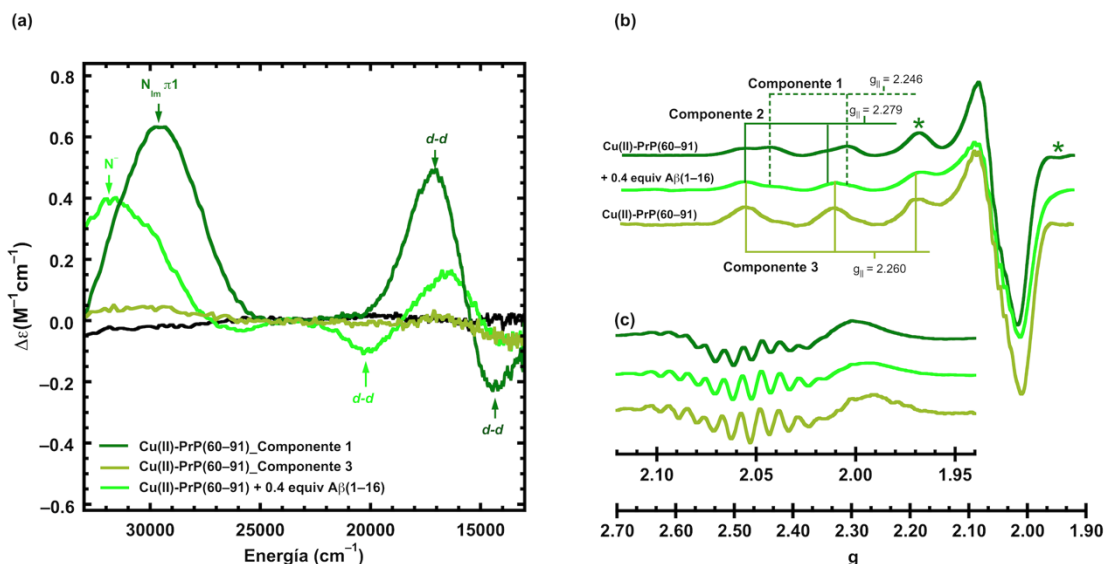
**Figura 3.2. Titulación del componentes 1 y 2 del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(60–91) con  $\beta\text{A}(1-16)$  seguido por CD (a) y ESR (b).** Los espectros de los componentes 1 y 2 de  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(60–91) y el complejo  $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A}(1-16)$  se muestran en color verde oscuro y negro. Las líneas de color verde claro, naranja y rojo corresponden a la adición de 0.4, 1.0 y 2.0 equivalentes de  $\beta\text{A}(1-16)$  a los componentes 1 y 2 del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(60–91). En (c) se muestra la derivada de la región perpendicular del espectro de ESR.

**Tabla 3.2. Parámetros de ESR de las diferentes muestras analizadas en la titulación de los modos de alta ocupación (componente 1 y 2) con  $\beta\text{A}(1-16)$ .**

Nombre de la muestra	Especie identificada	$g_{  }$	$A_{  } (1 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1})$
$\text{Cu}^{2+}$ -PrP(60–91)_modos de alta ocupación	Componente 1	2.246	169
	Componente 2	2.279	170
+ 0.4 equiv $\beta\text{A}(1-16)$	Componente 1	2.236	167
	Componente 3	2.256	192
+ 1.0 equiv $\beta\text{A}(1-16)$	Modo I	2.265	183
	Modo II	2.243	155
+ 2.0 equiv $\beta\text{A}(1-16)$	Modo I	2.269	180
	Modo II	2.238	156
$\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A}(1-16)$	Modo I	2.272	179
	Modo II	2.237	157

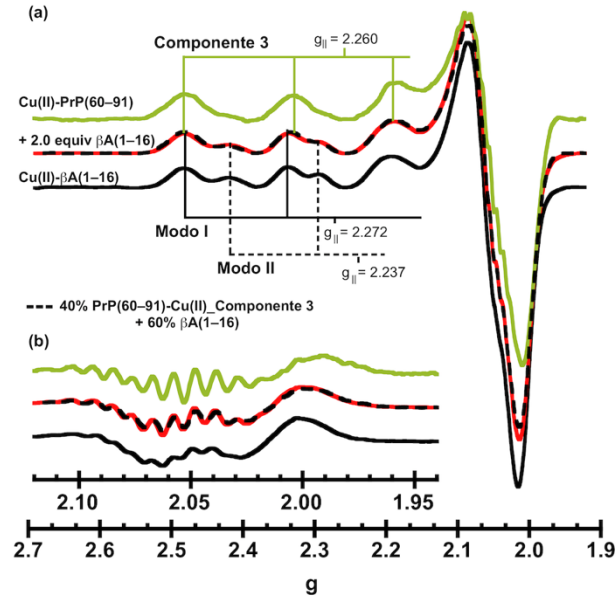
Después de su caracterización, los componentes 1 y 2 fueron titulados con alícuotas de 0.2 equivalentes  $\beta\text{A}(1-16)$ . Desde la adición de 0.4 equivalentes de  $\beta\text{A}(1-16)$  se observan cambios importantes en los espectros de CD y ESR (Figura 3.2, espectros de color verde claro). En el espectro de CD, la intensidad de las señales del componente 1 disminuye drásticamente y al mismo tiempo aparecen una banda positiva de LMCT en  $31\,780 \text{ cm}^{-1}$  ( $\Delta\epsilon = +0.40 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) y una banda  $d-d$  negativa en  $20\,270 \text{ cm}^{-1}$  ( $\Delta\epsilon = -0.10 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). De igual forma, en el espectro de ESR (Figura 3.2b, espectro verde claro), se aprecia una disminución en la intensidad de las señales asociadas al componente 1 y se detecta otra especie con valores  $g_{||} = 2.256$  y  $A_{||} = 192 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ . Las nuevas señales observadas por CD son similares a las

previamente reportadas para el *complejo ternario* formado entre el octapéptido OR<sub>1</sub> (PHGGGWGQ), Cu<sup>2+</sup> y βA(1–16).<sup>241</sup> Sin embargo, es importante recordar que el octapéptido OR<sub>1</sub> (PHGGGWGQ) forma exclusivamente el componente 1, a diferencia del fragmento PrP(60–91) utilizado en este trabajo, el cual puede formar los componentes 1, 2 y 3 dependiendo de la relación estequiométrica Cu<sup>2+</sup>/PrP. Curiosamente, la otra especie detectada en el espectro de ESR tiene valores de  $g_{\parallel}$  y  $A_{\parallel}$  prácticamente idénticos a los del componente 3 (Tabla 3.2) y presenta el mismo patrón en las señales del acoplamiento superhiperfino de nitrógeno (Figura 3.3). Estos resultados sugieren que cantidades pequeñas de βA(1–16) inducen la formación de una especie ternaria OR<sub>4</sub>-Cu<sup>2+</sup>-βA(1–16) a expensas del componente 1, pero además perturba el equilibrio entre los componentes 1, 2 y 3 en favor del componente 3, aún cuando la relación estequiométrica Cu<sup>2+</sup>/PrP favorece los componentes 1 y 2.



**Figura 3.3. Comparación de los espectros de CD (a) y ESR (b) para evidenciar la formación del componente 3 tras titular los componentes 1 y 2 con 0.4 equivalentes de βA(1–16).** Los espectros de los componentes 1 y 2 y el componente 3 del complejo de Cu<sup>2+</sup>-PrP(60–91) se muestran en color verde oscuro y oliva, respectivamente. La línea de color verde claro corresponde a la titulación de los componentes 1 y 2 con 0.4 equivalentes de βA(1–16). En (a) se observa disminución de las señales de los componentes 1 (verde oscuro) tras la adición de los de 0.4 equivalentes de βA(1–16) (verde claro). Esto está asociado en parte a la formación del complejo ternario OR<sub>4</sub>-Cu<sup>2+</sup>-βA(1–16), cuya banda *d-d* característica se aprecia en 20 000 cm<sup>-1</sup> (verde claro). La drástica disminución de las señales de CD también sugiere la formación del componente 3 (verde oliva), cuya señal de CD es prácticamente cero. La formación del componente 3 es más evidente en los espectros de ESR (b) y sus segundas derivadas (c).

Como se aprecia en la Figura 3.2a, al alcanzar 1.0 equivalente de  $\beta\text{A}(1-16)$  en la titulación de los componentes 1 y 2, la banda  $d-d$  de la especie ternaria  $\text{OR}_4\text{-Cu}^{2+}\text{-}\beta\text{A}(1-16)$  permanece sin cambios y se comienza a apreciar la banda  $d-d$  del complejo  $\text{Cu}^{2+}\text{-}\beta\text{A}(1-16)$ . Asimismo, en la región paralela del espectro de ESR, predominan los Modos I y II de complejo  $\text{Cu}^{2+}\text{-}\beta\text{A}(1-16)$  (ver Figura 3.2b, espectro color naranja); mientras que, en la región perpendicular, se incrementa la intensidad de las señales asociadas al acoplamiento superhiperfino de nitrógeno del componente 3 (Figura 3.2c, espectro color naranja). Estos resultados revelan que a medida que se incrementa la cantidad de  $\beta\text{A}(1-16)$  se favorece la formación del componente 3 y el complejo  $\text{Cu}^{2+}\text{-}\beta\text{A}(1-16)$ , pero no la formación del *complejo ternario*  $\text{OR}_4\text{-Cu}^{2+}\text{-}\beta\text{A}(1-16)$ . Finalmente, al agregar el segundo equivalente de  $\beta\text{A}(1-16)$ , las señales observadas en el espectro de CD son prácticamente idénticas a las del complejo  $\text{Cu}^{2+}\text{-}\beta\text{A}(1-16)$ , lo cual es congruente con el predominio de señales de los Modos I y II en la región paralela del espectro de ESR (Figura 3.2, espectros color rojo). Sin embargo, en la segunda derivada de la región perpendicular del espectro de ESR, aún se observa el acoplamiento superhiperfino de nitrógeno característico del componente 3 (Figura 3.2c, espectro color rojo). Para calcular la contribución del componente 3 en el espectro de ESR del punto final de la titulación, se sumaron los espectros de  $\text{Cu}^{2+}\text{-}\beta\text{A}(1-16)$  y componente 3 en diferentes proporciones, el mejor ajuste se obtuvo con 60% de espectro del complejo  $\text{Cu}^{2+}\text{-}\beta\text{A}(1-16)$  y 40% del espectro del componente 3 (Figura 3.4). Estos resultados indican que el péptido  $\beta\text{A}(1-16)$  solo puede remover ~60% del  $\text{Cu}^{2+}$  unido a los modos de alta ocupación, a pesar de que tiene una constante de afinidad al menos un orden de magnitud mayor a la de los componentes 1 y 2. Esta aparente contradicción se puede atribuir al cambio observado en el equilibrio de los componentes 1, 2 y 3, donde se favorece la formación del componente 3, especie cuya afinidad por  $\text{Cu}^{2+}$  es igual o incluso mayor a la de  $\beta\text{A}(1-16)$ .



**Figura 3.4. Comparación de espectros de ESR para evidenciar la formación del componente 3 tras titular los modos de alta ocupación (componente 1 y 2) con 2.0 equiv de  $\beta A(1-16)$ .** En (a) se muestran los espectros del componentes 3 y el complejo  $Cu^{2+}-\beta A(1-16)$  en color verde oliva y negro, respectivamente. La línea punteada negra es el resultado de sumar los espectros del componente 3 y del complejo  $Cu^{2+}-\beta A(1-16)$  en una proporción 40:60. En (b) se muestra la derivada de la región perpendicular del espectro de ESR.

En conjunto, los resultados de las titulaciones del modo de baja ocupación (componente 3) y los modos de alta ocupación (componentes 1 y 2) indican que el efecto del péptido  $\beta A(1-16)$  en la coordinación de  $Cu^{2+}$  a la región OR depende de la relación estequiométrica  $Cu^{2+}/PrP$  (Figura 3.5). En condiciones donde la cantidad de  $Cu^{2+}$  es menor a la de PrP, el  $\beta A(1-16)$  no puede remover eficientemente el  $Cu^{2+}$  del componente 3. Por el contrario, cuando la cantidad de  $Cu^{2+}$  es mayor que la de PrP, el  $\beta A(1-16)$  remueve  $\sim 60\%$  del  $Cu^{2+}$  unido a los modos de alta ocupación, forma un *complejo ternario*  $OR_4-Cu^{2+}-\beta A(1-16)$  con el componente 1, y además perturba el equilibrio entre los componentes 1, 2 y 3 en favor del componente 3.

Efecto de  $\beta A$  en la coordinación de  $Cu^{2+}$  a la región OR

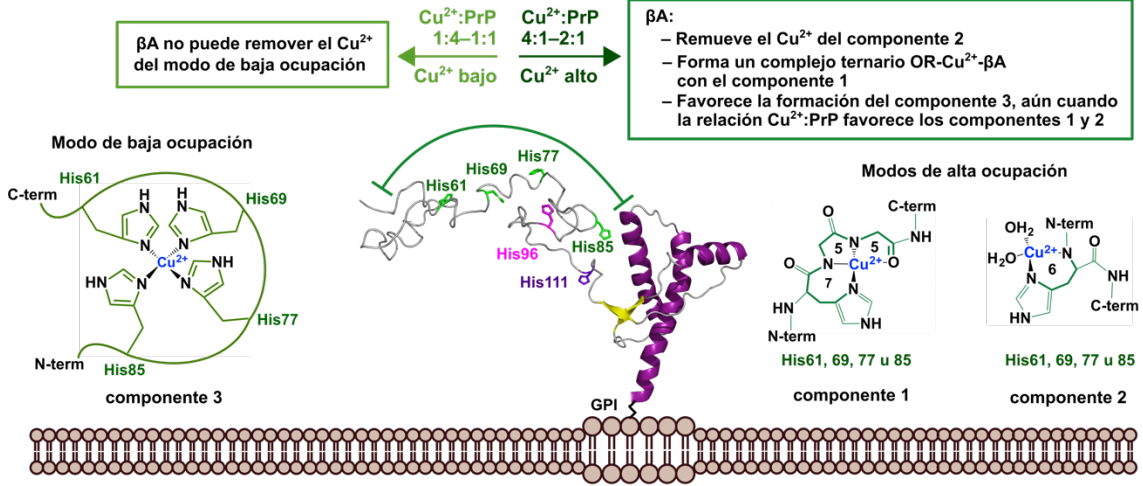
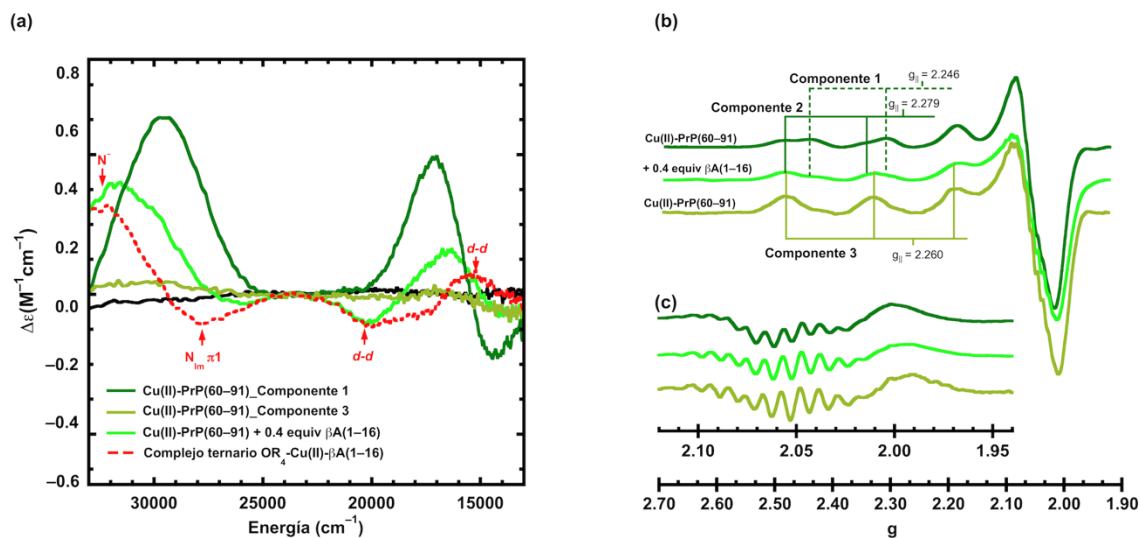


Figura 3.5. Efecto del  $\beta A(1-16)$  en la coordinación de  $Cu^{2+}$  a la región OR de la proteína prion.



*Análisis de las características espectroscópicas del complejo ternario OR<sub>4</sub>-Cu<sup>2+</sup>-βA(1-16) y propuesta de modo de coordinación*

A continuación se analizan con detalle las características espectroscópicas del *complejo ternario* OR<sub>4</sub>-Cu<sup>2+</sup>-βA(1-16), a fin de identificar los posibles ligantes que participan en la esfera de coordinación. Esta especie ternaria se observó al titular los modos de alta ocupación (componente 1 y 2) con 0.4 equivalentes de βA(1-16), como parte de una mezcla compleja que incluye los componentes 1, 2 y 3 (ver Figura 3.6). Desafortunadamente la presencia de los componentes 1, 2 y 3 enmascara las señales de ESR asociadas a la especie ternaria. Sin embargo, puesto que los componentes 2 y 3 son inactivos por CD, se obtuvo una aproximación el espectro de CD del *complejo ternario* OR<sub>4</sub>-Cu<sup>2+</sup>-βA(1-16) al restar del espectro verde claro las señales asociadas a la cantidad remanente del componente 1 (estimada a partir del Δε del componente 1 a 14 164 cm<sup>-1</sup>) (ver Figura 3.6). El espectro obtenido presenta el mismo número y tipo de bandas reportadas previamente para el *complejo ternario* OR<sub>1</sub>-Cu<sup>2+</sup>-βA(1-16) (Tabla 3.3). Entre las señales de CD asociadas a la especie ternaria OR<sub>4</sub>-Cu<sup>2+</sup>-βA(1-16), se observan una banda positiva de gran intensidad en 32 666 cm<sup>-1</sup> (Δε = +0.32 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>) correspondiente a la LMCT de amida desprotonada a Cu<sup>2+</sup> y otra negativa de baja intensidad en 27 863 cm<sup>-1</sup> (Δε = -0.11 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>) que puede asignarse a la LMCT de imidazol π1 a Cu<sup>2+</sup>, estas señales revelan la participación de residuos de His y amidas desprotonadas de la cadena péptidica en la esfera de coordinación. Lo anterior es congruente con el efecto Cotton de la banda *d-d*, el cual es característico de complejos de Cu<sup>2+</sup> en los que participan residuos His y amidas desprotonadas.<sup>228-230</sup> Asimismo, la presencia de una banda *d-d* a altas energías (20 149 cm<sup>-1</sup>) indica un desdoblamiento energético grande de los orbitales *d* del Cu<sup>2+</sup>, lo que se espera cuando están presentes ligantes de alta covalencia, como es el caso de las amidas desprotonadas. En conjunto todas estas características del espectro de CD del complejo OR<sub>4</sub>-Cu<sup>2+</sup>-βA(1-16) son consistentes con la participación de residuos de His y amidas desprotonadas en la esfera de coordinación del *complejo ternario* OR<sub>4</sub>-Cu<sup>2+</sup>-βA(1-16).



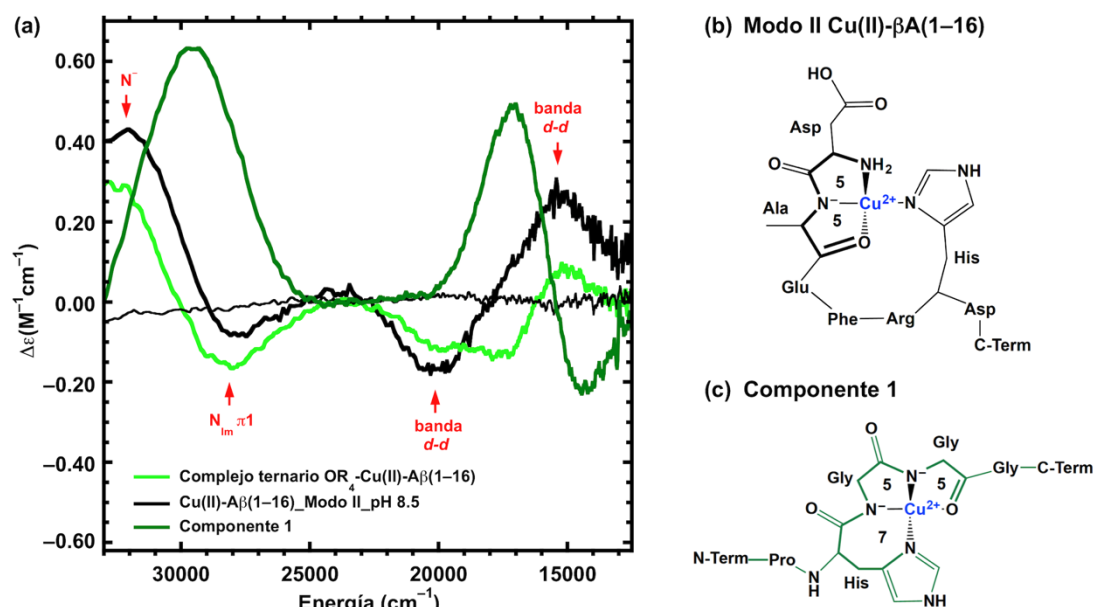
**Figura 3.6.** En los espectros de CD (a) y ESR (b-c) de la titulación de los modos de alta ocupación (componentes 1 y 2) con 0.4 equiv de  $\beta A(1-16)$  es evidente la formación del complejo ternario  $OR_4-Cu^{2+}-\beta A(1-16)$  y el componente 3. Los espectros de los componentes 1 y 2 del complejo  $Cu^{2+}-PrP(60-91)$  se muestra de color verde oscuro y el espectro que resulta de la adición de 0.4 equivalentes de  $\beta A(1-16)$  se muestra de color verde claro. Los espectros del componente 3 del complejo  $Cu^{2+}-PrP(60-91)$  se incluyen en color verde oliva. En (a) el espectro de color rojo se obtiene de restar del espectro de color verde claro las señales correspondientes al componente 1 remanente (estimado utilizando el  $\Delta\epsilon$  del componente 1 a  $14\ 164\ cm^{-1}$ ), el espectro resultante se asigna al complejo ternario  $OR_4-Cu^{2+}-\beta A(1-16)$ .

**Tabla 3.3.** Transiciones electrónicas observadas en el espectro de CD de las especies ternarias  $OR_1-Cu^{2+}-\beta A(1-16)$  y  $OR_4-Cu^{2+}-\beta A(1-16)$ .

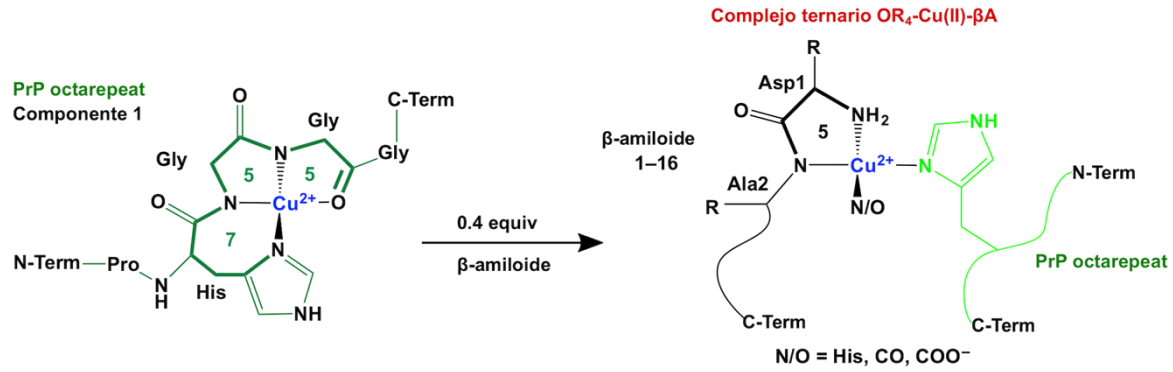
Especie ternaria	$N-\pi^*$ a $Cu^{2+}$	$\pi^*$ a $Cu^{2+}$	$d-d$	$d-d$	Ref.
$OR_1-Cu^{2+}-\beta A(1-16)$	$32\ 051\ cm^{-1}$	$28\ 409\ cm^{-1}$	$20\ 000\ cm^{-1}$	$15\ 500\ cm^{-1}$	<sup>144</sup>
	312 nm	352 nm	500 nm	642 nm	
	$\Delta\epsilon +0.54$	$\Delta\epsilon -0.30$	$\Delta\epsilon -0.32$	$\Delta\epsilon +0.14$	
$OR_4-Cu^{2+}-\beta A(1-16)$	$32\ 303\ cm^{-1}$	$27\ 863\ cm^{-1}$	$20\ 149\ cm^{-1}$	$15\ 528\ cm^{-1}$	Este trabajo
	306 nm	357 nm	499 nm	670 nm	<sup>258</sup>
	$\Delta\epsilon +0.31$	$\Delta\epsilon -0.10$	$\Delta\epsilon -0.10$	$\Delta\epsilon +0.070$	

Curiosamente, la especie ternaria  $OR_4-Cu^{2+}-\beta A(1-16)$  tiene un efecto Cotton muy parecido al del Modo II de  $Cu^{2+}-\beta A(1-16)$ , con el mismo tipo de bandas de LMCT, así como el mismo signo e intensidad relativa de las bandas  $d-d$  (ver Figura 3.7). Como se mencionó anteriormente, en complejos metal-proteína en los que participan amidas desprotonadas, el signo del efecto Cotton en las bandas  $d-d$  está asociado al impedimento estérico de las cadenas laterales de los aminoácidos que rodean dichas amidas desprotonadas: los residuos con cadenas laterales grandes, como el Asp y la Ala presentes en el  $N$ -terminal de  $\beta A(1-16)$ , dan lugar a una banda  $d-d$  negativa a altas energías y positiva a bajas energías ( $-/+$ ); por el contrario residuos con bajo impedimento estérico, como la Gly en el componente 1, producen

una banda *d-d* positiva a altas energías y negativa a bajas energías (+/-).<sup>228-230</sup> La similitud entre el efecto Cotton del Modo II de  $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A}(1-16)$  y el *complejo ternario*  $\text{OR}_4\text{-Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A}(1-16)$  sugiere que es el péptido  $\beta\text{A}(1-16)$  el que provee la amida desprotonada para formar el complejo  $\text{OR}_4\text{-Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A}(1-16)$ . Con base en las características previamente descritas del espectro de CD de la especie ternaria  $\text{OR}_4\text{-Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A}(1-16)$  se propone el modo de coordinación mostrado en la Figura 3.8.



**Figura 3.7.** La relación entre el efecto Cotton del Modo II de  $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A}(1-16)$  y el componente 1 (a) y sus modos de coordinación (b-c) revela algunos de los componentes de la esfera de coordinación del complejo  $\text{OR}_4\text{-Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A}(1-16)$ . En (a) se muestran los espectros de CD del complejo ternario  $\text{OR}_4\text{-Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A}(1-16)$  en color verde claro, el Modo II del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A}(1-16)$  en color negro y el componente 1 en color verde oscuro  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(60-91). En (b) se muestra el modo de coordinación del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A}(1-16)$  formado por: el nitrógeno del amino terminal, el nitrógeno de anillo de imidazol de la His-6, el oxígeno del carbonilo del Asp-2 y la amida desprotonada de la Ala-2. En (c) se muestra el modo de coordinación del componente 1 formado por: el oxígeno del carbonilo de un residuo de Gly, dos amidas desprotonadas de los residuos de Gly continuos y un nitrógeno del anillo imidazol de la His. Al comparar los espectros de CD (a) y los modos de coordinación de los complejos  $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A}(1-16)$  y componente 1 (b-c), se observa que en el complejo  $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A}(1-16)$  la amida desprotonada proviene de un residuo de Ala (b), mientras que en el componente 1 las dos amidas desprotonadas de la esfera de coordinación provienen de residuos de Gly (c). El signo del efecto Cotton es consistente con el impedimento estérico por los grupos metilo del residuo de Ala en el complejo  $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A}(1-16)$  y la ausencia de este impedimento estérico en los residuos de Gly del componente 1.



**Figura 3.8. Modo de coordinación propuesto para el complejo ternario OR<sub>4</sub>-Cu<sup>2+</sup>-βA(1-16).** El modo de coordinación propuesto para el complejo ternario OR<sub>4</sub>-Cu<sup>2+</sup>-βA(1-16) formado a partir del componente 1 involucra los siguientes ligandos: el nitrógeno del grupo amino terminal y la amida desprotonada de la Ala-2 del βA(1-16), el imidazol de un *octarepeat* de la PrP y otro ligante (nitrógeno u oxígeno) que puede provenir del βA(1-16) o del *octarepeat* de la PrP.

### 3.1.2. Región del *non-octarepeat* (non-OR)

La PrP puede unir dos átomos de  $\text{Cu}^{2+}$  fuera de la región del OR, en los sitios de His96 e His111. Para estudiar el efecto del  $\beta\text{A}$  en la unión de  $\text{Cu}^{2+}$  a la región del non-OR se realizaron ensayos de competencia, donde los complejos  $\text{Cu}^{2+}$ -His96 (**A**) y  $\text{Cu}^{2+}$ -His111 (**B**) se enfrentaron al péptido  $\beta\text{A}(1-16)$ . A continuación, se describen los resultados obtenidos en estos ensayos.

#### A. Competencia por $\text{Cu}^{2+}$ entre el péptido $\beta\text{A}(1-16)$ y el sitio de His96

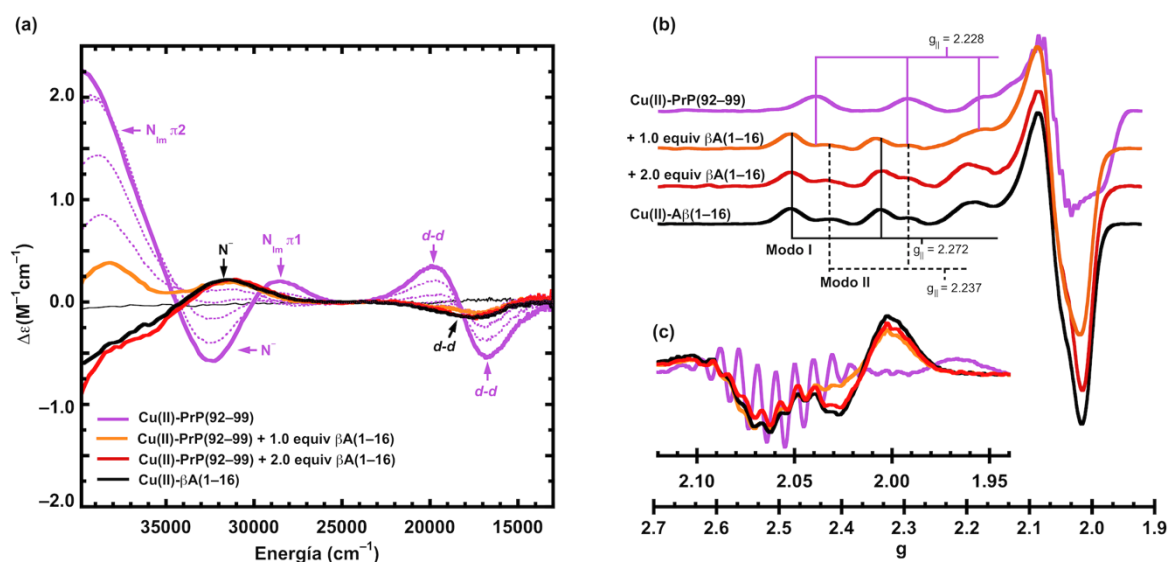
El complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -His96 se formó al agregar 0.24 mM de  $\text{Cu}^{2+}$  a una solución 0.3 mM de PrP(92-99) a un pH de 7.5. Los espectros de CD y ESR correspondientes a esta muestra se presentan de color rosa en la Figura 3.9. En el espectro de CD se aprecian dos bandas *d-d*, una positiva en  $19\,871\text{ cm}^{-1}$  ( $\Delta\epsilon = +0.34\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) y otra negativa en  $16\,718\text{ cm}^{-1}$  ( $\Delta\epsilon = -0.54\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ); así como tres bandas de LMCT: una positiva de gran intensidad en  $39\,740\text{ cm}^{-1}$  ( $\Delta\epsilon = +2.2\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) que puede asignarse a la LMCT de imidazol  $\pi_1$  a  $\text{Cu}^{2+}$ , una banda negativa en  $32\,388\text{ cm}^{-1}$  ( $\Delta\epsilon = -0.58\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) correspondiente a la LMCT de amida desprotonada de la cadena peptídica a  $\text{Cu}^{2+}$  y una banda positiva de baja intensidad en  $28\,624\text{ cm}^{-1}$  ( $\Delta\epsilon = +0.23\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) que corresponde a la LMCT de imidazol  $\pi_1$  a  $\text{Cu}^{2+}$ . Estas señales de CD son consistentes con los reportes previos para el sitio de la His96 en valores de pH cercanos a 7 (ver Capítulo I: Antecedentes, sección 1.6).<sup>236</sup> Aunque a este valor de pH coexisten los modos 3N1O y 4N del complejo PrP(92-99), previamente se demostró que sus las señales de ESR se traslapan, por lo que las señales de cada modo de coordinación no se pueden asignar de forma independiente en estas condiciones, dando lugar a un solo juego de señales con valores  $g_{\parallel} = 2.228$  y  $A_{\parallel} = 184 \times 10^{-4}\text{ cm}^{-1}$  (Tabla 3.4).<sup>236</sup>

Después de su caracterización, el complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(92-99) fue titulado con alícuotas de 0.2 equivalentes de  $\beta\text{A}(1-16)$ . Como se puede observar en la Figura 3.9a, la adición de 0.2, 0.4, 0.6 y 0.8 equivalentes de  $\beta\text{A}(1-16)$  provoca la disminución gradual de las señales de CD asociadas al complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(92-99) (ver líneas punteadas de color rosa). Tras agregar el primer equivalente de  $\beta\text{A}(1-16)$ , se aprecian claramente las señales del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A}(1-16)$  tanto en el espectro de CD como en el espectro de ESR (ver Figura 3.9, espectros color naranja). Finalmente, con el segundo equivalente de  $\beta\text{A}(1-16)$ , se obtienen espectros

de CD y ESR idénticos a los del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A}(1-16)$  (ver Figura 3.9, espectros color rojo). Estos resultados indican que el  $\beta\text{A}(1-16)$  puede remover por completo el  $\text{Cu}^{2+}$  del sitio de His96.

**Tabla 3.4. Parámetros de ESR de las diferentes muestras analizadas en la titulación del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(92-99) con  $\beta\text{A}(1-16)$ .**

Nombre de la muestra	Modo de coordinación identificado	$g_{\parallel}$	$A_{\parallel}$ ( $1 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ )
$\text{Cu}^{2+}$ -PrP(92-99)	3N1O/4N	2.228	184
+ 1.0 equiv $\beta\text{A}(1-16)$	Modo I	2.272	178
	Modo II	2.243	157
+ 2.0 equiv $\beta\text{A}(1-16)$	Modo I	2.272	178
	Modo II	2.243	157
$\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A}(1-16)$	Modo I	2.272	179
	Modo II	2.237	157

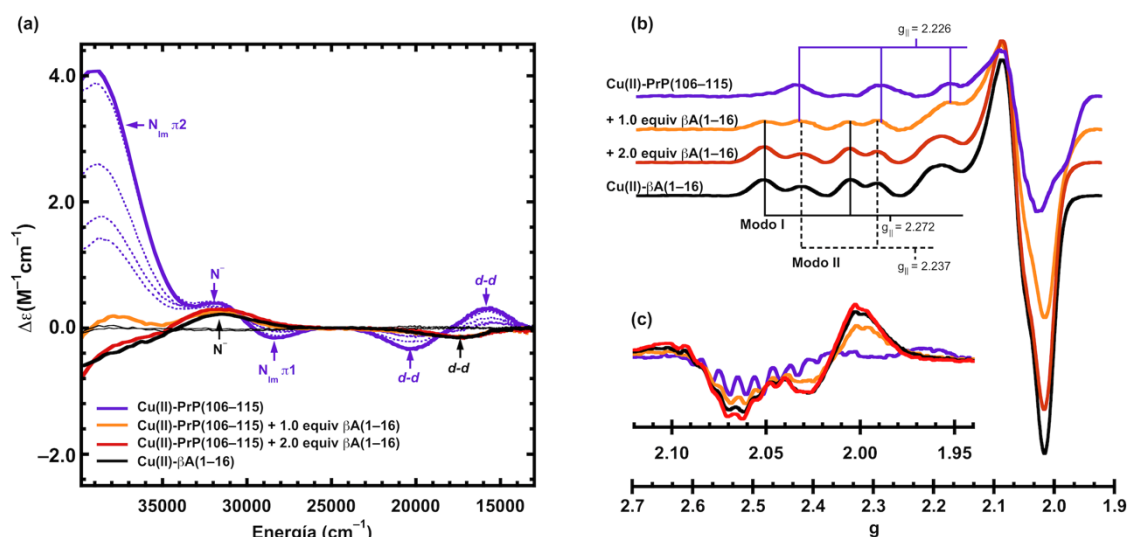


**Figura 3.9 Titulación del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(92-99) con  $\beta\text{A}(1-16)$  seguido por CD (a) y ESR (b).** Los espectros del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(92-99) y el complejo  $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A}(1-16)$  se muestran en color rosa y negro. En (a) las líneas punteadas de color rosa corresponden a la titulación del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(92-99) con alícuotas de 0.2 en 0.2 equiv hasta 0.8 equiv de  $\beta\text{A}(1-16)$ . Los espectros de color naranja y rojo corresponden a la titulación del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(92-99) con 1.0 y 2.0 equivalentes de  $\beta\text{A}(1-16)$ . En (c) se muestra la derivada de la región perpendicular del espectro de ESR.

