

EVALUACIÓN DE LOS SITIOS DE ADSORCIÓN DE COBRE EN LA  
 $\beta$ -2-MICROGLOBULINA

CLAUDIA JULIANA ULLOA RODRÍGUEZ

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS-DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
Bucaramanga-Santander  
2010

EVALUACIÓN DE LOS SITIOS DE ADSORCIÓN DE COBRE EN LA  
 $\beta$  -2-MICROGLOBULINA

CLAUDIA JULIANA ULLOA RODRÍGUEZ

Trabajo de investigación para optar el título de:

QUIMICO

Director  
CRISTIAN BLANCO TIRADO  
Químico, PhD.

Codirector  
MARIO ALBERTO BARÓN RODRÍGUEZ  
Químico

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS-DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
Bucaramanga-Santander

2010

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia por su apoyo incondicional. A mi mamá Rosalba Rodríguez por inculcarme la disciplina necesaria para enfrentar los retos académicos. A mi padre por apoyarme económicamente durante mi tesis. A mi tía Luisa, mis abuelas y mi abuelo Ángel, por ser mi apoyo moral y espiritual.

A mi familia GIFTEX, en especial a Jorge Quintero por su ayuda incondicional, a Mario Barón por dirigir este trabajo de investigación, al profe Cristian Blanco por ser la cabeza principal de estas ideas. A Deisy, Sonia, Luisa, Yorguin, Cesar, Gato. A todos, gracias por hacer parte de mis días y por llenar mi mente de buenas ideas y mi corazón de bonitos sentimientos.

A la familia Rojas Anicchiarico y Villarreal solano por hacerme parte de sus familias y permitirme compartir inolvidables momentos.

A mis amigos, Sandrita, Laura la chucu, Cachaco, Hans, José y a todos aquellos que hicieron parte de este logro.

A mis profesores que hicieron parte de mi formación académica en esta institución, en especial al profe Palma a quien admiro y aprecio.

En general a la vida por darme la oportunidad de compartir los últimos años con personas que han sido parte fundamental en mi formación como mujer, persona y científica.

A todos los que me inculcaron el amor a la ciencia. Gracias!!!

## TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>15</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>17</b>
<b>1. MARCO TEÓRICO</b>	<b>18</b>
1.1 Amiloidosis °	18
1.1.1 Amiloidosis Relacionada con Diálisis	19
1.2 Química de coordinación	20
1.2.1 Teoría de ABDB	20
1.2.2 Iones metálicos en solución	21
1.3 $\beta$ -2-Microglobulina	23
1.3.1 Forma funcional	23
1.3.2 Forma estructural	24
1.4 Cobre en sistemas biológicos	25
1.5 Herramientas computacionales	26
1.5.1 Docking molecular	26
1.5.2 Algoritmo genético	27
1.5.3 Campos de fuerza	27
1.5.4 Autodock	28
1.5.5 Función de energía libre	28
<b>2 ESTADO DEL ARTE</b>	<b>31</b>
<b>3 METODOLOGÍA</b>	<b>50</b>
3.1 Determinación de los sitios de adsorción	50
3.1.1 Selección de estructuras de partida	50
3.1.2 Docking molecular: Rígido y Flexible	51
3.2 Determinación de la afinidad	53
3.3 Validación de resultados	53
<b>4 RESULTADOS Y DISCUSIONES</b>	<b>54</b>

4.1 Sitios de adsorción del Cobre en la $\beta$ 2m	54
4.1.2 Docking molecular	54
4.1.3 Docking rígido	54
4.1.4 Docking flexible	56
4.2 Determinación de la afinidad	73
4.3 Validación de resultados	77
<b>5 CONCLUSIONES</b>	<b>82</b>
<b>6 RECOMENDACIONES</b>	<b>84</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>85</b>

## LISTADO DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Descripción de los principales tipos de amiloides	<b>18</b>
<b>Tablas 2.</b> Escala de dureza de Pearson de metales y sustancias químicas pertenecientes a sistemas biológicos	<b>21</b>
<b>Tabla 3.</b> Energías del proceso de adsorción del Cobre en la $\beta 2m$ . Para el Cu(0)-modelo A, el Cu(+1)-modelo A, el Cu(+2)-modelo C.	<b>55</b>
<b>Tabla 4.</b> Energías del proceso de adsorción del Cobre en el modelo A, para las conformaciones de menor energía docking de las tres cargas del metal.	<b>63</b>
<b>Tabla 5.</b> Energías del proceso de adsorción del Cobre en la $\beta 2m$ . Cu(0)-modelo C, Cu(+1)-modelo C, el Cu(+2)-modelo B.	<b>68</b>
<b>Tabla 6.</b> Energías del proceso de adsorción del Cu(0) en los modelos A, B, C, D, para las conformaciones de menor energía docking ( $<\Delta G$ de enlace).	<b>73</b>
<b>Tabla 7.</b> Energías del proceso de adsorción del Cu(+2) en el modelo C, para las conformaciones de menor energía docking ( $<\Delta G$ de enlace).	<b>74</b>
<b>Tabla 8.</b> Conformaciones de mayor espontaneidad ( $<\Delta G$ de enlace) del docking flexible (df) (parte I,II,III).	<b>75</b>

## LISTADO DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estables estructuras calculadas para: A) $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_8]^{2+}$ y B) $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+}$	<b>22</b>
<b>Figura 2.</b> Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH-I) código <i>Protein Data Bank</i> 1DUZ (19). En azul la $\beta 2\text{m}$ .	<b>23</b>
<b>Figura 3.</b> Geometría de la $\beta 2\text{m}$ .	<b>24</b>
<b>Figura 4.</b> Diagrama de los estados de enlace y de no-enlace para las interacciones inter e intramoleculares de la proteína y el ligando.	<b>29</b>
<b>Figura 5.</b> Etapas del desarrollo de la DRA.	<b>32</b>
<b>Figura 6.</b> Fibras amiloides de $\beta 2\text{m}$ . Imagen visualizada por Microscopia de Transmisión Electrónica luego de seis días de incubación de $\beta 2\text{m}$ con $\text{Cu}(\text{II})$ .	<b>34</b>
<b>Figura 7.</b> Cambios estructurales en la $\beta 2\text{m}$ en presencia de $\text{Cu}(\text{II})$ . Isomerización de la Pro32 y exposición al solvente de la Phe30.	<b>35</b>
<b>Figura 8.</b> Modelo propuesto del papel catalítico del Cobre en la oligomerización de la $\beta 2\text{m}$ .	<b>36</b>
<b>Figura 9.</b> Geometría de coordinación cuadrado plana del $\text{Cu}(\text{II})$ en el hexámero mutante H13F ( <i>pdb</i> 3CIQ) (42) y en el fragmento HGGGW del octapéptido de la PrP.	<b>37</b>
<b>Figura 10.</b> Posibles sitios de coordinación del $\text{Cu}(\text{II})$ en la $\beta 2\text{m}$ elucidados por el método MCO/MS.	<b>39</b>
<b>Figura 11.</b> Reacciones de los residuos (Histidina, Tirosina, Serina y Treonina) con DEPC.	<b>41</b>
<b>Figura 12.</b> Posible región de coordinación del $\text{Cu}(\text{II})$ en la $\beta 2\text{m}$ .	<b>43</b>
<b>Figura 13.</b> Comparación de la estructura cristalina del	<b>45</b>

monómero de  $\beta 2m$  (verde) (*pdb* 1LDS) (22) y una subunidad del hexámero H13F (azul) (*pdb* 3CIQ) (42) que ilustra la reposición del Asp59 en presencia del Cobre.

**Figura 14.** Interacciones entre la cadena B y C en el hexámero H13F (*pdb* 3CIQ) (42), mostrando los puentes salinos formados entre el Asp59 (D59)- Lys19 (K19) y la Arg3 (R3)-Glu16 (E16). **46**

**Figura 15.** Aminoácidos que están localizados en las hojas (A) ABDE Y (B) CFG de la  $\beta 2m$ . **47**

**Figura 16.** Comparación entre los modelos más representativos del proceso de minimización de energía (B, C, D) (gris) con la estructura de partida (A) (azul), código PDB 1DUZ (19). Desviación del *backbone* a) r.m.s= 1.409 Å entre el modelo A-B b) r.m.s= 1.412 Å entre el modelo A-C d) r.m.s= 1.220 Å entre el modelo A-D. **50**

**Figura 17.** Energías de adsorción representativas ( $< \Delta G$  de enlace) de los cuatro modelos de  $\beta 2m$ , producto de las simulaciones de docking molecular rígido, con las diferentes cargas del Cobre. **54**

**Figura 18.** Mejores conformaciones ( $< \Delta G$  de enlace) de las simulaciones de docking molecular rígido. A) Adsorción del Cu(0) en el modelo A (-0.11KCal/mol), B) Adsorción del Cu(+1) en el modelo A (-4.42KCal/mol), C) Adsorción del Cu(0) en el modelo C (-10.77KCal/mol). Las distancias de adsorción están dadas en Å. **56**

**Figura 19.** Energías de adsorción, producto de las simulaciones de docking molecular del Cobre en el modelo A. Para cada carga del metal (0,+1 y +2) se realizaron simulaciones por triplicado. Se obtuvo un total de 25 conformaciones. **58**

**Figura 20.** Mejores conformaciones ( $< \Delta G$  de enlace) de las simulaciones de docking molecular para el Cu(0) en el modelo **60**

A. A) (-15.13KCal/mol), B) (-14.98KCal/mol), C) (-14.76KCal/mol). Las distancias de adsorción están dadas en Å.

**Figura 21.** Formación de un puente de hidrógeno intermolecular entre la Ser57 (HG) y el Asp59 (OD1) con una energía de -3.921 KCal/mol La distancia esta dada en Å. **60**

**Figura 22.** Mejores conformaciones ( $< \Delta G$  de enlace) de las simulaciones de docking molecular para el Cu(+2) en el modelo A. A) (-18.69KCal/mol) (3/25), B) (-16.18 KCal/mol), (1/25). Las distancias de adsorción están dadas en Å. **61**

**Figura 23.** Formación de un puente de hidrógeno intramolecular entre Asp98 (HN) y el Asp98 (OD2), con una energía de -0.145 kCal/mol. La distancia esta dada en Å **62**

**Figura 24.** Energías de adsorción representativas ( $< \Delta G$  de enlace), de las simulaciones de docking molecular del Cobre en los cuatro modelos, variando las cargas del metal. **63**

**Figura 25.** a) Comparación del modelo B(gris) con la estructura de partida del proceso de dinámica (modelo A-azul). Desviación del *backbone* r.m.s= 1.409 Å. b) Comparación de la estructura de partida B (azul) y la conformación del proceso de docking (gris). c) conformación del proceso de adsorción, con una energía docking de -28.45 KCal/mol (4/25). Las distancias de adsorción están dadas en Å. **65**

**Figura 26.** a) Región de mayor espontaneidad en el proceso de adsorción del Cu(0) en el modelo C. b) Conformación de menor energía docking (-18.21 KCal/mol) (2/25). **65**

**Figura 27.** a) Región de mayor espontaneidad en el proceso de adsorción del Cu(0) en el modelo B. b) Conformación de menor energía docking (-17.17 kCal/mol) (1/25). **66**

**Figura 28.** Conformaciones de menor energía docking en el **67**

proceso de adsorción del Cu(0). a) Modelo C (2/25)( -18.05 KCal/mol) ,b) Modelo C (1/25)( -17.63KCal/mol), c) Modelo D (1/25) (-16.32KCal/mol).

