



Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas
Universidad Nacional de Rosario

Tesis de Doctorado

**Cobre, daño oxidativo y agregación amiloide: Un
enfoque estructural sobre la proteína α -sinucleína,
implicada en la enfermedad de Parkinson**

Presentada por Marco César Miotto

Rosario, Argentina

2017

Cobre, daño oxidativo y agregación amiloide: Un enfoque estructural sobre la proteína α -sinucleína, implicada en la enfermedad de Parkinson.

Marco César Miotto

Licenciado en Biotecnología – Facultad de Ciencias Bioquímicas y
Farmacéuticas – Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Químicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo inicialmente en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR-UNR-CONICET) y posteriormente en el Instituto de Investigaciones para el Descubrimiento de Fármacos de Rosario (IIDEFAR-UNR-CONICET) y Laboratorio Max Planck de Biología Estructural, Química y Biofísica Molecular de Rosario (LMPbioR-UNR-MPIbpC), durante el período comprendido entre el 1 de abril de 2012 y el 10 de febrero de 2017, bajo la dirección de Dr. Claudio O. Fernández.

Agradecimientos

Al reflexionar sobre mi recorrido en estos años de investigación y de desarrollo de tesis doctoral, no logro desligar mi crecimiento científico de todas las vivencias personales y emocionales. En consecuencia, dedico esta breve sección, especialmente formulada para agradecer, a todas aquellas personas que me acompañaron en esta experiencia y que me aportaron en la deconstrucción y reinención de lo que soy. Aunque algunas personas ya no estén presentes, aunque hayan estado más o menos tiempo que otras, su compañía y afecto me fueron enormemente valiosos y les agradezco por siempre.

Agradezco en primer lugar al Dr. Claudio Fernández que allá por el 2011, luego de unos meses de haberme incorporado como estudiante de grado, aceptó dirigirme como futuro estudiante doctoral dentro de su grupo de investigación. Le agradezco la posibilidad de aprender no sólo acerca de cómo ser un buen científico sino también cómo ser una buena persona. Debo destacar que he entendido la importancia del valor de la palabra, del diálogo y del respeto.

Agradezco la compañía de los chicos de la entonces casita verde, Arielito, Gago, Gonza, Lau, Maru, Paulie y Valen. Una mención muy especial para Maru, compañera firme desde el primer día, quien no deja de sorprenderme y quien siempre dispone de un brazo fuerte del cual agarrarme.

Agradezco a todos los que se sumaron en el nuevo mundo SEDIPFAR/IIDEFAR, Carlos, Gabi, Marianela, Mauge, Mayra, Tomé, Vero, a todos los chicos de Química, Apoyo Técnico y Administración. A los breves y no tanto, Antonio, Caro, Cate, Timo. A los últimos, Aye, Mai, Mauri. A Andrés, por todos esos skypes para arrancar el RMN, por la buena onda permanente y por las siempre admirables respuestas a toda consulta científica y personal. A Gonzalito, por las charlas y discusiones existenciales, por enseñarme a educar divirtiéndonos, por recordarme que siguen existiendo personas bondadosas que valen la pena.

Agradezco a todos los que hicieron mi estadía en Göttingen más encantadora, Adriana, Filippo, Garima, Javier, Luis, entre tantos otros. Al Dr. Markus Zweckstetter por esperarme de brazos abiertos y guiarme en esa

experiencia completamente nutritiva. A Ingrid y Cate por la amistad tan hermosa que decantó y que me acobijó con tanta ternura.

Agradezco a los chicos del IBR, del Lab1, del Lab5, Andrés, Anto, Belu, Flor, Irina, La Tía, Marcos, Nina, Sory y tantos otros, por tantas experiencias y risas compartidas. A Bruno por estar cuando se lo necesita, con esa bipolaridad adulto-niño que tanto ilumina la vida.

Agradezco a los chicos de la facu con los que tantas risas compartimos, Cin, Emi, Gabi, JP, Juli, Mavi, Nata, Sele y tantos otros que se hace difícil mencionar a todos. A Rami por esa amistad tan especial, cultivada sobre la base del cariño y del respeto.

Agradezco a los polipibes, Euge, Juan, Lu, Mavi, Pau, San, Tincho, Vicky. Aunque nos vemos esporádicamente, el vínculo siempre permanece. Es sorprendente ver cómo cambian las personas a lo largo del tiempo... décadas, ya podríamos decir.

Agradezco a esas bellas personas que te trae el destino por casualidad y que te enriquecen la experiencia de la vida, Aylu, Belén y Mariano, La Tili, Lisandro, Maxi, Jorge y Vir.

Agradezco a mi familia, Celi, Mamá, Papá, abuelos, tíos, primos. Siempre presentes. A Debo y Luli por esas sonrisas pícaras y esas cabezas dispuestas a escuchar y compartir. A Celi por ese amor fraternal que supera todas las barreras.

Agradezco a la vida, por haberme permitido compartir un rato el camino con Ignacio. Una de esas personas que se encuentran un par de veces en la vida, que te dan vuelta el mundo, que te hacen reír a carcajadas desde adentro, que te hacen recordar lo maravilloso que es compartir, construir, elegir, vivir...

Agradezco finalmente a mi abuela Diana, un ideal de amor incondicional construido sobre los recuerdos de un niño impolutos por el paso del tiempo.

*“Los científicos dicen
que estamos hechos de átomos,
pero a mí un pajarito me contó que
estamos hechos de historias.”*

Eduardo Galeano

Índice

Índice.....	i
Abreviaturas y símbolos	iv
Capítulo 1 - Introducción	1
1.1 Amiloidogénesis proteica.....	1
1.1.1 Fibras amiloides y enfermedades neurodegenerativas.....	1
1.1.2 Fases macroscópicas de la agregación amiloide.....	1
1.1.3 Eventos microscópicos que modulan la agregación amiloide	3
1.2 La proteína alfa-sinucleína.....	5
1.2.1 Alfa-sinucleína y la enfermedad de Parkinson	5
1.2.2 La familia de sinucleínas	6
1.2.3 Rol fisiopatológico de AS	7
1.3 Estrés oxidativo y daño oxidativo.....	10
1.3.1 Estrés oxidativo.....	10
1.3.2 Daño oxidativo y enfermedad de Parkinson.....	11
1.3.3 Daño oxidativo y alfa-sinucleína.....	13
1.4 Metalobiología y química de la enfermedad de Parkinson.....	15
1.4.1 El vínculo entre el cobre y la enfermedad de Parkinson.....	15
1.4.2 Cobre, alfa-sinucleína y daño oxidativo.....	17
1.5 Objetivos de la tesis.....	20
Capítulo 2 - Materiales y Métodos	22
2.1. Reactivos generales, proteínas, cepas y medios de cultivo.	22
2.1.1 Soluciones amortiguadoras.....	22
2.1.2 Reactivos para los estudios por RMN	22
2.1.3 Proteínas y péptidos.....	22
2.1.4 Cepas y plásmidos.....	24
2.1.5 Medios de cultivo	25
2.2. Técnicas de biología molecular.	25
2.2.1. Transformación de E. coli BL21 (DE3).....	25
2.2.2. Mutagénesis sitio dirigida.....	26
2.3. Purificación de péptidos y proteínas.....	27

2.3.1. Purificación de AS, sus variantes y BS.....	27
2.3.2. Purificación de Met1 ^{OX} AS.....	29
2.3.3. Síntesis de péptidos modelos.....	30
2.4 Análisis de proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida.....	31
2.5 Determinación de la cinética de agregación amiloide	32
2.5.1 Medición de la agregación amiloide mediante fluorescencia de ThioT	32
2.5.2 Medición de la agregación amiloide mediante RMN.....	33
2.5.3 Medición de la agregación amiloide en microplaca	33
2.6. Estudios de Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear.....	34
2.6.1. Espectros unidimensionales.....	35
2.6.2. Espectros bidimensionales homonucleares.	35
2.6.3. Espectros bidimensionales heteronucleares.	35
2.6.4. Espectros tridimensionales heteronucleares.....	37
2.6.5. Determinación de las constantes de relajación longitudinal y transversal	39
2.6.6. Medición de NOE heteronuclear (hNOE).....	40
2.6.7. Cálculo de las diferencias promedio de los desplazamientos químicos de las señales de RMN.....	40
2.7. Determinación de la afinidad usando el programa DynaFit.....	41
Capítulo 3 - Caracterización estructural de la interacción de iones Cu(I) con la proteína alfa-sinucleína	43
3.1 Introducción.....	43
3.2 Identificación de las regiones afectadas en la proteína AS por la presencia de iones Cu(I)	44
3.3 Determinantes estructurales y afinidad del sitio 1 de unión a Cu(I) en la proteína AS.....	45
3.4 Determinantes estructurales y afinidad del sitio 2 de unión a Cu(I) en la proteína AS.....	52
3.5 Determinantes estructurales y afinidad del sitio 3 de unión a Cu(I) en la proteína AS.....	56
3.6 Análisis global de la unión de Cu(I) a la proteína AS.....	58
3.7 Discusión	58
Capítulo 4 – Daño oxidativo en la proteína alfa-sinucleína catalizado por su interacción con iones cobre.....	65

4.1	Introducción.....	65
4.2	Identificación de los residuos afectados en la proteína AS por la catálisis oxidativa mediada por iones cobre.....	66
4.3	Motivos químicos involucrados en la oxidación específica de Met1	71
4.4	Determinación de las propiedades amiloidogénicas de Met1 ^{OX} AS.....	73
4.5	Discusión	76
Capítulo 5 – Amiloidogénesis y conformación de la proteína alfa-sinucleína en presencia de Cu(I).....		82
5.1	Introducción.....	82
5.2	Propiedades amiloidogénicas del complejo acAS-Cu(I).....	83
5.3	Propiedades de unión de Cu(I) a la proteína acAS	85
5.4	Estimación de los valores K_{dapp} para los sitios de unión a Cu(I) en acAS.....	88
5.5	Estado conformacional de acAS en presencia de Cu(I)	89
5.6	Propiedades dinámicas del esqueleto proteico de la especie acAS unida a Cu(I) ...	95
5.7	Discusión	96
Capítulo 6 – Implicancias estructurales de la interacción entre la proteína beta-sinucleína y el ion Cu(I).....		100
6.1	Introducción.....	100
6.2	Identificación de los sitios de unión a Cu(I) en la proteína acBS.....	101
6.3	Estimación de los valores de K_{dapp} para los sitios de unión a Cu(I) en acBS.....	104
6.4	Determinación de las propiedades estructurales de la proteína acBS en su estado unido a Cu(I)	106
6.5	Propiedades dinámicas del esqueleto proteico de la especie acBS unida a Cu(I) ..	109
6.6	Discusión	111
Conclusiones.....		113
Resumen.....		115
Anexo único		120
	Medición directa de los valores de $^3J_{HN-H\alpha}$ a través de experimentos TROSY-HSQC. .	120
Referencias.....		127
Divulgación		140
	Publicaciones.....	140
	Reuniones científicas.....	141

Abreviaturas y símbolos

% p/v	porcentaje peso en volumen
°C	grado centígrado
$^3J_{\text{HN-H}\alpha}$	constante de acoplamiento escalar a 3 enlaces HN-H α
$\epsilon_{274\text{nm}}$	coeficiente de extinción molar
δ	desplazamiento químico
$\Delta\delta$	diferencia de desplazamiento químico
ΔT	diferencia de temperatura
Å	Angstrom
A β	péptido amiloide beta
AA	ácido ascórbico
acAS	alfa-sinucleína acetilada en el extremo amino-terminal
acBS	beta-sinucleína acetilada en el extremo amino-terminal
acP1AS	P1AS acetilado en el extremo amino-terminal
ADN	ácido desoxirribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
AS	alfa-sinucleína
BS	beta-sinucleína
Da	Dalton
DO $_{600\text{nm}}$	densidad óptica a 600nm
DSS	4,4-dimetil-4-silapentano-1-ácido sulfónico
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EP	enfermedad de Parkinson
GS	gama-sinucleína

h	hora
hNOE	NOE heteronuclear ^1H - ^{15}N
Hz	Hertz
IDP	proteína intrínsecamente desordenada
IPTG	isopropil-Tio- β -D-Galactopiranosido
K	grado Kelvin
k_{app}	velocidad de elongación de fibras
K_d	constante de disociación
LB	medio rico Luria-Bertani
m	metro
M	molar
m/z	relación masa carga
MALDI-TOF	desorción/ionización mediante láser asistida por Matriz, acoplada a un analizador de tiempo de vuelo
MES	ácido 2-N-Morfolino-etano-sulfónico
Met ^{ox}	residuo de metionina oxidado
min	minuto
MOPS	ácido 3-N-Morfolino-propano-sulfónico
NAC	componente no amiloide-beta
NatB	complejo N-terminal acetil transferasa B
ncSP	propensión estructural corregida por vecinos
NOE	efecto nuclear Overhauser
P1AS	péptido sintético $^1\text{MDVFMK}^6$
pb	pares de base
PCR	reacción en cadena de la polimerasa

PMSF	fluoruro de sulfonil fenilmetano
ppm	partes por millón
R ₁	tiempo de relajación longitudinal
R ₂	tiempo de relajación transversal
RMN	resonancia magnética nuclear
ROS	especies reactivas de oxígeno
SDS	dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
s	segundo
t _{1/2}	tiempo medio de agregación
ThioT	Tioflavina-T
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
UV-Vis	UV-visible
V	voltios

Capítulo 1 - Introducción

1.1 Amiloidogénesis proteica

1.1.1 Fibras amiloides y enfermedades neurodegenerativas

La amiloidogénesis proteica o agregación amiloide es el proceso en el cual proteínas o péptidos solubles sufren un proceso de reorganización estructural dando lugar a fibras amiloides. Las fibras amiloides han sido observadas en conexión con más de 30 enfermedades humanas incurables,¹ muchas de las cuales son de orden neurodegenerativo, incluyendo las más frecuentes y conocidas: la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica y la enfermedad de Huntington.^{2,3}

Desde un punto de vista ultra-estructural, las fibras amiloides son agregados elongados insolubles altamente ordenados, caracterizados a nivel molecular por la presencia de una malla de láminas beta orientadas perpendicularmente al eje longitudinal de la fibra.^{4,5} A pesar de la gran variedad en secuencia, tamaño o plegamiento de las proteínas precursoras, una vez ensambladas las fibras amiloides, éstas poseen estructuras genéricas altamente similares con algunas variaciones menores de empaquetamiento local que derivan en diferencias morfológicas, como por ejemplo torsión y curvatura.

Para muchas proteínas amiloidogénicas, se ha encontrado que los monómeros y las fibras amiloides maduras presentan una toxicidad limitada o nula sobre células neuronales.⁶ En cambio, la muerte celular puede ser inducida por agregados de tamaño intermedio formados durante el proceso de amiloidogénesis o por el proceso de agregación *per se*.^{7,8}

1.1.2 Fases macroscópicas de la agregación amiloide

El resultado de la reacción general de la amiloidogénesis proteica resulta en la conversión de monómeros solubles de péptidos o proteínas en un

conjunto de agregados. Las reacciones de agregación siguen una compleja vía caracterizada por una cascada de especies intermoleculares metaestables.^{9,10} Las especies formadas como consecuencia del proceso de agregación amiloide son altamente heterogéneas, pudiendo clasificarse en oligómeros, núcleos, protofibras y fibras. Los oligómeros son los agregados de menor tamaño y prácticamente carecen de capacidad de elongación amiloide. Los núcleos son los agregados de menor peso molecular lo suficientemente estables para permitir que la asociación de monómeros a su superficie sea más rápida que la disociación en monómeros y por lo tanto dar lugar a las protofibras y posteriormente a las fibras amiloides. Finalmente, las protofibras, estructuras solubles linealmente ordenadas con capacidad de elongar rápidamente a través de la asociación de monómeros a los extremos, y las fibras amiloides maduras, previamente descritas, son las especies mayoritarias.

Las reacciones de auto-ensamblado molecular dependientes de nucleación, como lo es la agregación amiloide, muestran una cinética del tipo sigmoideo.¹¹ El proceso de agregación amiloide se puede dividir en tres fases macroscópicas, una fase *lag* sin cambios aparentes en la solución, una fase exponencial donde comienzan a observarse las fibras amiloides maduras y una fase final estacionaria, que representa un estado donde el monómero está en equilibrio con las fibras maduras (Figura 1.1A).¹⁰ Trabajos realizados durante décadas revelaron que durante el proceso de agregación amiloide, los monómeros y las fibras son los componentes dominantes durante el curso entero de reacción. Los monómeros son prevalentes durante la fase *lag* y las fibras durante la fase estacionaria. Si la concentración de monómeros y fibras amiloides se grafica en función del tiempo, se obtienen curvas sigmoideas especulares que se cruzan cerca del tiempo medio ($t_{1/2}$), donde las concentraciones de cada especie es prácticamente del orden del 50% (Figura 1.1B). La concentración de todos los intermediarios es baja durante todo el proceso de agregación amiloide, y debido a su variedad, heterogeneidad e

inestabilidad los mismos son muy difíciles de cuantificar. Sin embargo, utilizando cromatografía de exclusión molecular y marcaje radio-isotópico se pudo calcular que dichos oligómeros tienen un pico máximo de concentración donde se cruzan ambas curvas de aproximadamente un 1.5% del total de proteína.⁶

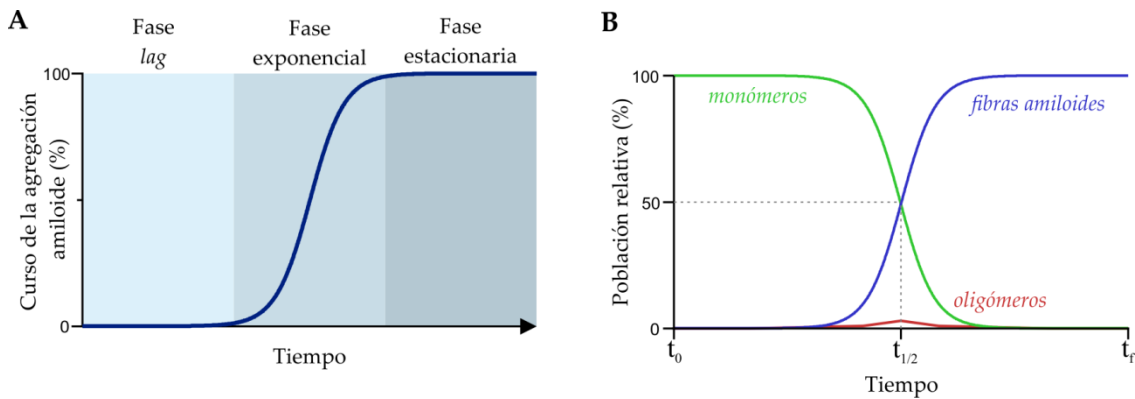


Figura 1.1. Cinética del proceso de agregación amiloide. A. Se esquematiza la forma sigmoidea del proceso de agregación amiloide en función del tiempo y se identifican las tres fases macroscópicas. B. Dependencia de la concentración relativa de las especies monoméricas, oligoméricas y fibrilares durante la agregación amiloide.

1.1.3 Eventos microscópicos que modulan la agregación amiloide

Ninguna de las fases macroscópicas pueden ser descritas por un único evento microscópico, sino que una variedad de eventos microscópicos se presentan durante todas las fases, aunque sus flujos netos difieren y están gobernados por constantes de reacción y actividades de las especies reactantes.¹² El proceso de agregación amiloide requiere fundamentalmente de dos eventos microscópicos: nucleación y elongación (Figura 1.2). La formación de núcleos se puede dar a través de dos vías diferentes, la nucleación primaria, donde los núcleos son formados a partir de monómeros solubles y oligómeros, y la nucleación secundaria, donde los núcleos son formados a partir de monómeros pero esta vez catalizados por la superficie de fibras pre-formadas.¹³ Los otros eventos microscópicos que definen la cinética de agregación amiloide son el evento de elongación amiloide, en el cual los monómeros se adicionan a

los extremos de las fibras amiloides y el evento de fragmentación, donde una fibra amiloide se fragmenta para formar fibras de menor tamaño, lo que proporciona más cantidad de extremos libres donde se pueden asociar los monómeros.

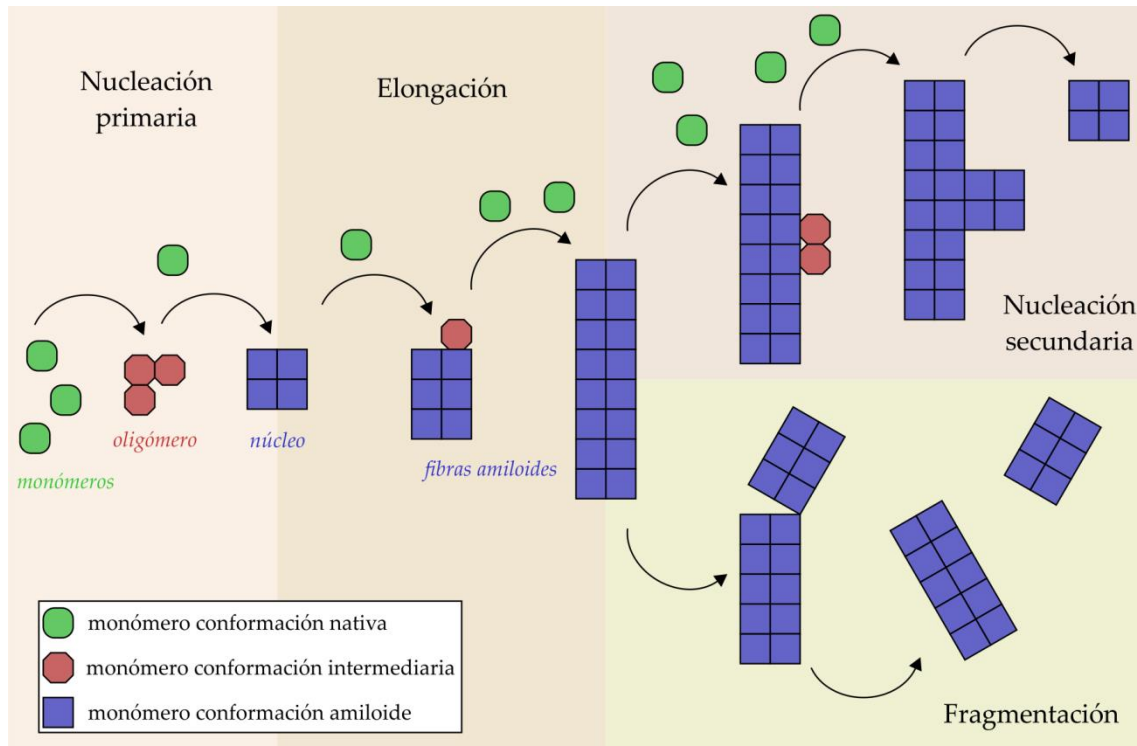


Figura 1.2. Eventos microscópicos de la agregación amiloide. Esquema representativo del comportamiento de los monómeros de péptidos/proteínas precursoras durante los eventos microscópicos de la agregación amiloide.

La velocidad de formación de núcleos primarios es constante durante la fase *lag* y decae a partir de la fase de crecimiento ya que es dependiente de la concentración de monómero soluble. La formación de núcleos secundarios, aumenta considerablemente cuando hay suficiente superficie fibrilar y al ser auto-catalítica, supera considerablemente los núcleos formados a través de la nucleación primaria al iniciar la fase exponencial. La velocidad máxima de nucleación secundaria se observa inmediatamente antes del tiempo medio y sería el proceso que brinda la mayor cantidad de núcleos que permite la transición de la fase *lag* a la fase exponencial. El conocimiento de las velocidades de los cuatro procesos microscópicos permite simular precisamente

la reacción de agregación amiloide y determinar la dependencia de la agregación amiloide de cada evento microscópico.¹³ Finalmente, tanto los mecanismos moleculares que definen cada evento microscópico como las características estructurales de los oligómeros y núcleos dependen de la proteína precursora y actualmente son las áreas de mayor estudio debido al gran desconocimiento fruto de la dificultad del análisis.

1.2 La proteína alfa-sinucleína

1.2.1 Alfa-sinucleína y la enfermedad de Parkinson

La proteína alfa-sinucleína (AS), una de las proteínas amiloidogénicas más estudiadas en las últimas décadas, fue inicialmente identificada a través de una caracterización bioquímica de las placas seniles presentes en pacientes con la enfermedad de Alzheimer.¹⁴ Estudios posteriores vincularon a AS con la enfermedad de Parkinson (EP), una enfermedad neurodegenerativa caracterizada principalmente por la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra pars compacta* que resulta en los síntomas clásicos de rigidez, temblor y bradicinesia.¹⁵⁻¹⁷ Una de las principales características de la EP es la presencia de cuerpos de Lewy, inclusiones citoplasmáticas de 8-30µm de diámetro, formados por fibras amiloides de 7-27nm de largo dispuestas radialmente, cuyo componente principal determinado mediante inmunohistoquímica es la proteína AS.^{15,18} Además, se encontró que cinco mutaciones familiares, A30P, E46K, H50Q, G51D y A53T, así como la triplicación del gen de AS, causan una forma precoz y agresiva de la EP, confirmando el rol principal de esta proteína en el desarrollo de la enfermedad.¹⁹⁻²³ Posteriormente, se ha vinculado a AS con el desarrollo de un grupo de desórdenes neurodegenerativos superpuestos denominados sinucleinopatías, los cuales incluyen, además de la EP, a la demencia asociada a

la EP, la demencia con cuerpos de Lewy, la atrofia multisistémica y un número de distrofias neuroaxonales menos caracterizadas.^{17,24,25}

1.2.2 La familia de sinucleínas

La proteína AS pertenece a una familia de proteínas homólogas compuesta además por beta-sinucleína (BS) y gama-sinucleína (GS). Las sinucleínas son proteínas solubles pequeñas (~14kDa), expresadas predominantemente en neuronas, aunque su localización celular varía. Así, las proteínas AS y BS se encuentran localizadas ubicuamente en terminales pre-sinápticas del cerebro, mientras que la proteína GS se encuentra localizada en células nerviosas más diferenciadas alejadas del cerebro anterior.^{26,27} Las sinucleínas han sido encontradas además en otros tejidos como hígado (GS), músculo esquelético (AS, BS y GS), pulmón (AS) y glóbulos rojos (AS).²⁶

Desde el punto de vista estructural, las sinucleínas han sido descritas como proteínas intrínsecamente desordenadas, sin elementos estables de estructura secundaria ni topología global definida.²⁸⁻³⁰ La secuencia primaria puede ser dividida en tres segmentos: la región N-terminal (residuos 1-60), rica en residuos básicos que median la unión a membranas, la región NAC (del inglés *Componente No Amiloide-beta*, residuos 61-95), rica en residuos hidrofóbicos directamente relacionada con el potencial amiloidogénico de la proteína y la región C-terminal (residuos 96-140), rica en residuos de Asp, Glu y Pro, cuya función no está del todo claro, pero podría estar involucrada en interacciones proteína-proteína así como en la inhibición intrínseca de la agregación amiloide.^{31,32} El análisis de la secuencia de la región N-terminal indica la existencia de seis o siete repeticiones de la secuencia consenso KTKEGV según la sinucleína, que permiten la interacción con membranas a través de la formación de una hélice anfipática.³³⁻³⁵ Por otro lado, existen variaciones de secuencia que podrían ser las responsables de las diferentes funciones nativas de las sinucleínas, incluyendo la ausencia en BS de una

secuencia altamente hidrofóbica de 11 aminoácidos correspondientes a los residuos 73-83 de la región NAC de AS y GS,³⁶ y la presencia de una región C-terminal más corta y menos negativa en GS. Finalmente, la capacidad amiloidogénica de BS es notablemente inferior a la de AS, e incluso se ha demostrado que la presencia de BS y GS inhibe la agregación amiloide de AS *in vitro*, pudiendo actuar como reguladores naturales de la agregación amiloide *in vivo*.^{36,37}

1.2.3 Rol fisiopatológico de AS

Aunque la función exacta de AS es desconocida, se cree que juega un rol importante en el mantenimiento del flujo de vesículas sinápticas en terminales pre-sinápticas maduras. La proteína AS no es esencial para el desarrollo neuronal ni para la formación de sinapsis ya que la expresión de AS se detecta luego del desarrollo sináptico.³⁸ Además, ratones *knockout* de AS desarrollan una arquitectura cerebral y conexiones sinápticas normales, sólo observándose leves anomalías en la liberación de neurotransmisores dependientes de actividad.^{39,40}

La localización específica de AS en las terminales pre-sinápticas responde a la alta preferencia de AS por membranas cargadas negativamente y con gran curvatura,^{41,42} donde abundan las vesículas sinápticas, descritas como una de las membranas biológicas más pequeñas. La proteína AS adopta una conformación de hélice extendida cuando se une a la superficie de vesículas lipídicas de 100nm de diámetro (Figura 1.3).⁴³ A diferencia de otras proteínas sinápticas, AS se disocia de las vesículas sinápticas una vez que estas se funden con la membrana plasmática.⁴⁴ AS se dispersa de los botones pre-sinápticos con estimulación, es decir que la actividad neuronal controla la función normal de AS en las terminales nerviosas.⁴⁴ Consistentemente, la sobreexpresión moderada de AS a niveles que no producen depósitos amiloides ni toxicidad causa la inhibición de la exocitosis de vesículas sinápticas.⁴⁵

Complementariamente, la proteína AS puede regular funciones sinápticas a través de la interacción con varias proteínas sinápticas involucradas en el tráfico de membranas, exocitosis y liberación de vesículas sinápticas en células neuronales.^{46,47} La proteína AS coopera con las proteínas CSP- α y SNAREs para prevenir la neurodegeneración,⁴⁸ y actúa como un chaperón molecular en el normal ensamblado del complejo SNARE en las terminales pre-sinápticas

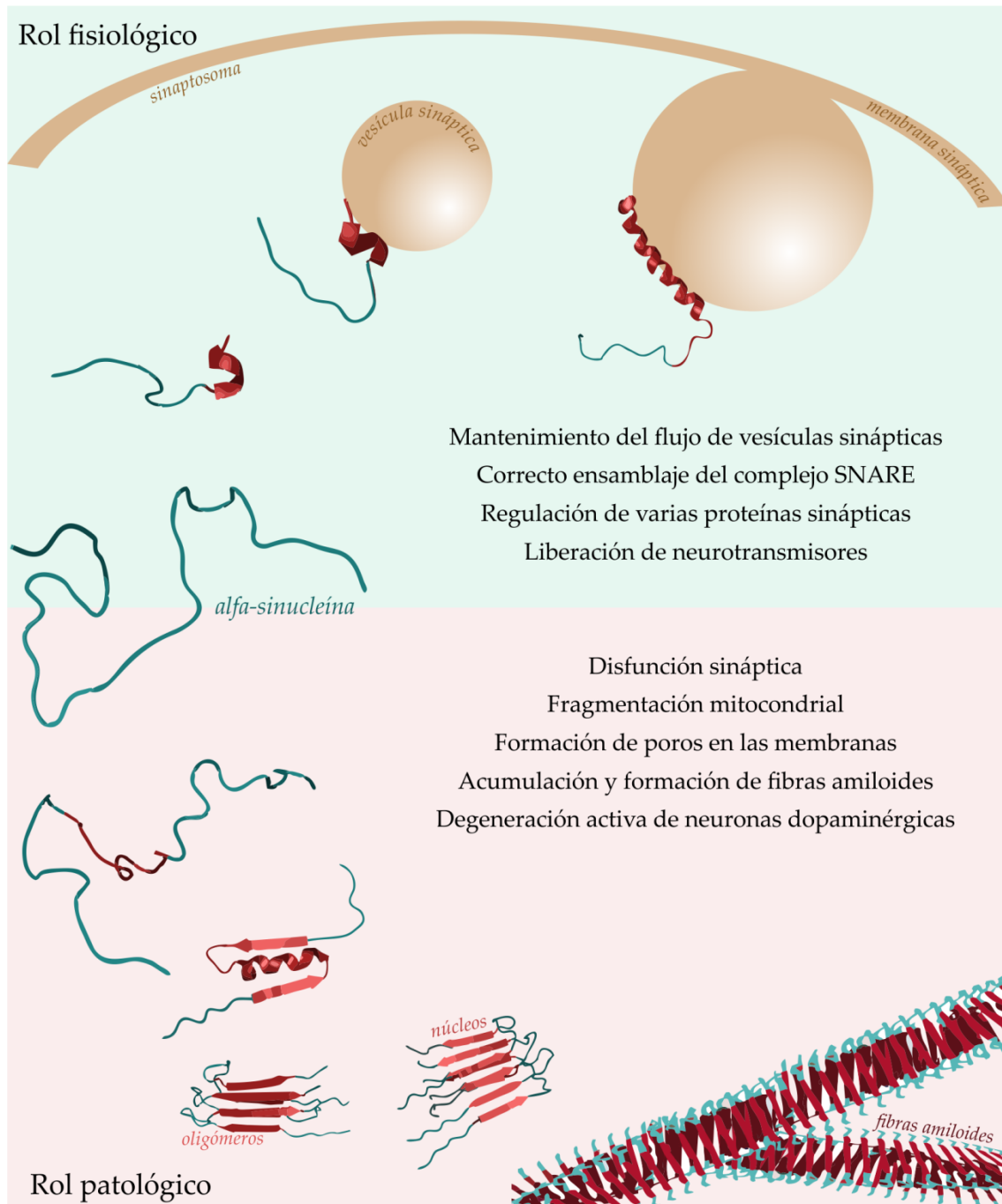


Figura 1.3. Rol fisiopatológico de AS. Esquema representativo y descripción sintética de los roles fisiológicos y patológicos de AS.

durante el envejecimiento.^{49,50} Además, puede modular la expresión, distribución subcelular y actividad de varias proteínas sinápticas y componentes citoesqueléticos.⁵¹⁻⁵⁴

La pérdida del efecto modulador pre-sináptico de AS podría derivar en su agregación amiloide patológica, disfunción sináptica, y por ende, contribuir a la muerte neuronal (Figura 1.3). La alteración de los niveles normales de AS, en un estado patológico, además de generar la pérdida de función, podría promover la ganancia de función tóxica. En este sentido, se ha observado que ratones *knockout* de AS presentan resistencia a las neurotoxinas inductoras de parkinsonismo, MPTP y 6-OHDA, sugiriendo que AS estaría involucrada en la degeneración activa de las neuronas dopaminérgicas.^{55,56} Además, se ha encontrado que la interacción entre dopamina, calcio y AS puede causar muerte selectiva de las neuronas de la *substantia nigra*.⁵⁷

Aunque es necesaria una profundización de la investigación en este sentido, algunos mecanismos moleculares se han empezado a desglosar. La sobre-expresión de AS altera la conductancia de membranas y promueve la formación de poros, fenómenos que pueden estar implicados en cambios pre- y post-sinápticos en las diferentes sinucleinopatías.⁵⁸ Conjuntamente, se observó que el nivel de sobreexpresión de AS se correlaciona con el nivel de fragmentación mitocondrial,⁵⁹ uniéndose a la membrana interna de las mitocondrias, las cuales poseen zonas de elevada curvatura y excepcionalmente ricas en fosfolípidos ácidos, propiedades que permiten una fuerte asociación de AS.

Además de la sobre-expresión de AS, la desregulación de su degradación puede provocar la acumulación de AS y promover la neurodegeneración.⁶⁰ Inicialmente, fue pensado que AS se degradaba principalmente a través del proteosoma sin necesidad de ubiquitinación debido a su característica intrínsecamente desordenada,^{61,62} sin embargo fue encontrado que la degradación de AS por proteosoma es promovido por su monoubiquitinación,

y que la misma es completamente reversible.^{63,64} Además, existen numerosas evidencias que sugieren que la proteína AS puede degradarse por lisosoma, y que la macroautofagia permite la degradación tanto de oligómeros como monómeros de AS.^{65,66}

Muchos han sido los factores testeados por su capacidad para influenciar la acumulación y agregación de AS, ya sea a través de la modificación directa o indirecta de la proteína. Así, las modificaciones post-traduccionales como fosforilación de residuos de Ser y Tyr, la acetilación del extremo amino-terminal del residuo de Met1, la ubiquitinación y sumoilación de residuos de Lys y la O-GalNAc acetilación de residuos de Ser y Thr han demostrado que pueden influir sobre las propiedades tanto fisiológicas como amiloidogénicas de AS.⁶⁷ Además, la proteína AS puede sufrir la nitración de sus residuos de Tyr y la oxidación de sus residuos de His y Met en respuesta al estrés oxidativo proveniente del envejecimiento normal.^{68,69} Por último, factores medioambientales pueden predisponer la agregación de AS, a la vez que ciertos metales promueven el depósito de AS *in vitro* y en cultivos celulares.^{69,70}

1.3 Estrés oxidativo y daño oxidativo

1.3.1 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es una condición donde se pierde el balance homeostático entre los niveles de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*) y la capacidad de los sistemas antioxidantes de eliminarlos, resultando en una acumulación excesiva de ROS (Figura 1.4).⁷¹⁻⁷³ Las ROS son radicales basados en oxígeno producidos en la mayoría de las células eucariotas como subproductos de la actividad enzimática involucrada en la cadena de transporte de electrones mitocondrial y de la actividad de citocromos, lipooxigenasas, ciclooxigenasas, NAD(P)H oxidasas y peroxidasas, entre otros.^{74,75} También pueden ser generados a través de la

interacción directa de metales redox con especies de oxígeno, vía reacciones de Fenton y Haber-Weiss. Niveles elevados de ROS eventualmente provocan daño a nivel de la membrana celular a través de la peroxidación de lípidos, daño estructural sobre ácidos nucleicos y cambios en la estructura y función de proteínas por oxidación, creando una cascada de disfunción celular que deriva en muerte celular.^{71,76} La acumulación de ROS ha sido descrita como un subproducto potencialmente dañino del envejecimiento, isquemia, inflamación y toxicidad relacionada con neuropatologías.⁷⁷⁻⁷⁹

La producción extensiva de ROS en el cerebro puede proveer una explicación de la magnitud del rol que estas especies juegan en el envejecimiento y las neuropatologías. El cerebro es uno de los órganos metabólicamente más activos del cuerpo y es vulnerable al estrés oxidativo particularmente por las siguientes razones. El cerebro tiene una alta demanda de oxígeno, consumiendo el 20% del suministro de oxígeno de todo el cuerpo y del cual una significativa parte es convertido en ROS.⁸⁰ Los metales redox activos como hierro y cobre están presentes en abundancia y están activamente involucrados en la catálisis de ROS. Los niveles elevados de ácidos grasos poliinsaturados encontrados en las membranas de las células cerebrales son sustratos de peroxidación lipídica, generando subproductos tóxicos.^{81,82} Finalmente, hay relativamente bajos niveles de glutatión, el cual juega un rol antioxidante endógeno en la eliminación de ROS.⁸³

1.3.2 Daño oxidativo y enfermedad de Parkinson

En lo que respecta a la EP, la edad es el principal factor de riesgo, con un aumento exponencial de la ocurrencia de la enfermedad por encima de la edad de 65 años.⁸⁴⁻⁸⁶ Los mecanismos responsables de la neurodegeneración en la EP son complejos y todavía no han sido claramente dilucidados. Las evidencias acumuladas indican que el daño oxidativo y la disfunción mitocondrial contribuyen a la cascada de eventos que conducen a la degeneración de las

neuronas dopaminérgicas (Figura 1.4).⁸⁷⁻⁹⁰ Esto es sustentado por varios análisis de cerebros *post mortem* de pacientes con EP que muestran elevados niveles de subproductos de peroxidación de lípidos,^{91,92} carbonilación y oxidación de proteínas solubles,⁹³ y productos de oxidación de ADN y ARN.^{94,95} Igualmente, se encontraron cambios en las moléculas antioxidantes, descritas en etapas tempranas de la EP, en particular la disminución de los niveles de glutatión en la *substantia nigra* de pacientes con EP.⁹⁶

Además de las décadas necesarias para que el plegamiento anormal de proteínas alcance un nivel umbral para generar daño neuronal, la disfunción mitocondrial asociada con el envejecimiento y el consecuente aumento en la producción de ROS parecen ser aspectos importantes en los desórdenes neurodegenerativos.^{86,97-99} La disfunción de la respiración mitocondrial aumenta con la edad, y está asociada tanto a cambios morfológicos mitocondriales,¹⁰⁰ como a una acumulación de mitocondrias defectuosas resultado del descenso

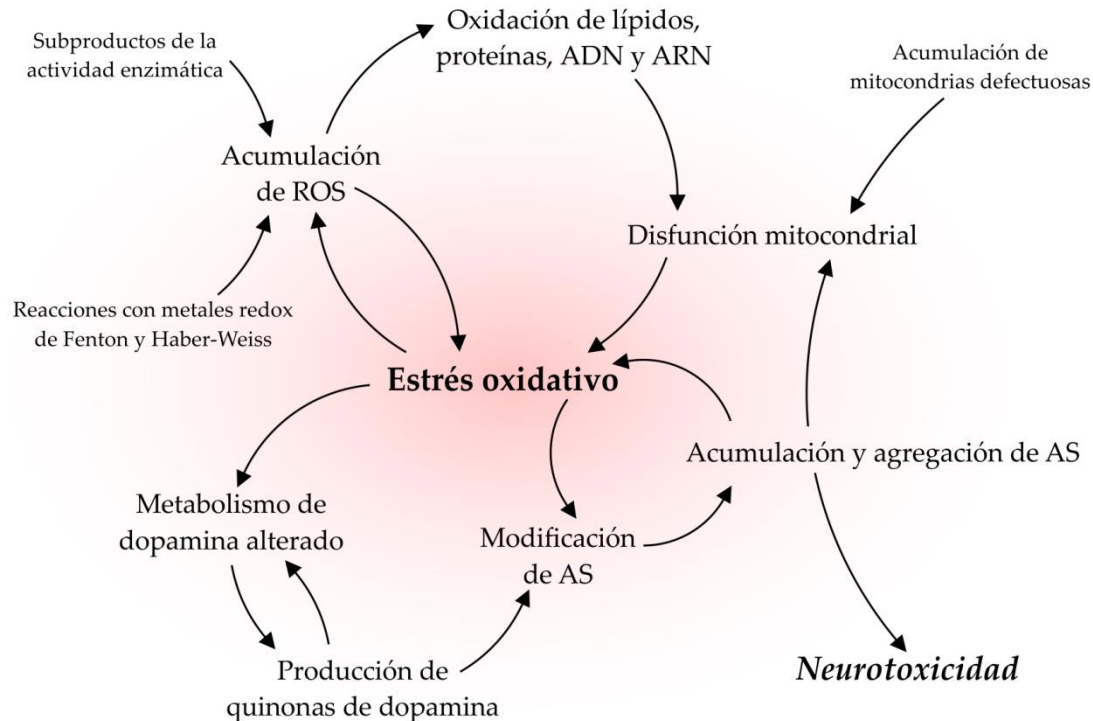


Figura 1.4. Rol del estrés oxidativo en el desarrollo de la enfermedad de Parkinson. Esquema representativo que correlaciona las fuentes del estrés oxidativo con la neurotoxicidad inducida por AS responsable de la enfermedad de Parkinson.

relacionado con la edad de la autofagia (Figura 1.4).^{101,102} En cerebros envejecidos y de pacientes con EP, se han detectado niveles elevados de delecciones y mutaciones del genoma mitocondrial de neuronas de la *substantia nigra*.¹⁰³⁻¹⁰⁵ Esto provoca la expresión de formas mutantes de subunidades de la cadena de transporte de electrones y ARN de transferencia mitocondriales esenciales para la traducción,¹⁰⁶ exacerbando colectivamente la producción de ROS. Este escenario crearía un círculo vicioso que produciría mayor daño a los elementos mitocondriales y por ende mayor producción de ROS.^{103,107}

Por otro lado, la neurodegeneración selectiva de las neuronas dopaminérgicas sugiere que el metabolismo de la dopamina en sí mismo puede ser fuente de estrés oxidativo (Figura 1.4).^{88,108} Se ha observado que las terminales de neuronas dopaminérgicas activas degeneran proporcionalmente a los niveles de oxidación de dopamina que sigue a una inyección de dopamina,¹⁰⁹ y se ha demostrado que el aumento en el transporte de dopamina en ratones resulta en daño oxidativo, pérdida neuronal y déficits motores.¹¹⁰ La dopamina es sintetizada a partir de tirosina por la tirosina hidroxilasa y la aminoácido aromático decarboxilasa, y a continuación se almacena en vesículas sinápticas. Sin embargo, cuando hay un exceso de dopamina citosólica fuera de las vesículas sinápticas, la dopamina es fácilmente metabolizada a través de la monoaminaoxidasa o por autooxidación a quinona de dopamina.¹¹¹ Las quinonas de dopamina pueden causar la inactivación del transportador de dopamina y de la tirosina hidroxilasa afectando así el metabolismo de dopamina^{112,113} y la modificación de varias proteínas relacionadas con la EP, como AS, DJ-1 y PINK, alterando sus propiedades fisiopatológicas.¹¹³⁻¹¹⁵

1.3.3 Daño oxidativo y alfa-sinucleína

Experimentos sobre cultivos celulares mostraron que la proteína AS modificada por dopamina no sólo es pobremente degradada por la vía de autofagia mediada por chaperonas, sino que además bloquea este sistema de

degradación para otros sustratos que utilizan esta vía, causando considerable estrés celular.¹¹⁶ Además, la conjugación de dopamina con AS inhibe la transición de protofibras a fibras maduras, generando una acumulación potencial de protofibras solubles citotóxicas en las neuronas dopaminérgicas, mientras que la adición de agentes antioxidantes tiene la habilidad de revertir la formación de estos aductos, sugiriendo que la oxidación de dopamina puede contribuir a la acumulación de protofibras de AS.^{117,118}

En esta dirección, experimentos *in vivo* e *in vitro* soportan la noción de que el aumento de estrés oxidativo del cerebro puede contribuir a la agregación de AS (Figura 1.4).¹¹⁹ El estrés oxidativo puede causar modificaciones en la membrana nuclear y causar la translocación de AS al núcleo, donde puede formar complejos con histonas provocando la oligomerización en fibras amiloides.¹²⁰⁻¹²² El estrés oxidativo promueve la incorporación, acumulación y oligomerización de AS extracelular en oligodendrocitos¹²³ e induce modificaciones oxidativas sobre AS que incrementan la toxicidad sobre neuronas dopaminérgicas.¹²⁴ Además, la incubación de AS recombinante en presencia de citocromo c y H₂O₂,¹²⁵ o la exposición de células en cultivo a H₂O₂ y Fe(II), MPP+, superóxido y óxido nítrico promueven la oxidación y agregación de AS.^{119,126,127}

Finalmente, podría generarse un círculo vicioso de neurotoxicidad creciente, ya que la formación de agregados de AS está asociada con el aumento de estrés oxidativo (Figura 1.4).^{119,128,129} Se ha demostrado que las inclusiones de AS aumentan el estrés oxidativo mitocondrial dendrítico en neuronas dopaminérgicas¹³⁰ y que la acumulación de AS en neuronas dopaminérgicas reduce la actividad del Complejo I mitocondrial y aumentan la producción de ROS derivando en la muerte celular.¹³¹ El mecanismo dual patogénico, donde la actividad fisiológica de AS es alterada por el estrés oxidativo mientras que la modificación oxidativa de AS presenta propiedades neurotóxicas, crea un

estado de muerte celular progresiva como el que es observado en la EP, aunque las bases moleculares aún se desconocen.

1.4 Metalobiología y química de la enfermedad de Parkinson

1.4.1 El vínculo entre el cobre y la enfermedad de Parkinson

Las alteraciones en el almacenamiento, transporte y manipulación celular de ciertos metales de transición han llamado la atención en la EP, particularmente debido a que estudios sobre cerebros *post mortem* de pacientes con EP han revelado alteraciones en los niveles de hierro y cobre.^{132,133} Estos descubrimientos son especialmente importantes debido a que ambos metales están involucrados en la generación y propagación de ROS debido a sus propiedades redox. La acumulación de hierro podría estar vinculada con la disminución de la actividad ferroxidasa, llevada a cabo principalmente por la cuproproteína ceruloplasmina,¹³⁴ cuya actividad enzimática se ha visto sistemáticamente disminuida en pacientes con la EP.^{135,136} Por otro lado, se ha reportado que las concentraciones de cobre en el líquido cefalorraquídeo son mayores en pacientes con EP,^{135,137} implicando que el cobre no estaría siendo correctamente manipulado por las cuproproteínas neuronales y/o no estaría siendo correctamente transportado.