## B. Competencia por $\text{Cu}^{2+}$ entre el péptido $\beta\text{A}(1-16)$ y sitio de His111

El complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -His111 se formó al agregar 0.24 mM de  $\text{Cu}^{2+}$  a una solución 0.3 mM de PrP(106-115) a pH de 7.5. Los espectros de CD y ESR correspondientes a la mezcla de los modos 3N1O y 4N del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(106-115) se muestran de color morado en la Figura 3.10. En el espectro de CD se observan una banda  $d-d$  positiva en  $15\,676 \text{ cm}^{-1}$  ( $\Delta\epsilon = +0.33 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) y una banda  $d-d$  negativa a  $20\,277 \text{ cm}^{-1}$  ( $\Delta\epsilon = -0.37 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), al igual que

tres bandas de LMCT en  $39\,090\text{ cm}^{-1}$  ( $\Delta\varepsilon = +4.08\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ),  $32,3061\text{ cm}^{-1}$  ( $\Delta\varepsilon = +0.42\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ),  $28\,305\text{ cm}^{-1}$  ( $\Delta\varepsilon = -0.18\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), correspondientes a las LMCT de imidazol  $\pi_2$ , amida desprotonada e imidazol  $\pi_1$  a  $\text{Cu}^{2+}$ , respectivamente. Por otra parte, en el espectro de ESR (Figura 3.9b) se observa un juego de señales con un  $g_{\parallel} = 2.226$  y  $A_{\parallel} = 178 \times 10^{-4}\text{ cm}^{-1}$ . Estos espectros de CD y ESR son consistentes con los previamente reportados para el sitio de His111 (ver Capítulo I: Antecedentes, sección 1.6).<sup>235</sup>



**Figura 3.10. Titulación del el complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(106–115) con  $\beta\text{A(1–16)}$  seguido por CD (a) y ESR (b).** Los espectros del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(106–115) y el complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -  $\beta\text{A(1–16)}$  se muestran en color morado y negro. En (a) las líneas punteadas de color morado corresponden a la titulación del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(106–115) con alícuotas de 0.2 en 0.2 equiv hasta 0.8 equiv de  $\beta\text{A(1–16)}$ . Los espectros de color naranja y rojo corresponden a la titulación del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(106–115) con 1.0 y 2.0 equivalentes de  $\beta\text{A(1–16)}$ . En (c) se muestra la derivada de la región perpendicular del espectro de ESR.

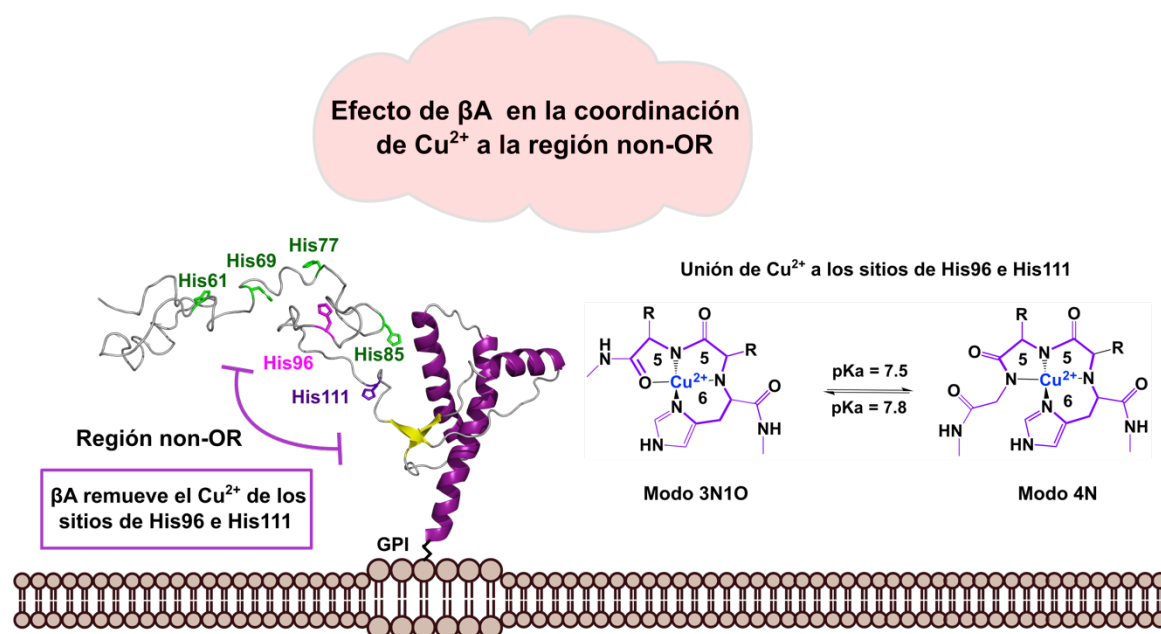
Después de su caracterización, el complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(106–115) fue titulado con alícuotas de 0.2 equivalentes de  $\beta\text{A(1–16)}$ . La adición desde 0.2 y hasta 0.8 equivalentes de  $\beta\text{A(1–16)}$  provoca la disminución gradual de las señales de CD asociadas al complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(106–115) (ver Figura 3.10a, líneas punteadas moradas). Después de agregar el primer equivalente de  $\beta\text{A(1–16)}$ , las señales de CD y ESR del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(106–115) prácticamente desaparecen y predominan las señales correspondientes al complejo  $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A(1–16)}$  (ver Figura 3.10, espectros color naranja). Tras la adición del segundo equivalente de  $\beta\text{A(1–16)}$ , los espectros de CD y ESR son idénticos a los del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A(1–16)}$  (ver Figura 3.10,

espectros color naranja). Estos resultados indican que el  $\beta A(1-16)$  puede remover por  $Cu^{2+}$  del sitio de la His111.

**Tabla 3.5. Parámetros de ESR de las diferentes muestras analizadas en la titulación del complejo  $Cu^{2+}$ -PrP(106-115) con  $\beta A(1-16)$ .**

Nombre de la muestra	Modo de coordinación identificado	$g_{  }$	$A_{  } (1 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1})$
$Cu^{2+}$ -PrP(106-115)	3N1O/4N	2.226	178
+ 1.0 equiv $A\beta(1-16)$	Modo I	2.274	173
	Modo II	2.238	156
+ 2.0 equiv $A\beta(1-16)$	Modo I	2.274	173
	Modo II	2.238	156
$Cu^{2+}$ - $A\beta(1-16)$	Modo I	2.272	179
	Modo II	2.237	157

En conjunto, los resultados de las titulaciones de los complejos  $Cu^{2+}$ -PrP(92-99) y  $Cu^{2+}$ -PrP(106-115) indican que el péptido  $\beta A(1-16)$  puede remover al  $Cu^{2+}$  de los sitios de His96 e His111 sin formar complejos ternarios (Figura 3.5). Esto es consistente con la gran semejanza en los modos de coordinación y con las constantes de disociación previamente reportadas para los sitios de la región non-OR (0.4-0.7  $\mu M$ ), mayores a la del  $\beta A(1-16)$  (0.1 nM).<sup>140</sup>



**Figura 3.11. Efecto de  $\beta A(1-16)$  en la coordinación de  $Cu^{2+}$  a la región del non-OR de la proteína prion.**



### 3.2. Efecto de $\beta$ A(1–16) en la coordinación de $\text{Cu}^{2+}$ al sitio de la $\alpha$ -His111 generado tras el procesamiento de la proteína prion por la $\alpha$ -secretasa

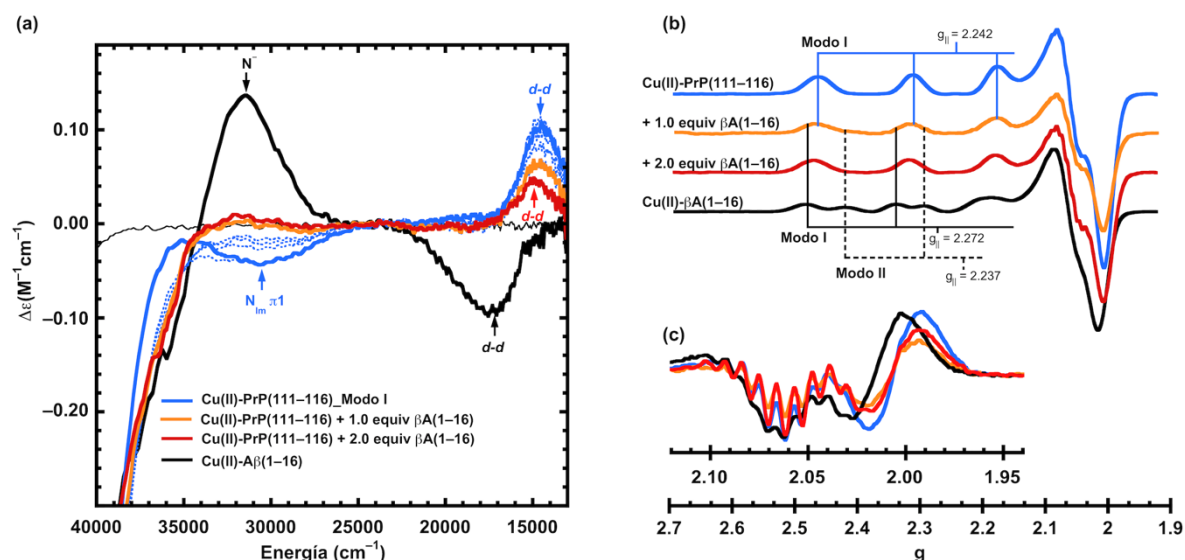
El sitio de unión a  $\text{Cu}^{2+}$  que resulta de la escisión de la PrP entre Lys110/His111 se modeló en este trabajo utilizando el péptido PrP(111–116). Al igual que en la región OR, la coordinación de  $\text{Cu}^{2+}$  en el sitio  $\alpha$ -His111 depende de las concentraciones relativas  $\text{Cu}^{2+}/\text{PrP}$ , dando lugar a los modos de coordinación conocidos como Modo I y Modo II. Por lo cual, en este trabajo se estudió de forma independiente el efecto del péptido  $\beta$ A(1–16) en la coordinación de  $\text{Cu}^{2+}$  al Modo I (A) y al Modo II (B).

#### A. Competencia por $\text{Cu}^{2+}$ entre el péptido $\beta$ A(1–16) y el Modo I de $\text{Cu}^{2+}$ - $\alpha$ -His111

Para formar el Modo I de  $\text{Cu}^{2+}$ - $\alpha$ -His111 se agregaron 0.2 mM de  $\text{CuSO}_4$  a una solución de 0.8 mM de PrP(111–116), para alcanzar una relación estequiométrica 0.2:1.0 de  $\text{Cu}^{2+}/\text{PrP}$ . Los espectros de CD y ESR del Modo I del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(111–116) se muestran de color azul claro en la Figura 3.12. En el espectro de CD (Figura 3.12a) se observan: una banda negativa de LMCT de  $\text{NH}_2$  a  $\text{Cu}^{2+}$  alrededor de  $40\,000\text{ cm}^{-1}$  y otra de imidazol  $\pi$ 1 a  $\text{Cu}^{2+}$  en  $30\,606\text{ cm}^{-1}$ , así como una banda  $d-d$  positiva en  $14\,596\text{ cm}^{-1}$ .<sup>144</sup> En la región paralela del espectro de ESR (Figura 3.12b), se observa una sola especie con un  $g_{\parallel} = 2.242$  y  $A_{\parallel} = 184 \times 10^{-4}\text{ cm}^{-1}$ ; mientras que, en la segunda derivada de la región perpendicular del espectro (Figura 3.12c, espectro azul claro) se observan las señales asociadas al acoplamiento superhiperfino de tres o cuatro átomos de nitrógeno. Éstas son consistentes con el modo de coordinación 4N propuesto para el Modo I del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(111–116).<sup>144</sup> Los espectros de CD y ESR anteriormente descritos son consistentes con los reportados previamente (ver Capítulo I: Antecedentes, sección 1.6).<sup>144</sup>

**Tabla 3.6. Parámetros de ESR de las diferentes muestras analizadas en la titulación Modo I del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(111–116) con  $\beta$ A(1–16).**

Nombre de la muestra	Modo de coordinación identificado	$g_{\parallel}$	$A_{\parallel}$ ( $1 \times 10^{-4}\text{ cm}^{-1}$ )
$\text{Cu}^{2+}$ -PrP(111–116)	Modo I	2.242	184
+ 1.0 equiv $\beta$ A(1–16)	Complejo ternario tipo Modo I	2.248	185
+ 2.0 equiv $\beta$ A(1–16)	Complejo ternario tipo Modo I	2.248	185
$\text{Cu}^{2+}$ - $\beta$ A(1–16)	Modo I	2.272	179
	Modo II	2.237	157



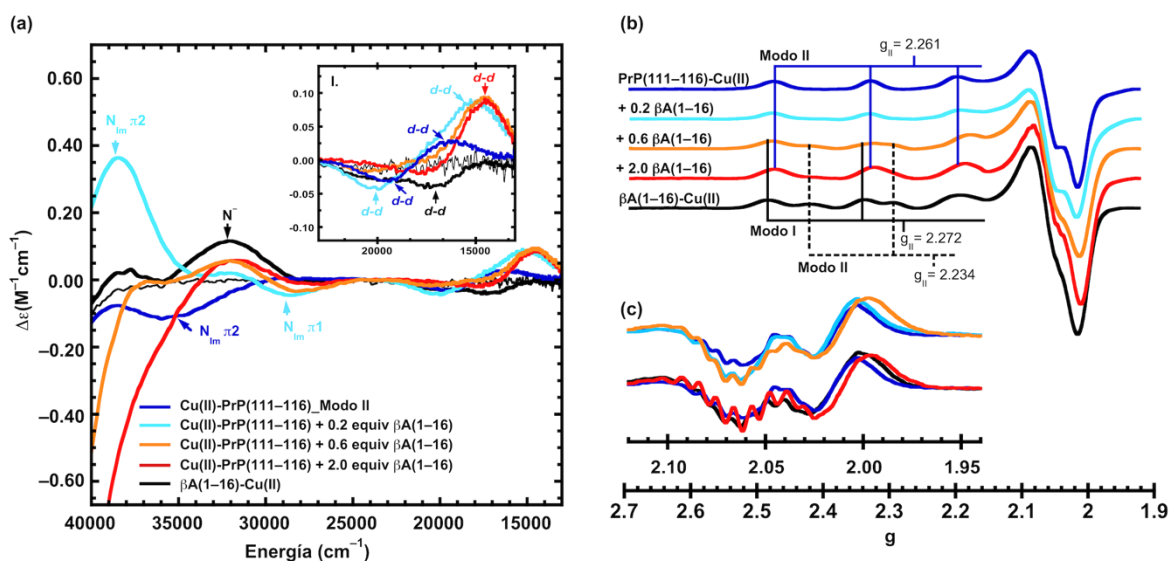
**Figura 3.12. Titulación del Modo I del complejo Cu<sup>2+</sup>- $\alpha$ -His111 con  $\beta$ A(1-16) seguido por CD (a) y ESR (b).** Los espectros del Modo I de Cu<sup>2+</sup>-PrP(111-116) y el complejo Cu<sup>2+</sup>- $\beta$ A(1-16) se muestran en color azul claro y negro. En (a) las líneas punteadas de color azul claro corresponden a la titulación del complejo Cu<sup>2+</sup>-PrP(111-116) con alícuotas de 0.2 en 0.2 equiv hasta 0.8 equiv de  $\beta$ A(1-16). Los espectros de color naranja y rojo corresponden a la titulación del complejo Cu<sup>2+</sup>-PrP(111-116) con 1.0 y 2.0 equivalentes de  $\beta$ A(1-16). En (c) se muestra la derivada de la región perpendicular del espectro de ESR.

Una vez caracterizado el Modo I del complejo Cu<sup>2+</sup>-PrP(111-116), éste fue titulado con pequeñas alícuotas de una solución concentrada de  $\beta$ A(1-16). Como se puede observar en el espectro de CD (Figura 3.12a, líneas punteadas azules), la adición consecutiva de 0.2 en 0.2 equivalentes de  $\beta$ A(1-16) hasta 0.8 equivalentes provoca la disminución gradual de las señales asociadas al Modo I (la banda de LMCT imidazol  $\pi$ 1 a Cu<sup>2+</sup> a 30 606 cm<sup>-1</sup> y la banda *d-d* a 14 596 cm<sup>-1</sup>). Al alcanzar 1.0 y 2.0 equivalentes  $\beta$ A(1-16) en la titulación, la señal a 30 606 cm<sup>-1</sup> prácticamente desaparece y el máximo de la banda *d-d* se desplaza a mayores energías (de 14 596 cm<sup>-1</sup> a 14 925 cm<sup>-1</sup>). En el espectro de ESR, se observa un pequeño cambio en el valor  $g_{||}$  de 2.242 a 2.248, así como un aumento en la intensidad de las señales asociadas al acoplamiento superhiperfino de nitrógeno. En ningún punto de la titulación se observan las señales de CD y ESR correspondientes al complejo Cu<sup>2+</sup>- $\beta$ A(1-16). Estos resultados revelan que  $\beta$ A(1-16) no puede remover al Cu<sup>2+</sup> del sitio  $\alpha$ -His111, pero forma un complejo ternario  $\alpha$ -His111-Cu<sup>2+</sup>- $\beta$ A(1-16) con características espectroscópicas similares a las del Modo I: una banda de LMCT negativa alrededor de 40 000 cm<sup>-1</sup> y una banda *d-d* positiva a baja energía (entre 14 000 y 15 000 cm<sup>-1</sup>) en el espectro de CD, así como un valor

$g_{\parallel}$  entre 2.240 y 2.250 en el espectro de ESR. Por lo anterior, en este trabajo se identifica esta nueva especie ternaria  $\alpha$ -His111-Cu<sup>2+</sup>- $\beta$ A(1-16) como *complejo ternario tipo Modo I*.

### B. Competencia por Cu<sup>2+</sup> entre el péptido $\beta$ A(1-16) y el Modo II de Cu<sup>2+</sup>- $\alpha$ -His111

El Modo II de Cu<sup>2+</sup>- $\alpha$ -His111 se formó a partir de una solución 0.5 mM de PrP(111-116), a la cual se le agregaron 0.45 mM de Cu<sup>2+</sup> para alcanzar una relación estequiométrica 0.8:1.0 de Cu<sup>2+</sup>/PrP. Los espectros de CD y ESR Modo II se muestran de color azul oscuro en la Figura 3.13. En el espectro de CD (Figura 3.13 a y b) se observan: una banda de LMCT de imidazol  $\pi$ 2 a Cu<sup>2+</sup> en 35 065 cm<sup>-1</sup>, una banda  $d-d$  negativa en 19 600 cm<sup>-1</sup> y otra positiva en 16 985 cm<sup>-1</sup>. Por otra parte, en la región paralela del espectro de ESR, se observa una sola especie con un valor  $g_{\parallel} = 2.261$  y  $A_{\parallel} = 181 \times 10^{-4}$  cm<sup>-1</sup>. Los espectros de CD y ESR anteriormente descritos son consistentes con los reportados previamente para el Modo II del complejo Cu<sup>2+</sup>- $\alpha$ -His111 (ver Capítulo I: Antecedentes, sección 1.6).<sup>144</sup>



**Figura 3.13. Titulación del Modo II del complejo Cu<sup>2+</sup>- $\alpha$ -His111 con  $\beta$ A(1-16) seguido por CD (a) y ESR (b).** Los espectros del Modo II de Cu<sup>2+</sup>-PrP(111-116) y el complejo Cu<sup>2+</sup>- $\beta$ A(1-16) se muestran en color azul oscuro y negro. Los espectros correspondientes a la titulación del Modo II con 0.2, 0.6 y 2.0 equivalentes se muestran de color azul celeste, naranja y rojo, respectivamente. En (c) se muestra la derivada de la región perpendicular del espectro de ESR.

Después de corroborar la formación del Modo II, éste fue titulado con alícuotas pequeñas de una solución concentrada de  $\beta$ A(1-16). La adición de los primeros 0.2 equivalentes de  $\beta$ A(1-16) provoca cambios drásticos en el espectro de CD: dos de las bandas asociadas al Modo II prácticamente desaparecen (la banda LMCT imidazol  $\pi$ 2 a Cu<sup>2+</sup> en 35 065 cm<sup>-1</sup> y la banda

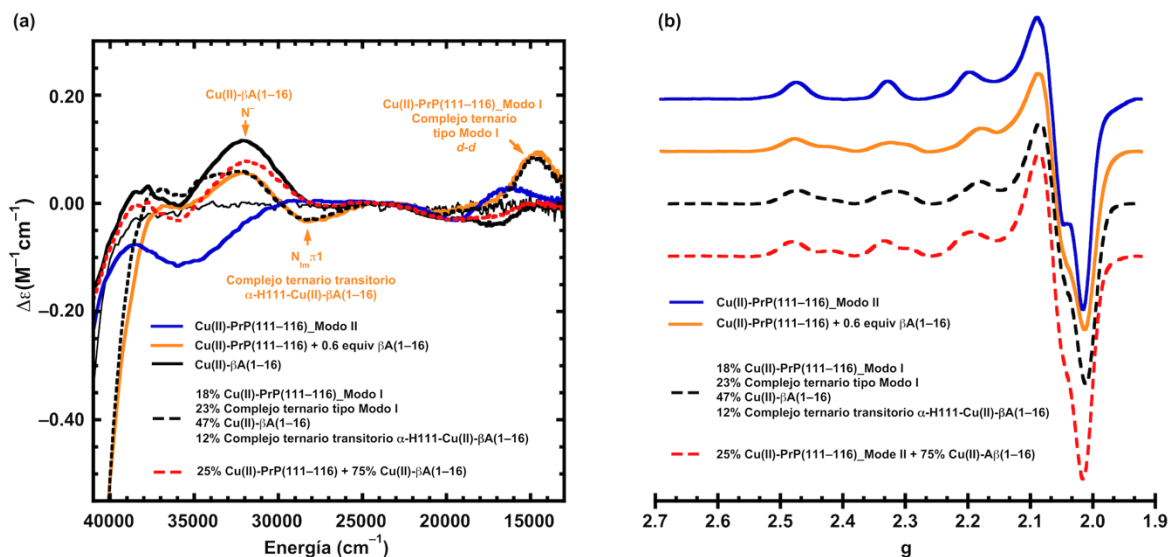
*d-d* negativa a  $19\,600\text{ cm}^{-1}$ ), al mismo tiempo que se aprecia una nueva banda *d-d* positiva en  $14\,555\text{ cm}^{-1}$  y tres nuevas bandas de LMCT en  $28\,277\text{ cm}^{-1}$ ,  $32\,072\text{ cm}^{-1}$  y  $38\,542\text{ cm}^{-1}$ . Por el contrario, en el espectro de ESR, solo se observan cambios sutiles en la región perpendicular; mientras en la región paralela el Modo II continúa siendo la especie predominante. Los cambios observados en los espectros de CD y ESR no corresponden con la formación del complejo  $\text{Cu}^{2+}\text{-}\beta\text{A}(1\text{-}16)$ , lo cual sugiere la formación de otro *complejo ternario*  $\alpha\text{-His111-Cu}^{2+}\text{-}\beta\text{A}(1\text{-}16)$ . En este trabajo nos referimos a esta nueva especie como *complejo ternario transitorio*  $\alpha\text{-His111-Cu}^{2+}\text{-}\beta\text{A}(1\text{-}16)$  para distinguirlo del *complejo ternario tipo Modo I*.

**Tabla 3.7. Parámetros de ESR de las diferentes muestras analizadas en la titulación del complejo  $\text{Cu}^{2+}\text{-PrP}(111\text{-}116)$  con  $\beta\text{A}(1\text{-}16)$ .**

Nombre de la muestra	Modo de coordinación identificado	$g_{\parallel}$	$A_{\parallel}$ ( $1 \times 10^{-4}\text{ cm}^{-1}$ )
$\text{Cu}^{2+}\text{-PrP}(111\text{-}116)$	Modo II	2.261	181
+ 1.0 equiv $\beta\text{A}(1\text{-}16)$	Complejo ternario tipo Modo I $\text{Cu}^{2+}\text{-}\beta\text{A}(1\text{-}16)$	2.254	186
	$\text{Cu}^{2+}\text{-PrP}(111\text{-}116)$ Modo I		
+ 2.0 equiv $\beta\text{A}(1\text{-}16)$	Complejo ternario tipo Modo I $\text{Cu}^{2+}\text{-}\beta\text{A}(1\text{-}16)$	2.254	186
	$\text{Cu}^{2+}\text{-PrP}(111\text{-}116)$ Modo I		
$\text{Cu}^{2+}\text{-}\beta\text{A}(1\text{-}16)$	Modo I	2.272	179
	Modo II	2.237	157

Tras la adición acumulada de 0.6 equivalentes de  $\beta\text{A}(1\text{-}16)$ , las bandas de LMCT asociadas a la formación del *complejo ternario transitorio*  $\alpha\text{-His111-Cu}^{2+}\text{-}\beta\text{A}(1\text{-}16)$  prácticamente desaparecen. Sin embargo, la banda *d-d* positiva observada en  $14\,555\text{ cm}^{-1}$  permanece sin cambios en intensidad. Curiosamente, esta banda es muy parecida a la del Modo I del complejo  $\text{Cu}^{2+}\text{-PrP}(111\text{-}116)$  y a la *especie ternaria*  $\alpha\text{-His111-Cu}^{2+}\text{-}\beta\text{A}(1\text{-}16)$  tipo Modo I, ambas favorecidas cuando la concentración de  $\text{Cu}^{2+}$  disponible es menos de la mitad de la de PrP. En el espectro de ESR se observan una mezcla de especies en la que se pueden identificar el las señales del complejo  $\text{Cu}^{2+}\text{-}\beta\text{A}(1\text{-}16)$ . Sin embargo, los espectros de CD y ESR no se pueden reproducir a partir de la suma de los espectros de  $\text{Cu}^{2+}\text{-}\beta\text{A}(1\text{-}16)$  y Modo II (ver figura 3.13, línea roja punteada). La mejor aproximación de los espectros de 0.6 equiv  $\beta\text{A}(1\text{-}16)$ , se obtiene al sumar 47% de espectro de  $\text{Cu}^{2+}\text{-}\beta\text{A}(1\text{-}16)$ , 18% de Modo I, 23% de ternario tipo Modo I y 12% del complejo ternario transitorio. Este análisis indica que al aumentar los equivalentes de  $\beta\text{A}(1\text{-}16)$ , ésta logra competir parcialmente por  $\text{Cu}^{2+}$  con el

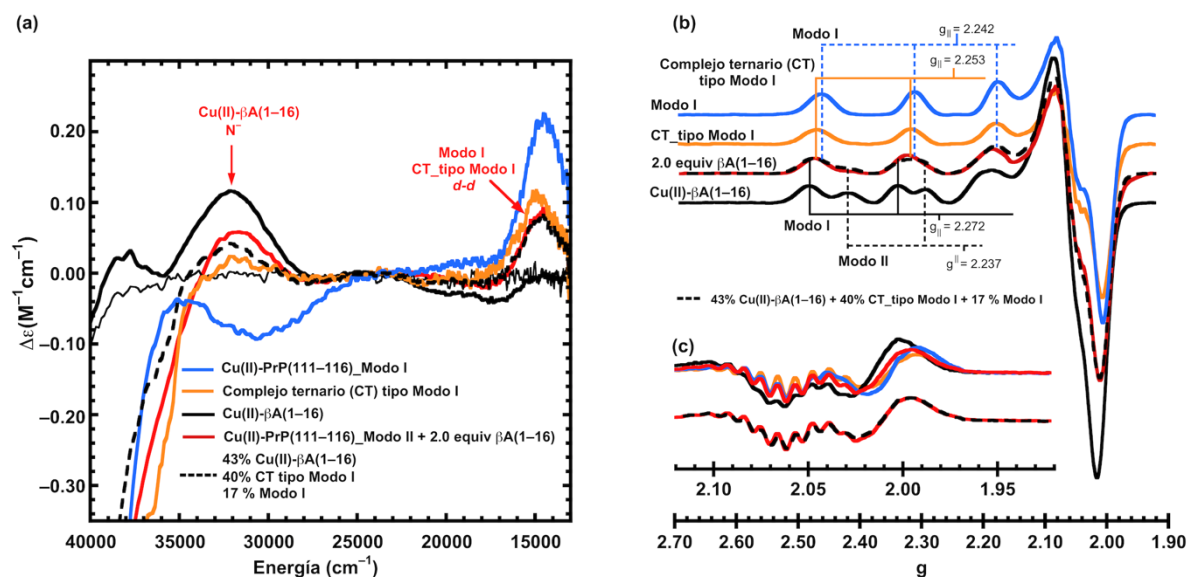
Modo II, sin embargo también se favorece la formación del Modo I y en consecuencia la formación del *complejo ternario tipo Modo I*.



**Figura 3.14. Titulación del Modo II del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ - $\alpha$ -His111 con 0.6 equiv de  $\beta\text{A(1-16)}$  produce una mezcla compleja de especies  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP y  $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A(1-16)}$ .** Los espectros de CD (a) y ESR (b) del Modo II se muestran de color azul oscuro. El espectro de CD del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A(1-16)}$  se agrega para comparación (línea continua negra). Las líneas rojas punteadas resultan de sumar los espectros de Modo II y  $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A(1-16)}$  en una proporción 25:75. Las líneas negras punteadas se obtienen de sumar los espectros de los complejos  $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A(1-16)}$ , Modo I y ternario tipo Modo I en una proporción 47:18:23 para el espectro de ESR y para el espectro de CD se agregó además 12% del complejo ternario transitorio.

Finalmente al agregar el segundo equivalente de  $\beta\text{A(1-16)}$ , las señales de CD asociadas al *complejo ternario transitorio* desaparecen, se observa claramente la banda de LMCT de amida desprotonada a  $\text{Cu}^{2+}$  correspondiente al complejo  $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A(1-16)}$ , así como las bandas asociadas a la mezcla de Modo I y el *complejo ternario tipo Modo I*. Por otra parte, en el espectro de ESR se distinguen al menos dos juegos de señales, uno de baja intensidad que podría corresponder al Modo II del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A(1-16)}$  y otro de mayor intensidad con un valor  $g_{\parallel} = 2.254$  y  $A_{\parallel} = 186 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ , en el cual podría co-existir la mezcla de Modo I de  $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A(1-16)}$ , Modo I de  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(111-116) y el *complejo ternario tipo Modo I*. Tanto el espectro de CD como el de ESR se pueden reproducir a partir de la suma de los espectros de  $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A(1-16)}$ , complejo ternario tipo Modo I y Modo I de  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(111-116) en una proporción 43:40:17 (Figura 3.15). Estos resultados indican que a bajas concentraciones relativas de  $\beta\text{A(1-16)}$  se favorece la formación de un complejo ternario transitorio, mientras que al incrementarse su concentración,  $\beta\text{A(1-16)}$  remueve parte del  $\text{Cu}^{2+}$  unido al Modo II

de  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(111–116), favorece la formación del Modo I de  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(111–116) y en consecuencia también favorece la formación del *complejo ternario tipo Modo I*.



**Figura 3.15. Titulación del Modo II del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ - $\alpha$ -His111 con 2.0 equiv de  $\beta\text{A(1-16)}$  produce una mezcla compleja de especies  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP y  $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A(1-16)}$ .** Los espectros de CD (a) y ESR (b) del Modo II se muestran de color azul oscuro. El espectro de CD del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A(1-16)}$  se agrega para comparación (línea continua negra). Las líneas rojas punteadas resultan de sumar los espectros de Modo II y  $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A(1-16)}$  en una proporción 25:75. Las líneas negras punteadas se obtienen de sumar los espectros de los complejos  $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A(1-16)}$ , Modo I y ternario tipo Modo I en una proporción 47:18:23 para el espectro de ESR y para el espectro de CD se agregó además 12% del el complejo ternario transitorio.

En conjunto los resultados de las titulaciones de los Modo I y II del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(111–116) indican que el efecto  $\beta\text{A(1-16)}$  en la coordinación de  $\text{Cu}^{2+}$  al sitio de la  $\alpha$ -His111 depende de la relación estequiométrica  $\text{Cu}^{2+}$ /PrP/ $\beta\text{A}$ . En condiciones donde la concentración de  $\text{Cu}^{2+}$  es menos de la mitad de la de PrP, el  $\beta\text{A(1-16)}$  no puede remover al  $\text{Cu}^{2+}$  de Modo I del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(111–116) y forma un *complejo ternario  $\alpha$ -His111- $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A(1-16)}$*  tipo Modo I. Por otra parte, cuando la concentración de  $\text{Cu}^{2+}$  es más de la mitad de la PrP y la concentración relativa de  $\beta\text{A(1-16)}$  es baja, se favorece la formación del *complejo ternario transitorio  $\alpha$ -His111- $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A(1-16)}$* . Sin embargo, a mayores concentraciones relativas de  $\beta\text{A(1-16)}$ , ya no se observa el *complejo ternario transitorio  $\alpha$ -His111- $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A(1-16)}$* , se remueve  $\sim 40\%$  del  $\text{Cu}^{2+}$  unido al Modo II, se favorece la formación del Modo I y en consecuencia la formación del *complejo ternario  $\alpha$ -His111- $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A(1-16)}$*  tipo Modo I.

Efecto de  $\beta A$  en la coordinación de  $Cu^{2+}$  al sitio de la  $\alpha$ -His111

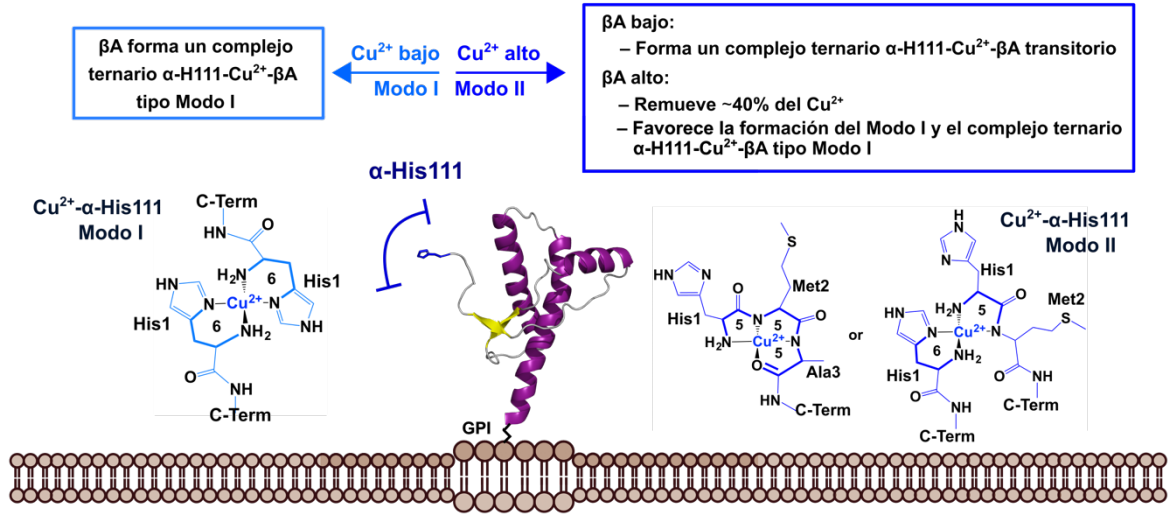


Figura 3.16. Efecto de  $\beta A(1-16)$  en la coordinación de  $Cu^{2+}$  al sitio  $\alpha$ -H111

*Análisis de las características espectroscópicas del complejo ternario  $\alpha$ -His111-Cu<sup>2+</sup>- $\beta$ A(1-16) tipo Modo I y propuesta de modo de coordinación*

A continuación se analizan con detalle las características espectroscópicas del *complejo ternario*  $\alpha$ -His111-Cu<sup>2+</sup>- $\beta$ A(1-16) tipo Modo I, a fin de identificar los posibles ligantes que participan en la esfera de coordinación. Esta especie ternaria comparte algunas características con el Modo I del complejo Cu<sup>2+</sup>-PrP(111-116). Ambos complejos tienen bandas *d-d* positivas a bajas energías (entre 14 000–15 000 cm<sup>-1</sup>) ver Figura 3.17a, lo cual indica un desdoblamiento energético similar de los orbitales *d* del metal y sugiere modos de coordinación similares. Por otra parte, en los espectros de ESR, tanto el Modo I como el complejo ternario tipo Modo I presentan valores  $g_{\parallel}$  entre 2.240 y 2.250 y  $A_{\parallel}$  alrededor de  $180 \times 10^{-4}$  cm<sup>-1</sup>, cuya interpolación en la correlación de Peisach y Blumberg sugiere un modo de coordinación rico en nitrógenos (Ver Figura 3.18). Además, en la región perpendicular de los espectros de ESR, estas dos especies presentan señales claramente asociadas al acoplamiento superhiperfino de tres o cuatro átomos de nitrógeno (ver Figura 3.18). En conjunto, tanto los espectros CD como los de ESR sugieren que la *especie ternaria*  $\alpha$ -His111-Cu<sup>2+</sup>- $\beta$ A(1-16) tipo Modo I tiene un modo de coordinación que involucra tres o cuatro átomos de nitrógenos y es similar al del Modo I del complejo Cu<sup>2+</sup>-PrP(111-116).

De acuerdo con estudios previos, el Modo I está formado por un átomo de Cu<sup>2+</sup> coordinado a dos moléculas de PrP(111-116), donde cada una de estas contribuye con un grupo NH<sub>2</sub> libre y un residuo de His, dando lugar a un modo de coordinación tipo histamina (ver Figura 3.17b).<sup>144</sup> Esta propuesta de modo de coordinación es consistente con lo observado en el espectro de CD del Modo I, donde la participación de grupos NH<sub>2</sub> en la esfera de coordinación queda evidenciada por la presencia de la banda negativa de LMCT de NH<sub>2</sub> a Cu<sup>2+</sup> en 40 000 cm<sup>-1</sup> y la participación de los residuos de His queda de manifiesto por la presencia de una banda negativa de LMCT de imidazol  $\pi_1$  a Cu<sup>2+</sup> observada en 30 606 cm<sup>-1</sup> (ver Figura 3.17a). El espectro de CD del *complejo ternario tipo Modo I* también presenta la banda negativa de LMCT de NH<sub>2</sub> a Cu<sup>2+</sup> en 40 000 cm<sup>-1</sup>, lo cual sugiere la participación de los grupos NH<sub>2</sub> provenientes de los péptidos PrP(111-116) y  $\beta$ A(1-16) (ver Figura 3.17a). Por otra parte, aunque el espectro de CD del *complejo ternario tipo Modo I* se caracteriza por la ausencia de la banda de LMCT de imidazol  $\pi_1$  a Cu<sup>2+</sup>, esto no descarta la participación de



residuos de His en la esfera de coordinación, ya que en el *complejo ternario* los residuos de His disponibles provienen de péptidos diferentes y por lo tanto podrían tener un efecto Cotton con signos opuestos, dando como resultado una señal cercana a cero. Lo anterior coincide con lo observado en los complejos individuales  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(111–116) y  $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A}(1-16)$ , donde la banda de LMCT de imidazol  $\pi$ 1 a  $\text{Cu}^{2+}$  del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(111–116) tiene un efecto Cotton negativo, mientras la misma banda en el complejo  $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A}(1-16)$  es positiva. En general, las señales observadas en el espectro de CD del complejo  $\alpha$ -His111- $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A}(1-16)$  tipo Modo I son congruentes con un modo de coordinación tipo “Histamina”, donde participan dos grupos  $\text{NH}_2$  y dos residuos de His provenientes de PrP(111–116) y  $\beta\text{A}(1-16)$  (ver Figura 3.17c). Además, la formación de este *complejo ternario*  $\alpha$ -His111- $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A}(1-16)$  podría estar favorecida por la participación del Asp-1 del péptido  $\beta\text{A}(1-16)$  como ligante axial.