**Figura 29.** Formación de un puente de hidrógeno intermolecular entre la His13 (HE2) y el Glu16 (OE2) con una energía de -3.264 KCal/mol. La distancia esta dada en Å. **67**

**Figura 30.**a) Coordinación del Cobre en una subunidad del hexámero mutante H13F (pdb 3CIQ) b) Conformación de menor energía docking (-14.26 KCal/mol) (1/25), de la adsorción del Cu(0) en el modelo C. Las distancias de adsorción están dadas en Å. **70**

**Figura 31.**Comparación de la estructura cristalina de una subunidad del hexámero H13F (verde) (pdb 3CIQ) (42) y la conformación de la adsorción del Cu(0) en el modelo C (azul). Desviación del *backbone* r.m.s= 1.303 Å. **70**

**Figura 32.**Comparación de la estructura cristalina de una subunidad del hexámero H13F (verde) (pdb 3CIQ) (42) y la conformación de la adsorción del Cu(0) en el modelo C (azul) que ilustra las diferencias en la reposición del Asp59 y la Arg3. **71**

**Figura 33.**Mejores conformaciones (<  $\Delta G$  de enlace) de las simulaciones de docking molecular flexible III, para el Cu(0) a) (-14.36 KCal/mol)-modelo A (1/25), b) (-16.42 KCal/mol)-modelo B (1/25). **72**

**Figura 34.**Regiones de mayor espontaneidad en el proceso de adsorción del Cu(+2) y el Cu(+1) en la  $\beta$ 2m. **76**

**Figura 35.** Regiones de mayor espontaneidad en el proceso de adsorción del Cu(0) en la  $\beta$ 2m. **77**

## RESUMEN

**TÍTULO:** EVALUACION DE LOS SITIOS DE ADSORCION DEL COBRE EN LA  $\beta$ -2-MICROGLOBULINA\*

**AUTOR:** CLAUDIA JULIANA ULLOA RODRÍGUEZ, MARIO A. BARÓN RODRÍGUEZ, CRISTIAN BLANCO TIRADO\*\*

**PALABRAS CLAVES:** AMILOIDOSIS,  $\beta$ -2-MICROGLOBULINA, COBRE, DOCKING.

La formación de fibras amiloides es un proceso en el que están involucradas diversas proteínas, que pasan de su forma soluble, a agregados moleculares insolubles. En la amiloidosis relacionada con largos tratamientos de diálisis (DRA, por sus siglas en inglés: *Dialysis Related Amyloidosis*), el material amiloide está constituido principalmente por  $\beta$ -2-microglobulina ( $\beta$ 2m), proteína que se precipita en el sistema musculo-esquelético de pacientes sometidos a largos tratamientos de diálisis, como resultado de insuficiencia renal crónica.

La primera etapa en la formación de fibras amiloides de  $\beta$ 2m es el proceso de coordinación del Cu(II), el cual se encuentra efectivamente presente en las membranas de diálisis. Se ha encontrado que el metal se deposita en la superficie de la  $\beta$ 2m. Este complejo es el inicio de la polimerización de la proteína a través de adiciones sucesivas de unidades que forman dímeros, tetrámeros y hexámeros, hasta lograr la formación de fibras amiloides.

Para determinar los sitios de adsorción del Cobre en la  $\beta$ 2m y conocer bases moleculares de la primera etapa del proceso de formación de fibras amiloides en la DRA, se realizaron múltiples simulaciones de docking molecular. Se evaluó el Cobre con diferentes cargas, i.e., 0, +1, +2; para estudiar la influencia del efecto electrostático sobre la adsorción del cobre.

De la múltiples simulaciones de docking molecular se puede concluir que la adsorción para el Cu(+1) y el Cu(+2) esta determinada por las fuerzas de Coulomb, a través de interacciones electrostáticas con aa con carga negativa en las cadenas laterales, tales como, Aspartatos y Glutamatos, expuestos en al superficie de la  $\beta$ 2m . En especial en la región del C-terminal (Asp96 y Asp98). Para el Cu(0) la adsorción esta determinada por las interacciones de VdW , en especial, con las histidinas expuestas en superficie (His31) y la región del N-terminal.

---

\*Proyecto de grado

\*\* Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Director Dr. Cristian Blanco Tirado

## ABSTRACT

**TITLE:** EVALUATION OF ADSORPTION SITES OF COPPER IN THE  $\beta$ -2-MICROGLOBULIN\*

**AUTOR:** CLAUDIA JULIANA ULLOA RODRÍGUEZ, MARIO A. BARÓN RODRÍGUEZ, CRISTIAN BLANCO TIRADO\*\*

**KEY WORDS:** AMYLOIDOSIS,  $\beta$ -2-MICROGLOBULIN, COPPER, DOCKING.

### DESCRIPTION:

The formation of amyloid fibril is a process in which they are involved different proteins, which move from its soluble to insoluble molecular aggregates. In Dialysis Related Amyloidosis (DRA), the amyloid material consists mainly to  $\beta$ -2-microglobulin ( $\beta$ 2m), a protein that is precipitated muscle-skeletal system of patients undergoing long dialysis as a result of chronic renal failure.

The first stage in the formation of amyloid fibers from  $\beta$ 2m is the coordination process of Cu(II), which is actually present in dialysis membranes. It is found that the metal is deposited on the surface of  $\beta$ 2m. This complex is the beginning of the polymerization of protein through successive additions of units that form dimmers, tetramers and hexamers, until the formation of amyloid fibrils.

In order to study the binding sites of copper in the  $\beta$ 2m protein and acquire new information about the amyloid fiber formation in the DRA, we evaluated the copper with different charges i.e., 0,+1,+2, for study the influence of the electrostatic effect on the copper adsorption.

We can conclude that adsorption of Cu(+1) and Cu(+2) is determined by the Coulomb forces through electrostatic interactions with charged amino acids the negative side chains such as aspartate and glutamate which are exposed on the surface of the protein mainly in the C-terminal (Asp96 y Asp98). For the Cu(0) adsorption is determined by Van der Waals interactions mainly in the His31 and N-terminal.

---

\*Degree project

\*\* Santander Industrial University, Science Faculty, School Chemistry, Director Dr. Cristian Blanco Tirado.

## INTRODUCCIÓN

La formación de fibras amiloides es un proceso en el que están involucradas diversas proteínas, que pasan de su forma soluble, a agregados moleculares insolubles. En la amiloidosis relacionada con largos tratamientos de diálisis (DRA, por sus siglas en inglés: *Dialysis Related Amyloidosis*) (1) el material amiloide está constituido principalmente por  $\beta$ -2-microglobulina ( $\beta$ 2m), proteína que se precipita en el sistema musculo-esquelético de pacientes sometidos a largos tratamientos de diálisis, como resultado de insuficiencia renal crónica (2).

La causa de la formación de fibras de  $\beta$ 2m *in vivo* no se conoce con claridad. Sin embargo, existen diversos factores que influyen en la formación de fibras amiloides *in vitro*. Por ejemplo, la incubación de la proteína  $\beta$ 2m en presencia de cantidades estequiométricas de Cobre (1,3). Este método es de relevancia en los procesos *in vivo*, debido que las condiciones experimentales son semejantes a las condiciones fisiológicas.

La primera etapa en la formación de fibras amiloides es el proceso de coordinación del Cu(II), el cual se encuentra efectivamente presente en las membranas de diálisis (1,3). Se ha encontrado que el metal se deposita en la superficie de la  $\beta$ 2m. Este complejo es el inicio de la polimerización de la proteína a través de adiciones sucesivas de unidades que forman dímeros, tetrámeros y hexámeros, hasta lograr la formación de fibras amiloides (4-5).

Estudios de RMN a pH 6,6 indican que el Cu(II) se une a las histidinas (His) His13 y His31(6).

Estudios posteriores muestran que la His31 es el único residuo de la estructura nativa de la  $\beta$ 2m implicado en la coordinación con el Cu(II), mientras que las His13, His51 y His84 son los residuos que coordinan al Cu(II) en el estado no nativo de la proteína (7). Un estudio posterior de RMN heteronuclear determinó que a pH 7,0 las tres histidinas superficiales His13, His31 y His51, están implicadas en la coordinación del Cu(II) (8).

Estudios recientes evidencian la presencia de los grupos N-terminal de la Ile1, amida de la Gln2, imidazol de la His31 y carboxilo del Asp59, coordinados al Cu(II) en el monómero de  $\beta$ 2m (5). Sin embargo, actualmente no se conoce específicamente la manera como el Cobre se asocia a la  $\beta$ 2m ni tampoco se conocen las bases moleculares de la asociación de este metal de transición en sitios de coordinación que inducen la DRA.

Por tanto, para determinar los sitios de adsorción del Cobre en la  $\beta$ 2m y conocer bases moleculares de la primera etapa del proceso de formación de fibras amiloides en la DRA, se realizaron múltiples simulaciones de docking molecular. Se evaluó el Cobre con diferentes cargas, i.e., 0, +1, +2; para estudiar la influencia del efecto electrostático sobre la adsorción del cobre.