En condiciones fisiológicas, la mayoría del cobre plasmático está unido a ceruloplasmina, con una porción minoritaria transportada por albumina, transcupretina y otros aminoácidos. Sin embargo, la incorporación celular de cobre plasmático a través de ceruloplasmina y albumina es insignificante comparado con la incorporación en capilares cerebrales de cobre libre a través de la proteína transmembrana Ctr1.^{138,139} Estudios sobre cerebros *post mortem* de pacientes con EP han reportado que existe una disminución marcada de Ctr1 neuronal, y que los niveles de la misma se correlacionan con la concentración de cobre en la *substantia nigra*.¹⁴⁰ Por lo tanto, se sugiere que la desregulación

patológica de cobre en ciertas áreas del cerebro es un evento de suma importancia, ya que además de contribuir a la generación de ROS mediante el aumento de cobre libre no transportado, alteraría los niveles de los sistemas antioxidantes dependientes de cobre.

El cobre es requerido en numerosas reacciones del metabolismo celular,¹⁴¹ particularmente en el cerebro debido a que este órgano posee un elevado ritmo respiratorio y es proclive a sufrir estrés oxidativo. En este sentido, el cobre no solo participa de la neutralización de ROS como cofactor de Cu/Zn-SOD sino que además contribuye al transporte de electrones dentro de la cadena respiratoria mitocondrial, participa en la síntesis de neurotransmisores (dopamina betahidroxilasa), en el metabolismo de neurotransmisores (diaminaoxidasas y monoaminaoxidasas), y en el almacenamiento y manipulación de otros metales (metalotionina, ceruloplasmina y hefastina), entre otros.¹⁴¹

Finalmente, el cobre tiene un rol como tal dentro de la vía de señalización sináptica. La presencia de cantidades sustanciales de cobre en las terminales nerviosas ha sido demostrada por fraccionamiento subcelular, revelando que el 23% del contenido total de cobre está contenido en sinaptosomas.¹⁴² La concentración de cobre en sinaptosomas fue estimada en 15µM, mientras que en vesículas sinápticas podría alcanzar concentraciones del orden de los 300µM.^{143,144} Esto sugiere que un transporte activo estaría involucrado en la incorporación y almacenamiento de cobre a dichas vesículas con el fin de liberarlo frente a estimulación, llegando a niveles del orden de los 250µM en el espacio sináptico durante la actividad neuronal.^{144,145} Sumado al hecho que el cobre está enriquecido en la *substantia nigra*,^{146,147} la co-localización de cobre y AS en las terminales pre-sinápticas y la afinidad de AS por vesículas sinápticas constituye un escenario donde la interacción entre ambos se torna factible y relevante para la fisiopatología de la EP.

1.4.2 Cobre, alfa-sinucleína y daño oxidativo

Se ha sugerido que la interacción entre AS y cobre podría tener un rol en el desarrollo de la EP ya que se ha observado que el ion Cu(II) acelera dramáticamente agregación amiloide de la proteína.^{70,148-151} Experimentos utilizando concentraciones micromolares de iones metálicos di- y trivalentes, mostraron que sólo Cu(II) tiene la capacidad de acelerar la formación de fibras amiloides bajo estas condiciones.^{152,153} La presencia de Cu(II) induce la formación de agregados anulares y protofibrilares de corta duración, que favorecen el ensamblado de las fibras amiloides.¹⁵⁴

Por otro lado, la interacción entre AS y cobre puede influenciar ciertos procesos interconectados, como modular la reactividad redox intrínseca del cobre promoviendo la producción de ROS, promover la oxidación de sustratos externos presentes en la neurona e inducir modificaciones post-traduccionales oxidativas sobre AS. La oxidación catalizada por cobre involucra la reducción de Cu(II) a Cu(I) por un dador de electrones adecuado y la conversión de O₂ en ROS. Para los complejos AS-Cu(II), primero deben ser reducidos por un dador de electrones como el ácido ascórbico (AA), NADH, glutatión o la propia proteína. Altos niveles de AA fueron encontrados en el interior de las neuronas¹⁵⁵ y es por esto que la mayoría de los estudios utilizan AA como el dador de electrones de relevancia fisiológica. Evidencia experimental muestra que el complejo entre AS y cobre induce cambios en las propiedades redox del cobre y ha sido relacionado con una producción incrementada de H₂O₂ y de quinona de dopamina a partir de la oxidación de AA.¹⁵⁶ Fue encontrado que el AA puede reducir directamente AS-Cu(II) a AS-Cu(I), cuyo ciclo de reducción y oxidación produce radicales hidroxilos¹⁵⁷ y que la oxidación del complejo AS-Cu(I) por O₂ exhibe un comportamiento citotóxico.¹⁵⁶

Un amplio rango de modificaciones estructurales se han reportado para péptidos coordinando Cu(II) en presencia de H₂O₂ o de AA bajo condiciones aeróbicas, tales como oxidación de cadenas laterales, entrecruzamiento

proteína-proteína, oxidación del esqueleto proteico y fragmentación proteica.¹⁵⁸⁻
¹⁶⁰ Estudios de las propiedades redox del complejo formado entre AS y cobre muestran que la oxidación de Cu(I) está asociada con la generación de ROS y la formación de puentes di-tirosina.¹⁶¹ Además, estudios de espectroscopia de masas indican que el ciclo redox Cu(I)/Cu(II), en presencia de AA y O₂ cataliza eficientemente la oxidación de los residuos de Met1 y Met5 del péptido ¹MDVFMK⁶ de AS.¹⁶⁰ La oxidación de los residuos de Met se ha observado al incubar AS-Cu(II) tanto con dopamina, con H₂O₂ o con AA,^{158,159,162,163} mientras que la oxidación del residuo de His50 se ha observado al incubar AS-Cu(II) con H₂O₂.¹⁵⁹ Finalmente, se observó que la incubación de AS con Cu(II) y H₂O₂ promueve la formación de fibras amiloides,¹⁶⁴ mientras que la incubación con H₂O₂ solo genera oligómeros no fibrilares. Estos resultados resaltan la importancia del rol catalítico de la química de cobre en el ensamblado amiloide de AS,^{165,166} y han hecho necesaria la caracterización detallada de los sitios de coordinación de cobre por parte de AS para develar los mecanismos moleculares detrás de dichos eventos.

La unión de Cu(II) por AS fue estudiada intensamente en la última década, utilizando una variedad de técnicas que permitieron describir con detalle las características de la coordinación de Cu(II) a la proteína (Figura 1.5).^{151,167} Se han caracterizado tres sitios diferentes de coordinación independientes y no interactivos, que involucran a los residuos ¹MD² (sitio 1), ⁴⁹VH⁵⁰ (sitio 2) y ¹¹⁹DPDNE¹²³ (sitio 3).^{149,151-153,168} El uso de mutantes proteicas demostraron conclusivamente que la aceleración de la agregación de AS inducida por Cu(II), presenta como paso crítico la unión de Cu(II) al sitio 1 de AS.¹⁶⁸ A través del uso de calorimetría de titulación isotérmica se estimaron afinidades de 0.1μM para el sitio 1, 35μM para el sitio 2 y ~1mM para el sitio 3.^{151,168} El sitio de mayor afinidad muestra el comportamiento de un set de ligandos del tipo 2N2O, compuestos por el N del grupo amino-terminal de Met1, el N amida desprotonado y el O de la cadena lateral de Asp2 y el O de

una molécula de agua. Los parámetros estructurales son característicos de una coordinación de Cu(II) en un arreglo tetragonal distorsionado, corroborado por la construcción de un modelo por dinámica molecular QM/MM.¹⁶⁸ Estudios espectroscópicos indican que el set de ligandos del segundo sitio de coordinación podría ser 1N3O, 2N2O o 3N1O.^{149,169,170} Además del N del grupo imidazol de His50, los otros N podrían provenir de los grupos amida desprotonados de Val49 e His50. Respecto a los ligandos O, no hay evidencia experimental pero se sugiere la presencia de una molécula de agua y/o de un carbonilo del esqueleto proteico. El tercer sitio muestra un comportamiento 4O, siendo los candidatos más probables los O de los grupos carboxilo de los residuos Asp119, Asp121, Asn122 y Glu123.^{152,168,169} Recientemente, se ha reportado la existencia de la modificación post-traducciona de acetilación del extremo amino-terminal, que entre otras cosas provocaría el bloqueo de la unión de Cu(II) en el sitio 1 de alta afinidad en AS.^{171,172}

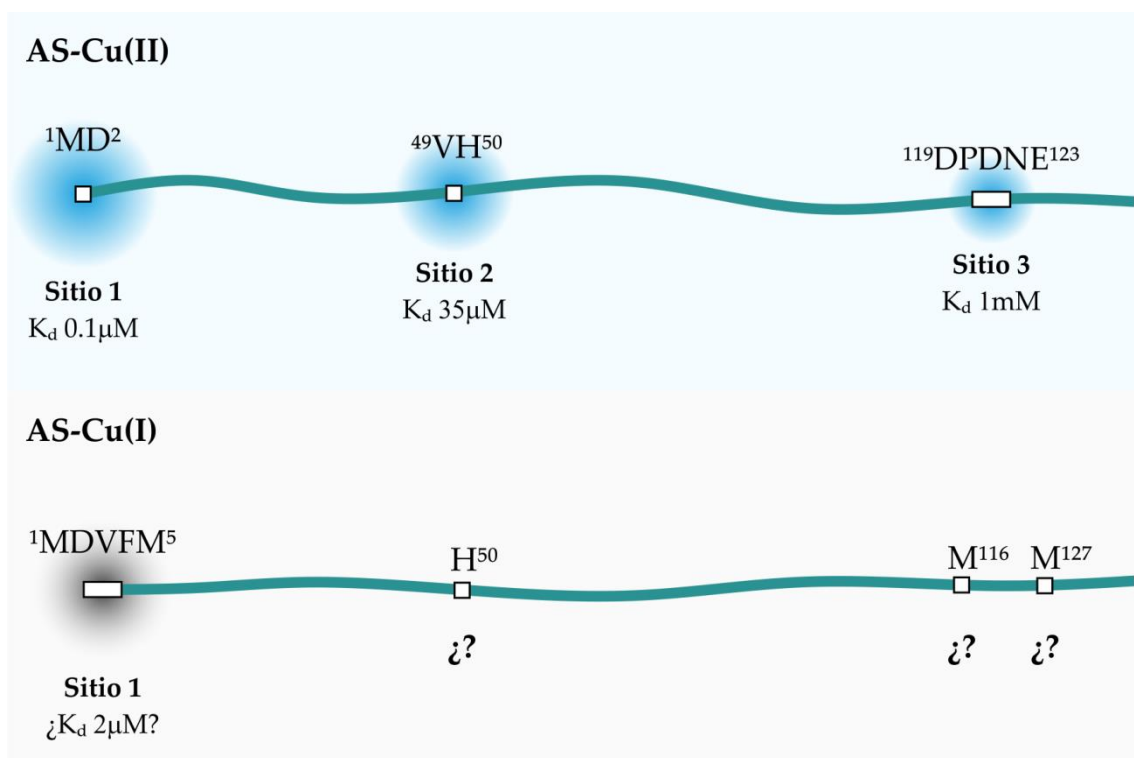


Figura 1.5. Interacción entre AS y cobre. Se muestra gráficamente las características de los sitios de unión de Cu(II) y Cu(I) de AS.

Comparado con la abundante información de Cu(II), la unión de Cu(I) a la proteína AS ha sido recientemente explorada. El interés de caracterizar la unión de Cu(I) a la proteína AS supera el de describir su rol como simple catalizador de la oxidación de la proteína, ya que el ion Cu(I) adquiere importancia por sí mismo debido a que es el estado de oxidación mayoritario en el interior celular altamente reductor, donde ocurre fundamentalmente la agregación amiloide de la proteína AS y donde la interacción AS-Cu(I) podría tener consecuencias amiloidogénicas y/o patológicas particulares. La primer evidencia de unión de Cu(I) a AS identifica al extremo de la región N-terminal como el sitio de unión principal,¹⁶⁰ determinándose que los grupos tioeter de los residuos de Met1 y Met5 serían los ligandos principales de dicho ion metálico, con una afinidad en el rango micromolar bajo (Figura 1.5). Además, los estudios sugieren una interacción más débil con el residuo de His50 en la región N-terminal y con los residuos de Met116 y Met127 en la región C-terminal.¹⁶⁰ Este escenario de vacancia, cuyo conocimiento resulta crítico para avanzar en la química bioinorgánica de la EP, fue la circunstancia principal que motivó el desarrollo del presente trabajo de tesis, que como se verá tiene su epicentro temático en la dilucidación de las bases estructurales de la interacción entre el ion Cu(I) y la proteína AS.

1.5 Objetivos de la tesis

Las evidencias descritas en este capítulo sustentan la hipótesis que postula una correlación directa entre los eventos de oxidación de la proteína AS y su interacción con cobre con los procesos patológicos de agregación amiloide, estrés oxidativo y pérdida de células neuronales en la EP. Por ende, en este trabajo de tesis nos enfocamos en avanzar en algunos de estos aspectos aún desconocidos, y que entendemos son de fundamental importancia para avanzar en el desarrollo de la química bioinorgánica de la EP, un área que aun hoy es de

vacancia si se la compara con el grado de desarrollo alcanzado en otras patologías neurodegenerativas como por ejemplo la enfermedad de Alzheimer. El objetivo general de este trabajo de tesis fue abordar el estudio de la caracterización estructural de la interacción entre la proteína AS e ion Cu(I), para lo cual se establecieron los siguientes objetivos específicos, cuyos resultados serán presentados y discutidos detalladamente a lo largo de este trabajo de tesis:

1. Identificar los sitios de unión y grupos primarios de anclaje de Cu(I) en la región N-terminal y C-terminal de la proteína AS.
2. Determinar la estequiometría y afinidad de cada sitio de unión a Cu(I) de la proteína AS.
3. Determinar los productos de la oxidación catalizada por cobre en AS, el mecanismo de reacción y las consecuencias sobre el potencial amiloidogénico de la proteína.
4. Analizar el impacto de la interacción AS-Cu(I) sobre el potencial amiloidogénico de la proteína.
5. Evaluar la ocurrencia de cambios en la conformación y en la dinámica de la proteína AS como consecuencia de su interacción con el ion Cu(I).
6. Caracterizar la interacción de Cu(I) con la proteína BS, homóloga de AS y que cumpliría un rol como regulador negativo de su amiloidogénesis.

Capítulo 2 - Materiales y Métodos

2.1. Reactivos generales, proteínas, cepas y medios de cultivo.

2.1.1 Soluciones amortiguadoras.

Las soluciones amortiguadoras utilizadas durante el presente trabajo de tesis fueron ácido 4-Morfolinoetanosulfónico deuterado (MESd) 20mM, NaCl 100mM, pH 6.5 (solución amortiguadora A), ácido 4-Morfolinoetanosulfónico (MES) 20mM, NaCl 100mM, pH 6.5 (solución amortiguadora B), y ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS) 20mM, NaCl 100mM, pH 7.4 (solución amortiguadora C). Para las distintas etapas de la purificación proteica se utilizó también la solución amortiguadora de lisis conteniendo tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) 25mM, pH 7.7. De igual modo, las soluciones amortiguadoras TRIS 0.5M, pH 6.8 y TRIS 1.5M, pH 8.8 se utilizaron para la preparación de geles de poliacrilamida. Las drogas sólidas fueron adquiridas de Sigma-Aldrich.

2.1.2 Reactivos para los estudios por RMN

Los reactivos ($^{15}\text{NH}_4$) $_2\text{SO}_4$, Glucosa (^{13}C), y MESd fueron obtenidos de Cambridge Isotope Laboratories. D $_2\text{O}$ 100% y el compuesto n-octilpenta-(etilen glicol) (C8E5) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich.

La sal CuSO_4 de mayor pureza disponible y el ácido ascórbico (AA), fueron adquiridos de Sigma-Aldrich. Todas las soluciones de Cu(I) utilizadas en este trabajo se prepararon a partir de una solución madre de CuSO_4 100mM y de una solución madre de AA ~1M en solución amortiguadora B, que demostró ser estable en almacenamiento a -80°C .

2.1.3 Proteínas y péptidos

Las proteínas utilizadas en esta tesis se detallan a continuación:

- Alfa-sinucleína (AS)

- AS oxidada en Met1 (Met1^{ox} AS)
- AS con la mutación puntual H50A (H50A AS)
- AS con la mutación puntual M116A (M116A AS)
- AS con la mutación puntual M127A (M127A AS)
- AS con las mutaciones puntuales M5I y H50A (M5I/H50A AS)
- AS con la supresión del segmento Δ 109-140 (1-108 AS)
- AS con la mutación puntual M5I y la supresión del segmento Δ 109-140 (M5I 1-108 AS)
- AS con la mutación puntual H50A y la supresión del segmento Δ 109-140 (H50A 1-108 AS)
- AS con las mutaciones puntuales M5I y H50A y la supresión del segmento Δ 109-140 (M5I/H50A 1-108 AS)
- AS con la acetilación del grupo amino-terminal (acAS)
- Beta-sinucleína con la acetilación del grupo amino-terminal (acBS)

Los péptidos sintéticos utilizados en esta tesis se detallan a continuación:

- El péptido de secuencia ¹MDVFMK⁶ (P1AS)
- P1AS con la mutación puntual M1I (M1I P1AS)
- P1AS con la mutación puntual M5I (M5I P1AS)
- P1AS con las mutaciones puntuales M1I y M5I (M1I/M5I P1AS)
- P1AS con la acetilación del grupo amino-terminal (acP1AS)
- El péptido de secuencia ⁴⁵KEGVVHGVATV⁵⁵ con la acetilación del grupo amino-terminal (45-55 AS)
- El péptido de secuencia ¹MDVFMKGLSMAKEGV¹⁵ con la acetilación del grupo amino-terminal (1-15 acBS)

Todos los péptidos fueron amidados en su extremo C-terminal.

2.1.4 Cepas y plásmidos

Para la sobreexpresión de las distintas variantes proteicas se utilizó la siguiente cepa:

Escherichia coli BL21 (DE3): F⁻, ompT, dcm, gal. La cepa contiene el profago λ (DE3), que incluye: (a) el gen que codifica para la ARN polimerasa del fago T7 y que se encuentra bajo el control del promotor lacUV5, inducible por lactosa o por Isopropil-Tio- β -D-Galactopiranosido (IPTG), y (b) el gen lacIq, que codifica para el represor de la transcripción, LacI.

Los plásmidos utilizados fueron los siguientes:

pT7-7 AS: plásmido construido en nuestro laboratorio a partir del vector pT7-7. Este vector de expresión, de alto número de copias en *E. coli*, contiene al gen que codifica para la proteína AS, bajo el control del promotor fuerte del fago T7. Además, posee el gen amp^r como marcador de selección de transformantes en *E. coli*.

pT7-7 1-108 AS: plásmido construido en nuestro laboratorio a partir del vector pT7-7. Este vector de expresión, de alto número de copias en *E. coli*, contiene al gen que codifica para la proteína AS con la supresión del segmento Δ 109-140, bajo el control del promotor fuerte del fago T7. Además, posee el gen amp^r como marcador de selección de transformantes en *E. coli*.

Sobre los plásmidos pT7-7 AS o pT7-7 1-108 AS se realizaron las mutaciones dirigidas para obtener nuevos plásmidos derivados, que contienen las secuencias para expresar las proteínas mutantes.

pT7-7 BS: plásmido construido en nuestro laboratorio a partir del vector pT7-7. Este vector de expresión, de alto número de copias en *E. coli*, contiene al gen que codifica para la proteína BS bajo el control del promotor fuerte del fago T7. Además, posee el gen amp^r como marcador de selección de transformantes en *E. coli*.

pNatB: plásmido pACYCduet-naa20⁺-naa25⁺, que permite la co-expresión de las subunidades catalíticas (Naa20) y regulatoria (Naa25) del complejo NatB

de levadura. Además, posee el gen *clfr* como marcador de selección de transformantes en *E. coli*.

2.1.5 Medios de cultivo

Medio de cultivo rico Luria-Bertani (LB) (Sigma): Contiene peptona de caseína (1%p/v), extracto de levadura (0,5%p/v), NaCl (0,5%p/v). En su versión sólida este medio incluye agar-agar (1%p/v).

Medio mínimo M9 ¹⁵N: Contiene Na₂HPO₄ (8,5g/L), KH₂PO₄ (3g/L), NaCl (0,5g/L), (¹⁵NH₄)₂SO₄ (1,2g/L), CaCl₂ (0,1mM), MgSO₄ (2mM), Glucosa (0,4%), H₂O csp 1L. Se utilizó para obtener proteínas enriquecidas isotópicamente en ¹⁵N.

Medio mínimo M9 ¹³C: Contiene Na₂HPO₄ (8,5g/L), KH₂PO₄ (3g/L), NaCl (0,5g/L), (NH₄)₂SO₄ (1,2g/L), CaCl₂ (0,1mM), MgSO₄ (2mM), ¹³C-Glucosa (0,4%), H₂O csp 1L. Se utilizó para obtener proteínas enriquecidas isotópicamente en ¹³C.

Medio mínimo M9 ¹³C-¹⁵N: Contiene Na₂HPO₄ (8,5g/L), KH₂PO₄ (3g/L), NaCl (0,5g/L), (¹⁵NH₄)₂SO₄ (1,2g/L), CaCl₂ (0,1mM), MgSO₄ (2mM), ¹³C-Glucosa (0,4%), H₂O csp 1L. Se utilizó para obtener proteínas enriquecidas isotópicamente en ¹³C/¹⁵N.

2.2. Técnicas de biología molecular.

2.2.1. Transformación de *E. coli* BL21 (DE3).

La transformación de células de *E. coli* se efectuó en presencia de CaCl₂, exponiendo las células competentes a un shock térmico que permite la permeabilización momentánea de sus membranas celulares. En primer lugar se obtuvieron células en fase de crecimiento exponencial, realizando una dilución (1/100) de un cultivo saturado de *E. coli* crecido previamente en LB suplementado con Ampicilina (100µg/mL). Este cultivo se incubó durante

2h/37°C/250rpm hasta alcanzar una densidad óptica a $\lambda=600\text{nm}$ ($\text{DO}_{600\text{nm}}$) de 0.6-0.8. Luego, se extrajeron alícuotas de 1mL para cada evento de transformación y se las centrifugó durante 2h/4°C/5000rpm. Una vez descartado el sobrenadante, las células se resuspendieron en 500 μL de CaCl_2 (0,1 M), frío y estéril, y se centrifugaron nuevamente durante 2h/4°C/5000rpm. El pellet celular obtenido se resuspendió en 100 μL de CaCl_2 (0,1M), frío y estéril. A esta suspensión se le agregó una alícuota del plásmido correspondiente (50-100ng). Luego de 1h de incubación en hielo se aplicó un shock térmico durante 45s/42°C, seguido de 2min de incubación en hielo. Estas células se recuperaron en 1mL de medio líquido LB durante 1h/37°C. Finalmente, se las sembró en medio sólido LB suplementado con los antibióticos correspondientes.

2.2.2. Mutagénesis sitio dirigida

Las especies de proteínas con mutaciones puntuales se obtuvieron a partir de las secuencias silvestres de AS y 1-108 AS, usando el sistema de mutagénesis sitio dirigida “Quick Change Site Directed Mutagénesis” (Stratagene). Brevemente, para cada mutante se diseñaron dos cebadores complementarios de aproximadamente 30pb conteniendo la mutación puntual en el centro de su secuencia. Las regiones 5' y 3' que flanquean la mutación son complementarias a la secuencia silvestre permitiendo la hibridación de los cebadores al ADN parental. La reacción se realizó con ambos cebadores (sentido y antisentido) en el mismo tubo de PCR, lo que generó la amplificación completa de ambas hebras de ADN del plásmido. Luego de la amplificación, el ADN parental fue degradado selectivamente por acción de la enzima DpnI, una exonucleasa que reconoce ADN metilado. El ADN amplificado mutante se transformó en cepas de *E. coli* JM109 dentro de las cuales se produjo la circularización y síntesis de la hebra complementaria. Las cepas que contienen el plásmido circularizado se aislaron mediante el marcador de resistencia presente en el vector (resistencia a ampicilina). A continuación, se seleccionaron tres transformantes de las cuales

se extrajo el ADN plasmídico y se verificó la incorporación de la mutación puntual por secuenciación. Una vez secuenciados, los plásmidos se transformaron en la cepa *E. coli* BL21, que nos permitió obtener niveles altos de expresión de las proteínas a ser estudiadas.

Las reacciones de PCR se realizaron agregando los cebadores (10 μ M), directo y reverso, a una solución de H₂O milliQ (50 μ L, volumen final) que contiene cantidades equimolares de los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTPs, 25mM), MgSO₄ (50mM), enzima Pfx Platinum® DNA Polimerasa (Invitrogen) (2,5U/ μ L) con su correspondiente solución de amplificación (100mM), y el plásmido de la cepa *E. coli* JM109 (100ng/ μ L), previamente aislado. Como control negativo se utilizó una solución que no contenía el plásmido molde. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador (BioRad MyCycler PCR system). Este equipo permitió realizar las variaciones de temperatura necesarias. La enzima DpnI (10 μ M) (New England Biolabs) se agregó al final del ciclado a fin de digerir la hebra parental no amplificada.

2.3. Purificación de péptidos y proteínas

2.3.1. Purificación de AS, sus variantes y BS.

Se utilizó el mismo protocolo de purificación para AS, BS y sus correspondientes mutantes. Luego de ser transformada con el plásmido de interés, la cepa de *E. coli* BL21 fue inoculada en 10mL de medio líquido LB suplementado con 100 μ g/mL de ampicilina (Parafarm). El cultivo se dejó crecer hasta saturación durante toda la noche (37°C/250rpm). Este cultivo saturado se utilizó para inocular un cultivo de 500mL de LB suplementado con ampicilina (100 μ g/mL). Se incubó bajo las mismas condiciones hasta obtener valores de DO_{600nm} en el rango 0.6-0.8. La expresión de proteínas se indujo con IPTG 1mM. Luego de 4h de incubación, el cultivo fue cosechado mediante centrifugación

(15min/5000rpm/4°C). Se descartó el sobrenadante, el pellet de células se resuspendió en 20ml de solución amortiguadora de lisis, se agregó PMSF 1 mM y se almacenó a -20°C. Seguidamente, se descongeló y se realizó la lisis celular mediante sonicado (Branson Sonifier), el cual consistió en aplicar 6 pulsos de 30seg a 40watts, con intervalos de 1min entre pulsos. El extracto celular obtenido se hirvió (20min/95°C) con el objetivo de completar la lisis celular e inducir la precipitación de proteínas termosensibles. Luego, se centrifugó la solución resultante (40min/4°C/11000rpm) y se recuperó el sobrenadante, donde permanecían las proteínas termoresistentes como AS. Al sobrenadante se le agregó sulfato de estreptomicina 10mg/ml, con el objetivo de precipitar el ADN genómico, se incubó con agitación orbital constante (15min/4°C) y se centrifugó (40min/4°C/11000rpm). Se recuperó el sobrenadante, al cual se le incorporó sulfato de amonio 360mg/mL, con el objetivo de producir la precipitación de las proteínas presentes, entre las que se encuentran las proteínas de interés. Al igual que en el paso anterior, la solución fue incubada con agitación orbital constante (15min/4°C). Finalmente, se efectuó una etapa de centrifugación (40min/4°C/11000rpm), luego de la cual se preservó el precipitado. El precipitado proteico se resuspendió en 5ml H₂O y fue sometido a un proceso de diálisis contra 200 volúmenes de TRIS 25mM pH7.7, a fin de disminuir la concentración salina que pudiera interferir con el proceso cromatográfico a realizar posteriormente. Todos los pasos de diálisis se realizaron utilizando membranas de diálisis de corte 3kDa.

Con el fin de purificar la proteína de interés, la solución fue sometida a una etapa de cromatografía de intercambio aniónico, utilizando una columna MonoQ, en un equipo FPLC (AktaPurifier). AS y sus variantes, debido a su carga neta negativa, fueron retenidas por la columna MonoQ, y fueron recuperada mediante la aplicación de un gradiente salino lineal (0-1.5M NaCl), produciéndose la elusión de la proteína de interés a una concentración de 300mM NaCl. A continuación, se procedió a la concentración de la muestra, la

cual se llevó a cabo mediante centrifugaciones sucesivas (15min/4°C/5000rpm), utilizando concentradores del tipo Amicon Centriprep/Centricon 10000MWCO (Milipore). Al lograr un volumen menor de 1mL, la muestra fue sometida a una cromatografía de exclusión molecular utilizando una columna Hiloal 16/600, Superdex 75pg empleando un equipo FPLC (AktaPrime). Finalmente, se procedió a una última concentración, mediante centrifugaciones sucesivas (15min/4°C/5000rpm) utilizando concentradores del tipo Amicon Centriprep/Centricon 10000MWCO hasta lograr una concentración de 200-300µM de AS. La concentración se estableció mediante espectroscopia UV (JASCO V-550), utilizando el coeficiente de extinción molar ϵ_{274nm} de 5600cm⁻¹M⁻¹. Finalmente la solución fue fraccionada y almacenada a -70°C. La pureza de las soluciones proteicas obtenidas se determinó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

Para la expresión de proteínas enriquecidas isotópicamente en ¹⁵N, ¹³C o ¹³C/¹⁵N se utilizó el mismo protocolo, excepto por el reemplazo de 500mL de medio LB por 500mL de medio mínimo M9 correspondiente.

Para la expresión de 1-108 AS y sus variantes, se procedió de igual forma excepto que se obvió el paso de cromatografía de intercambio aniónico, ya que estas proteínas no poseen carga neta negativa y por ende no son retenidas por la columna MonoQ.

Para la expresión de las proteínas acetiladas, se utilizaron las cepas E.coli BL21 conteniendo el plásmido pNatB además del plásmido de sinucleína correspondiente. El medio de cultivo se suplementó con Cloranfenicol (35µg/mL) y Ampicilina (100µg/mL) para evitar la pérdida de alguno de los plásmidos durante el crecimiento y la expresión.

2.3.2. Purificación de Met1^{OX} AS

La generación de Met1^{OX} AS se realizó de la siguiente forma: a 800µL de AS 300µM en solución amortiguadora B, se agregó Cu(II) 100µM y AA 40mM.

Se dejó oxidar en un tubo eppendorf y cada 2h se tomó una alícuota de 50 μ L y se agregó 10 equivalentes de EDTA, para monitorear el estado de oxidación mediante experimentos 1D ^1H RMN. Una vez observada la oxidación completa de Met1 se detuvo la reacción de oxidación mediante el agregado de EDTA 9mM. El EDTA acompleja el Cu(II) con alta afinidad y evita que se genere el ciclo de óxido-reducción catalizado por cobre. El mismo tratamiento se realizó sobre una muestra de AS en las mismas condiciones, excepto por el agregado de Cu(II), para obtener una proteína sin oxidación, pero bajo las mismas condiciones de estrés. Luego se realizó una diálisis conjunta para eliminar los metabolitos y ajustar el pH. Ambas muestras se dializaron dentro del mismo recipiente para que las condiciones finales fueran idénticas. A continuación, se realizó una ultrafiltración con filtro de 100kDa, con el objetivo de eliminar cualquier oligómero o protofibra que se haya generado durante la manipulación de las proteínas. La concentración final se cuantificó utilizando UV-Vis. Finalmente se realizó un SDS-PAGE que permitió monitorear que el estado monomérico no se ve afectado por el proceso de oxidación específico de Met1.

2.3.3. Síntesis de péptidos modelos

Los péptidos P1AS, M1I P1AS, M5I P1AS, M1I/M5I P1AS y acP1AS fueron sintetizados en fase sólida (resina de amida de Rink) usando química F-moc. A continuación, fueron purificados por cromatografía líquida de fase reversa (HPLC, Waters Delta 600) usando una columna C18 y un gradiente de 0-30% ACN/H₂O y caracterizados por HPLC y espectrometría de masas (ESI-TOF-MS, Agilent). Los péptidos fueron amidados en el grupo carboxilo C-terminal, mientras que el grupo amino N-terminal no fue modificado, excepto en el péptido acP1AS donde fue acetilado. El coeficiente de extinción de los péptidos fue determinado usando una curva de calibración preparada en solución amortiguadora B, a partir del pesaje de muestras de péptido sólido. El

coeficiente de extinción calculado fue de $11500\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ a 214nm y fue utilizado para determinar la concentración en cada muestra experimental.

Los péptidos 45-55 AS, 1-15 acAS y 1-15 acBS fueron adquiridos de EZBiolab.

2.4 Análisis de proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida

La pureza e integridad de las proteínas purificadas se verificó mediante la realización de geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) empleando el sistema Miniprotean III (Bio-Rad Laboratories). A tales fines se utilizó el sistema del tipo discontinuo, el cual consiste en un gel de concentración (poliacrilamida 4%, en solución amortiguadora Tris 0.126M, pH 6.8, SDS 0.26%p/v), y un gel de separación (poliacrilamida 16% en solución amortiguadora Tris 0.36M, pH 8.8, SDS 0.26%p/v). Una vez gelificado, el sistema discontinuo se colocó en una cubeta conteniendo la solución amortiguadora de corrida Laemmli. Tanto a las muestras como al marcador de peso molecular se le adicionó una solución de siembra [glicerol (5%), SDS (2%), β -mercaptoetanol (0.1%), azul de bromofenol (0.1mg/mL)] y se incubó durante 2min a 100°C ; se sembraron en las distintas calles del gel y se aplicó un voltaje constante de 180mV.

A fin de revelar las proteínas resueltas en los geles, los mismos se incubaron en primer lugar en una solución de etanol:ácido acético:agua (30:10:60) durante 5 min para producir la fijación de las proteínas. Posteriormente, los geles fueron teñidos con una solución de Azul Brillante de Coomassie R250 1%p/v (etanol:ácido acético:agua, 50:10:40) durante 2min. Finalmente, los geles se decoloraron mediante incubación a 100°C en agua destilada (5-10min).

El marcador de peso molecular utilizado estuvo compuesto por: albúmina sérica bovina (66kDa), ovoalbúmina (45kDa), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (36kDa), anhidrasa carbónica (29kDa), inhibidor de tripsina (20kDa) y α -lactoalbúmina (14kDa).

2.5 Determinación de la cinética de agregación amiloide

2.5.1 Medición de la agregación amiloide mediante fluorescencia de ThioT

El método más utilizado para detectar la formación de fibras amiloides implica la utilización de Tioflavina-T (ThioT). El espectro de absorción de este compuesto se modifica cuando el compuesto interacciona con las fibras amiloides, lo cual permite monitorear el incremento en la fluorescencia del compuesto durante un ensayo de agregación, excitando el compuesto a 440nm y midiendo la fluorescencia a 485nm.^{173,174}

El análisis de las cinéticas de agregación se realizó asumiendo un modelo nucleación dependiente,¹⁷⁵ el cual se ajusta a la siguiente ecuación sigmoidea:

$$\alpha(t) = (1 - e^{-k_{app}t})/[1 + e^{-k_{app}(t-t_{1/2})}]$$

El valor de $\alpha[t]$ representa la fracción de fibras amiloides formadas, mientras que k_{app} es la velocidad de elongación de fibras y $t_{1/2}$ corresponde al punto medio de la cinética de agregación.

Los datos de fluorescencia obtenidos se ajustaron a una curva sigmoidea, con ordenada al origen cero. Se utilizaron para este fin los programas SigmaPlot y/o GraphPad. De los ajustes se obtuvieron los parámetros $t_{1/2}$ y k_{app} , los cuales corresponden a la abscisa del punto de inflexión y a la pendiente de la recta tangente a la curva que pasa por el punto de inflexión, respectivamente.

Los ensayos de ThioT se realizaron mediante la extracción de alícuotas de 4 μ L a distintos tiempos de incubación de AS, posteriormente diluidas en un volumen final de 2 ml con solución amortiguadora MES 50mM, ThioT 10 μ M, pH 6.5, sobre las cuales se realizaron las medidas de fluorescencia.

2.5.2 Medición de la agregación amiloide mediante RMN

En nuestro grupo se cuenta con un método adicional que consiste en cuantificar la cantidad de monómero soluble durante un ensayo de agregación mediante RMN. La estrategia se basa en que durante la agregación, AS forma especies heterogéneas de mayor tamaño que no son detectadas mediante RMN de solución. De esta forma, monitoreando la evolución de la intensidad de la señal de RMN durante el curso de una agregación evidenciamos la conversión del monómero en especies de mayor tamaño. Este método es no invasivo, no requiere tomar alícuotas y sobre todo permite detectar potenciales cambios estructurales al nivel del monómero durante el proceso de agregación. La cinética de agregación se obtuvo integrando la señal de la región alifática 0.8-1.1ppm y cuantificando la disminución de dicho valor durante la agregación.

Los estudios de agregación se realizaron por duplicado en tubos de 5mm de RMN conteniendo una barra magnética de 5mm. Las muestras de AS 50-100 μ M se prepararon en un volumen final de 500 μ L en solución amortiguadora B, 10%D₂O y se incubaron a 37°C con agitación magnética a 300rpm. Cada 4-8h se extrajo la barra magnética y se adquirió un espectro 1D ¹H RMN a 25°C. El tiempo total que insume la medición fue menor a los 10min implicando un mínimo efecto sobre la agregación amiloide. Además, eventualmente se tomó una alícuota y verificó la formación de fibras amiloides a través del ensayo de ThioT descrito en la sección anterior.

2.5.3 Medición de la agregación amiloide en microplaca

Con el fin de eliminar el O₂ del entorno del complejo acAS-Cu(I) para monitorear el efecto de Cu(I) sobre la agregación amiloide, se requirió optimizar la siguiente metodología en microplacas. Se preparó una solución madre de acAS 25 μ M, AA 2.5mM, en solución amortiguadora B, y sobre una microplaca de 96 pocillos (CELLSTAR), se colocó una perla de vidrio de 2mm de diámetro por pocillo y una alícuota de CuSO₄ 1mM para obtener los

equivalentes finales deseados para cada pocillo. Cada condición se realizó por quintuplicado. La solución madre y la microplaca fueron introducidos en una bolsa anaeróbica (AtmosBag SIGMA) y fueron purgados con un flujo de N₂ continuo durante 1h, para obtener una atmósfera inerte libre de O₂. Una vez purgado el sistema, en cada pocillo se sembró 100µL de solución madre, bajo atmósfera inerte mantenida con presión positiva de N₂. Se purgó el sistema durante 30min adicionales, luego se selló la microplaca con parafilm y se introdujo en una bolsa hermética transparente del tipo ziplock, que permite la medición de fluorescencia. Finalmente, se retiró la microplaca de la bolsa anaeróbica y se introdujo en un lector de microplacas (PolarStar OMEGA). El programa del lector de microplaca utilizado para monitorear la agregación amiloide consistió en medidas puntuales de fluorescencia de ThioT ($\lambda_{\text{ex}} = 440\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 480\text{nm}$) luego de 1 ciclo de agitación orbital (5min/37°C/300rpm).

2.6. Estudios de Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear

Los experimentos de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) fueron realizados utilizando un espectrómetro Bruker Avance II de 600MHz, equipado con una sonda de detección inversa TXI 5mm 1H/D-13C/15N y un espectrómetro Bruker 600 MHz Avance III equipado con una crio-sonda de triple resonancia TCI 1H(13C/15N), con gradientes de campo magnético en el eje z. Todas las secuencias de pulsos utilizadas en este trabajo de tesis se encuentran disponibles en la biblioteca de Bruker. A menos expresado lo contrario, la temperatura de trabajo se ajustó a 15°C, para evitar problemas derivados de la agregación de AS. Bajo estas condiciones de baja temperatura y ausencia de agitación no se observó agregación de las muestras durante la adquisición de los experimentos. Todos los espectros fueron procesados y analizados usando los programas TopSpin 2.1 (Bruker), CARAMA,¹⁷⁶ Sparky¹⁷⁷ y

CCP-NMR.¹⁷⁸ A continuación se describen brevemente las técnicas de RMN utilizadas.

2.6.1. Espectros unidimensionales.

Para obtener espectros 1D ^1H RMN, se utilizó la secuencia *zgesgp*, una secuencia de pulsos 1D que realiza la supresión de solvente mediante *excitation sculpting* con gradientes.¹⁷⁹ Los parámetros utilizados fueron: 32K puntos complejos, 16ppm de ancho espectral y de 32 a 512 *scans* dependiendo de la concentración de la muestra.

2.6.2. Espectros bidimensionales homonucleares.

Para obtener espectros ^1H - ^1H TOCSY se utilizó la secuencia *mlevesgp*, una secuencia de pulsos sensible a fase que utiliza una transferencia homonuclear Hartman-Hahn, una secuencia MLEV17 para el tiempo de mezclado, dos niveles de potencia para la excitación y el *spinlock*.^{179,180} Las correlaciones detectadas en este experimento corresponden a un protón acoplado escalarmente con otro protón dentro de un sistema de espines dado, de modo que el patrón resultante para cada sistema de espines dependerá de la naturaleza del aminoácido que le da origen. Los parámetros utilizados fueron: 2K puntos complejos en la dimensión directa y 128 en la dimensión indirecta, 10ppm de ancho espectral, de 4 a 32 *scans* dependiendo de la concentración de la muestra y 85ms de tiempo de mezclado.

2.6.3. Espectros bidimensionales heteronucleares.

Para obtener espectros ^1H - ^{15}N HSQC se utilizó la secuencia *fhsqcf3gp*, una secuencia de pulsos sensible a fase que detecta correlaciones 2D ^1H - ^{15}N vía una transferencia de doble INEPT con desacople durante la adquisición.¹⁸¹ Las correlaciones detectadas en este experimento corresponden a un protón amida acoplado escalarmente con el nitrógeno amida del propio residuo, excepto los

residuos Pro que carecen de grupo amida y el residuo Met1 que posee un grupo amino, de modo que el patrón resultante permite analizar la totalidad del esqueleto proteico de una proteína. Los parámetros utilizados fueron: 2K puntos complejos en la dimensión directa (^1H) y 256 en la dimensión indirecta (^{15}N), 10ppm de ancho espectral en la dimensión directa (^1H) y 22ppm en la dimensión indirecta (^{15}N), y de 2 a 8 *scans* dependiendo de la concentración de la muestra.

Para obtener espectros ^1H - ^{15}N TROSY-HSQC se utilizó la secuencia *trosetf3gpsi*, una secuencia de pulsos sensible a fase usando una selección de gradiente *echo/antiecho* que detecta correlaciones 2D ^1H - ^{15}N vía TROSY con mejoramiento de sensibilidad.¹⁸² Las correlaciones detectadas en este experimento son las mismas que en el experimento ^1H - ^{15}N HSQC, aunque la resolución está intrínsecamente incrementada por la secuencia TROSY. Los parámetros utilizados fueron: 2.5K puntos complejos en la dimensión directa (^1H) y 512 en la dimensión indirecta (^{15}N), 7.75ppm de ancho espectral en la dimensión directa (^1H) y 22ppm en la dimensión indirecta (^{15}N) y 4 *scans*.

Para obtener espectros ^1H - ^{13}C HSQC se utilizó la secuencia *hsqcetgp*, una secuencia de pulsos sensible a fase usando una selección de gradiente *echo/antiecho-TPPI* que detecta correlaciones 2D ^1H - ^{13}C vía una transferencia de doble INEPT con desacople durante la adquisición. Las correlaciones detectadas en este experimento corresponden a un protón acoplado escalarmente con el carbono covalentemente unido, de modo que el patrón resultante permite analizar la totalidad de los enlaces ^1H - ^{13}C de una proteína. Los parámetros utilizados fueron: 1K puntos complejos en la dimensión directa (^1H) y 128 en la dimensión indirecta (^{13}C), 12ppm de ancho espectral en la dimensión directa (^1H) y 80ppm en la dimensión indirecta (^{13}C), y de 8 a 512 *scans* dependiendo de la concentración de la muestra.

Para obtener espectros ^{13}C - ^{15}N HflipCON se utilizó la secuencia *hflipcon*, una secuencia de pulsos que detecta correlaciones 2D ^{13}C - ^{15}N vía excitación de

^1H y detección directa de ^{13}C .¹⁸³ Las correlaciones detectadas en este experimento corresponden a un carbono carbonilo de un residuo acoplado escalarmente con el nitrógeno amida covalentemente unido del residuo siguiente, de modo que el patrón resultante permite analizar la totalidad del esqueleto proteico de una proteína. Los parámetros utilizados fueron: 1K puntos complejos en la dimensión directa (^{13}C) y 256 en la dimensión indirecta (^{15}N), 32ppm de ancho espectral en la dimensión directa (^{13}C) y 26ppm en la dimensión indirecta (^{15}N), y 256 *scans*.

2.6.4. Espectros tridimensionales heteronucleares.

Para obtener espectros ^1H - ^{15}N HNHA se utilizó la secuencia *hnhagp3d*, una secuencia de pulsos que detecta correlaciones 3D ^1H - ^1HN - ^{15}N vía una correlación heteronuclear inversa de coherencia cuántica de orden cero y doble.¹⁸⁴ Las correlaciones detectadas en este experimento corresponden a un protón alfa o amida acoplado escalarmente con el nitrógeno amida y el protón amida del mismo residuo, de modo que el patrón resultante permite analizar el desplazamiento químico de los protones alfa y los valores de $^3\text{J}_{\text{HNH}\alpha}$ de cada residuo. Los parámetros utilizados fueron: 1K puntos complejos en la dimensión directa (^1H), 120 en la dimensión indirecta (^1H) y 120 en la dimensión indirecta (^{15}N), 16ppm de ancho espectral en la dimensión directa (^1H), 10ppm en la dimensión indirecta (^1H) y 26ppm en la dimensión indirecta (^{15}N), y 8 *scans*.

Para obtener espectros ^1H - ^{15}N NOESY-HSQC se utilizó la secuencia *noesyhsqctf3gp3d*, una secuencia de pulsos que detecta correlaciones ^1H - ^1HN vía acoplamiento homonuclear por NOE o por intercambio químico y correlaciones ^1H - ^{15}N vía una transferencia de doble INEPT con desacople durante la adquisición.¹⁸⁵ Las correlaciones detectadas en este experimento corresponden a un protón acoplado dipolarmente con un protón amida que a su vez está acoplado escalarmente con el nitrógeno amida, de modo que el patrón

resultante permite analizar el los acoplamiento dipolares de cada residuo. Los parámetros utilizados fueron: 1K puntos complejos en la dimensión directa (^1H), 128 en la dimensión indirecta (^1H), 64 en la dimensión indirecta (^{15}N), 16ppm de ancho espectral en la dimensión directa (^1H), 10ppm en la dimensión indirecta (^1H) y 26ppm en la dimensión indirecta (^{15}N), y 16 *scans*.

Para obtener espectros ^1H - ^{13}C - ^{15}N HNCACB se utilizó la secuencia *hncacbgpwg3d*, una secuencia de pulsos que detecta correlaciones ^1H - ^{13}C - ^{15}N vía una correlación inversa de triple resonancia usando múltiples pasos de transferencia de INEPT.¹⁸⁶ Las correlaciones detectadas en este experimento corresponden a un protón amida acoplado escalarmente con el nitrógeno amida covalentemente unido y los carbonos alfa y beta del propio residuo, de modo que el patrón resultante permite analizar los desplazamientos químicos de los carbonos alfa y beta de cada residuo. Los parámetros utilizados fueron: 1K puntos complejos en la dimensión directa (^1H), 74 en la dimensión indirecta (^{15}N), 96 en la dimensión indirecta (^{13}C), 16ppm de ancho espectral en la dimensión directa (^1H), 26ppm en la dimensión indirecta (^{15}N) y 66ppm en la dimensión indirecta (^{13}C), y 16 *scans*.

Para obtener espectros ^1H - ^{13}C - ^{15}N HNCO se utilizó la secuencia *hncacogpwg3d*, una secuencia de pulsos que detecta correlaciones ^1H - ^{13}C - ^{15}N vía una correlación inversa de triple resonancia usando múltiples pasos de transferencia de INEPT.¹⁸⁶ Las correlaciones detectadas en este experimento corresponden a un protón amida acoplado escalarmente con el nitrógeno amida covalentemente unido y los carbonos carbonilo del propio residuo y del residuo anterior, de modo que el patrón resultante permite analizar los desplazamientos químicos de los carbonos carbonilo de cada residuo y del anterior, permitiendo además vincular los residuos y asignarlos dentro de la secuencia proteica. Los parámetros utilizados fueron: 1K puntos complejos en la dimensión directa (^1H), 74 en la dimensión indirecta (^{15}N), 96 en la dimensión indirecta (^{13}C),

16ppm de ancho espectral en la dimensión directa (^1H), 26ppm en la dimensión indirecta (^{15}N) y 66ppm en la dimensión indirecta (^{13}C), y 16 *scans*.