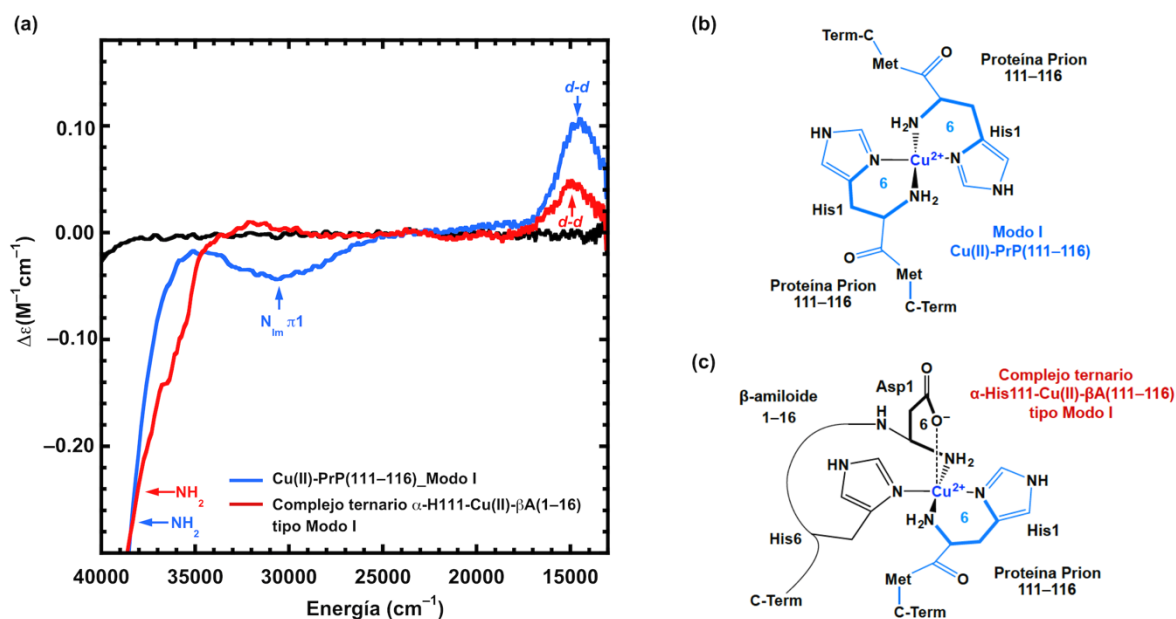


Figura 3.17. Comparación de los espectros de CD de Modo I del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(111–116) y el complejo ternario  $\alpha$ -H111- $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A}(1-16)$  (a) y sus propuestas de los modos de coordinación (b-c).

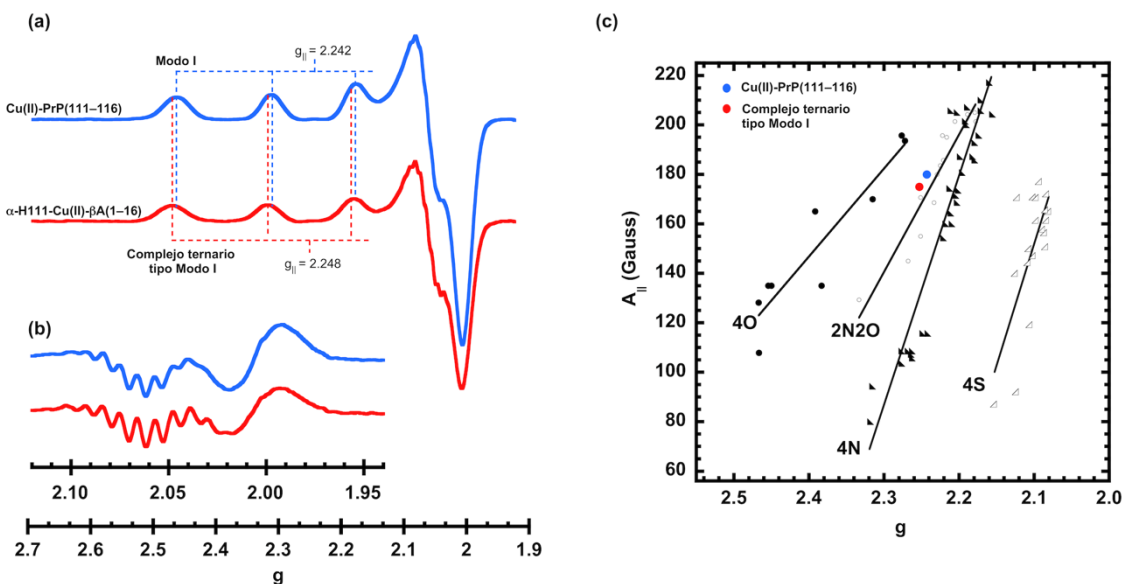


Figura 3.18. Comparación del Modo I del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(111-116) y el complejo ternario  $\alpha$ -H111- $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta$ A(1-16): espectros de ESR (a), su derivada (b) y la correlación de Peisach and Blumberg (c).

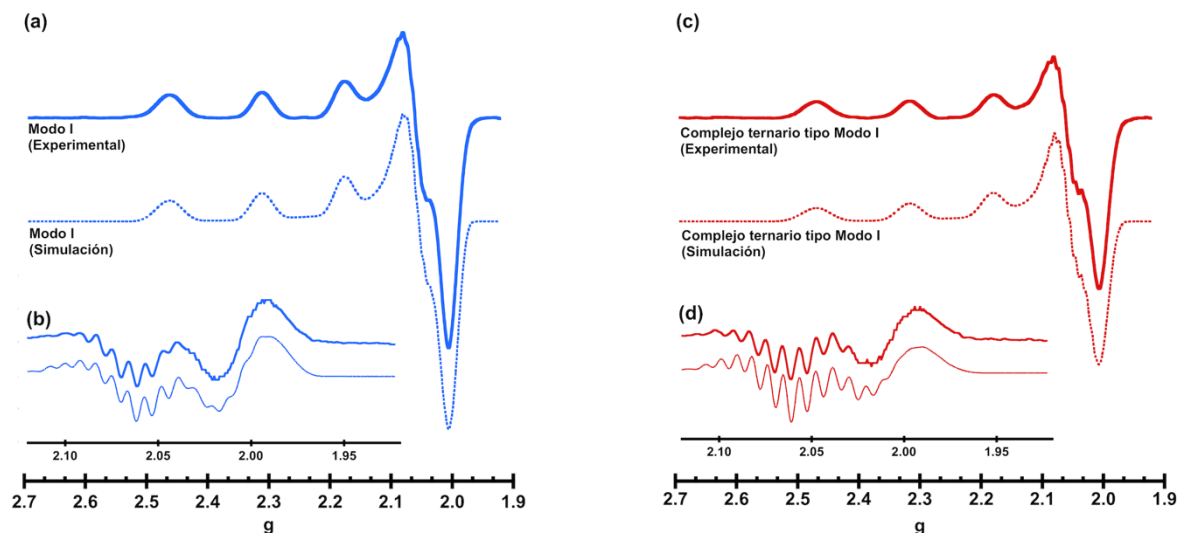


Figura 3.19. Simulaciones de los espectros de ESR del Modo I del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ - $\alpha$ -H111 (a) y el complejo ternario tipo Modo I (c), así como su derivada (b y d).

Los modos de coordinación tipo histamina propuestos para el Modo I del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(111-116) y para la especie ternaria  $\alpha$ -His111- $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta$ A(1-16) tipo Modo I también son soportados por los resultados de la simulación de los espectros de ESR (ver Figura 3.19). En estas simulaciones del Modo I se consideró un átomo de  $\text{Cu}^{2+}$  coordinado por dos pares de nitrógenos magnéticamente equivalentes: un par con  $NA_{\text{iso}} = 45$  MHz asignado a dos ligantes de His en orientación *trans*, y otro con un  $NA_{\text{iso}} = 28$  MHz correspondiente a dos grupos de

NH<sub>2</sub> en orientación *trans*. Estos parámetros de ESR son consistentes con la participación de dos grupos NH<sub>2</sub> idénticos y dos residuos de His de las mismas características provenientes de dos moléculas de PrP(111–116). Por otra parte, el espectro de ESR del *complejo ternario*  $\alpha$ -His111-Cu<sup>2+</sup>- $\beta$ A(1–16) *tipo Modo I* se simuló considerando un átomo de Cu<sup>2+</sup> coordinado por cuatro nitrógenos magnéticamente diferentes: dos de ellos con un N<sub>A<sub>iso</sub></sub> de 40 y 43 MHz correspondientes a dos ligantes de His en orientación *trans* y otros dos con N<sub>A<sub>iso</sub></sub> de 34 y 37 MHz asignados a dos grupos NH<sub>2</sub>. Este acoplamiento de nitrógeno menos simétrico es congruente con la participación de dos péptidos diferentes en el modo tipo histamina y reproduce las diferencias sutiles en los espectros de ESR del Modo I y el *complejo ternario tipo Modo I* (ver Figura 3.19). En conclusión, el análisis detallado de los espectros de CD y ESR del Modo I y el *complejo ternario tipo Modo I* soporta las propuestas de modos de coordinación mostradas en la Figura 3.17.

**Tabla 3.8. Parámetros de ESR utilizados en las simulaciones del Modo I y el complejo ternario tipo Modo I.**

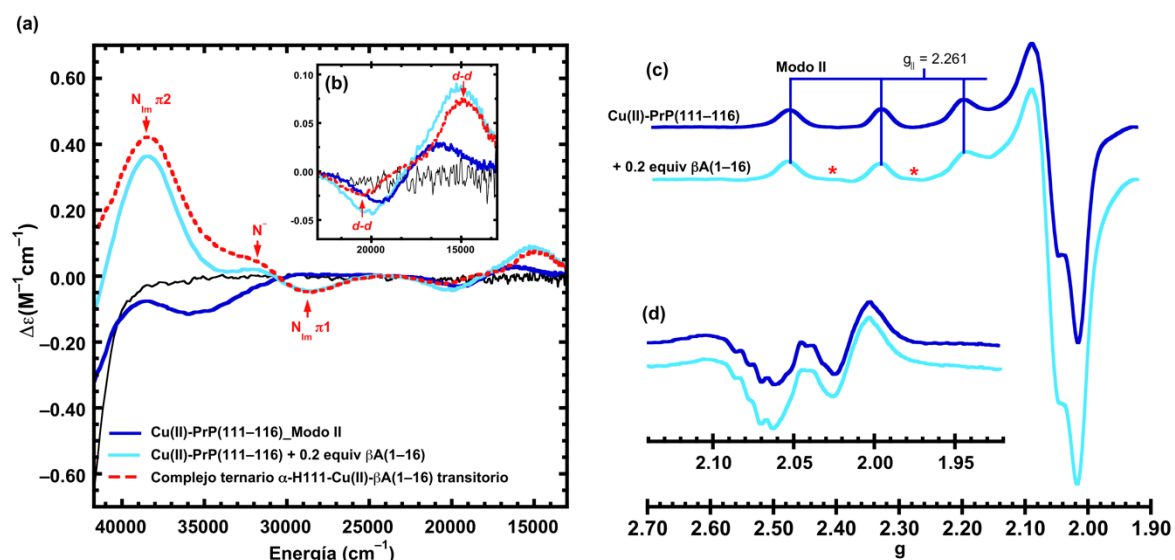
	<b>Modo I</b>	<b>Complejo ternario tipo Modo I</b>
gx	2.044	2.044
gy	2.068	2.068
gz	2.242	2.248
Ax	27	20
Ay	27	27
Az	551	553
N <sub>(Im)</sub>		
Ax	45	45
Ay	44.5	42
Az	44.5	42
A <sub>iso</sub>	45	43
N <sub>(Im)</sub>		
Ax	45	41
Ay	44.5	40
Az	44.5	40
A <sub>iso</sub>	45	40
N(NH <sub>2</sub> )		
Ax	25	37
Ay	35	38
Az	25	37
A <sub>iso</sub>	28	37
N(NH <sub>2</sub> )		
Ax	25	33
Ay	35	35
Az	25	33
A <sub>iso</sub>	28	34

*Análisis de las características espectroscópicas del complejo ternario transitorio  $\alpha$ -H111- $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A}(1-16)$  y propuesta de modo de coordinación*

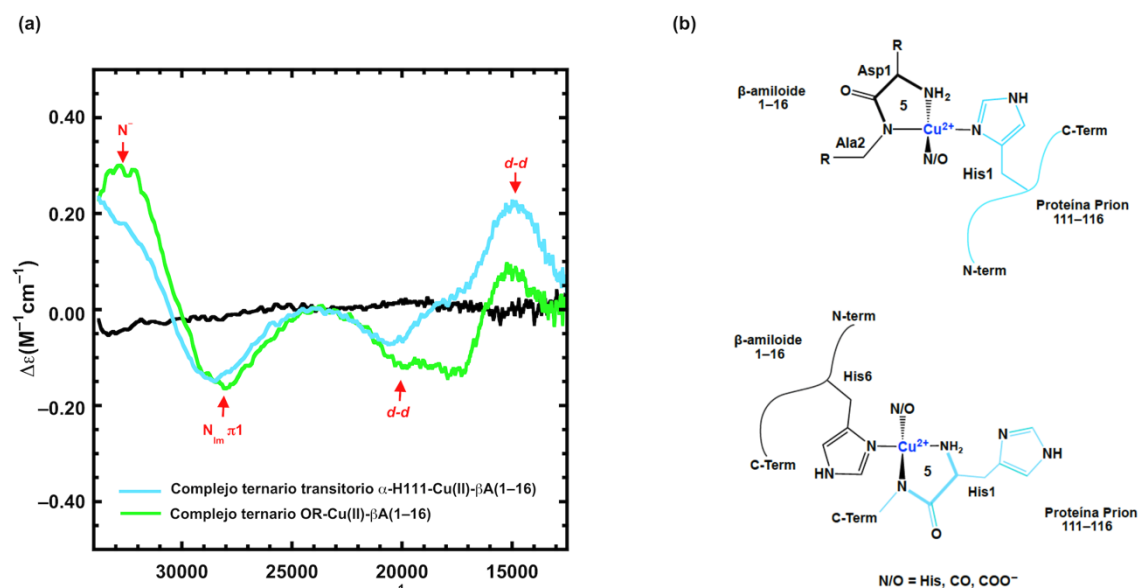
A continuación se analizan con detalle las características espectroscópicas del *complejo ternario transitorio*  $\alpha$ -H111- $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A}(1-16)$ , a fin de identificar los posibles ligantes que participan en la esfera de coordinación. Esta nueva especie se observó al titular el Modo II del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(111-116) con 0.2 equivalentes de  $\beta\text{A}(1-16)$ . Curiosamente, la adición de mayores cantidades de  $\beta\text{A}(1-16)$  no promueve la formación de esta especie ternaria, de forma similar a lo observado con el *complejo ternario*  $\text{OR}_4$ - $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A}(1-16)$ . La formación del *complejo ternario transitorio*  $\alpha$ -H111- $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A}(1-16)$  provoca cambios drásticos en el espectro de CD, pero no en el de ESR (ver Figura 3.20). Esto se puede atribuir a que la intensidad de las señales de ESR únicamente depende de la concentración de los diferentes complejos de  $\text{Cu}^{2+}$ , por lo que el *complejo ternario transitorio* al encontrarse en una baja concentración relativa no exhibe señales de ESR lo suficiente intensas para distinguirlas del Modo II. Por el contrario, la intensidad de la señal de CD depende tanto de la concentración del complejo metal-péptido como de la quiralidad de éste, lo cual sugiere que el *complejo ternario transitorio* a pesar de su baja abundancia exhibe señales intensas de CD debido a su quiralidad.

El espectro de CD del *complejo ternario transitorio*  $\alpha$ -H111- $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A}(1-16)$  se obtuvo al sustraer las señales de CD asociadas a la cantidad residual de Modo II del espectro de la muestra de 0.2 equivalentes de  $\beta\text{A}(1-16)$  (ver Figura 3.20). Las señales de CD resultantes corresponden al mismo tipo de bandas asignadas al *complejo ternario*  $\text{OR}_4$ - $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A}(1-16)$ : una banda de LMCT de amida desprotonada a  $\text{Cu}^{2+}$  en  $32\,600\text{ cm}^{-1}$  y una banda positiva de imidazol  $\pi$ 1 a  $\text{Cu}^{2+}$  en  $28\,600\text{ cm}^{-1}$  (ver Figura 3.21a). Por lo anterior, se propone para el *complejo ternario transitorio*  $\alpha$ -H111- $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A}(1-16)$  un modo de coordinación que implica residuos un residuo de His, una amida desprotonada y un grupo  $\text{NH}_2$ , donde los residuos de His como la amida desprotonada pueden provenir de  $\beta\text{A}(1-16)$  y PrP(111-116). En este caso, a diferencia de lo observado en la región OR, las amidas desprotonadas disponibles en ambos péptidos están rodeadas de los residuos cuyas cadenas laterales son voluminosas, por lo que

el efecto Cotton no nos permite discernir el origen de la amida desprotonada que participa en la esfera de coordinación, las dos propuestas se muestran en la Figura 3.21b.



**Figura 3.20.** La titulación del Modo II del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(111-116) con 0.2 equiv de  $\beta\text{A}(1-16)$  forma un complejo ternario transitorio. El espectro del Modo II se muestra de color azul oscuro y el espectro que resulta de la adición de 0.2 equiv de  $\beta\text{A}(1-16)$  se muestra de color azul celeste. El espectro de color rojo se obtiene de restar las señales correspondientes al Modo II remanente del espectro de azul celeste. Las flechas de color rojo indican las señales asignadas al complejo ternario transitorio.

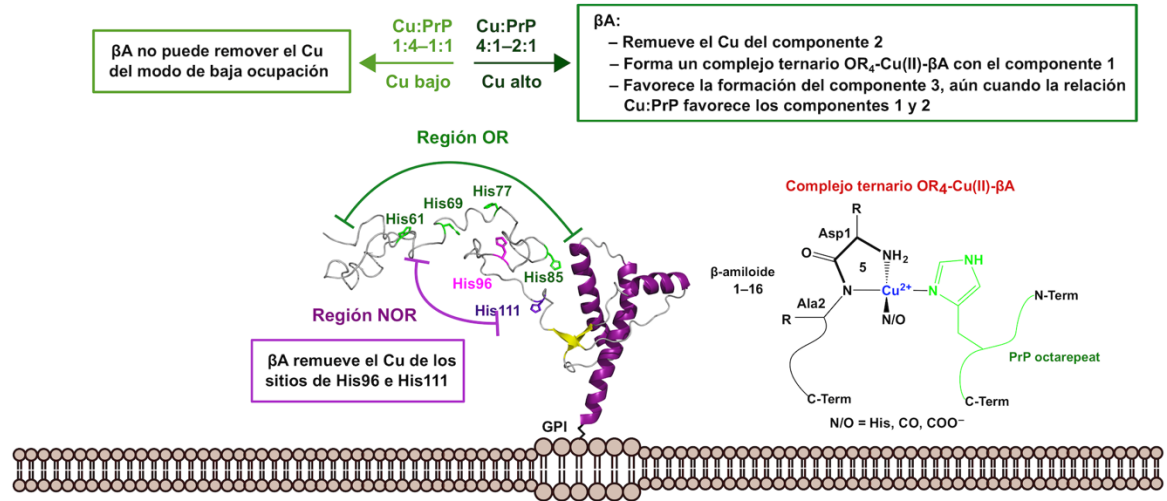


**Figura 3.21.** Comparación de los complejos ternarios  $\text{OR}_4\text{-Cu}^{2+}\text{-}\beta\text{A}(1-16)$  y el complejo ternario transitorio  $\alpha\text{-H111-Cu}^{2+}\text{-}\beta\text{A}(1-16)$  en (a) y propuestas de modo de coordinación para el complejo ternario transitorio  $\alpha\text{-H111-Cu}^{2+}\text{-}\beta\text{A}(1-16)$  en (b).

En general, los resultados presentados nos permiten concluir que el efecto del péptido  $\beta A(1-16)$  en la coordinación de  $Cu^{2+}$  a la PrP (**sección 3.1**) y al fragmento C1 resultado del corte proteolítico  $\alpha$  de la PrP (**sección 3.2**) es pleomorfo y sitio-específico. En la región OR el efecto de  $\beta A(1-16)$  depende de la concentración relativa  $Cu^{2+}/PrP$ , cuando la concentración de Cu es menor que la de PrP,  $\beta A(1-16)$  no puede remover de manera efectiva el  $Cu^{2+}$  del componente 3 o modo de baja ocupación (ver Figura 3.22a). En cambio, cuando la concentración relativa de  $Cu^{2+}/PrP$  favorece los modos de alta ocupación,  $\beta A(1-16)$  forma un *complejo ternario*  $OR_4-Cu^{2+}-\beta A(1-16)$  con el componente 1, remueve el  $Cu^{2+}$  del componente 2 y favorece la formación del componente 3, aún cuando éste no está favorecido por la relación estequiométrica  $Cu^{2+}/PrP$  (ver Figura 3.22b). Por el contrario,  $\beta A(1-16)$  remueve completamente el  $Cu^{2+}$  de los sitios de His96 e His111 sin evidencia de formación de complejos (ver Figura 3.22c).

Finalmente, el efecto de  $\beta A(1-16)$  en la unión a  $Cu^{2+}$  en el sitio de la  $\alpha$ -H111 depende no solo de concentración relativa  $Cu^{2+}/PrP$ , sino también de la cantidad de  $\beta A$ . En una relación  $Cu^{2+}/PrP$  que favorece el Modo I del complejo  $Cu^{2+}-PrP(111-116)$ ,  $\beta A(1-16)$  no puede remover al  $Cu^{2+}$ , pero forma un *complejo ternario*  $\alpha$ -H111- $Cu^{2+}$ - $\beta A(1-16)$  (ver Figura 3.22d). Sin embargo, cuando la relación estequiométrica  $Cu^{2+}/PrP$  favorece el Modo II se observan diferentes efectos dependiendo de la concentración relativa de  $\beta A$ , con cantidades de  $\beta A(1-16)$  bajas se forma un *complejo ternario transitorio*  $\alpha$ -H111- $Cu^{2+}$ - $\beta A(1-16)$ ; mientras que, al agregar más  $\beta A(1-16)$ , ésta remueve el  $Cu^{2+}$  del Modo II sin evidencia de formación del *complejo ternario transitorio*  $\alpha$ -H111- $Cu^{2+}$ - $\beta A(1-16)$ , al mismo tiempo se favorece la formación del Modo I y en consecuencia del *complejo ternario tipo Modo I* (ver Figura 3.22e)

(a) Efecto de  $\beta$ A en la coordinación de Cu(II) a la Proteína Prion



(b) Efecto de  $\beta$ A en la coordinación de Cu(II) al sitio de la  $\alpha$ -His111 del fragmento C1 de la PrP

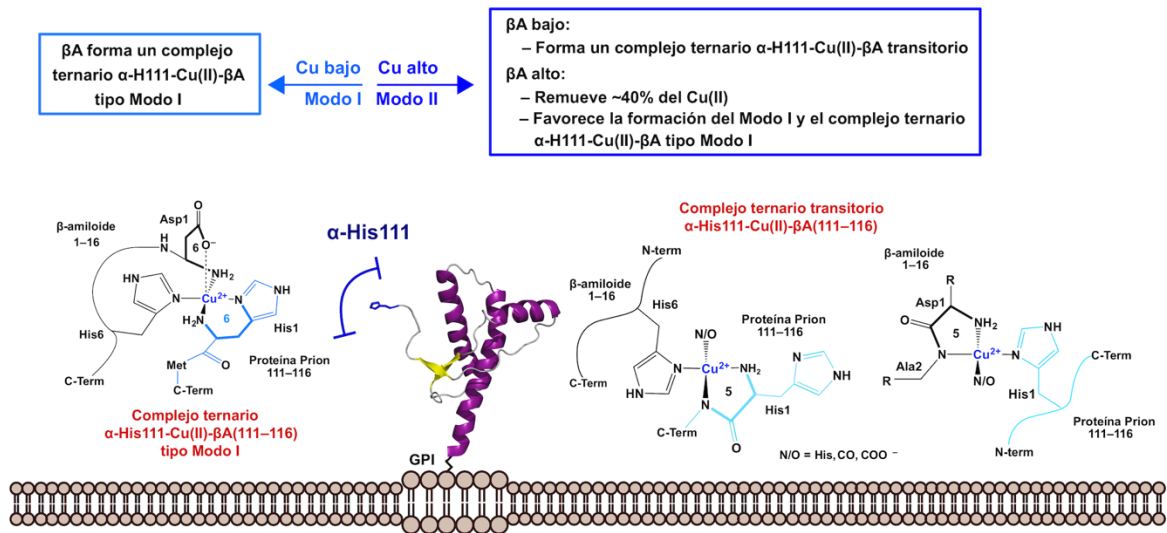
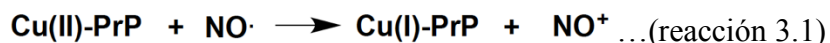


Figura 3.22. Efecto de  $\beta$ A(1-16) en la coordinación de Cu<sup>2+</sup> a la PrP (a) y el fragmento PrPC1 resultado del corte proteolítico  $\alpha$  (b).

### 3.3. Reactividad de óxido nítrico con los complejos Cu<sup>2+</sup>-PrP formados en la región del *non-octarepeat* de la proteína prion

Como se describió en la sección 1.8 (Capítulo I: Antecedentes), en estudios previos se evaluó la reactividad de la región *octarepeat* (componentes 1 y 2) frente al óxido nítrico (NO•). En este trabajo nos enfocamos en la evaluación de la reactividad de los complejos Cu<sup>2+</sup>-His96 y Cu<sup>2+</sup>-His111 con NO•, a fin de determinar su capacidad para catalizar la formación del ión nitrosonio (NO<sup>+</sup>) a expensas de la reducción de Cu<sup>2+</sup> a Cu<sup>+</sup> (ver reacción 3.1) y compararla con la previamente reportada para región OR. Para esto, se utilizaron como fuente de NO• los mismos compuestos utilizados en estudios previos: NOC-12 (donador lento de NO•) y NOC-9 (donador rápido de NO•). Estos compuestos tienen de un grupo ONNO estabilizado por una diamina, por lo que cada molécula de NOC-12 o NOC-9 libera dos moléculas de NO• y una molécula de la diamina correspondiente. Dietilendiamina (DEDA) en el caso de NOC-12 y dimetilhexadiamina (DMHDA) en el caso de NOC-9 (ver Figura 3.23 a-b). Desafortunadamente las diaminas poseen átomos de nitrógeno con pares de electrones disponibles para coordinar Cu<sup>2+</sup> (ver Figura 3.23 b-c). Por esta razón, además de evaluar la cinética de reducción de los complejos Cu<sup>2+</sup>-PrP(92–99) (B) y Cu<sup>2+</sup>-PrP(106–115) (C-D) en presencia de los donadores de NO•, también se evaluó si NOC-12 y NOC-9 generan especies capaces de coordinar Cu<sup>2+</sup> en las condiciones de trabajo (A).



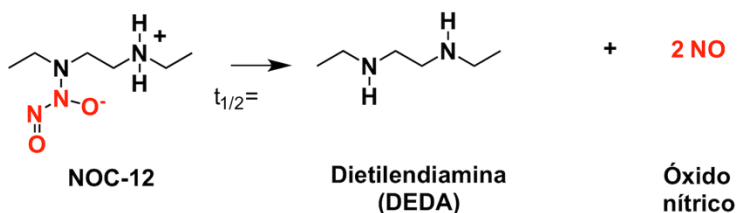
#### 3.3.1. Complejos de Cu<sup>2+</sup> formados a partir de NOC-12 y NOC-9 bajo las condiciones de trabajo.

La formación de complejos de Cu<sup>2+</sup> durante la liberación de NO• se evaluó utilizando una solución de Cu<sup>2+</sup>, a la cual se le agregó una alícuota de NOC-12/ NOC-9 en condiciones anaerobias. Como se observa en la Figura 3.24, los espectros de absorción electrónica de ambas soluciones, NOC-12 y NOC-9, presentan bandas *d-d* entre 500–900 nm. En el caso de NOC-12, se observa una banda *d-d* en 643 nm, cuya la intensidad se incrementa en función del tiempo (ver Figura 3.24a), lo cual es congruente con la formación del complejo Cu<sup>2+</sup>-DEDA durante la liberación de NO•. Por otra parte, en el espectro de absorción electrónica del NOC-9, se observan al menos tres bandas *d-d*, cuyos máximos de absorción se ubican en

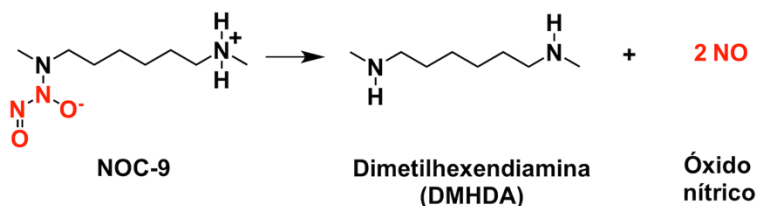


708, 763 y 873 nm, las cuales podrían corresponder a diferentes arreglos del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -DMHDA (ver Figura 3.24b). En general, estos resultados indican que al evaluar la reactividad de los complejos  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP en presencia de NOC-12 y NOC-9 es necesario considerar la posible formación de los complejos  $\text{Cu}^{2+}$ -DEDA y  $\text{Cu}^{2+}$ -DMHDA.

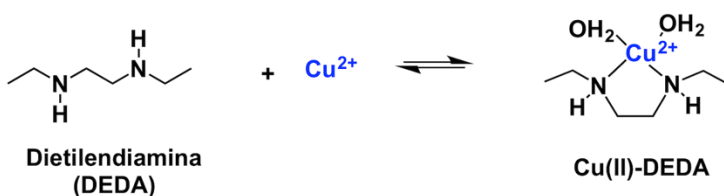
(a) Liberación de óxido nítrico en solución a partir de NOC-12



(b) Liberación de óxido nítrico en solución a partir de NOC-9



(c) Posible coordinación de  $\text{Cu(II)}$  por los derivados de NOC-12



(d) Posible coordinación de  $\text{Cu(II)}$  por los derivados de NOC-9

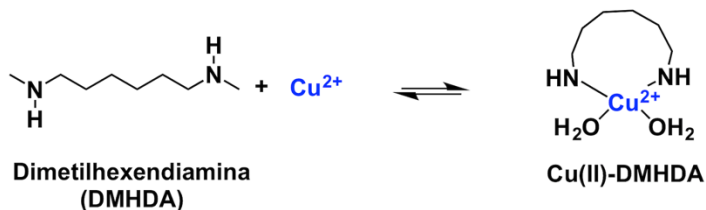


Figura 3.23 Liberación de óxido nítrico a partir de NOC-12 y NOC-9 en solución (a-b) y posibles complejos de  $\text{Cu}^{2+}$  formados con las diaminas derivadas de NOC-12 y NOC-9 (c-d).

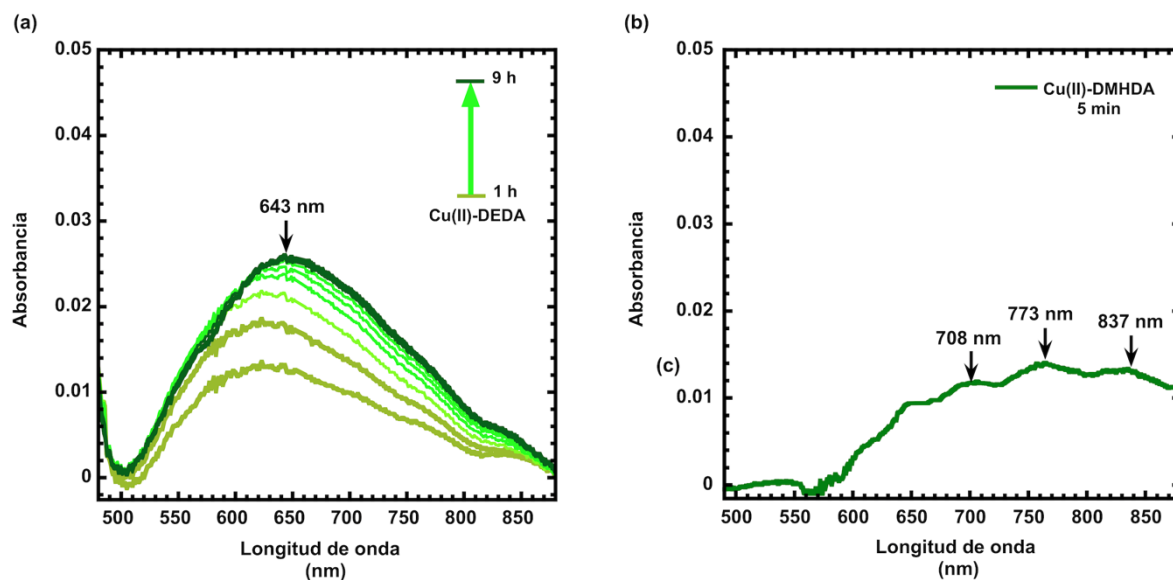
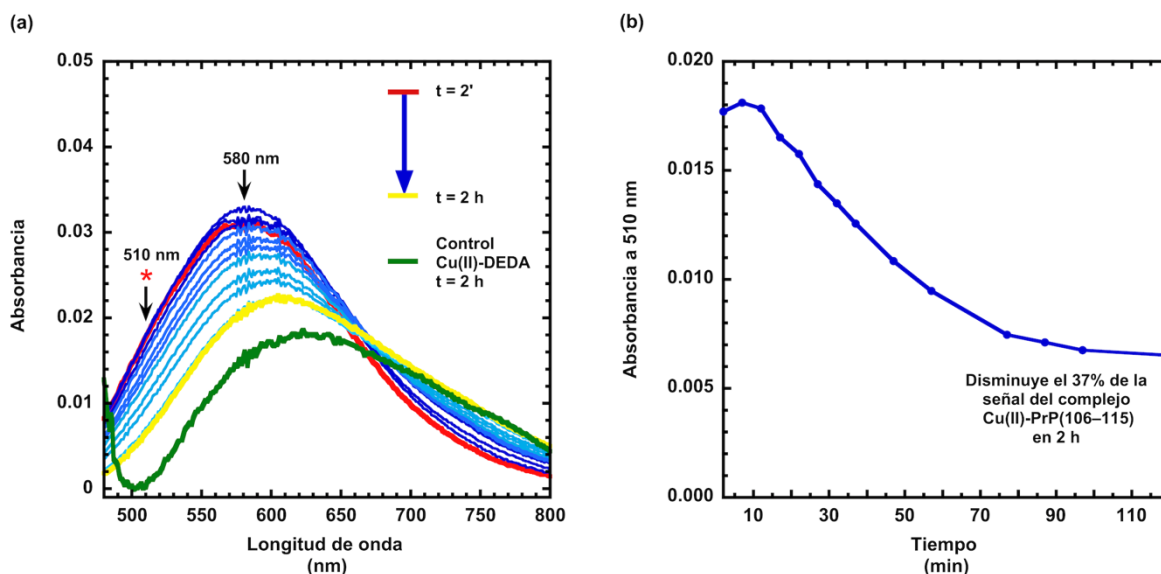


Figura 3.24. Espectros de absorción electrónica de los complejos de  $\text{Cu}^{2+}$  formados durante la liberación de óxido nítrico a partir de NOC-12 (a) y NOC-9 (b).

### 3.3.2. Reactividad del complejo $\text{Cu}^{2+}$ -His96 frente al óxido nítrico

La capacidad del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -His96 para reducir  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$  en presencia de  $\text{NO}^\bullet$  se evaluó a partir de los cambios observados en el espectro de absorción electrónica durante la reacción del  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(92–99) con 1.5 equivalentes de NOC-12 en condiciones anaeróbicas. La primera lectura del espectro de absorción electrónica después de la adición de NOC-12 se muestra de color rojo en la Figura 3.25a. En ésta se puede observar una banda *d-d* con un máximo de absorción en 580 nm, en la cual se traslapan las bandas *d-d* de los Modos I y II del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(92–99). Durante las primeras dos horas de reacción, la intensidad de la banda *d-d* disminuye de forma gradual (Figura 3.25 espectros de color azul y amarillo); sin embargo, al mismo tiempo se observa un ensanchamiento de dicha banda hacia mayores longitudes de onda, lo cual desplaza el máximo de absorción a 620 nm y sugieren la formación del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -DEDA. Considerando que la relación estequiométrica  $\text{Cu}^{2+}$ :PrP es 1:1, la formación del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -DEDA indica que la dietilendiamina (DEDA) puede remover al  $\text{Cu}^{2+}$  del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(92–99). A fin de discernir entre los cambios del espectro de absorción electrónica asociados a la disminución del concentración del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(92–99) y aquellos debidos a la formación del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -DEDA, se graficó la absorbancia a 510 nm en función del tiempo (Figura 3.25b), ya que a esta longitud de onda la absorción del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -DEDA es igual a cero. En la Figura 3.25b

se observa como durante las primeras dos horas de reacción disminuye la intensidad de la señal a 510 nm en un 37%. Desafortunadamente, en este caso en particular, la disminución de la intensidad de la banda *d-d* podría estar asociada tanto a la reducción de  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$  como a la formación del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -DEDA. Por lo cual, no podemos precisar la cantidad del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(92-99) que se redujo a  $\text{Cu}^+$ -PrP(92-99) en presencia de  $\text{NO}^{\bullet}$ .