Entender factores involucrados en el proceso de oligomerización de la  $\beta$ 2m es de importancia, no sólo para explicar este fenómeno biológico, si no también para abordar racionalmente enfermedades relacionadas con la precipitación de proteínas. Consideramos que el entendimiento de las bases moleculares de la precipitación de proteínas puede ayudar, a futuro, a diseñar procedimientos y/o fármacos que controlen o mitiguen la formación de fibras amiloides.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Evaluar los sitios de adsorción del Cobre en la  $\beta$ -2-Microglobulina a través de simulaciones de docking molecular, con el fin de determinar bases moleculares de la primera etapa de formación de fibras amiloides en la DRA.

### Objetivos específicos

Determinar los sitios de adsorción del Cobre en la  $\beta$ 2m, variando la carga del metal (i.e., 0,+1,+2,) para evaluar el efecto electrostático en el sitio de adsorción. A través de *docking* molecular rígido y flexible.

Determinar la afinidad de la adsorción del Cobre en la  $\beta$ 2m, evaluando las conformaciones de mayor estabilidad ( $<\Delta G$  de enlace).

Validar los resultados de docking molecular con los datos reportados en la literatura para los sitios de coordinación del Cu(II) en la  $\beta$ 2m.

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1. Amiloidosis

Históricamente el término *amiloide* ha sido usado para describir depósitos extracelulares de proteínas asociadas con alguna enfermedad (9). En la actualidad se incluyen depósitos intracelulares del material amiloide. Así, el término amiloide caracteriza un grupo de enfermedades, que comparten la formación de fibras amiloides.

El depósito extracelular e intracelular esta formado principalmente por fibras compuestas de subunidades de bajo peso molecular (5 a 25 KD) de una variedad de proteínas. De acuerdo con su origen y con el tipo de proteína depositada existen varias clases de amiloides (10). En la tabla 1 se presentan los más comunes tipos de amiloides

Abreviatura	Tipo de amiloide	Descripción
AL	Amiloide de cadena ligera	Contiene inmunoglobulina de cadena ligera ( $\lambda, \kappa$ ) derivadas de las células I plasmáticas
AA	Amiloide Asociada	Proteína no-inmunoglobulina sintetizada en el hígado
A $\beta$	$\beta$ Amiloide	Encontrada en la enfermedad de Alzheimer
$\beta$ 2M	$\beta$ 2Microglobulina	Es una proteína normal del suero, parte del complejo mayor de Histocompatibilidad (MHC) clase I. Puede ocurrir en largos tratamiento de hemodiálisis
IAPP	Amylin	Encontrada en el páncreas de pacientes con diabetes tipo II

PrP	Proteína Prion	En la enfermedad del Prion, la PrP se deposita en los tejidos. Por ejemplo en la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob .
-----	----------------	--

**Tabla 1.** Descripción de los principales tipos de amiloides (10).

Los depósitos de fibras amiloides pueden presentarse en cualquier órgano, incluyendo el corazón, riñones, tracto gastrointestinal, sistema musculoesquelético y sistema nervioso central (SNC) (11).

Aunque se han reportado modelos de formación de fibras amiloides de  $\beta 2m$ , incluso combinados con técnicas docking (12), en la actualidad este proceso tiene lugar siguiendo un mecanismo que aún no se ha esclarecido completamente.

### 1.1.1. Amiloidosis Relacionada con Diálisis

La amiloidosis relacionada con largos tratamientos de diálisis (DRA) es un tipo de amiloidosis asociada al depósito de  $\beta 2m$  (2). El síndrome de túnel del carpo y el dolor en hombros son las características clínicas más importantes de este tipo de amiloidosis (11).

El tratamiento clínico que se realiza para la DRA, es el trasplante de riñón, lo cual ha demostrado detener la enfermedad. Sin embargo, a falta de un suministro de órganos de remplazo ó para el caso de pacientes con problemas cardiovasculares y de avanzada edad, la única esperanza es el desarrollo de procedimientos para prevenir la DRA, e.g., el desarrollo de membranas de diálisis con mayor bioselectividad y/o el desarrollo de terapias con pequeñas moléculas (fármacos) que controlen o mitiguen la asociación de  $\beta 2m$  en fibras amiloides. Por tanto, estudiar los posibles factores que inducen la formación de fibras de  $\beta 2m$ , es una herramienta necesaria para el desarrollo de procedimientos contra la DRA.

## 1.2 Química de Coordinación

Una teoría que nos permite de manera cualitativa establecer la acción de una molécula (ligando) sobre un determinado metal es la teoría de ácidos y bases duros y blandos (ABDB) (13)

### 1.2.1 Teoría ABDB

Ralph Pearson definió la teoría ABDB, teoría HSAB (por sus siglas en inglés: *hard and soft acid and base*) (13). Lo fundamental de este principio es que los ácidos duros (metales) prefieren interactuar con las bases duras (átomos donadores) y que los ácidos blandos prefieren interactuar con las bases blandas.

Los iones metálicos difieren en su afinidad por las biomoléculas y esta fuerza de enlace se refleja en la escala de dureza (tabla 2). En los sistemas biológicos e.g. el ión  $\text{Ca}^{2+}$  (ácido duro) se encuentra frecuentemente coordinado con carboxilato o base conjugada del  $\text{RCOOH}$  (base dura) y el  $\text{Cu}^{2+}$  (ácido intermedio) con nitrógenos del anillo imidazol (base intermedia) del residuo histidina.

El comportamiento de un centro metálico como duro o blando depende de las interacciones estéricas de los ligandos que lo rodean en solución. Para los metales redox activos, como es el caso del Cobre, los ligandos se acomodan al medio para dar cabida a los diferentes estados de oxidación del metal (14). Por tanto, es de importancia conocer en más detalle la química de coordinación de un ión metálico en solución.

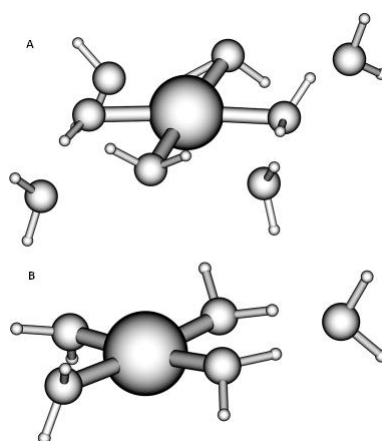
Ácidos			Bases		
Duros	Intermedios	Blandos	Duras	Intermedias	Blandas
Na <sup>+</sup>	Fe <sup>2+</sup>	Cu <sup>+</sup>	OH <sup>-</sup>	Amina	Tiol SH
K <sup>+</sup>	Co <sup>2+</sup>	Pb <sup>2+</sup>	RCOO <sup>-</sup>	Imina	Tioéter C-S-C
Mn <sup>2+</sup>	Ni <sup>2+</sup>	Cd <sup>2+</sup>	Carbonilo C=O	Amida	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub>
Fe <sup>3+</sup>	Cu <sup>2+</sup>	Tl <sup>+</sup>	H <sub>2</sub> O	Amina 2 <sup>o</sup>	
Co <sup>3+</sup>	Zn <sup>2+</sup>	Hg <sup>2+</sup>	NH <sub>3</sub>	Imidazol	
Mg <sup>2+</sup>	Mn <sup>2+</sup>	Ag <sup>+</sup>			
Ca <sup>2+</sup>		Au <sup>+</sup>			
Al <sup>3+</sup>		Sn <sup>2+</sup>			
Cr <sup>3+</sup>		Bi <sup>3+</sup>			
Fe <sup>3+</sup>					

**Tablas 2.** Escala de dureza de Pearson de metales y sustancias químicas pertenecientes a sistemas biológicos (adaptado de 15).

### 1.2.2 Iones Metálicos en Solución

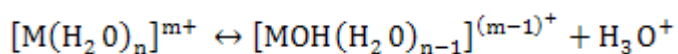
En solución acuosa un ión metálico M esta normalmente coordinado con moléculas de agua. Los complejos del Cu(II) en agua son normalmente expresados como [Cu(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>]<sup>2+</sup> (16). Sin embargo, se han publicado trabajos experimentales y computacionales (14, 16) que evidencian una estructura de coordinación del Cu(II) en solución como: [Cu(H<sub>2</sub>O)<sub>8</sub>]<sup>2+</sup>, incluso estructuras que contienen cinco moléculas de agua. (figura 1).

Estas estructuras consisten de una primera esfera de coordinación que constan de cuatro moléculas de agua coordinadas directamente con el ión metálico en posiciones ecuatoriales, seguida de adicionales moléculas de agua que se unen mediante puentes de hidrógeno a las moléculas de la primera esfera de coordinación.



**Figura 1.** Estables estructuras calculadas para: A)  $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_8]^{2+}$  y B)  $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+}$  (adaptado de 16).

Este tipo de solventes que forman puentes de hidrógeno, como es el caso del agua, pueden tener cierta influencia en la química de coordinación del metal. Para un caso general, se podría presentar la transferencia de un protón (reacción de hidrólisis) (Ecuación 1), el cual está limitado por el pH del medio (14)



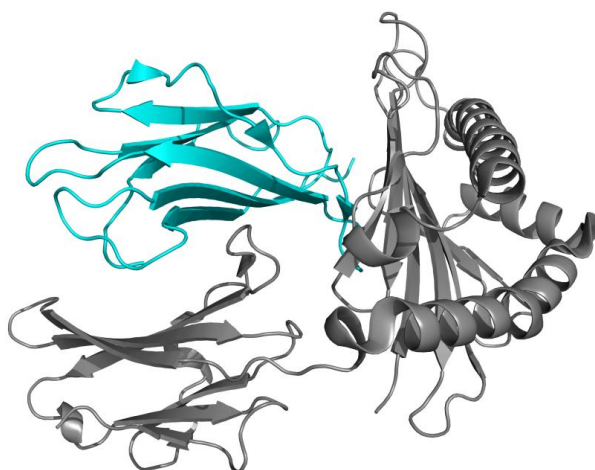
**Ecuación 1.** Reacción de hidrólisis en la solvatación de un ión metálico (adaptado de 14).