2.6.5. Determinación de las constantes de relajación longitudinal y transversal

Las constantes de relajación longitudinal (R_1) y transversal (R_2) de núcleos ^{15}N de los grupos amida contienen información sobre la dinámica global y local del esqueleto proteico en la escala de tiempo de los ps-ns (R_1 y R_2) y sobre fenómenos de intercambio químico o conformacional en la escala de μs -ms (R_2). En términos generales, la medición de estas velocidades involucra una perturbación inicial de la magnetización y la cuantificación de la velocidad a la que se recupera el estado de equilibrio.¹⁸⁷ Esta recuperación se produce por fluctuaciones aleatorias del campo local, que en el caso de las proteínas intrínsecamente desordenadas en solución provienen principalmente de interacciones dipolares del grupo amida y de fenómenos de intercambio químico o conformacional.¹⁸⁸

Para medir los valores de R_1 se utilizaron secuencias de pulsos basadas en las originalmente descritas por Kay y colaboradores.¹⁸⁹ Las velocidades de relajación R_1 de los núcleos ^{15}N se obtienen midiendo las intensidades de las resonancias de los grupos amida a distintos tiempos de espera y posteriormente los mismos se ajustaron a la siguiente ecuación de decaimiento exponencial:

$$I(t) = I_0(1 - e^{-R_1 t})$$

donde $I(t)$ es la altura o intensidad de las resonancias analizadas, t es el tiempo de espera de cada experimento y R_1 es la constante de relajación. Los tiempos de espera utilizados en nuestros experimentos fueron: 20, 40, 80, 160, 320, 640, 860, 1280 y 1800ms. Para el análisis se utilizaron las rutinas disponibles en el programa Sparky y CCPNMR.

Por otro lado, la secuencia utilizada para medir las constantes de relajación transversal (R_2) de los núcleos ^{15}N está basada en el módulo Car-

Purcell-Meiboom-Gill (CPMG), constituido por un tren de pulsos de 180° separados un tiempo τ_{cp} que en nuestro caso es igual a 0.45ms. Este tren de pulsos es repetido hasta alcanzar los distintos tiempos de espera evaluados durante el cual se produce la relajación transversal: 48, 72, 96, 128, 160, 264, 360, y 480ms. Se midieron las intensidades de las resonancias de los grupos amida a los distintos tiempos de espera y se ajustaron a la siguiente ecuación:

$$I(t) = I_0 e^{-R_2 t}$$

Los parámetros utilizados fueron: 2K puntos complejos en la dimensión directa (^1H) y 256 en la dimensión indirecta (^{15}N), 10ppm de ancho espectral en la dimensión directa (^1H) y 22ppm en la dimensión indirecta (^{15}N), y 4 *scans*.

2.6.6. Medición de NOE heteronuclear (hNOE)

Los experimentos de hNOE fueron adquiridos utilizando versiones modernas de las secuencias de pulsos descritas por Kay y colaboradores.¹⁸⁹ Los valores de hNOE fueron obtenidos como el cociente de la altura de pico con y sin saturación durante la espera de reciclo. Los parámetros utilizados fueron: 2K puntos complejos en la dimensión directa (^1H) y 256 en la dimensión indirecta (^{15}N), 10ppm de ancho espectral en la dimensión directa (^1H) y 26ppm en la dimensión indirecta (^{15}N), y 4 *scans*.

2.6.7. Cálculo de las diferencias promedio de los desplazamientos químicos de las señales de RMN

La diferencia entre dos condiciones distintas de proteínas o péptidos se analizó a partir de los cambios en los valores de desplazamiento químico de las señales en los espectros ^1H - ^{15}N HSQC o ^1H - ^{13}C HSQC. A tales fines se determinaron los valores de desplazamientos químicos promedio de las señales presentes en el espectro de acuerdo a las ecuaciones:

$$\Delta\delta \text{ } ^1\text{H}\text{-}^{15}\text{N} \text{ (ppm)} = [\Delta\delta(^1\text{H})^2 + \Delta\delta(^{15}\text{N})^2/100]^{1/2}$$

$$\Delta\delta \text{ } ^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C} \text{ (ppm)} = [\Delta\delta(^1\text{H})^2 + \Delta\delta(^{13}\text{C})^2/4]^{1/2}$$

donde $\Delta\delta(^1\text{H})$, $\Delta\delta(^{15}\text{N})$ y $\Delta\delta(^{13}\text{C})$ representan los cambios en los valores de desplazamientos químicos de ^1H , ^{15}N y ^{13}C , respectivamente, entre las distintas condiciones. Los valores de $\Delta\delta$ obtenidos para cada residuo se graficaron en función de la posición de dicho residuo en la secuencia primaria a fin de localizar los cambios.

2.7. Determinación de la afinidad usando el programa DynaFit

La estimación de las constantes de disociación aparente (K_{dapp}) se realizó evaluando los cambios progresivos en los valores de δ de las señales de los residuos perturbados frente a concentraciones crecientes de Cu(I). Para el ajuste de los datos experimentales y la consecuente obtención de la K_{dapp} , se empleó el programa DynaFit, el cual utiliza datos experimentales (cambios en los valores de δ vs [Cu(I)]) para realizar una aproximación por mínimos cuadrados (regresión no lineal).¹⁹⁰ La principal ventaja de usar el programa DynaFit reside en la habilidad para caracterizar sistemas de reactantes bioquímicos en términos de ecuaciones simbólicas o estequiométricas. La interacción de Cu(I) con la proteína/péptido en estudio, se ajustó a un modelo que considera uno de los siguientes mecanismos dependiendo de la cantidad de sitios de unión de Cu(I) presentes:

Un único sitio



Dos sitios independientes y no interactivos



Tres sitios independientes y no interactivos



En cada caso se especificó a qué equilibrio responde cada señal, es decir, las señales de los residuos del sitio 1 responderán al equilibrio que involucra el complejo AS.Cu.1, las señales de los residuos del sitio 2 responderán al equilibrio que involucra el complejo AS.Cu.2 y las señales de los residuos del sitio 3 responderán al equilibrio que involucra el complejo AS.Cu.3. Una vez ingresado los datos, descrito el modelo y vinculado los sistemas, el programa se ejecutó, brindando las curvas del ajuste matemático y los valores de K_d con sus errores relativos correspondientes.

Capítulo 3 - Caracterización estructural de la interacción de iones Cu(I) con la
proteína alfa-sinucleína

3.1 Introducción

Como se ha desarrollado en la introducción de este trabajo de tesis, la química de coordinación de Cu(II) por parte de la proteína AS ha sido muy estudiada y bien caracterizada a nivel de resolución atómico en la última década.^{149,151,167,168,191} Sin embargo, los estudios de la química de coordinación de Cu(I) por parte de la proteína AS constituyen un área de reciente desarrollo. Respecto a la caracterización estructural de los sitios de coordinación de Cu(I) en la proteína AS, previo al inicio de este trabajo de tesis fue reportado por Binolfi *et al.* (2011) que la presencia de iones Cu(I) en muestras de la proteína AS promovía cambios en las regiones alrededor de los residuos 3-5, 50-51 y 119-129, siendo la región 3-5 la más afectada a niveles subestequiométricos de Cu(I).¹⁶⁰ En el mismo estudio, se trabajó con el péptido modelo que contiene los primeros seis aminoácidos de la secuencia de AS: ¹MDVFMK⁶ (P1AS) y se determinó que los cambios inducidos por el ion Cu(I) se circunscribían principalmente a los residuos de Met1 y Met5. En el mismo trabajo, se estimó un valor de constante de disociación (K_d) para complejo P1AS-Cu(I) en el orden $K_d \approx 2\mu\text{M}$. Posteriormente, otro estudio por Camponeschi *et al.* (2013) propuso la existencia de dos dominios de unión de Cu(I)/Ag(I) en AS, con afinidades comparables (K_d en el rango 10^{-5} - 10^{-6}M), involucrando los residuos Met1/Met5 en la región N-Terminal y Met116/Met127 en la región C-terminal de AS.¹⁹² Sin embargo, estas últimas conclusiones deben ser consideradas con cautela, ya que se basaron fundamentalmente en la utilización de iones Ag(I) como modelo iónico de unión de Cu(I) y un sistema binario de péptidos de secuencia 1-15 y 113-130 como modelos de los sitios de unión de AS.¹⁹² De hecho, el mismo estudio no reporta evidencia alguna de interacción de iones Ag(I)/Cu(I) con el

segmento que contiene al residuo de His50, sugiriendo que esta región no estaba involucrada en la unión de Cu(I).¹⁹²

En el contexto mencionado, nuestro grupo decidió avanzar en la caracterización estructural, así como en la determinación de las afinidades aparentes de los distintos sitios de unión de Cu(I) de AS, utilizando una estrategia de trabajo basada en el uso de la técnica espectroscópica de resonancia magnética nuclear (RMN) aplicada al estudio de péptidos sintéticos y especies mutantes de la proteína AS especialmente diseñadas para dichos estudios.

3.2 Identificación de las regiones afectadas en la proteína AS por la presencia de iones Cu(I)

Con el objetivo de analizar la interacción entre iones Cu(I) y la proteína AS, se utilizaron experimentos ¹H-¹⁵N HSQC de RMN para identificar a los residuos resultan fundamentalmente afectados por la presencia del ion metálico y que, en consecuencia, podrían ser considerados como potenciales ligandos. Este tipo de experimento genera un espectro bidimensional donde cada señal corresponde a un grupo amida de la proteína. Cada señal posee dos parámetros principales que se utilizaron para monitorear los cambios inducidos en la proteína como consecuencia de su interacción con el ion Cu(I): el valor de desplazamiento químico (δ) de cada señal o resonancia y su intensidad. El parámetro δ se puede interpretar como la coordenada de cada señal dentro del espectro y la intensidad como la altura relativa de dicha señal. Los grupos amida de los distintos aminoácidos en la secuencia primaria de la proteína no son equivalentes entre sí debido a los diferentes entornos electro-químicos y dinámicas estructurales que sensan en el interior de la molécula, y por ende, presentan valores de δ e intensidades diferentes que permiten su identificación y asignación inequívoca.

La adición de iones Cu(I) a la proteína AS enriquecida isotópicamente en átomos de ^{15}N , (^{15}N AS), dio lugar a cambios apreciables sobre las señales de los grupos amida de los aminoácidos en las posiciones 3-6, 48-52 y 115-129 de las regiones N-terminal y C-terminal de la proteína (Figura 3.1A-B). Es sabido que los ligandos característicos de iones Cu(I) en proteínas son los residuos de Cys, Met e His. En el caso de la proteína AS, los aminoácidos cuyas resonancias resultan fundamentalmente afectados por la presencia de iones Cu(I) son: Met1, Met5, His50, Met116 y Met127 (Figura 3.1). De nuestro análisis es posible identificar a priori tres sitios de interacción con el ion metálico en AS: 1) sitio 1, que involucra a los residuos de Met1 y Met5; 2) sitio 2 que involucra el residuo de His50 y 3) sitio 3, que involucra los residuos de Met116 y Met127. Cabe destacar que el sitio 1 resulta fundamentalmente afectado a concentraciones sub-estequiométricas de Cu(I), a la vez que los sitios identificados como 2 y 3 son afectados fundamentalmente a concentraciones superiores. En la siguiente sección, se abordará la caracterización estructural de los distintos sitios de unión a Cu(I) identificados en la proteína AS, así como la determinación de los valores de sus afinidades aparentes por el ion metálico.

3.3 Determinantes estructurales y afinidad del sitio 1 de unión a Cu(I) en la proteína AS

Con el fin de evaluar el rol de los residuos de Met1 y Met5 en la formación del complejo con Cu(I) en el sitio 1 de AS, en primer lugar se analizaron las características de unión de Cu(I) al péptido sintético modelo P1AS y variantes del mismo en los cuales los residuos de Met1 y Met5 fueron reemplazados por residuos de Ile (M1I P1AS y M5I P1AS, respectivamente). El reemplazo de residuos de Met por residuos de Ile permitió analizar el impacto causado por la ausencia de residuos de Met, conservando las propiedades fisicoquímicas generales del péptido original.

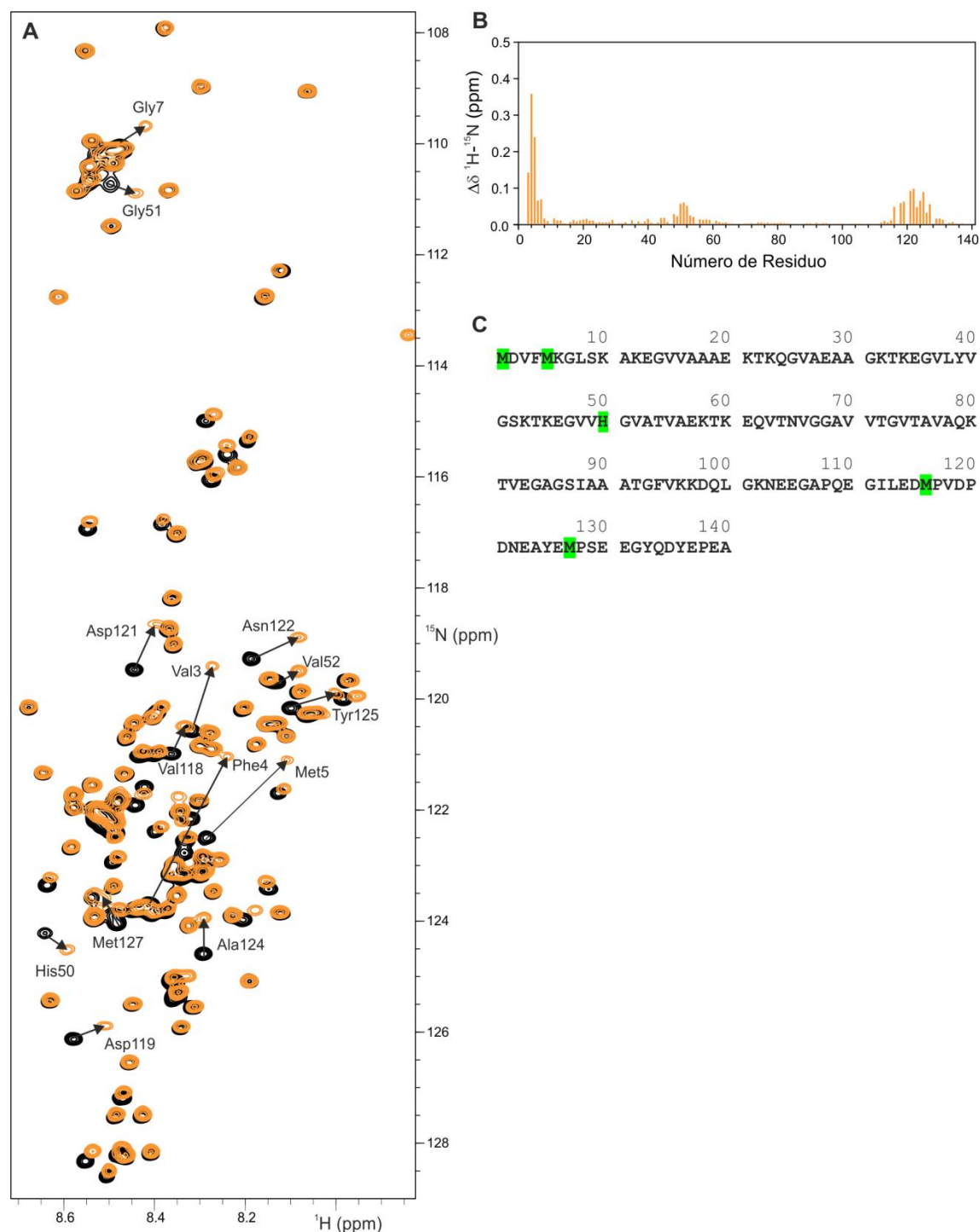


Figura 3.1. Análisis por RMN de la unión de Cu(I) a AS. A. Espectros superpuestos ^1H - ^{15}N HSQC de ^{15}N AS 100 μM en ausencia (negro) y presencia (naranja) de 10 equivalentes de Cu(I). Se señalan los residuos que mayor cambio presentan. Los experimentos fueron adquiridos en solución amortiguadora B, 10% D₂O y 15°C. B. Perfil de $\Delta\delta$ ^1H - ^{15}N de los grupos amida de AS en presencia de 10 equivalentes de Cu(I). C. Secuencia primaria de AS. Las letras resaltadas indican los residuos Met1, Met5, His50, Met116 y Met127.

En primer lugar, se monitorearon los cambios en los valores de δ de las señales del péptido P1AS en presencia de iones Cu(I). A tales fines, se utilizó el experimento de RMN ^1H - ^{13}C HSQC, a partir del cual se obtuvo el perfil de $\Delta\delta$ que se observa en la Figura 3.2. De dicho perfil se desprende que las señales más afectadas por la presencia del ion Cu(I) son aquellas correspondientes a los grupos $\text{H}\gamma\text{-C}\gamma$ y $\text{H}\epsilon\text{-C}\epsilon$ de los residuos de Met1 y Met5, en perfecta concordancia con los resultados previamente reportados.¹⁶⁰ Los átomos $\text{C}\gamma$ y $\text{C}\epsilon$ están directamente unidos al átomo $\text{S}\delta$ de los residuos Met, y por ende, son altamente sensibles a la unión de Cu(I) por parte del grupo tioeter de dichos residuos.

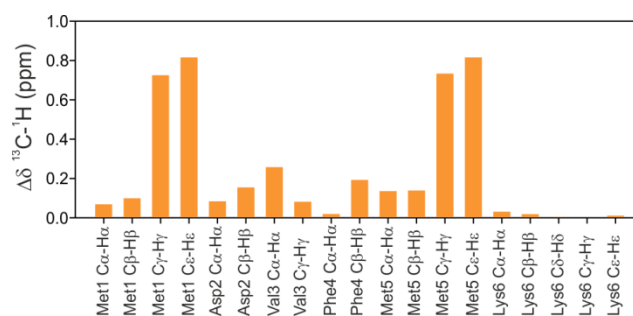


Figura 3.2. Análisis por RMN de la unión de Cu(I) a P1AS. Perfil de $\Delta\delta$ ^1H - ^{13}C de los grupos C-H del péptido P1AS 1mM en presencia de un equivalente de Cu(I). Los experimentos ^1H - ^{13}C HSQC fueron adquiridos en solución amortiguadora B, 10% D_2O y 15°C .

Posteriormente, se procedió a realizar un análisis comparativo de la unión de Cu(I) a las distintas variantes peptídicas diseñadas. En primer lugar se analizó la región amida de los péptidos modelos del sitio 1 de unión a Cu(I) mediante espectros 2D ^1H - ^1H TOCSY de RMN. Si bien las resonancias de los protones amida de los residuos de Met1 y Asp2 no pueden ser detectados en estos experimentos debido a los efectos del intercambio con el solvente, dicha región espectral contiene solamente un sistema de señales para cada residuo y por lo tanto constituyen una excelente sonda para analizar el proceso de interacción. Las señales asignadas a los residuos de Phe4 y Met5 del péptido P1AS resultaron ser las más afectadas por la presencia de Cu(I) (Figura 3.3A).

Las señales correspondientes al residuo de Val3 también se vieron afectadas, aunque en menor medida, mientras que no se observaron cambios en las señales pertenecientes al residuo de Lys6 (Figura 3.3A). Por el contrario, los efectos de la unión de Cu(I) fueron menos pronunciados en aquellos péptidos donde uno de los residuos de Met, en posición 1 o 5 de la secuencia, fueron reemplazados por un residuo de Ile. En estos casos, la presencia de iones Cu(I) dio lugar a pequeños cambios en las señales de los residuos de Val3 y Phe4 de los péptidos M5I P1AS y M1I P1AS, respectivamente (Figura 3.3A). Del mismo modo, se confirmó que la especie doble mutante M1I/M5I P1AS es incapaz de

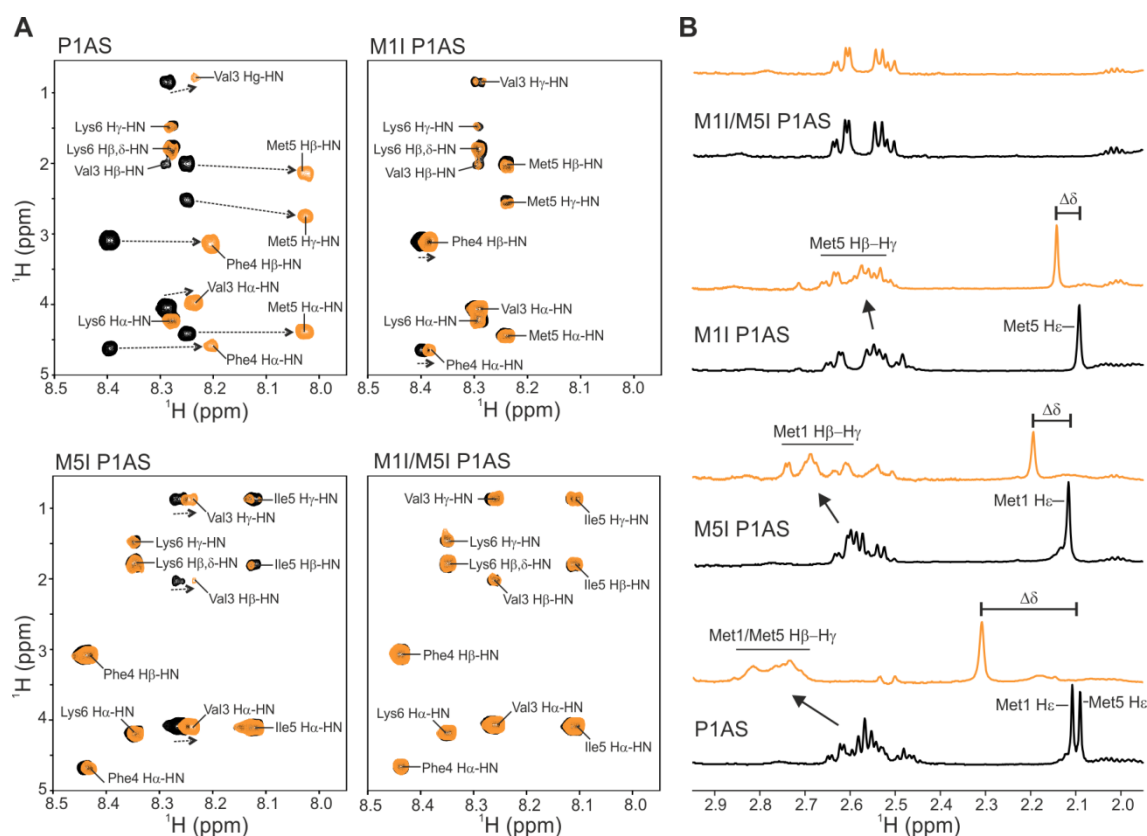


Figura 3.3. Análisis por RMN de la unión de Cu(I) a los péptidos modelos del sitio 1. **A.** Espectros superpuestos ^1H - ^1H TOCSY de los péptidos modelos 300 μM del sitio 1 en ausencia (negro) y presencia (naranja) de 1 equivalente de Cu(I). Los experimentos fueron adquiridos en solución amortiguadora B, 10% D_2O y 15 $^\circ\text{C}$. **B.** Espectros 1D ^1H de los péptidos modelos 300 μM del sitio 1 en ausencia (negro) y presencia (naranja) de 1 equivalente de Cu(I). Se muestra la región alifática donde se encuentran los protones $\text{H}\beta$, $\text{H}\gamma$ (2.4-2.9 ppm) y $\text{H}\epsilon$ (2.1-2.3 ppm) de los residuos Met. Los experimentos fueron adquiridos en solución amortiguadora A, 100% D_2O y 15 $^\circ\text{C}$.

unir iones Cu(I), evidenciando la pérdida completa del sitio de unión a Cu(I) de AS luego de la sustitución de los dos residuos de Met en su secuencia por residuos de Ile (Figura 3.3A). En todos los casos donde se observó interacción entre los péptidos modelo estudiados y Cu(I), la adición de EDTA en exceso a las muestras canceló completamente los cambios inducidos por Cu(I), confirmando la reversibilidad de esta interacción molecular.

Complementariamente, se analizó también la región alifática, la cual contiene a las señales de los protones H β , H γ y H ϵ de las cadenas laterales de los residuos contenidos en la secuencia P1AS y sus derivados. Mediante experimentos de 1D ^1H RMN se observó que las resonancias de los protones H ϵ de los residuos Met1 y Met5 en la variante P1AS resultaron significativamente afectadas por la presencia de iones Cu(I) (Figura 3.3B). Las señales de los protones H β y H γ de los residuos Met1 y Met5 de P1AS también se vieron afectadas, aunque en menor medida. En el caso de los péptidos mutantes, en términos comparativos con lo observado para el péptido P1AS, se pudo concluir que el nivel de perturbaciones inducidas por Cu(I) disminuyó sustancialmente tanto en el péptido M1I P1AS como en el péptido M5I P1AS. Tal como era de esperarse, la especie M1I/M5I P1AS no mostró modificaciones en los valores de δ de sus residuos en presencia de Cu(I) (Figura 3.3B). Estos resultados indican que los efectos observados en los grupos amida de los péptidos modelo del sitio 1, y por ende en la proteína AS (Figura 3.1), en presencia de Cu(I) reflejan la interacción directa del ión Cu(I) con los grupos tioeter de los residuos de Met1 y Met5. En su conjunto, nuestros datos nos permiten concluir que la presencia de los dos residuos de Met es clave para el anclaje efectivo del ion Cu(I) en el sitio 1, dado que los efectos derivados de la interacción de este ion metálico con dicho sitio se redujeron marcadamente al sustituirse uno de estos residuos de Met, mientras que la sustitución de ambos residuos de Met dio lugar a la pérdida completa de la unión de Cu(I) al sitio en cuestión.

A posteriori, se procedió a efectuar estudios de afinidad para los complejos de Cu(I) identificados en las distintas variantes peptídicas. La estimación de los valores de K_d aparente (K_{dapp}) para los distintos complejos de Cu(I) se realizó mediante ensayos de titulación de Cu(I) monitoreados por experimentos 1D 1H RMN. A partir de la cuantificación de los cambios en los valores de $\Delta\delta$ de distintas resonancias en presencia de concentraciones crecientes de Cu(I) fue posible obtener las distintas curvas de unión de Cu(I) al sitio 1 en los péptidos sintéticos analizados (Figura 3.4). Las resonancias correspondientes a los protones $H\epsilon$ de Met1 y Met5, H_N de Met5, $H\gamma$ de Val3 y $H\delta$ de Phe4 del péptido P1AS conservaron una excelente resolución en presencia de concentraciones crecientes de Cu(I), por lo tanto, a partir de su análisis se obtuvieron las distintas curvas de unión. Para la estimación del valor de K_{dapp} del sistema P1AS-Cu(I), se utilizó el programa DynaFit y se consideró un modelo con un sitio de unión capaz de unir solamente un equivalente de Cu(I). El valor de K_{dapp} obtenido para el complejo de Cu(I) con P1AS fue $K_{dapp} = 20 \pm 2\mu M$ (Figura 3.4A). En el caso de los complejos de Cu(I) con P1AS M5I y P1AS M1I se utilizaron las señales de los protones $H\epsilon$. Considerando el mismo

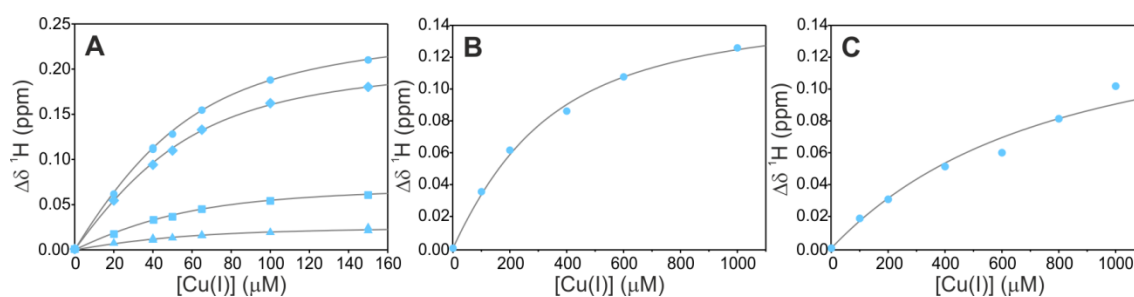


Figura 3.4. Características de afinidad de la unión de Cu(I) a los péptidos modelos del sitio 1. **A.** Curvas de unión de Cu(I) a P1AS 50 μM , monitoreado por los valores de $\Delta\delta \text{ } ^1H$ de H_N de Met5 (círculo celeste), $H\epsilon$ de Met1 y Met5 (rombo celeste), $H\delta$ de Phe4 (cuadrado celeste) y $H\gamma$ de Val3 (triángulo celeste). **B.** Curva de unión de Cu(I) a M5I P1AS 200 μM , monitoreado por los valores de $\Delta\delta \text{ } ^1H$ de $H\epsilon$ de Met1. **C.** Curva de unión de Cu(I) a M1I P1AS 200 μM , monitoreado por los valores de $\Delta\delta \text{ } ^1H$ de $H\epsilon$ de Met5. Las curvas grises representan el ajuste a los modelos descritos en el texto. Los experimentos fueron adquiridos en solución amortiguadora B, 10% D₂O y 15°C.

modelo de unión, se obtuvieron los valores de $K_{dapp} = 200 \pm 20 \mu\text{M}$ y $K_{dapp} = 500 \pm 50 \mu\text{M}$, respectivamente (Figura 3.4B-C).

Finalmente, con el objetivo de reproducir y validar los datos obtenidos con los péptidos sintéticos se procedió a determinar el valor de K_{dapp} para el complejo de Cu(I) en el sitio 1 de la proteína silvestre. A tales fines se utilizó la variante truncada de AS en su extremo C-terminal, conteniendo además la mutación H50A (H50A 1-108 AS). Dicha variante presenta la ventaja de que carece de los residuos de His50, Met116 y Met127, los cuales constituyen sitios de anclaje adicionales para Cu(I) y podrían dificultar el análisis experimental. Para analizar la contribución de los residuos de Met como fue realizado con los péptidos sintéticos, se preparó la variante 1-108 AS conteniendo las mutaciones M5I y H50A (M5I/H50A 1-108 AS). En ambos casos, a fin de evitar problemas derivados del solapamiento de las resonancias en los espectros de protones, las proteínas utilizadas fueron enriquecidas isotópicamente en ^{13}C y se adquirieron experimentos de ^1H - ^{13}C HSQC. Se observó que las únicas conectividades significativamente afectadas fueron aquellas que pertenecen a las señales $\text{C}\gamma$ - $\text{H}\gamma$ y $\text{C}\epsilon$ - $\text{H}\epsilon$ de los residuos de Met1 y Met5 (Figura 3.5). A partir de la

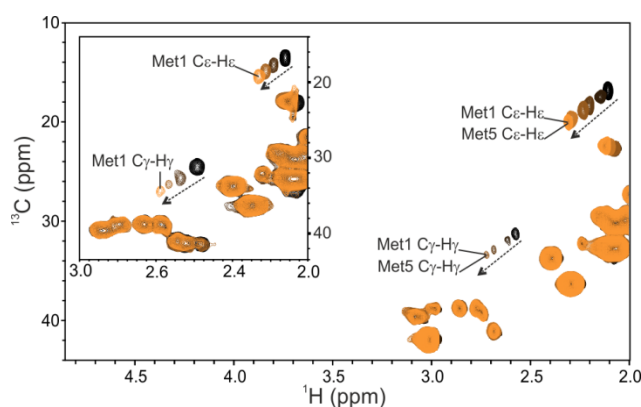


Figura 3.5. Análisis por RMN de la unión de Cu(I) a las proteínas modelos del sitio 1. Espectros superpuestos ^1H - ^{13}C HSQC de ^{13}C H50A 1-108 AS $50 \mu\text{M}$ en presencia de concentraciones crecientes de Cu(I), de negro a naranja: 0, 0.2, 0.4, 1, 1.5 y 3 equivalentes de Cu(I). El recuadro muestra los espectros ^1H - ^{13}C HSQC superpuestos de ^{13}C M5I/H50A 1-108 AS $100 \mu\text{M}$ en presencia de concentraciones crecientes de Cu(I), de negro a naranja: 0, 1, 3 y 5 equivalentes de Cu(I). Los experimentos fueron adquiridos en solución amortiguadora B, 10% D_2O y 15°C .

cuantificación de los $\Delta\delta$, utilizando el programa Dynafit y asumiendo nuevamente un modelo con un sitio de unión capaz de unir un equivalente de Cu(I), se obtuvo valores de K_{dapp} de $K_{dapp1} = 17 \pm 2\mu\text{M}$ para el complejo de Cu(I) con el sitio 1 en H50A 1-108 AS, y de $K_{dapp} = 190 \pm 40\mu\text{M}$ para la variante M5I/H50A 1-108 AS. Estos datos demuestran que los determinantes estructurales para la afinidad de unión de iones Cu(I) al sitio 1 en los péptidos sintéticos se conservan en la proteína AS.

3.4 Determinantes estructurales y afinidad del sitio 2 de unión a Cu(I) en la proteína AS

En primera instancia, a fin de comprobar el rol del residuo de His50 en la unión de Cu(I) a la proteína AS, se realizó un análisis comparativo con la proteína silvestre usando la variante H50A AS. Se observó que el reemplazo del residuo de His50 por un residuo de Ala cancela los cambios inducidos en la región 45-55 por la presencia de iones Cu(I), sin ejercer influencias sobre la interacción de Cu(I) a los sitios 1 y 3 (Figura 3.6). De esta manera se demostró que el residuo His50 jugaría un rol principal en el anclaje de iones Cu(I) al sitio 2, a la vez que este experimento indica que estamos en presencia de sitios de unión a Cu(I) que son independientes, dado que la ausencia o presencia de alguno de ellos no afecta al comportamiento de los otros sitios.

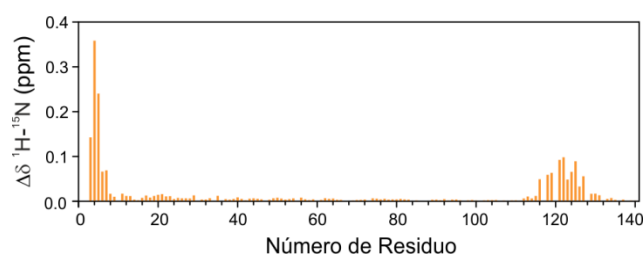


Figura 3.6. Análisis por RMN de la unión de Cu(I) a H50A AS. Perfil de $\Delta\delta$ ^1H - ^{15}N de los grupos amida de ^{15}N H50A AS $100\mu\text{M}$ en presencia de 10 equivalentes de Cu(I). Los experimentos ^1H - ^{15}N HSQC fueron adquiridos en solución amortiguadora B, 10% D_2O y 15°C .

En segundo lugar se utilizó el péptido sintético 45-55 AS para estudiar la unión de Cu(I) al sitio 2 de la proteína. El anillo imidazol de His50 fue confirmado como el ligando primario para la unión de Cu(I) al sitio 2, ya que al titular el péptido 45-55 AS con concentraciones crecientes de Cu(I), los mayores cambios en los valores de $\Delta\delta$ se observaron en las resonancias de los protones H δ y H ϵ del residuo His50 (Figura 3.7A-B).

Un aspecto a considerar es la sensibilidad de los residuos de His a las variaciones de pH, especialmente en el rango de valores de pH 6-7, donde dichos residuos poseen el pK_a de la cadena lateral. La utilización del

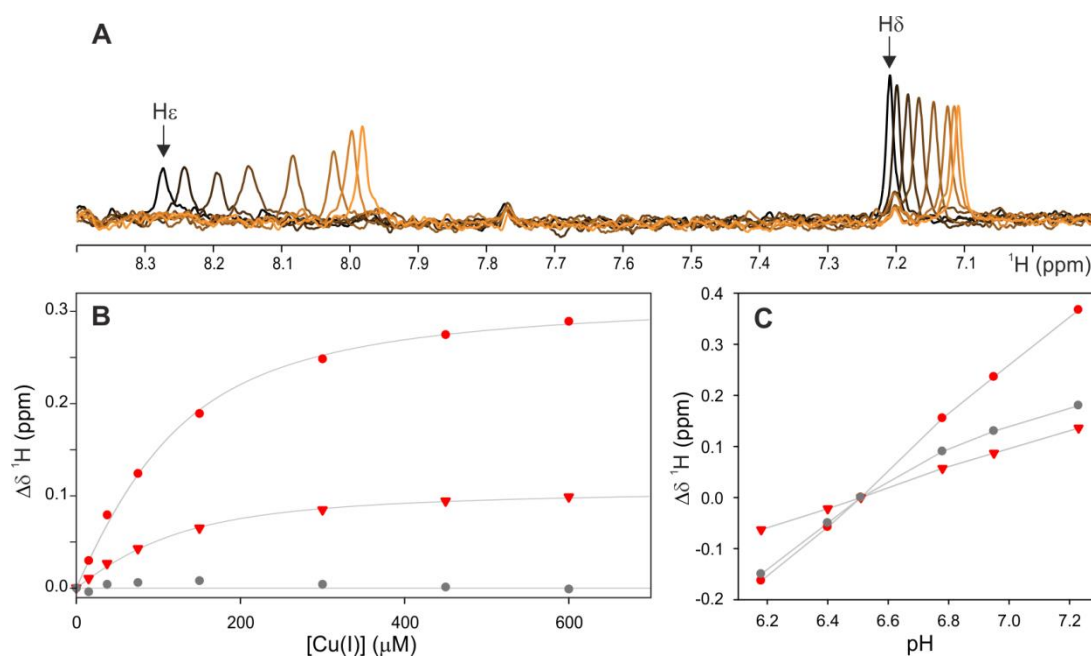


Figura 3.7. Análisis por RMN de la unión de Cu(I) al péptido 45-55 AS. A. Espectros superpuestos 1D ¹H NMR de péptido 45-55 AS 75 μ M en presencia de concentraciones crecientes de Cu(I). Los espectros de titulación representan, de negro a naranja: 0, 0.2, 0.5, 1, 2, 4, 6 y 8 equivalentes de Cu(I). Se muestra la región aromática (6.9-8.4 ppm) donde se encuentran los protones H ϵ y H δ del residuo de His50. Los experimentos fueron adquiridos en solución amortiguadora B, 100% D₂O y 15°C. B. Curvas de unión de Cu(I) al péptido 45-55 AS monitoreadas por $\Delta\delta$ ¹H de los protones H ϵ (círculo rojo) y H δ (triángulo rojo) de His50. Como control de pH, se muestra el $\Delta\delta$ ¹H del protón H₄ de MES (círculo gris). Las curvas grises representan el ajuste a los modelos descritos en el texto. C. Dependencia de $\Delta\delta$ ¹H respecto al pH de las señales de los protones H ϵ (círculo rojo) y H δ (triángulo rojo) de His50, y H₄ de MES (círculo gris).

amortiguador MES permitió monitorear el pH de la solución por RMN, ya que las señales de los protones de MES son igualmente sensibles al pH. Para caracterizar el comportamiento de los mismos frente al pH se realizó un experimento de dependencia de los valores de $\Delta\delta$ en función del pH para las señales de los protones H δ y H ϵ de His50 y del protón H₄ de MES (Figura 3.7C). Se observó que dichas señales tienen un comportamiento casi lineal en el rango de pH 6.1-7.3, y que el comportamiento del protón H₄ del MES describió una curva intermedia entre aquellas delineadas por los protones H δ y H ϵ de His50. En el experimento de titulación de Cu(I) previamente mencionado, se monitoreó la señal del protón H₄ de MES y la misma describió una curva prácticamente horizontal, por lo que se pudo descartar cambios de pH y confirmar que la variación observada en los valores de $\Delta\delta$ de las señales de His50 son el producto exclusivo de la interacción del ion Cu(I) con ese sitio (Figura 3.7B). El valor de K_{dapp} derivado del estudio del péptido 45-55 AS, utilizando el programa DynaFit y considerando un modelo con un único sitio de unión, capaz de unir un equivalente de Cu(I), fue de $K_{dapp} = 55 \pm 5 \mu\text{M}$.

Con el fin de validar los resultados obtenidos con el péptido modelo 45-55 AS se utilizó la proteína M5I 1-108 AS, donde se eliminaron los residuos de Met5, Met116 y Met127. El residuo de Met1 se mantuvo, ya que es necesario para la expresión de la proteína y no puede ser mutado. Para realizar este análisis se utilizaron dos enfoques, el primero observando el comportamiento de los valores de δ de los protones de las cadenas laterales de Met1 y His50, a través de experimentos 1D ¹H RMN, y el segundo analizando los valores de δ de los grupos amida de los residuos vecinos a Met1 y His50, a través de experimentos ¹H-¹⁵N HSQC (Figura 3.8). Se observó nuevamente que las señales más afectadas fueron aquellas que pertenecen a los protones H δ y H ϵ de His50, confirmando al residuo de His50 como grupo de anclaje primario para iones Cu(I) en el sitio 2 (Figura 3.8A). Los valores de $\Delta\delta$, obtenidos de las titulaciones de Cu(I), se graficaron en función de la concentración de Cu(I) para generar las

curvas de unión (Figura 3.8B,D). Luego se utilizó el programa DynaFit y se consideró un modelo con dos sitios de unión, independientes y no interactivos, capaces de unir un equivalente de Cu(I) cada uno. Los resultados de los ajustes de ambos experimentos dieron en promedio un valor de $K_{dapp} = 159 \pm 24 \mu\text{M}$ para el motivo ${}^1\text{MDVFI}^5$ y un valor de $K_{dapp2} = 51 \pm 4 \mu\text{M}$ para el sitio 2. Al igual que para el sitio 1, estos datos demuestran que los determinantes estructural-afinidad de unión de Cu(I) observados en el péptido sintético 45-55 AS se conservan en la especie proteica.

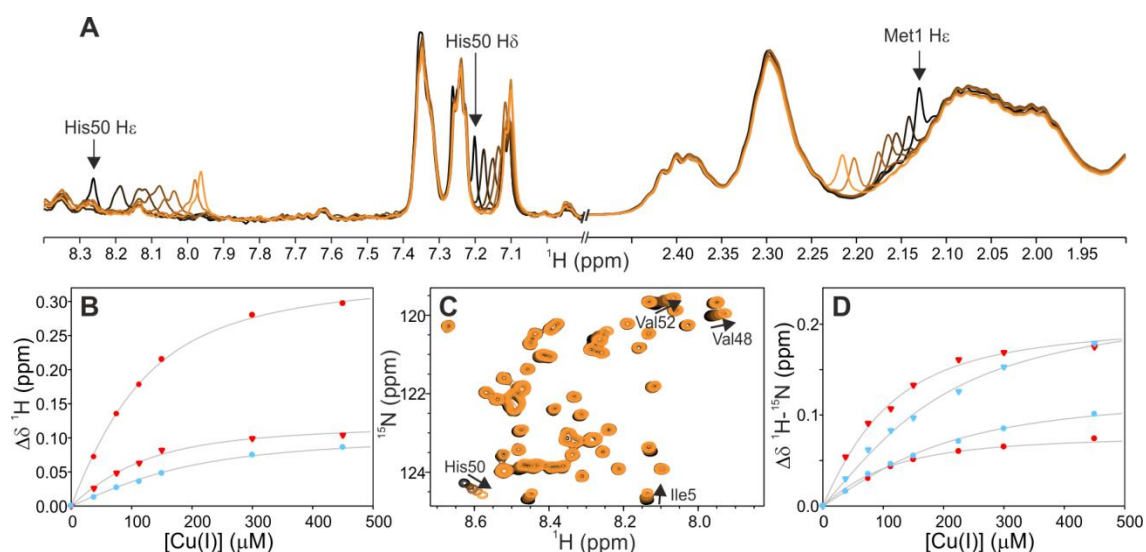


Figura 3.8. Análisis por RMN de la unión de Cu(I) a M5I 1-108 AS. **A.** Espectros superpuestos 1D ${}^1\text{H}$ NMR de M5I 1-108 AS $75 \mu\text{M}$ en presencia de concentraciones crecientes de Cu(I). Los espectros de titulación representan, de negro a naranja: 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4 y 6 equivalentes de Cu(I). Los protones H ϵ y H δ del residuo His50 (6.9-8.4ppm) y H ϵ del residuo Met1 (1.9-2.5ppm) fueron identificados. Los experimentos fueron adquiridos en solución amortiguadora B, 10% D_2O y 15°C . **B.** Curvas de unión de Cu(I) a M5I 1-108 AS monitoreadas por $\Delta\delta$ ${}^1\text{H}$ de los protones H ϵ (círculo rojo) y H δ (triángulo rojo) de His50 y H ϵ (círculo celeste) de Met1. Las curvas grises representan el ajuste a los modelos descritos en el texto. **C.** Espectros superpuestos ${}^1\text{H}$ - ${}^{15}\text{N}$ HSQC de ${}^{15}\text{N}$ M5I 1-108 AS $75 \mu\text{M}$ en presencia de concentraciones crecientes de Cu(I). Los espectros de titulación representan, de negro a naranja: 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, y 6 equivalentes. Los experimentos fueron adquiridos en solución amortiguadora B, 10% D_2O y 15°C . **D.** Curvas de unión de Cu(I) a M5I 1-108 AS monitoreadas por $\Delta\delta$ ${}^1\text{H}$ - ${}^{15}\text{N}$ del protón H ϵ (círculo celeste) de Met1 y de los grupos amida de Val48 (círculo rojo), Val52 (triángulo rojo) e Ile5 (triángulo celeste). Las curvas grises representan el ajuste a los modelos descritos en el texto.

3.5 Determinantes estructurales y afinidad del sitio 3 de unión a Cu(I) en la proteína AS

Finalmente, para proceder a la caracterización del sitio 3 de unión de Cu(I) y determinar el rol que cumplen los residuos de Met116 y Met127 en dicho sitio, se analizó el efecto de Cu(I) sobre la proteína AS y las especies M127A AS y M116A AS. La presencia de concentraciones crecientes de Cu(I) afectó fundamentalmente a los residuos de Val118, Asp119, Asp121, Asn122, Ala124, Tyr125 y Met127 en la proteína silvestre (Figura 3.9A). Al realizar el mismo ensayo sobre las proteínas M116A AS y M127A AS, los residuos Asp119, Asp121, Asn122 y Ala124 prácticamente se mantuvieron inalterados y solamente se observaron cambios de magnitud significativamente menor alrededor de los residuos Met127 y Met116, respectivamente (Figura 3.9B,C). La

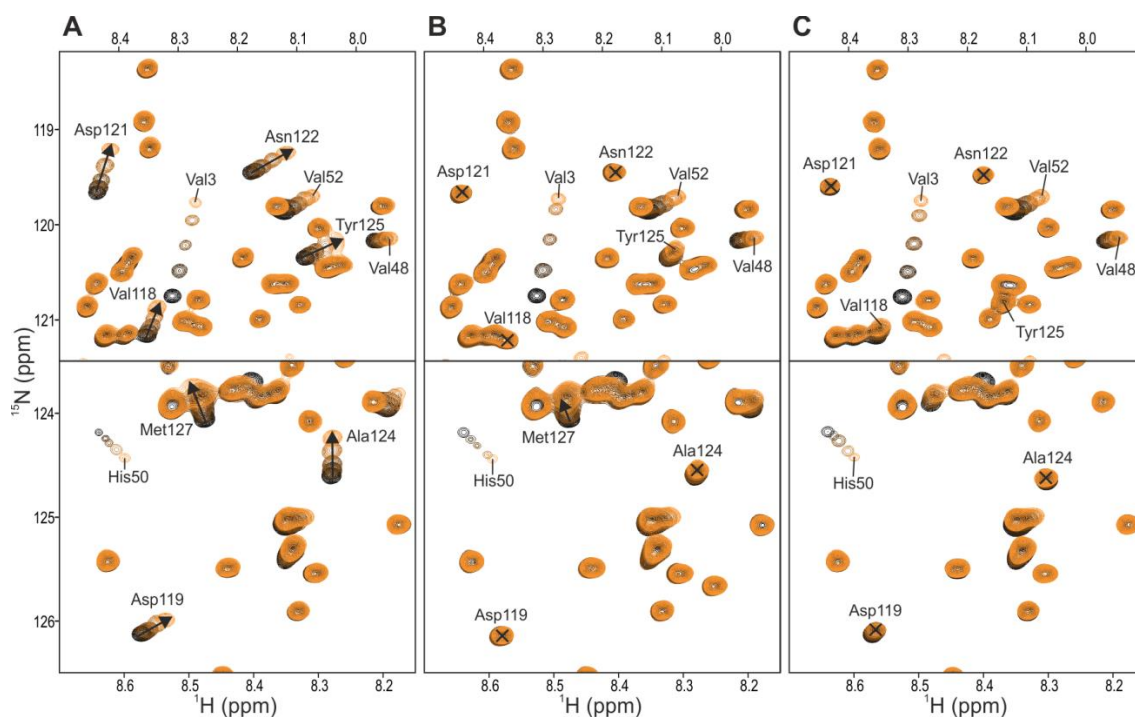


Figura 3.9. Análisis por RMN de la unión de Cu(I) a las proteínas modelos del sitio 3. Espectros superpuestos ^1H - ^{15}N HSQC de ^{15}N AS $100\mu\text{M}$ (A), ^{15}N M116A AS $100\mu\text{M}$ (B) y ^{15}N M127A AS $100\mu\text{M}$ (C), en presencia de concentraciones crecientes de Cu(I), de negro a naranja: 0, 0.5, 1, 2 y 3 equivalentes. Los experimentos fueron adquiridos en solución amortiguadora B, 10% D_2O y 15°C .

cancelación de los efectos observados en dicha región cuando uno de los residuos de Met116 o Met127 fue remplazado por Ala indica que ambos residuos de Met serían claves para la unión de Cu(I) en el sitio 3. De acuerdo con los resultados descritos en secciones anteriores, el reemplazo de los residuos de Met116 o Met127 por residuos de Ala no afectó en absoluto la unión de Cu(I) al sitio 1 ni al sitio 2 de AS (Figura 3.9).