**Figura 3.25.** Espectros de absorción electrónica (a) y cambios en la absorbancia a 510 nm en función del tiempo (b) durante la reacción del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(92-99) con NOC-12 en condiciones anaeróbicas. En (a) se agrega el espectro del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -DEDA como control (línea color verde).

Después de dos horas de reacción la intensidad de la banda *d-d* se incrementa de forma progresiva (ver Figura 3.26a), esto se puede asociar a la re-oxidación del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(92-99). Es importante destacar, que al iniciar la lectura de los espectros de absorción electrónica se suspendió el flujo de nitrógeno gas, por lo que resulta inevitable la difusión de pequeñas cantidades de oxígeno a través de la celda conforme pasa el tiempo, lo cual en este caso da como resultado la re-oxidación del complejo  $\text{Cu}^+$ -PrP(92-99). Después de 9 h, se recupera aproximadamente el 23% de la señal a 510 nm, este resultado sugiere que al menos 23% del complejo  $\text{Cu}^{2+}$  unido al péptido PrP(92-99) inicialmente se redujo a  $\text{Cu}^+$  y posteriormente se re-oxidó. En general podemos concluir que el sitio de His96 es capaz de reducir  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$  en presencia de óxido nítrico.

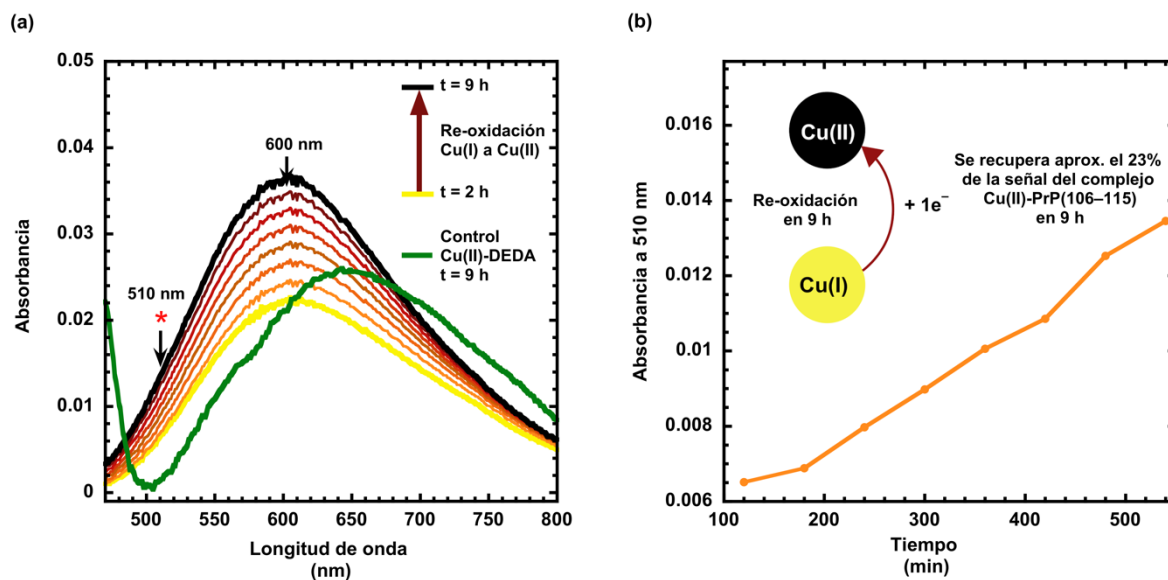


Figura 3.26. Espectros de absorción electrónica (a) y cambios en la absorbancia a 510 nm (b) durante la reacción del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(92-99) con NOC-12 (de 2 a 9 horas de reacción). En (a) se agrega el espectro del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -DEDA como control (línea color verde).

### 3.3.3. Reactividad del complejo $\text{Cu}^{2+}$ -His111 frente al óxido nítrico.

La capacidad del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -His111 para reducir  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$  en presencia de  $\text{NO}^\bullet$  se evaluó a partir de los cambios observados en el espectro de absorción electrónica durante la reacción del  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(106-115) con 1.5 equivalentes de NOC-12 en condiciones anaerobias. En la Figura 3.26a se muestra de color rojo la primera lectura del espectro de absorción electrónica después de la adición de NOC-12, donde claramente se observa una banda *d-d* con un máximo a 587 nm, la cual está asociada a la mezcla de los Modos I y II del complejo PrP(106-115). Durante las primeras 3 h de reacción, se aprecia la disminución continua de la intensidad de la banda *d-d*. A diferencia de lo observado con el modelo del sitio de His96, no se aprecian cambios asociados a la formación del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -DEDA. Esto sugiere que la dietildiamina producida a partir del NOC-12 no remueve de forma significativa el  $\text{Cu}^{2+}$  unido al péptido PrP(106-115) y es consistente con los reportes previos que indican que el sitio de His111 es más afín por  $\text{Cu}^{2+}$  en comparación con el sitio de His96. Durante las primeras 2 h de reacción, la intensidad de la banda *d-d* del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(106-115) disminuye entre 80% y 90%, indicando que la mayor parte del  $\text{Cu}^{2+}$  unido al péptido PrP(106-115) se redujo a  $\text{Cu}^+$ . Después de la tercera hora de reacción, se observa un incremento en la intensidad de la banda *d-d* asociada al complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(106-115), evidenciando la re-oxidación de  $\text{Cu}^+$  unido al péptido PrP(106-115). En general estos

resultados indican que el sitio de His111 puede reducir  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$  de forma reversible en presencia de óxido nítrico y con mayor eficiencia en comparación con el sitio de His96.

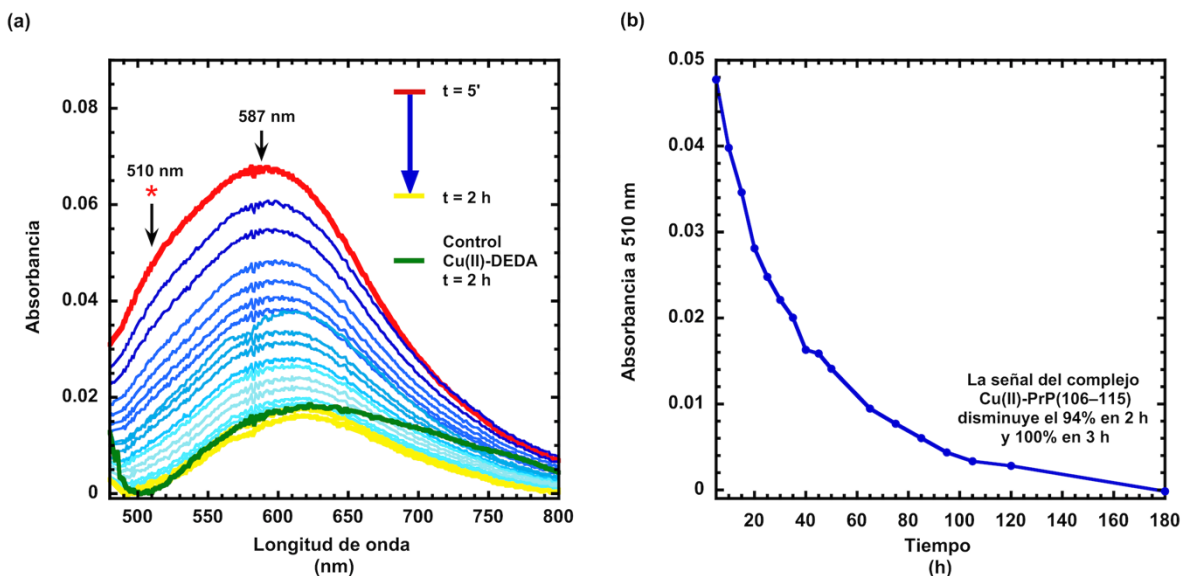


Figura 3.27. Espectros de absorción electrónica (a) y cambios en la absorbancia a 510 y 587 nm en función del tiempo (b) durante la reacción del complejo  $\text{Cu}^{2+}\text{-PrP(106-115)}$  con NOC-12 en condiciones anaeróbicas. En (a) se agrega el espectro del complejo  $\text{Cu}^{2+}\text{-DEDA}$  como control (línea color verde).

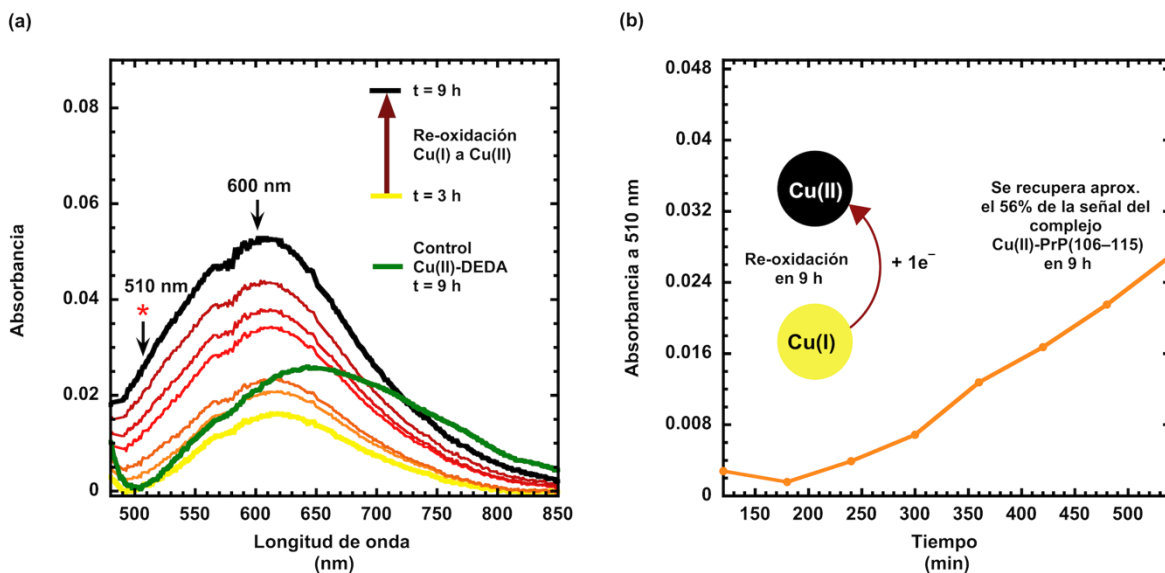
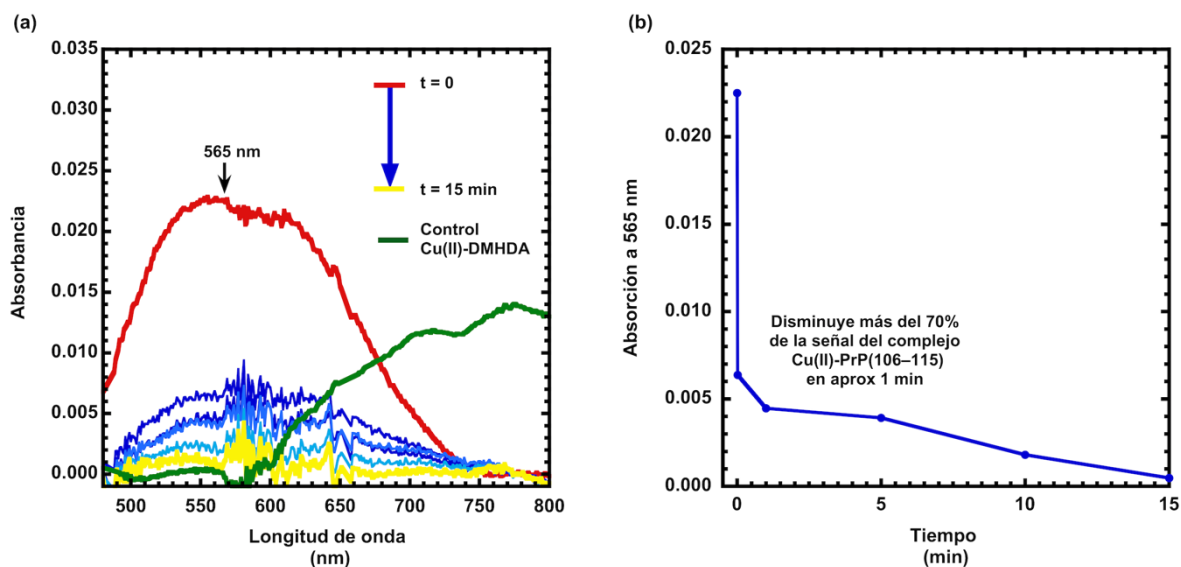


Figura 3.28. Espectros de absorción electrónica (a) y cambios en la absorbancia a 510 nm (b) durante la reacción del complejo  $\text{Cu}^{2+}\text{-PrP(106-115)}$  con NOC-12 (de 3 a 9 horas de reacción). En (a) se agrega el espectro del complejo  $\text{Cu}^{2+}\text{-DEDA}$  como control (línea color verde).

Aunque el NOC-12 fue particularmente útil para comparar la reactividad de los sitios His96 e His111, la liberación lenta de  $\text{NO}^\bullet$  a partir de este compuesto ( $t_{1/2} = 4.5 \text{ h}$ ) es una limitante para visualizar la rapidez de la reacción entre los complejos  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP y  $\text{NO}^\bullet$ . Por lo anterior, se evaluó la capacidad del sitio de His111 para reducir  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$  en presencia de un donador rápido de  $\text{NO}^\bullet$  (NOC-9), cuyo tiempo de vida media es de aproximadamente 3 min. La cinética de reducción del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(106–115) en presencia de NOC-9 se muestra en la Figura 3.29. En ésta se observa claramente como la banda  $d-d$  asociada al complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(106–115) prácticamente desaparece en menos de aproximadamente 1 min, lo cual sugiere que esta reacción ocurre en el orden de segundos o fracciones de segundo. Es importante resaltar que para obtener más información de la cinética de esta reacción se requiere el uso de un sistema automatizado de mezclado (*stopped-flow*) y una fuente directa de  $\text{NO}^\bullet$ .

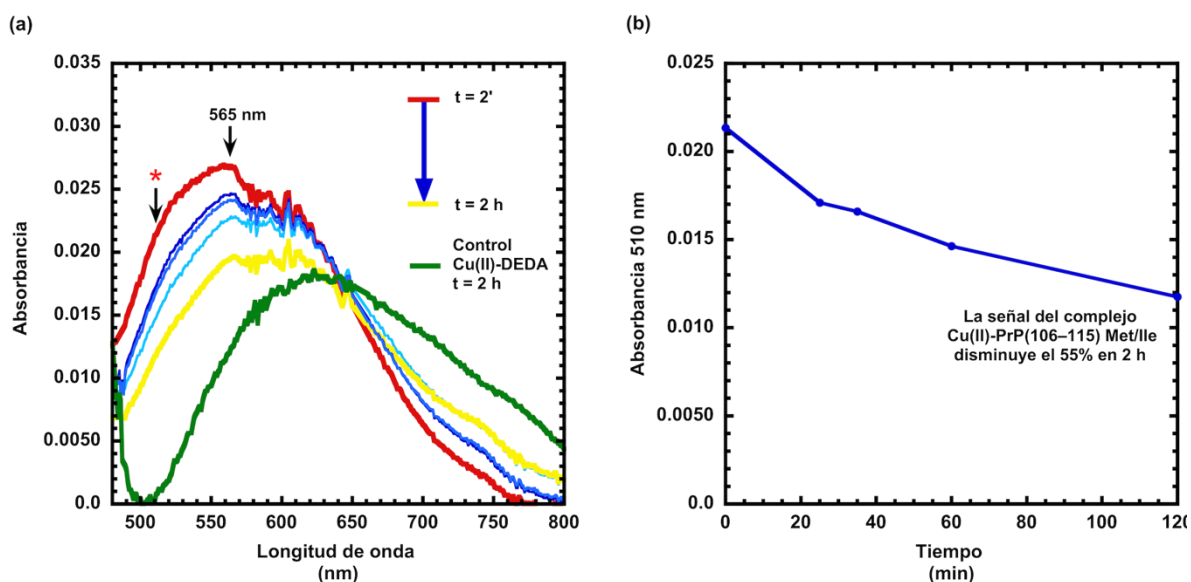


**Figura 3.29.** Espectros de absorción electrónica (a) y cambios en la absorbancia a 565 nm en función del tiempo (b), durante la reacción del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(106–115) con NOC-12, en condiciones anaeróbicas. En (a) se agrega como control el espectro del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -DMHDA (línea color verde).

*Papel de las metioninas 109 y 112 en la capacidad del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(106–115) para reducir  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$  en presencia de óxido nítrico.*

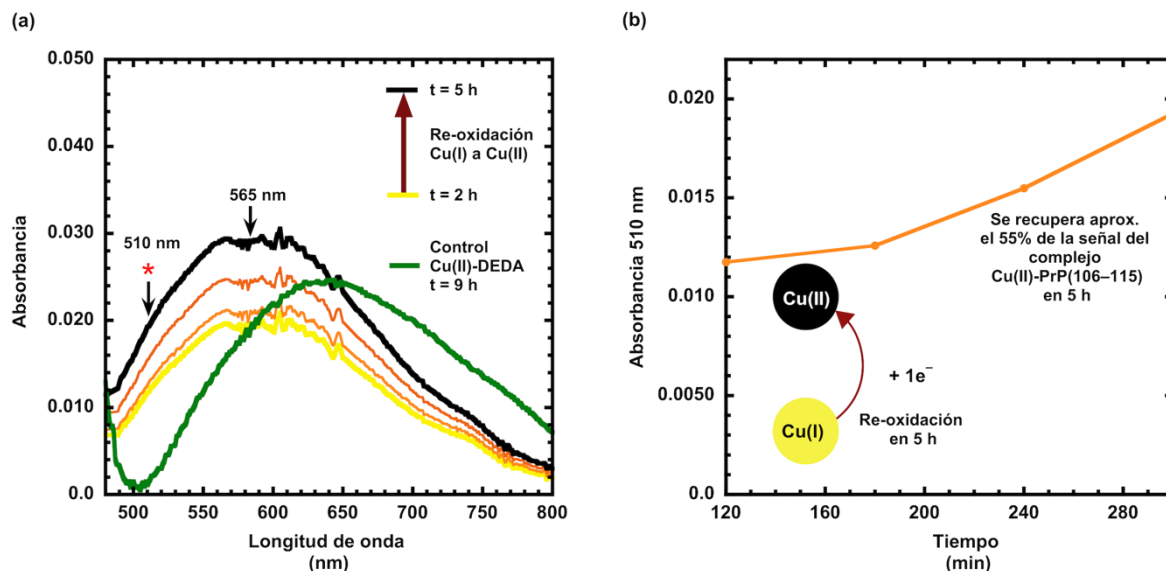
Las diferencias en la eficiencia de los sitios de His96 e His111 para reducir  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$  en presencia de  $\text{NO}^\bullet$  podrían explicarse por la presencia de dos residuos de Met alrededor del

sitio de His111, los cuales no están presentes en el sitio de His96. Estos residuos de Met participan en la coordinación de  $\text{Cu}^+$  al sitio de His111 y tienen un impacto importante en la rapidez con la que los complejos  $\text{Cu}^{2+}$ -His111 reducen el  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$  en presencia de ácido ascórbico. Por lo anterior, en este trabajo se sintetizó el péptido  $^{106}\text{KTNIKHIAGA}^{115}$  donde los residuos de Met de las posiciones 109 y 112 fueron sustituidos por Ile y se evaluó la capacidad de los complejos  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(106–115) Met/Ile para reducir  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$  en presencia de NOC-12 (ver Figura 3.28).



**Figura 3.30.** Espectros de absorción electrónica (a) y cambios en la absorbancia a 510 y 565 nm en función del tiempo (b) durante la reacción del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(106–115) Met/Ile con NOC-12 en condiciones anaeróbicas. En (a) se agrega el espectro del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -DEDA como control (línea color verde).

En la primera lectura claramente se aprecia la banda *d-d* del complejo PrP(106–115) con un máximo de absorbancia en 565 nm (Figura 3.30, espectro rojo). Durante las primeras dos horas de reacción, la intensidad de esta banda *d-d* disminuye en aproximadamente un 55%, esto sugiere que la ausencia de los residuos de Met impacta negativamente la eficiencia con la que el sitio His111 reduce  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$  en presencia de  $\text{NO}^\bullet$ . Después de 2 h de reacción, se incrementa gradualmente la intensidad de la banda *d-d* del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(106–115), lo cual se puede asociar a la re-oxidación de  $\text{Cu}^+$  a  $\text{Cu}^{2+}$ . En general estos resultados nos permiten concluir que los residuos de Met ubicados alrededor del sitio de His111 facilitan la reducción de  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$  en presencia de  $\text{NO}^\bullet$ .



**Figura 3.31.** Espectros de absorción electrónica (a) y cambios en la absorbancia a 510 nm (b) durante la reacción del complejo Cu<sup>2+</sup>-PrP(106–115) Met/Ile con NOC-12 (de 3 a 9 horas de reacción). En (a) se agrega como control el espectro del complejo Cu<sup>2+</sup>-DEDA (línea color verde).

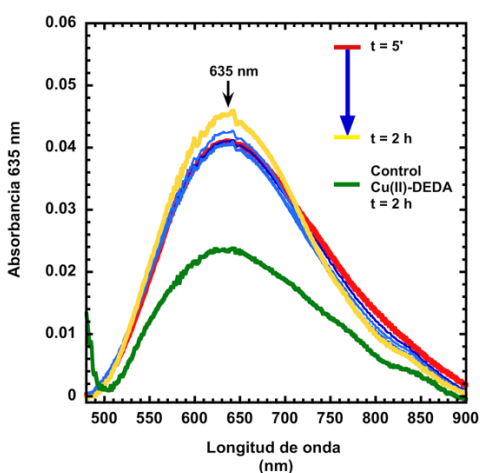
En conjunto estos resultados indican que el sitio más eficiente para catalizar la reducción de Cu<sup>2+</sup> a Cu<sup>+</sup> de la región *non-octarepeat* es el sitio de His111, lo cual lo hace un candidato potencial para participar en reacciones de S-nitrosilación. La alta eficiencia de este sitio se puede asociar por lo menos en parte a los residuos de Met ubicados en las posiciones 109 y 112.

### 3.4. Reactividad de óxido nítrico con el complejo Cu<sup>2+</sup>-PrP formado en el sitio de la $\alpha$ -His111 generado tras el procesamiento de la proteína prion por la $\alpha$ -secretasa

El sitio de la His111 es el más afectado por corte proteolítico de la PrP por las  $\alpha$ -secretasas, ya que los residuos cuyas amidas desprotonadas completan la esfera de coordinación del complejo Cu<sup>2+</sup>-His111 son escindidos, entre ellos el residuo de Met109. En estudios previos se demostró que la coordinación de Cu<sup>2+</sup> al sitio de la  $\alpha$ -His111 exhibe características espectroscópicas diferentes en comparación con el sitio His111.<sup>144</sup> Aunque el impacto de la coordinación Cu<sup>+</sup> no se ha estudiado, es de esperarse que la ausencia del residuo de Met109 afecte tanto la coordinación como la reactividad del complejo Cu<sup>2+</sup>- $\alpha$ -His111. En este trabajo se evaluó la capacidad del sitio de la  $\alpha$ -His111 para reducir Cu<sup>2+</sup> a Cu<sup>+</sup> en presencia de NO•, a partir de los cambios observados espectro de absorción electrónica durante la reacción del complejo Cu<sup>2+</sup>-PrP(111–116) con 1.5 equivalentes de NOC-12 en condiciones anaerobias.



En la Figura 3.32a se muestra de color rojo la primera lectura del espectro de absorción electrónica después de la adición de NOC-12, donde claramente se observa una banda *d-d* con un máximo a 635 nm, ésta corresponde al Modo II del complejo PrP(111–116). Después de 2 h de reacción, no se observan cambios importantes en el espectro de absorción electrónica, lo cual contrasta con lo observado en el sitio de la His111. Estos resultados sugieren que los cambios que sufre el sitio de la His111 después del corte proteolítico  $\alpha$  impactan de manera importante su capacidad para reducir  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$  en presencia de óxido nítrico.



**Figura 3.32. Espectros de absorción electrónica durante la reacción del Modo II del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(111–116) con NOC-12 en condiciones anaeróbicas. El espectro del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -DEDA se incluye como control (línea color verde).**

En conjunto, los resultados de los ensayos de reactividad de los complejos  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(92–99),  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(106–115) y  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(111–116) con  $\text{NO}^\bullet$  indican que el sitio que reduce  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$  con mayor eficiencia es el de la His111. Esta eficiencia se ve disminuida al sustituir los residuos de Met en las posiciones 106 y 112 por Ile y por los cambios que sufre el sitio de His111 después de la escisión  $\alpha$ .

Finalmente, al integrar todos los resultados obtenidos en esta Tesis se puede concluir que tanto la reactividad de los complejos  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP con  $\text{NO}^\bullet$  como el efecto del  $\beta\text{A}$  sobre la coordinación de  $\text{Cu}^{2+}$  a la PrP son sitio-específicos y dependen de la relación estequiométrica  $\text{Cu}^{2+}$ /PrP. En la Figura 3.33 se presenta un resumen de los obtenidos los resultados obtenidos

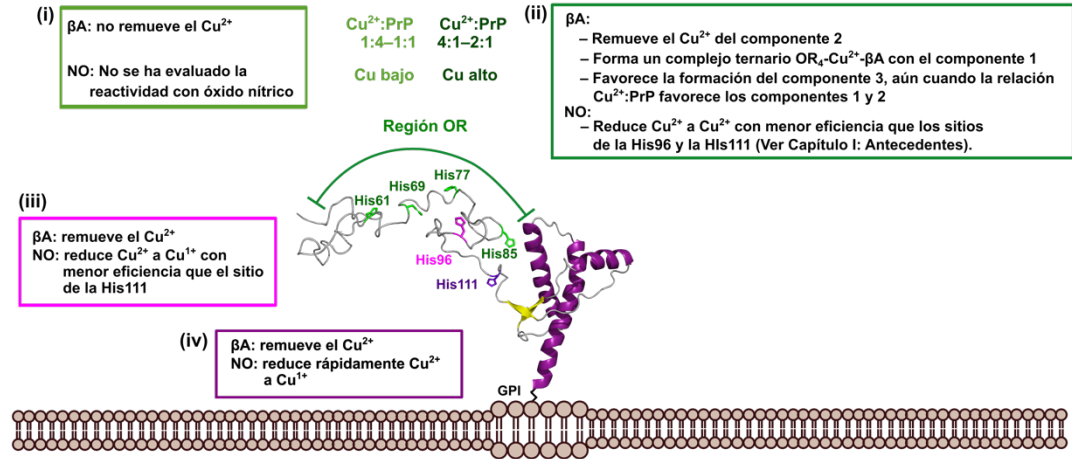
para los sitios de unión presentes en la PrP (Figura 3.33a) y para el sitio  $\alpha$ -His111 (Figura 3.33b).

Para los sitios de unión a  $\text{Cu}^{2+}$  presentes en la region OR de la PrP, el efecto del  $\beta\text{A}$  depende de la relación estequiométrica. Cuando la concentración de  $\text{Cu}^{2+}$  es igual o menor a la concentración de la PrP (Figura 3.33a.i), el  $\beta\text{A}$  remueve solo el 30% del  $\text{Cu}^{2+}$  unido a la región OR (componente 3); mientras que, a concentraciones de  $\text{Cu}^{2+}$  mayores a las de PrP (Ver Figura 3.33a.ii), el  $\beta\text{A}$  puede quitar hasta el 60% del  $\text{Cu}^{2+}$  unido a la región OR (componentes 1 y 2), forma un complejo ternario OR- $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A}$  y favorece el modo de coordinación de mayor afinidad en la región OR (componente 3). Aunque en este trabajo no se evaluó la reactividad de  $\text{NO}^\bullet$  con modelos que reproducen los modos de alta ocupación de la región OR (componentes 1 y 2), en estudios previos se demostró que el componente 1 puede reducir  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$  en presencia de  $\text{NO}^\bullet$ , pero no el componente 2 (Ver Figura 3.33a.ii). Contrario a lo observado en la región OR, el  $\beta\text{A}$  remueve todo el  $\text{Cu}^{2+}$  unido a los sitios de His96 (Ver Figura 3.33a.iii) e His111 (Ver Figura 3.33a.iv). En cuando a la reactividad frente al  $\text{NO}^\bullet$ , los resultados de este estudio indican que el sitio de la His111 es más reactivo que el de His96 (Ver Figura 3.33a.iv). Esta diferencia en reactividades se deben en parte a la presencia de los residuos de Met 109 y Met112 en el sitio sitio de His111, ya que la mutación de estos residuos a Ile retrasa la cinética de reducción de  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$ .

Al igual que en la región OR, para el sitio de la  $\alpha$ -His111, el efecto del  $\beta\text{A}$  depende de la relación estequiométrica  $\text{Cu}^{2+}/\text{PrP}$ . Cuando la concentración de  $\text{Cu}^{2+}$  es mucho menor que la de PrP (relación  $\text{Cu}^{2+}/\text{PrP}$ , 1:4), el  $\beta\text{A}$  no puede remover al  $\text{Cu}^{2+}$  del Modo I del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ - $\alpha$ -H111 y forma el *complejo ternario tipo Modo I* (Ver Figura 3.33b.i). Por otra parte, cuando la concentración de  $\text{Cu}^{2+}$  es cercana a la de PrP (estequiometría 1:1), el efecto del  $\beta\text{A}$  dependiendo de la concentración relativa del  $\beta\text{A}$ . La adición de cantidades pequeñas de  $\beta\text{A}$  induce la formación de un *complejo ternario transitorio*  $\alpha$ -H111- $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta\text{A}$ ; mientras que, al agregar más  $\beta\text{A}$ , ésta remueve el  $\text{Cu}^{2+}$  del Modo II, favorece la formación del Modo I y en consecuencia del *complejo ternario tipo Modo I* (Ver Figura 3.33b.i). Contrario a lo observado con el sitio de la His111, el Modo II del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ - $\alpha$ -H111 no reacciona con

NO•, sugiriendo que la escisión  $\alpha$  de la PrP podría afectar significativamente la reactividad del sitio de His111.

a. Efecto de  $\beta$ A en la coordinación de  $\text{Cu}^{2+}$  a la Proteína Prion



b. Efecto de  $\beta$ A y óxido nítrico en la coordinación de  $\text{Cu}^{2+}$  al sitio de la  $\alpha$ -His111 del fragmento PrPC1

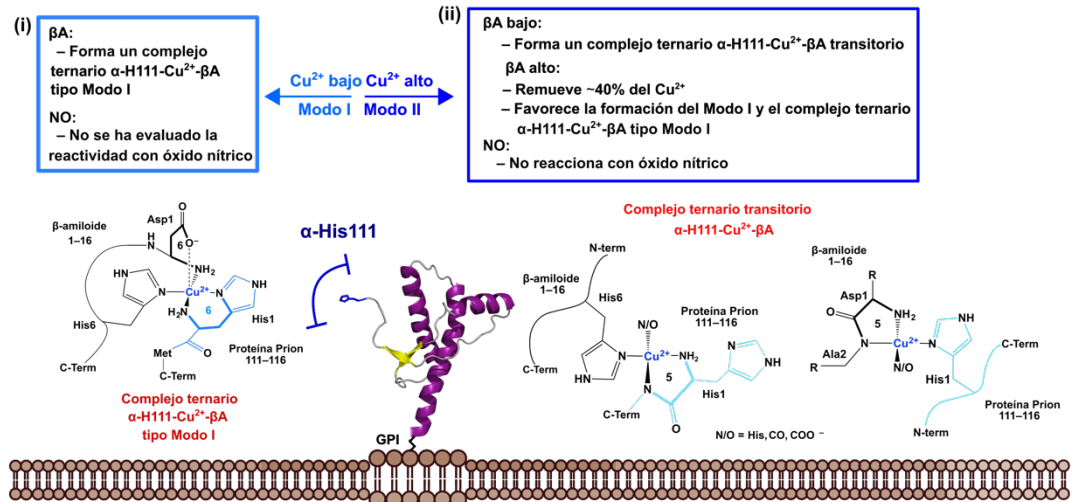


Figura 3.33. Efecto de  $\beta$ A y óxido nítrico en la coordinación de  $\text{Cu}^{2+}$  a la PrP (a) y con el sitio de la  $\alpha$ -His111 presente en el fragmento PrPC1 (b).

## CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN

El cobre es el tercer metal del bloque *d* más abundante en el cerebro, después de zinc y hierro.<sup>259</sup> Además de ser un importante cofactor enzimático, el cobre intracelular se moviliza durante la transmisión sináptica y se libera al espacio extracelular después de la activación de los receptores NMDA.<sup>205</sup> Aunque existen varias proteínas que se expresan en el SNC y pueden unir cobre, la ablación del gen que codifica para la PrP<sup>C</sup> reduce en más del 80% la cantidad de este metal presente en membranas y sinaptosomas, lo cual indica que la PrP<sup>C</sup> es la principal proteína que une cobre en las sinapsis.<sup>260</sup> Tanto la PrP<sup>C</sup> como el Cu<sup>2+</sup> participan en dos mecanismos que modulan la actividad de los receptores NMDA: 1) La formación del complejo PrP<sup>C</sup>-NMDAR y 2) La S-nitrosilación del NMDAR.<sup>18, 48</sup> A pesar de que en condiciones fisiológicas la PrP<sup>C</sup> es la principal proteína que une cobre en las sinapsis, la expresión/producción de otras metaloproteínas como la APP y el péptido  $\beta$ A se ve incrementada en algunos desordenes neurodegenerativos, como la EA.<sup>261</sup> Por lo que, en estas patologías, la acumulación del  $\beta$ A podría afectar los procesos celulares donde participan la PrP<sup>C</sup> y el Cu<sup>2+</sup>, tales como la S-nitrosilación de los receptores NMDA.<sup>18, 48</sup> Dado que la reactividad y la afinidad de los complejos Cu<sup>2+</sup>-PrP está directamente asociada con su modo de coordinación (Ver Capítulo I: Antecedentes, sección 1.3.2A), es de gran importancia caracterizar qué ocurre con la coordinación de Cu<sup>2+</sup> a la PrP en presencia del  $\beta$ A y cómo la química de coordinación de los complejos Cu<sup>2+</sup>-PrP determina su capacidad para catalizar reacciones como la S-nitrosilación.

En este trabajo, se evaluó la reactividad de los complejos Cu<sup>2+</sup>-PrP con NO• y el efecto del  $\beta$ A(1–16) sobre la coordinación de Cu<sup>2+</sup> a la PrP, con la finalidad de contribuir al entendimiento del papel del Cu<sup>2+</sup> y de estas metaloproteínas en la EA. Los resultados obtenidos indican que el NO• reacciona con los complejos Cu<sup>2+</sup>-PrP de manera sitio-específica, siendo el sitio de la His111 el más reactivo. Por otra parte, el efecto del  $\beta$ A en la coordinación de Cu<sup>2+</sup> a la PrP también es sitio-específico e involucra al menos tres mecanismos: 1) La remoción del metal de los complejos Cu<sup>2+</sup>-PrP, 2) La formación de complejos ternarios  $\beta$ A-Cu<sup>2+</sup>-PrP, y 3) La alteración de los equilibrios entre los diferentes

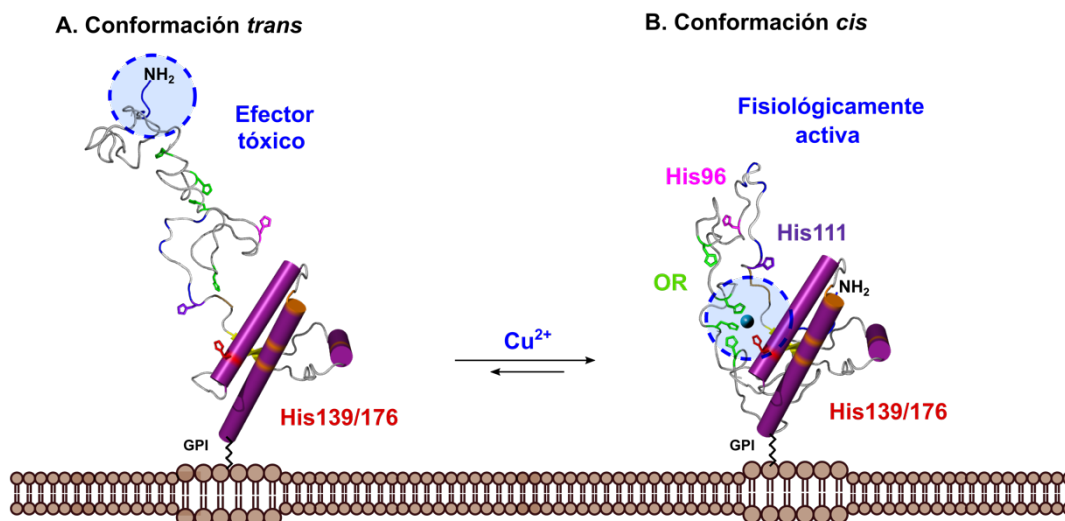
modos de coordinación de los complejos  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP. A lo largo de este capítulo se discuten estos hallazgos y sus posibles implicaciones funcionales.