Los procesos de transferencia de protón, pueden revelar detalles de la influencia que tiene la solvatación en diversos procesos a nivel molecular. Por ejemplo, la influencia de la solvatación del Cobre en solución y el intercambio de Ligandos (residuos de aminoácidos) por moléculas de agua, para llevar a la formación de complejos de coordinación en sistemas biomoleculares, en los que este metal se ha encontrado presente. Como es el caso de las proteínas propensas a formar fibras amiloides (1,3).

### 1.3 $\beta$ -2-Microglobulina ( $\beta$ 2m)

#### 1.3.1 Forma Funcional

La  $\beta$ 2m es una proteína de aproximadamente 12KDa, que se expresa en la superficie de todas las células (17). La  $\beta$ 2m forma parte del Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase I (CMH-I) y se une a este a través de una unión no covalente en la superficie celular (figura 2). El CMH-I es un tipo de gen presente en el cromosoma 6 de todas las células nucleadas y esta formado por un conjunto de proteínas implicadas en la presentación de antígenos a los linfocitos T, generando una respuesta inmunitaria, que permite la identificación de los cuerpos propios y extraños, estos últimos eliminados del organismo mediante diferentes mecanismos (18).



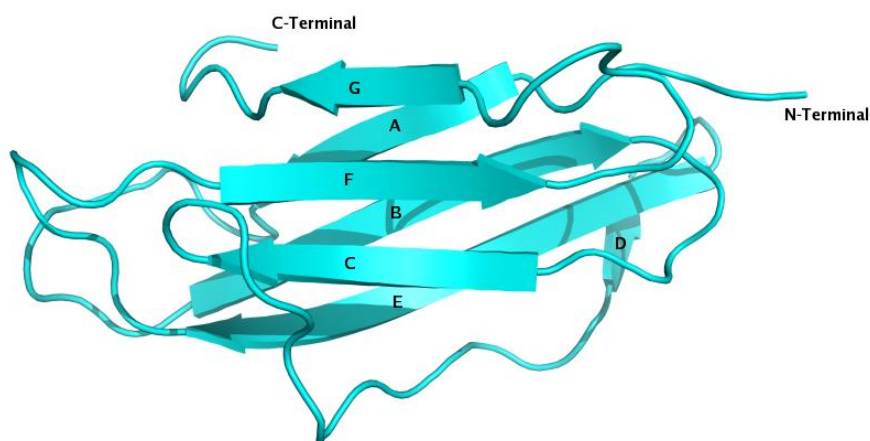
**Figura 2.** Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH-I) código *Protein Data Bank* 1DUZ (19). En azul la  $\beta$ 2m.

La función mejor caracterizada de la  $\beta$ 2m es interaccionar y estabilizar la estructura terciaria del CMH-I. La  $\beta$ 2m está presente fisiológicamente como monómero (20) y es transportada por los líquidos plasmáticos al riñón donde es degradada.

Sin embargo, en el caso de fallas renales, como se da en los pacientes sometidos a largos tratamiento de diálisis, la concentración de  $\beta 2m$  en el suero puede incrementarse hasta 60 veces de su valor normal ( $\sim 0.1 \mu M$ ) (21). Este incremento es necesario pero no suficiente para la formación de fibras amiloides en la DRA (2).

### 1.3.2 Forma Estructural

La  $\beta 2m$  es una proteína globular formada por 99 residuos de aminoácidos. En su estructura secundaria, la  $\beta 2m$  adopta una conformación de 7 hojas plegadas tipo  $\beta$  (cadenas A, B, C, D, E, F, G) (figura 3).



**Figura 3.** Geometría de la  $\beta 2m$  (19)

El plegamiento de la  $\beta 2m$  da lugar a dos hojas- $\beta$  de diferente tamaño, la hoja- $\beta$  de mayor tamaño está compuesta por las cadenas A, B, D, E, y la de menor tamaño esta compuesta por las cadenas C, F, G. La estructura terciaria es estabilizada por la interacción entre las dos hojas- $\beta$  conectadas por un puente disulfuro intramolecular, formado entre la Cys25 y la Cys80 (6).

La estructura cristalina de la  $\beta$ 2m ha sido elucidada por RMN (6,22). Aunque sólo un conjunto de datos se encuentra disponible en la *Protein Data Bank* (PDB: 1JNJ (6)). También por estudios de cristalografía de rayos-X. e.g. la  $\beta$ 2m como monómero (PDB: 1LDS) (22) y en la estructura 1DUZ (19).

#### **1.4 Cobre en Sistemas Biológicos**

El cobre es un oligoelemento esencial para los seres vivos. Hace parte de los procesos metabólicos, incluyendo la fosforilación oxidativa, la desintoxicación de radicales libres, síntesis y desnaturalización de neurotransmisores, formación de pigmentos, síntesis del tejido conectivo y metabolismo del hierro (23).

En el cuerpo humano, en condiciones fisiológicas, gran parte del Cobre es probablemente funcional, involucrado como cofactor de diversas enzimas redox, implicadas en reacciones de oxidación (24).

En el cuerpo humano el Cobre se encuentra en cantidades relativamente elevadas, por ejemplo: un adulto sano de 70 Kg contiene aproximadamente 110 mg de cobre, la mayor parte (46 mg) en el esqueleto y en la medula ósea, 26 mg en los músculos esqueléticos, 10 mg en el hígado, 8.8 mg en el cerebro y 6 mg en la sangre (25). Una fuente dietética de cobre proviene del uso de tuberías utilizadas en la plomería. El valor estipulado por la organización mundial de la salud del contenido de cobre en agua para uso humano es de 2mg/L (26).

La ceruloplasmina es la principal proteína del plasma humano que contiene cobre, comprometiendo cerca del 65% del cobre en el suero. El contenido de cobre en el suero es aproximadamente 13-25  $\mu$ M y la mayoría esta enlazado a proteínas del plasma (27).

En los procedimientos de diálisis se observaron posibles medios que permitieron la interacción de la  $\beta$ 2m con el Cobre libre (1). El primero es vía al dializado, donde un año de diálisis exponía a un paciente a 15.000-30.000 L de agua. El máximo nivel de cobre recomendado para la diálisis por la asociación americana de instrumentación medica es de 1.6  $\mu$ M. El segundo, fue el uso del complejo de cobre ( $\text{Cu}(\text{NH}_3)_4(\text{OH})_2$ ) en la preparación de las membranas utilizadas anteriormente para el dializado. Estas membranas contenían aproximadamente 2mg/m<sup>2</sup> de cobre (una típica membrana de diálisis es de 1-2 m<sup>2</sup>). Por tanto, estas vías de contaminación proveían una alta concentración de Cobre.

La influencia del Cobre en la DRA se observó en evidencias clínicas que reportaron una disminución de más del 50% de pacientes que no presentaron DRA al ser tratados con membranas sintéticas libres de cobre (28).

## **1.5. Herramientas Computacionales**

Los sitios de interacción de iones metálicos en sistemas biomoleculares son generalmente complejos y específicos (29). La mecánica molecular es una de las herramientas más utilizadas para evaluar el comportamiento de sistemas biomoleculares, los cuales se describen mediante modelos clásicos, es decir, campos de fuerza. Estos son ampliamente utilizados para sistemas macromoleculares de más de 1000 átomos. Para nuestro tema de estudio se utilizó el *docking* molecular, un método basado en campos de fuerza.

### **1.5.1 Docking molecular**

Los métodos Docking proteína-sustrato consisten de dos componentes: uno de ellos es el algoritmo de búsqueda, que considera posibles geometrías de enlace entre la proteína y el sustrato.

El otro es una función de peso (función *scoring*) que clasifica los resultados de búsqueda y selecciona la mejor geometría de enlace con base en las energías de los complejos ( $\Delta G$  de enlace), definida como la diferencia entre los estados enlazados y de no enlace del sustrato y la proteína (30).

### 1.5.2 Algoritmo Genético

El algoritmo genético Lamarckian (LGA) (31), es utilizado en los procesos de Docking. Se basa principalmente en la teoría evolucionista de Charles Darwin. Este representa los estados de los grados de libertad del sustrato como una cadena de dígitos, esta cadena es llamada gen. Una población de diferentes genes se genera aleatoriamente. Cada gen es evaluado energéticamente, con lo cual se seleccionan los genes de menor energía para formar una nueva población. Pares de los genes seleccionados son entrecruzados. En este proceso se selecciona un segmento del gen y los valores en este rango se intercambian entre ellos con el fin de encontrar una mejor solución, es decir, una conformación de menor energía libre de interacción molecular, la cual es sometida a una minimización de energía.

### 1.5.3 Campos de fuerza

La mecánica molecular describe los sistemas mediante campos de fuerza, i.e. interacciones de enlace, torsiones, ángulos e interacciones no enlazantes tales como VdW y electrostáticas, basados en métodos clásicos (Ecuación 2.) (31). Los campos de fuerza (AMBER (32), CHARMM, GROMOS, UFF, MM4) se han desarrollado con base en datos espectroscópicos, datos experimentales y cálculos *ab initio*, razón por la cual en muchos casos se ha demostrado que brindan respuestas formalmente correctas, a pesar de que no incluyen en la descripción de las propiedades moleculares el movimiento electrónico.

El campo de fuerza AMBER94 fue validado para ser utilizado en sistemas biomoleculares. La función del potencial está dada por la ecuación:

$$E_{Total} = \sum_{enlace} K_r (r - r_{eq})^2 + \sum_{angular} K_\theta (\theta - \theta_{eq})^2 + \sum_{torcional} \frac{V_r}{2} [1 + \cos(n\theta - \gamma)] + \sum_{i < j} \left[ \frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{\epsilon R_{ij}} \right]$$

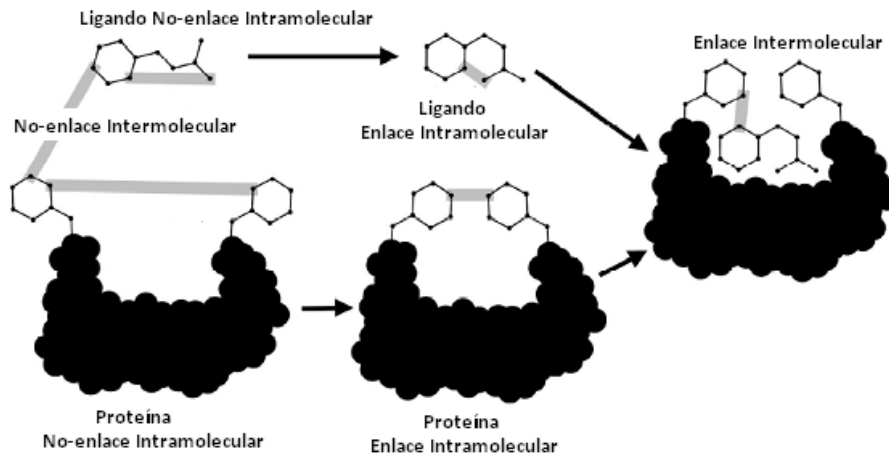
**Ecuación 2.** Función de energía del campo de fuerza AMBER94.