Posteriormente, se utilizó la proteína M5I/H50A AS para determinar la afinidad del Cu(I) por el sitio 3. Se realizó una titulación fina de Cu(I) sobre muestras ^{15}N M5I/H50A AS y se utilizó el programa DynaFit, considerando un modelo con dos sitios de unión, independientes y no interactivos, capaces de unir un equivalente de Cu(I) cada uno (Figura 3.10). Los resultados del ajuste arrojaron un valor de $K_{dapp} = 141 \pm 14\mu\text{M}$ para el motivo $^1\text{MDVFI}^5$ y un valor de $K_{d3app} = 285 \pm 19\mu\text{M}$ para el sitio 3.

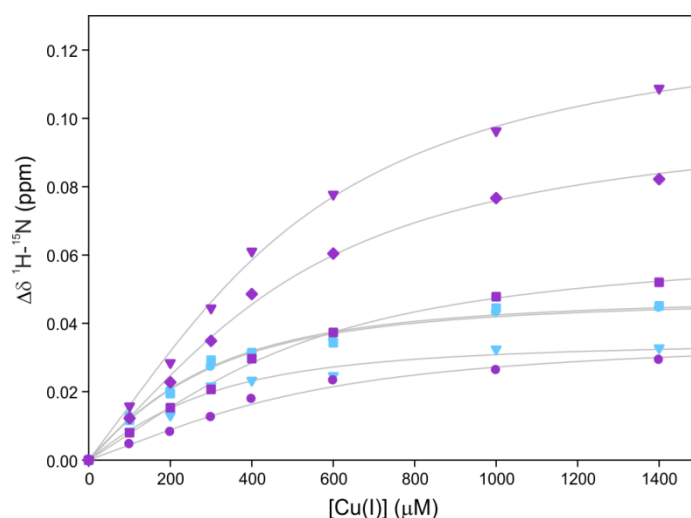


Figura 3.10. Características de afinidad de la unión de Cu(I) a M5I H50A AS. Curvas de unión de Cu(I) a M5I H50A AS 200 μM monitoreada por $\Delta\delta$ ^1H - ^{15}N de los grupos amida de Val3 (círculo celeste), Phe4 (triángulo celeste), Ile5 (cuadrado celeste), Asp119 (círculo violeta), Asp121 (triángulo violeta), Asn122 (cuadrado violeta) y Ala124 (rombo violeta). Las curvas grises representan el ajuste a los modelos descritos en el texto.

3.6 Análisis global de la unión de Cu(I) a la proteína AS

Una vez caracterizados con precisión los distintos sitios de unión de Cu(I) de AS a través de modelos peptídicos o proteicos, se procedió a realizar un estudio de unión de Cu(I) a la proteína AS sin ningún tipo de modificaciones. Se realizó una titulación fina y exhaustiva de Cu(I) sobre la proteína AS y se identificaron los residuos involucrados en cada sitio de unión, los cuales ya habían sido previamente caracterizados en las secciones anteriores (Figura 3.11A). Se realizó un ajuste global de los experimentos de titulación con Cu(I), utilizando el programa DynaFit y considerando un modelo con tres sitios de unión, independientes y no interactivos, capaces de unir un equivalente de Cu(I) cada uno. El excelente ajuste resultante validó el modelo de tres sitios de unión de Cu(I), independientes y no interactivos, y proporcionó valores precisos de K_{dapp} (Figura 3.11B). Los valores de K_{dapp} derivados para los complejos de Cu(I) con el sitio 1 (Met1/Met5), el sitio 2 (His50) y el sitio 3 (Met116/Met127), fueron $K_{dapp1} = 24.0 \pm 1.2\mu\text{M}$, $K_{dapp2} = 49.8 \pm 4.5\mu\text{M}$ y $K_{dapp3} = 270.3 \pm 17.3\mu\text{M}$, respectivamente. Los valores de K_{dapp} obtenidos para cada sitio de unión a Cu(I) en AS resultaron ser completamente consistentes con los valores obtenidos para los péptidos sintéticos y las variantes proteicas.

3.7 Discusión

En este capítulo se realizó una caracterización estructural detallada de los complejos formados entre Cu(I) y los distintos sitios de unión en AS. Se utilizaron condiciones optimizadas para la estimación de los valores de K_{dapp} , y el diseño de diversos modelos como péptidos sintéticos y proteínas mutantes de AS. Nuestros resultados demostraron conclusivamente que existen tres sitios de unión de Cu(I) en AS, consistente con la unión de 3 equivalentes de ion Cu(I)

por molécula de AS. El hecho de que mutaciones puntuales en cada sitio afecten solo localmente a las características de unión de Cu(I) demuestra que los tres sitios de unión de Cu(I) son independientes y no interactivos. La interacción

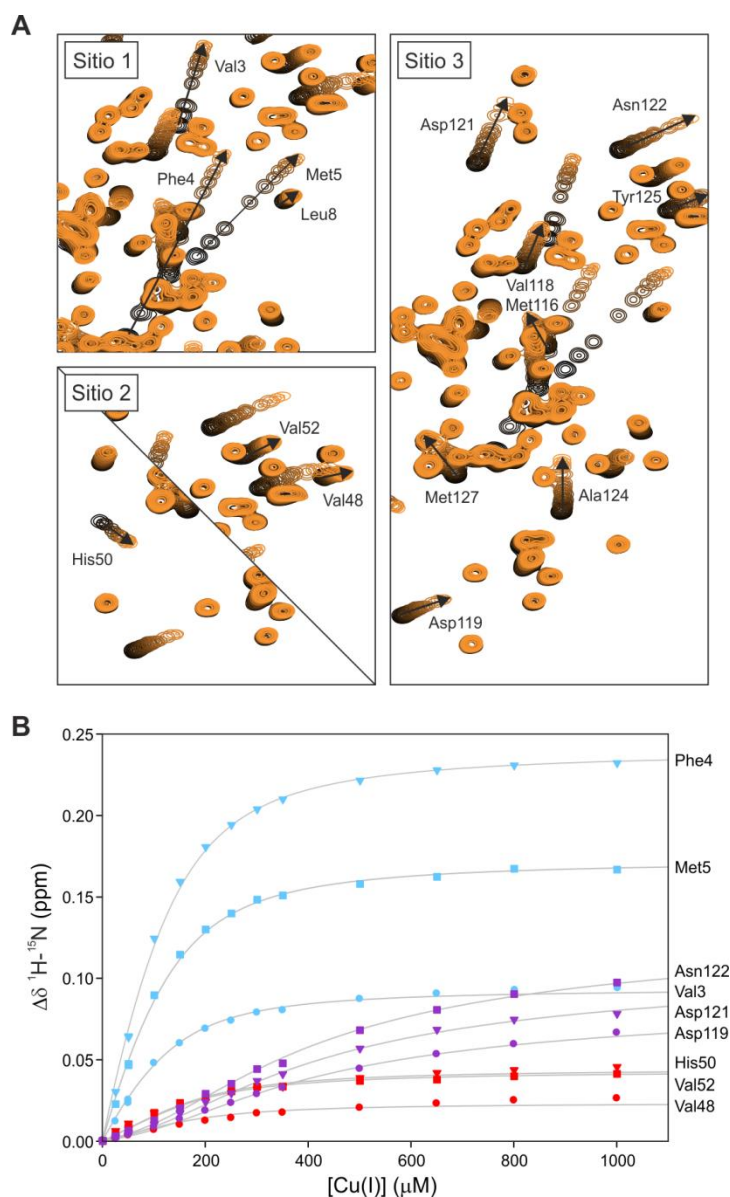


Figura 3.11. Características de afinidad de la unión de Cu(I) a AS. A. Espectros superpuestos $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ HSQC de ^{15}N AS $100\mu\text{M}$ en presencia de concentraciones crecientes de Cu(I). Los espectros de titulación representan, de negro a naranja: 0, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 5, 6.5, 8 y 10 equivalentes de Cu(I). Los experimentos fueron adquiridos en solución amortiguadora B, 10% D_2O y 15°C . **B.** Curvas de unión de Cu(I) a AS monitoreado por $\Delta\delta \text{ } ^1\text{H}-^{15}\text{N}$ de las resonancias de los grupos amida de Val3 (círculo celeste), Phe4 (triángulo celeste), Met5 (cuadrado celeste), Val48 (círculo rojo), His50 (triángulo rojo), Val52 (cuadrado rojo), Asp119 (círculo violeta), Asp121 (triángulo violeta) y Asn122 (cuadrado violeta). Las curvas grises representan el ajuste a los modelos descritos en el texto.

tiene como ligandos de anclaje de Cu(I) a los residuos de Met1 y Met5 en el sitio 1 de $K_{dapp1} \approx 20\mu\text{M}$, el residuo de His50 en el sitio 2 de $K_{dapp2} \approx 50\mu\text{M}$, y los residuos de Met116 y Met127 en el sitio 3 de $K_{dapp3} \approx 300\mu\text{M}$.

Respecto al sitio 1, nuestros resultados demostraron conclusivamente que ambos residuos de Met en el motivo ${}^1\text{MDVFM}^5$ son claves para la unión de Cu(I) a la región N-terminal de AS, consistente con la preferencia del ion Cu(I) por ligandos sulfurados.^{193,194} En promedio, la afinidad aparente estimada para la unión de Cu(I) al motivo ${}^1\text{MDVFM}^5$ fue de $K_{dapp} \approx 20\mu\text{M}$, un orden de magnitud diferente al reportado previamente por Binolfi *et al.* (2011).¹⁶⁰ Esta diferencia de afinidades se debe principalmente a las concentraciones de péptido utilizadas. Al calcular un valor de K_{dapp} , la concentración de péptido o proteína en estudio debe estar en el rango de dicha K_{dapp} , o incluso puede ser menor. Cuando es mayor, no se logra definir una buena curvatura y se incrementa el error de ajuste matemático. En los estudios de Binolfi *et al.* (2011), se utilizaron concentraciones de $300\mu\text{M}$ de P1AS, bien por encima de los valores de K_d reportados. Por el contrario, nuestros experimentos fueron realizados a una concentración de proteína del orden de los $50\mu\text{M}$, dando lugar a condiciones más óptimas para el cálculo de los valores de K_{dapp} en cuestión. Por otro lado, cuando se reemplazó un residuo de Met por un residuo no sulfurado, como en las variantes M1I P1AS y M5I P1AS, la afinidad de la interacción disminuyó dramáticamente, mientras que la remoción de ambos residuos Met resultó en una pérdida de unión total. Los valores de K_{dapp} de $200\mu\text{M}$ y $500\mu\text{M}$ para los motivos conteniendo un solo residuo de Met, ${}^1\text{MDVFI}^5$ y ${}^1\text{IDVFM}^5$, respectivamente, implican una disminución de un orden de magnitud o más en la fuerza de interacción, sugiriendo un efecto sinérgico de la presencia de ambos residuos de Met del sitio 1 en la unión de Cu(I). La mayor afinidad del motivo ${}^1\text{MDVFI}^5$ respecto al motivo ${}^1\text{IDVFM}^5$ podría deberse a la participación del grupo amino-terminal del residuo de Met1 como ligando secundario, ya que el nitrógeno amino ha sido reportado como ligando débil de Cu(I) en otros

complejos de Cu(I).¹⁹⁵ Sin embargo, no hay evidencias de que dicho grupo amino sea un ligando activo en el motivo ¹MDVFM⁵, probablemente debido a restricciones conformacionales.

Estos resultados están en completo acuerdo con los reportes previos dirigidos para entender las características de unión de Cu(I) a sitios ricos en residuos de Met y donde la interacción con el ion Cu(I) ocurre exclusivamente vía coordinación de los grupos tioéter.¹⁹⁶ Utilizando péptidos conteniendo el motivo de unión Met-X_n-Met que simulan la secuencia de PcoC, una proteína que otorga resistencia a cobre de bacterias, mediante experimentos de espectrometría de masas y ensayos cinéticos, se determinaron afinidades en el rango 20-45 μM para complejos del tipo S-Cu(I)-S.¹⁹⁶ La afinidad comparable entre el complejo S-Cu(I)-S determinada para péptidos Met-X_n-Met y el sitio 1 del complejo AS-Cu(I) indica que la unión de Cu(I) al motivo ¹MDVFM⁵ ocurriría de manera exclusiva a través de los átomos Sδ de los residuos de Met1 y Met5. Consistentemente, a través de estudios de que involucran péptidos modelos de AS mediante un enfoque de espectroscopias de absorción de rayos X, se ha reportado recientemente un modo de coordinación del tipo 2S2O para la interacción Cu(I) con el sitio 1 de AS.¹⁹⁷ Complementado con espectroscopia de RMN y cálculos estructurales, se concluyó como ligandos principales los átomos Sδ de los residuos de Met1 y Met5 y se observó que la incorporación de un átomo O de la cadena lateral de Asp2 estabilizaba notablemente el complejo modelado, sugiriendo al residuo Asp2 como potencial ligando secundario, aunque no hubiera evidencias experimentales robustas.^{192,197}

Respecto al sitio 2 de unión a Cu(I) en AS, se demostró conclusivamente que el mismo posee como sitio primario de anclaje al residuo de His50. Los estudios confirmaron que el ligando principal es el anillo imidazol de la cadena lateral. Asimismo, se realizó un control interno del pH para asegurar que los cambios de las señales de RMN respondan a la presencia de Cu(I) y no a cambios de pH debido inconvenientes experimentales. Se determinó que los

cambios de pH son insignificantes y que la curva de titulación responde íntegramente a la unión de Cu(I). El rol del residuo de His50 en la unión de Cu(I) es un descubrimiento importante de este trabajo de tesis que necesitará ser profundizado en futuras investigaciones. Se sugiere que el residuo de His50 podría tener un fuerte rol fisio-patológico, dado que se postula la existencia de un bucle funcional en la región alrededor del residuo de His50, que se ve alterado por la mayoría de las mutaciones hereditarias de la enfermedad de Parkinson (E46K, H50Q, G51D y A53T).^{23,198-200} A su vez, la interacción del residuo de His50 con diferentes ligandos, o la modificación oxidativa del mismo, podría tener efectos directos sobre las propiedades fisicoquímicas de dicha región que podrían alterar la agregación amiloide de la proteína.

Finalmente, se determinó que el sitio 3 es un sitio que une un único equivalente de Cu(I), donde ambos residuos de Met116 y Met127 juegan un rol esencial en la química de coordinación, ya que la mutación de cualquiera de ambos residuos afecta dramáticamente su afinidad por el ion metálico. Nuestros estudios revelan que las preferencias de unión de los iones Cu(I) por los sitios de Met en las regiones N- y C-terminal difieren sustancialmente, en contraposición con estudios previos.¹⁹² De hecho, los iones Cu(I) se unen preferentemente al motivo ¹MDVFM⁵ por sobre el motivo ¹¹⁶MPVDPDNEAYEM¹²⁷. Nuestros descubrimientos son consistentes con trabajos anteriores que indican que la afinidad de sitios Met-X_n-Met por iones Cu(I) depende no sólo del número de residuos de Met involucrados, sino también del número de aminoácidos que los separan.^{194,196,201,202} Efectivamente, en péptidos modelos conteniendo dos residuos Met, la afinidad varió desde 20µM a 45µM cuando el número interviniente de aminoácidos entre ambos residuos de Met cambió de dos a cinco, respectivamente.¹⁹⁶ En consecuencia, sería de esperar un efecto aún más drástico cuando se compara la afinidad del Cu(I) por el motivo ¹MDVFM⁵ por el fragmento ¹¹⁶MPVDPDNEAYEM¹²⁷, tal cual lo demuestran nuestros resultados.

Otro aspecto que contribuye a explicar las discrepancias entre los resultados reportados aquí y aquellos publicados por otro grupo surge de la utilización de iones Ag(I) como modelo iónico de Cu(I). Las limitaciones de este modelo han sido descritas por estudios de competición, basados en espectrometría de masas, RMN y dicroísmo circular, que demostraron que los residuos de Met poseen una mayor preferencia por iones Ag(I) que por iones Cu(I).¹⁹⁴ Incluso, dichos estudios indicaron que de acuerdo con las considerables diferencias en los radios iónicos efectivos de dichos iones metálicos, Ag(I) podría inducir mayores cambios estructurales.¹⁹⁴ En su conjunto, nuestros resultados demostraron que las conclusiones derivadas de estrategias usando iones Ag(I) y péptidos sintéticos como único enfoque para describir los efectos de la unión de Cu(I) a proteínas intrínsecamente desordenadas deben ser, al menos, interpretados con cautela.

Los valores de K_{dapp} medidos indican una afinidad relativamente baja de AS por iones Cu(I) respecto a otras metalo-proteínas o chaperonas de Cu(I); sin embargo, el entorno intracelular podría ser el encargado de proveer las condiciones necesarias para que AS acompleje Cu(I) *in vivo*. La proteína AS es expresada abundantemente en el cerebro, con niveles en el rango $\sim 20\text{--}100\mu\text{M}$.^{203,204} Incluso concentraciones fisiológicas de aproximadamente $50\mu\text{M}$ se han reportados en los sinaptosomas cerebrales.²⁰⁵ Adicionalmente, las concentraciones de iones cobre a nivel intracelular pueden llegar a ser del orden de los $15\mu\text{M}$ en sinaptosomas y hasta $300\mu\text{M}$ en vesículas sinápticas,^{144,206} donde se ha reportado que AS se encuentra mayormente localizada y cumple un rol fisiológico.⁵⁰ Estas concentraciones podrían ser aún más elevadas en condiciones patológicas donde el metabolismo normal de cobre podría encontrarse perturbado, como fue reportado en varios desordenes neurodegenerativos.²⁰⁷ Aunque las concentraciones de cobre intracelular libre esperado sería muy bajo debido a la coordinación con metalo-proteínas y chaperonas, en los últimos años ha habido una creciente evidencia de la

presencia de un *pool* dinámico de iones cobre que estarían débilmente unidos a diferentes metabolitos y podrían llegar a estar disponible para interactuar con AS.^{208,209}

Finalmente, nos gustaría hacer notar que un cierto tipo de proteínas transportadoras de cobre, como Ctr1, coordinan iones Cu(I) vía sitios ricos en residuos de Met localizados en la membrana celular, con afinidades de unión de un orden similar al reportado aquí para la proteína AS. Estos hallazgos evidencian por un lado que la unión de Cu(I) por este tipo de motivos es funcional *in vivo* y por otro lado, propone compartimientos celulares donde AS podría competir activamente por Cu(I).^{194,196} En su conjunto, estos trabajos sugieren que las condiciones para la formación de complejos del tipo AS-Cu(I) pueden ser encontradas en el entorno celular y podría tener implicancias fisiológicas y/o patológicas que deben estudiarse con mayor profundidad.

Capítulo 4 – Daño oxidativo en la proteína alfa-sinucleína catalizado por su interacción con iones cobre

4.1 Introducción

Una gran variedad de estudios muestra que el estrés oxidativo juega un rol fundamental en el proceso de neurodegeneración que caracteriza a la EP y otros desordenes relacionados. En el caso particular de la proteína AS, los eventos de oxidación dan lugar a consecuencias variada que van desde la inhibición de la agregación amiloide hasta la promoción la citotoxicidad.²¹⁰⁻²¹⁴ Lamentablemente, los estudios se han focalizado solo en los efectos causados sobre las propiedades amiloidogénicas y/o citotóxicas de la proteína AS, obviando de esta forma la caracterización estructural alrededor del mismo.

En lo que se refiere a la oxidación catalizada por la interacción de iones metálicos sobre la proteína AS, una serie de estudios han demostrado que el ciclo redox Cu(I)/Cu(II) es efectivo a la hora de catalizar la oxidación de los residuos Met1 y Met5 en la secuencia ¹MDVFMK⁶ de AS.¹⁶⁰ En este capítulo, abordamos en el estudio de este proceso con un enfoque donde prima la caracterización estructural de las modificaciones que derivan de la oxidación de la proteína AS catalizada por la cupla Cu(I)/Cu(II), empleando iones cobre como agente catalítico, AA como agente reductor fisiológico, y O₂ como agente oxidante. Nuevamente la espectroscopia de RMN se constituye aquí como herramienta principal de nuestro análisis, permitiéndonos identificar en detalle los residuos de AS que resultan afectados por los agentes oxidantes involucrados así como las modificaciones químicas producidas sobre la proteína. En este contexto se analizó también el impacto de dichas modificaciones estructurales, sobre las propiedades amiloidogénicas de la proteína AS *in vitro*.

4.2 Identificación de los residuos afectados en la proteína AS por la catálisis oxidativa mediada por iones cobre

Con el fin de identificar residuos que resultan afectados como consecuencia del proceso de catálisis oxidativo mediado por la interacción de la proteína AS con iones cobre en sus estados oxidado y reducido, se procedió a generar daño oxidativo sobre la proteína mediante una estrategia basada en el uso de la terna cobre-AA-O₂. A posteriori, el daño oxidativo fue detenido mediante el agregado de un exceso de EDTA. El EDTA suprime la reactividad del cobre en solución a través de su potente efecto quelante sobre el mismo, a la vez mantiene a AS en su estado libre de iones metálicos, facilitando un mejor análisis experimental. Para investigar el daño oxidativo producido sobre la proteína AS, los cambios moleculares se monitorearon mediante el análisis de las señales de protones en experimentos 1D ¹H RMN. Luego de la inducción de daño oxidativo y el agregado de EDTA, el único cambio observado fue una disminución sustancial en la intensidad de las señales de los protones H ϵ de los residuos de Met de la región N-terminal de AS (Figura 4.1). En contraste, las señales de los protones H ϵ de los residuos de Met de la región C-terminal y las señales de los demás residuos susceptibles a daño oxidativo (por ejemplo residuos de His o Tyr) se mantuvieron prácticamente inalterados. La asignación específica de las señales de los protones H ϵ correspondiente a los cuatro residuos de Met en AS fue posible gracias a la utilización de variantes con mutaciones puntuales en los residuos de Met (M5I AS, M116A AS y M127A AS). Los protones H ϵ son apropiados para el monitoreo del estado de oxidación de los residuos de Met dado que el valor de δ de los mismos depende fuertemente del estado de oxidación del átomo S δ de la cadena lateral.²¹⁵ Así, el valor de δ para el protón H ϵ es de aproximadamente 2.1-2.2ppm para residuos de Met, 2.7-2.8ppm para residuos de Met oxidados a la especie sulfóxido (incorporación de un átomo de oxígeno) y 3.1-3.2ppm para residuos de Met

oxidados a la especie de sulfona (incorporación de dos átomos de oxígeno). La disminución observada en intensidad de las señales de los residuos Met reducidos en las condiciones experimentales de nuestros estudios puede ser atribuida, en primer instancia, a la ocurrencia de un daño oxidativo residuo-específico en los residuos de Met de la región N-terminal de AS.

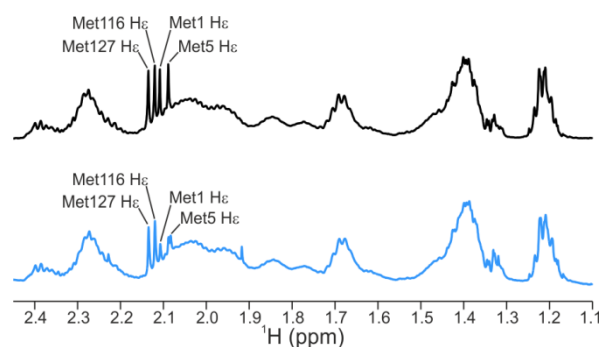


Figura 4.1. Análisis por RMN de la oxidación catalizada por cobre de AS. Espectros 1D ^1H NMR de AS $100\mu\text{M}$ en ausencia (negro) y presencia (azul) de 1 equivalente de Cu(I), seguido de 5h de exposición al aire y agregado de EDTA 5mM. Las señales correspondientes a los protones H_ϵ de Met1, Met5, Met116 y Met127 fueron rotuladas.

Con el fin de confirmar dicha hipótesis e identificar las especies oxidadas de los residuos de Met, utilizamos el monitoreo por la técnica de RMN de los valores de δ de los protones H_ϵ en los residuos de Met y el análisis por espectrometría de masas de los productos de oxidación tanto en la proteína silvestre como en distintas especies mutantes de la misma y péptidos sintéticos.

Inicialmente, se realizaron experimentos ^1H - ^{13}C HSQC sobre la proteína H50A 1-108 AS. Se decidió utilizar esta variante proteica para analizar exclusivamente los fenómenos que suceden en la región N-terminal, sin interferencias del residuo de His50 y de los residuos de Met de la región C-terminal, los cuales poseen capacidad de unión a cobre y podrían interferir en el análisis. Las correlaciones H_ϵ - C_ϵ de los residuos Met1 y Met5 en sus estados reducidos y oxidados fueron bien resueltos y pudieron ser asignados inequívocamente mediante RMN (Figura 4.2). Se realizó el mismo procedimiento experimental de oxidación catalizada por cobre previamente

descrito, y se pudo observar en dichos experimentos que, asociado con la atenuación de las intensidades de las correlaciones H ϵ -C ϵ para los residuos de Met1 y Met5, se detectó la presencia nuevas correlaciones del tipo H ϵ -C ϵ localizadas alrededor de 2.75ppm (^1H) y 9ppm (^{13}C) (Figura 4.2). Dado que estos valores de δ son típicos de residuos de Met en su forma sulfóxido,²¹⁵ los experimentos demostraron claramente que la oxidación específica de los residuos de Met1 y Met5 catalizada por iones cobre produce mayoritariamente residuos de Met sulfóxido (Met^{OX}). Paralelamente, el análisis comparativo de las intensidades de resonancias de Met1 y Met5 antes y después de las condiciones de exposición a oxígeno sugiere una oxidación más rápida de Met1.

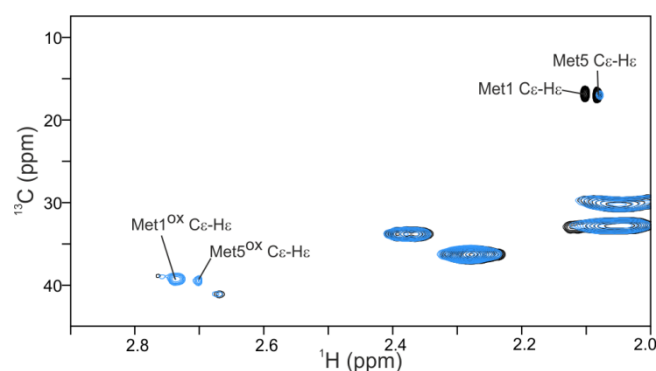
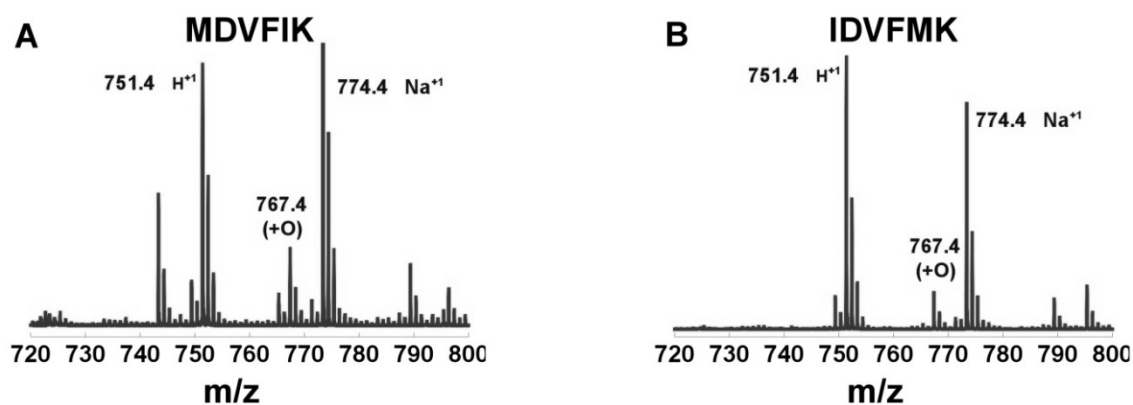


Figura 4.2. Análisis por RMN de la oxidación catalizada por cobre de H50A 1-108 AS. Se muestran los espectros superpuestos ^1H - ^{13}C HSQC de H50A 1-108 AS 50 μM en ausencia (negro) y presencia (azul) de daño oxidativo catalizado por cobre. Los experimentos fueron adquiridos en solución amortiguadora B, 10% D $_2$ O y 15 $^\circ\text{C}$, luego del agregado de EDTA 5mM.

Con el fin de confirmar la ausencia de formación de especies sulfona en los residuos de Met afectados por la oxidación catalizada por cobre, se utilizó complementariamente la técnica de espectrometría de masas. El estado final de oxidación fue confirmado por un análisis MALDI-TOF utilizando muestras de los péptidos M1I P1AS y M5I P1AS sometidas a oxidación catalizada por cobre y tratadas posteriormente con EDTA, con el fin de realizar un análisis comparativo con el péptido P1AS, como fue previamente reportado (Figura 4.3).¹⁶⁰ Luego del proceso controlado de oxidación de los péptidos M1I P1AS y

M5I P1AS, se observó la aparición de señales de m/z 767.4 que corresponden a péptidos con la incorporación de un único átomo de oxígeno (Figura 4.3). La oxidación a Met sulfona (m/z 783.4) no fue observada bajo las condiciones de nuestros estudios.



Péptido	Masa (H ⁺)	Met ^{OX} (H ⁺)
P1AS*	769.35*	785.33*
M1I P1AS	751.41	767.41
M5I P1AS	751.41	767.41

Figura 4.3. Análisis por MALDI-TOF de la oxidación catalizada por cobre de AS. A-B. Datos de MALDI-TOF de M5I P1AS y M1I P1AS luego de la exposición a la oxidación catalizada por cobre. Los experimentos fueron adquiridos en solución amortiguadora B. En ambos casos, se observan los picos correspondientes a la masa de los péptidos mono-oxidados. En la tabla se muestran los valores observados de los péptidos modelos. *Adaptado de Binolfi et al.⁹

Finalmente, con el fin de estudiar y dilucidar la susceptibilidad frente a la oxidación de los residuos Met1 y Met5, se estudió la oxidación de los péptidos P1AS, M5I P1AS y M1I P1AS unidos a Cu(I) en función del tiempo. A partir del análisis de la intensidad de las señales de los protones H ϵ de Met1^{OX} y Met5^{OX} del péptido P1AS bajo oxidación catalizada por cobre, se hizo evidente que la velocidad de oxidación parece ser al menos dos veces más rápida para el residuo de Met1 ($t_{1/2}$ ~7h) que para el residuo de Met5 ($t_{1/2}$ ~15h) (Figura 4.4A). Del mismo modo, los resultados derivados del análisis de las variantes M5I P1AS y M1I P1AS revelan que la velocidad de oxidación del residuo de Met1 es

mayor que la del residuo de Met5 (Figura 4.4A). Este análisis fue posible debido a que las resonancias de los protones H ϵ de los residuos Met^{OX} aparecen en una región muy bien resuelta del espectro 1D ¹H RMN, permitiendo la asignación de cada residuo (Figura 4.4B). La detección de un doblete para los protones H ϵ de Met1^{OX} es debido a la presencia de diastereoisómeros no equivalentes, mientras que Met5^{OX} presenta una única señal que resulta de diastereoisómeros prácticamente superpuestos. La detección de diastereoisómeros se debe a que el átomo S δ de los residuos de Met^{OX} es un centro quiral dado que posee un par

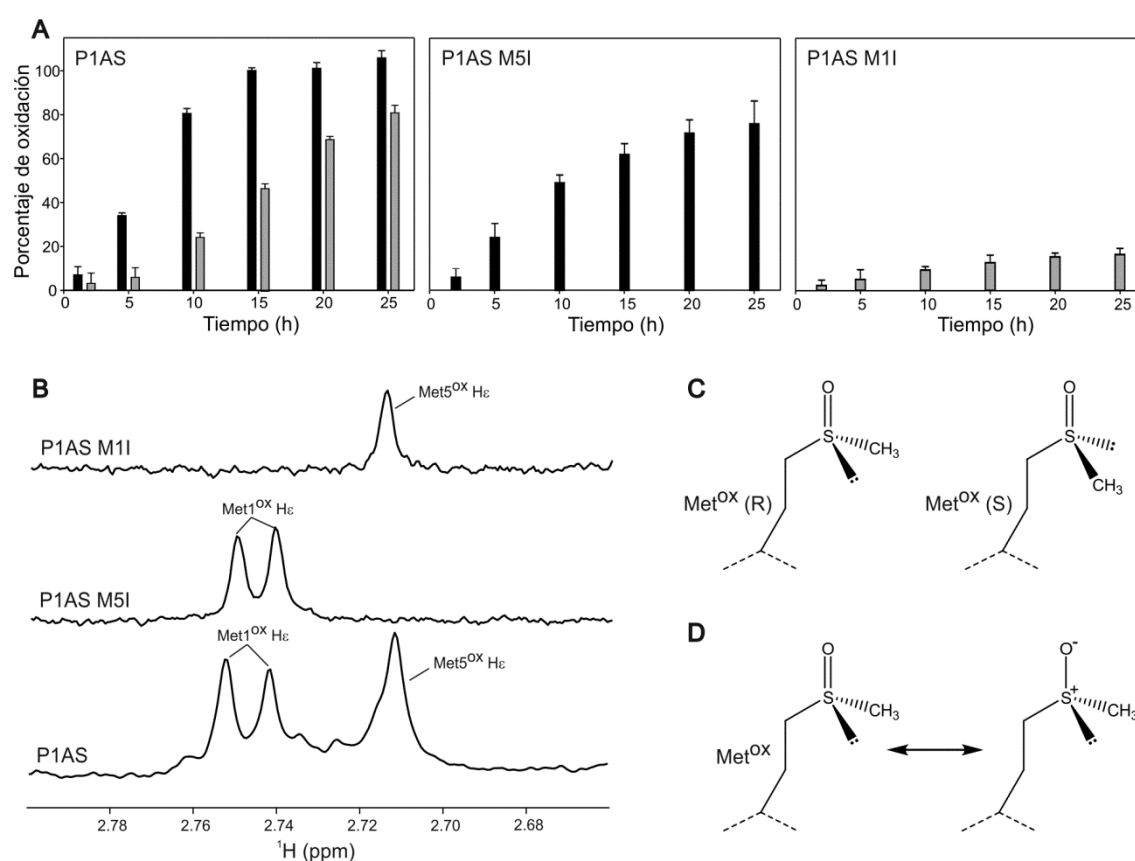


Figura 4.4. Análisis por RMN de la oxidación de P1AS y sus variantes catalizada por cobre. **A.** El nivel de oxidación de los residuos Met fue monitoreada mediante la integración de las señales correspondientes a los protones H ϵ de Met1^{OX} (barras negras) y Met5^{OX} (barras grises) en función del tiempo. Los experimentos fueron realizados utilizando péptidos 50 μ M en presencia de 0.8 equivalentes de Cu(I), bajo condiciones aeróbicas, en solución amortiguadora A, 100% D₂O y 15°C. **B.** Se muestra la región 2.66-2.80ppm, característico de los protones H ϵ de los residuos Met^{OX}. **C.** Esquema representando las estructuras de los diastereoisómeros de residuos Met^{OX}. **D.** Esquema representando las estructuras de resonancia de residuos Met^{OX}.

libre de electrones que establece una geometría tetraédrica (Figura 4.4C).²¹⁵ Complementariamente, se observó que las señales de los protones H ϵ de los residuos de Met^{OX} son insensibles a la presencia de Cu(I), implicando la incapacidad de dichos residuos de unir Cu(I) y la posibilidad metodológica de no necesitar el agregado de EDTA para cada medición. Esto se debe a que el átomo S de un tioeter, como en un residuo de Met, es un buen dador de electrones por lo que tiene buena capacidad de coordinación de Cu(I), mientras que el átomo S de un sulfóxido, como en un residuo de Met^{OX}, posee componentes de simple enlace y enlace iónico que resultan en una densidad de carga positiva sobre el átomo S tornándolo incapaz de coordinar un ión blando como lo es el Cu(I) (Figura 4.4D).²¹⁶⁻²¹⁸

Teniendo en cuenta los experimentos discutidos en esta sección, se pudo concluir que la oxidación catalizada por iones cobre es capaz de inducir daño oxidativo sobre la proteína AS dando lugar a modificaciones del tipo sulfóxido que afectan fundamentalmente al residuo de Met1 y, en menor proporción, al residuo de Met5.

4.3 Motivos químicos involucrados en la oxidación específica de Met1

Con el fin de determinar el mecanismo sitio-específico de oxidación catalizada por cobre, se analizó la influencia de la presencia o ausencia de ciertos motivos químicos en la proteína. Así, para analizar el rol de los átomos S δ de los residuos de Met1 y Met5 y el átomo de N del grupo amino-terminal, se utilizaron las variantes peptídicas M1I P1AS, M5I P1AS y P1AS acetilado en su extremo amino-terminal (acP1AS), respectivamente. El grupo amino-terminal se bloqueó mediante acetilación y se incluyó en el análisis debido a que, siendo el ligando principal de Cu(II), podría tener un rol importante en el ciclo redox Cu(I)/Cu(II). A tales fines, se realizaron experimentos de 1D ¹H RMN para analizar la evolución de las resonancias de los protones H ϵ en los

residuos de Met de la especie unida a Cu(I) para los péptidos P1AS, M1I P1AS, M5I P1AS y acP1AS, en idénticas condiciones experimentales. Se procedió a cuantificar el área de la señal correspondiente al protón H ϵ de los residuos de Met del complejo con Cu(I) y la misma se evaluó en función del tiempo (Figura 4.5). En este caso, la desaparición de la señal del complejo con Cu(I) equivale a la aparición de la señal de la especie oxidada, sin embargo, se eligió monitorear esta señal debido a que la incorporación del péptido acP1AS dificulta el análisis comparativo ya que presenta diferencias en δ de las señales H ϵ de Met1^{OX}. Se observó que las caídas de intensidad, y por ende, las cinéticas de oxidación podían ser separadas en dos grupos bien diferenciados. Una cinética rápida, que agrupa los péptidos P1AS y M5I P1AS y una cinética lenta que agrupa los péptidos M1I P1AS y acP1AS (Figura 4.5). La presencia de dos cinéticas de oxidación es indicativa de la existencia de dos mecanismos de oxidación diferentes. Se postuló que la cinética rápida, respondería a un mecanismo sitio-

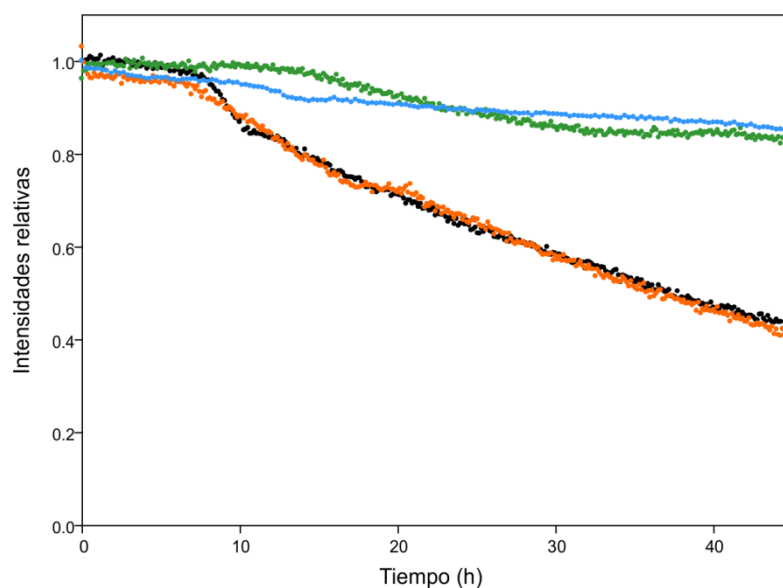


Figura 4.5. Análisis por RMN de la oxidación de P1AS y sus variantes catalizada por cobre. La oxidación de los residuos Met de P1AS 100 μ M (negro), M5I P1AS (naranja), M1I P1AS (verde) y acP1AS (azul) en presencia de 0.8 equivalentes de Cu(I), fue monitoreada mediante la integración de las señales correspondientes a los protones H ϵ de Met1 y Met5 en sus estados unidos a Cu(I) (2.10-2.25 ppm). Los experimentos fueron adquiridos en solución amortiguadora A, 100% D₂O y 15°C.

específico de oxidación catalizada por el cobre unido a los péptidos, mientras que la cinética lenta respondería a una oxidación inespecífica de ROS provenientes del medio oxidante. Las características que comparten las especies P1AS y M5I P1AS son: la presencia del átomo S δ de Met1, ligando esencial en la unión de Cu(I) y el grupo amino-terminal, ligando esencial en la unión de Cu(II). Mientras que las variantes M1I P1AS y acP1AS, carecen de uno de dichos grupos esenciales, el átomo S δ de Met1 y el grupo amino-terminal, respectivamente. Por otro lado, experimentos controles realizados en atmósfera de N₂, es decir en ausencia de O₂, no muestran oxidación significativa de los residuos de Met. Estas evidencias indican que tanto el oxígeno molecular como el N del grupo amino-terminal y el S δ de Met1 son componentes esenciales del mecanismo sitio-específico de la oxidación catalizada por cobre de AS.

4.4 Determinación de las propiedades amiloidogénicas de Met1^{ox} AS

A fin de determinar que implicancias tiene la oxidación específica de Met1 catalizada por cobre sobre las propiedades amiloidogénicas de AS, se optimizaron las condiciones de oxidación con el fin de obtener y purificar la proteína AS con el residuo de Met1 en su forma sulfóxido (Met1^{ox} AS). Con el fin de purificar dicha especie, se realizó una oxidación controlada con niveles subestequiométricos de cobre para permitir la completa oxidación del residuo de Met1 intentando mantener inalterados los otros residuos de Met. La reacción se evaluó en función del tiempo mediante la técnica de RMN de manera que una vez completa la oxidación de Met1 se detuvo la reacción mediante el agregado de EDTA (Figura 4.6). Realizando un intercambio de solución mediante diálisis, la especie Met1^{ox} AS se purificó y separó de los reactivos y productos secundarios de la reacción de oxidación, tales como iones cobre, AA, ROS y especies oxidadas del buffer.

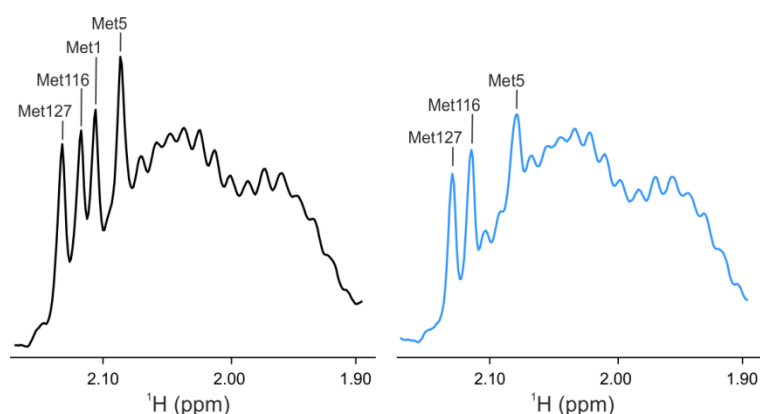


Figura 4.6. Generación y purificación de Met1^{OX} AS. Espectros 1D ¹H RMN de AS (negro) y Met1^{OX} AS (celeste) luego del paso final de diálisis conjunta. Se muestra la región 1.90-2.15 ppm donde se encuentran los H ϵ de los residuos de Met, permitiendo el monitoreo del estado de oxidación de dichos residuos.

Una vez purificada y cuantificada la variante Met1^{OX} AS, se realizó un experimento de agregación amiloide con el fin de analizar el efecto que tiene la oxidación de Met1 sobre el potencial amiloidogénico de AS. La agregación amiloide fue monitoreada por dos técnicas complementarias, un ensayo de consumo de monómero y un ensayo de fluorescencia de ThioT. El ensayo de consumo de monómero permite monitorear mediante RMN la cantidad de monómero de AS que permanece en solución, dado que para esta técnica las especies oligoméricas de mayor tamaño molecular resultan invisibles y por ende no pueden ser detectadas. Por el contrario, y de manera complementaria, el ensayo de ThioT permite detectar la formación de fibras amiloides, debido a que el compuesto ThioT fluoresce al interaccionar con las estructuras características de lámina beta cruzada de las fibras amiloides.