#### **4.1. Implicaciones funcionales del efecto del péptido $\beta\text{A}$ en la unión de $\text{Cu}^{2+}$ a la PrP y la reactividad de óxido nítrico con los complejos $\text{Cu}^{2+}$ -PrP**

Aunque en ningún estudio se ha logrado vincular una función de la PrP<sup>C</sup> con un modo de coordinación  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP<sup>C</sup>, recientemente se demostró que la unión de  $\text{Cu}^{2+}$  puede inducir un cambio conformacional en la PrP<sup>C</sup> asociado con la función y toxicidad de esta proteína.<sup>141, 262</sup> Es importante recordar que la PrP<sup>C</sup> está formada por dos dominios: el *N*-terminal—caracterizado por la ausencia de estructura secundaria y donde se localizan los sitios de unión a  $\text{Cu}^{2+}$ —y el *C*-terminal formado por tres hélices  $\alpha$  y dos hojas  $\beta$ .<sup>97</sup> La unión de  $\text{Cu}^{2+}$  a la región OR promueve la interacción entre el dominio *N*- y *C*-terminal (*conformación cis*), al formar un complejo multi-His, donde participan tres residuos de His de la región OR y una His(139/176) del dominio *C*-terminal (Ver Figura 4.1)<sup>141, 262</sup> Este complejo multi-His es espectroscópicamente idéntico al modo de baja ocupación de la región OR o componente 3.<sup>141</sup> Estudios funcionales indican que la disminución o inhibición de la conformación *cis* de la PrP<sup>C</sup> es tóxica para las células en cultivo.<sup>263</sup> Por lo que, se ha propuesto que el *N*-terminal de la PrP<sup>C</sup> contiene un “efector tóxico” que solo está disponible cuando la PrP<sup>C</sup> se encuentra en conformación *trans* y se neutraliza cuando la proteína adopta la conformación *cis* (Ver Figura 4.1).<sup>263</sup> Aunque en esta Tesis se evaluó el efecto del péptido  $\beta\text{A}$  sobre la coordinación de  $\text{Cu}^{2+}$  a la PrP en cada sitio/región de la PrP de manera individual, es importante recordar que la región OR y non-OR (sitios de His96 e His111) están presentes de manera simultánea en la PrP<sup>C</sup>. Por lo que, para identificar las posibles implicaciones funcionales de los resultados derivados de este trabajo, es necesario analizar los escenarios de la PrP<sup>C</sup> donde los complejos estudiados son relevantes (Ver Figura 4.2).

En el escenario I.A (Figura 4.2), la PrP<sup>C</sup> forma el complejo multi-His que estabiliza la conformación *cis* de la PrP<sup>C</sup>, reproduciendo la coordinación del metal observada en el componente 3. De acuerdo con los resultados de esta Tesis, en este ambiente químico, el péptido  $\beta\text{A}$  solo puede remover al metal del 30% del componente 3, aún cuando la concentración del  $\beta\text{A}$  es dos veces mayor a la PrP<sup>C</sup>. Aunque la unión de  $\text{Cu}^{2+}$  al  $\beta\text{A}$  está

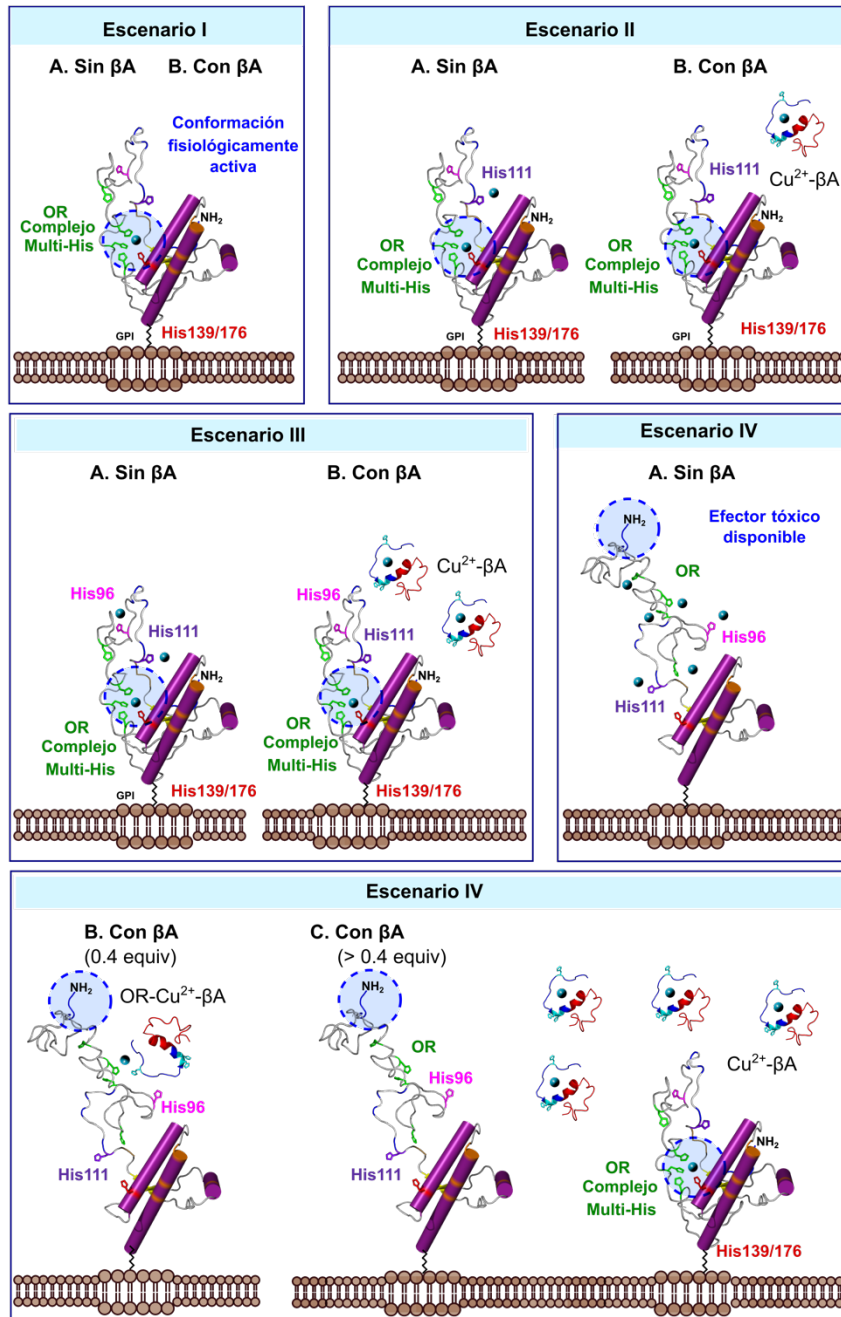
favorecida por la formación de dos anillos de 5 miembros (efecto quelato), esto no es suficiente para remover al metal del complejo multi-His formado en el componente 3. Dada la equivalencia espectroscópica del componente 3 y el complejo multi-His que promueve la conformación *cis*, los resultados de este trabajo sugieren que el  $\beta$ A no podría desestabilizar la conformación “*fisiológicamente activa*” de la PrP<sup>C</sup> (Figura 4.2, escenario I.A-B).



**Figura 4.1 Efecto de  $\text{Cu}^{2+}$  en la conformación de la PrP<sup>C</sup>.** En ausencia de  $\text{Cu}^{2+}$  se favorece la conformación *trans* de la PrP<sup>C</sup> (A), donde el extremo *N*-terminal se encuentra libre y funciona como efecto neurotóxico. En presencia de  $\text{Cu}^{2+}$ , el metal estabiliza la conformación *cis* a través de la formación de un complejo multi-His de entre la región OR y el dominio *C*-terminal de la PrP<sup>C</sup>.

En el escenario II.A (Figura 4.2), la PrP<sup>C</sup> tiene coordinados dos átomos de  $\text{Cu}^{2+}$ : uno formando un complejo multi-His entre la región OR y el *C*-terminal (espectroscópicamente equivalente al componente 3), y el otro coordinado a la His111 ( $K_d = 0.4\text{--}0.7 \mu\text{M}$ ). En este ambiente, de acuerdo con los resultados de esta Tesis, el  $\beta$ A podría remover totalmente el  $\text{Cu}^{2+}$  de la His111 y en consecuencia interrumpir cualquier función de la PrP<sup>C</sup> que dependa de la unión del metal a este sitio. Sin embargo, dado que el  $\beta$ A no altera la unión de  $\text{Cu}^{2+}$  al componente 3, la presencia del  $\beta$ A favorecería el escenario I, donde se mantiene la “*conformación fisiológicamente activa*” de la PrP<sup>C</sup> (Figura 4.2 II.B). Por otra parte, en el escenario III.A (Figura 4.2), la PrP<sup>C</sup> une tres iones  $\text{Cu}^{2+}$ : uno en la región OR estabilizando la conformación *cis*, y dos en la región non-OR (His 96 e His111). En este ambiente, el  $\beta$ A podría remover totalmente el  $\text{Cu}^{2+}$  de los dos sitios de la región non-OR (His96 e His111), y por lo tanto inhibir cualquier función vinculada a la unión de  $\text{Cu}^{2+}$  en esta región. Sin

embargo, al igual que el escenario II, el  $\beta A$  no podría remover al  $Cu^{2+}$  del complejo multi-His que estabiliza la conformación *cis* o “fisiológicamente activa” de la PrP<sup>C</sup>, favoreciendo nuevamente el escenario I (Ver Figura 4.2 III.B).



**Figura 4.2 Efecto del  $\beta A$  en la unión de  $Cu^{2+}$  a la PrP<sup>C</sup>.** En los escenarios I.A, II.A, III.A y IV.A se muestran los diferentes niveles de ocupación de los sitios de unión a  $Cu^{2+}$  en el PrP<sup>C</sup>, mientras que en los escenarios I.B, II.B, III.B y IV.B se muestra el efecto del péptido  $\beta A$  en la unión de  $Cu^{2+}$  a la PrP<sup>C</sup>.

En el escenario IV.A (Figura 4.2), de acuerdo con los resultados de esta Tesis, el  $\beta$ A remueve el  $\text{Cu}^{2+}$  del componente 2 y los sitios la region non-OR (His111 y His96), forma un complejo ternario OR- $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta$ A y favorece la formación del componente 3 (Figura 4.2 IV.B-C). En general, el péptido  $\beta$ A puede alterar las funciones asociadas a la unión de  $\text{Cu}^{2+}$  a la PrP<sup>C</sup> en su máximo nivel de ocupación a través de varios mecanismos. Al remover al metal de la región OR y non-OR, el  $\beta$ A, podría inhibir las funciones asociadas a estos sitios. Por otra parte, la formación del complejo ternario OR- $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta$ A podría inducir la activación de alguna vía de señalización, tal como se demostró con la unión de los o $\beta$ A a la PrP<sup>C</sup>.<sup>166</sup> Finalmente, al promover la formación del componente 3 favorecería la conformación “*fisiológicamente activa*” de la PrP<sup>C</sup>, aún cuando cuando la concentración de  $\text{Cu}^{2+}$  sea alta.

Es importante destacar que el máximo nivel de ocupación de la PrP<sup>C</sup> es el único escenario donde la interacción inderdominio tipo *cis* no ocurre. El papel de la unión de  $\text{Cu}^{2+}$  a la region OR como interruptor entre la conformación *cis* y *trans* es compatible con otras hipótesis expuestas en la literatura, en las cuales se postula que la unión de  $\text{Cu}^{2+}$  a la región OR determina la localización de la PrP<sup>C</sup> en la membrana celular. En cultivo celular la adición de cantidades altas de  $\text{Cu}^{2+}$  (150–500  $\mu\text{M}$ ) promueve el movimiento lateral de la PrP<sup>C</sup> en la membrana celular, lo cual da como resultado la salida de la PrP<sup>C</sup> de las balsas lipídicas—regiones de la membrana ricas en colesterol que facilitan el ensamblaje de complejos proteicos para activar vías de señalización—y facilita su endocitosis vía clatrina.<sup>264</sup> Dado que la unión la coordinación de  $\text{Cu}^{2+}$  en la región OR depende de la concentración del metal, el efecto del metal en la localización de la PrP<sup>C</sup> en la membrana celular se podría explicar de la siguiente forma: a bajas concentraciones de  $\text{Cu}^{2+}$ , la PrP<sup>C</sup> une un solo  $\text{Cu}^{2+}$  en la región OR (conformación *cis*) y adopta una conformación que es reconocida por una proteína transmembranal que mantiene a la PrP<sup>C</sup> dentro de la balsa lipídicas; mientras que, al aumentar la cantidad de  $\text{Cu}^{2+}$  la coordinación en la región OR cambia (conformación *trans*) y esto promueve la salida de la PrP<sup>C</sup> de las balsas lipídicas.<sup>265</sup> En este contexto, los resultados de esta Tesis sugieren que a concentraciones altas de  $\text{Cu}^{2+}$  (Escenario IV), el  $\beta$ A podría prevenir la salida de la PrP<sup>C</sup> de las balsas lipídicas y con ello evitar su endocitosis vía clatrina.



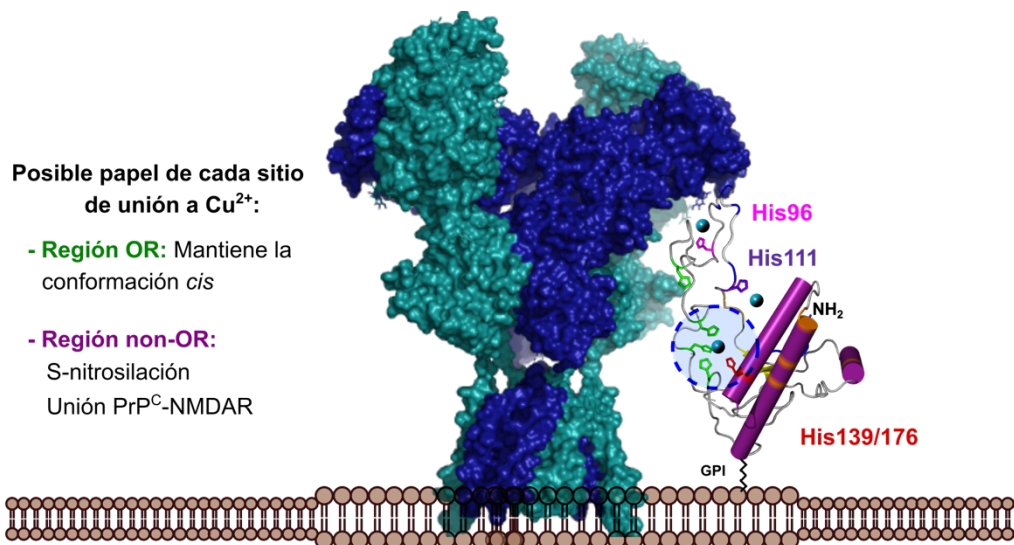
Los conceptos de “*conformación fisiológica*” (conformación *cis*) y “*efector tóxico*” (*N*-terminal) son consistentes con el impacto funcional o patológico reportado para la interacción de la PrP<sup>C</sup> con otras proteínas.<sup>97</sup> Las proteínas identificadas como ligantes de la PrP<sup>C</sup> y vinculadas a mecanismos no patológicos—vibronectina (Vn), la proteína inducida por estrés (STI1), las moléculas de adhesión de células neuronales (NCAM) y la laminina—se unen en la región non-OR o en el dominio *C*-terminal, pero no a la región OR,<sup>97</sup> de tal forma que pueden unirse a la PrP<sup>C</sup> mientras ésta se encuentra en la “*conformación fisiológicamente activa*”. Por el contrario, la unión de la PrP<sup>C</sup> al receptor mGluR5 requiere del extremo *N*-terminal “*efector tóxico*” y activa la vía de señalización (oβA-PrP<sup>C</sup>-mGluR5-Fyn)—cuya toxicidad y relación con la EA fue ampliamente revisada en la Tabla 1.9 del Capítulo I: Antecedentes. De tal forma que, solo los complejos Cu<sup>2+</sup>-PrP<sup>C</sup> mostrados en los escenarios I, II y III podrían clasificarse como potencialmente activos en condiciones fisiológicas y el escenario IV como potencialmente tóxico. Sin embargo, el efecto del βA sobre la unión de Cu<sup>2+</sup> a la PrP<sup>C</sup> es mucho más difícil de clasificar utilizando los conceptos de “*conformación fisiológicamente activa*” y “*efector tóxico*”. Aunque en cualquier escenario el βA no perturba o incluso favorece la “*conformación fisiológicamente activa*” (componente 3), también forma el complejo ternario OR-Cu<sup>2+</sup>-βA, donde el *N*-terminal podría funcionar como el “*efector tóxico*” (Ver Figura 4.2, escenario IV.C). Además, al remover al metal de los componentes 1 y 2 podría prevenir la endocitosis de la PrP<sup>C</sup> a concentraciones altas de Cu<sup>2+</sup>, donde este mecanismo podría tener un carácter protector.

De manera general, el Cu<sup>2+</sup> y la PrP<sup>C</sup> participan en varios procesos esenciales para las células neuronales, tales como: la neuritogénesis, neurogénesis y la plasticidad neuronal.<sup>97</sup> En un par de trabajos recientes se demostró que la mutación de los residuos de His que anclan al Cu<sup>2+</sup> en la región OR (His61, His69, His77 y His85) o en la región non-OR (His96 y His111) es suficiente para inhibir el papel de Cu<sup>2+</sup> y PrP<sup>C</sup> en la neuritogénesis y la modulación de los receptores NMDA.<sup>257, 266</sup> Aunque este resultado sugiere que el efecto de la PrP<sup>C</sup> y el Cu<sup>2+</sup> en la neuritogénesis y la modulación de los receptores NMDA requiere alguno de los escenarios II, III, o IV, no es posible asociar estas funciones de la PrP<sup>C</sup> a un modo de coordinación específico sin realizar un estudio más detallado. Sin embargo, con la finalidad de sentar las bases para estudios futuros, a continuación se aplican los conceptos de “*conformación*

*fisiológicamente activa*” y “*efector tóxico*” para identificar cómo la unión de  $\text{Cu}^{2+}$  a la PrP<sup>C</sup> podría estar participando en neuritogenesis y la modulación de los NMDAR. En principio el escenario IV quedaría descartado por considerarse potencialmente tóxico. Además, la necesidad de mantener la “*conformación fisiológicamente activa*” explicaría porque la mutación de las cuatro His de la región OR es suficiente para inhibir los efectos de  $\text{Cu}^{2+}$  y PrP<sup>C</sup> en la neuritogenesis y la modulación de los NMDAR. Esto también sugiere que al no ser necesaria la unión de  $\text{Cu}^{2+}$  a la región non-OR para estabilizar la “*conformación fisiológicamente activa*”,<sup>267</sup> los complejos formados en estos sitios de la PrP<sup>C</sup> podrían tener un papel funcional más allá de la estabilización de la conformación *cis*.

En el caso de la modulación de los receptores NMDAR, es importante recordar que se han descrito dos mecanismos: 1) La formación del complejo PrP<sup>C</sup>-NMDAR inducida por  $\text{Cu}^{2+}$  y 2) La S-nitrosilación del NMDAR promovida por PrP<sup>C</sup> y  $\text{Cu}^{2+}$ .<sup>18,48</sup> Estos mecanismos fueron identificados en condiciones experimentales muy diferentes, por lo que aún se desconoce si se trata de procesos aislados.<sup>18,48</sup> Para el primero de ellos, también se demostró que el  $\beta\text{A}$  puede impedir la formación del complejo PrP<sup>C</sup>-NMDAR inducida por  $\text{Cu}^{2+}$ .<sup>48</sup> Es importante destacar que este efecto del  $\beta\text{A}$  se revierte totalmente al lavar el medio cultivo, lo cual sugiere que este péptido evita la formación del complejo PrP<sup>C</sup>-NMDAR al competir con la PrP<sup>C</sup> por  $\text{Cu}^{2+}$  y no por la unión  $\beta\text{A}$ -PrP<sup>C</sup>.<sup>48</sup> De acuerdo con los resultados de esta Tesis, solo en los escenarios II y III, el  $\beta\text{A}$  puede competir por  $\text{Cu}^{2+}$  con la PrP<sup>C</sup> sin favorecer la formación de complejos ternarios  $\beta\text{A}$ - $\text{Cu}^{2+}$ -PrP<sup>C</sup>. En cualquiera de los escenarios I y II, la presencia del  $\beta\text{A}$  favorecería un complejo  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP<sup>C</sup> sin metal en la región non-OR. Lo anterior explicaría porque la presencia del  $\beta\text{A}$  tiene el mismo efecto en las corrientes de los receptores NMDA que la mutación de los residuos de His/Ala en la región non-OR.<sup>48,257</sup> Retomando la idea de que tres de las cuatro residuos de His de la región OR son necesarios para estabilizar la “*conformación fisiológicamente activa*”, los residuos de His de la región non-OR podrían participar en la unión de la PrP<sup>C</sup> al NMDA o bien en la activación del  $\text{NO}^\bullet$  (Ver Figura 4.3). Este último, es congruente con los resultados de esta Tesis, donde se demuestra que el sitio de la His111 es el único capaz de reducir  $\text{Cu}^{2+}$  en presencia de  $\text{NO}^\bullet$  en fracciones de segundo, por lo que es el sitio con mayor potencial para catalizar una reacción de S-nitrosilación en condiciones fisiológicas. Finalmente, es importante resaltar que de acuerdo con los resultados

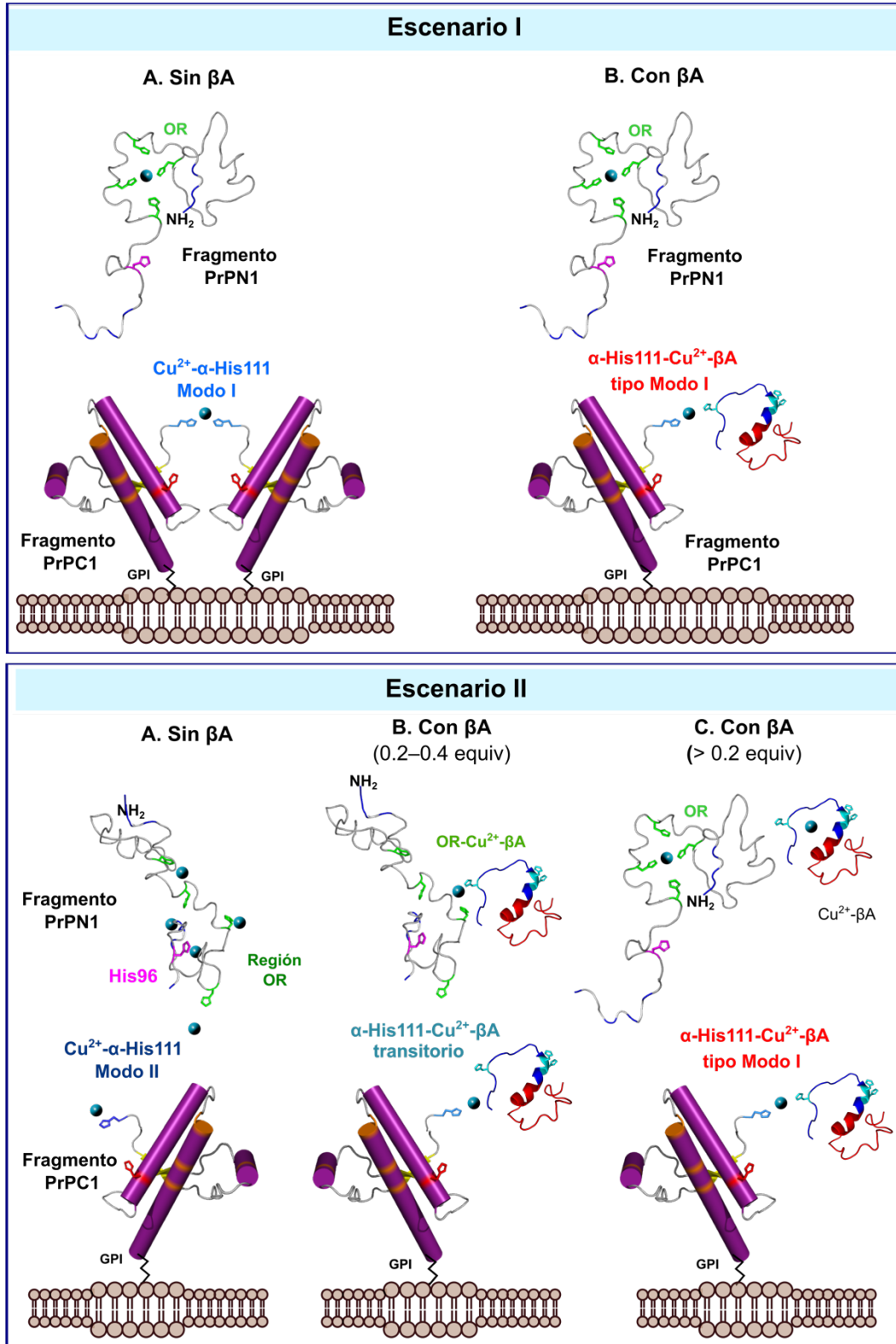
de esta Tesis, aunque el sitio de His111 es el más reactivo frente al  $\text{NO}^\bullet$ , dicha reactividad está asociada a los residuos de Met presentes en las posiciones 109 y 112 ( $^{106}\text{KTN}\text{MKHMAGA}^{115}$ ). Dado que estos residuos de Met están presentes en la secuencia de la PrP<sup>C</sup> humana y ausentes en la secuencia de roedores y otras especies, es posible que la eficiencia de la PrP<sup>C</sup> para catalizar reacciones de S-nitrosilación sea diferente entre especies.



**Figura 4.3 Posibles papel de cada sitio de unión a  $\text{Cu}^{2+}$  de la PrP<sup>C</sup> en la modulación de los receptores NMDA.** La modulación de los receptores NMDA dependiente de  $\text{Cu}^{2+}$  y PrP<sup>C</sup> requiere de la región OR y non-OR. Las His de la región OR podrían participar en la estabilización de la conformación *cis* de la PrP<sup>C</sup>; mientras que, las His de la región non-OR podrían participar en la unión PrP<sup>C</sup>-NMDAR o en la S-nitrosilación.

#### 4.2. Implicaciones funcionales del efecto del péptido $\beta\text{A}$ en la unión de $\text{Cu}^{2+}$ al sitio de la $\alpha$ -His111 y de la reactividad de óxido nítrico con los complejos $\text{Cu}^{2+}$ - $\alpha$ -His111

Finalmente, para analizar las implicaciones funcionales del efecto del  $\beta\text{A}$  en la unión de  $\text{Cu}^{2+}$  al sitio  $\alpha$ -H111, es importante recordar que éste se encuentra en el fragmento PrPC1, el cual es uno de los dos productos de la proteólisis de la PrP<sup>C</sup> por la  $\alpha$ -secretasa.<sup>97</sup> Como se describió ampliamente en el Capítulo I (Antecedentes, sección 1.3.2B), la coordinación del  $\text{Cu}^{2+}$  al sitio de la  $\alpha$ -H111 es totalmente diferente a la observada en el sitio de His111 presente en la PrP<sup>C</sup>.<sup>144</sup> Por lo que, en este trabajo se evaluó el efecto del péptido  $\beta\text{A}$  sobre la coordinación de  $\text{Cu}^{2+}$  al sitio de la  $\alpha$ -H111 y la reactividad del complejo  $\text{Cu}^{2+}$ - $\alpha$ -H111 con la finalidad de contrastar las diferencias con respecto al sitio de His111 presente en la PrP<sup>C</sup> completa.



**Figura 4.4** Unión de  $\text{Cu}^{2+}$  a los fragmentos PrPN1 y PrPC1 de la PrP<sup>C</sup> y efecto del  $\beta$ A. En los escenarios I.A, II.A, se muestran los diferentes niveles de ocupación de los sitios de unión a  $\text{Cu}^{2+}$  en el PrP<sup>C</sup>; mientras que, en los escenarios I.B, II.B y II.C se muestra el efecto del péptido  $\beta$ A en la unión de  $\text{Cu}^{2+}$  a la PrP<sup>C</sup>.

Aunque en este trabajo no se analizó el efecto del  $\beta$ A sobre la coordinación de  $\text{Cu}^{2+}$  al fragmento PrPN1 y la reactividad de los complejos  $\text{Cu}^{2+}$ -PrPN1, al conservar intactos los sitios de unión a  $\text{Cu}^{2+}$  de la región OR y el sitio de la His96, el fragmento PrPN1, en principio, podría coordinar  $\text{Cu}^{2+}$  de manera similar a la PrP<sup>C</sup>. Por lo tanto, los resultados obtenidos en este trabajo para la región OR y el sitio de la His96 también aportan información importante sobre el fragmento PrPN1.<sup>97</sup> Considerando que la unión de  $\text{Cu}^{2+}$  al OR y al sitio de la  $\alpha$ -H111 ubicado en el fragmento PrPC1 depende de la relación estequiométrica  $\text{Cu}^{2+}/\text{PrPC1}$ , se pueden plantear al menos dos escenarios en donde los fragmentos PrPN1 y PrPC1 podrían coordinar  $\text{Cu}^{2+}$  de forma diferente dependiendo de las concentraciones de  $\text{Cu}^{2+}$  y los fragmentos PrPN1 y PrPC1 (Ver Figura 4.3). En el escenario I, el fragmento PrPN1 une un átomo de  $\text{Cu}^{2+}$  formando un complejo multi-His (componente 3); mientras que, en la membrana celular, el  $\text{Cu}^{2+}$  induce la homodimerización del fragmento PrPC1. Por otra parte, en el escenario II, el fragmento PrPN1 une cuatro átomos de  $\text{Cu}^{2+}$  en el fragmento PrPN1 y uno en el fragmento PrPC1.

Los resultados de esta Tesis indican que en el escenario I (Figura 4.4), el  $\beta$ A no afecta la unión de  $\text{Cu}^{2+}$  al fragmento PrPN1, pero forma un *complejo ternario*  $\alpha$ -H111- $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta$ A *tipo Modo I* en el fragmento PrPC1. En el escenario II, el efecto del  $\beta$ A es mucho más complejo y depende de la concentración relativa  $\beta\text{A}/\text{Cu}^{2+}/\text{PrPC1}/\text{PrPN1}$ . Cuando la concentración del  $\beta$ A es baja (Figura 4.4, escenario II.B), se favorece la formación de un *complejo ternario* OR- $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta$ A en el fragmento PrPN1 y la formación del *complejo ternario transitorio*  $\alpha$ -H111- $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta$ A con el fragmento PrPC1. Por otra parte, cuando la concentración de  $\beta$ A es mucho mayor a la de los fragmentos PrPN1 y PrPC1, el  $\beta$ A remueve el  $\text{Cu}^{2+}$  del OR y la His96 en el fragmento PrPN1 y favorece la formación del complejo multi-His en la región OR; mientras que, en el fragmento PrPC1 se forma una mezcla compleja de especies que incluye el *complejo ternario*  $\alpha$ -H111- $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta$ A *tipo Modo I* y  $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta$ A.

Los resultados de este trabajo muestran que el sitio de la  $\alpha$ -H111 tiene una mayor tendencia a formar complejos ternarios en comparación con los sitios de unión a metal presentes en la PrP<sup>C</sup>. Esto podría deberse a que al poseer un grupo  $-\text{NH}_2$  libre se reduce el impedimento

estérico para que otro péptido o proteína pueda coordinarse. Aunque en el sitio de la  $\alpha$ -H111 se forman complejos ternarios con el modo de baja y alta ocupación, cabe destacar que el *complejo ternario transitorio* tiene varias similitudes con el complejo *complejo ternario* OR-Cu<sup>2+</sup>- $\beta$ A: ambos son espectroscópicamente similares, se forman a concentraciones subestequiométricas del  $\beta$ A, no se favorecen al agregar más  $\beta$ A y podrían coexistir en el escenario II. Esta facilidad del sitio de la  $\alpha$ -H111 para formar complejos ternarios con el  $\beta$ A, podría tener un impacto funcional importante al activar vías de señalización.

## CAPÍTULO V. CONCLUSIONES

De manera consistente con la dinámica química de coordinación de la PrP<sup>C</sup> y el  $\beta$ A, los resultados de esta tesis demuestran que el efecto del  $\beta$ A sobre la coordinación de Cu<sup>2+</sup> a la PrP y la reactividad de los complejos Cu<sup>2+</sup>-PrP son sitio-específicas.

- *Efecto sitio específico del  $\beta$ A sobre la unión de Cu<sup>2+</sup> a la PrP:* En la región OR, el complejo multi-His formado por el modo de baja ocupación (componente 3), es el único que resiste el efecto quelante del  $\beta$ A, lo cual sugiere que la conformación *cis* o “*fisiológicamente activa*” de la PrP<sup>C</sup> podría resistir el efecto del  $\beta$ A. En contraste, en los modos de alta ocupación (componentes 1 y 2), el  $\beta$ A perturba la unión de Cu<sup>2+</sup> a través de varios mecanismos: remueve parcialmente el metal, forma un *complejo ternario* OR-Cu<sup>2+</sup>- $\beta$ A y modifica el equilibrio entre los componentes 1, 2 y 3 en favor al componente 3. Este efecto pleomórfico del  $\beta$ A sobre los modos de alta ocupación de la región OR, sugiere al  $\beta$ A como un modulador de la unión de Cu<sup>2+</sup> a la PrP<sup>C</sup> o bien como un ligante con varios mecanismos potencialmente tóxicos. Además, por su impacto en la unión de Cu<sup>2+</sup> a los modos de alta ocupación de la región OR, el  $\beta$ A podría evitar la salida de la PrP<sup>C</sup> de las balsas lipídicas y prevenir su endocitosis. Asimismo, al favorecer la formación de componente 3, el  $\beta$ A podría promover la conformación “*fisiológicamente activa*” de la PrP<sup>C</sup> a concentraciones altas de Cu<sup>2+</sup>; mientras que, el complejo ternario OR-Cu<sup>2+</sup>- $\beta$ A podría activar alguna vía de señalización como se ha observado con el complejo o $\beta$ A-PrP<sup>C</sup>.<sup>97</sup> Finalmente, en cuanto a los sitios de His96 e His111, éstos son los únicos que pierden todo el Cu<sup>2+</sup> en presencia del  $\beta$ A, por lo que cualquier función asociada a los complejos Cu<sup>2+</sup>-His96 y Cu<sup>2+</sup>-His96 sería inhibida en presencia del  $\beta$ A.
- *Formación de complejos ternarios PrP-Cu<sup>2+</sup>- $\beta$ A:* De todos los sitios de unión a metal presentes en la PrP<sup>C</sup>, el  $\beta$ A solo forma un complejo ternario—el OR-Cu<sup>2+</sup>- $\beta$ A—en la región OR y en condiciones muy específicas: a una relación estequiométrica Cu<sup>2+</sup>/OR de 4:1, con cantidades subestequiométricas del  $\beta$ A y a expensas del componente 1.

Las características espectroscópicas del complejo ternario OR-Cu<sup>2+</sup>-βA son consistentes con la presencia de residuos de His y amidas desprotonadas en la esfera de coordinación.

- La reactividad sitio específica de los complejos Cu<sup>2+</sup>-PrP señala al sitio de la His111 como clave para la modulación de los receptores NMDA: Para la modulación de los receptores NMDA, el efecto del βA sobre la unión de Cu<sup>2+</sup> a la PrP, sugiere que los sitios de la región OR son necesarios para mantener la conformación cis de la PrP<sup>C</sup>; mientras que, los sitios de la región non-OR podrían participar en la unión PrP<sup>C</sup>-NMDA o bien en la S-nitrosilación. En este sentido, los estudios de reactividad de los complejos Cu<sup>2+</sup>-PrP indican que el sitio más reactivo es el de la His111, por lo que éste es el sitio que tiene mayor potencial para catalizar reacciones de S-nitrosilación. La reactividad del sitio de His111 frente al NO• se ve disminuida al cambiar los residuos de Met109 y Met112 a Ile. Dado que la presencia de estos residuos de Met a ambos lados de la His111 es una característica distintiva de la secuencia humana de la PrP<sup>C</sup>, es posible que la reactividad de los complejos Cu<sup>2+</sup>-PrP<sup>C</sup> sea diferente entre especies.
- El impacto del corte proteolítico α en la unión de Cu<sup>2+</sup> al sitio de la His111 también se refleja en el efecto del βA y la reactividad con óxido nítrico: El efecto del βA en la coordinación de Cu<sup>2+</sup> al sitio de la α-His111 y la reactividad del complejo Cu<sup>2+</sup>-α-His111 con NO• es totalmente diferente al observado en el sitio de la His111 presente en la PrP<sup>C</sup>.

El efecto del βA en la unión de Cu<sup>2+</sup> al sitio de la α-His111 depende de la relación estequiométrica Cu<sup>2+</sup>/PrP<sup>C</sup> y se caracteriza por la formación de complejos ternarios: el *complejo ternario tipo Modo I* y el *complejo ternario transitorio*. Las características espectroscópicas del *complejo ternario tipo Modo I* son compatibles con una coordinación tipo “Histamina” [2NH<sub>2</sub>, 2His]. Por otra parte, el *complejo ternario transitorio* α-H111-Cu<sup>2+</sup>-βA tiene varias similitudes con el *complejo ternario* OR-Cu<sup>2+</sup>-βA: ambos se forman a concentraciones altas de Cu<sup>2+</sup> y cantidades



subestequiométricas del  $\beta$ A, y no se favorecen al incrementar la concentración del  $\beta$ A. Las características espectroscópicas del *complejo ternario transitorio*  $\alpha$ -H111- $\text{Cu}^{2+}$ - $\beta$ A son compatibles con la presencia de residuos de His y amidas desprotonadas en la esfera de coordinación.

Finalmente, las modificaciones que sufre el sitio de His111 después del corte proteolítico  $\alpha$  también tienen una repercusión en su reactividad frente al  $\text{NO}^\bullet$ . A diferencia de lo observado en el sitio de His111, los complejos  $\text{Cu}^{2+}$ - $\alpha$ -H111 (Modo II) son prácticamente inertes frente al  $\text{NO}^\bullet$ . Esto sugiere que la capacidad de los complejos  $\text{Cu}^{2+}$ -PrPC para nitrosilar residuos de Cys podría verse afectada por el corte proteolítico  $\alpha$ .

## CAPÍTULO VI. PERSPECTIVAS

Los resultados de este trabajo y su correspondiente análisis abren la puerta a investigaciones futuras enfocadas en entender la química detrás del papel de  $\text{Cu}^{2+}$ , el  $\beta\text{A}$  y la  $\text{PrP}^{\text{C}}$  en condiciones fisiológicas y en la EA. A continuación se describen de forma algunas de investigaciones emergentes y cómo podrían abordarse.