Donde el primer término representa las energías de los enlaces;  $K_r$  es la constante y  $r_{eq}$  es la distancia de equilibrio del enlace. El segundo término representa la energía angular, donde  $K_\theta$  es la constante y  $\theta_{eq}$  es el ángulo de equilibrio entre tres átomos. El tercer término representa la energía de torsión, donde  $V_r$  es la componente de Fourier,  $\theta$  es el ángulo de torsión y  $\gamma$  es el factor de desfase. El último término incluye: i) las interacciones de VdW, donde  $A_{ij}$  y  $B_{ij}$  son parámetros de interacciones de repulsión y atracción, respectivamente,  $R_{ij}$  es la distancia interatómica. y ii) las interacciones electrostáticas, donde  $q$  es la carga puntual de cada átomo y  $\epsilon$  representa la constante dieléctrica del medio.

#### 1.5.4 Autodock

Para evaluar los sitios de adsorción del Cobre sobre la superficie de la  $\beta 2m$  se utilizó el programa Autodock4 (33). Autodock es una herramienta adecuada para predecir los sitios y modos de enlace de un ligando en una biomolécula, sin un conocimiento previo de su localización y conformación, procedimiento conocido como *docking ciego* o *blind docking* (34).

#### 1.5.5 Función de energía libre



**Figura 4.** Diagrama de los estados de enlace y de no-enlace para las interacciones inter e intramoleculares de la proteína y el ligando (adaptada de 60).

Autodock calcula la energía como energía libre de Gibbs a partir del potencial que se calcula con base en los parámetros del campo de fuerza Amber (Ecuación 3). El ligando y la proteína inician en una conformación de no enlace. En el primer paso, se calculan las energías intramoleculares para la transición desde los estados de no enlace hasta la conformación del ligando y la proteína en el estado de enlace. En el segundo paso se evalúa la energía intermolecular de combinar el ligando y la proteína en su conformación de enlace (figura 4).

$$\Delta G_{docking} = (V_{enlace}^{L-L} - V_{no\ enlace}^{L-L}) + (V_{enlace}^{P-P} - V_{no\ enlace}^{P-P}) + (V_{enlace}^{P-L} - V_{no\ enlace}^{P-L} + \Delta S_{conf})$$

**Ecuación 3.** Función de energía libre de docking molecular. Donde L se refiere al ligando y P a la proteína

La energía V de la Ecuación 3, es la sumatoria de las energías de dispersión/repulsión, energía de las interacciones puente de hidrógeno, electrostáticas y energía de solvatación (Ecuación 4.). El último término  $\Delta S_{conf}$  define la entropía del sistema.

$$V = W_{vdw} \sum_{i,j} \left( \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) + W_{hbond} \sum_{i,j} E(t) \left( \frac{C_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{r_{ij}^{10}} \right) + W_{elec} \sum_{i,j} \frac{q_i q_j}{\epsilon(r_{ij}) r_{ij}} + W_{solv} \sum_{i,j} (S_i V_j + S_j V_i) + e^{-r_{ij}^2 / 2\sigma^2}$$

**Ecuación 4.** Energía de pares de interacción (V). Donde *i* es el índice de átomos del ligando y *j* el índice de átomos del receptor.

Las constantes W han sido optimizadas con base en un conjunto de constantes de enlace determinadas experimentalmente. El primer término de la ecuación es un potencial (6/12) para las interacciones de dispersión/repulsión. Los parámetros se basan en el campo de fuerza AMBER. El segundo es un término direccional de puentes de Hidrógeno, basado en un potencial (10/12).

Los parámetros C y D son parámetros para las interacciones de repulsión y atracción respectivamente, r es la distancia entre los átomos *i* y *j*. La función E(t) proporciona direccionalidad con base en un ángulo t, de una geometría ideal de un puente de hidrógeno. El tercer término es un potencial de Coulomb para las interacciones electrostáticas. El último término es un potencial de solvatación basado en el volumen de los átomos (V). Siendo  $\sigma$  la constante de distancia gaussiana (3,5 Å) y S un parámetro de solvatación propio de cada átomo.

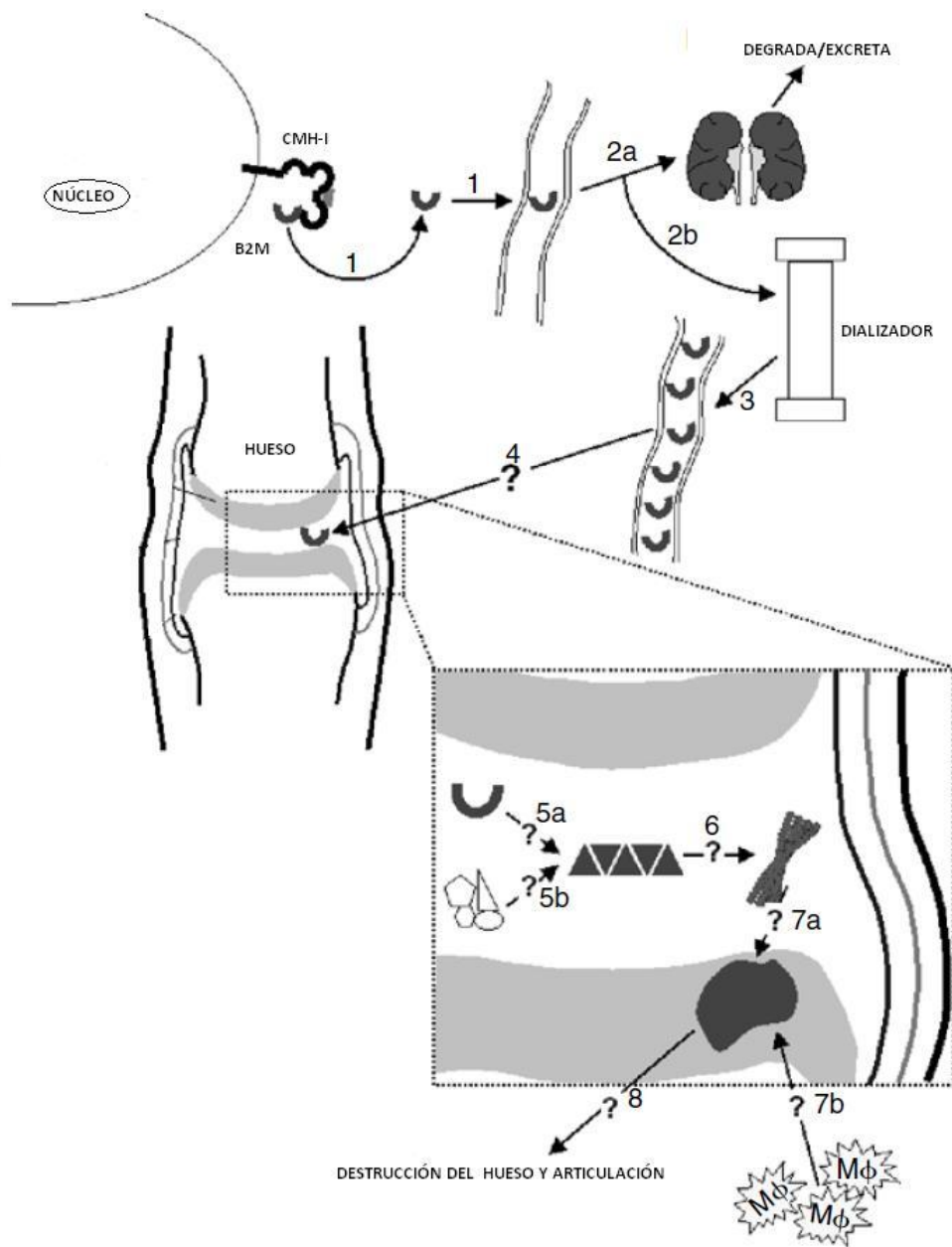
## 2. ESTADO DEL ARTE

La formación de fibras amiloides es un proceso implicado en diversas enfermedades e.g., la enfermedad de Alzheimer (35), Parkinson (36) y amiloidosis relacionada con largos tratamientos de diálisis DRA (1). Sin embargo, no se conoce con claridad los mecanismos por los cuales las proteínas solubles, implicadas en estas patologías, forman fibras amiloides insolubles. Entender los mecanismos de estos procesos es de importancia no sólo para explicar este fenómeno biológico si no también para abordar racionalmente estas enfermedades. Así, a futuro se puedan diseñar procedimientos y/o fármacos que controlen o mitiguen la formación de fibras amiloides.

La DRA es un tipo de amiloidosis asociada al depósito de  $\beta 2m$  (2). En la figura 5 se observan diferentes etapas del desarrollo de la DRA. La primera etapa [1] comprende la disociación de la  $\beta 2m$  del CMH-I y su entrada como monómero al suero plasmático. En individuos sanos, la  $\beta 2m$  es degradada y eliminada por el riñón [2a]. La etapa [2b] comprende la filtración de la sangre mediante dializado, en pacientes con fallas renales.

En la tercera etapa [3], se incrementa la concentración de  $\beta 2m$  hasta 60 veces de su valor normal ( $\sim 0.1 \mu M$ ). Debido a que las membranas de diálisis no remueven efectivamente la proteína de la sangre. Sin embargo, estos niveles elevados de  $\beta 2m$  no están correlacionados con la DRA (2,21).

La  $\beta 2m$  entra a las articulaciones por un mecanismo desconocido [4], donde forma un estado pre-fibrilar [5a], posiblemente con la ayuda de otros factores biológicos [5b]. Seguidamente este estado pre-fibrilar pasa a formar fibras amiloides [6], que se depositan en las articulaciones [7a], causando la infiltración de macrófagos ( $M\phi$ ) [7b]. Los macrófagos activados liberan citocinas que conlleva a la destrucción de las articulaciones y los huesos [8], que se traduce en el inicio de la fase sintomática de la DRA.