Se realizó el ensayo de consumo de monómero de Met1^{OX} AS de manera comparativa a AS, con el fin de poder monitorear el comportamiento de la especie monomérica en solución y complementariamente se tomaron alícuotas a distintos tiempos de agregación para analizar la formación de especies fibrilares mediante el ensayo de fluorescencia de ThioT (Figura 4.7). En las muestras analizadas, se observó que Met1^{OX} AS presentó una cinética de agregación

amiloide diferente a la especie AS (Figura 4.7A-B). Se observó que la cinética de agregación de Met1^{OX} AS es mucho más lenta ($t_{1/2}$ ~42h) que la de AS ($t_{1/2}$ ~15h) y finaliza con un contenido mayor de monómero soluble final (70% para Met1^{OX} AS y 30% para AS). Por otro lado, se observó que la caída de monómero de AS fue acompañada por un incremento de fluorescencia de ThioT, mientras que no hubo incremento significativo de fluorescencia de la muestra Met1^{OX} AS en el tiempo de análisis experimental (Figura 4.7C). Además, se analizó la diferencia entre los estados iniciales y finales de agregación, de los valores de intensidad

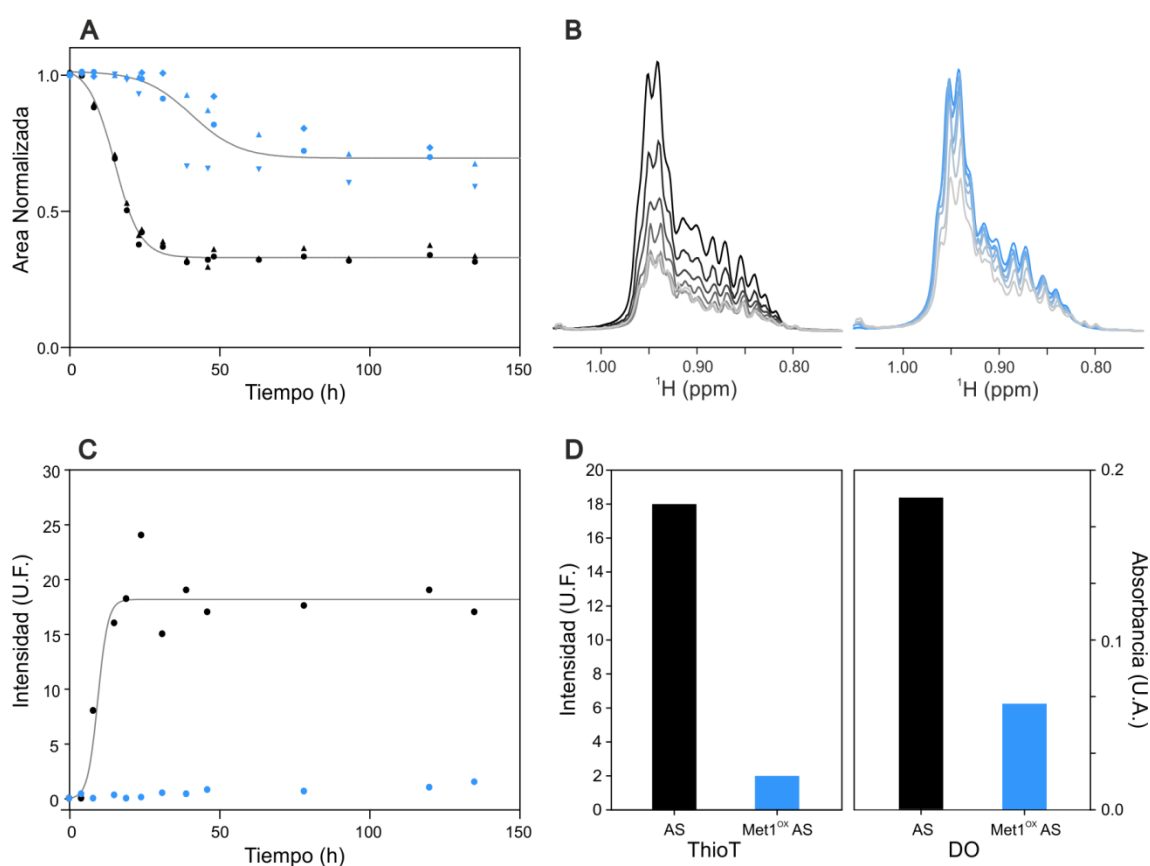


Figura 4.7. Análisis del proceso de agregación amiloide de Met1^{OX} AS. A. El panel muestra el decaimiento de la intensidad del monómero en función del tiempo de AS (negro) y Met1^{OX} AS (celeste). B. Se ejemplifica la disminución de intensidad de la región alifática en función del tiempo de AS (de negro a gris) y Met1^{OX} AS (de celeste a gris), para los tiempos: 0, 15, 19, 23, 39, 63 y 135h. C. Monitoreo de la intensidad de fluorescencia de una alícuota de 5 μ L de AS (negro) y Met1^{OX} AS (celeste) tomada del tubo de RMN a distintos tiempos y diluida en una solución de 20 μ M de ThioT. D. Diferencia de parámetros entre los estados finales e iniciales de AS (negro) y Met1^{OX} AS (celeste) respecto a la intensidad de fluorescencia de ThioT (izquierda), densidad óptica a 600nm (derecha).

de fluorescencia de ThioT y de densidad óptica a 600nm (Figura 4.7D). El aumento de fluorescencia es indicativo de aparición de especies fibrilares, mientras que la absorbancia o densidad óptica es indicativa de especies de gran tamaño (oligómeros, agregados amorfos y fibras amiloides). Se observó un aumento considerable de fluorescencia y OD para AS, indicativo de la formación de fibras amiloides, mientras que se observó un aumento menor pero significativo de OD para Met1^{OX} AS. Estas evidencias en conjunto con los ensayos de consumo de monómero y ThioT, indican que Met1^{OX} AS transita un mecanismo de agregación no amiloide, con formación de especies oligoméricas en equilibrio con mayor nivel de monómero soluble.

4.5 Discusión

Para contribuir al esclarecimiento del rol de la oxidación catalizada por metales en el desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas, estudiamos la oxidación catalizada por iones cobre en la proteína AS. En nuestros estudios, utilizamos AA como agente reductor debido a que: (1) AA mostró ser un reductor eficiente de sitios de Cu(II) en metalo-enzimas y proteínas amiloidogénicas,^{196,219} (2) con respecto al potencial redox reportado del complejo AS-Cu(II) ($E = 0.018V$ vs Ag/AgCl), se demostró que AA ($E = -0.145V$ vs Ag/AgCl) puede reducir directamente AS-Cu(II) a AS-Cu(I),¹⁶⁰ y (3) altos niveles de AA fueron reportados en el medio intracelular de las neuronas.^{155,220} Nuestros experimentos demuestran que la formación de complejos AS-Cu(I) en condiciones que favorecen el ciclado redox del par Cu(I)/Cu(II) conduce a la oxidación selectiva del residuo de Met1 a su forma sulfóxido, mientras que a mayor nivel de exposición la oxidación inespecífica del residuo Met5 se torna significativa.

La especificidad sobre Met1 podría deberse a que dicho residuo participa en la coordinación de ambos estados de los iones cobre, léase Cu(II) y Cu(I),

resultando en una exposición directa a los ROS generados en el ciclado redox Cu(I)/Cu(II). Incluso, la mayor susceptibilidad del residuo de Met1 hacia la oxidación puede reflejar la existencia de un estado redox activo AS-Cu(I) poblado por confórmers en el cual la interacción de Met1 con ambos estados de oxidación de cobre resulta fuertemente favorecido. En este sentido, recientemente fue reportada la formación de confórmers redox activos y poco poblados de A β -Cu(I) que son capaces de atravesar rápidas transferencias electrónicas y catalizar la producción de ROS.²²¹ La coordinación química de dicho estado redox activo se ha demostrado que es diferente al conformero más poblado de A β -Cu(I), mientras que el carácter transitorio de este estado explica porque no fue posible detectarlo a través de estudios espectroscópicos de A β -Cu(I) y A β -Cu(II).²²¹ Este puede ser un escenario posible para la proteína AS, donde los ligandos principales como el átomo N del grupo amino-terminal y el átomo S δ de Met1, podrían ser esenciales y de algún modo favorecerían la oxidación de Met1 catalizada por cobre. El hecho de que la modificación de motivos químicos de los péptidos afecten la velocidad de la reacción sitio-específica de oxidación catalizada por cobre implica que la misma debe responder directamente a la oxido-reducción de la dupla Cu(I)/Cu(II) acomplejado a la proteína. Si bien no existen datos robustos que sustenten que algún ligando de los sitios de coordinación para Cu(I) y para Cu(II) en AS se comparta, lo que permitiría la oxidación directa sin cambio de coordinación (Figura 4.8A,F), nosotros sugerimos que debe existir algún intermediario con capacidad de unir ambos estados de oxidación con relativa estabilidad y que permita la oxido-reducción Cu(I)/Cu(II), como fue propuesto para A β ,²²¹ y catalice la oxidación de la proteína *in situ*. Es por esta razón que propusimos un mecanismo de reacción sitio-específico de oxidación catalizada por cobre de AS (Figura 4.8), incluyendo un intermediario de coordinación Cu(I)/Cu(II) alternativo que involucra el N del grupo amino-terminal y el átomo S δ de Met1: el complejo S-Cu(I)-S de AS (A) estaría en equilibrio con pequeñas poblaciones

de complejos monodentados S-Cu(I) (B), los cuales se comportarían como los péptidos mutantes M1I P1AS y M5I P1AS. El grupo amino-terminal actuaría como una base de Lewis, atacando con su par libre de electrones al Cu(I) unido al átomo Sδ de Met1 (B), y formando un complejo estable S-Cu(I)-N.¹⁹⁵ El complejo S-Cu(I)-N formado (C) podría aceptar al oxígeno molecular como ligando adicional (D) y permanecer en equilibrio con la formación de la unión Cu(II)-O₂ radical superóxido (E).^{222,223} El grupo amino-terminal es esencial en este proceso ya que es el ligando de anclaje principal del sitio de Cu(II) y actúa como estabilizador del mismo. Cuando dicha amina esta acetilada (como en el caso del péptido acP1AS), el producto es una amida incapaz de actuar como base de Lewis, es decir, no se forman los intermediarios necesarios para la estabilización de Cu(II). El radical superóxido podría generar un enlace de tres

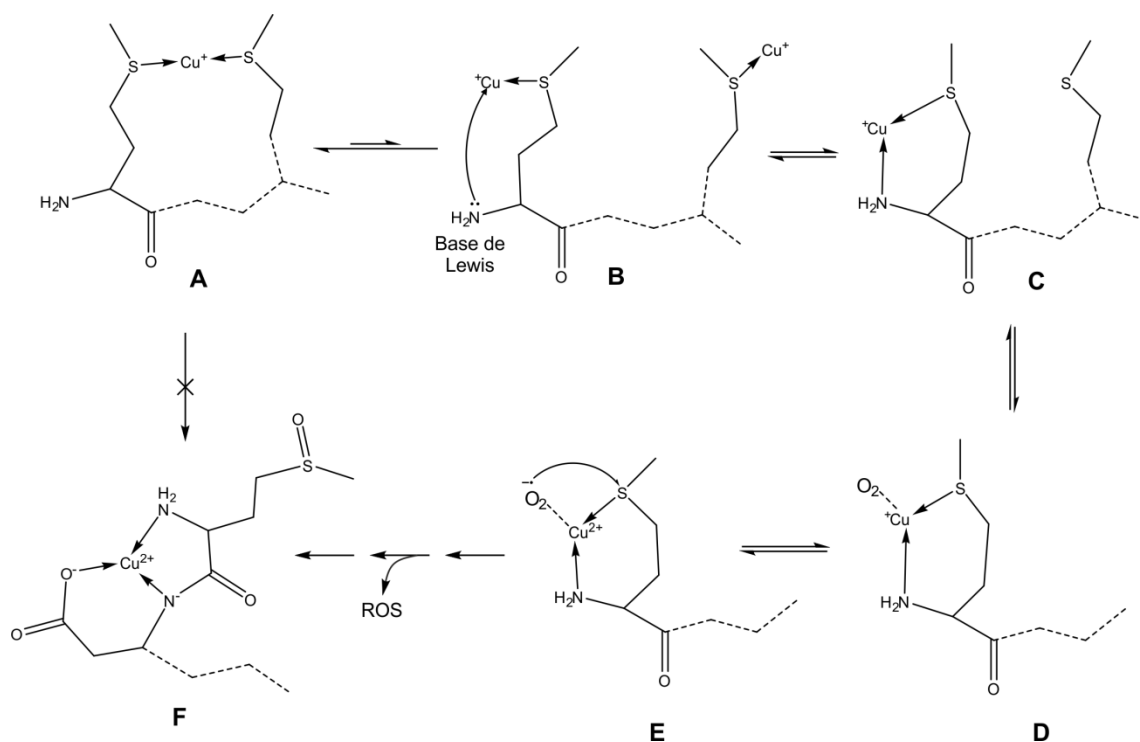


Figura 4.8. Mecanismo sitio-específico de reacción propuesto de la oxidación de AS catalizada por cobre. A. Complejo S-Cu(I)-S de AS reportado. B. Complejos minoritarios S-Cu(I) en equilibrio. El grupo amino-terminal, actuando como base de Lewis, ataca a S-Cu(I) de Met1. C. Complejo estable S-Cu(I)-N. D. El complejo S-Cu(I)-N acepta una molécula de O₂ como ligando adicional. E. Complejo Cu(II)-O₂^{•-} (radical superóxido) en equilibrio. El radical superóxido genera un enlace de tres electrones con el átomo Sδ de Met1. F. Oxidación de Met1 y formación del sitio de Cu(II) reportado.

electrones con el átomo Sδ de Met1, provocando una posterior oxidación de Met1 y una generación de ROS como subproductos de reacción (F).²²⁴ Una vez oxidado Met1, este residuo perdería la capacidad de unir Cu(I) y el Cu(II) formado forzaría la reorganización de los ligandos hacia aquel sitio de mayor estabilidad reportado (F).¹⁶⁸ Este mecanismo sitio-específico explicaría la oxidación catalizada por cobre del residuo Met1 de la proteína AS, y al mismo tiempo, explicaría la generación de ROS en las cercanías de la reacción que podrían afectar al residuo Met5 de manera inespecífica, y por cuestiones de distancia se vería más afectado que los residuos Met116 y Met127. Sin embargo, experimentos complementarios son necesarios para confirmar y desentrañar las bases moleculares y electroquímicas de los intermediarios de la reacción de oxidación catalizada por cobre.

Complementariamente, hemos demostrado que la oxidación del residuo de Met1 es suficiente para provocar cambios en las propiedades amiloidogénicas de AS, inhibiendo la formación de fibras amiloides y promoviendo en cierta medida la estabilización de especies oligoméricas. El hecho de que la oxidación de un único residuo tenga efectos tan pronunciados podría explicarse por las modificaciones en tendencia estructural que provoca la oxidación de los residuos de Met. Se ha reportado que la sola conversión de residuos Met a Met^{OX}, transforma un péptido capaz de adoptar conformaciones de hélice alfa en uno capaz de adoptar conformaciones de lámina beta.²²⁵ Este mismo escenario fue observado en AS, donde los residuos Met1 y Met5 otorgan una tendencia helicoidal leve que se anula al cambiar la naturaleza de los residuos mediante oxidación.²²⁶ Este cambio estructural podría desestabilizar y/o estabilizar conformaciones necesarias para la formación de fibras amiloides y/u oligómeros, respectivamente.

Como fue propuesto por varios autores, las modificaciones oxidativas en la proteína AS tendrían un rol importante en la agregación amiloide y numerosos estudios se han enfocado en la comprensión de las consecuencias

fisiopatológicas derivadas de la oxidación de la proteína AS.^{212,227} En el particular caso de la oxidación que involucra a los residuos de Met, fue sugerido que esta modificación inhibe la formación de fibras amiloides promoviendo la formación de oligómeros estables.^{165,166,210,228,229} Además, un trabajo reciente de Bax y colaboradores demostró que la oxidación de los residuos Met1 y Met5 de AS mediada por lípidos peroxidados, afectaban sustancialmente las propiedades de unión a membranas de la proteína AS.²³⁰ Por otro lado, se reportó que la oxidación los residuos de Met permite inhibir la degradación de oligómeros a través de la vía de autofagia y la degradación proteosomal de AS.^{116,212,231} Los residuos críticos detrás de este fenómeno resultaron ser los residuos de Met1 y Met5, ya que la interacción de AS con la subunidad C8 del proteosoma ocurre a través de la región N-terminal de AS.²³¹ Esta evidencia fue utilizada para hipotetizar que la oxidación de AS provocaría un aumento en la población citosólica de AS capaz de oligomerizar rápidamente.²²⁷ Esta evidencia biológica indica que existiría un balance complejo de especies de AS en células bajo estrés oxidativo, y por ende el conocimiento de las bases mecánicas y estructurales detrás de la formación de dichas especies resulta clave para el entendimiento de los eventos moleculares que guían la agregación amiloide.

Recientemente, se ha descrito que la proteína AS en condiciones normales y fisiológicas sufriría la modificación post-traducciona de acetilación del extremo amino-terminal,²³² provocando una reducción en la capacidad de unión de Cu(II)¹⁷² y probablemente bloqueando la oxidación catalizada por cobre de AS como se ha visto para el péptido acP1AS. Sin embargo, en condiciones patológicas, podría ser posible un escenario donde la coordinación de cobre y posterior oxidación de Met1 fuera más rápida que la acetilación del mismo. La oxidación de Met1 cambiaría las propiedades fisicoquímicas del motivo ¹MD² necesario para la acetilación²³³ y promovería una acumulación de una población de Met1^{OX} AS resistentes a la acetilación con las propiedades recién descritas.

Nuestros hallazgos sustentan un mecanismo a través del cual la interacción de AS con los iones cobre, en presencia de un agente reductor fisiológico como AA, podría catalizar el daño oxidativo de los residuos de Met, previniendo la interacción de AS con membranas, estabilizando la formación de oligómeros, inhibiendo su degradación y permitiendo la acumulación de un conjunto de moléculas de AS con propiedades estructurales diferentes. La oxidación de los residuos de Met genera un centro asimétrico, Met^{OX} (R) y Met^{OX} (S), los cuales pueden ser reducidos nuevamente a residuos de Met por reductasas de Met sulfóxido estéreo específica (MsrA y MsrB, respectivamente).^{212,227,234,235} De las mismas, MsrA fue encontrada capaz de reparar eficientemente solo las modificaciones que involucran a Met^{5OX}, siendo ineficaz frente a Met^{1OX} de AS, sugiriendo que una población de Met^{1OX} AS permanecería modificada más tiempo de lo usual.²³⁰ En su conjunto, las evidencias discutidas en esta sección sugieren que la unión de cobre a la región N-terminal de AS y el daño oxidativo que resultaría de dicha interacción podría jugar un papel de relevancia en la neurodegeneración asociada a la proteína AS y el desarrollo de la enfermedad de Parkinson.

Capítulo 5 – Amiloidogénesis y conformación de la proteína alfa-sinucleína en presencia de Cu(I)

5.1 Introducción

En el capítulo 3 se describió la interacción entre el ion Cu(I) y la proteína AS con un enfoque estructural y en términos de las afinidades relativas de los sitios de unión para el metal identificados en la proteína. Sin embargo, el estudio *in vitro* tiene sus limitaciones si no se considera el contexto fisiológico en el cual ocurriría la potencial interacción entre la proteína AS y el ion Cu(I). Una de las cuestiones a considerar emerge de la reciente observación que indica que la proteína AS existiría *in vivo* como una variante acetilada en su extremo N-terminal (acAS).²³² La acetilación de la proteína ocurre vía la enzima N-terminal acetil transferasa B (NatB), cuya función es acetilar el grupo amino-terminal de los residuos de Met1 en el marco de la secuencia consenso ¹MD² y, en menor medida, ¹ME².²³³ Recientemente, ha sido reportado que la acetilación del grupo amino-terminal de AS confiere a la proteína una mayor tendencia a adquirir elementos de estructura secundaria del tipo de hélice alfa, así como un aumento en su afinidad de unión a vesículas lipídicas,^{171,236,237} a la vez que no ejerce ningún tipo de influencia sobre el potencial amiloidogénico de la proteína y de la morfología de sus fibras.^{171,236}

Por otro lado, cabe remarcar que la acetilación del grupo amino-terminal en AS cancela completamente la unión del ion Cu(II) al sitio 1 o de alta afinidad, por lo que la influencia de este ion metálico sobre la amiloidogénesis de la proteína AS es nula.¹⁷² Además, como hemos discutido en el capítulo 4 de este trabajo de tesis, la oxidación catalizada por cobre se encuentra notablemente disminuida como consecuencia de la acetilación y el bloqueo del sitio de unión a Cu(II) en la proteína. En este contexto, si bien el grupo amino-terminal de AS no está involucrado directamente en la coordinación de Cu(I), la modificación

química del residuo de Met1 y el ligero cambio en las preferencias conformacionales del segmento 1-6 en la variante acetilada de la proteína justifican una reevaluación de las propiedades de unión del ion Cu(I) a acAS. Por ende, en este capítulo se analizó detalladamente dicha interacción, así como el impacto de la misma sobre las preferencias conformacionales de la proteína acAS y su potencial amiloidogénico.

5.2 Propiedades amiloidogénicas del complejo acAS-Cu(I)

En primer lugar, se obtuvo una cepa transformante de *E. coli* BL21 que contiene los genes para la expresión de las proteínas NatB y AS. Esta cepa permite expresar y luego purificar la proteína AS acetilada en su extremo N-terminal (acAS), haciendo uso de la metodología descrita en este trabajo de tesis.

Al intentar analizar el impacto del ion Cu(I) sobre las propiedades amiloidogénicas de acAS, el principal obstáculo con el que nos encontramos al medir la cinética de agregación amiloide es que la presencia de O₂ actúa promoviendo la oxidación acAS, interfiriendo con el análisis del rol del ion Cu(I). En consecuencia, para lograr excluir el O₂ en nuestros experimentos se optimizó una metodología alternativa en microplaca bajo atmosfera inerte, la cual además de permitir la preparación de las soluciones bajo una atmosfera libre de O₂, hace posible la medición de ThioT sin exposición al aire atmosférico (ver “Agregación amiloide en microplaca” en Materiales y Métodos).

Bajo estas condiciones experimentales, se observó una aceleración considerable de la cinética de agregación de acAS, aún en presencia de concentraciones sub-estequiométricas de Cu(I) (Figura 5.1A). Cada cinética de agregación responde a una curva típicamente sigmoidea de la cual es posible calcular los parámetros clásicos de velocidad de elongación (k_{app}) y tiempo medio de agregación ($t_{1/2}$), utilizando el programa GraphPad (Figura 5.1B). Se

observó que el parámetro k_{app} fue el mayormente afectado, aumentando hasta seis veces en presencia de Cu(I) respecto al valor de referencia. El valor de $t_{1/2}$ disminuyó a valores menores de la mitad respecto de la referencia, como consecuencia principalmente del aumento de k_{app} y en menor medida de la disminución de la fase *lag* (calculada como el tiempo que se tarda en superar el 5% de agregación). El análisis de dichos parámetros nos permite concluir que la principal influencia del ion Cu(I) sobre la cinética de agregación amiloide de acAS ocurre a nivel de la fase de elongación, muy probablemente mediante el favorecimiento de la formación de núcleos secundarios o de la adición de monómeros de acAS a las estructuras amiloides. La formación de núcleos primarios que condiciona principalmente la fase *lag* no estaría siendo afectada por la unión de Cu(I) por acAS.

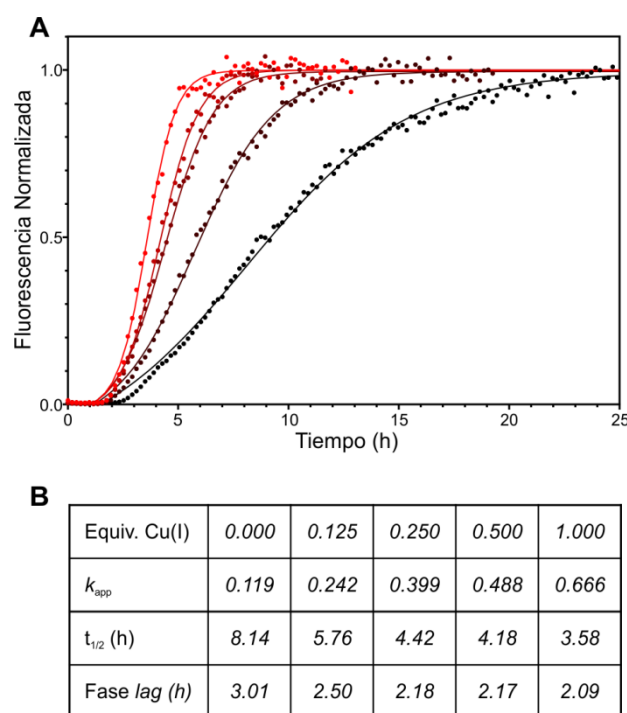


Figura 5.1. Análisis del proceso de agregación amiloide de acAS-Cu(I). **A.** Proceso de agregación amiloide analizado mediante el ensayo de agregación amiloide en microplaca. Se muestra la intensidad de fluorescencia normalizada en función del tiempo de acAS 25 μ M en presencia de concentraciones crecientes de Cu(I) (de negro a rojo: 0, 0.125, 0.25, 0.5 y 1 equivalente). **B.** Se muestran los valores de k_{app} y $t_{1/2}$ para el ajuste sigmoideo y los valores de fase *lag* de cada condición.

5.3 Propiedades de unión de Cu(I) a la proteína acAS

Con el fin de analizar si la acetilación del grupo amino-terminal altera o modifica la unión de Cu(I) a la proteína AS, se realizaron experimentos ^1H - ^{15}N SOFAST-HMQC sobre la variante acAS enriquecida isotópicamente en átomos de ^{15}N , en ausencia y presencia de dicho ion metálico (Figura 5.2A). A partir de este estudio, fue posible detectar variaciones importantes de los valores de $\Delta\delta$

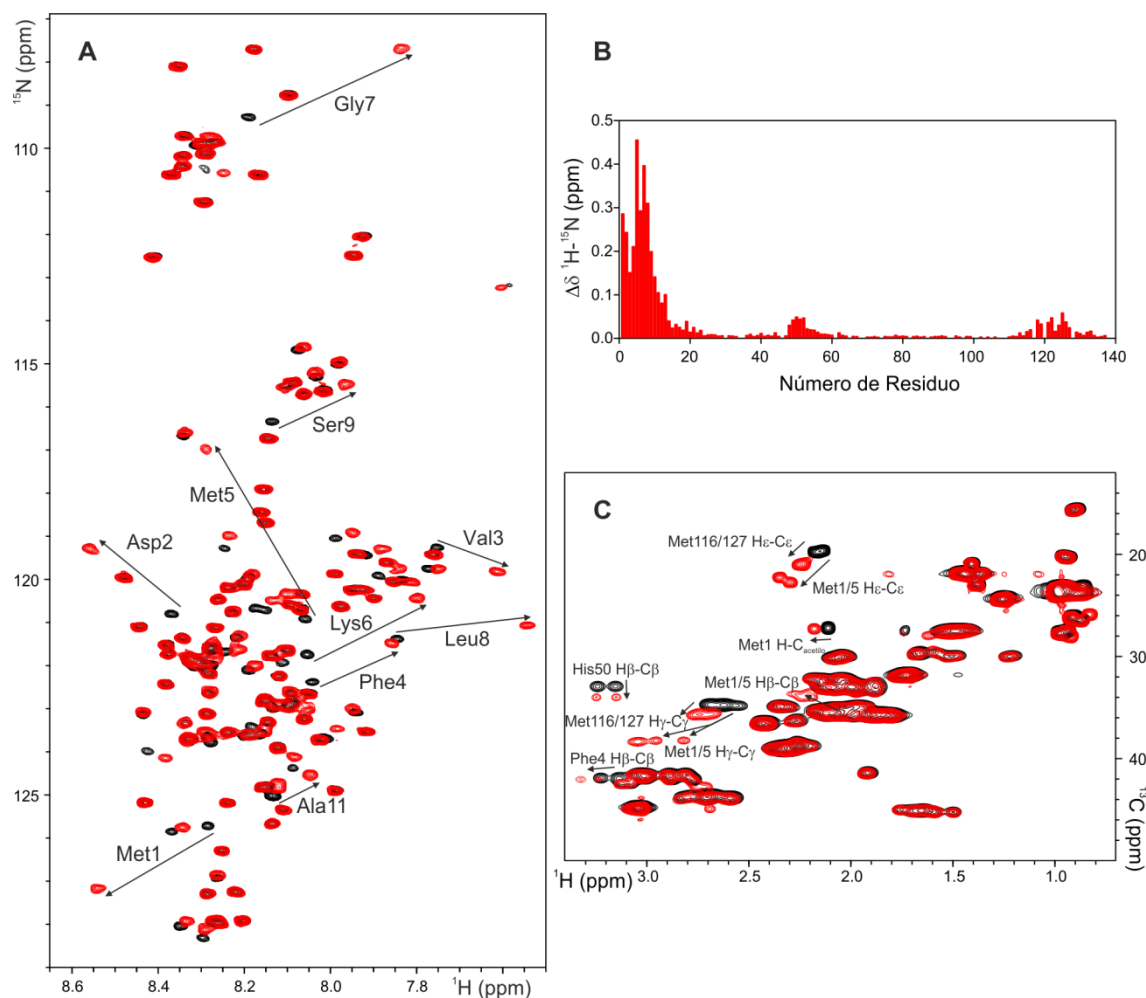


Figura 5.2. Análisis por RMN de la unión de Cu(I) a acAS. A. Espectros superpuestos ^1H - ^{15}N SOFAST HMQC de ^{15}N acAS $50\mu\text{M}$ en ausencia (negro) y presencia (rojo) de 3 equivalentes de Cu(I). Los experimentos fueron adquiridos en solución amortiguadora B, 10% D_2O y 15°C . B. Perfil de $\Delta\delta$ ^1H - ^{15}N de los grupos amida de acAS en presencia de 3 equivalentes de Cu(I). C. Espectros superpuestos ^1H - ^{13}C HSQC de ^{13}C acAS $300\mu\text{M}$ en ausencia (negro) y presencia (rojo) de 3 equivalentes de Cu(I). Los experimentos fueron adquiridos en solución amortiguadora A, 100% D_2O y 15°C .

de los residuos contenidos en el segmento 1-15 de la secuencia primaria de la proteína acAS, a la vez que se observaron efectos menores alrededor del residuo de His50, y en la región 115-129, en concordancia con los tres sitios de unión de Cu(I) descritos previamente para la proteína AS sin modificar (Figura 5.2B). El análisis basado en los valores de δ de las cadenas laterales de acAS mediante ^1H - ^{13}C HSQC reveló que luego del agregado de Cu(I), las resonancias mayormente afectadas correspondieron a los grupos $\text{H}\gamma$ - $\text{C}\gamma$ y $\text{H}\epsilon$ - $\text{C}\epsilon$ de Met1 y Met5 y, en menor medida, a las resonancias correspondientes al grupo $\text{H}\beta$ - $\text{C}\beta$ de His50 y a los grupos $\text{H}\gamma$ - $\text{C}\gamma$ y $\text{H}\epsilon$ - $\text{C}\epsilon$ de Met116 y Met127 (Figura 5.2C). Estos resultados demuestran que la acetilación del grupo amino-terminal no ejerce efecto alguno sobre la unión del ion Cu(I) al sitio 1, el cual se sigue constituyendo como el sitio de anclaje preferencial para dicho ion metálico también en la especie acAS.

Paralelamente, se analizó la unión del ion Cu(I) al péptido acP1AS, utilizando experimentos 1D ^1H RMN. Al realizar una titulación de Cu(I) sobre el péptido acP1AS, se observaron cambios importantes a nivel de los valores de δ de las señales $\text{H}\epsilon$ de los residuos de Met1 y Met5 (Figura 5.3A). Con el fin de efectuar un análisis comparativo con los experimentos obtenidos para acAS, se realizaron experimentos ^1H - ^{13}C HSQC y se encontró que el patrón de los cambios en los valores de δ , de las señales de los grupos $\text{H}\gamma$ - $\text{C}\gamma$ y $\text{H}\epsilon$ - $\text{C}\epsilon$ de Met1 y Met5 y $\text{H}\beta$ - $\text{C}\beta$ de Phe4 en acP1AS reproduce fielmente el perfil encontrado para el complejo acAS-Cu(I) (Figura 5.3B). La similitud observada en la capacidad de coordinación de Cu(I) por acP1AS respecto de acAS, indica que la unión de dicho ion metálico al sitio 1 ocurre de manera independiente a los otros dos sitios reportados. Del mismo modo, los estudios confirman que los átomos $\text{S}\delta$ de los residuos de Met1 y Met5 son los ligandos de coordinación de Cu(I) en el sitio 1 de acAS, tal como sucede en el sitio 1 de AS.

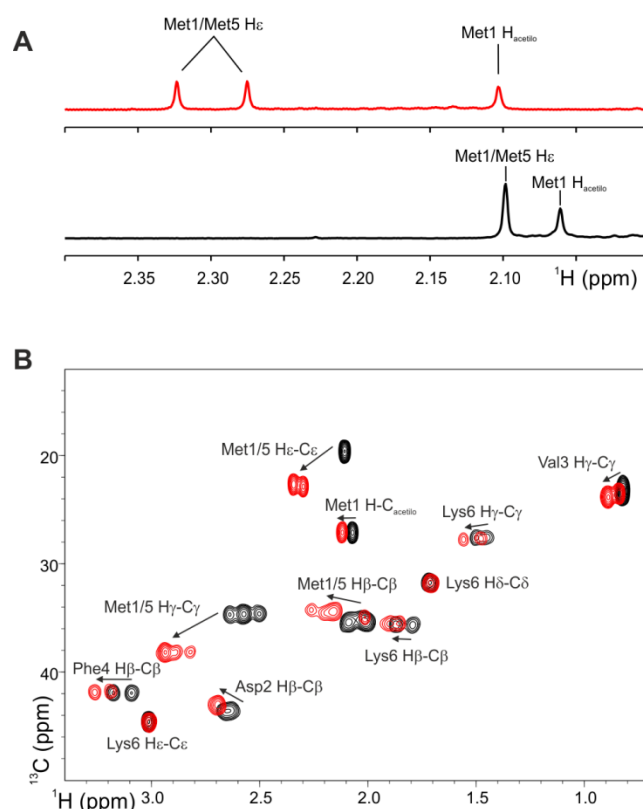


Figura 5.3. Análisis por RMN de la unión de Cu(I) a acP1AS. **A.** Espectros 1D ¹H RMN de acP1AS 50 μM en ausencia (negro) y presencia (rojo) de 3 equivalentes de Cu(I). Se muestra la región alifática (2.00-2.40 ppm) donde se encuentran los protones H ϵ de Met1 y Met5. **B.** Espectros superpuestos ¹H-¹³C HSQC de acP1AS 800 μM en ausencia (negro) y presencia (rojo) de 3 equivalentes de Cu(I). Los experimentos fueron adquiridos en solución amortiguadora A, 100% D₂O y 15°C.

Finalmente, utilizando experimentos de RMN de detección directa de ¹³C (denominado ¹³C-¹⁵N HflipCON), fue posible analizar la formación del complejo acAS-Cu(I) a pH 7.4 y 37°C, condiciones que representan más fielmente las condiciones de pH y temperatura encontradas en el interior celular (Figura 5.4A). El perfil de los cambios en los valores de $\Delta\delta$ ¹³C-¹⁵N resultó similar al obtenido para los grupos amida en el complejo acAS-Cu(I) en las condiciones de trabajo previamente utilizadas (Figura 5.4B). Esta observación indica que las conclusiones obtenidas de nuestros experimentos podrían ser representativas de lo que ocurriría en las condiciones del interior celular.

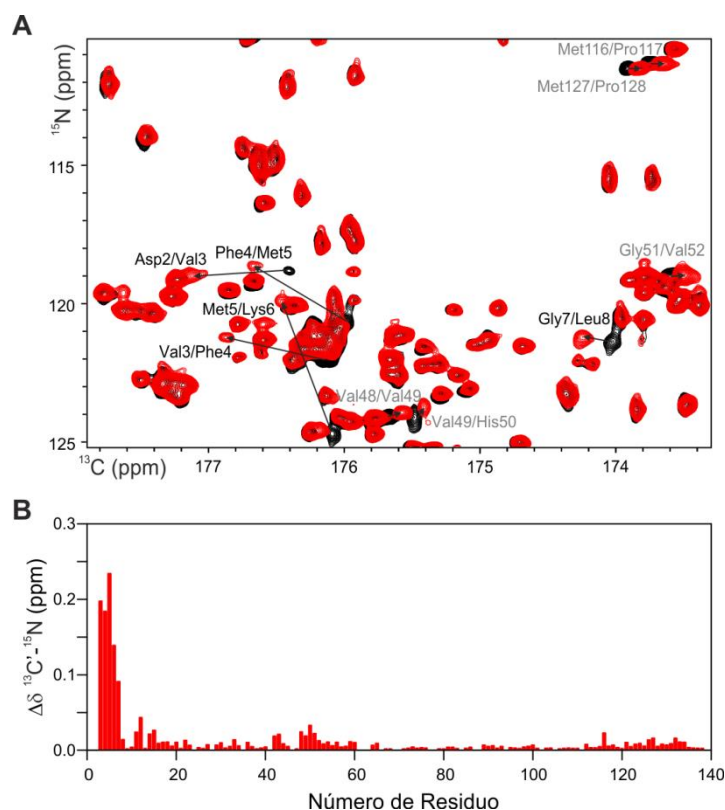


Figura 5.4. Análisis por RMN de la unión de Cu(I) a acAS a pH 7,4 y 37°C. A. Espectros superpuestos ^{13}C - ^{15}N HflipCON de ^{13}C - ^{15}N acAS 300 μM en ausencia (negro) y presencia (rojo) de 3 equivalentes de Cu(I). Las señales corresponden a la correlación del carbonilo amida del residuo i con el N amida del residuo $i+1$. Los experimentos fueron adquiridos en solución amortiguadora C, 10% D_2O y 37°C. **B.** Perfil de $\Delta\delta$ $^{13}\text{C}'$ - ^{15}N de los grupos amida de acAS en presencia de 3 equivalentes de Cu(I).

5.4 Estimación de los valores K_{dapp} para los sitios de unión a Cu(I) en acAS

Con el fin de determinar los valores de K_{dapp} para los sitios de unión de Cu(I) en acAS, se realizaron titulaciones de Cu(I) sobre las variantes acAS y acP1AS. Para el caso de la proteína acAS se realizó un ajuste global con el programa DynaFit, considerando un modelo con tres sitios de unión a Cu(I), independientes y no interactivos, capaces de unir un equivalente de Cu(I) cada uno (Figura 5.5A-C). Los resultados que arrojó el ajuste matemático fueron los siguientes: $K_{\text{dapp}1} = 12 \pm 2\mu\text{M}$, $K_{\text{dapp}2} = 49 \pm 7\mu\text{M}$ y $K_{\text{dapp}3} = 312 \pm 50\mu\text{M}$. Los datos

registrados sobre el péptido acP1AS, en el cual se monitorearon los cambios en los valores de δ de los protones H ϵ en los residuos de Met1 y Met5 (Figura 5.5D) arrojaron un valor de $K_{dapp} = 15 \pm 2\mu\text{M}$, en perfecta concordancia con el valor estimado para acAS a partir de los grupos amida así como para la variante proteica sin acetilar.

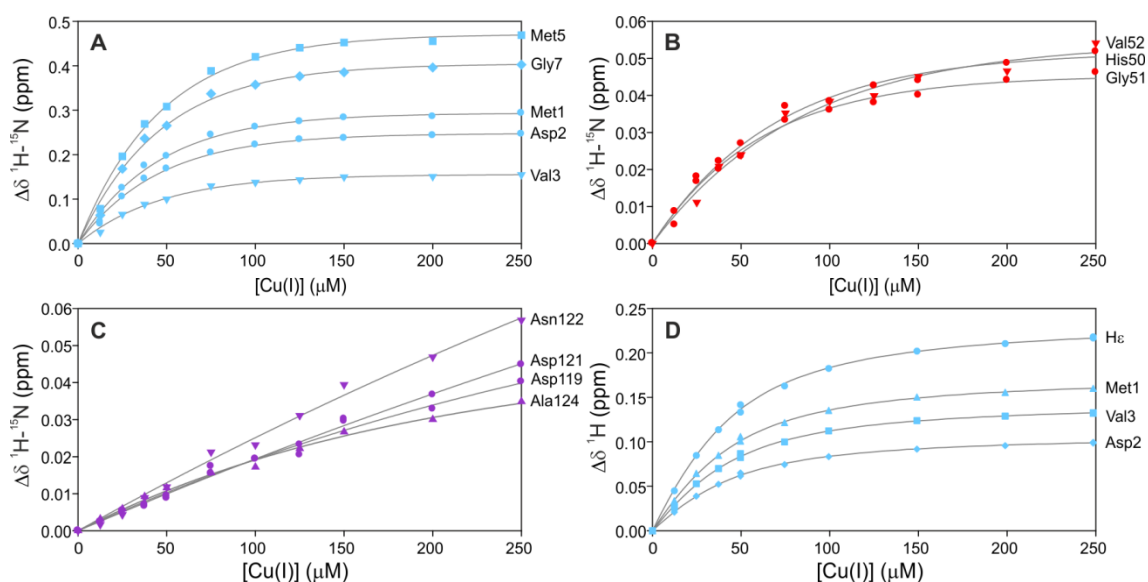


Figura 5.5. Características de afinidad de la unión de Cu(I) a acAS y acP1AS. **A-C.** Curvas de unión de Cu(I) a ^{15}N acAS $50\mu\text{M}$ monitoreado por $\Delta\delta$ $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ de las resonancias de los grupos amida del sitio 1 (símbolos celestes), sitio 2 (símbolos rojos) y sitio 3 (símbolos violetas). Los experimentos $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ HSQC fueron adquiridos en solución amortiguadora B, 10% D_2O y 15°C . **D.** Curvas de unión de Cu(I) a acP1AS $50\mu\text{M}$ monitoreado por $\Delta\delta$ ^1H de las resonancias de las señales amida de Met1 (triángulo celeste), Asp2 (rombo celeste) y Val3 (cuadrado celeste) y del promedio de $\Delta\delta$ ^1H de las señales H ϵ de Met1 y Met5 (círculo celeste). Los experimentos 1D ^1H RMN fueron adquiridos en solución amortiguadora B, 10% D_2O y 15°C . Las curvas grises representan el ajuste a los modelos descritos en el texto.

5.5 Estado conformacional de acAS en presencia de Cu(I)

Al analizar el perfil de interacción de Cu(I) con la proteína acAS se observaron efectos muy significativos sobre los valores de desplazamientos químicos de los señales de los residuos ubicados en el segmento 1-10 de la secuencia primaria de la proteína, conjuntamente con cambios menores que se

extienden hasta la posición 20 (Figura 5.2B). Este fenómeno no fue observado en los casos de los sitios 2 y 3 de unión a Cu(I), donde las perturbaciones estuvieron circunscriptas a dos o tres residuos vecinos a los ligandos primarios del metal. Más aun, los cambios observados en la especie acetilada exceden también a los provocados por la unión del ion Cu(I) a la variante no acetilada de la proteína (Figura 3.1B). Este comportamiento podría ser consistente con un cambio en las preferencias conformacionales de la proteína unida a Cu(I), el cual afectaría los primeros diez residuos de la proteína. Con el fin de dilucidar estos aspectos nos enfocamos en la caracterización de parámetros de RMN que reflejan la presencia de elementos de estructura secundaria, tales como los valores de desplazamientos químicos secundarios de protones y carbonos en el esqueleto proteico de la proteína, el factor o score de propensión de estructura secundaria, los valores de constante de acoplamiento escalar, y factores NOE ($i, i-1$) y ($i, i-3$), así como la relación $r\text{NOE } H_N-H\alpha(i,i)/H_N-H\alpha(i,i-1)$.

Los valores de $\Delta\delta$ secundarios son ampliamente usados para determinar el contenido de estructura secundaria en proteínas y péptidos, y se calculan como las desviaciones con respecto a valores consenso para cada residuo en una estructura de ovillo estadístico.²³⁸ Así, por ejemplo, desviaciones positivas o negativas en dicho parámetro para los átomos $C\alpha$ son indicativas de la presencia de elementos de estructura secundaria de hélice alfa o lámina beta, respectivamente, y lo contrario se aplica para los átomos $C\beta$. El perfil de $\Delta\delta$ secundarios medido para los distintos átomos del esqueleto proteico de acAS libre indican que la proteína adopta mayormente una estructura intrínsecamente desordenada, excepto en los primeros cinco o seis residuos donde se puede observar una leve tendencia a adoptar estados de hélice alfa, en concordancia con resultados publicados por otros grupos de investigación (Figura 5.6A-B).¹⁷¹ Sorpresivamente, para el estado unido a Cu(I) de la proteína acAS se observó un aumento significativo en el contenido de hélice alfa en el segmento que contiene a los primeros diez residuos de la proteína, tal cual lo

indican las significativas desviaciones positivas y negativas determinadas para los valores de $\Delta\delta$ secundarios en átomos $C\alpha$ y $C\beta$, respectivamente.

En la misma dirección, los valores de δ de los átomos $H\alpha$, $C\alpha$, y $C\beta$ se

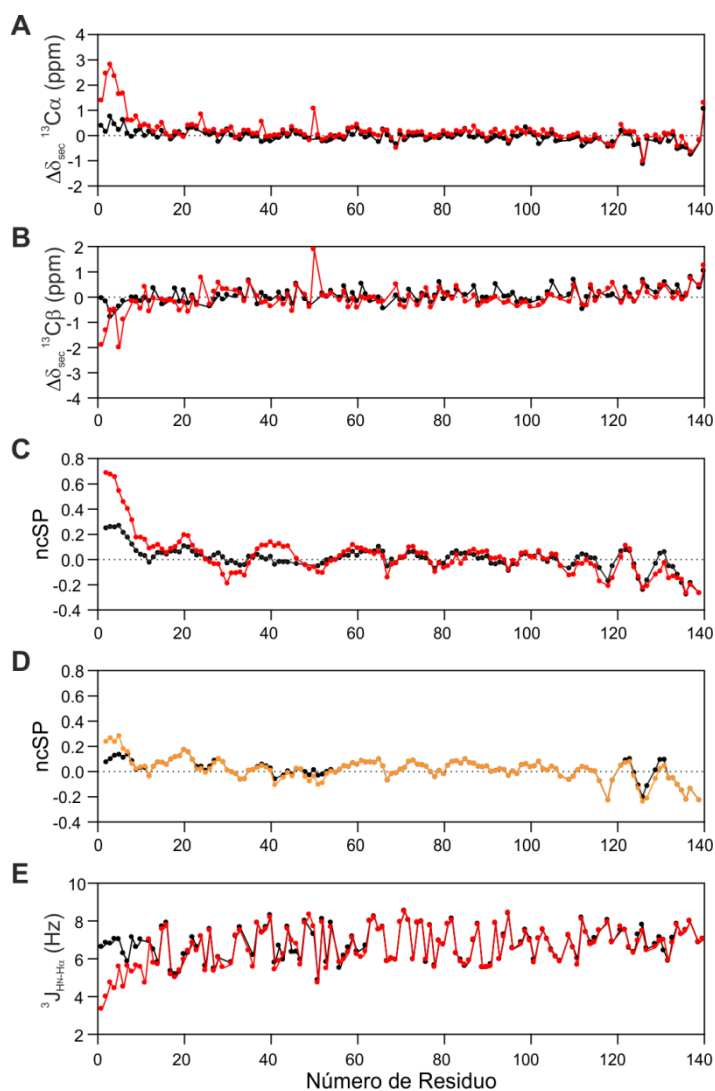


Figura 5.6. Análisis por RMN de los parámetros de estructura secundaria de acAS-Cu(I). A-B. $\Delta\delta$ secundarios de $^{13}C\alpha$ y $^{13}C\beta$ calculados para ^{13}C - ^{15}N acAS $300\mu M$ en ausencia (negro) y presencia (rojo) de 3 equivalentes de Cu(I). C. Propensión de estructura secundaria corregida por vecinos (ncSP) calculada a partir de los valores de δ de $^1H\alpha$, $^{13}C\alpha$ y $^{13}C\beta$. D. Propensión de estructura secundaria calculada a partir de los valores de δ de $^{13}C\alpha$ y $^{13}C\beta$ de ^{13}C - ^{15}N AS $300\mu M$ en ausencia (negro) y presencia (naranja) de 3 equivalentes de Cu(I). E. Acoplamiento $^3J_{HN-H\alpha}$ de ^{15}N acAS $200\mu M$ en ausencia (negro) y presencia (rojo) de 3 equivalentes de Cu(I). Los experimentos HNHA, HNCACB y TROSY-HSQC fueron adquiridos en solución amortiguadora B, 10% D_2O y $15^\circ C$.

utilizaron para calcular el factor denominado de propensión de estructura secundaria, en este caso corregido en función de la naturaleza de los aminoácidos vecinos (ncSP, del inglés *neighbor corrected Structure Propensity*). Los valores de ncSP varían entre -1 para una propensión 100% de lámina beta y +1 para una propensión 100% de hélice alfa.²³⁹ Se observó que la propensión de estructura helicoidal es ~0.2 en la región N-terminal de acAS, mientras que ese valor se incrementó a 0.7 en presencia de Cu(I) (Figura 5.6C). Este sustancial incremento contrasta con lo observado en la especie AS sin acetilar donde tanto para la forma libre como unida a Cu(I) dichos valores oscilan alrededor de 0.2 (Figura 5.6D).