*El efecto de  $\text{Cu}^{2+}$  en la localización de la  $\text{PrP}^{\text{C}}$  en la membrana celular y en la endocitosis.*

Una de las principales áreas emergentes de investigación que surge del análisis realizado en esta Tesis es el estudio de la química de coordinación detrás del efecto del  $\text{Cu}^{2+}$  en la localización de la  $\text{PrP}^{\text{C}}$  en la membrana celular. Aunque se ha demostrado que cantidades altas de  $\text{Cu}^{2+}$  (150–500  $\mu\text{M}$ ) inducen el movimiento lateral de la  $\text{PrP}^{\text{C}}$  y favorecen la endocitosis, se desconoce si la conformación *cis* estabiliza a la  $\text{PrP}^{\text{C}}$  en las balsas lipídicas.<sup>264</sup> Para comprobar esto, se puede evaluar la presencia de la  $\text{PrP}^{\text{C}}$  en las balsas lipídicas utilizando células que expresen las siguientes variantes de la  $\text{PrP}^{\text{C}}$ :

- 5) **Mutante His139Q/H176Q.** Esta mutación en la secuencia de la  $\text{PrP}^{\text{C}}$  bloquea la formación del complejo multi-His entre la región OR y el C-terminal de la  $\text{PrP}^{\text{C}}$ . Esto reduce la estabilidad de la conformación *cis* de la  $\text{PrP}^{\text{C}}$ , pero no bloquea su formación.<sup>141</sup>
- 6) **Mutante H61A/H69A.** Esta proteína solo posee dos de las cuatro His de la región OR, por lo que no puede formar el complejo multi-His que estabiliza la conformación *cis*. Al igual que la mutante His139Q/H176Q reduce la estabilidad de la conformación *cis*, pero no bloquea por completo su formación.<sup>141</sup>
- 7) **Mutante K23L/K24L/K27L.** Esta mutante de  $\text{PrP}^{\text{C}}$  evidencia el efecto de región polibásica del extremo N-terminal en las interacciones electrostáticas. Esta mutante bloquea casi por completo la conformación *cis* de la  $\text{PrP}^{\text{C}}$ .<sup>141</sup>

De forma complementaria, la evaluación del efecto de quelantes de  $\text{Cu}^{2+}$  en la localización de la  $\text{PrP}^{\text{C}}$  en las balsas lipídicas pondría evidenciar el papel del metal a bajas concentraciones de  $\text{Cu}^{2+}$ .

Asimismo, aunque se asume que dicho movimiento depende de la formación de los modos de alta ocupación (componente 1 y 2) en la región OR, se desconoce si la formación de dichos modos de coordinación es imprescindible. Para comprobar esto experimentalmente, se puede evaluar la localización de la PrP<sup>C</sup> en la membrana y su endocitosis en células que expresen las siguientes mutantes:

- 8) **Mutante non-OR (H96A, H111A) y OR (H61A, H69A).** Esta PrP<sup>C</sup> no puede formar complejos multi-His (componente 3 o conformación *cis*) y no puede unir Cu<sup>2+</sup> en la región non-OR, por lo que permite aislar el efecto de los componentes 1 y 2.
- 9) **Mutante non-OR (H96A, H111A) y OR (H61A, H69A, H77A).** Esta mutante no puede formar complejos multi-His (componente 3), no puede unir Cu<sup>2+</sup> en la región non-OR y no puede formar el componente 2. Por lo que, permite aislar el efecto del componente 1.
- 10) **Mutante H96A, H111A.** Aunque se asume que la unión de Cu<sup>2+</sup> a los sitios de la región non-OR no tienen impacto en el movimiento lateral de la PrP<sup>C</sup> o bien en su endocitosis, no hay evidencia experimental que soporte esa hipótesis. Por lo que, también es necesario evaluar el efecto de esta mutante.

#### *El papel del Cu<sup>2+</sup> en la formación del complejo PrP<sup>C</sup>-NMDAR*

Como se mencionó anteriormente, estudios recientes demostraron que el efecto de Cu<sup>2+</sup> y la PrP<sup>C</sup> en la modulación de los receptores NMDA requiere de los seis residuos de His que anclan el metal a las regiones OR y non-OR.<sup>257</sup> Sin embargo, aún quedan muchas preguntas sin resolver sobre este mecanismo, entre ellas:

- ¿Cuál es el papel de la conformación *cis* en la modulación de los NMDAR?
- ¿Cuál es el papel de las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas en la unión PrP<sup>C</sup>-NMDAR?
- ¿Cuál es el papel de los sitios de la región non-OR en la modulación de los NMDAR?
- ¿Se forma un complejo ternario PrP<sup>C</sup>-Cu<sup>2+</sup>-NMDAR?

La mayoría de estas preguntas se pueden resolver utilizando las mutantes de PrP<sup>C</sup> previamente descritas y evaluando la formación del complejo PrP<sup>C</sup>-NMDAR. Para determinar la importancia de la conformación *cis* en la interacción se pueden utilizar las mutantes 1–3. Aún cuando se ha demostrado que la unión PrP<sup>C</sup>-NMDAR depende de la presencia de Cu<sup>2+</sup>, es necesario evaluar la importancia de las interacciones electrostáticas en la formación de este complejo. La PrP<sup>C</sup> tiene dos regiones cargadas positivamente en el N-terminal y una región hidrofóbica: la región <sup>23</sup>KKRPKPGGW<sup>31</sup>, la cual es necesaria para la interacción *cis* (mutante 3), la secuencia <sup>101</sup>KPSKPKTNMK<sup>110</sup> que se encuentra en la región non-OR entre los sitios de His96 e His111 y la región hidrofóbica <sup>112</sup>MAGAAAAGAVVGGLGGYMLG<sup>131</sup>. Para determinar el papel de las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas en la formación del complejo PrP<sup>C</sup>-NMDAR, se puede utilizar las siguientes mutantes:

- 11) Mutante K101L, K115L, K110L.** Esta proteína carece de tres de las cuatro cargas positivas presentes en la región non-OR con el objetivo de evidenciar si existe contribución de interacciones electrostáticas en la formación del complejo PrP<sup>C</sup>-NMDAR.
- 12) Mutante Δ117–130.** Esta proteína carece de parte de la región hidrofóbica que se encuentra después del sitio de la His111. La evaluación del efecto de esta delección demostraría.

Además, para determinar el efecto de la unión a Cu<sup>2+</sup> en los sitios de la región non-OR la mutante 6 y las mutantes individuales de los sitios de la región non-OR:

**13) Mutante H111A**

**14) Mutante H96A**

Finalmente para descartar la posible formación de un complejo ternario PrP<sup>C</sup>-Cu<sup>2+</sup>-NMDAR, se deben identificar los residuos de His expuestos a la superficie en el receptor NMDAR y evaluar el papel de estos en la formación del complejo PrP<sup>C</sup>-NMDAR.

### *El papel del $\text{Cu}^{2+}$ en S-nitrosilación de los receptores NMDA*

Como se mencionó previamente, los dos mecanismos de modulación de los receptores NMDA en los que participa  $\text{Cu}^{2+}$  y la PrP<sup>C</sup>—la S-nitrosilación de los receptores NMDA y la formación del complejo PrP<sup>C</sup>-NMDAR—se identificaron en condiciones experimentales muy diferentes.<sup>18,48</sup> Por lo que, uno de los primeros pasos para entender la S-nitrosilación de los receptores NMDA es demostrar si esta modificación postraducciona ocurre al formar del complejo PrP<sup>C</sup>-NMDA. Los resultados de esta Tesis sugieren que el sitio de unión a  $\text{Cu}^{2+}$  con mayor potencial para catalizar la S-nitrosilación de los receptores NMDA es el de la His111. De tal forma que, para entender con mayor detalle el papel del  $\text{Cu}^{2+}$  en la modulación de los receptores NMDA, se debe evaluar el impacto de la mutante H111A en la S-nitrosilación de los NMDA. Asimismo, con base en los resultados de esta Tesis se propone que la capacidad de los complejos  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP podría diferir entre especies debido a que solo la secuencia de la PrP<sup>C</sup> humana posee los residuos de Met109 y Met112 que estabilizan el complejo  $\text{Cu}^{+}$ -PrP<sup>C</sup>, favoreciendo su reducción. Para comprobar esta hipótesis se pueden evaluar el efecto de las siguientes mutantes en la S-nitrosilación de los NMDAR:

**15) Mutante M109L, M112V.** Estas mutaciones modifican la secuencia de la PrP<sup>C</sup> a su equivalente en la PrP<sup>C</sup> de ratón en el sitio de la His111.

### *La química detrás de las reacciones de S-nitrosilación promovidas por los complejos de $\text{Cu}^{2+}$ -PrP<sup>C</sup>*

Aunque en esta Tesis se exploró la reactividad de los complejos  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP, uno de los principales inconvenientes de la metodología utilizada fue uso de donadores de  $\text{NO}^{\bullet}$  como el NOC-9 y el NOC-12, los cuales en solución además del  $\text{NO}^{\bullet}$  liberan una diamina capaz de coordinar  $\text{Cu}^{2+}$ . Por lo que, en estudios futuros, se recomienda estudiar la reactividad de los complejos  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP utilizando  $\text{NO}^{\bullet}$  gas o bien una fuente de  $\text{NO}^{\bullet}$  que no contenga interferencias como las diaminas del NOC-9 y NOC-12.

Además, al utilizar una fuente directa de  $\text{NO}^{\bullet}$  gas, se pueden realizar estudios cinéticos e identificar los intermediarios generados durante la reducción de  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{+}$ —tales como complejos  $\text{NO-Cu}^{2+}$ -PrP—utilizando la técnica de “*stopped-flow*” acoplado a un detector de

absorción electrónica y un sistema “freeze-quench”. Además, para profundizar la caracterización de la reactividad de los complejos  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP frente al  $\text{NO}^\bullet$ , es recomendable utilizar otras técnicas espectroscópicas como ESR y CD.

Otro aspecto determinante en las reacciones de S-nitrosilación es la reactividad de las Cys. Por esta razón, es de gran importancia identificar cuál o cuáles de los residuos de Cys del receptor NMDA están involucrados en la modulación de los receptores NMDA dependiente de  $\text{Cu}^{2+}$  y PrP<sup>C</sup>, siendo los principales candidatos las Cys744 y Cys798 en la subunidad GluN1 y la Cys399 en la subunidad GluN2A.<sup>208, 209</sup> La identificación de el/los residuos de Cys involucrados en la modulación de los receptores NMDA dependiente de  $\text{Cu}^{2+}$  y PrP<sup>C</sup> es crucial, ya que abre la puerta para estudiar la reactividad de los complejos  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP en presencia de  $\text{NO}^\bullet$  y el/los dominios del receptor NMDA que posean las Cys reactivas.

#### *El impacto del corte proteolítico $\alpha$ en la modulación de los receptores NMDA mediada por $\text{Cu}^{2+}$ y PrP<sup>C</sup>*

Aunque un estudio reciente demostró que la modulación de los receptores NMDA dependiente de  $\text{Cu}^{2+}$  y PrP<sup>C</sup> requiere de los residuos de His de la región OR (His61, His69, His77, His85) y non-OR (His96 e His111),<sup>257, 266</sup> se debe evaluar si el fragmento PrPN1—donde están presentes todos los residuos de His de la región OR y la His96—puede unirse al receptor NMDA o nitrosilar los residuos de Cys de este receptor. Por otra parte, a pesar de que el fragmento PrPC1 conserva solo la His111, es importante evaluar si este fragmento puede unir al receptor NMDA a través de otro tipo de interacción.

#### *El efecto del $\beta\text{A}$ en las funciones de la PrP<sup>C</sup> dependientes de $\text{Cu}^{2+}$*

El péptido  $\beta\text{A}$ (1–16) es un modelo que permite aislar los efectos del  $\beta\text{A}$  que dependen de la coordinación de  $\text{Cu}^{2+}$  de aquellos que dependen de las interacciones hidrofóbicas del C-Terminal. Sin embargo, dado que la PrP<sup>C</sup> posee dos regiones cargadas positivamente y una región hidrofóbica, es importante estudiar como la presencia de estos aminoácidos puede prevenir o potencializar aquellas interacciones PrP<sup>C</sup>- $\beta\text{A}$  promovidas por el  $\text{Cu}^{2+}$ .

## CAPÍTULO VII. REACTIVOS, MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología de este proyecto se dividió en tres etapas: obtención de péptidos (**sección 7.1**), efecto del péptido  $\beta$ -amiloide en la coordinación de  $\text{Cu}^{2+}$  a proteína prion (**sección 7.2**) y reactividad de los complejos de  $\text{NO}^\bullet$  con los complejos  $\text{Cu}^{2+}$ -proteína prion (**sección 7.3**). A continuación, se detallan los materiales, reactivos y métodos utilizados en cada etapa de la metodología.

### 7.1. Obtención de péptidos

En esta etapa se sintetizaron, purificaron y liofilizaron el péptido  $\beta\text{A}(1-16)$  y los fragmentos 60–91, 92–99, 106–115 y 111–116 de la PrP. Además, se verificó la identidad de cada secuencia por espectrometría de masas y se determinó su porcentaje de pureza por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés). En la Tabla 7.1 se muestran las secuencias de los péptidos utilizados para la realización de este proyecto.

**Tabla 7.1. Fragmentos de la PrP y del péptido  $\beta\text{A}$  utilizados en el presente trabajo.**

Péptido	Secuencia
PrP(60–91)	Ac-PHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQ-Am
PrP(92–99)	Ac-GGGTHSQW-Am
PrP(106–115)	Ac-KTNMKHMAGA-Am
PrP(106–115) Met/Ile	Ac-KTNIKHIAGA-Am
PrP(111–116)	NH <sub>2</sub> -HMAGAA-Am
$\beta\text{A}(1-16)$	NH <sub>2</sub> -DAEFRHDSGYEVHHQK-Am

Ac: Acetilación; Am: Amidación

#### A. Síntesis de péptidos

**Materiales y reactivos:** resina Fmoc-rink amide, Fmoc-Pro, Fmoc-His(Trt), Fmoc-Gly, Fmoc-Gln (Trt), Fmoc-Trp(Boc), Fmoc-Thr(tBu), Fmoc-Ser(tBu), Fmoc-Lys(Boc), Fmoc-Asp(tBu), Fmoc-Met, Fmoc-Ala, Fmoc-Asp(tBu), Fmoc-Glu(tBu), Fmoc-Phe, Fmoc-Arg(Pbf), Fmoc-Thr(Trt) y Fmoc-Val, piperidina, 1,8-Diazobicyclo[5.4.0]undeca-7-eno (DBU), N,N'-Diisopropilcarbodiimida (DIC), acetato de etilcianohidroximina (Oxima pure), dimetilformamida grado industrial (DMF), diclorometano (DCM), isopropanol (IPA), etano-1,2-ditiol (EDT), triisopropilsilano (TIS), ninhidrina, etanol, fenol, cianuro de potasio, anhídrido acético, piridina y éter etílico.

**Métodos:** los péptidos se obtuvieron por el método de síntesis en fase sólida, en reactores tipo jeringa. Se empleó como soporte sólido partículas porosas de poliestireno funcionalizadas en la superficie con el grupo Fmoc-aminometil (Fmoc-NH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>-), conocidas comercialmente como resina Fmoc-Rink amide. Para remover al grupo Fmoc de la resina y exponer el -NH<sub>2</sub>, se empleó un medio básico compuesto por piperidina, DBU y DMF en una proporción 20:2:78 (reacción de desprotección). La solución utilizada en la desprotección se eliminó con lavados sucesivos de DMF, IPA y DCM. La eficiencia de la reacción desprotección se evaluó con la prueba de Káiser, para lo cual se tomó una muestra de la resina de síntesis y se hizo reaccionar con una mezcla en una proporción 2:1 de las soluciones A (compuesta por fenol, etanol y cianuro de potasio) y la solución B (compuesta por ninhidrina en etanol). En esta prueba dos moléculas de ninhidrina reaccionan con un grupo amino libre (-NH<sub>2</sub>) y forman un compuesto de color azul conocido como azul de Ruterma.<sup>268</sup> De tal forma que, la presencia del azul de Ruterma se usó como indicador de una desprotección exitosa.

Una vez desprotegida la resina, el primer aminoácido del extremo *C*-terminal de la secuencia a sintetizar se enlazó directamente a la superficie de la resina mediante la formación de un enlace amida -OCNH<sub>2</sub> (reacción de acople). Para esto, primero se disolvió el aminoácido protegido con Fmoc (Fmoc-aa) en DMF y se hizo reaccionar durante 10 min con cantidades equimolares de DIC (activador) y oxima pure (supresor de racemización), a fin formar un éster en el *C*-terminal del Fmoc-aa. La solución que contiene el Fmoc-aa activado se agregó al reactor de síntesis y se dejó reaccionar en cuna durante cuatro horas (acople convencional), o bien en microonda bajo las condiciones descritas en la Tabla 7.2. La solución de acople se eliminó con lavados sucesivos de DMF, IPA y DCM. Al igual que en la desprotección, la eficiencia de la reacción de acople se evaluó con la prueba de Káiser. En este caso, la ausencia del compuesto azul de Ruterma se utilizó como indicador de un acople exitoso. Los demás aminoácidos de la secuencia se enlazaron uno a uno al extremo *N*-terminal de la cadena en crecimiento por medio de reacciones sucesivas de desprotección y acople como las descritas anteriormente.



**Tabla 7.2. Condiciones para el acople de Fmoc-aa asistido por microonda**

Temperatura	50 °C
Rampa para alcanzar la temperatura	1 min
Potencia	60 watts
Tiempo	5 min
Número de ciclos	5

Una vez acoplados todos los aminoácidos, el péptido  $\beta$ A(1–16) y el fragmento PrP(111–116) se desanclaron de la resina con el extremo *N*-terminal libre. Por el contrario, los fragmentos 60–91, 92–99 y 106–115 de la PrP fueron acetilados en el extremo *N*-terminal utilizando una solución de anhídrido acético, piridina y DMF en una proporción 1:1:1. Los fragmentos 60–91, 92–99 de la PrP y el péptido  $\beta$ A(1–16) se desanclaron del soporte sólido con una solución compuesta por 95% de TFA, 2.5% de agua y 2.5% de TIS, mientras para el desanclaje de los péptidos PrP(106–115) y PrP(111–116) se utilizaron 92.5% de TFA, 2.5% de agua, 2.5% de TIS y 2.5% de EDT, éste último se agregó con la finalidad de evitar la oxidación de los residuos de Met. Después de la reacción de desanclaje, los péptidos se precipitaron en éter etílico frío y se separaron por centrifugación (4000 rpm, a 4 °C, 10 min). Posteriormente, se realizaron dos lavados con éter etílico para eliminar los residuos de la solución de desanclaje. Finalmente, el precipitado se dejó en la campana de extracción durante 12 h para eliminar el exceso de éter etílico.

## B. Purificación y liofilización

**Materiales y reactivos:** acrodiscos con membrana de PVDF de 0.45  $\mu$ m, agua tipo I con resistividad de 18.2 M $\Omega$ , ácido trifluoro acético (TFA), acetonitrilo grado cromatográfico (ACN), metanol grado cromatográfico (MeOH), columna C18 Pursuit (10  $\mu$ m  $\times$  250  $\times$  10 mm), viales de centelleo y nitrógeno líquido.

**Métodos:** todos los péptidos se purificaron por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés), en un equipo marca Waters con un sistema de bombas binario (A y B) y un detector de absorción electrónica (UV-visible) con arreglo de diodos. Se utilizó como fase estacionaria una columna semi-preparativa C18 Pursuit y como fases móviles agua acidificada con TFA (Fase A), y ACN o MeOH (Fase B). El crudo de la reacción de desanclaje se disolvió en fase móvil A, se filtró con una membrana de PDVF de

0.45  $\mu\text{m}$  y se inyectó al equipo cromatográfico. Los péptidos se eluyeron utilizando métodos tipo gradiente, los cuales fueron optimizados para cada péptido a fin de lograr la mejor separación. Los programas cromatográficos empleados se muestran en la Tabla 7.3.

**Tabla 7.3. Programas cromatográficos (HPLC) utilizados para purificar los diferentes fragmentos de la PrP y el péptido  $\beta\text{A}$  sintetizados..**

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	PrP(60–91)	
		A: Agua/TFA 0.05%	B: MeOH
0.0	0.50	100.0	0.0
6.00	4.00	100.0	0.0
8.00	4.00	70.0	30.0
35.00	4.00	40.0	60.0
37.00	4.00	0.0	100.0
42.00	4.00	0.0	100.0
44.00	4.00	100.0	0.0
49.00	4.00	100.0	0.0
51.00	0.50	100.0	0.0
52.00	0.50	100.0	0.0

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	PrP(106–115)	
		A: Agua/TFA 0.05%	B: MeOH
0.0	0.50	100.0	0.0
3.00	3.50	100.0	0.0
20.00	3.50	70.0	30.0
30.00	3.50	0.0	100.0
35.00	3.50	0.0	100.0
38.00	3.50	100.0	0.0
44.00	3.50	100.0	0.0
45.00	0.50	100.0	0.0
46.00	0.50	100.0	0.0
47.00	0.10	100.0	0.0

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	PrP(92–99)	
		A: Agua/TFA 0.05%	B: ACN
0.0	0.50	95.0	5.0
4.0	4.50	95.0	5.0
40.0	4.50	88.0	12.0
43.0	4.50	0.0	100.0
49.0	4.50	0.0	100.0
51.0	4.50	95.0	5.0
55.0	4.50	95.0	5.0
58.0	0.50	95.0	5.0
60.0	0.50	95.0	5.0

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	PrP(111–116)	
		A: Agua/TFA 0.1%	B: MeOH
0.0	0.50	100.0	0.0
4.0	4.50	100.0	0.0
8.0	4.50	100.0	0.0
35.0	4.50	95.0	5.0
38.0	4.50	0.0	100.0
44.0	4.50	0.0	100.0
47.0	4.50	100.0	0.0
53.0	4.50	100.0	0.0
56.0	0.50	100.0	0.0

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	$\beta\text{A}(1-16)$	
		A: Agua/TFA 0.07%	B: ACN
0.0	0.50	100.0	0.0
5.0	4.00	100.0	0.0
9.0	4.00	100.0	0.0
14.0	4.00	88.0	12.0
32.0	4.00	88.0	12.0
42.0	4.00	60.0	40.0
45.0	4.00	0.0	100.0
50.0	4.00	0.0	100.0
53.0	4.00	100.0	0.0
63.0	4.00	100.0	0.0
66.0	0.50	100.0	0.0
67.0	0.50	100.0	0.0

Las fracciones con el compuesto de interés de todas las corridas cromatografías se mezclaron en viales de centelleo y se congelaron utilizando nitrógeno líquido. Posteriormente, estas muestras fueron liofilizadas en un equipo Labconco modelo Stoppering Tray Dryer 230V US, a presión reducida (aproximadamente 0.2 mBar), utilizando el programa descrito en la Tabla 7.4.

**Tabla 7.4. Condiciones para la liofilización de péptidos**

Tiempo (h)	Temperatura (°C)
0.5	- 40 °C
36	- 40 °C
36	- 10 °C
10	25 °C

### C. Prueba de identidad y análisis de pureza

**Materiales y reactivos.** Acrodiscos con membrana de PVDF de 0.45  $\mu\text{m}$ , agua tipo I con resistividad de 18.2  $\text{M}\Omega$ , acetonitrilo grado cromatográfico (ACN), metanol grado cromatográfico (MeOH), viales para HPLC, ácido trifluoro acético (TFA), columna C18 Zorbax Eclipse XDB (4.6  $\mu\text{m}$   $\times$  250  $\times$  10 mm).

**Métodos:** la identidad de todos los péptidos utilizados en este proyecto se verificó por espectrometría de masas (MS, por sus siglas en inglés). Para esto, se pesaron aproximadamente 0.5 mg del péptido y se disolvieron en 500  $\mu\text{L}$  agua. La solución se filtró a través de una membrana de PDVF de 0.45  $\mu\text{m}$  en un vial para cromatografía. La muestra se inyectó a un equipo de HPLC marca agilent y acoplado a un detector de masas tipo ESI. En la tabla 4 se muestran una comparación de las masas calculadas y las experimentales para cada péptido. Se consideró una identificación positiva cuando el error entre la masa calculada y la experimental es menor a 2 ppm.

Para el análisis de pureza, se usó parte de la muestra preparada para la prueba de identidad, se inyectaron de 10–100  $\mu\text{l}$  de dicha muestra en el equipo de HPLC, utilizando como fase estacionaria una columna analítica C18 Zorbax Eclipse XDB y como fases móviles agua acidificada con TFA (Fase A), y ACN o MeOH (Fase B). Los péptidos se eluyeron empleando métodos tipo gradiente, los cuales fueron optimizados para cada secuencia a fin

de lograr la mejor separación entre el péptido de interés y sus impurezas. Los programas cromatográficos empleados se muestran en la Tabla 7.5.

**Tabla 7.5. Programas cromatográficos (HPLC) utilizados para determinar el porcentaje de pureza los diferentes fragmentos de la PrP y el péptido  $\beta$ A sintetizados.**

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	PrP(60–91)	
		A: Agua/TFA 0.05%	B: MeOH
0.0	0.50	100.0	0.0
3.50	1.00	100.0	0.0
6.00	1.00	100.0	0.0
8.00	1.00	70.0	30.0
35.00	1.00	40.0	60.0
37.00	1.00	0.0	100.0
42.00	1.00	0.0	100.0
44.00	1.00	100.0	0.0
49.00	1.00	100.0	0.0
51.00	0.50	100.0	0.0

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	PrP(106–115)	
		A: Agua/TFA 0.05%	B: MeOH
0.0	0.50	100.0	0.0
1.00	1.00	100.0	0.0
20.00	1.00	70.0	30.0
30.00	1.00	0.0	100.0
35.00	1.00	0.0	100.0
36.00	1.00	100.0	0.0
40.00	1.00	100.0	0.0
42.00	1.00	100.0	0.0
43.00	0.50	100.0	0.0

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	PrP(92–99)	
		A: Agua/TFA 0.05%	B: ACN
0.0	0.50	100.0	0.0
3.0	1.00	100.0	0.0
25.0	1.00	85.0	15.0
30.0	1.00	0.0	100.0
35.0	1.00	0.0	100.0
36.0	1.00	100.0	0.0
41.0	1.00	100.0	0.0
42.0	0.50	100.0	0.0
43.0	0.50	100.0	0.0

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	PrP(111–116)	
		A: Agua/TFA 0.1%	B: MeOH
0.0	0.50	100.0	0.0
4.0	1.00	100.0	0.0
30.0	1.00	85.0	15.0
32.0	1.00	0.0	100.0
35.0	1.00	0.0	100.0
36.0	1.00	100.0	0.0
40.0	1.00	100.0	0.0
41.0	0.50	100.0	0.0
42.0	0.50	100.0	0.0

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	$\beta$ A(1–16)	
		A: Agua/TFA 0.07%	B: ACN
0.0	0.50	100.0	0.0
1.00	1.00	100.0	0.0
20.00	1.00	90.0	10.0
40.00	1.00	80.0	20.0
45.00	1.00	0.0	100.0
55.00	1.00	0.0	100.0
56.00	1.00	100.0	0.0
60.00	1.00	100.0	0.0
61.00	0.50	100.0	0.0

El porcentaje de pureza de los péptidos se estimó como el cociente del área del pico de interés entre la suma de todas las áreas de todos los picos presentes en el cromatograma, multiplicado por 100. Para este estudio se utilizaron péptidos con un porcentaje de pureza igual o mayor al 95%, ver Tabla 7.6.

**Tabla 7.6. Pureza de los péptidos sintetizados**

<b>Péptido</b>	<b>% de pureza</b>
PrP(60–91)	95 %
PrP(92–99)	99 %
PrP(106–115)	97 %
PrP(106–115) Met/Ile	97 %
PrP(111–116)	99 %
$\beta$ A(1–16)	98–99 %

Todos los análisis de pureza fueron validados con la prueba de pureza de pico o prueba de pureza espectroscópica. Ésta tiene como finalidad descartar la co-elución de dos compuestos en un mismo pico. La prueba de pureza de pico se basa en la medición de la heterogeneidad de los espectros de absorción electrónica en la región UV-Vis (200–800 nm) en tres puntos diferentes del pico de interés. La heterogeneidad atribuible al ruido del detector se conoce como umbral de pureza, mientras la heterogeneidad observada en los espectros del pico de interés se conoce como ángulo de pureza. De tal forma que, un pico espectroscópicamente puro es aquel que tiene un ángulo de pureza igual o menor al umbral de pureza. Todos los porcentajes de pureza reportados en la Tabla 7.6 corresponden a análisis en los que el pico de interés es espectroscópicamente puro.

## **7.2. Competencia por $\text{Cu}^{2+}$ entre el péptido $\beta$ A(1–16) y la proteína prion**

En esta etapa se prepararon los complejos  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP y fueron titulados con el péptido  $\beta$ A(1–16). Todas las titulaciones se monitorizaron por dicroísmo circular electrónico (CD, por sus siglas en inglés) y resonancia de espín electrónico (ESR, por sus siglas en inglés).

**Materiales y reactivos:** N-etilmofolina (NEM), glicerol, sulfato de  $\text{Cu}^{2+}$  pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), cloruro de sodio, celdas de cuarzo de 10 mm de paso óptico y tubos para ESR de 0.4 mm de diámetro interno.

## **Métodos**

**Preparación de muestras:** Los liofilizados de los fragmentos 60–91, 92–99, 106–115 y 111–116 de la PrP se pesaron en una microbalanza Mettler Toledo y se disolvieron en una solución amortiguadora de NEM 100 mM con 50% a un pH de 7.5. Estas soluciones se prepararon a diferentes concentraciones en función del modo de coordinación a formar, ver tabla 5. Las concentraciones de PrP fueron verificadas utilizando los coeficientes de extinción molar de cada péptido, los cuales se determinaron previamente en la solución amortiguadora de trabajo. Para formar los complejos  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP, se agregaron alícuotas de una solución madre de  $\text{CuSO}_4$  (25 mM), las concentraciones finales  $\text{Cu}^{2+}$  en cada caso se indican en la Tabla 7.7.

**Tabla 7.7. Concentraciones de PrP y sulfato de  $\text{Cu}^{2+}$  utilizadas para formar los diferentes modos de coordinación  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP.**

Péptido	Concentración de PrP (mM)	Concentración de $\text{Cu}^{2+}$ (mM)
$\text{Cu}^{2+}$ -PrP(60–91)_ Modo de baja ocupación	0.80	0.17
$\text{Cu}^{2+}$ -PrP(60–91)_ Modos de alta ocupación	0.30	0.60
PrP(92–99)	0.30	0.24
PrP(106–115)	0.30	0.24
PrP(111–116)_ Modo I	0.80	0.20
PrP(111–116)_ Modo II	0.50	0.40

Los complejos  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP se titularon con alícuotas de 0.2 en 0.2 equivalentes de  $\beta\text{A}(1-16)$  hasta 2.0 equivalentes utilizando una solución madre de  $\beta\text{A}(1-16)$  a una concentración de 5 mM. Todas las titulaciones se realizaron al menos por duplicado.

**Dicroísmo circular electrónico (CD).** En todas las titulaciones de los complejos  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP, se midieron los espectros de CD de las muestras correspondientes a la adición de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 y 2.0 equivalentes de  $\beta\text{A}(1-16)$ . Las lecturas se realizaron a temperatura ambiente, en un espectropolarímetro marca Jasco, modelo J-815, utilizando celdas de cuarzo de paso óptico de 10 mm. Se realizaron dos lecturas de cada muestra de 250–300 a 800 nm, a una velocidad de escaneo de 200 nm/min.

**Resonancia de espín electrónico (ESR).** En todas las titulaciones de los complejos  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP se midieron los espectros de ESR correspondientes a 1.0 y 2.0 equivalentes de  $\beta\text{A}(1-16)$ . En la titulación de los modos de alta ocupación de  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(60–91) se midió 0.4 equivalentes de  $\beta\text{A}(1-16)$  y en la titulación del Modo II de  $\text{Cu}^{2+}$ -PrP(111–116) los espectros de 0.2 y 0.6 equivalentes de  $\beta\text{A}(1-16)$ . Todos los espectros de ESR se midieron en un equipo

de onda continua, banda X, marca Bruker, acoplado a un sistema de enfriamiento con nitrógeno líquido y empleando las condiciones indicadas en la Tabla 7.8.

**Tabla 7.8. Condiciones empleadas para medir los espectros de ESR**

Frecuencia	9.4
Temperatura	150 K
Modulación de amplitud	5 G
Modulación de frecuencia	100 kHz
Poder de la microonda	100 mW
Frecuencia	9.4

### 7.3. Reactividad de los complejos Cu<sup>2+</sup>-PrP con óxido nítrico

En esta etapa se prepararon los complejos Cu<sup>2+</sup>-PrP y se evaluó su reactividad con NOC-12 y NOC-9 (donadores de NO•) empleando la técnica de absorción electrónica en la región UV-vis.

**Materiales y reactivos.** 4-Ethylmorpholina (NEM), sulfato de Cu<sup>2+</sup> pentahidratado (CuSO<sub>4</sub>•5H<sub>2</sub>O), NOC-12 (cada molécula de NOC-12 dona dos moléculas de NO•) y celdas de cuarzo anaeróbicas de 10 mm de paso óptico.

#### Métodos

**Preparación de los complejos Cu<sup>2+</sup>-PrP:** los liofilizados de los fragmentos 92–99, 106–115 y 111–116 de la PrP se pesaron en una microbalanza Mettler Toledo en cantidades necesarias para formar obtener una concentración final de 1 mM. Los péptidos se disolvieron en una solución amortiguadora de NEM 100 mM sin glicerol a un pH de 7.5. Para formar los complejos Cu<sup>2+</sup>-PrP, se agregó una alícuota de una solución de CuSO<sub>4</sub> (25 mM) correspondiente a 0.9 equivalentes de Cu<sup>2+</sup>. Las soluciones de los complejos Cu<sup>2+</sup>-PrP se colocaron en celdas de cuarzo anaeróbicas y se redujo la concentración de oxígeno en las muestras alternando ciclos de alto vacío y N<sub>2(g)</sub> en una línea Schlenk.

**Preparación de la solución madre de NOC-12:** se pesó el donador de NO• (NOC-12) en un vial anaerobio. Posteriormente, se purgó el vial alternando ciclos de alto vacío y N<sub>2(g)</sub> en

una línea Schlenk y se disolvió el NOC-12 en solución amortiguadora previamente saturada con  $N_{2(g)}$ .

**Espectroscopia de absorción electrónica (UV-vis) en modo cinética:** la solución con el  $Cu^{2+}$ -PrP se colocó en el espectrofotómetro UV-vis con flujo continuo de  $N_{2(g)}$  y se midió el espectro de absorción electrónica. Posteriormente se agregó una alícuota de la solución madre de NOC-12 suficiente para alcanzar una concentración final de 1.5 mM, la cual corresponde a una relación estequiometrica 1:3 de PrP:NO. Inmediatamente después de agregar el NOC-12 se inició la lectura de los espectros de absorción electrónica en el modo cinética, cada 15 segundos, durante 9 h, a 37 °C.



## REFERENCIAS

1. Li, T.; Tang, H.; Zhu, J.; Zhang, J. H., The finer scale of consciousness: quantum theory. *Ann. Transl. Med.* **2019**, *7* (20), 585.
2. Camina, E.; Guell, F., The neuroanatomical, neurophysiological and psychological basis of memory: Current models and their origins. *Front. Pharmacol.* **2017**, *8*, 438.
3. Andreone, B. J.; Larhammar, M.; Lewcock, J. W., Cell Death and Neurodegeneration. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2020**, *12* (2).
4. Hippus, H.; Neundorfer, G., The discovery of Alzheimer's disease. *Dialogues Clin. Neurosci.* **2003**, *5* (1), 101-8.
5. Dahm, R., Alzheimer's discovery. *Current Biology* **2006**, *16* (21), R906-R910.
6. Kollmer, M.; Close, W.; Funk, L.; Rasmussen, J.; Bsoul, A.; Schierhorn, A.; Schmidt, M.; Sigurdson, C. J.; Jucker, M.; Fandrich, M., Cryo-EM structure and polymorphism of Abeta amyloid fibrils purified from Alzheimer's brain tissue. *Nat. Commun.* **2019**, *10* (1), 4760.
7. Falcon, B.; Zhang, W.; Schweighauser, M.; Murzin, A. G.; Vidal, R.; Garringer, H. J.; Ghetti, B.; Scheres, S. H. W.; Goedert, M., Tau filaments from multiple cases of sporadic and inherited Alzheimer's disease adopt a common fold. *Acta Neuropathol.* **2018**, *136* (5), 699-708.
8. Therriault, J.; Pascoal, T. A.; Lussier, F. Z.; Tissot, C.; Chamoun, M.; Bezgin, G.; Servaes, S.; Benedet, A. L.; Ashton, N. J.; Karikari, T. K.; Lantero-Rodriguez, J.; Kunach, P.; Wang, Y.-T.; Fernandez-Arias, J.; Massarweh, G.; Vitali, P.; Soucy, J.-P.; Saha-Chaudhuri, P.; Blennow, K.; Zetterberg, H.; Gauthier, S.; Rosa-Neto, P., Biomarker modeling of Alzheimer's disease using PET-based Braak staging. *Nature Aging* **2022**.
9. Yang, A. C.; Vest, R. T.; Kern, F.; Lee, D. P.; Agam, M.; Maat, C. A.; Losada, P. M.; Chen, M. B.; Schaum, N.; Khoury, N.; Toland, A.; Calcuttawala, K.; Shin, H.; Palovics, R.; Shin, A.; Wang, E. Y.; Luo, J.; Gate, D.; Schulz-Schaeffer, W. J.; Chu, P.; Siegenthaler, J. A.; McNerney, M. W.; Keller, A.; Wyss-Coray, T., A human brain vascular atlas reveals diverse mediators of Alzheimer's risk. *Nature* **2022**, *603* (7903), 885-892.
10. Stoloro, N.; Frenkel, D., The dialog between neurons and microglia in Alzheimer's disease: The neurotransmitters view. *J Neurochem* **2021**, *158* (6), 1412-1424.
11. Zhang, G.; Wang, Z.; Hu, H.; Zhao, M.; Sun, L., Microglia in Alzheimer's disease: A target for therapeutic intervention. *Front. Cell. Neurosci.* **2021**, *15*, 749587.
12. Elliott, C.; Rojo, A. I.; Ribe, E.; Broadstock, M.; Xia, W.; Morin, P.; Semenov, M.; Baillie, G.; Cuadrado, A.; Al-Shawi, R.; Ballard, C. G.; Simons, P.; Killick, R., A role for APP in Wnt signalling links synapse loss with beta-amyloid production. *Transl. Psychiatry* **2018**, *8* (1), 179.
13. Selkoe, D. J., Treatments for Alzheimer's disease emerge. *Science* **2021**, *373* (6555), 624-626.
14. Ren, D., Sodium leak channels in neuronal excitability and rhythmic behaviors. *Neuron* **2011**, *72* (6), 899-911.
15. Hodgkin, A. L.; Katz, B., The effect of sodium ions on the electrical activity of giant axon of the squid. *J Physiol* **1949**, *108* (1), 37-77.
16. Clapham, D. E., Calcium signaling. *Cell* **2007**, *131* (6), 1047-58.