**Figura 5.** Etapas del desarrollo de la DRA (adaptado de 22)

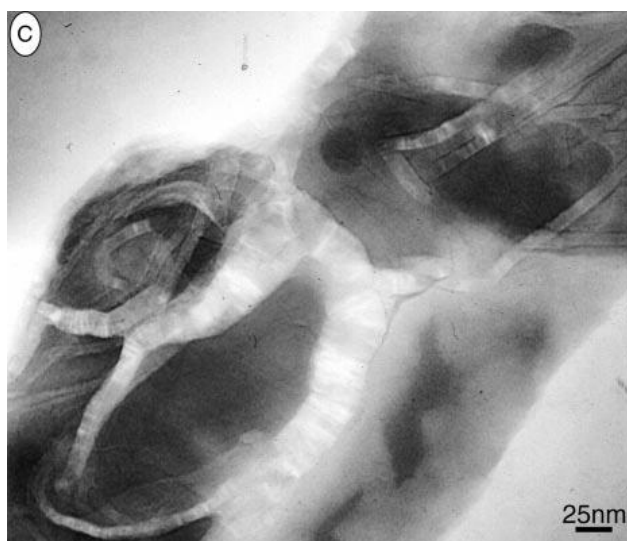
Si bien, la causa de la formación de fibras de  $\beta 2m$  *in vivo* no se conoce con claridad, existen otros factores *in vitro* para generar fibras amiloides de  $\beta 2m$ .

Las fibras de  $\beta 2m$  pueden ser generadas en condiciones ácidas (pH <3.6) (37), por remoción de los primeros seis aminoácidos del N-terminal (38), por mezcla de la  $\beta 2m$  con colágeno a pH 6.4 (39), y por la incubación de la  $\beta 2m$  en condiciones fisiológicas, en presencia de cantidades estequiométricas de Cobre (1,3).

Este último método es de relevancia en los procesos *in vivo*, debido a las cercanas condiciones fisiológicas utilizadas. En la etapa [5] del desarrollo de la DRA (figura 5) se han sugerido factores directamente relacionados con la terapia de diálisis, a estar implicados en el paso de la forma nativa de  $\beta 2m$  a insolubles fibras amiloides. Uno de los factores fisiológicamente relevantes, capaz de afectar la conformación y por tanto la agregación de proteínas/péptidos son los iones metálicos.

Miranker y colaboradores demostraron que la cantidad de Cobre presente en los procesos de diálisis puede ser suficiente para que este metal de transición sea un factor desencadenante *in vivo* de la formación de las fibras amiloides de  $\beta 2m$  (1).

Estos investigadores evidenciaron que el enlace del Cu(II) en presencia de 100mM de urea, es específico en comparación con el Ca(II) y el Zn(II). Además, mostraron que la desestabilización por Cu(II) únicamente promueve la formación de fibras de  $\beta 2m$  a 37°C y pH neutro. Las fibras presentaron un ancho entre 6-10 nm en el agregado amorfo (figura 6)



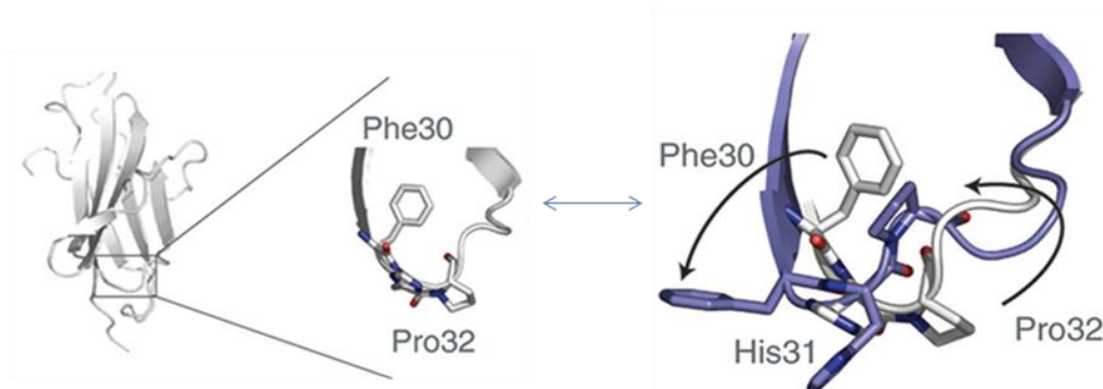
**Figura 6.** Fibras amiloides de  $\beta 2m$ . Imagen visualizada por Microscopía de Transmisión Electrónica luego de seis días de incubación de  $\beta 2m$  con  $Cu(II)$  (adaptado de 1)

La  $\beta 2m$  nativa es desestabilizada por el enlace del  $Cu(II)$ ,. A pH 6.5 (6), se ha observado que la His13 (*A-B loop*) y la His31 (*B-C loop*) son los residuos implicados en el enlace con el  $Cu(II)$ . Villanueva y colaboradores (8) mostraron que a pH 7 la His13, la His31 y la His51 están implicadas en la interacción con el  $Cu(II)$ .

El enlace del  $Cu(II)$  a la His51, incrementa la movilidad en las regiones adyacentes al sitio del enlace, debilitando los enlaces de hidrógeno a lo largo del *backbone* y alterando las interacciones hidrófobas, permitiendo la formación de un precursor necesario para la formación de las fibras amiloides de  $\beta 2m$  (8). De hecho, los cambios conformacionales observados en la cadena D de la estructura cristalina de la  $\beta 2m$  humana, generan un cambio en la orientación de la His51 de 180 grados (22), lo cual podría facilitar el enlace del  $Cu(II)$  (8).

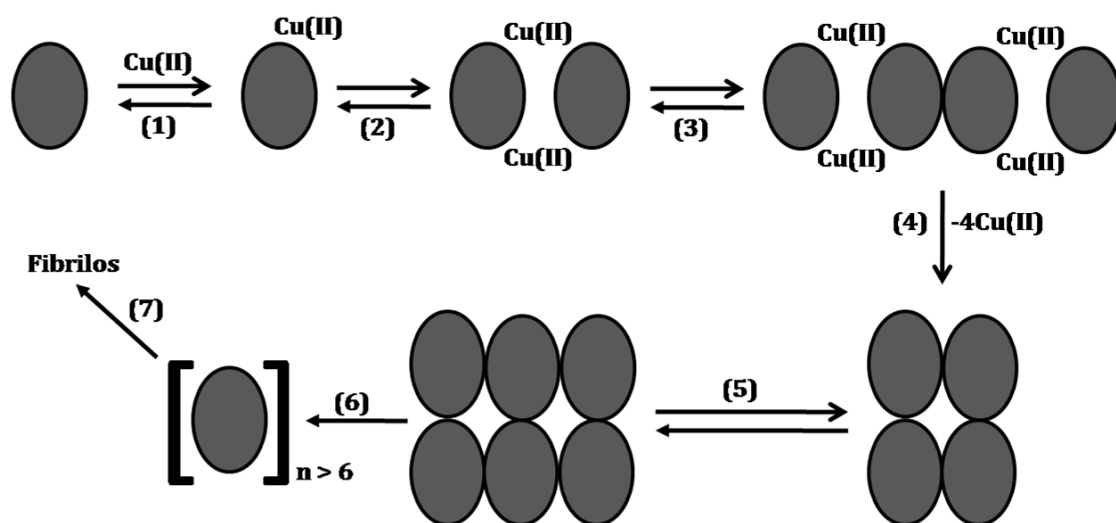
La isomerización cis/trans de la Pro32 es otro factor implicado en la formación de fibras de  $\beta 2m$  a pH 7. La estructura atómica fue resuelta por Rayos-X (*pdb* 2F8O). En este estudio Eakin y colaboradores (40) establecieron bases químicas y estructurales de los cambios de la  $\beta 2m$  requeridos para la oligomerización. El Cu(II) puede actuar como ácido Lewis en la Pro32, interaccionando con el par libre de electrones del nitrógeno y debilitando el enlace amida. Además, el enlace del Cu(II) genera una rotación de la Phe30 desde el medio hidrofóbico a la superficie accesible al solvente de la proteína (figura 7). Estos estudios destacan el hecho de que sólo unos pequeños cambios en la soluble y estable  $\beta 2m$  pueden incidir en el proceso de oligomerización.

Los cambios estructurales son requeridos para iniciar el proceso de oligomerización. Eakin y colaboradores evidenciaron que el Cu(II) es necesario para la formación y estabilización de intermediarios oligoméricos de  $\beta 2m$ , sugiriendo que el Cu(II) actúa como un factor iniciador de la amiloidosis (20). Los intermediarios oligoméricos, dímeros y hexámeros en tamaño, requieren de Cu(II) para su formación, pero una vez generados no necesitan del catión metálico para su estabilización (41).



**Figura 7.** Cambios estructurales en la  $\beta 2m$  en presencia de Cu(II). Isomerización de la Pro32 y exposición al solvente de la Phe30 (adaptado de 40).

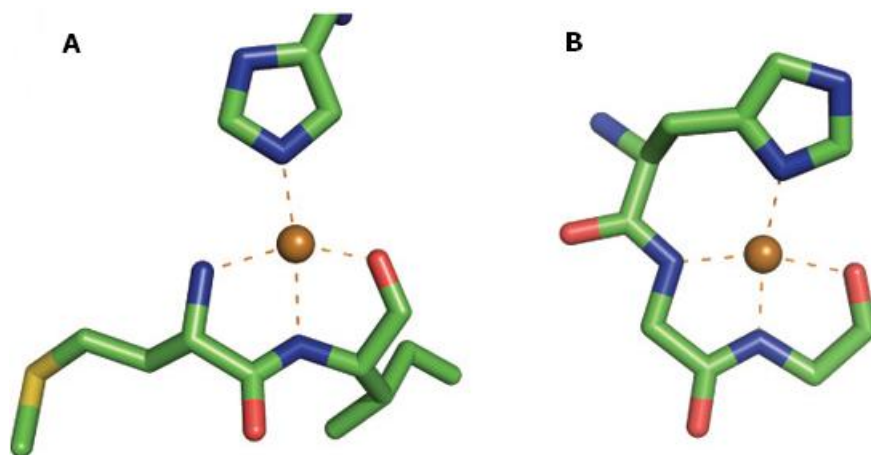
Vachet y colaboradores determinaron la estequiometría de los oligómeros intermedios, que preceden la formación de las fibras amiloides (figura 8) (4). Estos resultados sugirieron que el Cobre es esencial para iniciar la formación de los oligómeros *in vitro* en condiciones cercas a la fisiológicas (i.e.;pH 7.4, 37°C y 150 mM de fuerza iónica), pero no es necesario para mantener la estabilidad de tetrámeros y hexámeros, por esto, su ausencia en las fibras amiloides formadas.