Con el fin de confirmar nuestros hallazgos, utilizamos otros parámetros de RMN. Así, se calcularon los valores de las constantes de acoplamiento escalar a tres enlaces H_N-H_α (³J_{H_N-H_α), los cuales son reporteros confiables de la distribución de los ángulos de torsión del esqueleto proteico y consecuentemente de la estructura secundaria.²⁴⁰ Este acoplamiento oscila en el rango 4-6Hz para estructuras secundarias de hélice alfa, 6-8Hz para estructuras de ovillo estadístico y 8-11Hz para estructuras secundarias de lámina beta. Existen diferentes experimentos que permiten calcular dichas constantes, siendo el más utilizado el experimento HNHA, sin embargo este experimento posee ciertas desventajas para proteínas intrínsecamente desordenadas como AS, y por lo tanto se ha desarrollado, como parte complementaria de este trabajo de tesis, una metodología alternativa que se describe en el *Anexo único*. Nuestros datos muestran valores de ³J_{H_N-H_α entre 6-8Hz para la mayoría de los residuos de acAS y de 4-6Hz para los primeros 12 residuos de acAS en presencia de Cu(I), manteniéndose prácticamente inalterados los restantes residuos (Figura 5.6E). En concordancia con los resultados descritos más arriba, estos resultados reflejan también un incremento en el contenido de estructura helicoidal en los primeros diez residuos de la proteína.}}

Finalmente, realizamos experimentos basados en la medición del efecto NOE a partir de los cuales es posible evaluar el patrón de acoplamientos dipolares inter-residuales en la región N-terminal de acAS en ausencia y presencia de Cu(I). A tales fines, utilizando experimentos 3D ^{15}N NOESY-HSQC fue posible detectar conectividades ^1H - ^1H NOE de corto rango H_N - $\text{H}_\text{N}(i,i-1)$ y de medio rango H_N - $\text{H}_\alpha(i,i-3)$ en los primeros residuos de acAS-Cu(I), las cuales estaban ausentes en la especie libre de la proteína (Figura 5.7A). El patrón de conectividades H_N - $\text{H}_\text{N}(i,i-1)$, observado para casi todos los pares en el segmento 1-9 es típico de estructuras más bien rígidas o compactas y, en particular, el patrón de conectividades H_N - $\text{H}_\alpha(i,i-3)$, observado para los pares Met1-Phe4, Val3-Lys6 y Phe4-Gly7, es característico de estructuras del tipo hélice alfa.^{241,242} Por otro lado, dentro del mismo experimento se observó que el acoplamiento con el agua, característico de estructuras desordenadas debido a interacciones de puente hidrógeno o intercambio de protones H_N - H_2O , fue prácticamente nulo en los primeros 8 residuos de acAS-Cu(I) (Figura 5.7A). Sumado a las evidencias anteriores, la ausencia de este acoplamiento puede atribuirse al hecho que los protones amida H_N se encontrarían inaccesibles al solvente y/o participando en puentes hidrógeno característicos de estructuras secundarias estables. Finalmente, se cuantificó la relación de intensidades entre la señal NOE intra-residuo H_N - $\text{H}_\alpha(i,i)$ y la señal NOE secuencial H_N - $\text{H}_\alpha(i,i-1)$. Dicha relación adopta valores de ~ 0.35 para estructuras desordenadas, valores de ~ 0.25 para estructuras de lámina beta y valores de hasta 6 para estructuras con fuerte contenido helicoidal.²³⁶ Se observó que estos valores aumentaron dramáticamente para los primeros diez residuos de acAS unida a Cu(I), mientras que para la especie libre de la proteína se observaron valores típicos de estructura desordenada (Figura 5.7B).

En su conjunto, los cambios observados en los tres indicadores de RMN independientes de estructura secundaria, nos permiten concluir que la unión de Cu(I) a la proteína acAS induce un cambio conformacional que afecta a los

primeros diez residuos de su secuencia y que se caracteriza por la presencia de elementos estables de estructura secundaria del tipo hélice alfa.

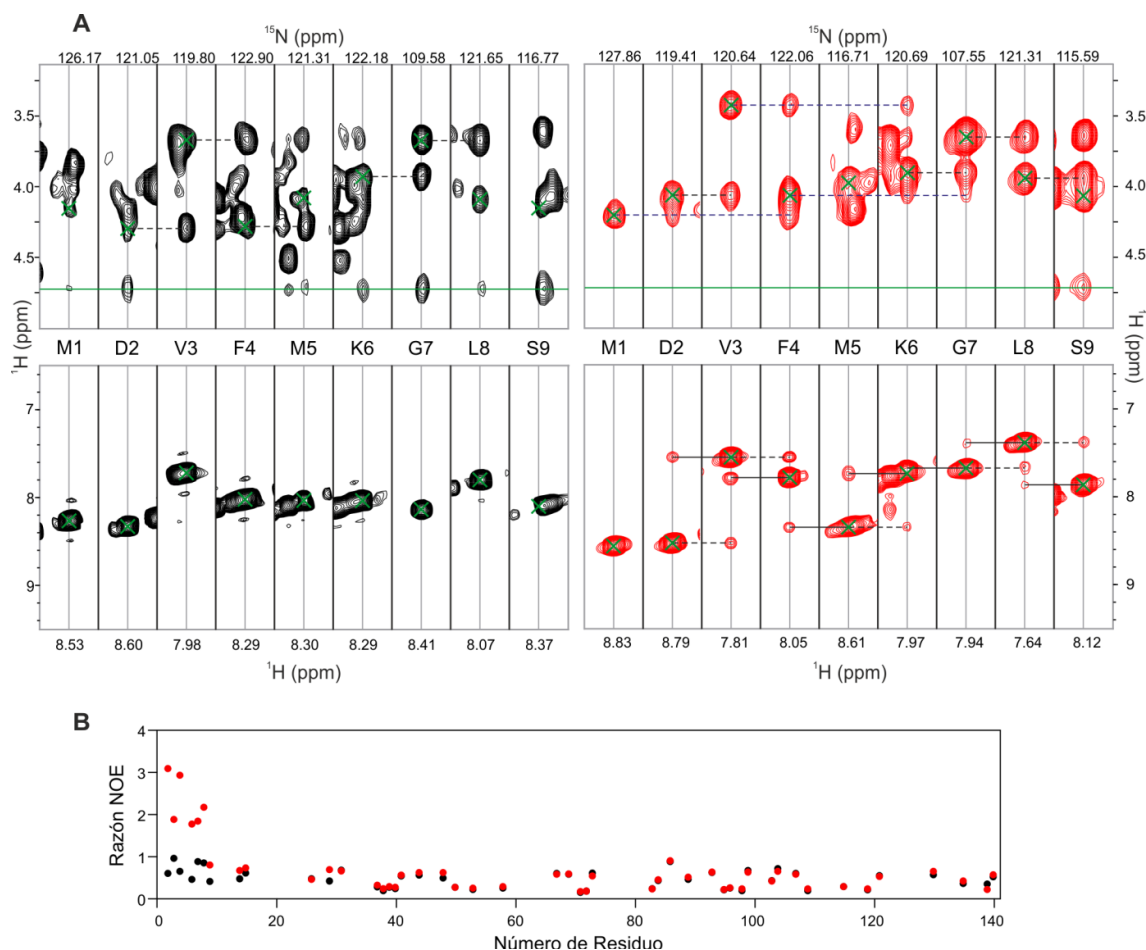


Figura 5.7. Análisis por RMN de las conectividades NOE de acAS-Cu(I). **A.** Tiras del espectro ^1H - ^1H - ^{15}N NOESY-HSQC correspondiente a los $\text{H}\alpha$ (arriba) y H_N (abajo) de ^{15}N acAS $300\mu\text{M}$ en ausencia (negro) y presencia (rojo) de 3 equivalentes de Cu(I). Las cruces denotan la correlación de los picos pertenecientes al propio residuo, las líneas de trazo negro denotan las correlaciones inter-residuo $d\text{H}_\text{N}$ - $\text{H}_\text{N}(i,i-1)$ y $d\text{H}_\text{N}$ - $\text{H}\alpha(i,i-1)$, las líneas de trazo azul denotan las correlaciones inter-residuos $d\text{H}_\text{N}$ - $\text{H}\alpha(i,i-3)$ y la línea verde identifica las correlaciones con el agua. Los experimentos fueron adquiridos en solución amortiguadora B, 10% D_2O y 15°C . **B.** Razón NOE $d\text{H}_\text{N}$ - $\text{H}\alpha(i,i)/d\text{H}_\text{N}$ - $\text{H}\alpha(i,i-1)$ calculada para acAS en ausencia (negro) y presencia (rojo) de 3 equivalentes de Cu(I).

5.6 Propiedades dinámicas del esqueleto proteico de la especie acAS unida a Cu(I)

Los principales estudios que brindan información acerca de las propiedades dinámicas del esqueleto proteico son los experimentos de relajación R_1 y R_2 de ^{15}N y el experimento NOE heteronuclear ^1H - ^{15}N (hNOE). Los valores de R_1 , R_2 y hNOE son indicadores útiles de la dinámica del esqueleto proteico en un amplio rango de escalas de tiempo que van de pico a nanosegundos (ps-ns), y cuanto mayores resulten dichos valores, mayor es la restricción existente a la movilidad. Además de medir la dinámica en la escala ps-ns, los valores de R_2 permiten monitorear cambios en la escala de los micro a milisegundos (μs -ms).

En el caso de la proteína acAS libre, la mayoría de los residuos mostró valores de R_1 entre 1.3 y 1.8s^{-1} , de R_2 entre 2 y 4s^{-1} y de hNOE entre -0.4 y 0.4, con la excepción de los altamente flexibles residuos en los extremos N- y C-terminal (Figura 5.8). El perfil obtenido indica que acAS adopta un estado flexible, comparable con lo observado para AS, sugiriendo que la acetilación del amino-terminal no tiene un impacto profundo en las propiedades dinámicas de la proteína. En presencia de Cu(I), se detectó un incremento significativo en los valores de R_1 de los primeros diez residuos, a la vez que el resto de los residuos permanecieron inalterados. El incremento observado resultó aún más pronunciado para los parámetros R_2 y hNOE, afectando a los primeros 25 residuos de la secuencia (Figura 5.8). Estos datos, en particular el de hNOE, indican que la región N-terminal adopta conformaciones más rígidas al unir Cu(I). Los valores relativamente mayores de R_2 , además de indicar un aumento de rigidez, podrían corresponder con una contribución del intercambio químico conformacional, es decir, los residuos contenidos en el segmento afectado podrían además estar poblando distintas estructuras helicoidales transientes y dinámicas. Cabe remarcar que se detectaron también valores aumentados de R_2

en los residuos afectados por la unión de Cu(I) a los sitios 2 y 3, pero en este caso, la ausencia de cambios de mayor magnitud en R_1 y hNOE indican que dichos incrementos responden a procesos de intercambio químico, ya sea intercambio de unión de Cu(I) y/o de conformación con poca pérdida de flexibilidad.

En su conjunto, estos resultados demuestran que la unión de Cu(I) a la proteína acAS transcurre con la formación de conformaciones más rígidas y estructuradas en la región N-terminal de la proteína, en completo acuerdo con las conclusiones obtenidas en la sección anterior.

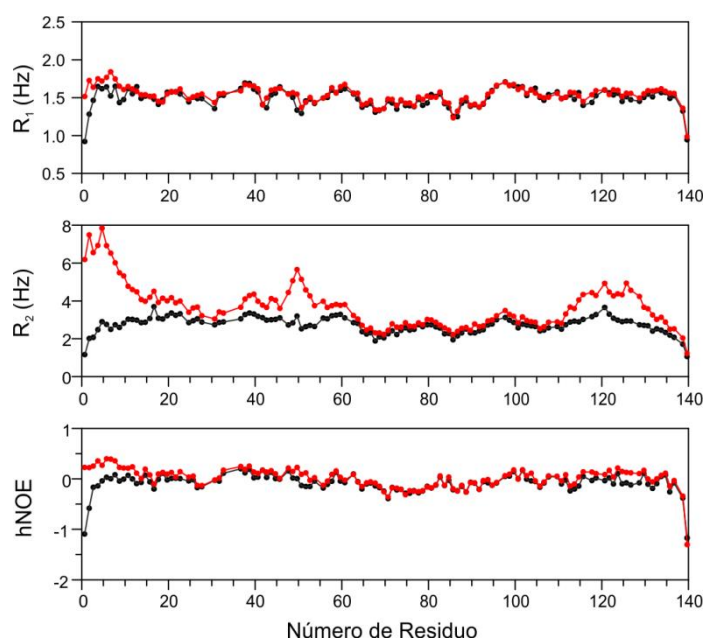


Figura 5.8. Análisis por RMN de las propiedades dinámicas de acAS-Cu(I). Perfil de R_1 , R_2 y hNOE de ^{15}N acAS $250\mu\text{M}$ en ausencia (negro) y presencia (rojo) de 3 equivalentes de Cu(I). Los experimentos fueron adquiridos en solución amortiguadora B, 10% D_2O y 15°C .

5.7 Discusión

En este capítulo hemos caracterizado la interacción entre Cu(I) y la proteína acAS. Tanto los iones Cu(I) como la proteína acAS son altamente abundantes en las vesículas sinápticas y sinaptosomas, alcanzando concentraciones de $15\text{-}300\mu\text{M}$ ^{144,206} y $\sim 50\mu\text{M}$,²⁰⁵ respectivamente. La consecuencia

más notable de la unión de Cu(I) a acAS fue la significativa aceleración de la agregación amiloide en presencia de cantidades micromolares y subestequiométricas ($<25\mu\text{M}$), sugiriendo que en este ion metálico podría jugar un importante rol patológico en la progresión de la agregación amiloide, y por ende, de la EP. Sustento adicional a esta hipótesis deviene del hecho que la unión de dicho ion metálico a la especie acetilada de AS favorece la estabilización de una conformación del tipo de hélice alfa en los residuos 1-10 (Figura 5.9), siendo dichos elementos de estructura secundaria helicoidal reportados como intermediarios en el proceso de agregación amiloide de la proteína.^{243,244} Esta transición conformacional fue confirmada por parámetros independientes de RMN, a saber: valores de desplazamiento químico secundarios, factores o scores ncSP, constantes de acoplamiento escalar $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$, conectividades del tipo NOE, y parámetros de relajación heteronuclear de ^{15}N (R_1 , R_2 y hNOE). Además, el aumento leve de los valores de R_2 y hNOE de los residuos 10-25, indica que podría existir un intercambio químico de tipo conformacional, sugiriendo la presencia de fluctuaciones helicoidales dinámicas en dichos residuos tras la unión de Cu(I) (Figura 5.9). Paralelamente, se

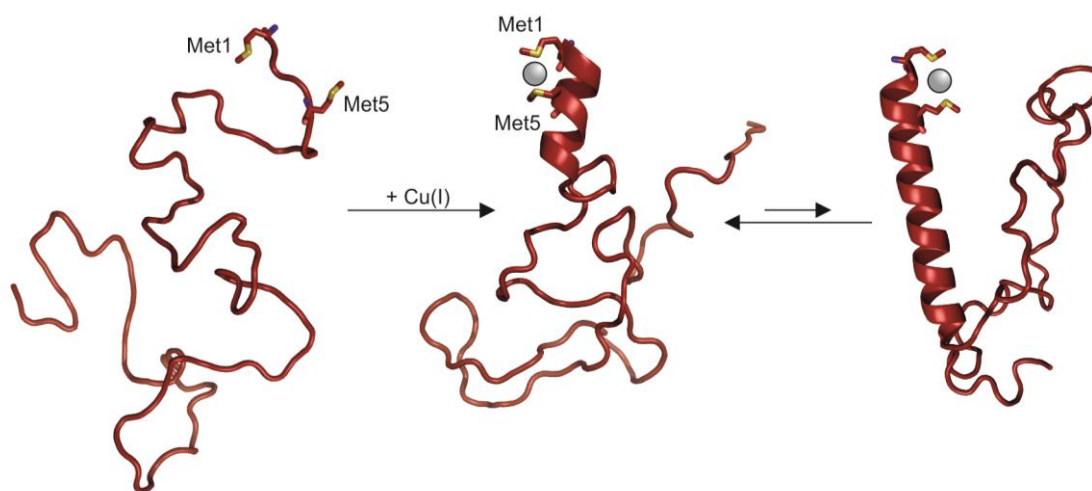


Figura 5.9. Modelo estructural propuesto del complejo acAS-Cu(I). Se muestra la transición entre un estado desordenado de acAS a un estado estructurado con una conformación helicoidal en los primeros 10 residuos de acAS tras la unión de Cu(I). Además, dicha unión favorece la presencia de una población minoritaria dinámica de conformación helicoidal en los residuos 10-25.

comprobó la persistencia de la interacción entre acAS y Cu(I) a pH 7.4 y 37°C, condiciones fisiológicas de pH y temperatura, sugiriendo que los modelos propuestos en este capítulo podrían extrapolarse al interior celular.

Los cambios descritos aquí para el proceso de interacción de un ligando pequeño como lo es el ion Cu(I) a la proteína acAS no tienen precedentes en la literatura. El aumento de helicidad observado para acAS frente a la interacción con Cu(I) puede ser racionalizado por la estabilización del macrodipolo de la hélice y la formación de puentes hidrogeno energéticamente más favorables, disparados por la remoción de la carga positiva del grupo amino terminal luego de la acetilación,^{245,246} por la presencia del acetyl-carbonilo como aceptor de puente hidrógeno y por la torsión del esqueleto proteico provocada por el acercamiento de los residuos Met1 y Met5.

Además de inducir el cambio conformacional descrito, se observó una disminución en el valor de K_{dapp} del sitio 1, pasando de un valor de $K_{dapp} = 20-24\mu\text{M}$ para AS-Cu(I) a un valor de $K_{dapp} = 12-15\mu\text{M}$ para acAS-Cu(I). Este cambio podría interpretarse sobre la base de que la afinidad de un motivo de dos residuos Met, reportados en péptidos desordenados, depende del número de residuos que separan dichos residuos, es decir la distancia entre ellos.^{194,196} Al formarse una estructura helicoidal estable en acAS-Cu(I), la distancia promedio estimada mediante modelos computacionales construidos con el programa *HyperChem*, entre los átomos S δ de Met1 y Met5 (6-7Å) es menor que aquella existente entre los mismos átomos en estructuras desplegadas (10-12Å). Este análisis sugiere que la afinidad de los motivos exclusivos de Met por Cu(I) no solo responde a la cantidad de residuos Met y a la distancia secuencial entre ellos, sino también a la distancia lineal entre los átomos S δ determinada por la estructura secundaria y la topología global de la proteína.

La inducción conformacional observada en la región N-terminal de la proteína acAS unida a Cu(I), además del impacto en la agregación amiloide, podría tener un efecto en procesos de unión a membranas, donde la ocurrencia

de elementos de estructura secundaria helicoidal tienen un rol principal.^{236,247} Del mismo modo, el motivo Met-X₃-Met de acAS recuerda a aquellos encontrados en hélices transmembranas de las proteínas transportadoras de cobre,²⁴⁸⁻²⁵⁰ lo que sumado a la propiedad de esta proteína de adoptar estructuras helicoidales en presencia de Cu(I) así como de formar estructuras multiméricas durante el proceso de agregación amiloide con capacidad de inducir poros transmembrana, podría tener implicancias relevantes fisiológicas en procesos relacionados al transporte de iones cobre.²⁵¹⁻²⁵³ En este contexto, los hallazgos descritos en este capítulo abren un abanico importante de nuevas líneas de investigación enfocadas en dilucidar el rol fisiopatológico de Cu(I) en la EP.

Capítulo 6 – Implicancias estructurales de la interacción entre la proteína beta-sinucleína y el ion Cu(I)

6.1 Introducción

Un factor importante a tener en cuenta en el contexto celular en el cual ocurre la agregación amiloide de la proteína AS es su relación con otras biomoléculas. En ese contexto, la proteína homóloga beta-sinucleína (BS), no sólo se co-localiza con AS sino que además ha sido reconocida como un agente natural que actúa regulando su potencial amiloidogénico de manera negativa, es decir, posee efectos inhibitorios y protectores sobre la amiloidogénesis y toxicidad que emerge de la agregación de la proteína AS.²⁵⁴ Los estudios *in vitro* revelan que no existe una interacción directa entre ambas proteínas que permita explicar el efecto anti-amiloide que BS ejerce sobre su homólogo. Además, la proteína BS se encuentra presente en concentraciones similares a AS en los botones sinápticos en condiciones fisiológicas,²⁰⁵ aunque por el contrario, en condiciones patológicas como lo es la EP, se observa una disminución sustancial en la concentración de BS respecto a AS.^{36,255}

Además de estas implicancias biológicas, desde el punto de vista estructural la proteína BS posee una alta homología de secuencia con AS en su región N-terminal, a la vez que carece de la región hidrofóbica NAC y, por ende, posee un potencial amiloidogénico disminuido con respecto a su homólogo AS. Más aun, la proteína carece de las interacciones terciarias transientes presentes en AS. Todas estas características han hecho que en los últimos años se desarrollen numerosos trabajos en el área biológica y química para tratar de comprender el rol protector que la proteína BS ejerce sobre la agregación amiloide de la proteína AS. En ese contexto, la interacción con distintos iones metálicos fue una de las áreas exploradas. Se observó que la proteína es capaz de unir iones Cu(II) con la misma capacidad que su homólogo

AS.¹⁴⁹ Con respecto a la interacción con el ion Cu(I) dos estudios recientes trabajando con modelos peptídicos indican que la proteína BS une Cu(I) en su región N-terminal mediante un complejo que involucraría a los residuos de Met1, Met5 y Met10.^{197,256} Uno de estos trabajos indican que la afinidad de BS por el ion Cu(I) sería mayor que la de AS, un factor que podría explicar en sí mismo y en un contexto celular patológico con desregulación homeostática de los niveles de Cu(I) el efecto inhibitorio de BS sobre la agregación amiloide de AS. Sin embargo la fuerza de interacción entre BS y Cu(I) no ha sido cuantificada, a la vez que no se ha analizado el rol que juega en esta molécula el residuo de His65, corrido en la secuencia con respecto al residuo de His50 de AS, y tampoco se han evaluado las consecuencias o impacto estructural que la formación de los complejos con Cu(I) pudiera desencadenar en la proteína. Es por ello que en este capítulo del trabajo de tesis abordamos el estudio de la interacción del ion Cu(I) con la proteína BS. Cabe destacar que dado que la proteína BS presenta, al igual que AS, la secuencia ¹MD², nuestros estudios se realizaron sobre la variante acetilada de la proteína (acBS).

6.2 Identificación de los sitios de unión a Cu(I) en la proteína acBS

La proteína BS presenta una elevada homología de secuencia con AS en el extremo N-terminal; sin embargo, en dicha región difiere tanto en el número como en la posición de residuos con capacidad para unir Cu(I), tales como los residuos de Met e His.^{254,257} La proteína BS presenta cambios puntuales respecto a AS en la región N-terminal: así, el sitio de unión a Cu(I) formado por los residuos Met1-Met5 en AS se modifica incorporando un residuo Met adicional en posición 10 en BS, estableciendo un motivo de unión a Cu(I) Met-X₃-Met-X₄-Met (Figura 6.1). Del mismo modo, el residuo de His50 en AS se relocaliza a la posición His65 de BS, a la vez que en la región C-terminal los residuos Met116 y

Met127 de AS son reemplazados por un único residuo Met112 de BS (Figura 6.1). Interesantemente, estas diferencias aparecen conservadas en todos los vertebrados y podrían, entonces, encerrar cuestiones que hacen a una diferente funcionalidad de estas moléculas.

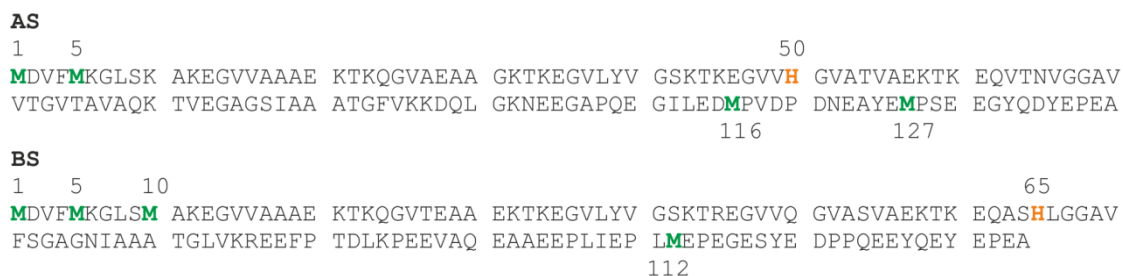


Figura 6.1. Secuencia primaria de AS y BS. Se muestran los residuos Met (verde) e His (naranja).

Previo a efectuar la caracterización estructural de los complejos BS-Cu(I) por RMN, se obtuvo una cepa transformante de *E. coli* BL21 que contiene genes para la expresión de las proteínas NatB y BS. Esta cepa permite expresar y luego purificar, con la misma metodología aplicada en AS, la proteína BS acetilada en el residuo Met1 (acBS). La proteína purificada fue analizada mediante espectroscopia de RMN, concluyéndose a partir de la evaluación de las señales de los residuos 1-6 en espectros 2D ^1H - ^{15}N HSQC que dicho segmento posee características similares a las descritas para acAS, confirmando así la efectiva acetilación del extremo amino-terminal en la proteína BS. La asignación de las señales de acBS se realizó basándose en experimentos de RMN de dos y tres dimensiones heteronucleares.^{171,258}

Para comenzar el análisis, se estudió la interacción entre acBS y Cu(I) mediante experimentos 2D ^1H - ^{15}N HSQC. Los cambios en los valores de δ de los grupos amida del esqueleto proteico fueron más pronunciados en la región que contiene a los primeros diez residuos de la secuencia, seguidos por menores perturbaciones alrededor de His65 y Met112 (Figura 6.2A-B). El perfil de $\Delta\delta$ obtenido sugiere que los residuos de unión a Cu(I) serían aquellos predichos a

partir de la secuencia primaria, es decir Met1, Met5, Met10, His65 y Met112. Mediante experimentos de 1D ^1H RMN se confirmó que en la coordinación de Cu(I) intervienen los residuos Met1, Met5, Met10, ya que las señales de los protones H_ϵ de los mismos, que monitorean directamente la unión de Cu(I), responden de manera directa al agregado del ion metálico (Figura 6.2C). El mismo análisis se realizó para los protones H_δ y H_ϵ del residuo His65, confirmando la coordinación de Cu(I) mediante el imidazol de dicho residuo.

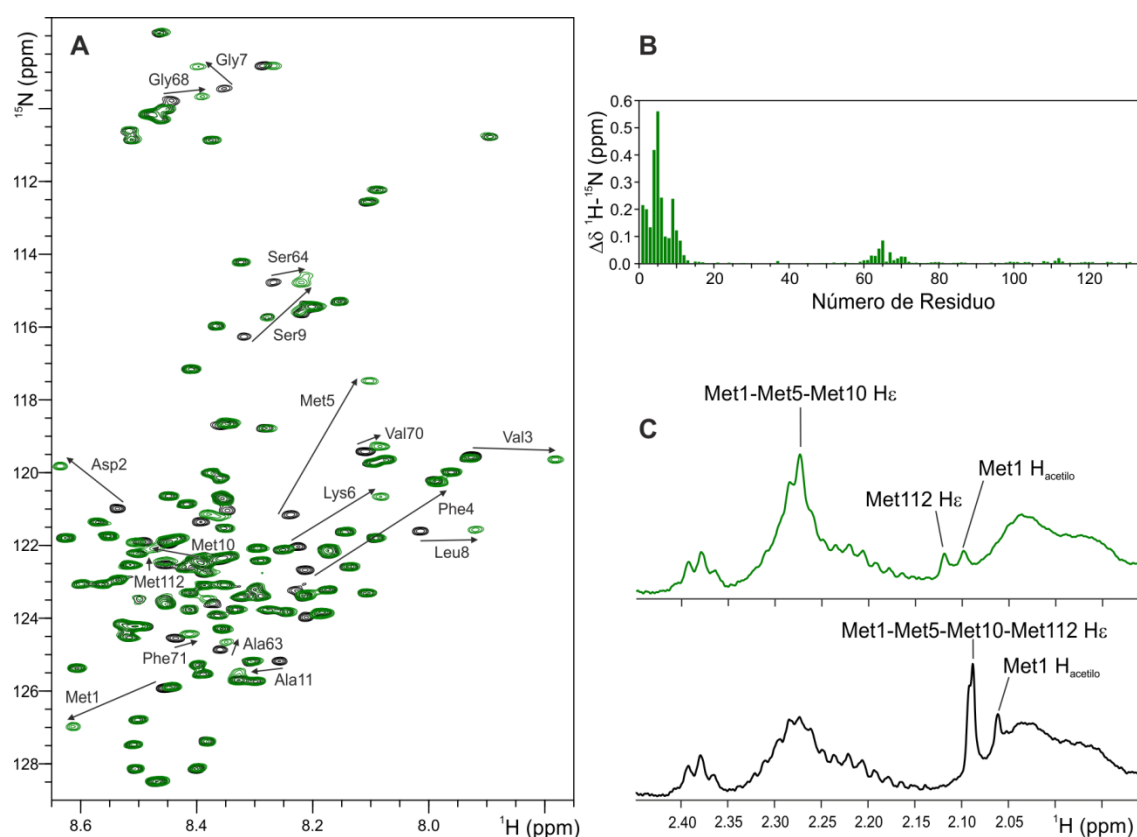


Figura 6.2. Análisis por RMN de la unión de Cu(I) a acBS. A. Espectros superpuestos ^1H - ^{15}N HSQC de ^{15}N acBS $20\mu\text{M}$ en ausencia (negro) y presencia (verde) de 10 equivalentes de Cu(I). B. Perfil de $\Delta\delta$ ^1H - ^{15}N de los grupos amida de acBS en presencia de 10 equivalentes de Cu(I). C. Espectros 1D ^1H RMN de ^{15}N acBS $20\mu\text{M}$ en ausencia (negro) y presencia (verde) de 10 equivalentes de Cu(I). Se muestra la región alifática (1.90-2.45ppm) donde se encuentran los protones H_ϵ de Met1, Met5, Met10 y Met112. Los experimentos fueron adquiridos en solución amortiguadora B, 10% D_2O y 15°C .

6.3 Estimación de los valores de K_{dapp} para los sitios de unión a Cu(I) en acBS

La afinidad y el carácter independiente de los sitios de unión a Cu(I) en acBS fueron analizados mediante experimentos de titulación con iones Cu(I) sobre muestras de acBS y sobre el péptido sintético acetilado en el extremo amino-terminal, el cual contiene los primeros 15 residuos de BS (1-15 acBS). Una titulación fina de Cu(I) sobre acBS fue realizada y monitoreada mediante experimentos 2D ^1H - ^{15}N HSQC y 1D ^1H RMN. En el caso de la proteína completa, los valores de $\Delta\delta$ de varios residuos se analizaron y se agruparon según comportamientos similares (Figura 6.3A). Se realizó un ajuste global de los experimentos de titulación con Cu(I), utilizando el programa DynaFit y considerando un modelo con tres sitios de unión, independientes y no interactivos, capaces de unir un equivalente de Cu(I) cada uno. Se obtuvo un valor de $K_{dapp1} = 2.1 \pm 0.2\mu\text{M}$ para el sitio 1 (Met1-Met5-Met10) y un valor de $K_{dapp2} = 50 \pm 15\mu\text{M}$ para el sitio 2 (His65). En las condiciones experimentales, el valor de K_{dapp3} para el sitio 3 (Met112) fue difícil de calcular de manera certera, sin embargo se pudo estimar que dicho valor no sería menor a $500\mu\text{M}$. Del mismo modo, la misma titulación se llevó a cabo sobre el péptido 1-15 acBS, obteniendo un valor de $K_{dapp} = 1.7 \pm 0.3\mu\text{M}$ para el sitio 1 (Met1-Met5-Met10, Figura 6.3B). Por un lado, estos resultados confirman la independencia de los sitios de unión de Cu(I), a la vez que son consistentes con la afinidad de motivos estructurales ricos en residuos de Met reportados para otros péptidos y proteínas de unión a Cu(I).^{194,196}

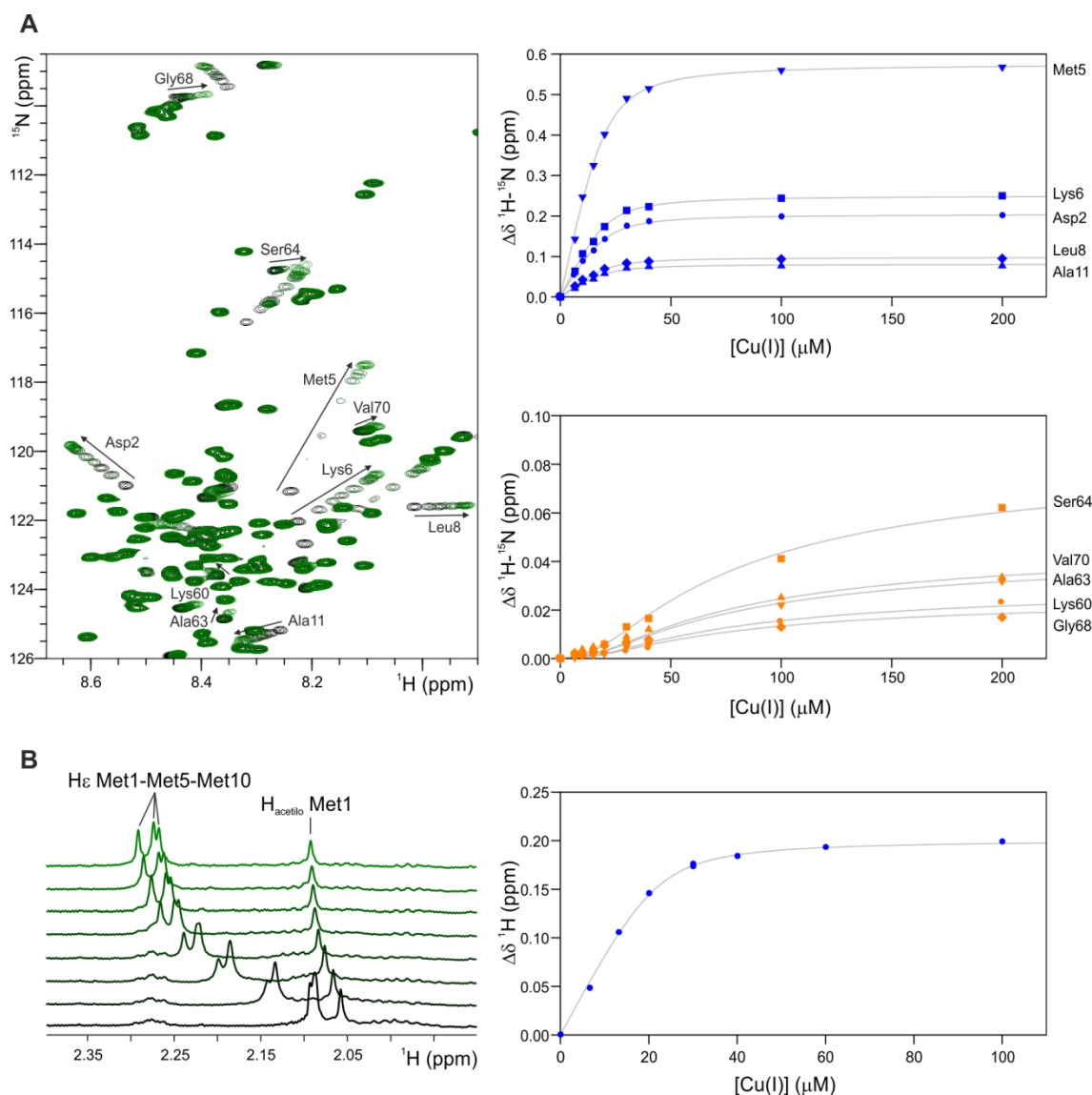


Figura 6.3 Características de afinidad de la unión de Cu(I) a acBS y 1-15 acBS. **A. Izq.** Espectros superpuestos ^1H - ^{15}N HSQC de ^{15}N acBS $20\mu\text{M}$ en presencia de concentraciones crecientes de Cu(I) (de negro a verde: 0, 0.33, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 5 y 10 equivalentes). **Der.** Curvas de unión de Cu(I) a acBS monitoreado por $\Delta\delta$ ^1H - ^{15}N de las resonancias de los grupos amida del sitio 1 (símbolos azules) y sitio 2 (símbolos naranja). **B. Izq.** Espectros 1D ^1H RMN de 1-15 acBS $20\mu\text{M}$ en presencia de concentraciones crecientes de Cu(I) (de negro a verde: 0, 0.33, 0.66, 1, 1.5, 2, 3 y 5 equivalentes). **Der.** Curvas de unión de Cu(I) a 1-15 acBS monitoreado por $\Delta\delta$ ^1H del promedio de δ de los protones H_ϵ de Met1, Met5 y Met10. Los experimentos fueron adquiridos en solución amortiguadora B, 10% D_2O y 15°C . Las curvas grises representan el ajuste a los modelos descritos en el texto.

6.4 Determinación de las propiedades estructurales de la proteína acBS en su estado unido a Cu(I)

La determinación de las propiedades estructurales de la proteína acBS unida a Cu(I) fue realizada haciendo uso de la técnica de RMN. A tales fines, tal cual lo realizado para el complejo acAS-Cu(I), se utilizaron los valores del factor ncSP, calculados a partir de los valores de δ de varios núcleos, y los valores de las constantes de acoplamiento escalar $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ como parámetros a partir de los cuales es posible obtener información acerca de la presencia de elementos de estructura secundaria en la proteína. Así, se midieron los valores de δ de H α , C α , C β y C' para acBS y acBS-Cu(I) y se analizó el cambio de propensión de estructura secundaria de acBS en presencia de Cu(I). Los valores de ncSP calculados revelaron un incremento en la propensión de estructura helicoidal de ~60% en los residuos 2-5 para la especie acBS-Cu(I) respecto de la proteína libre, un efecto opuesto en los residuos 8-12 y un efecto nulo en el resto de la secuencia (Figura 6.4A). Por otro lado, se midió también un set completo de los valores de $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ de acBS en ausencia y presencia de Cu(I). Con excepción de un descenso en los valores de $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ para los primeros residuos de acBS en presencia de Cu(I), los valores de $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ fueron prácticamente indistinguibles entre las dos formas de acBS. La disminución de $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ de los primeros cinco residuos de acBS-Cu(I) a valores de 5-6 Hz es indicativo nuevamente de la presencia de elementos estructurales helicoidales en dicho segmento, mientras que los valores de 6-8 Hz del resto de los residuos son típicos de la naturaleza intrínsecamente desordenada de la proteína (Figura 6.4B).

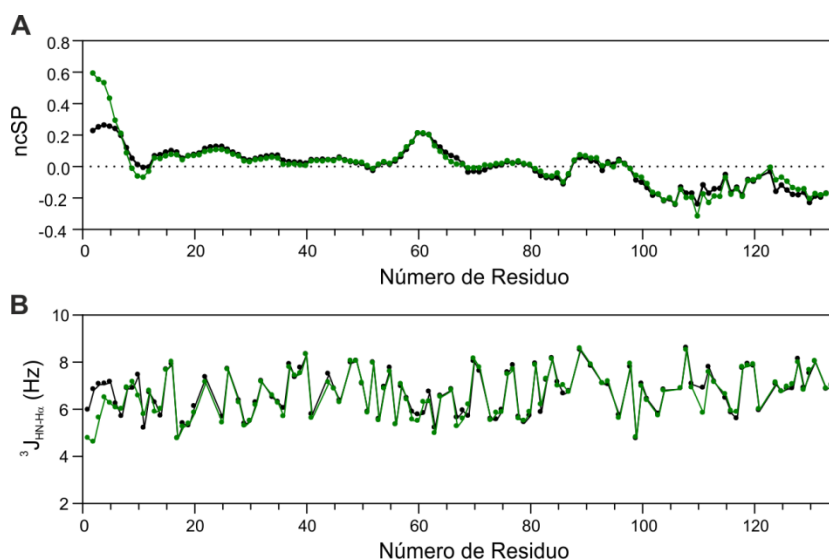


Figura 6.4. Análisis por RMN de los parámetros de estructura secundaria de acBS-Cu(I). A. Propensión de estructura secundaria corregida por vecinos (ncSP) calculada a partir de los valores de δ de $^1\text{H}\alpha$, $^{13}\text{C}\alpha$, $^{13}\text{C}\beta$, $^{13}\text{C}'$ y ^{15}N de ^{13}C - ^{15}N acBS 250 μM en ausencia (negro) y presencia (verde) de 3 equivalentes. B. Acoplamientos $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ de ^{15}N acBS 250 μM en ausencia (negro) y presencia (verde) de 3 equivalentes de Cu(I). Los experimentos fueron adquiridos en solución amortiguadora B, 10% D₂O y 15°C.

Interesantemente, al analizar el espectro de 3D HNHA utilizado para estimar los valores de $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$, se observó que los dos protones H α del residuo Gly7 en la forma unida acBS-Cu(I) presentan valores de δ diferentes, implicando la no equivalencia de dichos núcleos (Figura 6.5A). Este comportamiento es indicativo de una rigidez del esqueleto proteico, siendo dicho comportamiento frecuentemente observado en estructuras secundarias del tipo de lámina beta.²⁵⁹ Sin embargo, los parámetros de estructura secundaria previamente analizados indican que no hay presencia de elementos estructurales de lámina beta, interpretándose que la no equivalencia de dichos núcleos podría surgir de la formación de una estructura rígida que no responde a los tipos clásicos de estructura secundaria. Así, por ejemplo, los elementos del tipo “giro” promueven un quiebre de 180° del esqueleto proteico permitiendo estructuras rígidas y complejas. En nuestro escenario donde la cadena lateral del residuo de Met10 se debe acercar al Cu(I) coordinado por Met1 y Met5, la formación de un giro en localizado alrededor del residuo de Gly7 podría

resultar factible. La extensión de los giros puede variar entre 2 y 6, siendo el más frecuente el giro beta de extensión 4.²⁶⁰ La característica principal de los giros es un puente hidrógeno entre los residuos de los extremos de dicho giro.²⁶⁰ Para probar la existencia de un giro en la zona propuesta, se decidió realizar un experimento para la detección de dadores de puentes hidrógeno, el cual consta de analizar la dependencia de los valores δ de los protones amida respecto a la temperatura ($\Delta\delta\text{H}_\text{N}/\Delta\text{T}$). Aquellos residuos que presenten un factor $\Delta\delta\text{H}_\text{N}/\Delta\text{T}$ mayor a -4.5 ppb/K serían factibles de actuar como dadores de puente hidrógeno.²⁶¹ Respecto a los receptores de puente hidrógeno, los núcleos de ^{16}O no son detectables en RMN, y por ende, se necesita utilizar una estrategia alternativa analizando la dependencia de los valores de δ de los carbonilos amida respecto a la temperatura ($\Delta\delta\text{C}'/\Delta\text{T}$). Aquellos residuos que presentan $\Delta\delta\text{C}'/\Delta\text{T}$ menores que la media pueden ser identificados como receptores de

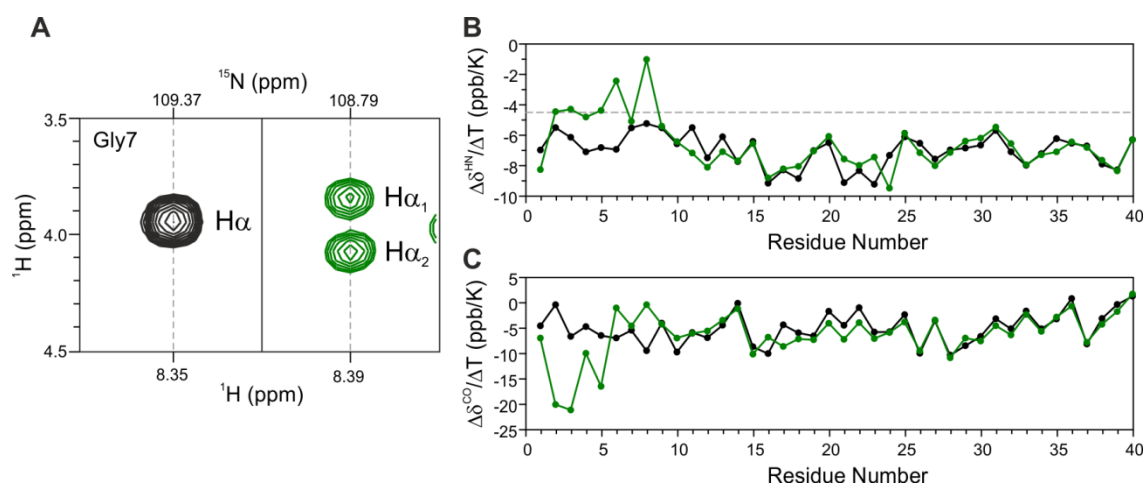


Figura 6.5. Análisis por RMN de los parámetros de estructura terciaria de acBS-Cu(I). A. Tiras del espectro ^1H - ^{15}N HNHA correspondiente a los protones $\text{H}\alpha$ de Gly7 de ^{15}N acBS $250\mu\text{M}$ en ausencia (negro) y presencia (verde) de 3 equivalentes de Cu(I). Los experimentos fueron adquiridos en solución amortiguadora B, 10% D_2O y 15°C . B. Perfil de $\Delta\delta\text{H}_\text{N}/\Delta\text{T}$ de ^{13}C - ^{15}N acBS $250\mu\text{M}$ en presencia de 3 equivalentes de Cu(I). En línea de trazo gris se marca el límite de -4.5 ppb/K. se encuadran los valores de los residuos Phe4, Met5, Lys6 y Leu8. C. Perfil de $\Delta\delta\text{C}'/\Delta\text{T}$ de ^{13}C - ^{15}N acBS $250\mu\text{M}$ en presencia de 3 equivalentes de Cu(I). Se encuadran los valores de los residuos Asp2, Val3 y Met5. Los valores de $\Delta\delta$ fueron obtenidos a partir de experimentos HNC0 adquiridos en solución amortiguadora B, 10% D_2O y a dos temperaturas diferentes (10°C y 15°C).

punto de hidrógeno.²⁶² Del análisis de $\Delta\delta_{HN}/\Delta T$ y $\Delta\delta_{C'}/\Delta T$ del complejo acBS-Cu(I) surgen como potenciales residuos involucrados en el giro tanto el residuo de Leu8 como dador de puente hidrógeno como el residuo de Met5, que actuaría como aceptor de puente hidrogeno (Figura 6.5B-C). La formación de un puente hidrógeno Met5-Leu8 (i,i+3), con la presencia de un residuo de Gly en posición i+2, es característico de los giros beta del tipo I' o del tipo II.²⁶⁰ Se interpreta, además, como potenciales dadores a los residuos Phe4, Met5 y Lys6 y como potenciales aceptores a Asp2 y Val3, residuos que están en concordancia con la formación de los puentes de hidrógeno requeridos para estabilizar una estructura helicoidal en dicho segmento.

Integrando los resultados de ncSP, $^3J_{HN-H\alpha}$ y de $\Delta\delta/\Delta T$, se propone para el complejo acBS-Cu(I) de alta afinidad un modelo estructural con una estructura helicoidal entre los residuos 1-6 y un giro beta entre los residuos 5-8, donde ambos elementos estructurales permiten el acercamiento de los átomos S δ de Met1, Met5 y Met10 para coordinar el ion Cu(I).

6.5 Propiedades dinámicas del esqueleto proteico de la especie acBS unida a Cu(I)

Las propiedades dinámicas del esqueleto proteico de acBS y acBS-Cu(I) se evaluaron mediante experimentos de relajación ^{15}N heteronuclear R_1 y R_2 de ^{15}N y 1H - ^{15}N hNOE. Al analizar las propiedades dinámicas de acBS-Cu(I) se observó un incremento de los valores de R_1 , R_2 y hNOE de los primeros diez residuos de la secuencia respecto a acBS (Figura 6.6). El aumento de los tres parámetros es indicativo de un aumento en la rigidez estructural en esa región. Se observó también un incremento de R_2 acompañado por incrementos muy bajos de hNOE alrededor del sitio 2 de unión a Cu(I), probablemente debido a la ocurrencia de un proceso con un componente mayoritario de intercambio químico (Figura 6.6).

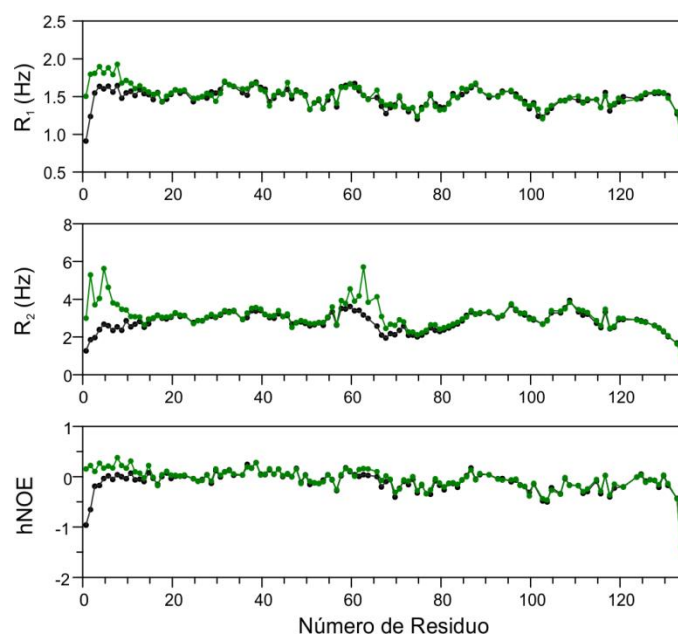


Figura 6.6. Análisis por RMN de las propiedades dinámicas de acBS-Cu(I). Perfil de R_1 , R_2 y hNOE de ^{15}N acBS $250\mu\text{M}$ en ausencia (negro) y presencia (verde) de 3 equivalentes de Cu(I). Los experimentos fueron adquiridos en solución amortiguadora B, 10% D_2O y 15°C .