17. Takemoto-Kimura, S.; Suzuki, K.; Horigane, S. I.; Kamijo, S.; Inoue, M.; Sakamoto, M.; Fujii, H.; Bito, H., Calmodulin kinases: essential regulators in health and disease. *J. Neurochem.* **2017**, *141* (6), 808-818.
18. Gasperini, L.; Meneghetti, E.; Pastore, B.; Benetti, F.; Legname, G., Prion protein and copper cooperatively protect neurons by modulating NMDA receptor through S-nitrosylation. *Antioxid. Redox Signal.* **2015**, *22* (9), 772-84.
19. Roat-Malone, R. M., Inorganic chemistry essentials In *Bioinorganic chemistry: A short course*, Wiley: 2007; pp 1-28.
20. Bertini, I.; Turano, P., Metal ions and proteins: Binding, stability, and folding In *Biological inorganic chemistry : structure and reactivity*, Bertini, I.; Grey, H. B.; Stiefel, E. I.; Valentine, J. S., Eds. University Science Books: Sausalito, Calif., 2007; pp 31-41.
21. Lippard, S. J.; Berg, J. M., Principles of Coordination Chemistry related to Bioinorganic Research. In *Principles of Bioinorganic Chemistry*, University Science Books: 1994; pp 21-41.
22. Bertini, I.; Turano, P., Fundamentals of coordination chemistry. In *Biological inorganic chemistry : structure and reactivity*, Bertini, I.; Grey, H. B.; Stiefel, E. I.; Valentine, J. S., Eds. University Science Books: Sausalito, Calif., 2007; pp 31-41.
23. Nitsche, A.; Arnold, C.; Ueberham, U.; Reiche, K.; Fallmann, J.; Hackermuller, J.; Horn, F.; Stadler, P. F.; Arendt, T., Alzheimer-related genes show accelerated evolution. *Mol. Psychiatry* **2020**.
24. DeTure, M. A.; Dickson, D. W., The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. *Mol. Neurodegener.* **2019**, *14* (1).
25. Soria Lopez, J. A.; Gonzalez, H. M.; Leger, G. C., Alzheimer's disease. *Handb. Clin. Neurol.* **2019**, *167*, 231-255.
26. Hyman, B. T.; Phelps, C. H.; Beach, T. G.; Bigio, E. H.; Cairns, N. J.; Carrillo, M. C.; Dickson, D. W.; Duyckaerts, C.; Frosch, M. P.; Masliah, E.; Mirra, S. S.; Nelson, P. T.; Schneider, J. A.; Thal, D. R.; Thies, B.; Trojanowski, J. Q.; Vinters, H. V.; Montine, T. J., National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* **2012**, *8* (1), 1-13.
27. Busche, M. A.; Hyman, B. T., Synergy between amyloid-beta and tau in Alzheimer's disease. *Nat. Neurosci.* **2020**, *23* (10), 1183-1193.
28. Kent, S. A.; Spires-Jones, T. L.; Durrant, C. S., The physiological roles of tau and Abeta: implications for Alzheimer's disease pathology and therapeutics. *Acta Neuropathol.* **2020**, *140* (4), 417-447.
29. Lanoiselee, H. M.; Nicolas, G.; Wallon, D.; Rovelet-Lecrux, A.; Lacour, M.; Rousseau, S.; Richard, A. C.; Pasquier, F.; Rollin-Sillaire, A.; Martinaud, O.; Quillard-Muraine, M.; de la Sayette, V.; Boutoleau-Bretonniere, C.; Etcharry-Bouyx, F.; Chauvire, V.; Sarazin, M.; le Ber, I.; Epelbaum, S.; Jonveaux, T.; Rouaud, O.; Ceccaldi, M.; Felician, O.; Godefroy, O.; Formaglio, M.; Croisile, B.; Auriacombe, S.; Chamard, L.; Vincent, J. L.; Sauvee, M.; Marelli-Tosi, C.; Gabelle, A.; Ozsancak, C.; Pariente, J.; Paquet, C.; Hannequin, D.; Campion, D.; collaborators of the, C. N. R. M. A. J. p., APP, PSEN1, and PSEN2 mutations in early-onset Alzheimer disease: A genetic screening study of familial and sporadic cases. *PLoS Med.* **2017**, *14* (3), e1002270.
30. Choi, S. H.; Kim, Y. H.; Hebisch, M.; Sliwinski, C.; Lee, S.; D'Avanzo, C.; Chen, H.; Hooli, B.; Asselin, C.; Muffat, J.; Klee, J. B.; Zhang, C.; Wainger, B. J.; Peitz, M.; Kovacs,

D. M.; Woolf, C. J.; Wagner, S. L.; Tanzi, R. E.; Kim, D. Y., A three-dimensional human neural cell culture model of Alzheimer's disease. *Nature* **2014**, *515* (7526), 274-8.

31. Mendez, M. F., Early-onset Alzheimer disease. *Neurol. Clin.* **2017**, *35* (2), 263-281.

32. Lee, M. H.; Siddoway, B.; Kaeser, G. E.; Segota, I.; Rivera, R.; Romanow, W. J.; Liu, C. S.; Park, C.; Kennedy, G.; Long, T.; Chun, J., Somatic APP gene recombination in Alzheimer's disease and normal neurons. *Nature* **2018**, *563* (7733), 639-645.

33. Garcia-Alloza, M.; Robbins, E. M.; Zhang-Nunes, S. X.; Purcell, S. M.; Betensky, R. A.; Raju, S.; Prada, C.; Greenberg, S. M.; Bacskai, B. J.; Frosch, M. P., Characterization of amyloid deposition in the APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> mouse model of Alzheimer disease. *Neurobiol. Dis.* **2006**, *24* (3), 516-24.

34. Moechars, D.; Dewachter, I.; Lorent, K.; Reverse, D.; Baekelandt, V.; Naidu, A.; Tesseur, I.; Spittaels, K.; Haute, C. V.; Checler, F.; Godaux, E.; Cordell, B.; Van Leuven, F., Early phenotypic changes in transgenic mice that overexpress different mutants of amyloid precursor protein in brain. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274* (10), 6483-92.

35. Maarouf, C. L.; Kokjohn, T. A.; Whiteside, C. M.; Macias, M. P.; Kalback, W. M.; Sabbagh, M. N.; Beach, T. G.; Vassar, R.; Roher, A. E., Molecular differences and similarities between Alzheimer's disease and the 5XFAD transgenic mouse model of amyloidosis. *Biochem Insights* **2013**, *6*, 1-10.

36. Oakley, H.; Cole, S. L.; Logan, S.; Maus, E.; Shao, P.; Craft, J.; Guillozet-Bongaarts, A.; Ohno, M.; Disterhoft, J.; Van Eldik, L.; Berry, R.; Vassar, R., Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *J Neurosci.* **2006**, *26* (40), 10129-40.

37. Sasaki, A.; Shoji, M.; Harigaya, Y.; Kawarabayashi, T.; Ikeda, M.; Naito, M.; Matsubara, E.; Abe, K.; Nakazato, Y., Amyloid cored plaques in Tg2576 transgenic mice are characterized by giant plaques, slightly activated microglia, and the lack of paired helical filament-typed, dystrophic neurites. *Virchows Arch.* **2002**, *441* (4), 358-67.

38. Rockenstein, E.; Mallory, M.; Mante, M.; Sisk, A.; Masliaha, E., Early formation of mature amyloid-beta protein deposits in a mutant APP transgenic model depends on levels of A $\beta$ (1-42). *J. Neurosci. Res.* **2001**, *66* (4), 573-82.

39. Jeremic, D.; Jimenez-Diaz, L.; Navarro-Lopez, J. D., Past, present and future of therapeutic strategies against amyloid-beta peptides in Alzheimer's disease: a systematic review. *Aging Res. Rev.* **2021**, *72*, 101496.

40. Muller, U. C.; Deller, T.; Korte, M., Not just amyloid: physiological functions of the amyloid precursor protein family. *Nat. Rev. Neurosci.* **2017**, *18* (5), 281-298.

41. Needham, B. E.; Ciccotosto, G. D.; Cappai, R., Combined deletions of amyloid precursor protein and amyloid precursor-like protein 2 reveal different effects on mouse brain metal homeostasis. *Metallomics* **2014**, *6* (3), 598-603.

42. Greenough, M. A.; Volitakis, I.; Li, Q. X.; Laughton, K.; Evin, G.; Ho, M.; Dalziel, A. H.; Camakaris, J.; Bush, A. I., Presenilins promote the cellular uptake of copper and zinc and maintain copper chaperone of SOD1-dependent copper/zinc superoxide dismutase activity. *J Biol Chem* **2011**, *286* (11), 9776-86.

43. Wang, H.; Wang, M.; Wang, B.; Li, M.; Chen, H.; Yu, X.; Yang, K.; Chai, Z.; Zhao, Y.; Feng, W., Immunogold labeling and X-ray fluorescence microscopy reveal

enrichment ratios of Cu and Zn, metabolism of APP and amyloid-beta plaque formation in a mouse model of Alzheimer's disease. *Metallomics* **2012**, *4* (10), 1113-8.

44. Zhu, X.; Victor, T. W.; Ambi, A.; Sullivan, J. K.; Hatfield, J.; Xu, F.; Miller, L. M.; Van Nostrand, W. E., Copper accumulation and the effect of chelation treatment on cerebral amyloid angiopathy compared to parenchymal amyloid plaques. *Metallomics* **2020**, *12* (4), 539-546.

45. Lutsenko, S.; Washington-Hughes, C.; Ralle, M.; Schmidt, K., Copper and the brain noradrenergic system. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2019**, *24* (8), 1179-1188.

46. Garza-Lombo, C.; Posadas, Y.; Quintanar, L.; Gonsebatt, M. E.; Franco, R., Neurotoxicity linked to dysfunctional metal ion homeostasis and xenobiotic metal exposure: Redox signaling and oxidative stress. *Antioxid. Redox. Signal.* **2018**, *28* (18), 1669-1703.

47. McGee, T. P.; Houston, C. M.; Brickley, S. G., Copper block of extrasynaptic GABAA receptors in the mature cerebellum and striatum. *J Neurosci* **2013**, *33* (33), 13431-5.

48. You, H.; Tsutsui, S.; Hameed, S.; Kannanayakal, T. J.; Chen, L.; Xia, P.; Engbers, J. D.; Lipton, S. A.; Stys, P. K.; Zamponi, G. W., Abeta neurotoxicity depends on interactions between copper ions, prion protein, and N-methyl-D-aspartate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109* (5), 1737-42.

49. Marchetti, C.; Baranowska-Bosiacka, I.; Gavazzo, P., Multiple effects of copper on NMDA receptor currents. *Brain Res* **2014**, *1542*, 20-31.

50. Salazar-Weber, N. L.; Smith, J. P., Copper inhibits NMDA receptor-independent LTP and modulates the paired-pulse ratio after LTP in mouse hippocampal slices. *Int. J. Alzheimers Dis.* **2011**, *2011*, 864753.

51. Huang, S.; Chen, L.; Bladen, C.; Stys, P. K.; Zamponi, G. W., Differential modulation of NMDA and AMPA receptors by cellular prion protein and copper ions. *Mol. Brain* **2018**, *11* (1), 62.

52. Yuan, X. Z.; Li, G. Y.; Chen, J. L.; Li, J. Q.; Wang, X. P., Paramagnetic metal accumulation in the deep gray matter nuclei is associated with neurodegeneration in Wilson's disease. *Front. Neurosci.* **2020**, *14*, 573633.

53. Hodgkinson, V. L.; Zhu, S.; Wang, Y.; Ladomersky, E.; Nickelson, K.; Weisman, G. A.; Lee, J.; Gitlin, J. D.; Petris, M. J., Autonomous requirements of the Menkes disease protein in the nervous system. *Am J Physiol Cell Physiol* **2015**, *309* (10), C660-8.

54. Deibel, M. A.; Ehmann, W. D.; Markesbery, W. R., Copper, iron, and zinc imbalances in severely degenerated brain regions in Alzheimer's disease: possible relation to oxidative stress. *J. Neurol. Sci.* **1996**, *143* (1-2), 137-42.

55. Schrag, M.; Crofton, A.; Zabel, M.; Jiffry, A.; Kirsch, D.; Dickson, A.; Mao, X. W.; Vinters, H. V.; Domaille, D. W.; Chang, C. J.; Kirsch, W., Effect of cerebral amyloid angiopathy on brain iron, copper, and zinc in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **2011**, *24* (1), 137-49.

56. Schrag, M.; Mueller, C.; Oyoyo, U.; Smith, M. A.; Kirsch, W. M., Iron, zinc and copper in the Alzheimer's disease brain: a quantitative meta-analysis. Some insight on the influence of citation bias on scientific opinion. *Prog. Neurobiol.* **2011**, *94* (3), 296-306.

57. James, S. A.; Volitakis, I.; Adlard, P. A.; Duce, J. A.; Masters, C. L.; Cherny, R. A.; Bush, A. I., Elevated labile Cu is associated with oxidative pathology in Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med* **2012**, *52* (2), 298-302.

58. Bourassa, M. W.; Leskovjan, A. C.; Tappero, R. V.; Farquhar, E. R.; Colton, C. A.; Van Nostrand, W. E.; Miller, L. M., Elevated copper in the amyloid plaques and iron in the cortex are observed in mouse models of Alzheimer's disease that exhibit neurodegeneration. *Biomed. Spectrosc. Imaging* **2013**, *2* (2), 129-139.
59. James, S. A.; Churches, Q. I.; de Jonge, M. D.; Birchall, I. E.; Streltsov, V.; McColl, G.; Adlard, P. A.; Hare, D. J., Iron, copper, and zinc concentration in abeta plaques in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease correlates with metal levels in the surrounding neuropil. *ACS Chem. Neurosci.* **2017**, *8* (3), 629-637.
60. Wang, S.; Sheng, Z.; Yang, Z.; Hu, D.; Long, X.; Feng, G.; Liu, Y.; Yuan, Z.; Zhang, J.; Zheng, H.; Zhang, X., Activatable small-molecule photoacoustic probes that cross the blood-brain barrier for visualization of copper(II) in mice with Alzheimer's disease. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2019**, *58* (36), 12415-12419.
61. Bucossi, S.; Ventriglia, M.; Panetta, V.; Salustri, C.; Pasqualetti, P.; Mariani, S.; Siotto, M.; Rossini, P. M.; Squitti, R., Copper in Alzheimer's disease: a meta-analysis of serum, plasma, and cerebrospinal fluid studies. *J. Alzheimers Dis.* **2011**, *24* (1), 175-85.
62. Squitti, R.; Polimanti, R.; Siotto, M.; Bucossi, S.; Ventriglia, M.; Mariani, S.; Vernieri, F.; Scrascia, F.; Trotta, L.; Rossini, P. M., ATP7B variants as modulators of copper dyshomeostasis in Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med* **2013**, *15* (3), 515-22.
63. Squitti, R.; Simonelli, I.; Ventriglia, M.; Siotto, M.; Pasqualetti, P.; Rembach, A.; Doecke, J.; Bush, A. I., Meta-analysis of serum non-ceruloplasmin copper in Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* **2014**, *38* (4), 809-22.
64. Smits, F. M.; Porcaro, C.; Cottone, C.; Cancelli, A.; Rossini, P. M.; Tecchio, F., Electroencephalographic fractal dimension in healthy ageing and Alzheimer's disease. *PLoS one* **2016**, *11* (2), e0149587.
65. Squitti, R.; Ventriglia, M.; Gennarelli, M.; Colabufo, N. A.; El Idrissi, I. G.; Bucossi, S.; Mariani, S.; Rongioletti, M.; Zanetti, O.; Congiu, C.; Rossini, P. M.; Bonvicini, C., Non-ceruloplasmin copper distincts subtypes in Alzheimer's disease: a genetic study of ATP7B frequency. *Mol. Neurobiol.* **2017**, *54* (1), 671-681.
66. Squitti, R.; Ghidoni, R.; Simonelli, I.; Ivanova, I. D.; Colabufo, N. A.; Zuin, M.; Benussi, L.; Binetti, G.; Cassetta, E.; Rongioletti, M.; Siotto, M., Copper dyshomeostasis in Wilson disease and Alzheimer's disease as shown by serum and urine copper indicators. *J Trace Elem Med Biol* **2018**, *45*, 181-188.
67. 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.
68. 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), 30-7.
69. Leskovjan, A. C.; Lanzirotti, A.; Miller, L. M., Amyloid plaques in PSAPP mice bind less metal than plaques in human Alzheimer's disease. *Neuroimage* **2009**, *47* (4), 1215-20.
70. Xu, J.; Church, S. J.; Patassini, S.; Begley, P.; Waldvogel, H. J.; Curtis, M. A.; Faull, R. L. M.; Unwin, R. D.; Cooper, G. J. S., Evidence for widespread, severe brain copper deficiency in Alzheimer's dementia. *Metallomics* **2017**, *9* (8), 1106-1119.

71. Squitti, R.; Siotto, M.; Cassetta, E.; El Idrissi, I. G.; Colabufo, N. A., Measurements of serum non-ceruloplasmin copper by a direct fluorescent method specific to Cu(II). *Clin Chem Lab Med* **2017**, *55* (9), 1360-1367.
72. Squitti, R.; Rossini, P. M.; Cassetta, E.; Moffa, F.; Pasqualetti, P.; Cortesi, M.; Colloca, A.; Rossi, L.; Finazzi-Agro, A., D-penicillamine reduces serum oxidative stress in Alzheimer's disease patients. *Eur. J. Clin. Invest.* **2002**, *32* (1), 51-9.
73. Rossi, L.; Squitti, R.; Pasqualetti, P.; Marchese, E.; Cassetta, E.; Forastiere, E.; Rotilio, G.; Rossini, P. M.; Finazzi-Agro, A., Red blood cell copper, zinc superoxide dismutase activity is higher in Alzheimer's disease and is decreased by D-penicillamine. *Neurosci. Lett.* **2002**, *329* (2), 137-40.
74. Zhong, M.; Kou, H.; Zhao, P.; Zheng, W.; Xu, H.; Zhang, X.; Lan, W.; Guo, C.; Wang, T.; Guo, F.; Wang, Z.; Gao, H., Nasal delivery of D-penicillamine hydrogel upregulates a Disintegrin and Metalloprotease 10 expression via melatonin receptor 1 in Alzheimer's disease models. *Front. Aging Neurosci.* **2021**, *13*, 660249.
75. Cherny, R. A.; Atwood, C. S.; Xilinas, M. E.; Gray, D. N.; Jones, W. D.; McLean, C. A.; Barnham, K. J.; Volitakis, I.; Fraser, F. W.; Kim, Y.; Huang, X.; Goldstein, L. E.; Moir, R. D.; Lim, J. T.; Beyreuther, K.; Zheng, H.; Tanzi, R. E.; Masters, C. L.; Bush, A. I., Treatment with a copper-zinc chelator markedly and rapidly inhibits beta-amyloid accumulation in Alzheimer's disease transgenic mice. *Neuron* **2001**, *30* (3), 665-76.
76. Ritchie, C. W.; Bush, A. I.; Mackinnon, A.; Macfarlane, S.; Mastwyk, M.; MacGregor, L.; Kiers, L.; Cherny, R.; Li, Q. X.; Tammer, A.; Carrington, D.; Mavros, C.; Volitakis, I.; Xilinas, M.; Ames, D.; Davis, S.; Beyreuther, K.; Tanzi, R. E.; Masters, C. L., Metal-protein attenuation with iodochlorhydroxyquin (clioquinol) targeting Abeta amyloid deposition and toxicity in Alzheimer disease: a pilot phase 2 clinical trial. *Arch. Neurol.* **2003**, *60* (12), 1685-91.
77. Ibach, B.; Haen, E.; Marienhagen, J.; Hajak, G., Clioquinol treatment in familiar early onset of Alzheimer's disease: a case report. *Pharmacopsychiatry* **2005**, *38* (4), 178-9.
78. Schafer, S.; Pajonk, F. G.; Multhaup, G.; Bayer, T. A., Copper and clioquinol treatment in young APP transgenic and wild-type mice: effects on life expectancy, body weight, and metal-ion levels. *J. Mol. Med. (Berl)* **2007**, *85* (4), 405-13.
79. Lannfelt, L.; Blennow, K.; Zetterberg, H.; Batsman, S.; Ames, D.; Harrison, J.; Masters, C. L.; Targum, S.; Bush, A. I.; Murdoch, R.; Wilson, J.; Ritchie, C. W.; group, P. E. s., Safety, efficacy, and biomarker findings of PBT2 in targeting Abeta as a modifying therapy for Alzheimer's disease: a phase IIa, double-blind, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol.* **2008**, *7* (9), 779-86.
80. Faux, N. G.; Ritchie, C. W.; Gunn, A.; Rembach, A.; Tsatsanis, A.; Bedo, J.; Harrison, J.; Lannfelt, L.; Blennow, K.; Zetterberg, H.; Ingelsson, M.; Masters, C. L.; Tanzi, R. E.; Cummings, J. L.; Herd, C. M.; Bush, A. I., PBT2 rapidly improves cognition in Alzheimer's Disease: additional phase II analyses. *J. Alzheimers Dis.* **2010**, *20* (2), 509-16.
81. Adlard, P. A.; Cherny, R. A.; Finkelstein, D. I.; Gautier, E.; Robb, E.; Cortes, M.; Volitakis, I.; Liu, X.; Smith, J. P.; Perez, K.; Laughton, K.; Li, Q. X.; Charman, S. A.; Nicolazzo, J. A.; Wilkins, S.; Deleva, K.; Lynch, T.; Kok, G.; Ritchie, C. W.; Tanzi, R. E.; Cappai, R.; Masters, C. L.; Barnham, K. J.; Bush, A. I., Rapid restoration of cognition in

Alzheimer's transgenic mice with 8-hydroxy quinoline analogs is associated with decreased interstitial Abeta. *Neuron* **2008**, *59* (1), 43-55.

82. Villemagne, V. L.; Rowe, C. C.; Barnham, K. J.; Cherny, R.; Woodward, M.; Bozinosvski, S.; Salvado, O.; Bourgeat, P.; Perez, K.; Fowler, C.; Rembach, A.; Maruff, P.; Ritchie, C.; Tanzi, R.; Masters, C. L., A randomized, exploratory molecular imaging study targeting amyloid beta with a novel 8-OH quinoline in Alzheimer's disease: The PBT2-204 IMAGINE study. *Alzheimers Dement (N Y)* **2017**, *3* (4), 622-635.

83. Sedjahtera, A.; Gunawan, L.; Bray, L.; Hung, L. W.; Parsons, J.; Okamura, N.; Villemagne, V. L.; Yanai, K.; Liu, X. M.; Chan, J.; Bush, A. I.; Finkelstein, D. I.; Barnham, K. J.; Cherny, R. A.; Adlard, P. A., Targeting metals rescues the phenotype in an animal model of tauopathy. *Metallomics* **2018**, *10* (9), 1339-1347.

84. Xu, J.; Begley, P.; Church, S. J.; Patassini, S.; McHarg, S.; Kureishy, N.; Hollywood, K. A.; Waldvogel, H. J.; Liu, H.; Zhang, S.; Lin, W.; Herholz, K.; Turner, C.; Synek, B. J.; Curtis, M. A.; Rivers-Auty, J.; Lawrence, C. B.; Kellett, K. A.; Hooper, N. M.; Vardy, E. R.; Wu, D.; Unwin, R. D.; Faull, R. L.; Dowsey, A. W.; Cooper, G. J., Elevation of brain glucose and polyol-pathway intermediates with accompanying brain-copper deficiency in patients with Alzheimer's disease: metabolic basis for dementia. *Sci Rep* **2016**, *6*, 27524.

85. Mao, X.; Schimmer, A. D., The toxicology of Clioquinol. *Toxicol. Lett.* **2008**, *182* (1-3), 1-6.

86. Cahoon, L., The curious case of clioquinol. *Nat. Med.* **2009**, *15* (4), 356-9.

87. Summers, K. L.; Dolgova, N. V.; Gagnon, K. B.; Sopasis, G. J.; James, A. K.; Lai, B.; Sylvain, N. J.; Harris, H. H.; Nichol, H. K.; George, G. N.; Pickering, I. J., PBT2 acts through a different mechanism of action than other 8-hydroxyquinolines: an X-ray fluorescence imaging study. *Metallomics* **2020**, *12* (12), 1979-1994.

88. Drew, S. C., The case for abandoning therapeutic chelation of copper ions in Alzheimer's disease. *Front. Neurosci.* **2017**, *11*, 317.

89. Baumkotter, F.; Schmidt, N.; Vargas, C.; Schilling, S.; Weber, R.; Wagner, K.; Fiedler, S.; Klug, W.; Radzimanowski, J.; Nickolaus, S.; Keller, S.; Eggert, S.; Wild, K.; Kins, S., Amyloid precursor protein dimerization and synaptogenic function depend on copper binding to the growth factor-like domain. *J. Neurosci.* **2014**, *34* (33), 11159-72.

90. Kong, G. K.; Adams, J. J.; Harris, H. H.; Boas, J. F.; Curtain, C. C.; Galatis, D.; Masters, C. L.; Barnham, K. J.; McKinstry, W. J.; Cappai, R.; Parker, M. W., Structural studies of the Alzheimer's amyloid precursor protein copper-binding domain reveal how it binds copper ions. *J. Mol. Biol.* **2007**, *367* (1), 148-61.

91. Dahms, S. O.; Konnig, I.; Roeser, D.; Guhrs, K. H.; Mayer, M. C.; Kaden, D.; Multhaup, G.; Than, M. E., Metal binding dictates conformation and function of the amyloid precursor protein (APP) E2 domain. *J. Mol. Biol.* **2012**, *416* (3), 438-52.

92. Young, T. R.; Pukala, T. L.; Cappai, R.; Wedd, A. G.; Xiao, Z., The Human Amyloid Precursor Protein Binds Copper Ions Dominated by a Picomolar-Affinity Site in the Helix-Rich E2 Domain. *Biochemistry* **2018**, *57* (28), 4165-4176.

93. Liebsch, F.; Aourousseau, M. R. P.; Bethge, T.; McGuire, H.; Scolari, S.; Herrmann, A.; Blunck, R.; Bowie, D.; Multhaup, G., Full-length cellular beta-secretase has a trimeric subunit stoichiometry, and its sulfur-rich transmembrane interaction site modulates cytosolic copper compartmentalization. *J Biol Chem* **2017**, *292* (32), 13258-13270.

94. Munter, L. M.; Sieg, H.; Bethge, T.; Liebsch, F.; Bierkandt, F. S.; Schlegler, M.; Bittner, H. J.; Heberle, J.; Jakubowski, N.; Hildebrand, P. W.; Multhaup, G., Model

peptides uncover the role of the beta-secretase transmembrane sequence in metal ion mediated oligomerization. *J Am Chem Soc* **2013**, *135* (51), 19354-61.

95. Bittner, H. J.; Guixa-Gonzalez, R.; Hildebrand, P. W., Structural basis for the interaction of the beta-secretase with copper. *Biochim Biophys Acta Biomembr* **2018**, *1860* (5), 1105-1113.

96. Alies, B.; Renaglia, E.; Rozga, M.; Bal, W.; Faller, P.; Hureau, C., Cu(II) affinity for the Alzheimer's peptide: tyrosine fluorescence studies revisited. *Anal. Chem.* **2013**, *85* (3), 1501-8.

97. Posadas, Y.; Lopez-Guerrero, V. E.; Segovia, J.; Perez-Cruz, C.; Quintanar, L., Dissecting the copper bioinorganic chemistry of the functional and pathological roles of the prion protein: Relevance in Alzheimer's disease and cancer. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2022**, *66*, 102098.

98. Liu, L.; Ding, L.; Rovere, M.; Wolfe, M. S.; Selkoe, D. J., A cellular complex of BACE1 and gamma-secretase sequentially generates Abeta from its full-length precursor. *J. Cell. Biol.* **2019**, *218* (2), 644-663.

99. Kepp, K. P., Alzheimer's disease: How metal ions define  $\beta$ -amyloid function. *Coord. Chem. Rev.* **2017**, *351*, 127-159.

100. Faller, P.; Hureau, C., Bioinorganic chemistry of copper and zinc ions coordinated to amyloid-beta peptide. *Dalton Trans.* **2009**, (7), 1080-94.

101. Iljina, M.; Garcia, G. A.; Dear, A. J.; Flint, J.; Narayan, P.; Michaels, T. C.; Dobson, C. M.; Frenkel, D.; Knowles, T. P.; Klenerman, D., Quantitative analysis of co-oligomer formation by amyloid-beta peptide isoforms. *Sci Rep* **2016**, *6*, 28658.

102. Novo, M.; Freire, S.; Al-Soufi, W., Critical aggregation concentration for the formation of early Amyloid-beta (1-42) oligomers. *Sci Rep* **2018**, *8* (1), 1783.

103. Vivekanandan, S.; Brender, J. R.; Lee, S. Y.; Ramamoorthy, A., A partially folded structure of amyloid-beta(1-40) in an aqueous environment. *Biochem Biophys Res Commun* **2011**, *411* (2), 312-6.

104. Shea, D.; Hsu, C. C.; Bi, T. M.; Paranjapye, N.; Childers, M. C.; Cochran, J.; Tomberlin, C. P.; Wang, L.; Paris, D.; Zonderman, J.; Varani, G.; Link, C. D.; Mullan, M.; Daggett, V., alpha-Sheet secondary structure in amyloid beta-peptide drives aggregation and toxicity in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2019**, *116* (18), 8895-8900.

105. Marquez, M.; Blancas-Mejia, L. M.; Campos, A.; Rojas, L.; Castaneda-Hernandez, G.; Quintanar, L., A bifunctional non-natural tetrapeptide modulates amyloid-beta peptide aggregation in the presence of Cu(ii). *Metallomics* **2014**, *6* (12), 2189-92.

106. 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<sup>2+</sup> or Zn<sup>2+</sup>. *FEBS J* **2009**, *276* (15), 4051-60.

107. Weibull, M. G. M.; Simonsen, S.; Oksbjerg, C. R.; Tiwari, M. K.; Hemmingsen, L., Effects of Cu(II) on the aggregation of amyloid-beta. *J Biol Inorg Chem* **2019**, *24* (8), 1197-1215.

108. Jun, S.; Saxena, S., The aggregated state of amyloid-beta peptide in vitro depends on Cu<sup>2+</sup> ion concentration. *Angew Chem Int Ed Engl* **2007**, *46* (21), 3959-61.

109. Tougu, V.; Karafin, A.; Zovo, K.; Chung, R. S.; Howells, C.; West, A. K.; Palumaa, P., Zn(II)- and Cu(II)-induced non-fibrillar aggregates of amyloid-beta (1-42) peptide



are transformed to amyloid fibrils, both spontaneously and under the influence of metal chelators. *J Neurochem* **2009**, *110* (6), 1784-95.

110. Dai, X.; Sun, Y.; Gao, Z.; Jiang, Z., Copper enhances amyloid-beta peptide neurotoxicity and non beta-aggregation: a series of experiments conducted upon copper-bound and copper-free amyloid-beta peptide. *J Mol Neurosci* **2010**, *41* (1), 66-73.

111. Kamenetz, F.; Tomita, T.; Hsieh, H.; Seabrook, G.; Borchelt, D.; Iwatsubo, T.; Sisodia, S.; Malinow, R., APP processing and synaptic function. *Neuron* **2003**, *37* (6), 925-37.

112. Cirrito, J. R.; Yamada, K. A.; Finn, M. B.; Sloviter, R. S.; Bales, K. R.; May, P. C.; Schoepp, D. D.; Paul, S. M.; Mennerick, S.; Holtzman, D. M., Synaptic activity regulates interstitial fluid amyloid-beta levels in vivo. *Neuron* **2005**, *48* (6), 913-22.

113. Bero, A. W.; Yan, P.; Roh, J. H.; Cirrito, J. R.; Stewart, F. R.; Raichle, M. E.; Lee, J. M.; Holtzman, D. M., Neuronal activity regulates the regional vulnerability to amyloid-beta deposition. *Nat. Neurosci.* **2011**, *14* (6), 750-6.

114. Puzzo, D.; Privitera, L.; Leznik, E.; Fa, M.; Staniszewski, A.; Palmeri, A.; Arancio, O., Picomolar amyloid-beta positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus. *J. Neurosci.* **2008**, *28* (53), 14537-45.

115. Morley, J. E.; Farr, S. A.; Banks, W. A.; Johnson, S. N.; Yamada, K. A.; Xu, L., A physiological role for amyloid-beta protein: enhancement of learning and memory. *J Alzheimers Dis* **2010**, *19* (2), 441-9.

116. Puzzo, D.; Privitera, L.; Fa, M.; Staniszewski, A.; Hashimoto, G.; Aziz, F.; Sakurai, M.; Ribe, E. M.; Troy, C. M.; Mercken, M.; Jung, S. S.; Palmeri, A.; Arancio, O., Endogenous amyloid-beta is necessary for hippocampal synaptic plasticity and memory. *Ann Neurol* **2011**, *69* (5), 819-30.

117. Gulisano, W.; Melone, M.; Ripoli, C.; Tropea, M. R.; Li Puma, D. D.; Giunta, S.; Cocco, S.; Marcotulli, D.; Origlia, N.; Palmeri, A.; Arancio, O.; Conti, F.; Grassi, C.; Puzzo, D., Neuromodulatory action of picomolar extracellular Abeta42 oligomers on presynaptic and postsynaptic mechanisms underlying synaptic function and memory. *J. Neurosci.* **2019**, *39* (30), 5986-6000.

118. He, Y.; Wei, M.; Wu, Y.; Qin, H.; Li, W.; Ma, X.; Cheng, J.; Ren, J.; Shen, Y.; Chen, Z.; Sun, B.; Huang, F. D.; Shen, Y.; Zhou, Y. D., Amyloid beta oligomers suppress excitatory transmitter release via presynaptic depletion of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Nat. Commun.* **2019**, *10* (1), 1193.

119. Wei, W.; Nguyen, L. N.; Kessels, H. W.; Hagiwara, H.; Sisodia, S.; Malinow, R., Amyloid beta from axons and dendrites reduces local spine number and plasticity. *Nat Neurosci* **2010**, *13* (2), 190-6.

120. Mura, E.; Zappettini, S.; Preda, S.; Biundo, F.; Lanni, C.; Grilli, M.; Cavallero, A.; Olivero, G.; Salamone, A.; Govoni, S.; Marchi, M., Dual effect of beta-amyloid on alpha7 and alpha4beta2 nicotinic receptors controlling the release of glutamate, aspartate and GABA in rat hippocampus. *PLoS One* **2012**, *7* (1), e29661.

121. Gulisano, W.; Melone, M.; Li Puma, D. D.; Tropea, M. R.; Palmeri, A.; Arancio, O.; Grassi, C.; Conti, F.; Puzzo, D., The effect of amyloid-beta peptide on synaptic plasticity and memory is influenced by different isoforms, concentrations, and aggregation status. *Neurobiol Aging* **2018**, *71*, 51-60.

122. Hureau, C.; Faller, P., Abeta-mediated ROS production by Cu ions: structural insights, mechanisms and relevance to Alzheimer's disease. *Biochimie* **2009**, *91* (10), 1212-7.
123. Black, S. A.; Stys, P. K.; Zamponi, G. W.; Tsutsui, S., Cellular prion protein and NMDA receptor modulation: protecting against excitotoxicity. *Front Cell Dev Biol* **2014**, *2*, 45.
124. Zhang, Y.; Zhao, Y.; Zhang, L.; Yu, W.; Wang, Y.; Chang, W., Cellular prion protein as a receptor of toxic amyloid-beta42 oligomers is important for Alzheimer's disease. *Front. Cell. Neurosci.* **2019**, *13*, 339.
125. Stahl, N.; Borchelt, D. R.; Hsiao, K.; Prusiner, S. B., Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell* **1987**, *51* (2), 229-40.
126. Nicolas, O.; Gavin, R.; del Rio, J. A., New insights into cellular prion protein (PrPc) functions: the "ying and yang" of a relevant protein. *Brain Res. Rev.* **2009**, *61* (2), 170-84.
127. Ford, M. J.; Burton, L. J.; Morris, R. J.; Hall, S. M., Selective expression of prion protein in peripheral tissues of the adult mouse. *Neuroscience* **2002**, *113* (1), 177-92.
128. Wulf, M. A.; Senatore, A.; Aguzzi, A., The biological function of the cellular prion protein: an update. *BMC Biol.* **2017**, *15* (1), 34.
129. Zahn, R.; Liu, A.; Luhrs, T.; Riek, R.; von Schroetter, C.; Lopez Garcia, F.; Billeter, M.; Calzolari, L.; Wider, G.; Wuthrich, K., NMR solution structure of the human prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2000**, *97* (1), 145-50.
130. Kuffer, A.; Lakkaraju, A. K.; Mogha, A.; Petersen, S. C.; Airich, K.; Doucerain, C.; Marpakwar, R.; Bakirci, P.; Senatore, A.; Monnard, A.; Schiavi, C.; Nuvolone, M.; Grosshans, B.; Hornemann, S.; Bassilana, F.; Monk, K. R.; Aguzzi, A., The prion protein is an agonistic ligand of the G protein-coupled receptor Adgrg6. *Nature* **2016**, *536* (7617), 464-8.
131. Zanata, S. M.; Lopes, M. H.; Mercadante, A. F.; Hajj, G. N.; Chiarini, L. B.; Nomizo, R.; Freitas, A. R.; Cabral, A. L.; Lee, K. S.; Juliano, M. A.; de Oliveira, E.; Jachieri, S. G.; Burlingame, A.; Huang, L.; Linden, R.; Brentani, R. R.; Martins, V. R., Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. *EMBO J.* **2002**, *21* (13), 3307-16.
132. Jones, C. E.; Klewpatinond, M.; Abdelraheim, S. R.; Brown, D. R.; Viles, J. H., Probing copper<sup>2+</sup> binding to the prion protein using diamagnetic nickel<sup>2+</sup> and <sup>1</sup>H NMR: the unstructured N terminus facilitates the coordination of six copper<sup>2+</sup> ions at physiological concentrations. *J. Mol. Biol.* **2005**, *346* (5), 1393-407.
133. Walter, E. D.; Chattopadhyay, M.; Millhauser, G. L., The affinity of copper binding to the prion protein octarepeat domain: evidence for negative cooperativity. *Biochemistry* **2006**, *45* (43), 13083-92.
134. Chen, S. G.; Teplow, D. B.; Parchi, P.; Teller, J. K.; Gambetti, P.; Autilio-Gambetti, L., Truncated forms of the human prion protein in normal brain and in prion diseases. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270* (32), 19173-80.
135. Laffont-Proust, I.; Faucheux, B. A.; Hassig, R.; Sazdovitch, V.; Simon, S.; Grassi, J.; Hauw, J. J.; Moya, K. L.; Haik, S., The N-terminal cleavage of cellular prion protein in the human brain. *FEBS Lett.* **2005**, *579* (28), 6333-7.