**Figura 8.** Modelo propuesto del papel catalítico del Cobre en la oligomerización de la  $\beta 2m$  (adaptado de 4)

En el modelo propuesto en la figura 8 se observa que la primera etapa en el mecanismo de oligomerización es la interacción del  $Cu(II)$  con el monómero de  $\beta 2m$ . Por tanto, elucidar los residuos implicados en la interacción con el Cobre es de importancia para establecer bases moleculares del mecanismo de formación de fibras amiloides en la primera etapa de la DRA. Miranker y colaboradores (42) presentaron información estructural de la coordinación del Cobre en la  $\beta 2m$ . Estos investigadores cristalizaron un hexámero mutante de la  $\beta 2m$ , la H13F (*pdb* 3CIQ), en donde el  $Cu(II)$  se encuentra coordinado en una geometría cuadrado plana con el anillo imidazol de la His31, el N-terminal, y un grupo carbonilo de la cadena polipeptídica cerca al N-terminal, en cada subunidad de la proteína.

El modo de enlace del Cobre en la  $\beta 2m$  presenta gran similitud con la coordinación del cobre en la proteína PrP (43). El cobre se coordina a la  $\beta 2m$  y a la proteína PrP a través de un anillo imidazol, dos átomos de nitrógeno y un grupo carbonilo de la cadena polipeptídica (figura 9).



**Figura 9.** Geometría de coordinación cuadrado plana del Cu(II) en el hexámero mutante H13F (*pdb* 3CIQ) (42) y en el fragmento HG<sub>2</sub>GW del octapéptido de la PrP(43).

La geometría de coordinación del Cobre en el hexámero mutante H13F es una aproximación del posible modo de enlace de este metal en la  $\beta 2m$ , debido a que esta estructura fue cristalizada mediante una mutación de Histidina por Fenilalanina. Además, estudios previos habían determinado que los oligómeros (tetramero y hexámero) pierden los iones Cobre antes de progresar a formar las fibras amiloides (4). Sin embargo, esta información permite conocer a nivel microscópico el posible modo de coordinación de este metal en la  $\beta 2m$ . Así mismo, resultados experimentales han reportado que la His31 es un importante sitio de unión del Cobre en el monómero (7, 8,44). De igual forma el N-terminal (44), la His51 (8), la His13 (8).

Sin embargo, parte de los resultados presentados por RMN (7,8) pueden presentar efectos paramagnéticos que ocurren durante los análisis de complejos de Cobre (45)

Por lo anterior, el Profesor Richard Vachet y su grupo de investigación de la Universidad de Massachusetts, Amherst USA, llevaron a cabo experimentos basados en espectrometría de masas (MS por sus siglas en inglés: *Mass Spectrometry*) para identificar los sitios de coordinación del Cobre en el monómero y los demás oligómeros de  $\beta 2m$ . Estos métodos tuvieron cierta ventaja con respecto a los estudios de RMN, por tres razones específicas:

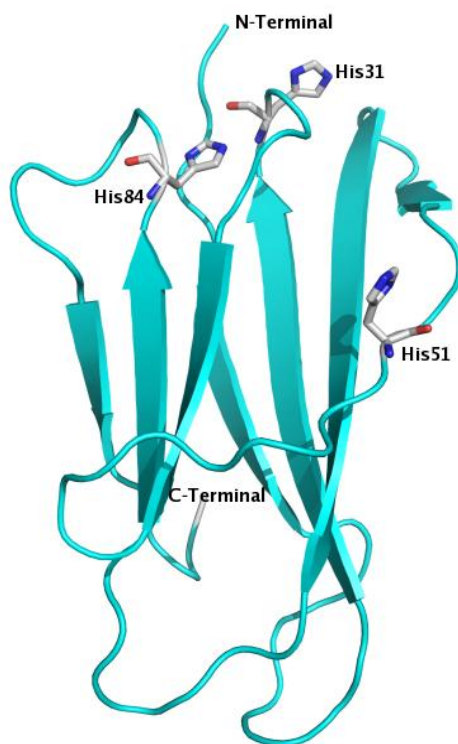
- A diferencia de la RMN estos métodos basados en MS no están sujetos a efectos paramagnéticos que pueden complicar la interpretación de datos.
- Las medidas pueden ser tomadas en la condición de formación de fibras amiloides en una concentración muy baja de la proteína, donde no ha ocurrido la oligomerización, lo que garantiza obtener información de la interacción del Cobre con la  $\beta 2m$  como monómero.
- La especificidad de MS permite conocer información del sitio de enlace del Cobre en la mezcla de oligómeros.

El primer método fue desarrollado por Lim y Vachet (46). Este método empleó las reacciones de oxidación catalizada por metales (MCO) para oxidar específicamente los aminoácidos implicados en el enlace de metales que presentan actividad redox. Con este método MCO/MS Lim y Vachet (44) determinaron los aa implicados en la coordinación del Cobre (figura 10).

En la proteína nativa, el N-terminal amina y la His31 son los aa implicados en la coordinación del Cu(II). Estos resultados son consistentes con previos reportes experimentales (1, 7, 6).

Además, Lim y Vachet (44) reportaron que la Met99 fue un aa susceptible a la oxidación. Esta oxidación de la Met (C-terminal) puede ser debida a posibles reacciones de oxidación no específicas y a la posibilidad de un segundo sitio del enlace. Miranker y colaboradores (7) previamente habían reportado que en presencia de un exceso de Cobre, la  $\beta 2m$  podría coordinarse con más de un ión metálico.

En el estado no nativo de la proteína, en presencia de 8M de urea, la His31, la His51, la His84 y el N-terminal son los posibles aa que se coordinan con el Cu(II). Eakin y colaboradores (7) habían reportado previamente que la His13, la His51 y la His84 estaban implicadas en la interacción con el Cobre, en el estado no-nativo de la  $\beta 2m$ .



**Figura 10.** Posibles sitios de coordinación del Cu(II) en la  $\beta 2m$  elucidados por el método MCO/MS (44).

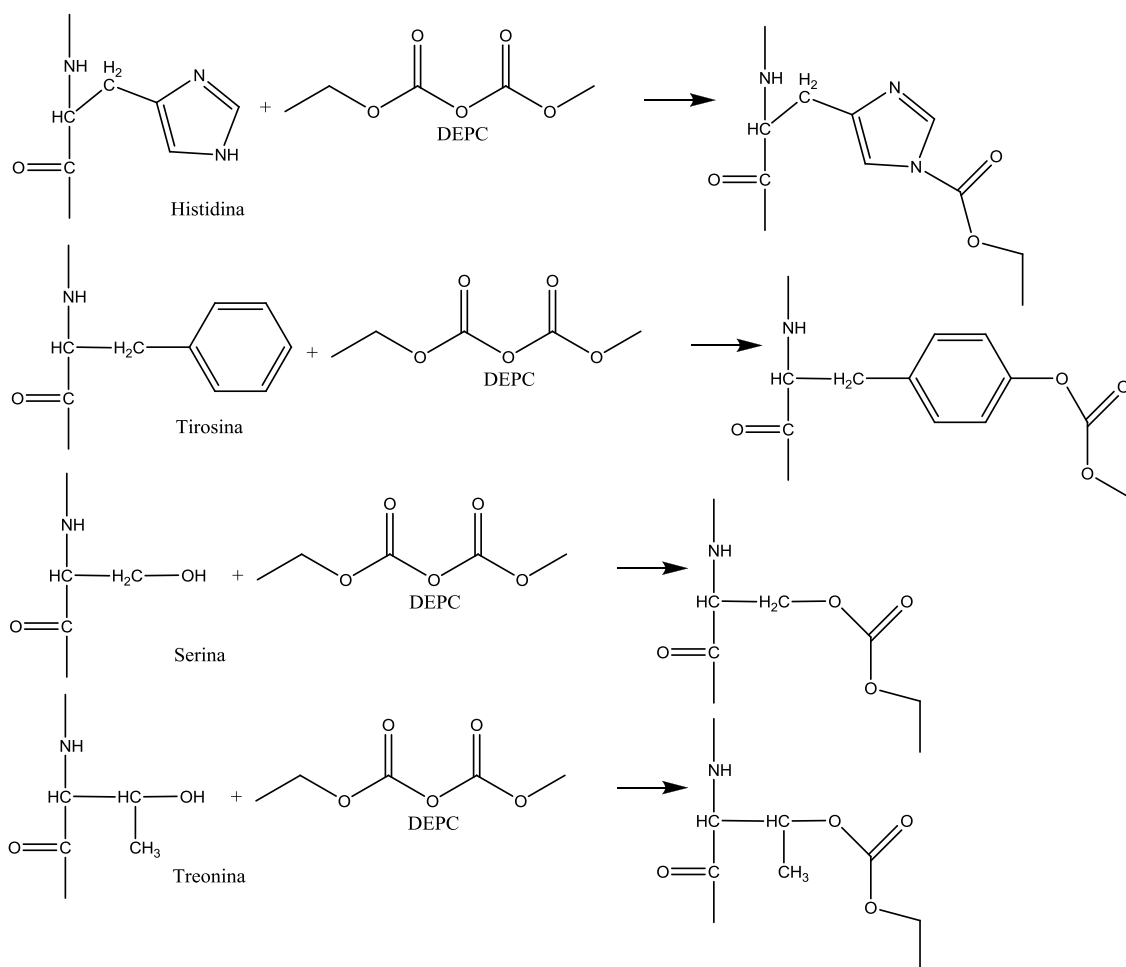
El método MCO/MS (44) evidenció diferencias en la estructura de coordinación del ión metálico en la  $\beta 2m$ , en su forma nativa y no-nativa. En la forma nativa, la interacción del Cu(II) con el N-terminal podría ser el primer paso en el mecanismo de desestabilización de la proteína que lleva a la formación de las fibras amiloides. Además, la coordinación del Cobre en el estado no nativo de la proteína podría ser un importante paso en el mecanismo de agregación.