De estos resultados surge que existe una diferencia notable entre acBS y acAS a nivel de los valores de R_2 inducidos por la presencia de Cu(I). Así, para el estado acBS-Cu(I) se observaron incrementos en los valores de R_2 respecto a acBS pero fundamentalmente restringidos a los primeros diez residuos (Figura 6.6). En contraposición, para acAS-Cu(I) se observó un aumento de valores de R_2 en el segmento 1-25 respecto de acAS (Figura 5.8). Este efecto es claramente debido a la formación de una hélice alfa en que se extiende y estabiliza más allá del sitio de unión a Cu(I) contenido en dicho segmento. En su conjunto, los resultados nos permiten concluir que en el caso del complejo acBS-Cu(I), la estructura de hélice alfa sería irrumpida por la ocurrencia de giro beta que actuaría acercando al residuo de Met10 a la esfera de coordinación del Cu(I). Por el contrario, la ausencia del residuo de Met10 en acAS-Cu(I) permitiría que el rearrreglo conformacional se extienda más allá del sitio de coordinación propiamente dicho.

6.6 Discusión

En este capítulo, se ha caracterizado la interacción entre Cu(I) y la proteína acBS. En condiciones normales, acBS es tan o aún más abundante que acAS en los botones sinápticos ($\sim 50\mu\text{M}$),²⁰⁵ y a pesar de la alta homología con AS (>90% en los primeros 60 residuos), BS presenta mutaciones conservadas que alteran los patrones de unión de Cu(I). Se encontró que acBS presenta tres sitios de unión a Cu(I), independientes y no interactivos. Los ligandos principales identificados fueron Met1, Met5 y Met10 para el sitio 1 ($K_{\text{dapp1}} \sim 2\mu\text{M}$), His65 para el sitio 2 ($K_{\text{dapp2}} \sim 50\mu\text{M}$) y Met112 para el sitio 3 ($K_{\text{dapp3}} > 500\mu\text{M}$). Los valores de K_{dapp} responden perfectamente a motivos de unión de Cu(I), de tres residuos de Met para el sitio 1, de un residuo de His para el sitio 2 y de un residuo de Met para el sitio 3.^{194,196} Finalmente, el hecho de que la afinidad por Cu(I) del sitio 1 de acBS es aproximadamente un orden de magnitud mayor que el de acAS, nos permite especular que acBS podría competir eficientemente y secuestrar iones Cu(I) que de otra manera estarían disponibles para formar complejos con acAS. Un estudio reciente de competencia indirecta y directa por iones Cu(I) entre péptidos sintéticos de AS y BS conteniendo el sitio 1 de unión al ion metálico confirma esta hipótesis.²⁵⁶ En cerebros saludables, donde ambas proteínas co-localizan y los niveles de acBS son elevados,²⁰⁵ la formación de los complejos acAS-Cu(I), y por ende, la aceleración de la agregación amiloide inducida por Cu(I), se verían impedidas, mientras que en cerebros afectados o enfermos, podría darse una situación inversa.²⁶³ En este contexto, fue reportado que el factor de transcripción sensible a metales (MTF-1) regula eficientemente la expresión de BS pero no la de AS,²⁶⁴ sugiriendo que BS podría actuar como un elemento de respuesta a cobre. Integrando los resultados y evidencias, se puede sugerir que BS podría cumplir un rol adicional de protección bajo condiciones normales de fluctuación en los niveles de cobre, aunque dicha capacidad se

vería sobrepasada en condiciones de pérdida de la homeostasis de metales relacionada con los inicios de la EP.

Por otro lado, las consecuencias estructurales de la unión de Cu(I) a acBS son claramente diferentes a las observadas para acAS. En el caso de acBS-Cu(I), el establecimiento de una estructura helicoidal en los primeros residuos de la secuencia se ve interrumpido abruptamente luego del residuo Lys6 (Figura 6.7). Nuestra interpretación, soportada por los valores de $ncSP$, $^3J_{HN-H\alpha}$, $HNHA$, $\Delta\delta/\Delta T$ y parámetros de relajación de ^{15}N R_1 , R_2 y $hNOE$, es que este resultado es consecuencia de la formación de una estructura de giro beta alrededor del residuo de Gly7 que tiene lugar para promover la coordinación de Cu(I) por parte del residuo de Met10. La estabilización de una estructura hélice-giro en los primeros 10 residuos de acBS, sin alterar las propiedades dinámicas y estructurales del resto de la proteína, difiere sustancialmente de los cambios conformacionales observados en el complejo acAS-Cu(I), lo cual podría traer aparejado implicancias tanto fisiológicas como patológicas. De hecho, estas conformaciones contrastantes a nivel de la región N-terminal podrían tener un impacto en procesos de unión a membranas, agregación amiloide, e interacción con otros elementos celulares.

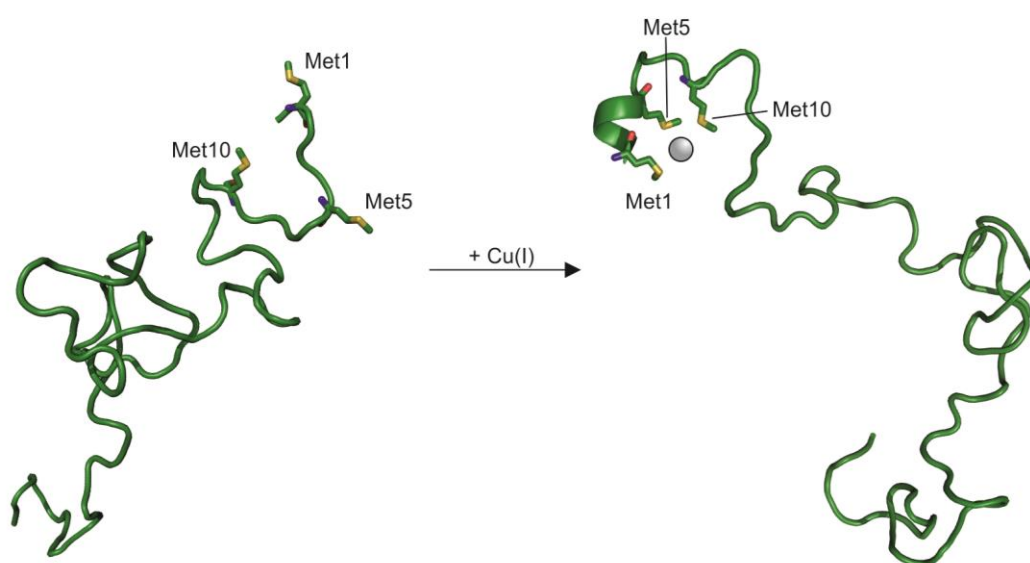


Figura 6.7. Modelo estructural propuesto del complejo acBS-Cu(I).

Conclusiones

En el presente trabajo de tesis doctoral se caracterizó la interacción entre la proteína AS y el ion Cu(I), evaluándose las propiedades estructurales y de afinidad de los complejos formados, su eficacia para inducir daño oxidativo en la proteína, así como sus implicancias en términos conformacionales y sobre la amiloidogénesis de la proteína. Además, se analizó también en términos comparativos, y con un enfoque más bien estructural, la interacción entre dicho ion metálico y la proteína BS, homóloga de AS. La herramienta fundamental de análisis utilizada a tales fines fue la espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear. En los distintos capítulos se presentaron y discutieron los resultados obtenidos, de cuyo análisis se derivan las conclusiones que se expresan a continuación:

- La proteína AS posee tres sitios de unión de Cu(I) independientes y no interactivos, que involucran a los residuos Met1/Met5 en el sitio 1 (K_{dapp} 20 μ M), His50 en el sitio 2 (K_{dapp} 50 μ M) y Met1116/Met127 en el sitio 3 (K_{dapp} 300 μ M).
- La oxidación catalizada por cobre afecta específicamente al residuo de Met1 y la sola oxidación de dicho residuo es suficiente para disminuir drásticamente la capacidad amiloidogénica de la proteína AS.
- La acetilación post-traducciona de AS favorece la formación de una estructura helicoidal, de naturaleza extremadamente transiente, restringida a los primeros cinco residuos de la secuencia, circunstancia que cambia notablemente en presencia de Cu(I), donde la unión del ion metálico al sitio de alta afinidad induce un cambio conformacional

sustancial que estabiliza dicha estructura helicoidal y la extiende a los primeros 15-20 residuos de la secuencia de la proteína.

- La interacción con el ión Cu(I) acelera dramáticamente la agregación amiloide de la proteína acAS.
- La proteína acBS, homóloga de acAS, posee tres sitios de unión a Cu(I) en su secuencia, siendo el sitio 1 de mayor afinidad que el descrito para acAS. Tal circunstancia se debe a la presencia de un residuo adicional de Met en la posición 10 de la secuencia de acBS.
- Los cambios conformacionales y en las propiedades dinámicas del esqueleto proteico de acAS inducidos por su interacción con Cu(I) no se observan en la variante homóloga acBS, donde la mayor afinidad de interacción con el ion Cu(I) y el involucramiento del residuo de Met10 jugarían un papel clave como factor desestabilizante para la ocurrencia de cambios en las propiedades estructurales y dinámicas en esta proteína.

Resumen

El plegamiento anormal de distintas proteínas en una conformación tóxica está propuesto como el componente principal de las bases moleculares de una serie de trastornos neurodegenerativos como la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson (EP).²⁶⁵ Una característica común y definitoria de dichas enfermedades es la formación y el depósito de agregados proteicos de diversas morfologías, incluyendo fibras amiloides.³ La neurodegeneración en la EP se caracteriza por la pérdida progresiva de las neuronas dopaminérgicas en la *substantia nigra*, y por la presencia de agregados fibrilares amiloides citoplasmáticos, conocidos como cuerpos de Lewy, cuyo componente principal es la proteína alfa-sinucleína (AS).^{16,266,267} La proteína AS está compuesta por 140 aminoácidos distribuidos en tres regiones claramente distinguibles: la región N-terminal anfipática, la región NAC hidrofóbica y la región C-terminal rica en residuos Pro, Glu y Asp.²⁶⁸⁻²⁷³ En su forma monomérica, estado intrínsecamente desordenado, la proteína se describe mejor como un conjunto de conformaciones estructuralmente heterogéneas, sin estructura secundaria persistente y con interacciones de largo alcance entre residuos que se han demostrado importantes para estabilizar conformaciones resistentes a la agregación amiloide.^{31,274-276} Estos contactos intramoleculares en AS se establecen principalmente entre las regiones N-terminal y C-terminal (interacciones electrostáticas) y entre las regiones NAC y C-terminal (interacciones hidrofóbicas).^{31,274,275}

Aunque no está claro cómo AS puede iniciar la muerte neuronal, lo cierto es que la agregación amiloide de AS es fundamental para los efectos patológicos asociados con la EP.²⁷⁷ En este sentido, las interacciones entre AS e iones metálicos desempeñan un papel importante en la aceleración de la agregación amiloide y podrían representar el vínculo entre los procesos patológicos de agregación, daño oxidativo y muerte de células neuronales.^{69,148,278-280} De hecho,

la relación entre la afinidad de AS por los iones metálicos y la eficacia en la que estos aceleran la fibrilación de AS reveló la existencia de una jerarquía de interacciones proteína-iones metálicos que refleja tanto los efectos biológicos como estructurales. Concretamente, la especificidad de unión de cobre a AS indica que el mecanismo a través del cual el cobre impacta sobre la agregación difiere significativamente de la ejercida por otros iones metálicos divalentes.^{152,153,281-283} Es por esto que la química de coordinación de cobre a AS ha merecido tanta atención en los últimos años.

La mayoría de los estudios sobre la interacción de cobre con AS se ha dirigido a elucidar el entorno de coordinación de Cu(II), y aunque algunos estudios se han centrado en las reacciones de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) catalizadas por cobre, la información relacionada a la estructura, afinidad y reactividad de los complejos proteína-Cu(I) es escasa. La existencia de una química asociada Cu(I)/dioxígeno y la descripción de las características de unión de Cu(I) a AS se ha informado sólo recientemente.^{160,161} Además, datos de voltametría cíclica demostraron que complejos AS-Cu(I) pueden someterse a re-oxidación con generación de H₂O₂ y otros ROS que son tóxicos para las células dopaminérgicas.¹⁵⁶ Por lo tanto, la elucidación de la base residuo-específico en la coordinación de Cu(I) por AS es central para establecer una conexión entre las características estructurales del complejo AS-Cu(I) y la base mecánica detrás de los procesos de daño oxidativo y el aceleramiento del ensamblaje amiloide mediado por cobre. Para hacer frente a tal cuestión irresoluta de la química bioinorgánica de la EP, se presenta en este trabajo de tesis doctoral una caracterización estructural detallada de los eventos de oxidación catalizados por cobre, y de la coordinación de Cu(I) por AS, con la asistencia de la técnica espectroscópica de RMN en combinación con proteínas mutantes y péptidos sintéticos modelos.

En una primera instancia, se determinó que los residuos Met1 y Met5 constituyen determinantes estructurales claves para la unión de Cu(I) a la

región N-terminal de AS y que los mismos mostraron una alta susceptibilidad a la oxidación catalizada por cobre en presencia de oxígeno. Las contribuciones individuales de los residuos Met de la región N-terminal al daño oxidativo y a la unión de Cu(I) se investigaron profundamente. Se demostró que la unión del ión Cu(I) a la proteína AS era capaz de catalizar, en presencia de ácido ascórbico y oxígeno, la oxidación específica del residuo Met1, mientras que los residuos Met de la región C-terminal permanecieron inalterados. Incluso, la proteína AS con el residuo Met1 oxidado presentó un potencial amiloidogénico disminuido. En consecuencia, la cinética de oxidación de Met1 se estudió en detalle y se propusieron las bases químicas de la reacción sitio-específica de oxidación catalizada por cobre.

En una segunda instancia, se realizó una deconvolución de las características estructurales y de coordinación de Cu(I) de la proteína AS, motivado por reportes bibliográficos controversiales que utilizaron Ag(I) como modelo iónico de Cu(I).¹⁹² A través de un análisis espectroscópico de RMN detallado, utilizando proteínas mutantes y péptidos sintéticos, se determinó que la unión de Cu(I) a la proteína AS se describe perfectamente como tres sitios de unión independientes y no interactivos. En el sitio 1, los dos átomos S δ de Met1 y Met5 se encontraron involucrados en la unión de Cu(I), al igual que lo que sucede en el sitio 3, con los átomos S δ de Met116 y Met127. En el sitio 2, sería el anillo imidazólico de His50 quien tiene el rol de la unión de Cu(I). De manera complementaria, se determinaron los valores de las constantes de disociación aparente (K_{dapp}) de AS-Cu(I), siendo 20 μ M para el sitio 1, 50 μ M para el sitio 2 y 300 μ M para el sitio 3. Respecto a la arquitectura del sitio 1, la presencia de ambos residuos Met1 y Met5 fue absolutamente necesaria para conservar la unión de alta afinidad de Cu(I) a la proteína, ya que la ausencia de uno de los residuos Met dio lugar a una disminución significativa en los valores de K_{dapp} . El valor de K_{dapp} del sitio 1 es consistente con la información reportada para sitios de unión a Cu(I) del tipo Met-X₃-Met encontrados en otras proteínas (K_{dapp}

15-45 μ M). Además, nuestros resultados exhaustivos obtenidos con Cu(I) corrigieron las discrepancias existentes sobre el escenario planteado para la interacción AS-Cu(I), que había sido sugerida por otros autores del campo a partir de la interacción AS-Ag(I).

Finalmente, nuevas evidencias demostraron que AS ocurre fisiológicamente en su forma acetilada en el extremo amino-terminal (acAS).^{232,284,285} Estudios estructurales mostraron que la modificación post-traduccional de acetilación del grupo α -NH₂ de Met1 de AS anula la capacidad de unión de Cu(II) en este sitio pero no se ha reportado su efecto sobre la interacción con Cu(I).¹⁷² Por otro lado, el homólogo más cercano de AS, beta-sinucleína (BS), presenta el mismo motivo de acetilación y localización subcelular que AS.²⁰⁵ Se ha reportado numerosas veces que BS presentaría propiedades anti-amiloidogénicas y actuaría como un regulador negativo natural de AS, no obstante las bases moleculares de dicho efecto protector se desconocen.^{37,286} Aunque BS presenta un nivel de homología del 90% en la región N-terminal, la presencia de un residuo Met adicional en posición 10 podría alterar el patrón de interacción con Cu(I). Por lo tanto, se decidió investigar las características de unión de Cu(I) a las proteínas acAS y acBS, utilizando técnicas de RMN de alta resolución y péptidos sintéticos modelos. Se encontró que la acetilación no tiene efecto sobre las propiedades de unión a Cu(I) de ninguno de los sitios de coordinación de AS. Sin embargo, mediante experimentos heteronucleares de RMN que permiten obtener información de la conformación general y la dinámica del esqueleto proteico, se determinó que la unión de Cu(I) a la región N-terminal de acAS induce una estructura secundaria del tipo hélice-alfa estable con propiedades de dinámica restringida en los primeros 10 residuos. Por otro lado, se encontró que la proteína acBS posee tres sitios de unión de Cu(I), que involucran los residuos Met1, Met5 y Met10 en el sitio 1 ($K_{dapp} \sim 2\mu$ M), His65 en el sitio 2 ($K_{dapp} \sim 50\mu$ M) y Met112 en el sitio 3 ($K_{dapp} > 500\mu$ M). Además, se encontró que a diferencia de acAS-Cu(I), acBS adopta

una estructura helicoidal en los primeros 5 residuos, la cual se ve abruptamente interrumpida por una estructura de giro-beta alrededor del residuo Gly7 que permite el acercamiento de Met10 y la coordinación de Cu(I) por parte del mismo. La diferencia encontrada en afinidad y estructura terciaria inducida por Cu(I) entre acAS y acBS podría ser el puntapié inicial para la comprensión del rol fisiopatológico de acAS y del rol protector de acBS.

En conclusión, la información de alta resolución a nivel estructural y molecular que emerge de este trabajo de tesis constituye un paso clave para la comprensión de la base química detrás de la agregación de AS mediada por cobre en la EP. Los resultados presentados establecen una fuerte correlación entre el daño oxidativo, la agregación amiloide y la coordinación de Cu(I), y a la vez constituyen un paso importante hacia la elucidación de las bases mecánicas y estructurales de la influencia del ión Cu(I) en la etiología de la EP. Del mismo modo, los resultados estructurales de los complejos acAS-Cu(I) y acBS-Cu(I) resultan relevantes en la hora fortalecer la base de conocimiento para favorecer la interpretación biológica en la química bioinorgánica de AS y de iniciar investigaciones para elucidar el rol fisiológico y/o patológico que tiene la inducción de estructura secundaria-terciaria por parte de Cu(I).

Anexo único

Medición directa de los valores de ${}^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ a través de experimentos TROSY-HSQC.

En biología estructural de proteínas, las constantes de acoplamiento escalar a 3 enlaces H_N - $\text{H}\alpha$ (${}^3J_{\text{HN-H}\alpha}$) están íntimamente relacionadas a los ángulos diedros H_N - $\text{H}\alpha$ y son, por ende, una fuente de información importante de estructura secundaria.²⁴⁰ Además, son utilizados para mejorar la convergencia y precisión de los cálculos de estructura, en particular para los fragmentos helicoidales.

El experimento 3D HNHA fue diseñado en 1993 para determinar con precisión los ${}^3J_{\text{HN-H}\alpha}$.¹⁸⁴ En este experimento tridimensional (${}^1\text{H}$ - ${}^1\text{HN}$ - ${}^{15}\text{N}$), las señales observadas son las correlaciones de los núcleos ${}^1\text{HN}$ - ${}^1\text{HN}$ - ${}^{15}\text{N}$ (picos de la diagonal) y de los núcleos ${}^1\text{H}\alpha$ - ${}^1\text{HN}$ - ${}^{15}\text{N}$ (picos cruzados). El ${}^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ es determinado a partir de la relación entre las intensidades de los picos de la diagonal (I_{HN}) y los picos cruzados ($I_{\text{H}\alpha}$) fácilmente cuantificables. La transferencia de la magnetización es del tipo HMQC involucrando coherencias cuánticas cero y doble, esto significa que las señales no se ven moduladas por los acoplamientos a un enlace HN - N . La evolución de ${}^{15}\text{N}$ ocurre en un modo “tiempo constante” y es incorporada en los periodos donde la magnetización es transferida desde el HN al $\text{H}\alpha$. Por ende, esta transferencia de magnetización es proporcional al periodo de transferencia (2ε) y a la magnitud del acoplamiento escalar HN - $\text{H}\alpha$. Finalmente, previo a la incorporación de un factor empírico que corrige los efectos de la relajación diferencial ($f=1.11$), la constante de acoplamiento se calcula con la siguiente ecuación:

$${}^3J_{\text{HN-H}\alpha} = \frac{f \times \tan^{-1} \sqrt{-I_{\text{H}\alpha}/I_{\text{HN}}}}{2\varepsilon\pi}$$

Las principales limitaciones del experimento HNHA son:

- En la práctica, adquirir un experimento tridimensional requiere de muestras de proteínas relativamente concentradas y largos tiempos de adquisición. Muchas veces se decide sacrificar resolución espectral en pos de disminuir los tiempos de adquisición y no perder relación señal/ruido.
- La resolución máxima en la dimensión ^{15}N está limitada por la secuencia de pulsos. Al ser un experimento “tiempo constante” posee una limitación intrínseca respecto a la resolución en dicha dimensión, que suele ser menor a la óptima para proteínas con poca dispersión como es el caso de las proteínas intrínsecamente desordenadas (IDPs).
- La medida de la intensidad de la señal puede introducir desviaciones debido a que depende de la calidad del espectro. Por ende, el tratamiento matemático que se le aplica a los datos puede provocar una propagación acrecentada de los errores de medición en el valor de las constantes de acoplamiento escalar.

Se han desarrollado varias metodologías alternativas para una mejor medición de dichas constantes, pero ninguna sin el éxito y divulgación que ha tenido el experimento HNHA original. Una de estas alternativas, basadas en el principio básico de que el acoplamiento escalar provoca la multiplicidad de las señales observadas, es la medición directa de la distancia entre componentes del doblete de las señales H_N .²⁸⁷ Sin embargo, esta metodología fue utilizada solo para péptidos pequeños pues se torna complicada para péptidos más grandes y proteínas debido al pequeño valor de la constante respecto al ancho de línea de los H_N y a la creciente superposición de señales. En esta sección, basados en el mismo principio, se puso a punto la medición directa de $^3\text{J}_{\text{H}_\text{N}-\text{H}_\alpha}$ mediante el experimento 2D TROSY-HSQC. El experimento TROSY-HSQC fue diseñado para seleccionar los componentes de magnetización para los cuales los diferentes mecanismos de relajación se ven prácticamente cancelados,

brindando señales espectrales angostas, y por ende, aumentando la resolución espectral.²⁸⁸ Este tipo de experimento 2D permite obtener la máxima resolución posible, solo limitado por la relajación intrínseca de los núcleos. En IDPs, evitar la pérdida de resolución por mecanismos de relajación, es suficiente para lograr una medición certera de los valores de $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ de manera directa. La aplicación se evaluó sobre acAS, proteína IDP de 14kDa, y permite que este método rápido y confiable pueda ser utilizado en todo tipo de IDP.

Como primer paso se optimizaron los parámetros de adquisición para obtener la mayor resolución y calidad espectral de ambos experimentos HNHA y TROSY-HSQC (Tabla A.1). Se observó una notoria diferencia en los tiempos de adquisición, mientras que el experimento HNHA requiere de 36h, el experimento TROSY-HSQC requiere menos de 1h. A continuación, se realizó una comparación de la resolución final de la proyección $^1\text{HN-}^{15}\text{N}$ del experimento HNHA y el experimento TROSY-HSQC (Figura A.1). Aunque la proyección no representa la totalidad de las señales en el experimento 3D, es un fiel reflejo de la resolución de las señales. La resolución de la proyección $^1\text{HN-}^{15}\text{N}$ del HNHA da idea de la resolución del experimento 3D en la región de la diagonal, debido a que la ganancia de resolución en la tercer dimensión del espectro 3D es despreciable ya que no aumenta la resolución en la dimensión ^{15}N sino en ^1H . Es decir, que aquellas señales superpuestas en la dimensión ^{15}N de la proyección, estarán igualmente resueltas que en el espectro 3D. Se contrastaron las regiones con mayor superposición de señales en acAS, donde

Tabla A.1 Parámetros óptimos para obtener la mayor resolución de los experimentos HNHA y TROSY-HSQC.

Parámetro	3D HNHA	2D TROSY-HSQC
Puntos complejos	1024 (^1H), 120 (^{15}N), 120 (^1H)	2560 (^1H), 512 (^{15}N)
Ancho espectral (ppm)	16 (^1H), 26 (^{15}N), 10 (^1H)	7.75 (^1H), 22 (^{15}N)
Número de escanes	8	4
Tiempo de adquisición	36 horas	59 minutos

en el caso del HNHA, las señales superpuestas fueron imposibles de resolver y de cuantificar efectivamente, mientras que en el caso del TROSY-HSQC, el 100% de las señales se lograron resolver, y la medición directa del acoplamiento fue factible en la mayoría de las mismas (Figura A.1). Las constantes de acoplamiento se midieron como la distancia en Hz entre los picos del doblete correspondiente a la correlación $^1\text{H}_\text{N}$ - ^{15}N de cada residuo. En el caso de los

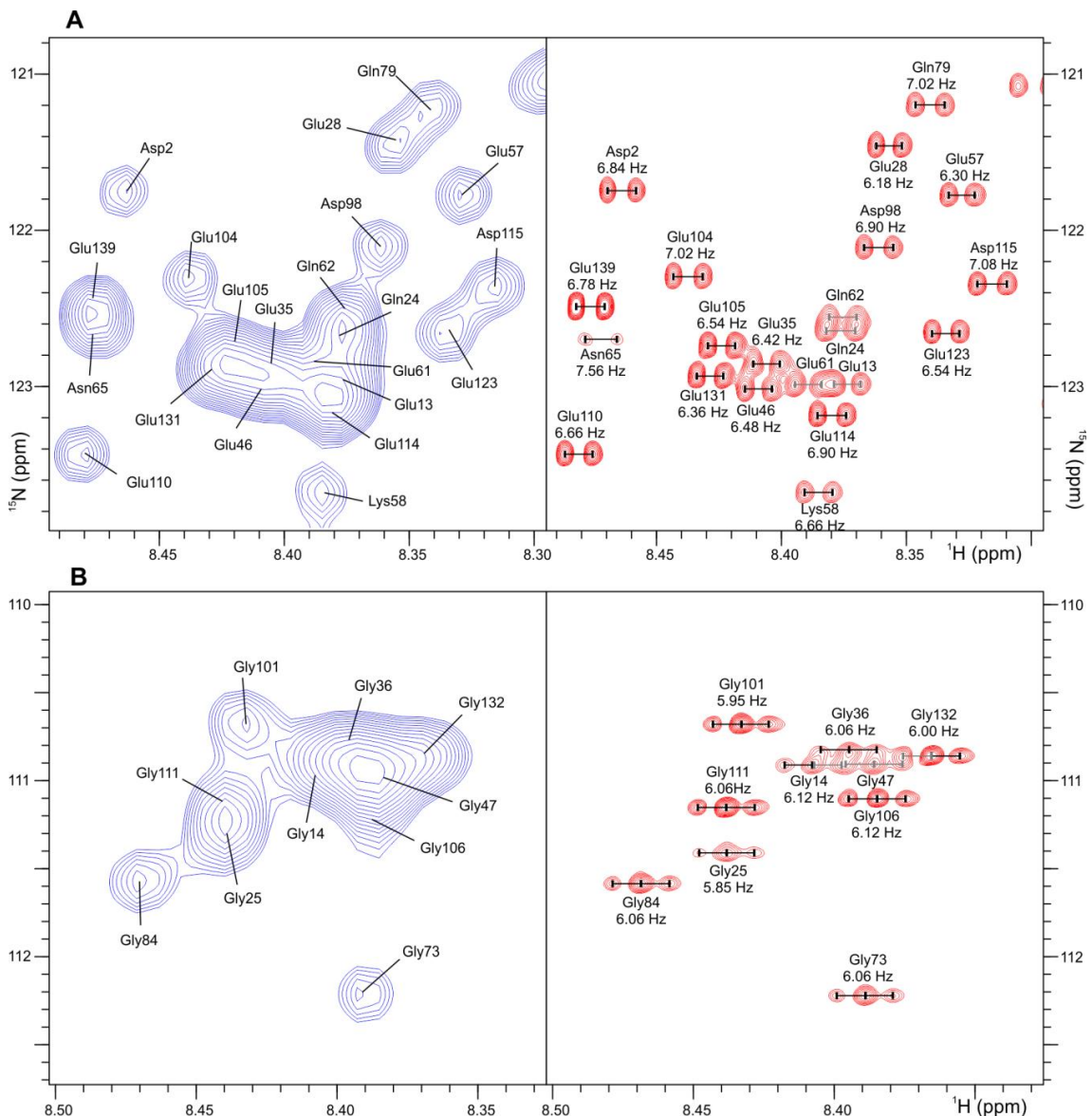


Figura A.1. Comparación de la resolución espectral entre los experimentos HNHA y TROSY-HSQC. A-B. Se muestra la región espectral en torno a los residuos de glutamato y glicina, respectivamente, correspondiente a la proyección $^1\text{H}_\text{N}$ - ^{15}N del experimento HNHA (azul) y del experimento TROSY-HSQC (rojo). Los experimentos fueron adquiridos con muestras ^{15}N acAS 200 μM , en solución A, 15 $^\circ\text{C}$.

residuos de Gly, la presencia de dos H α , provoca que la señal sea un triplete, y en este caso la constante de acoplamiento se puede medir como la distancia en Hz entre un pico exterior y el pico central o como la mitad de la distancia en Hz entre los dos picos exteriores.

En el caso de acAS, un 80% de los valores $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ se pudieron obtener con cierta seguridad con el método HNHA, mientras que ese valor se elevó a cerca de 95% con el método TROSY (Figura A.2A). Se pudo observar la similitud de los valores de $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ obtenidos por ambos métodos, sin embargo, para verificar la equivalencia del método TROSY respecto al método HNHA, se enfrentaron y graficaron los valores de acoplamiento medidos por el método TROSY ($^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ TROSY) en función de los valores de acoplamiento medidos por el método HNHA ($^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ HNHA) para cada residuo (Figura A.2B-C). La equivalencia de los métodos se confirmó matemáticamente utilizando el programa GraphPad,

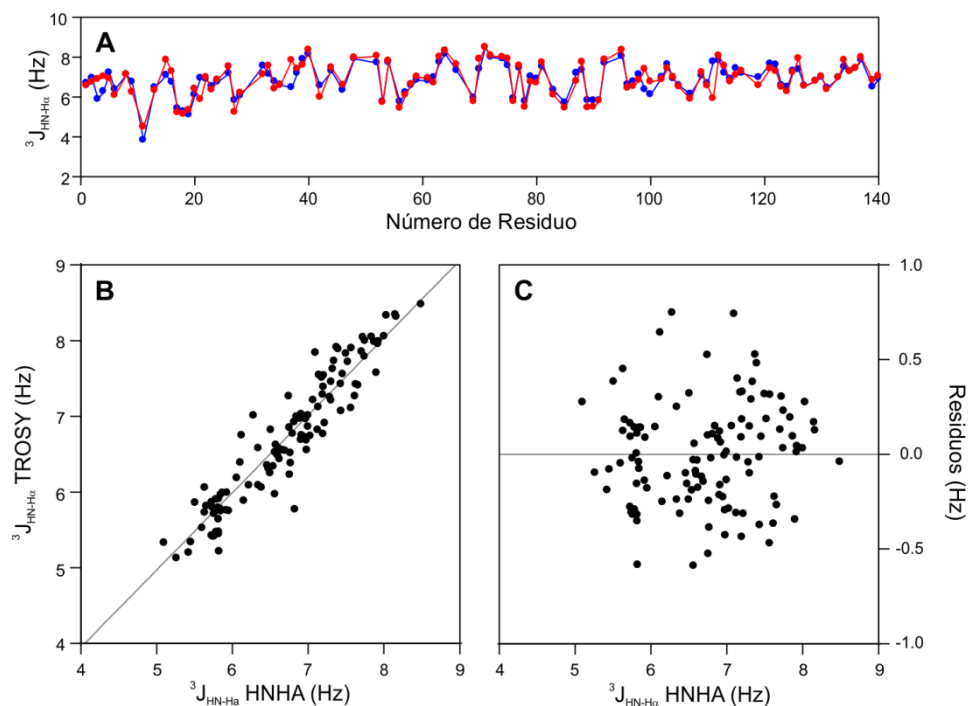


Figura A.2. Test de equivalencia del método TROSY. A. Valores de $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ de acAS obtenidos a través del método HNHA (azul) y método TROSY (rojo). B. Regresión lineal de los valores de $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ TROSY (Y) en función de $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ HNHA (X): $Y = a + b.X$. Resultados de la regresión: $a = -0.141 \pm 0.229$, $b = 1.02 \pm 0.0339$, $R^2 = 0.887$. No se desvía significativamente de la linealidad ($p = 0.577$). Utilizando el test-F, no se rechaza la hipótesis nula $a=0$, $b=1$ ($p = 0.776$). C. Dispersión homogénea de los residuos de la regresión lineal.

ya que la regresión lineal de los datos ingresados no difirió significativamente de una función identidad ($p = 0.776$).

Finalmente, se realizó una comparación interna para probar la robustez de cada método con dos muestras diferentes. Ambos métodos brindaron resultados reproducibles, indispensable para cualquier tipo de método, sin embargo la dispersión de los datos es significativamente menor en el método TROSY ($p = 0.009$), indicando que este método es más preciso que el método HNHA (Figura A.3).

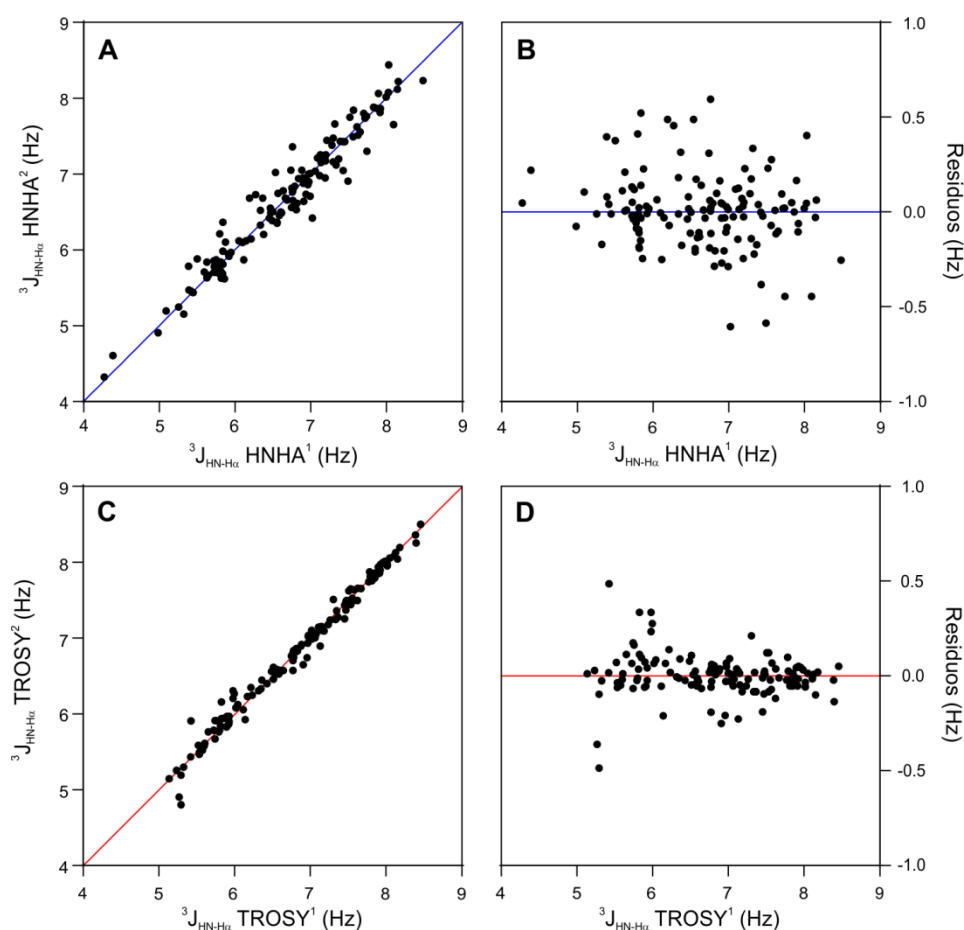


Figura A.3. Test de precisión del método TROSY. A. Valores de $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ HNHA de dos réplicas (negro) y función identidad (azul). B. Residuos respecto a la función identidad. La desviación estándar de los residuos es $SD = 0.197$. C. Valores de $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ TROSY de dos réplicas (negro) y función identidad (rojo). D. Residuos respecto a la función identidad. La desviación estándar de los residuos es $SD = 0.113$.

Se demostró así que utilizar el experimento TROSY-HSQC para la medición directa de $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ en IDPs, es equivalente a utilizar el experimento clásico HNHA. Además, el método TROSY presentó varias ventajas por sobre el HNHA:

- mayor resolución en la dimensión ^{15}N y por ende mayor número de residuos evaluados,
- mayor precisión en las mediciones,
- menor posibilidad de error matemático ya que no se utiliza una ecuación compleja ni parámetros empíricos,
- posibilidad de utilizar menor cantidad de muestra,
- menor tiempo de adquisición, en el orden de minutos.

Referencias

- (1) Sipe, J. D.; Benson, M. D.; Buxbaum, J. N.; Ikeda, S.; Merlini, G.; Saraiva, M. J. M.; Westermark, P.; Westermark. *Amyloid: Int. J. Exp. Clin. Investig.: Off. J. Int. Soc. Amyloidosis* **2012**, *19*, 167–170.
- (2) Lansbury, P. T.; Lashuel, H. A. *Nature* **2006**, *443*, 774–779.
- (3) Chiti, F.; Dobson, C. M. *Annu. Rev. Biochem.* **2006**, *75*, 333–366.
- (4) Nelson, R.; Sawaya, M. R.; Balbirnie, M.; Madsen, A. Ø.; Riek, C.; Grothe, R.; Eisenberg, D. *Nature* **2005**, *435*, 773–778.
- (5) Sawaya, M. R.; Sambashivan, S.; Nelson, R.; Ivanova, M. I.; Sievers, S. A.; Apostol, M. I.; Thompson, M. J.; Balbirnie, M.; Wiltzius, J. J. W.; McFarlane, H. T.; Madsen, A. Ø.; Riek, C.; Eisenberg, D. *Nature* **2007**, *447*, 453–457.
- (6) Cohen, S. I. A.; Linse, S.; Luheshi, L. M.; Hellstrand, E.; White, D. A.; Rajah, L.; Otzen, D. E.; Vendruscolo, M.; Dobson, C. M.; Knowles, T. P. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. United States Am.* **2013**, *110*, 9758–9763.
- (7) Shankar, G. M.; Li, S.; Mehta, T. H.; Garcia-Munoz, A.; Shepardson, N. E.; Smith, I.; Brett, F. M.; Farrell, M. A.; Rowan, M. J.; Lemere, C. A.; Regan, C. M.; Walsh, D. M.; Sabatini, B. L.; Selkoe, D. J. *Nat. Med.* **2008**, *14*, 837–842.
- (8) Jan, A.; Adolfsson, O.; Allaman, I.; Buccarello, A.-L.; Magistretti, P. J.; Pfeifer, A.; Muhs, A.; Lashuel, H. A. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 8585–8596.
- (9) Garcia, G. A.; Cohen, S. I. A.; Dobson, C. M.; Knowles, T. P. J. *Phys. Rev. Stat. nonlinear, soft Matter Phys.* **2014**, *89*.
- (10) Arosio, P.; Knowles, T. P. J.; Linse, S. *Phys. Chem. Chem. Phys.: PCCP* **2015**, *17*, 7606–7618.
- (11) Ferrone, F. *Methods Enzymol.* **1999**, *309*, 256–274.
- (12) Cohen, S. I. A.; Vendruscolo, M.; Dobson, C. M.; Knowles, T. P. J. *J. Mol. Biol.* **2012**, *421*, 160–171.
- (13) Buell, A. K.; Galvagnion, C.; Gaspar, R.; Sparr, E.; Vendruscolo, M.; Knowles, T. P. J.; Linse, S.; Dobson, C. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. United States Am.* **2014**, *111*, 7671–7676.
- (14) Ueda, K.; Fukushima, H.; Masliah, E.; Xia, Y.; Iwai, A.; Yoshimoto, M.; Otero, D. A.; Kondo, J.; Ihara, Y.; Saitoh, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. United States Am.* **1993**, *90*, 11282–11286.
- (15) Gibb, W. R. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **1986**, *12*, 223–234.
- (16) Spillantini, M. G.; Schmidt, M. L.; Lee, V. M.; Trojanowski, J. Q.; Jakes, R.; Goedert, M. *Nature* **1997**, *388*, 839–840.
- (17) Dev, K. K.; Hofele, K.; Barbieri, S.; Buchman, V. L.; van der Putten, H. *Neuropharmacology* **2003**, *45*, 14–44.
- (18) Erwin, W. G.; Turco, T. F. *Clin. Pharm.* **1986**, *5*, 742–753.
- (19) Polymeropoulos, M. H.; Lavedan, C.; Leroy, E.; Ide, S. E.; Dehejia, A.; Dutra, A.; Pike, B.; Root, H.; Rubenstein, J.; Boyer, R.; Stenroos, E. S.; Chandrasekharappa, S.; Athanassiadou, A.; Papapetropoulos, T.; Johnson, W.

- G.; Lazzarini, A. M.; Duvoisin, R. C.; Di Iorio, G.; Golbe, L. I.; Nussbaum, R. L. *Science* **1997**, *276*, 2045–2047.
- (20) Krüger, R.; Kuhn, W.; Müller, T.; Woitalla, D.; Graeber, M.; Kösel, S.; Przuntek, H.; Epplen, J. T.; Schöls, L.; Riess, O. *Nat. Genet.* **1998**, *18*, 106–108.
- (21) Bradbury, J. *Lancet. Neurol.* **2003**, *2*.
- (22) Zarranz, J. J.; Alegre, J.; Gómez-Esteban, J. C.; Lezcano, E.; Ros, R.; Ampuero, I.; Vidal, L.; Hoenicka, J.; Rodriguez, O.; Atarés, B.; Llorens, V.; Gomez Tortosa, E.; del Ser, T.; Muñoz, D. G.; de Yebenes, J. G. *Ann. Neurol.* **2004**, *55*, 164–173.
- (23) Kara, E.; Lewis, P. A.; Ling, H.; Proukakis, C.; Houlden, H.; Hardy, J. *Neurosci. Lett.* **2013**, *546*, 67–70.
- (24) Spillantini, M. G.; Goedert, M. *Ann. New York Acad. Sci.* **2000**, *920*, 16–27.
- (25) Dev, K. K.; van der Putten, H.; Sommer, B.; Rovelli, G. *Neuropharmacology* **2003**, *45*, 1–13.
- (26) Lavedan, C. *Genome Res.* **1998**, *8*, 871–880.
- (27) Chandra, S.; Fornai, F.; Kwon, H.-B.; Yazdani, U.; Atasoy, D.; Liu, X.; Hammer, R. E.; Battaglia, G.; German, D. C.; Castillo, P. E.; Südhof, T. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. United States Am.* **2004**, *101*, 14966–14971.
- (28) Weinreb, P. H.; Zhen, W.; Poon, A. W.; Conway, K. A.; Lansbury, P. T. *Biochemistry* **1996**, *35*, 13709–13715.
- (29) Uversky, V. N.; Li, J.; Fink, A. L. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 10737–10744.
- (30) Theillet, F.-X.; Binolfi, A.; Bekei, B.; Martorana, A.; Rose, H. M.; Stuiver, M.; Verzini, S.; Lorenz, D.; van Rossum, M.; Goldfarb, D.; Selenko, P. *Nature* **2016**, *530*, 45–50.
- (31) Bertoncini, C. W.; Jung, Y.-S.; Fernandez, C. O.; Hoyer, W.; Griesinger, C.; Jovin, T. M.; Zweckstetter, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. United States Am.* **2005**, *102*, 1430–1435.
- (32) Rivers, R. C.; Kumita, J. R.; Tartaglia, G. G.; Dedmon, M. M.; Pawar, A.; Vendruscolo, M.; Dobson, C. M.; Christodoulou, J. *Protein Sci. : Publ. Protein Soc.* **2008**, *17*, 887–898.
- (33) Davidson, W. S.; Jonas, A.; Clayton, D. F.; George, J. M. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 9443–9449.
- (34) Sung, Y.-H.; Eliezer, D. *Protein Sci. : Publ. Protein Soc.* **2006**, *15*, 1162–1174.
- (35) Drin, G.; Antonny, B. *FEBS Lett.* **2010**, *584*, 1840–1847.
- (36) Uversky, V. N.; Li, J.; Souillac, P.; Millett, I. S.; Doniach, S.; Jakes, R.; Goedert, M.; Fink, A. L. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 11970–11978.
- (37) Hashimoto, M.; Rockenstein, E.; Mante, M.; Mallory, M.; Masliah, E. *Neuron* **2001**, *32*, 213–223.
- (38) Murphy, D. D.; Rueter, S. M.; Trojanowski, J. Q.; Lee, V. M. *J. Neurosci. : Off. J. Soc. Neurosci.* **2000**, *20*, 3214–3220.
- (39) Abeliovich, A.; Schmitz, Y.; Fariñas, I.; Choi-Lundberg, D.; Ho, W. H.; Castillo, P. E.; Shinsky, N.; Verdugo, J. M.; Armanini, M.; Ryan, A.; Hynes, M.; Phillips, H.; Sulzer, D.; Rosenthal, A. *Neuron* **2000**, *25*, 239–252.