136. McDonald, A. J.; Dibble, J. P.; Evans, E. G.; Millhauser, G. L., A new paradigm for enzymatic control of alpha-cleavage and beta-cleavage of the prion protein. *J Biol Chem* **2014**, *289* (2), 803-13.
137. 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), 12647-56.
138. Quintanar, L.; Rivillas-Acevedo, L.; Grande-Aztatzi, R.; Gómez-Castro, C. Z.; Arcos-López, T.; Vela, A., Copper coordination to the prion protein: Insights from theoretical studies. *Coord. Chem. Rev.* **2013**, *257* (2), 429-444.
139. Klewpatinond, M.; Davies, P.; Bowen, S.; Brown, D. R.; Viles, J. H., Deconvoluting the Cu<sup>2+</sup> binding modes of full-length prion protein. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283* (4), 1870-81.
140. Sánchez-López, C.; Rivillas-Acevedo, L.; Cruz-Vásquez, O.; Quintanar, L., Methionine 109 plays a key role in Cu(II) binding to His111 in the 92–115 fragment of the human prion protein. *Inorganica Chimica Acta* **2018**, *481*, 87-97.
141. Schilling, K. M.; Tao, L.; Wu, B.; Kiblen, J. T. M.; Ubilla-Rodriguez, N. C.; Pushie, M. J.; Britt, R. D.; Roseman, G. P.; Harris, D. A.; Millhauser, G. L., Both N-Terminal and C-Terminal Histidine Residues of the Prion Protein Are Essential for Copper Coordination and Neuroprotective Self-Regulation. *J. Mol. Biol.* **2020**, *432* (16), 4408-4425.
142. Liu, L.; Jiang, D.; McDonald, A.; Hao, Y.; Millhauser, G. L.; Zhou, F., Copper redox cycling in the prion protein depends critically on binding mode. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (31), 12229-37.
143. Arcos-Lopez, T.; Qayyum, M.; Rivillas-Acevedo, L.; Miotto, M. C.; Grande-Aztatzi, R.; Fernandez, C. O.; Hedman, B.; Hodgson, K. O.; Vela, A.; Solomon, E. I.; Quintanar, L., Spectroscopic and theoretical study of Cu(I) binding to His111 in the human prion protein fragment 106-115. *Inorg Chem* **2016**, *55* (6), 2909-22.
144. Sánchez-López, C.; Fernández, C. O.; Quintanar, L., Neuroprotective alpha-cleavage of the human prion protein significantly impacts Cu(ii) coordination at its His111 site. *Dalton Trans.* **2018**, *47* (28), 9274-9282.
145. Casella, L.; Gullotti, M., Coordination modes of histidine. 4. Coordination structures in the copper(II)-L-histidine (1:2) system. *J. Inorg. Biochem.* **1983**, *18* (1), 19-31.
146. Ferrer, I.; Blanco, R.; Carmona, M.; Puig, B.; Ribera, R.; Rey, M. J.; Ribalta, T., Prion protein expression in senile plaques in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* **2001**, *101* (1), 49-56.
147. Velayos, J. L.; Irujo, A.; Cuadrado-Tejedor, M.; Paternain, B.; Moleres, F. J.; Ferrer, V., The cellular prion protein and its role in Alzheimer disease. *Prion* **2009**, *3* (2), 110-7.
148. Takahashi, R. H.; Tobiume, M.; Sato, Y.; Sata, T.; Gouras, G. K.; Takahashi, H., Accumulation of cellular prion protein within dystrophic neurites of amyloid plaques in the Alzheimer's disease brain. *Neuropathology* **2011**, *31* (3), 208-14.
149. Vergara, C.; Ordonez-Gutierrez, L.; Wandosell, F.; Ferrer, I.; del Rio, J. A.; Gavin, R., Role of PrP(C) Expression in Tau Protein Levels and Phosphorylation in Alzheimer's Disease Evolution. *Mol Neurobiol* **2015**, *51* (3), 1206-20.

150. Takahashi, R. H.; Yokotsuka, M.; Tobiume, M.; Sato, Y.; Hasegawa, H.; Nagao, T.; Gouras, G. K., Accumulation of cellular prion protein within beta-amyloid oligomer plaques in aged human brains. *Brain Pathol* **2021**, e12941.
151. Gomes, L. A.; Hipp, S. A.; Rijal Upadhaya, A.; Balakrishnan, K.; Ospitalieri, S.; Koper, M. J.; Largo-Barrientos, P.; Uytterhoeven, V.; Reichwald, J.; Rabe, S.; Vandenberghe, R.; von Arnim, C. A. F.; Tousseyn, T.; Feederle, R.; Giudici, C.; Willem, M.; Staufenbiel, M.; Thal, D. R., Abeta-induced acceleration of Alzheimer-related tau-pathology spreading and its association with prion protein. *Acta Neuropathol* **2019**, *138* (6), 913-941.
152. Lidon, L.; Vergara, C.; Ferrer, I.; Hernandez, F.; Avila, J.; Del Rio, J. A.; Gavin, R., Tau protein as a new regulator of cellular prion protein transcription. *Mol. Neurobiol.* **2020**, *57* (10), 4170-4186.
153. Schwarze-Eicker, K.; Keyvani, K.; Gortz, N.; Westaway, D.; Sachser, N.; Paulus, W., Prion protein (PrP<sup>C</sup>) promotes beta-amyloid plaque formation. *Neurobiol Aging* **2005**, *26* (8), 1177-82.
154. Saijo, E.; Scheff, S. W.; Telling, G. C., Unaltered prion protein expression in Alzheimer disease patients. *Prion* **2011**, *5* (2), 109-16.
155. Dohler, F.; Sepulveda-Falla, D.; Krasemann, S.; Altmeyen, H.; Schluter, H.; Hildebrand, D.; Zerr, I.; Matschke, J.; Glatzel, M., High molecular mass assemblies of amyloid-beta oligomers bind prion protein in patients with Alzheimer's disease. *Brain* **2014**, *137* (Pt 3), 873-86.
156. Beland, M.; Bedard, M.; Tremblay, G.; Lavigne, P.; Roucou, X., Abeta induces its own prion protein N-terminal fragment (PrPN1)-mediated neutralization in amorphous aggregates. *Neurobiol Aging* **2014**, *35* (7), 1537-48.
157. Foley, A. R.; Roseman, G. P.; Chan, K.; Smart, A.; Finn, T. S.; Yang, K.; Lokey, R. S.; Millhauser, G. L.; Raskatov, J. A., Evidence for aggregation-independent, PrP(C)-mediated Abeta cellular internalization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2020**, *117* (46), 28625-28631.
158. Kang, M.; Kim, S. Y.; An, S. S.; Ju, Y. R., Characterizing affinity epitopes between prion protein and beta-amyloid using an epitope mapping immunoassay. *Exp Mol Med* **2013**, *45*, e34.
159. 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), 1128-32.
160. Chen, S.; Yadav, S. P.; Surewicz, W. K., Interaction between human prion protein and amyloid-beta (Abeta) oligomers: role OF N-terminal residues. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285* (34), 26377-83.
161. Nieznanski, K.; Surewicz, K.; Chen, S.; Nieznanska, H.; Surewicz, W. K., Interaction between prion protein and Abeta amyloid fibrils revisited. *ACS Chem Neurosci* **2014**, *5* (5), 340-5.
162. Bate, C.; Williams, A., Amyloid-beta-induced synapse damage is mediated via cross-linkage of cellular prion proteins. *J Biol Chem* **2011**, *286* (44), 37955-37963.
163. Barry, A. E.; Klyubin, I.; Mc Donald, J. M.; Mably, A. J.; Farrell, M. A.; Scott, M.; Walsh, D. M.; Rowan, M. J., Alzheimer's disease brain-derived amyloid-beta-mediated inhibition of LTP in vivo is prevented by immunotargeting cellular prion protein. *J Neurosci* **2011**, *31* (20), 7259-63.

164. Kudo, W.; Lee, H. P.; Zou, W. Q.; Wang, X.; Perry, G.; Zhu, X.; Smith, M. A.; Petersen, R. B.; Lee, H. G., Cellular prion protein is essential for oligomeric amyloid-beta-induced neuronal cell death. *Hum Mol Genet* **2012**, *21* (5), 1138-44.
165. Larson, M.; Sherman, M. A.; Amar, F.; Nuvolone, M.; Schneider, J. A.; Bennett, D. A.; Aguzzi, A.; Lesne, S. E., The complex PrP(c)-Fyn couples human oligomeric Abeta with pathological tau changes in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* **2012**, *32* (47), 16857-71a.
166. Um, J. W.; Nygaard, H. B.; Heiss, J. K.; Kostylev, M. A.; Stagi, M.; Vortmeyer, A.; Wisniewski, T.; Gunther, E. C.; Strittmatter, S. M., Alzheimer amyloid- $\beta$  oligomer bound to postsynaptic prion protein activates Fyn to impair neurons. *Nature Neuroscience* **2012**, *15* (9), 1227-1235.
167. Haas, L. T.; Kostylev, M. A.; Strittmatter, S. M., Therapeutic molecules and endogenous ligands regulate the interaction between brain cellular prion protein (PrPC) and metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5). *J Biol Chem* **2014**, *289* (41), 28460-77.
168. Hu, N. W.; Nicoll, A. J.; Zhang, D.; Mably, A. J.; O'Malley, T.; Purro, S. A.; Terry, C.; Collinge, J.; Walsh, D. M.; Rowan, M. J., mGlu5 receptors and cellular prion protein mediate amyloid-beta-facilitated synaptic long-term depression in vivo. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 3374.
169. Hamilton, A.; Vasefi, M.; Vander Tuin, C.; McQuaid, R. J.; Anisman, H.; Ferguson, S. S., Chronic pharmacological mGluR5 inhibition prevents cognitive impairment and reduces pathogenesis in an Alzheimer disease mouse model. *Cell Rep* **2016**, *15* (9), 1859-65.
170. Haas, L. T.; Strittmatter, S. M., Oligomers of amyloid beta prevent physiological activation of the cellular prion protein-metabotropic glutamate receptor 5 complex by glutamate in Alzheimer's disease. *J Biol Chem* **2016**, *291* (33), 17112-21.
171. Beraldo, F. H.; Ostapchenko, V. G.; Caetano, F. A.; Guimaraes, A. L.; Ferretti, G. D.; Daude, N.; Bertram, L.; Nogueira, K. O.; Silva, J. L.; Westaway, D.; Cashman, N. R.; Martins, V. R.; Prado, V. F.; Prado, M. A., Regulation of amyloid beta oligomer binding to neurons and neurotoxicity by the prion protein-mGluR5 complex. *J Biol Chem* **2016**, *291* (42), 21945-21955.
172. Haas, L. T.; Salazar, S. V.; Smith, L. M.; Zhao, H. R.; Cox, T. O.; Herber, C. S.; Degnan, A. P.; Balakrishnan, A.; Macor, J. E.; Albright, C. F.; Strittmatter, S. M., Silent allosteric modulation of mGluR5 maintains glutamate signaling while rescuing Alzheimer's mouse phenotypes. *Cell Rep* **2017**, *20* (1), 76-88.
173. Abd-Elrahman, K. S.; Albaker, A.; de Souza, J. M.; Ribeiro, F. M.; Schlossmacher, M. G.; Tiberi, M.; Hamilton, A.; Ferguson, S. S. G., Abeta oligomers induce pathophysiological mGluR5 signaling in Alzheimer's disease model mice in a sex-selective manner. *Sci. Signal* **2020**, *13* (662).
174. Nieznanski, K.; Choi, J. K.; Chen, S.; Surewicz, K.; Surewicz, W. K., Soluble prion protein inhibits amyloid-beta (Abeta) fibrillization and toxicity. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287* (40), 33104-8.
175. Fluharty, B. R.; Biasini, E.; Stravalaci, M.; Scip, A.; Diomede, L.; Balducci, C.; La Vitola, P.; Messa, M.; Colombo, L.; Forloni, G.; Borsello, T.; Gobbi, M.; Harris, D. A., An N-terminal fragment of the prion protein binds to amyloid-beta oligomers and inhibits their neurotoxicity in vivo. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288* (11), 7857-7866.

176. Scott-McKean, J. J.; Surewicz, K.; Choi, J. K.; Ruffin, V. A.; Salameh, A. I.; Nieznanski, K.; Costa, A. C. S.; Surewicz, W. K., Soluble prion protein and its N-terminal fragment prevent impairment of synaptic plasticity by Abeta oligomers: Implications for novel therapeutic strategy in Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* **2016**, *91*, 124-131.
177. Falker, C.; Hartmann, A.; Guett, I.; Dohler, F.; Altmeppen, H.; Betzel, C.; Schubert, R.; Thurm, D.; Wegwitz, F.; Joshi, P.; Verderio, C.; Krasemann, S.; Glatzel, M., Exosomal cellular prion protein drives fibrillization of amyloid beta and counteracts amyloid beta-mediated neurotoxicity. *J Neurochem* **2016**, *137* (1), 88-100.
178. Jarosz-Griffiths, H. H.; Corbett, N. J.; Rowland, H. A.; Fisher, K.; Jones, A. C.; Baron, J.; Howell, G. J.; Cowley, S. A.; Chintawar, S.; Cader, M. Z.; Kellett, K. A. B.; Hooper, N. M., Proteolytic shedding of the prion protein via activation of metallopeptidase ADAM10 reduces cellular binding and toxicity of amyloid-beta oligomers. *J Biol Chem* **2019**, *294* (17), 7085-7097.
179. Hansen, K. B.; Yi, F.; Perszyk, R. E.; Furukawa, H.; Wollmuth, L. P.; Gibb, A. J.; Traynelis, S. F., Structure, function, and allosteric modulation of NMDA receptors. *J. Gen. Physiol.* **2018**, *150* (8), 1081-1105.
180. Lerdkrai, C.; Asavapanumas, N.; Brawek, B.; Kovalchuk, Y.; Mojtahedi, N.; Olmedillas Del Moral, M.; Garaschuk, O., Intracellular Ca(2+) stores control in vivo neuronal hyperactivity in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115* (6), E1279-E1288.
181. Haberman, R. P.; Branch, A.; Gallagher, M., Targeting neural hyperactivity as a treatment to stem progression of late-onset Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics* **2017**, *14* (3), 662-676.
182. Younan, N. D.; Sarell, C. J.; Davies, P.; Brown, D. R.; Viles, J. H., The cellular prion protein traps Alzheimer's Abeta in an oligomeric form and disassembles amyloid fibers. *FASEB J* **2013**, *27* (5), 1847-58.
183. Williams, T. L.; Choi, J. K.; Surewicz, K.; Surewicz, W. K., Soluble prion protein binds isolated low molecular weight amyloid-beta oligomers causing cytotoxicity inhibition. *ACS Chem Neurosci* **2015**, *6* (12), 1972-80.
184. Bove-Fenderson, E.; Urano, R.; Straub, J. E.; Harris, D. A., Cellular prion protein targets amyloid-beta fibril ends via its C-terminal domain to prevent elongation. *J Biol Chem* **2017**, *292* (41), 16858-16871.
185. Nieznanska, H.; Bandyszewska, M.; Surewicz, K.; Zajkowski, T.; Surewicz, W. K.; Nieznanski, K., Identification of prion protein-derived peptides of potential use in Alzheimer's disease therapy. *Biochim Biophys Acta Mol. Basis. Dis.* **2018**, *1864* (6 Pt A), 2143-2153.
186. Madhu, P.; Mukhopadhyay, S., Preferential recruitment of conformationally distinct amyloid-beta oligomers by the intrinsically disordered region of the human prion protein. *ACS Chem. Neurosci.* **2020**, *11* (1), 86-98.
187. Gimbel, D. A.; Nygaard, H. B.; Coffey, E. E.; Gunther, E. C.; Lauren, J.; Gimbel, Z. A.; Strittmatter, S. M., Memory impairment in transgenic Alzheimer mice requires cellular prion protein. *J Neurosci* **2010**, *30* (18), 6367-74.
188. Balducci, C.; Beeg, M.; Stravalaci, M.; Bastone, A.; Scip, A.; Biasini, E.; Tapella, L.; Colombo, L.; Manzoni, C.; Borsello, T.; Chiesa, R.; Gobbi, M.; Salmona, M.; Forloni, G., Synthetic amyloid-beta oligomers impair long-term memory independently of cellular prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107* (5), 2295-300.

189. Caetano, F. A.; Beraldo, F. H.; Hajj, G. N.; Guimaraes, A. L.; Jurgensen, S.; Wasilewska-Sampaio, A. P.; Hirata, P. H.; Souza, I.; Machado, C. F.; Wong, D. Y.; De Felice, F. G.; Ferreira, S. T.; Prado, V. F.; Rylett, R. J.; Martins, V. R.; Prado, M. A., Amyloid-beta oligomers increase the localization of prion protein at the cell surface. *J Neurochem* **2011**, *117* (3), 538-53.
190. Chen, R. J.; Chang, W. W.; Lin, Y. C.; Cheng, P. L.; Chen, Y. R., Alzheimer's amyloid-beta oligomers rescue cellular prion protein induced tau reduction via the Fyn pathway. *ACS Chem. Neurosci.* **2013**, *4* (9), 1287-96.
191. Ondrejcek, T.; Klyubin, I.; Corbett, G. T.; Fraser, G.; Hong, W.; Mably, A. J.; Gardener, M.; Hammersley, J.; Perkinson, M. S.; Billinton, A.; Walsh, D. M.; Rowan, M. J., Cellular prion protein mediates the disruption of hippocampal synaptic plasticity by soluble Tau in vivo. *J. Neurosci.* **2018**, *38* (50), 10595-10606.
192. Benilova, I.; De Strooper, B., Prion protein in Alzheimer's pathogenesis: a hot and controversial issue. *EMBO Mol Med* **2010**, *2* (8), 289-90.
193. Rajani, V.; Sengar, A. S.; Salter, M. W., Tripartite signalling by NMDA receptors. *Mol. Brain* **2020**, *13* (1).
194. Fan, X.; Jin, W. Y.; Wang, Y. T., The NMDA receptor complex: a multifunctional machine at the glutamatergic synapse. *Front Cell Neurosci* **2014**, *8*, 160.
195. Ryan, T. J.; Emes, R. D.; Grant, S. G.; Komiyama, N. H., Evolution of NMDA receptor cytoplasmic interaction domains: implications for organisation of synaptic signalling complexes. *BMC Neurosci.* **2008**, *9*, 6.
196. Paoletti, P.; Bellone, C.; Zhou, Q., NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **2013**, *14* (6), 383-400.
197. Kapitein, L. C.; Yau, K. W.; Gouveia, S. M.; van der Zwan, W. A.; Wulf, P. S.; Keijzer, N.; Demmers, J.; Jaworski, J.; Akhmanova, A.; Hoogenraad, C. C., NMDA receptor activation suppresses microtubule growth and spine entry. *J Neurosci* **2011**, *31* (22), 8194-209.
198. Bell, M.; Bartol, T.; Sejnowski, T.; Rangamani, P., Dendritic spine geometry and spine apparatus organization govern the spatiotemporal dynamics of calcium. *J Gen Physiol* **2019**, *151* (8), 1017-1034.
199. Ultanir, S. K.; Kim, J. E.; Hall, B. J.; Deerinck, T.; Ellisman, M.; Ghosh, A., Regulation of spine morphology and spine density by NMDA receptor signaling in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104* (49), 19553-8.
200. Luo, T.; Wu, W. H.; Chen, B. S., NMDA receptor signaling: death or survival? *Front Biol (Beijing)* **2011**, *6* (6), 468-476.
201. Dou, K. X.; Tan, M. S.; Tan, C. C.; Cao, X. P.; Hou, X. H.; Guo, Q. H.; Tan, L.; Mok, V.; Yu, J. T., Comparative safety and effectiveness of cholinesterase inhibitors and memantine for Alzheimer's disease: a network meta-analysis of 41 randomized controlled trials. *Alzheimers Res. Ther.* **2018**, *10* (1), 126.
202. Weiser, T.; Wienrich, M., The effects of copper ions on glutamate receptors in cultured rat cortical neurons. *Brain Res* **1996**, *742* (1-2), 211-8.
203. Vlachova, V.; Zemkova, H.; Vyklicky, L., Jr., Copper modulation of NMDA responses in mouse and rat cultured hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* **1996**, *8* (11), 2257-64.

204. Trombley, P. Q.; Shepherd, G. M., Differential modulation by zinc and copper of amino acid receptors from rat olfactory bulb neurons. *J Neurophysiol* **1996**, *76* (4), 2536-46.
205. Schlieff, M. L.; Craig, A. M.; Gitlin, J. D., NMDA receptor activation mediates copper homeostasis in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* **2005**, *25* (1), 239-46.
206. Stomberski, C. T.; Hess, D. T.; Stamler, J. S., Protein S-nitrosylation: Determinants of specificity and enzymatic regulation of S-nitrosothiol-based signaling. *Antioxid. Redox. Signal* **2019**, *30* (10), 1331-1351.
207. Fernando, V.; Zheng, X.; Walia, Y.; Sharma, V.; Letson, J.; Furuta, S., S-nitrosylation: An emerging paradigm of redox signaling. *Antioxidants (Basel)* **2019**, *8* (9).
208. Takahashi, H.; Shin, Y.; Cho, S. J.; Zago, W. M.; Nakamura, T.; Gu, Z.; Ma, Y.; Furukawa, H.; Liddington, R.; Zhang, D.; Tong, G.; Chen, H. S.; Lipton, S. A., Hypoxia enhances S-nitrosylation-mediated NMDA receptor inhibition via a thiol oxygen sensor motif. *Neuron* **2007**, *53* (1), 53-64.
209. Choi, Y. B.; Tenneti, L.; Le, D. A.; Ortiz, J.; Bai, G.; Chen, H. S.; Lipton, S. A., Molecular basis of NMDA receptor-coupled ion channel modulation by S-nitrosylation. *Nat. Neurosci.* **2000**, *3* (1), 15-21.
210. Aarts, M.; Liu, Y.; Liu, L.; Besshoh, S.; Arundine, M.; Gurd, J. W.; Wang, Y. T.; Salter, M. W.; Tymianski, M., Treatment of ischemic brain damage by perturbing NMDA receptor- PSD-95 protein interactions. *Science* **2002**, *298* (5594), 846-50.
211. Wolhuter, K.; Whitwell, H. J.; Switzer, C. H.; Burgoyne, J. R.; Timms, J. F.; Eaton, P., Evidence against stable protein S-nitrosylation as a widespread mechanism of post-translational regulation. *Mol. Cell.* **2018**, *69* (3), 438-450 e5.
212. Toledo, J. C., Jr.; Augusto, O., Connecting the chemical and biological properties of nitric oxide. *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, *25* (5), 975-89.
213. Ford, P. C.; Miranda, K. M., The solution chemistry of nitric oxide and other reactive nitrogen species. *Nitric Oxide* **2020**, *103*, 31-46.
214. Banci, L.; Bertini, I.; Ciofi-Baffoni, S.; Kozyreva, T.; Zovo, K.; Palumaa, P., Affinity gradients drive copper to cellular destinations. *Nature* **2010**, *465* (7298), 645-8.
215. Rae, T. D.; Schmidt, P. J.; Pufahl, R. A.; Culotta, V. C.; O'Halloran, T. V., Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science* **1999**, *284* (5415), 805-8.
216. Lippard, S. J.; Berg, J. M., Principles of coordination chemistry related to bioinorganic research. In *Principles of bioinorganic chemistry*, University Science Books: 1994; p 411.
217. Huheey, J. E.; Keiter, E. A.; Keiter, R. L.; Medhi, O. K., Acid-base chemistry. In *Inorganic chemistry: Principles of structure and reactivity*, Pearson Education: 2006; pp 319-358.
218. Heinrich, T. A.; da Silva, R. S.; Miranda, K. M.; Switzer, C. H.; Wink, D. A.; Fukuto, J. M., Biological nitric oxide signalling: chemistry and terminology. *Br J Pharmacol* **2013**, *169* (7), 1417-29.
219. Kakkar, R., Fundamentals of spectroscopy. In *Atomic and molecular spectroscopy*, Cambridge University Press: 2015; pp 1-47.
220. Gispert, J. R., Electronic spectroscopy. In *Coordination Chemistry*, Wiley: 2008; pp 273-294.



221. Atkins, P.; Overton, T., Physical techniques in inorganic chemistry. In *Shriver and Atkins' Inorganic Chemistry*, OUP Oxford: 2010; pp 223-254.
222. Harris, D. C.; Bertolucci, M. D., Molecular orbital theory. In *Symmetry and Spectroscopy: An Introduction to Vibrational and Electronic Spectroscopy*, Harris, D. C.; Bertolucci, M. D., Eds. Dover Publications: 1989; pp 225-306.
223. Atkins, P.; Overton, T., Atomic structure. In *Shriver and Atkins' Inorganic Chemistry*, OUP Oxford: 2010; pp 3-33.
224. Atkins, P.; Overton, T., Molecular structure and bonding. In *Shriver and Atkins' Inorganic Chemistry*, OUP Oxford: 2010; pp 34-64.
225. Quintanar, L.; Rivillas-Acevedo, L., Studying metal ion-protein interactions: electronic absorption, circular dichroism, and electron paramagnetic resonance. *Methods Mol. Biol.* **2013**, *1008*, 267-97.
226. Rodriguez, E. E.; Arcos-Lopez, T.; Trujano-Ortiz, L. G.; Fernandez, C. O.; Gonzalez, F. J.; Vela, A.; Quintanar, L., Role of N-terminal methionine residues in the redox activity of copper bound to alpha-synuclein. *J Biol Inorg Chem* **2016**, *21* (5-6), 691-702.
227. Tranter, G. E., Circular dichroism spectrometers. In *Encyclopedia of spectroscopy and spectrometry*, Lindon, J. C.; Tranter, G. E.; Koppelaar, D., Eds. Elsevier Science: 2016; pp 325-336.
228. Stanyon, H. F.; Cong, X.; Chen, Y.; Shahidullah, N.; Rossetti, G.; Dreyer, J.; Papamokos, G.; Carloni, P.; Viles, J. H., Developing predictive rules for coordination geometry from visible circular dichroism of copper(II) and nickel(II) ions in histidine and amide main-chain complexes. *FEBS Journal* **2014**, *281* (17), 3945-3954.
229. Klewpatinond, M.; Viles, J. H., Empirical rules for rationalising visible circular dichroism of Cu<sup>2+</sup> and Ni<sup>2+</sup>-histidine complexes: Applications to the prion protein. *FEBS Lett.* **2007**, *581* (7), 1430-1434.
230. Rivillas-Acevedo, L.; Grande-Aztatzi, R.; Juaristi, E.; Vela, A.; Quintanar, L., Reversible stereoisomer-specific Cotton effect of the ligand field transitions at a copper(II) binding site of the prion protein. *European Journal of Inorganic Chemistry* **2021**.
231. Rowlands, C., C. ; Murphy, D. M., EPR Spectroscopy, Theory. In *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, Lindon, J. C.; Tranter, G. E.; Koppelaar, D., Eds. Elsevier Science: 2016; pp 531-541.
232. Peisach, J.; Blumberg, W. E., Structural implications derived from the analysis of electron paramagnetic resonance spectra of natural and artificial copper proteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1974**, *165* (2), 691-708.
233. Palmer, G., Electron paramagnetic resonance of metalloproteins. In *Physical methods in bioinorganic chemistry: Spectroscopy and magnetism*, Que, L., Ed. University Science Books: 2010; pp 121-186.
234. 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), 1195-207.
235. Rivillas-Acevedo, L.; Grande-Aztatzi, R.; Lomelí, I.; García, J. E.; Barrios, E.; Teloxa, S.; Vela, A.; Quintanar, L., Spectroscopic and electronic structure studies of copper(II) binding to His111 in the human prion protein fragment 106–115: Evaluating the role of protons and methionine residues. *Inorg. Chem.* **2011**, *50* (5), 1956-1972.

236. 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. *The Journal of Physical Chemistry B* **2013**, *117* (3), 789-799.
237. Trujano-Ortiz, L. G.; Gonzalez, F. J.; Quintanar, L., Redox cycling of copper-amyloid beta 1-16 peptide complexes is highly dependent on the coordination mode. *Inorg. Chem.* **2015**, *54* (1), 4-6.
238. Syme, C. D.; Nadal, R. C.; Rigby, S. E.; 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), 18169-77.
239. Alies, B.; Eury, H.; Bijani, C.; Rechinat, 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), 11192-201.
240. Garnett, A. P.; Viles, J. H., Copper binding to the octarepeats of the prion protein. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (9), 6795-6802.
241. Magrì, A.; Di Natale, G.; Rizzarelli, E., Copper-assisted interaction between amyloid- $\beta$  and prion: Ternary metal complexes with A $\beta$  N-terminus and octarepeat. *Inorganica Chimica Acta* **2018**, *472*, 93-102.
242. Picon-Pages, P.; Garcia-Buendia, J.; Munoz, F. J., Functions and dysfunctions of nitric oxide in brain. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **2019**, *1865* (8), 1949-1967.
243. Yi, J.; Soares, A. S.; Richter-Addo, G. B., Crystallographic characterization of the nitric oxide derivative of R-state human hemoglobin. *Nitric Oxide* **2014**, *39*, 46-50.
244. Deatherage, J. F.; Moffat, K., Structure of nitric oxide hemoglobin. *Journal of Molecular Biology* **1979**, *134* (3), 401-417.
245. Lehnert, N.; Kim, E.; Dong, H. T.; Harland, J. B.; Hunt, A. P.; Manickas, E. C.; Oakley, K. M.; Pham, J.; Reed, G. C.; Alfaro, V. S., The biologically relevant coordination chemistry of iron and nitric oxide: Electronic structure and reactivity. *Chem. Rev.* **2021**, *121* (24), 14682-14905.
246. Mani, K.; Cheng, F.; Havsmark, B.; Jonsson, M.; Belting, M.; Fransson, L. A., Prion, amyloid beta-derived Cu(II) ions, or free Zn(II) ions support S-nitroso-dependent autocleavage of glypican-1 heparan sulfate. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (40), 38956-65.
247. Singh, I.; Sagare, A. P.; Coma, M.; Perlmutter, D.; Gelein, R.; Bell, R. D.; Deane, R. J.; Zhong, E.; Parisi, M.; Ciszewski, J.; Kasper, R. T.; Deane, R., Low levels of copper disrupt brain amyloid-beta homeostasis by altering its production and clearance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2013**, *110* (36), 14771-6.
248. Bonomo, R. P.; Pappalardo, G.; Rizzarelli, E.; Santoro, A. M.; Tabbi, G.; Vagliasindi, L. I., Nitrogen oxide interaction with copper complexes formed by small peptides belonging to the prion protein octa-repeat region. *Dalton Trans.* **2007**, (14), 1400-8.
249. Bonomo, R. P.; Pappalardo, G.; Rizzarelli, E.; Tabbi, G.; Vagliasindi, L. I., Studies of nitric oxide interaction with mono- and dinuclear copper(II) complexes of prion protein bis-octarepeat fragments. *Dalton. Trans.* **2008**, (29), 3805-16.
250. Organization, W. H., Dementia. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia> 2019.

251. Organization, W. H., Causes of death. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>, 2019.
252. Llibre Rodriguez, J. J.; Ferri, C. P.; Acosta, D.; Guerra, M.; Huang, Y.; Jacob, K. S.; Krishnamoorthy, E. S.; Salas, A.; Sosa, A. L.; Acosta, I.; Dewey, M. E.; Gaona, C.; Jotheeswaran, A. T.; Li, S.; Rodriguez, D.; Rodriguez, G.; Kumar, P. S.; Valhuerdi, A.; Prince, M.; Dementia Research, G., Prevalence of dementia in Latin America, India, and China: a population-based cross-sectional survey. *Lancet* **2008**, *372* (9637), 464-74.
253. Gutierrez-Robledo, L. M.; Arrieta-Cruz, I., [Dementia in Mexico: The need for a National Alzheimer's Plan]. *Gac Med Mex* **2015**, *151* (5), 667-73.
254. Sevigny, J.; Chiao, P.; Bussiere, T.; Weinreb, P. H.; Williams, L.; Maier, M.; Dunstan, R.; Salloway, S.; Chen, T.; Ling, Y.; O'Gorman, J.; Qian, F.; Arastu, M.; Li, M.; Chollate, S.; Brennan, M. S.; Quintero-Monzon, O.; Scannevin, R. H.; Arnold, H. M.; Engber, T.; Rhodes, K.; Ferrero, J.; Hang, Y.; Mikulskis, A.; Grimm, J.; Hock, C.; Nitsch, R. M.; Sandrock, A., The antibody aducanumab reduces Abeta plaques in Alzheimer's disease. *Nature* **2016**, *537* (7618), 50-6.
255. Schneider, L., A resurrection of aducanumab for Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* **2020**, *19* (2), 111-112.
256. Budd Haeberlein, S.; Aisen, P. S.; Barkhof, F.; Chalkias, S.; Chen, T.; Cohen, S.; Dent, G.; Hansson, O.; Harrison, K.; von Hehn, C.; Iwatsubo, T.; Mallinckrodt, C.; Mummery, C. J.; Muralidharan, K. K.; Nestorov, I.; Nisenbaum, L.; Rajagovindan, R.; Skordos, L.; Tian, Y.; van Dyck, C. H.; Vellas, B.; Wu, S.; Zhu, Y.; Sandrock, A., Two randomized phase 3 studies of Aducanumab in early Alzheimer's disease. *J. Prev. Alzheimers Dis.* **2022**, *9* (2), 197-210.
257. Huang, S.; Black, S. A.; Huang, J.; Stys, P. K.; Zamponi, G. W., Mutation of copper binding sites on cellular prion protein abolishes its inhibitory action on NMDA receptors in mouse hippocampal neurons. *Mol. Brain* **2021**, *14* (1), 117.
258. Posadas, Y.; Parra-Ojeda, L.; Perez-Cruz, C.; Quintanar, L., Amyloid beta perturbs Cu(II) binding to the prion protein in a site-specific manner: Insights into its potential neurotoxic mechanisms. *Inorg. Chem.* **2021**, *60* (12), 8958-8972.
259. Hare, D. J.; Lee, J. K.; Beavis, A. D.; van Gramberg, A.; George, J.; Adlard, P. A.; Finkelstein, D. I.; Doble, P. A., Three-dimensional atlas of iron, copper, and zinc in the mouse cerebrum and brainstem. *Anal Chem* **2012**, *84* (9), 3990-7.
260. Brown, D. R.; Qin, K.; Herms, J. W.; Madlung, A.; Manson, J.; Strome, R.; Fraser, P. E.; Kruck, T.; von Bohlen, A.; Schulz-Schaeffer, W.; Giese, A.; Westaway, D.; Kretzschmar, H., The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature* **1997**, *390* (6661), 684-7.
261. O'Brien, R. J.; Wong, P. C., Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annu Rev Neurosci* **2011**, *34*, 185-204.
262. Evans, E. G.; Pushie, M. J.; Markham, K. A.; Lee, H. W.; Millhauser, G. L., Interaction between prion protein's copper-bound octarepeat domain and a charged C-terminal pocket suggests a mechanism for N-terminal regulation. *Structure* **2016**, *24* (7), 1057-67.
263. Wu, B.; McDonald, A. J.; Markham, K.; Rich, C. B.; McHugh, K. P.; Tatzelt, J.; Colby, D. W.; Millhauser, G. L.; Harris, D. A., The N-terminus of the prion protein is a toxic effector regulated by the C-terminus. *Elife* **2017**, *6*.

264. Taylor, D. R., Assigning functions to distinct regions of the N-terminus of the prion protein that are involved in its copper-stimulated, clathrin-dependent endocytosis. *J. Cell Sci.* **2005**, *118* (21), 5141-5153.
265. Hooper, Nigel M.; Taylor, David R.; Watt, Nicole T., Mechanism of the metal-mediated endocytosis of the prion protein. *Biochemical Society Transactions* **2008**, *36* (6), 1272-1276.
266. Nguyen, X. T. A.; Tran, T. H.; Cojoc, D.; Legname, G., Copper binding regulates cellular prion protein function. *Mol. Neurobiol.* **2019**, *56* (9), 6121-6133.
267. Roseman, G. P.; Wu, B.; Wadolkowski, M. A.; Harris, D. A.; Millhauser, G. L., Intrinsic toxicity of the cellular prion protein is regulated by its conserved central region. *FASEB J* **2020**, *34* (6), 8734-8748.
268. Friedman, M., Applications of the ninhydrin reaction for analysis of amino acids, peptides, and proteins to agricultural and biomedical sciences. *J Agric Food Chem* **2004**, *52* (3), 385-406.

El jurado designado por el Departamento de Farmacología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional aprueba la Tesis de Doctorado titulada: "Efecto del péptido  $\beta$ -amiloide y el óxido nítrico en la coordinación de cobre a la proteína prion: Hallazgos relevantes sobre el papel de estas proteínas en la enfermedad de Alzheimer"

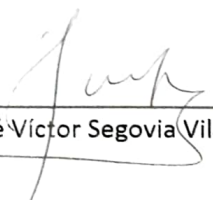
Que presenta la M. en C. Yanahi Posadas Torrentera para obtener el grado de Doctor en Ciencias en la especialidad en Farmacología, el día 29 de junio del 2022.




Dr. Ranier Gutiérrez Mendoza



Dr. Carlos Martín Cerda García-Rojas



Dr. José Víctor Segovia Vila

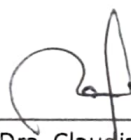


Dra. Ma. de Jesús Rosales Hoz

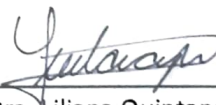


Dra. Lourdes Massieu Trigo

#### DIRECTORAS DE TESIS



Dra. Claudia Pérez Cruz



Dra. Liliana Quintanar Vera