- (40) Yavich, L.; Tanila, H.; Vepsäläinen, S.; Jäkälä, P. *J. Neurosci. : Off. J. Soc. Neurosci.* **2004**, *24*, 11165–11170.
- (41) Middleton, E. R.; Rhoades, E. *Biophys. J.* **2010**, *99*, 2279–2288.
- (42) Jensen, M. B.; Bhatia, V. K.; Jao, C. C.; Rasmussen, J. E.; Pedersen, S. L.; Jensen, K. J.; Langen, R.; Stamou, D. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 42603–42614.
- (43) Trexler, A. J.; Rhoades, E. *Biochemistry* **2009**, *48*, 2304–2306.
- (44) Fortin, D. L.; Nemani, V. M.; Voglmaier, S. M.; Anthony, M. D.; Ryan, T. A.; Edwards, R. H. *J. Neurosci. : Off. J. Soc. Neurosci.* **2005**, *25*, 10913–10921.
- (45) Nemani, V. M.; Lu, W.; Berge, V.; Nakamura, K.; Onoa, B.; Lee, M. K.; Chaudhry, F. A.; Nicoll, R. A.; Edwards, R. H. *Neuron* **2010**, *65*, 66–79.
- (46) Gitler, A. D.; Bevis, B. J.; Shorter, J.; Strathearn, K. E.; Hamamichi, S.; Su, L. J.; Caldwell, K. A.; Caldwell, G. A.; Rochet, J.-C.; McCaffery, J. M.; Barlowe, C.; Lindquist, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. United States Am.* **2008**, *105*, 145–150.
- (47) Chua, C. E. L.; Tang, B. L. *Brain Res. Rev.* **2011**, *67*, 268–281.
- (48) Chandra, S.; Gallardo, G.; Fernández-Chacón, R.; Schlüter, O. M.; Südhof, T. C. *Cell* **2005**, *123*, 383–396.
- (49) Bonini, N. M.; Giasson, B. I. *Cell* **2005**, *123*, 359–361.
- (50) Burré, J.; Sharma, M.; Tsetsenis, T.; Buchman, V.; Etherton, M. R.; Südhof, T. C. *Science* **2010**, *329*, 1663–1667.
- (51) Darios, F.; Ruipérez, V.; López, I.; Villanueva, J.; Gutierrez, L. M.; Davletov, B. *EMBO reports* **2010**, *11*, 528–533.
- (52) Garcia-Reitböck, P.; Anichtchik, O.; Bellucci, A.; Iovino, M.; Ballini, C.; Fineberg, E.; Ghetti, B.; Della Corte, L.; Spano, P.; Tofaris, G. K.; Goedert, M.; Spillantini, M. G. *Brain : J. Neurol.* **2010**, *133*, 2032–2044.
- (53) Scott, D. A.; Tabarean, I.; Tang, Y.; Cartier, A.; Masliah, E.; Roy, S. *J. Neurosci. : Off. J. Soc. Neurosci.* **2010**, *30*, 8083–8095.
- (54) Sousa, V. L.; Bellani, S.; Giannandrea, M.; Yousuf, M.; Valtorta, F.; Meldolesi, J.; Chierigatti, E. *Mol. Biol. cell* **2009**, *20*, 3725–3739.
- (55) Dauer, W.; Kholodilov, N.; Vila, M.; Trillat, A.-C.; Goodchild, R.; Larsen, K. E.; Staal, R.; Tieu, K.; Schmitz, Y.; Yuan, C. A.; Rocha, M.; Jackson-Lewis, V.; Hersch, S.; Sulzer, D.; Przedborski, S.; Burke, R.; Hen, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. United States Am.* **2002**, *99*, 14524–14529.
- (56) Alvarez-Fischer, D.; Henze, C.; Strenzke, C.; Westrich, J.; Ferger, B.; Höglinger, G. U.; Oertel, W. H.; Hartmann, A. *Exp. Neurol.* **2008**, *210*, 182–193.
- (57) Mosharov, E. V.; Larsen, K. E.; Kanter, E.; Phillips, K. A.; Wilson, K.; Schmitz, Y.; Krantz, D. E.; Kobayashi, K.; Edwards, R. H.; Sulzer, D. *Neuron* **2009**, *62*, 218–229.
- (58) Feng, L. R.; Federoff, H. J.; Vicini, S.; Maguire-Zeiss, K. A. *Eur. J. Neurosci.* **2010**, *32*, 10–17.
- (59) Nakamura, K.; Nemani, V. M.; Azarbal, F.; Skibinski, G.; Levy, J. M.; Egami, K.; Munishkina, L.; Zhang, J.; Gardner, B.; Wakabayashi, J.; Sesaki, H.; Cheng, Y.; Finkbeiner, S.; Nussbaum, R. L.; Masliah, E.; Edwards, R. H. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 20710–20726.

- (60) Alonso-Canovas, A.; Katschnig, P.; Tucci, A.; Carecchio, M.; Wood, N. W.; Edwards, M.; Martínez Castrillo, J. C.; Burke, D.; Heales, S.; Bhatia, K. P. *Mov. Disord. : Off. J. Mov. Disord. Soc.* **2010**, *25*, 1506–1509.
- (61) Bennett, M. C.; Bishop, J. F.; Leng, Y.; Chock, P. B.; Chase, T. N.; Mouradian, M. M. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 33855–33858.
- (62) Tofaris, G. K.; Layfield, R.; Spillantini, M. G. *FEBS Lett.* **2001**, *509*, 22–26.
- (63) Liani, E.; Eyal, A.; Avraham, E.; Shemer, R.; Szargel, R.; Berg, D.; Bornemann, A.; Riess, O.; Ross, C. A.; Rott, R.; Engelender, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. United States Am.* **2004**, *101*, 5500–5505.
- (64) Rott, R.; Szargel, R.; Haskin, J.; Bandopadhyay, R.; Lees, A. J.; Shani, V.; Engelender, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. United States Am.* **2011**, *108*, 18666–18671.
- (65) Rideout, H. J.; Lang-Rollin, I.; Stefanis, L. *Int. J. Biochem. & cell Biol.* **2004**, *36*, 2551–2562.
- (66) Mak, S. K.; McCormack, A. L.; Manning-Bog, A. B.; Cuervo, A. M.; Di Monte, D. A. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 13621–13629.
- (67) Pratt, M. R.; Abeywardana, T.; Marotta, N. P. *Biomolecules* **2015**, *5*, 1210–1227.
- (68) Giasson, B. I.; Duda, J. E.; Murray, I. V.; Chen, Q.; Souza, J. M.; Hurtig, H. I.; Ischiropoulos, H.; Trojanowski, J. Q.; Lee, V. M. *Science* **2000**, *290*, 985–989.
- (69) Breydo, L.; Wu, J. W.; Uversky, V. N. *Biochim. et Biophys. Acta* **2012**, *1822*, 261–285.
- (70) Paik, S. R.; Shin, H. J.; Lee, J. H.; Chang, C. S.; Kim, J. *Biochem. J.* **1999**, *340* (Pt 3), 821–828.
- (71) Gandhi, S.; Abramov, A. Y. *Oxidative Med. Cell. Longev.* **2012**, 2012.
- (72) Ray, P. D.; Huang, B.-W.; Tsuji, Y. *Cell. Signal.* **2012**, *24*, 981–990.
- (73) Dasuri, K.; Zhang, L.; Keller, J. N. *Free. Radic. Biol. & Med.* **2013**, *62*, 170–185.
- (74) Yang, Y.; Bazhin, A. V.; Werner, J.; Karakhanova, S. *Int. Rev. Immunol.* **2013**, *32*, 249–270.
- (75) Nayernia, Z.; Jaquet, V.; Krause, K.-H. *Antioxidants & redox Signal.* **2014**, *20*, 2815–2837.
- (76) Popa-Wagner, A.; Mitran, S.; Sivanesan, S.; Chang, E.; Buga, A.-M. *Oxidative Med. Cell. Longev.* **2013**, 2013.
- (77) Uttara, B.; Singh, A. V.; Zamboni, P.; Mahajan, R. T. *Curr. Neuropharmacol.* **2009**, *7*, 65–74.
- (78) Liochev, S. I. *Free. Radic. Biol. & Med.* **2013**, *60*, 1–4.
- (79) Chaudhari, N.; Talwar, P.; Parimisetty, A.; Lefebvre d’Hellencourt, C.; Ravanan, P. *Front. Cell. Neurosci.* **2014**, *8*.
- (80) Johnson, W. M.; Wilson-Delfosse, A. L.; Mielay, J. J. *Nutrients* **2012**, *4*, 1399–1440.
- (81) Liu, X.; Yamada, N.; Maruyama, W.; Osawa, T. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 34887–34895.
- (82) Wang, X.; Michaelis, E. K. *Front. Aging Neurosci.* **2010**, *2*.

- (83) Ferreira, M. E. S.; de Vasconcelos, A. S.; da Costa Vilhena, T.; da Silva, T. L.; da Silva Barbosa, A.; Gomes, A. R. Q.; Dolabela, M. F.; Percário, S. *Cell. Mol. Neurobiol.* **2015**, *35*, 595–614.
- (84) Calne, D. B.; Langston, J. W. *Lancet* **1983**, *2*, 1457–1459.
- (85) Gibb, W. R.; Lees, A. J. *J. Neurol. neurosurgery, Psychiatry* **1991**, *54*, 388–396.
- (86) Greaves, L. C.; Reeve, A. K.; Taylor, R. W.; Turnbull, D. M. *J. Pathol.* **2012**, *226*, 274–286.
- (87) Beal, M. F. *Ann. Neurol.* **2005**, *58*, 495–505.
- (88) Jenner, P.; Olanow, C. W. *Neurology* **2006**, *66*, S24–S36.
- (89) Zhu, J.; Chu, C. T. *J. Alzheimer's Dis. : JAD* **2010**, *20 Suppl 2*, S325–S334.
- (90) Schapira, A. H.; Jenner, P. *Mov. Disord. : Off. J. Mov. Disord. Soc.* **2011**, *26*, 1049–1055.
- (91) Yoritaka, A.; Hattori, N.; Uchida, K.; Tanaka, M.; Stadtman, E. R.; Mizuno, Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. United States Am.* **1996**, *93*, 2696–2701.
- (92) Jenner, P. *Ann. Neurol.* **2003**, *53 Suppl 3*, S26–S36; discussion S36–S38.
- (93) Floor, E.; Wetzel, M. G. *J. Neurochem.* **1998**, *70*, 268–275.
- (94) Alam, Z. I.; Jenner, A.; Daniel, S. E.; Lees, A. J.; Cairns, N.; Marsden, C. D.; Jenner, P.; Halliwell, B. *J. Neurochem.* **1997**, *69*, 1196–1203.
- (95) Zhang, J.; Perry, G.; Smith, M. A.; Robertson, D.; Olson, S. J.; Graham, D. G.; Montine, T. J. *Am. J. Pathol.* **1999**, *154*, 1423–1429.
- (96) Sian, J.; Dexter, D. T.; Lees, A. J.; Daniel, S.; Agid, Y.; Javoy-Agid, F.; Jenner, P.; Marsden, C. D. *Ann. Neurol.* **1994**, *36*, 348–355.
- (97) Schapira, A. H. V. *Lancet. Neurol.* **2008**, *7*, 97–109.
- (98) Reeve, A. K.; Krishnan, K. J.; Turnbull, D. M. *Biotechnol. J.* **2008**, *3*, 750–756.
- (99) Boumezbeur, F.; Mason, G. F.; de Graaf, R. A.; Behar, K. L.; Cline, G. W.; Shulman, G. I.; Rothman, D. L.; Petersen, K. F. *J. Cereb. blood flow Metab. : Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* **2010**, *30*, 211–221.
- (100) Shigenaga, M. K.; Hagen, T. M.; Ames, B. N. *Proc. Natl. Acad. Sci. United States Am.* **1994**, *91*, 10771–10778.
- (101) Cuervo, A. M. *Trends Genet. : TIG* **2008**, *24*, 604–612.
- (102) Hubbard, V. M.; Valdor, R.; Macian, F.; Cuervo, A. M. *Biogerontology* **2012**, *13*, 21–35.
- (103) Reeve, A. K.; Krishnan, K. J.; Elson, J. L.; Morris, C. M.; Bender, A.; Lightowers, R. N.; Turnbull, D. M. *Am. J. Hum. Genet.* **2008**, *82*, 228–235.
- (104) Abramov, A. Y.; Smulders-Srinivasan, T. K.; Kirby, D. M.; Acin-Perez, R.; Enriquez, J. A.; Lightowers, R. N.; Duchon, M. R.; Turnbull, D. M. *Brain : J. Neurol.* **2010**, *133*, 797–807.
- (105) Tuppen, H. A. L.; Blakely, E. L.; Turnbull, D. M.; Taylor, R. W. *Biochim. et Biophys. Acta* **2010**, *1797*, 113–128.
- (106) Surmeier, D. J.; Guzman, J. N.; Sanchez-Padilla, J.; Goldberg, J. A. *Antioxidants & redox Signal.* **2011**, *14*, 1289–1301.

- (107) Bender, A.; Krishnan, K. J.; Morris, C. M.; Taylor, G. A.; Reeve, A. K.; Perry, R. H.; Jaros, E.; Hersheson, J. S.; Betts, J.; Klopstock, T.; Taylor, R. W.; Turnbull, D. M. *Nat. Genet.* **2006**, *38*, 515–517.
- (108) Segura-Aguilar, J.; Paris, I.; Muñoz, P.; Ferrari, E.; Zecca, L.; Zucca, F. A. *J. Neurochem.* **2014**, *129*, 898–915.
- (109) Rabinovic, A. D.; Lewis, D. A.; Hastings, T. G. *Neuroscience* **2000**, *101*, 67–76.
- (110) Masoud, S. T.; Vecchio, L. M.; Bergeron, Y.; Hossain, M. M.; Nguyen, L. T.; Bermejo, M. K.; Kile, B.; Sotnikova, T. D.; Siesser, W. B.; Gainetdinov, R. R.; Wightman, R. M.; Caron, M. G.; Richardson, J. R.; Miller, G. W.; Ramsey, A. J.; Cyr, M.; Salahpour, A. *Neurobiol. Dis.* **2015**, *74*, 66–75.
- (111) Zucca, F. A.; Basso, E.; Cupaioli, F. A.; Ferrari, E.; Sulzer, D.; Casella, L.; Zecca, L. *Neurotox. Res.* **2014**, *25*, 13–23.
- (112) Whitehead, R. E.; Ferrer, J. V.; Javitch, J. A.; Justice, J. B. *J. Neurochem.* **2001**, *76*, 1242–1251.
- (113) Zhou, Z. D.; Refai, F. S.; Xie, S. P.; Ng, S. H.; Chan, C. H. S.; Ho, P. G. H.; Zhang, X. D.; Lim, T. M.; Tan, E. K. *Free. Radic. Biol. & Med.* **2014**, *68*, 220–233.
- (114) Giroto, S.; Sturlese, M.; Bellanda, M.; Tessari, I.; Cappellini, R.; Bisaglia, M.; Bubacco, L.; Mammi, S. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 18738–18749.
- (115) Da Silva, F. L.; Coelho Cerqueira, E.; de Freitas, M. S.; Gonçalves, D. L.; Costa, L. T.; Follmer, C. *Neurochem. Int.* **2013**, *62*, 103–112.
- (116) Martinez-Vicente, M.; Talloczy, Z.; Kaushik, S.; Massey, A. C.; Mazzulli, J.; Mosharov, E. V.; Hodara, R.; Fredenburg, R.; Wu, D.-C.; Follenzi, A.; Dauer, W.; Przedborski, S.; Ischiropoulos, H.; Lansbury, P. T.; Sulzer, D.; Cuervo, A. M. *J. Clin. Investig.* **2008**, *118*, 777–788.
- (117) Conway, K. A.; Rochet, J. C.; Bieganski, R. M.; Lansbury, P. T. *Science* **2001**, *294*, 1346–1349.
- (118) Chinta, S. J.; Andersen, J. K. *Biochim. et Biophys. Acta* **2008**, *1780*, 1362–1367.
- (119) Paxinou, E.; Chen, Q.; Weisse, M.; Giasson, B. I.; Norris, E. H.; Rueter, S. M.; Trojanowski, J. Q.; Lee, V. M.; Ischiropoulos, H. *J. Neurosci. : Off. J. Soc. Neurosci.* **2001**, *21*, 8053–8061.
- (120) Sangchot, P.; Sharma, S.; Chetsawang, B.; Porter, J.; Govitrapong, P.; Ebadi, M. *Dev. Neurosci.* **2002**, *24*, 143–153.
- (121) Goers, J.; Manning-Bog, A. B.; McCormack, A. L.; Millett, I. S.; Doniach, S.; Di Monte, D. A.; Uversky, V. N.; Fink, A. L. *Biochemistry* **2003**, *42*, 8465–8471.
- (122) Xu, S.; Zhou, M.; Yu, S.; Cai, Y.; Zhang, A.; Uéda, K.; Chan, P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *342*, 330–335.
- (123) Pukass, K.; Richter-Landsberg, C. *J. Mol. Neurosci. : MN* **2014**, *52*, 339–352.
- (124) Xiang, W.; Schlachetzki, J. C. M.; Helling, S.; Busmann, J. C.; Berlinghof, M.; Schäffer, T. E.; Marcus, K.; Winkler, J.; Klucken, J.; Becker, C.-M. *Mol. Cell. Neurosci.* **2013**, *54*, 71–83.
- (125) Hashimoto, M.; Hsu, L. J.; Xia, Y.; Takeda, A.; Sisk, A.; Sundsmo, M.;

- Masliah, E. *Neuroreport* **1999**, *10*, 717–721.
- (126) Ostrerova-Golts, N.; Petrucelli, L.; Hardy, J.; Lee, J. M.; Farer, M.; Wolozin, B. J. *J. Neurosci. : Off. J. Soc. Neurosci.* **2000**, *20*, 6048–6054.
- (127) Kakimura, J.; Kitamura, Y.; Takata, K.; Kohno, Y.; Nomura, Y.; Taniguchi, T. *Eur. J. Pharmacol.* **2001**, *417*, 59–67.
- (128) Schipper, H. M.; Liberman, A.; Stopa, E. G. *Exp. Neurol.* **1998**, *150*, 60–68.
- (129) Ischiropoulos, H.; Beckman, J. S. *J. Clin. Investig.* **2003**, *111*, 163–169.
- (130) Dryanovski, D. I.; Guzman, J. N.; Xie, Z.; Galteri, D. J.; Volpicelli-Daley, L. A.; Lee, V. M.-Y.; Miller, R. J.; Schumacker, P. T.; Surmeier, D. J. *J. Neurosci. : Off. J. Soc. Neurosci.* **2013**, *33*, 10154–10164.
- (131) Martin, L. J.; Pan, Y.; Price, A. C.; Sterling, W.; Copeland, N. G.; Jenkins, N. A.; Price, D. L.; Lee, M. K. *J. Neurosci. : Off. J. Soc. Neurosci.* **2006**, *26*, 41–50.
- (132) Dexter, D. T.; Wells, F. R.; Lees, A. J.; Agid, F.; Agid, Y.; Jenner, P.; Marsden, C. D. *J. Neurochem.* **1989**, *52*, 1830–1836.
- (133) Rivera-Mancía, S.; Pérez-Neri, I.; Ríos, C.; Tristán-López, L.; Rivera-Espinosa, L.; Montes, S. *Chem. interactions* **2010**, *186*, 184–199.
- (134) Prohaska, J. R. *Adv. Nutr.* **2011**, *2*, 89–95.
- (135) Boll, M.-C.; Alcaraz-Zubeldia, M.; Montes, S.; Rios, C. *Neurochem. Res.* **2008**, *33*, 1717–1723.
- (136) Ayton, S.; Lei, P.; Duce, J. A.; Wong, B. X. W.; Sedjahtera, A.; Adlard, P. A.; Bush, A. I.; Finkelstein, D. I. *Ann. Neurol.* **2013**, *73*, 554–559.
- (137) Hozumi, I.; Hasegawa, T.; Honda, A.; Ozawa, K.; Hayashi, Y.; Hashimoto, K.; Yamada, M.; Koumura, A.; Sakurai, T.; Kimura, A.; Tanaka, Y.; Satoh, M.; Inuzuka, T. *J. Neurol. Sci.* **2011**, *303*, 95–99.
- (138) Choi, B.-S.; Zheng, W. *Brain Res.* **2009**, *1248*, 14–21.
- (139) Lutsenko, S.; Bhattacharjee, A.; Hubbard, A. L. *Met. : Integr. biometal Sci.* **2010**, *2*, 596–608.
- (140) Davies, K. M.; Bohic, S.; Carmona, A.; Ortega, R.; Cottam, V.; Hare, D. J.; Finberg, J. P. M.; Reyes, S.; Halliday, G. M.; Mercer, J. F. B.; Double, K. L. *Neurobiol. Aging* **2014**, *35*, 858–866.
- (141) Tapiero, H.; Townsend, D. M.; Tew, K. D. *Biomed. & Pharmacother. = Bioméd. & pharmacothérapie* **2003**, *57*, 386–398.
- (142) Matsuba, Y.; Takahashi, Y. *Anal. Biochem.* **1970**, *36*, 182–191.
- (143) Saito, T.; Itoh, T.; Fujimura, M.; Saito, K. *Brain Res.* **1995**, *695*, 240–244.
- (144) Hopt, A.; Korte, S.; Fink, H.; Panne, U.; Niessner, R.; Jahn, R.; Kretschmar, H.; Herms, J. *J. Neurosci. methods* **2003**, *128*, 159–172.
- (145) Kardos, J.; Kovács, I.; Hajós, F.; Kálmán, M.; Simonyi, M. *Neurosci. Lett.* **1989**, *103*, 139–144.
- (146) Popescu, B. F. G.; George, M. J.; Bergmann, U.; Garachtchenko, A. V.; Kelly, M. E.; McCrea, R. P. E.; Lüning, K.; Devon, R. M.; George, G. N.; Hanson, A. D.; Harder, S. M.; Chapman, L. D.; Pickering, I. J.; Nichol, H. *Phys. Med. Biol.* **2009**, *54*, 651–663.
- (147) Davies, K. M.; Hare, D. J.; Cottam, V.; Chen, N.; Hilgers, L.; Halliday, G.;

- Mercer, J. F. B.; Double, K. L. *Met. : Integr. biometal Sci.* **2013**, *5*, 43–51.
- (148) Uversky, V. N.; Li, J.; Fink, A. L. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 44284–44296.
- (149) Binolfi, A.; Lamberto, G. R.; Duran, R.; Quintanar, L.; Bertoncini, C. W.; Souza, J. M.; Cerveñansky, C.; Zweckstetter, M.; Griesinger, C.; Fernández, C. *O. J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11801–11812.
- (150) Jackson, M. S.; Lee, J. C. *Inorg. Chem.* **2009**, *48*, 9303–9307.
- (151) Binolfi, A.; Quintanar, L.; Bertoncini, C. W.; Griesinger, C.; Fernández, C. *O. Coord. Chem. Rev.* **2012**, *256*, 2188–2201.
- (152) Rasia, R. M.; Bertoncini, C. W.; Marsh, D.; Hoyer, W.; Cherny, D.; Zweckstetter, M.; Griesinger, C.; Jovin, T. M.; Fernández, C. O. *Proc. Natl. Acad. Sci. United States Am.* **2005**, *102*, 4294–4299.
- (153) Binolfi, A.; Rasia, R. M.; Bertoncini, C. W.; Ceolin, M.; Zweckstetter, M.; Griesinger, C.; Jovin, T. M.; Fernández, C. O. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9893–9901.
- (154) Zhang, H.; Griggs, A.; Rochet, J.-C.; Stanciu, L. A. *Biophys. J.* **2013**, *104*, 2706–2713.
- (155) Guilloreau, L.; Combalbert, S.; Sournia-Saquet, A.; Mazarguil, H.; Faller, P. *Chembiochem : Eur. J. Chem. Biol.* **2007**, *8*, 1317–1325.
- (156) Wang, C.; Liu, L.; Zhang, L.; Peng, Y.; Zhou, F. *Biochemistry* **2010**, *49*, 8134–8142.
- (157) Meloni, G.; Vašák, M. *Free. Radic. Biol. Med.* **2011**, *50*, 1471–1479.
- (158) Kowalik-Jankowska, T.; Rajewska, A.; Jankowska, E.; Wiśniewska, K.; Grzonka, Z. *J. Inorg. Biochem.* **2006**, *100*, 1623–1631.
- (159) Kowalik-Jankowska, T.; Rajewska, A.; Jankowska, E.; Grzonka, Z. *Dalton Trans.* **2008**, 832–838.
- (160) Binolfi, A.; Valiente-Gabioud, A. A.; Duran, R.; Zweckstetter, M.; Griesinger, C.; Fernandez, C. O. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 194–196.
- (161) Lucas, H. R.; DeBeer, S.; Hong, M.-S.; Lee, J. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 6636–6637.
- (162) Leong, S. L.; Pham, C. L. L.; Galatis, D.; Fodero-Tavoletti, M. T.; Perez, K.; Hill, A. F.; Masters, C. L.; Ali, F. E.; Barnham, K. J.; Cappai, R. *Free. Radic. Biol. & Med.* **2009**, *46*, 1328–1337.
- (163) Zhou, B.; Hao, Y.; Wang, C.; Li, D.; Liu, Y.-N.; Zhou, F. *J. Inorg. Biochem.* **2013**, *118*, 68–73.
- (164) Paik, S. R.; Shin, H.-J.; Lee, J.-H. *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, *378*, 269–277.
- (165) Uversky, V. N.; Yamin, G.; Souillac, P. O.; Goers, J.; Glaser, C. B.; Fink, A. L. *FEBS Lett.* **2002**, *517*, 239–244.
- (166) Glaser, C. B.; Yamin, G.; Uversky, V. N.; Fink, A. L. *Biochim. et Biophys. Acta* **2005**, *1703*, 157–169.
- (167) Valensin, D.; Dell'Acqua, S.; Kozłowski, H.; Casella, L. *J. Inorg. Biochem.* **2016**.
- (168) Binolfi, A.; Rodriguez, E. E.; Valensin, D.; D'Amelio, N.; Ippoliti, E.; Obal,

- G.; Duran, R.; Magistrato, A.; Pritsch, O.; Zweckstetter, M.; Valensin, G.; Carloni, P.; Quintanar, L.; Griesinger, C.; Fernández, C. O. *Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 10668–10679.
- (169) Drew, S. C.; Leong, S. L.; Pham, C. L. L.; Tew, D. J.; Masters, C. L.; Miles, L. A.; Cappai, R.; Barnham, K. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 7766–7773.
- (170) Valensin, D.; Camponeschi, F.; Luczkowski, M.; Baratto, M. C.; Remelli, M.; Valensin, G.; Kozłowski, H. *Metallomics* **2011**, *3*, 292.
- (171) Kang, L.; Moriarty, G. M.; Woods, L. A.; Ashcroft, A. E.; Radford, S. E.; Baum, J. *Protein Sci. : Publ. Protein Soc.* **2012**, *21*, 911–917.
- (172) Moriarty, G. M.; Minetti, C. A. S. A.; Remeta, D. P.; Baum, J. A Revised Picture of the Cu(II)- α -Synuclein Complex: The Role of N-Terminal Acetylation. *Biochemistry*, 2014, *53*, 2815–2817.
- (173) Bolder, S. G.; Sagis, L. M. C.; Venema, P.; van der Linden, E. *Langmuir* **2007**, *23*, 4144–4147.
- (174) Hawe, A.; Sutter, M.; Jiskoot, W. *Pharm. Res.* **2008**, *25*, 1487–1499.
- (175) Fernández, C. O.; Hoyer, W.; Zweckstetter, M.; Jares-Erijman, E. A.; Subramaniam, V.; Griesinger, C.; Jovin, T. M. *EMBO J.* **2004**, *23*, 2039–2046.
- (176) Keller RLJ. (2004) The Computer Aided Resonance Assignment tutorial. Goldau: CANTINA Verlag. CARA website. Available: <http://cara.nmr-software.org/portal/>. Accessed 2012 Sep 5. - Open Access Library, 2016.
- (177) Goddard, T. D.; Kneller, D. G. **2014**.
- (178) Vranken, W. F.; Boucher, W.; Stevens, T. J.; Fogh, R. H.; Pajon, A.; Llinas, M.; Ulrich, E. L.; Markley, J. L.; Ionides, J.; Laue, E. D. *Proteins* **2005**, *59*, 687–696.
- (179) Shaka, A. J.; Hwang, T. L. *J. Magn. Reson. Ser.* **1995**, *112*, 275–279.
- (180) Davis, D. G.; Bax, A. *J. Magn. Reson.* **1985**, *65*, 355–360.
- (181) Mori, S.; Abeygunawardana, C.; Johnson, M. O.; van Zijl, P. C. *J. Magn. Reson. Ser. B* **1995**, *108*, 94–98.
- (182) Zhu, G.; Kong, X. M.; Sze, K. H. *J. Biomol. NMR* **1999**, *13*, 77–81.
- (183) Bermel, W.; Bertini, I.; Felli, I. C.; Pierattelli, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 15339–15345.
- (184) Vuister, G. W.; Bax, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 7772–7777.
- (185) Moskau, D.; Laue, E. D.; Keeler, J.; Davis, A. L. *J. Magn. Reson.* **1992**, *98*, 207–216.
- (186) Kay, L. E.; Muhandiram, D. R. *J. Magn. Reson. Ser. B* **1994**, *103*, 203–216.
- (187) Ishima, R. *Top. Curr. Chem.* **2012**, *326*, 99–122.
- (188) Palmer, A. G. *J. Magn. Reson.* **2014**, *241*, 3–17.
- (189) Farrow, N. A.; Zhang, O.; Forman-Kay, J. D.; Kay, L. E. *Biochemistry* **1997**, *36*, 2390–2402.
- (190) Kuzmic, P. *Anal. Biochem.* **1996**, *237*, 260–273.
- (191) Carboni, E.; Lingor, P. *Met. : Integr. biometal Sci.* **2015**, *7*, 395–404.
- (192) Camponeschi, F.; Valensin, D.; Tessari, I.; Bubacco, L.; Dell'Acqua, S.; Casella, L.; Monzani, E.; Gaggelli, E.; Valensin, G. *Inorg. Chem.* **2013**, *52*, 1358–1367.

- (193) Davis, A. V.; O'Halloran, T. V. *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 148–151.
- (194) Rubino, J. T.; Riggs-Gelasco, P.; Franz, K. J. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **2010**, *15*, 1033–1049.
- (195) Bagchi, P.; Morgan, M. T.; Bacsa, J.; Fahrni, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 18549–18559.
- (196) Jiang, J.; Nadas, I. A.; Kim, M. A.; Franz, K. J. *Inorg. Chem.* **2005**, *44*, 9787–9794.
- (197) De Ricco, R.; Valensin, D.; Dell'Acqua, S.; Casella, L.; Gaggelli, E.; Valensin, G.; Bubacco, L.; Mangani, S. *Inorg. Chem.* **2015**, *54*, 265–272.
- (198) Khalaf, O.; Fauvet, B.; Oueslati, A.; Dikiy, I.; Mahul-Mellier, A.-L.; Ruggeri, F. S.; Mbefo, M. K.; Vercruyse, F.; Dietler, G.; Lee, S.-J.; Eliezer, D.; Lashuel, H. A. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 21856–21876.
- (199) Xiang, W.; Menges, S.; Schlachetzki, J. C.; Meixner, H.; Hoffmann, A.-C.; Schlötzer-Schrehardt, U.; Becker, C.-M.; Winkler, J.; Klucken, J. *Mol. Neurodegener.* **2015**, *10*.
- (200) Petrucci, S.; Ginevrino, M.; Valente, E. M. *Park. & Relat. Disord.* **2016**, *22 Suppl 1*, S16–S20.
- (201) Rubino, J. T.; Chenkin, M. P.; Keller, M.; Riggs-Gelasco, P.; Franz, K. J. *Met. : Integr. biometal Sci.* **2011**, *3*, 61–73.
- (202) Rubino, J. T.; Franz, K. J. *J. Inorg. Biochem.* **2012**, *107*, 129–143.
- (203) Iwai, A.; Masliah, E.; Yoshimoto, M.; Ge, N.; Flanagan, L.; Rohan de Silva, H. A.; Kittel, A.; Saitoh, T. *Neuron* **1995**, *14*, 467–475.
- (204) Gruschus, J. M.; Yap, T. L.; Pistolesi, S.; Maltsev, A. S.; Lee, J. C. *Biochemistry* **2013**, *52*, 3436–3445.
- (205) Wilhelm, B. G.; Mandad, S.; Truckenbrodt, S.; Kröhnert, K.; Schäfer, C.; Rammner, B.; Koo, S. J.; Claßen, G. A.; Krauss, M.; Haucke, V.; Urlaub, H.; Rizzoli, S. O. *Science* **2014**, *344*, 1023–1028.
- (206) Scheiber, I. F.; Mercer, J. F.; Dringen, R. *Prog. Neurobiol.* **2014**.
- (207) Gaggelli, E.; Kozlowski, H.; Valensin, D.; Valensin, G. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 1995–2044.
- (208) Schlieff, M. L.; Gitlin, J. D. *Mol. Neurobiol.* **2006**, *33*, 81–90.
- (209) Yang, L.; McRae, R.; Henary, M. M.; Patel, R.; Lai, B.; Vogt, S.; Fahrni, C. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. United States Am.* **2005**, *102*, 11179–11184.
- (210) Zhou, W.; Long, C.; Reaney, S. H.; Monte, D. A. D.; Fink, A. L.; Uversky, V. N. *Biochim. et Biophys. Acta* **2010**, *1802*, 322–330.
- (211) Nakaso, K.; Tajima, N.; Ito, S.; Teraoka, M.; Yamashita, A.; Horikoshi, Y.; Kikuchi, D.; Mochida, S.; Nakashima, K.; Matura, T. *PloS one* **2013**, *8*.
- (212) Chavarría, C.; Souza, J. M. *Arch. Biochem. Biophys.* **2013**, *533*, 25–32.
- (213) Carmo-Gonçalves, P.; Pinheiro, A. S.; Romão, L.; Cortines, J.; Follmer, C. *Amyloid : Int. J. Exp. Clin. Investig. : Off. J. Int. Soc. Amyloidosis* **2014**, *21*, 163–174.
- (214) Jackson-Lewis, V. R.; Quiroga-Varela, A.; Trigo-Damas, I.; Blesa, J. *Front. Neuroanat.* **2015**, *9*.
- (215) Skvortsov, A. N.; Zavodnik, V. E.; Stash, A. I.; Bel'skii, V. K.; Skvortsov,

- N. K. *Russ. J. Org. Chem.* **2003**, *39*, 170–175.
- (216) Reynolds, W. L. *Dimethyl Sulfoxide in Inorganic Chemistry*, 1970, 1–99.
- (217) Cooper, D. L.; Cunningham, T. P.; Gerratt, J.; Karadakov, P. B.; Raimondi, M. J. *Chem. Soc. Faraday Trans.* **1997**, *93*, 2247–2254.
- (218) Sipos, G.; Drinkel, E. E.; Dorta, R. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 3834–3860.
- (219) Shearer, J.; Szalai, V. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 17826–17835.
- (220) Rice, M. E. *Trends Neurosci.* **2000**, *23*, 209–216.
- (221) Cassagnes, L.-E.; Hervé, V.; Nepveu, F.; Hureau, C.; Faller, P.; Collin, F. *Angew. Chem.* **2013**, *52*, 11110–11113.
- (222) Wiley: *Organic Reaction Mechanisms 2012: An annual survey covering the literature dated January to December 2012* - A. C. Knipe, 2016.
- (223) Wiley: *The Chemistry of Peroxides, Volume 3* - Joel F. Liebman, Alexander Greer, Zvi Rappoport, et al, 2016.
- (224) Pogocki, D.; Serdiuk, K.; Schöneich, C. *J. Phys. Chem.* **2003**, *107*, 7032–7042.
- (225) Dado, G. P.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 12609–12610.
- (226) Binolfi, A.; Limatola, A.; Verzini, S.; Kosten, J.; Theillet, F.-X.; Rose, H. M.; Bekei, B.; Stuiver, M.; van Rossum, M.; Selenko, P. *Nat. Commun.* **2016**, *7*.
- (227) Schildknecht, S.; Gerding, H. R.; Karreman, C.; Drescher, M.; Lashuel, H. A.; Outeiro, T. F.; Di Monte, D. A.; Leist, M. *J. Neurochem.* **2013**, *125*, 491–511.
- (228) Cole, N. B.; Murphy, D. D.; Lebowitz, J.; Di Noto, L.; Levine, R. L.; Nussbaum, R. L. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 9678–9690.
- (229) Hokenson, M. J.; Uversky, V. N.; Goers, J.; Yamin, G.; Munishkina, L. A.; Fink, A. L. *Biochemistry* **2004**, *43*, 4621–4633.
- (230) Maltsev, A. S.; Chen, J.; Levine, R. L.; Bax, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 2943–2946.
- (231) Alvarez-Castelao, B.; Goethals, M.; Vandekerckhove, J.; Castaño, J. G. *Biochim. et Biophys. Acta* **2014**, *1843*, 352–365.
- (232) Fauvet, B.; Fares, M.-B.; Samuel, F.; Dikiy, I.; Tandon, A.; Eliezer, D.; Lashuel, H. A. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 28243–28262.
- (233) Starheim, K. K.; Arnesen, T.; Gromyko, D.; Rynningen, A.; Varhaug, J. E.; Lillehaug, J. R. *Biochem. J.* **2008**, *415*, 325–331.
- (234) Wassef, R.; Haenold, R.; Hansel, A.; Brot, N.; Heinemann, S. H.; Hoshi, T. *J. Neurosci. : Off. J. Soc. Neurosci.* **2007**, *27*, 12808–12816.
- (235) Liu, F.; Hindupur, J.; Nguyen, J. L.; Ruf, K. J.; Zhu, J.; Schieler, J. L.; Bonham, C. C.; Wood, K. V.; Davisson, V. J.; Rochet, J.C. *Free. Radic. Biol. & Med.* **2008**, *45*, 242–255.
- (236) Maltsev, A. S.; Ying, J.; Bax, A. *Biochemistry* **2012**, *51*, 5004–5013.
- (237) Dikiy, I.; Eliezer, D. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 3652–3665.
- (238) Wishart, D. S.; Sykes, B. D. *Methods Enzymol.* **1994**, *239*, 363–392.
- (239) Tamiola, K.; Mulder, F. A. A. *Biochem. Soc. Trans.* **2012**, *40*, 1014–1020.
- (240) Serrano, L. *J. Mol. Biol.* **1995**, *254*, 322–333.
- (241) Hill, R. B.; Flanagan, J. M.; Prestegard, J. H. *Biochemistry* **1995**, *34*, 5587–

5596.

- (242) Wiley: NMR of Proteins and Nucleic Acids - Kurt Wüthrich, 2016.
- (243) Anderson, V. L.; Ramlall, T. F.; Rospigliosi, C. C.; Webb, W. W.; Eliezer, D. *Proc. Natl. Acad. Sci. United States Am.* **2010**, *107*, 18850–18855.
- (244) Ghosh, D.; Singh, P. K.; Sahay, S.; Jha, N. N.; Jacob, R. S.; Sen, S.; Kumar, A.; Riek, R.; Maji, S. K. *Sci. reports* **2015**, *5*.
- (245) Hol, W. G. *Adv. Biophys.* **1985**, *19*, 133–165.
- (246) Tyanova, S.; Cox, J.; Olsen, J.; Mann, M.; Frishman, D. *PLoS Comput. Biol.* **2013**, *9*.
- (247) Ducas, V. C.; Rhoades, E. J. *Mol. Biol.* **2012**, *423*, 528–539.
- (248) Guo, Y.; Smith, K.; Lee, J.; Thiele, D. J.; Petris, M. J. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 17428–17433.
- (249) Schushan, M.; Barkan, Y.; Haliloglu, T.; Ben-Tal, N. *Proc. Natl. Acad. Sci. United States Am.* **2010**, *107*, 10908–10913.
- (250) Öhrvik, H.; Nose, Y.; Wood, L. K.; Kim, B.-E.; Gleber, S.-C.; Ralle, M.; Thiele, D. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. United States Am.* **2013**, *110*, E4279–E4288.
- (251) Lashuel, H. A.; Petre, B. M.; Wall, J.; Simon, M.; Nowak, R. J.; Walz, T.; Lansbury, P. T. *J. Mol. Biol.* **2002**, *322*, 1089–1102.
- (252) Schmidt, F.; Levin, J.; Kamp, F.; Kretzschmar, H.; Giese, A.; Bötzel, K. *PloS one* **2012**, *7*.
- (253) Nübling, G. S.; Levin, J.; Bader, B.; Lorenzl, S.; Hillmer, A.; Högen, T.; Kamp, F.; Giese, A. *PloS one* **2014**, *9*.
- (254) Jakes, R.; Spillantini, M. G.; Goedert, M. *FEBS Lett.* **1994**, *345*, 27–32.
- (255) Fan, Y.; Limprasert, P.; Murray, I. V. J.; Smith, A. C.; Lee, V. M.-Y.; Trojanowski, J. Q.; Sopher, B. L.; La Spada, A. R. *Hum. Mol. Genet.* **2006**, *15*, 3002–3011.
- (256) De Ricco, R.; Valensin, D.; Dell’Acqua, S.; Casella, L.; Hureau, C.; Faller, P. *Chembiochem : Eur. J. Chem. Biol.* **2015**, *16*, 2319–2328.
- (257) Lavedan, C.; Leroy, E.; Torres, R.; Dehejia, A.; Dutra, A.; Buchholtz, S.; Nussbaum, R. L.; Polymeropoulos, M. H. *Genomics* **1998**, *54*, 173–175.
- (258) Bertoncini, C. W.; Rasia, R. M.; Lamberto, G. R.; Binolfi, A.; Zweckstetter, M.; Griesinger, C.; Fernandez, C. O. *J. Mol. Biol.* **2007**, *372*, 708–722.
- (259) Osapay, K.; Case, D. A. *J. Biomol. NMR* **1994**, *4*, 215–230.
- (260) Guruprasad, K.; Rajkumar, S. *J. Biosci.* **2000**, *25*, 143–156.
- (261) Baxter, N. J.; Williamson, M. P. *J. Biomol. NMR* **1997**, *9*, 359–369.
- (262) Weisz, K.; Limbach, H.; Dunger, A. *Chem. - Eur. J.* **1998**, *4*, 621–628.
- (263) Rockenstein, E.; Hansen, L. A.; Mallory, M.; Trojanowski, J. Q.; Galasko, D.; Masliah, E. *Brain Res.* **2001**, *914*, 48–56.
- (264) McHugh, P. C.; Wright, J. A.; Brown, D. R. *PloS one* **2011**, *6*.
- (265) Dobson, C. M. *Semin. cell & Dev. Biol.* **2004**, *15*, 3–16.
- (266) Forno, L. S. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **1996**, *55*, 259–272.
- (267) Goedert, M.; Spillantini, M. G.; Del Tredici, K.; Braak, H. *Nat. Rev. Neurol.* **2013**, *9*, 13–24.

- (268) Bisaglia, M.; Tessari, I.; Pinato, L.; Bellanda, M.; Giraudo, S.; Fasano, M.; Bergantino, E.; Bubacco, L.; Mammi, S. *Biochemistry* **2005**, *44*, 329–339.
- (269) Chandra, S.; Chen, X.; Rizo, J.; Jahn, R.; Südhof, T. C. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 15313–15318.
- (270) Jao, C. C.; Der-Sarkissian, A.; Chen, J.; Langen, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. United States Am.* **2004**, *101*, 8331–8336.
- (271) Giasson, B. I.; Murray, I. V.; Trojanowski, J. Q.; Lee, V. M. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 2380–2386.
- (272) Crowther, R. A.; Jakes, R.; Spillantini, M. G.; Goedert, M. *FEBS Lett.* **1998**, *436*, 309–312.
- (273) Hoyer, W.; Cherny, D.; Subramaniam, V.; Jovin, T. M. *Biochemistry* **2004**, *43*, 16233–16242.
- (274) Dedmon, M. M.; Lindorff-Larsen, K.; Christodoulou, J.; Vendruscolo, M.; Dobson, C. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 476–477.
- (275) Lee, J. C.; Gray, H. B.; Winkler, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 16388–16389.
- (276) Lee, J. C.; Lai, B. T.; Kozak, J. J.; Gray, H. B.; Winkler, J. R. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 2107–2112.
- (277) Lashuel, H. A.; Hartley, D.; Petre, B. M.; Walz, T.; Lansbury, P. T. *Nature* **2002**, *418*.
- (278) Youdim, M. B.; Ben-Shachar, D.; Riederer, P. *Eur. Neurol.* **1991**, *31 Suppl 1*, 34–40.
- (279) Yu, W.-R.; Jiang, H.; Wang, J.; Xie, J.-X. *Neurosci. Bull.* **2008**, *24*, 73–78.
- (280) Breydo, L.; Uversky, V. N. *Met. : Integr. biometal Sci.* **2011**, *3*, 1163–1180.
- (281) Lee, J. C.; Gray, H. B.; Winkler, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6898–6899.
- (282) Sung, Y.-H.; Rospigliosi, C.; Eliezer, D. *Biochim. et Biophys. Acta* **2006**, *1764*, 5–12.
- (283) Hsu, S.-T. D.; Bertocini, C. W.; Dobson, C. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 7222–7223.
- (284) Anderson, J. P.; Walker, D. E.; Goldstein, J. M.; de Laat, R.; Banducci, K.; Caccavello, R. J.; Barbour, R.; Huang, J.; Kling, K.; Lee, M.; Diep, L.; Keim, P. S.; Shen, X.; Chataway, T.; Schlossmacher, M. G.; Seubert, P.; Schenk, D.; Sinha, S.; Gai, W. P.; Chilcote, T. J. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 29739–29752.
- (285) Bartels, T.; Choi, J. G.; Selkoe, D. J. *Nature* **2011**, *477*, 107–110.
- (286) Masliah, E.; Hashimoto, M. *Neurotoxicology* **2002**, *23*, 461–468.
- (287) Sefler, A. M.; Lauri, G.; Bartlett, P. A. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1996**, *48*, 129–138.
- (288) Schulte-Herbrüggen, T.; Sorensen, O. W. *J. Magn. Reson.* **2000**, *144*, 123–128.

Divulgación

Publicaciones

Sánchez-López C, Cortés-Mejía R, **Miotto MC**, Binolfi A, Fernández CO, Del Campo JM, Quintanar L, *Copper Coordination Features of Human Islet Amyloid Polypeptide: The Type 2 Diabetes Peptide*; Inorg. Chem. **2016** 50 (20), pp 10727-40.

Valiente-Gabioud AA, **Miotto MC**, Chesta ME, Lombardo V, Binolfi A, Fernández CO, *Phthalocyanines as Molecular Scaffolds to Block Disease-Associated Protein Aggregation*; Acc. Chem. Res. **2016** 49 (5), pp 801–8.

Arcos-López T, Qayyum M, Rivillas-Acevedo L, **Miotto MC**, Grande-Aztatzi R, Fernández CO, Hedman B, Hodgson KO, Vela A, Solomon EI, 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.

Miotto MC, Valiente-Gabioud AA, Rossetti G, Zweckstetter M, Carloni P, Selenko P, Griesinger C, Binolfi A, Fernández CO, *Copper binding to the N-terminally acetylated, naturally occurring form of alpha-synuclein induces local helical folding*; J. Am. Chem. Soc. **2015** 137, 6444-7.

Hauser-Davis RA, de Freitas LV, Cukierman DS, Cruz WS, **Miotto MC**, Landeira-Fernandez J, Valiente-Gabioud AA, Fernández CO, Rey NA, *Disruption of zinc and copper interactions with A β (1-40) by a non-toxic, isoniazid-derived, hydrazone: a novel biometal homeostasis restoring agent in Alzheimer's disease therapy?*; Metallomics **2015** 7, 743-7.

Miotto MC, Binolfi A, Zweckstetter M, Griesinger C, Fernández CO, *Bioinorganic chemistry of synucleinopathies: Deciphering the binding features of Met motifs and His-50 in AS-Cu(I) interactions*; J. of Inorg. Biochem. **2014** 141, 208-211.

Miotto MC, Rodriguez EE, Valiente-Gabioud AA, Torres-Monserrat V, Binolfi A, Quintanar L, Zweckstetter M, Griesinger C, Fernández CO. *Site-Specific Copper-Catalyzed Oxidation of α -Synuclein: Tightening the Link between*

Metal Binding and Protein Oxidative Damage in Parkinson's Disease; *Inorg. Chem.* **2014** 53 (9), 4350–58.

Reuniones científicas

Presentación oral corta y presentación de poster del trabajo titulado “*NMR structural characterization of the complexation of Cu(I) by acetylated alpha-Synuclein*” - III Workshop On Magnetic Resonance “*NMR and EPR at the Forefront of Research*”, Santa Fe, Argentina, **2016**.

Coautoría del trabajo, presentado como poster y de manera oral, titulado “*A Non-toxic Isoniazid-Derived Hydrazone Effectively Disrupts Copper And Zinc Interactions With The Amyloid- β Peptide: Implications For Alzheimer's Disease Treatment*” - 29th International Conference of Alzheimer's Disease, San Juan, Puerto Rico, **2014**.

Presentación oral corta y presentación de poster del trabajo titulado “*Metallobiology of neurodegenerative diseases: Structural and mechanistic basis behind the acceleration of amyloid protein assembly*” - 18th International Society of Magnetic Resonance Meeting (ISMAR), Río de Janeiro, Brasil, **2013**.

Presentación de poster del trabajo titulado: “*Structural basis behind the high-affinity coordination of Cu(I) to alpha-synuclein and the induced oxidative damage: An NMR study*” - Frontiers in Bioscience Meeting, Buenos Aires, Argentina, **2012**.

Presentación de poster del trabajo titulado: “*Oxidative damage and amyloid aggregation in alpha-synuclein*” - XLI Annual Meeting of the Argentinian Society of Biophysics, Tucumán, Argentina, **2012**.