Un segundo método desarrollado por Vachet y colaboradores (47) se basó en la MCO en condiciones de reacción que oxidaron adicionales residuos cercanos (aproximadamente  $10\text{\AA}$ ) al sitio de enlace del Cobre, conocido como *detuned* MCO/MS.

Un tercer método desarrollado por Mendoza y Vachet (48) se basó en un mapeo superficial de marcaje covalente para modificar aminoácidos con grupos nucleofílicos, e.g., residuos His, Thr, Tyr y Ser, empleando dietilpirocarbonatos (DEPC) (figura 11). Estas reacciones covalentes se emplearon para identificar los sitios de enlace del Cu(II) en la  $\beta 2m$ , debido a que la reactividad de los residuos disminuye significativamente cuando éstos hacen parte del sitio de enlace del Cu(II) (49). Además, Mendoza y Vachet estimaron cambios en la accesibilidad al solvente de los residuos implicados en el enlace con el Cu(II), comparando los resultados con estructuras cristalinas resueltas por Rayos X.

Tres histidinas (His13, His31, His51) y otros tres aa accesibles al solvente (Thr4, Ser33, Ser88) fueron modificados en la reacción. Sin embargo, la reactividad de sólo tres aa (His31, Ser33, Thr4) disminuyó notablemente tras la adición de Cu(II). Mendoza y Vachet (48), atribuyeron que la disminución en la reactividad de la His31 es debido al enlace con el Cu(II), el cual la protege del DEPC. Este resultado es consistente con previos resultados experimentales (8, 7,44).

La disminución en la reactividad de la Ser33, fue atribuida a la cercanía de este residuo a la His31, lo que podría impedir el acceso del DEPC a la cadena lateral de la Ser33. Además, se había reportado que el enlace del Cu(II) en la  $\beta 2m$  lleva a la isomerización de la Pro32 (40). En esta estructura cristalina la  $\beta 2m$  adopta una conformación donde la Ser33 está poco expuesta en superficie, lo cual la hace menos accesible y menos reactiva.



**Figura 11.** Reacciones de los residuos (Histidina, Tirosina, Serina y Treonina) con DEPC (adaptado de 48).

La disminución de la reactividad de la Thr4 sugirió que la orientación del N-terminal, el cual incluye a la Thr4, es alterado por el enlace del Cu(II), lo cual cambia la accesibilidad al solvente de este residuo.

Mendoza y Vachet (48) no observaron cambios en la reactividad de la His51, lo cual es consistente con previos estudios (7,44), donde no se han reportado evidencias del enlace del Cu(II) en este aa. Sin embargo, estudios de RMN (8) han reportado a la His51 como un posible sitio de enlace. Mendoza y Vachet atribuyen que estos resultados de RMN pueden ser debido a un incremento en la flexibilidad conformacional de este residuo cuando el Cu(II) se enlaza a la  $\beta$ 2m.

Recientemente Vachet y colaboradores (5) aplicaron las metodologías expuestas anteriormente, MCO/MS (44), *detuned* MCO/MS (47) y mapeo superficial con modificación covalente (48) empleando DEPC y NHSA (acetato de sulfo N-succinimida) como agentes para el marcaje covalente, para estudiar la interacción del Cobre con la  $\beta$ 2m en el proceso de oligomerización. Los resultados más relevantes se reúnen a continuación:

✓ *Enlace del Cobre al monómero de  $\beta$ 2m evaluado por MCO/MS*

El N-terminal, la Gln2, la His31, el Asp59 y el Trp60 fueron modificados en las reacciones de oxidación, sugiriendo que estos aa están cerca o hacen parte del sitio de enlace metálico.

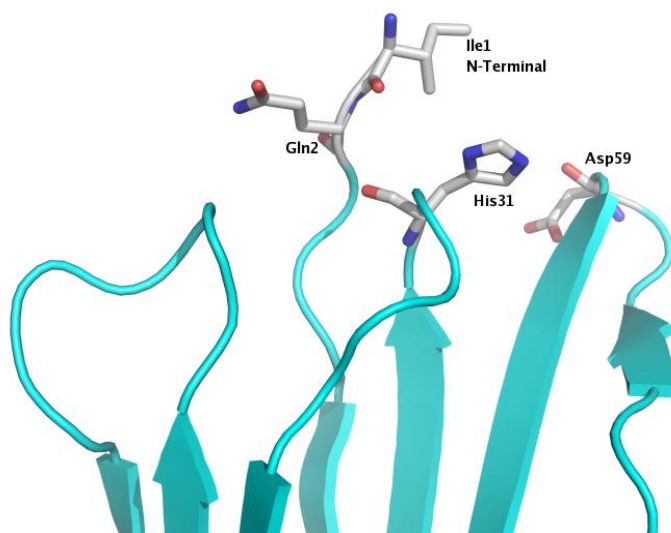
✓ *Enlace del Cobre al monómero de  $\beta$ 2m evaluado por el marcaje covalente.*

Los aa que presentaron cambios significativos en la reactividad con DEPC en presencia de Cobre fueron la Thr4, Ser28, His31 y Ser33. El N-terminal disminuyó su reactividad en presencia de Cobre, en los experimentos con NHSA. En conjunto, los datos del marcaje covalente con DEPC y NHSA son consistentes con los resultados de MCO/MS, indicando que el N-terminal y la His31 hacen parte del enlace del Cu(II).

✓ *Enlace del Cobre al monómero de  $\beta 2m$  evaluado por detuned MCO/MS*

Este método se aplicó para examinar los residuos que hacen parte de la vecindad del enlace metálico. Los nuevos aminoácidos oxidados fueron la Phe30, la Pro32, la Phe62 y la His84.

Los resultados de las anteriores metodologías evidencian que la región del N-terminal es responsable del enlace del Cu(II) en la primera etapa de formación de la fibras amiloides. El Cu(II) puede coordinarse en esta región vía el N-terminal, el enlace amida entre la Ile1 y la Gln2, la His31 y el Asp59 (5) (figura 7)



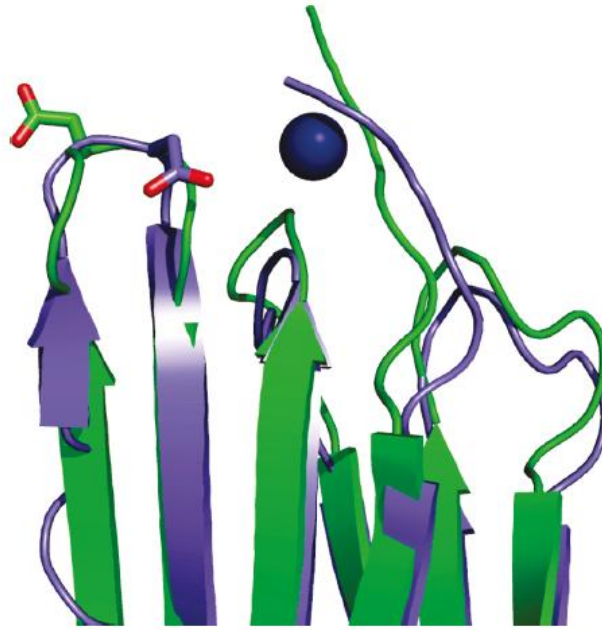
**Figura 12.** Posible región de coordinación del Cu(II) en la  $\beta 2m$  (5).

El Trp60 no fue tomado en cuenta por los autores (5) para hacer parte del enlace del Cu(II) en el monómero, debido a que los residuos triptófanos se coordinan con poca frecuencia a iones metálicos de transición. Por tanto, la disminución en la reactividad del Trp60 en la MCO/MS se atribuyó a la cercanía de este residuo al Asp59.

Los residuos Asp son resistentes a modificaciones de oxidación a menos que estén muy cerca al sitio de enlace metálico (47). Por tanto, el Asp59 fue considerado como un residuo que hace parte de la coordinación del Cu(II). Los autores especulan (5) que la presencia de este residuo en el sitio de enlace tiene importantes implicaciones en la liberación de Cobre en el proceso de oligomerización de la  $\beta$ 2m.

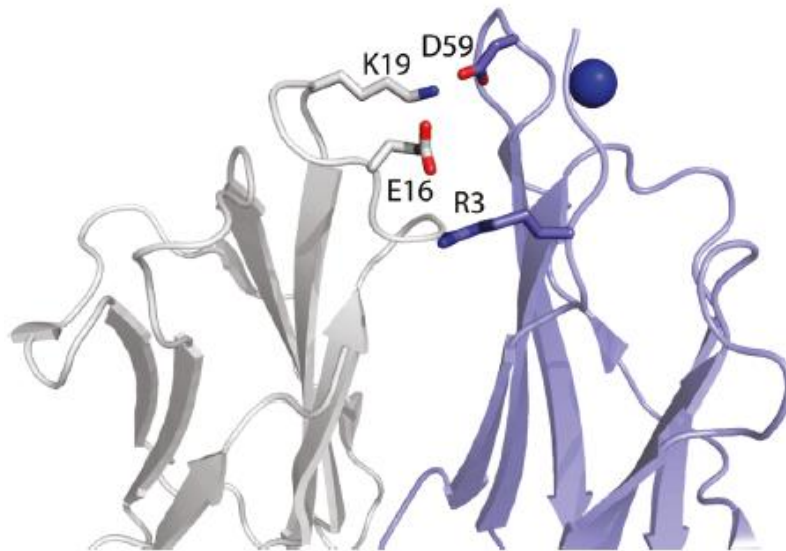
El aspartato es el tercer aminoácido más común a encontrarse coordinado con metales de transición. Sin embargo, un reciente estudio de la *Protein Data Bank* determinó que los residuos Asp (y Glu) son menos probables a coordinarse con el Cu(II), comparado con otros metales de transición de la primera fila (50). Cuando el carboxilato se coordina con el Cobre en proteínas, el promedio de la longitud de enlace es 0.3 Å mayor comparado con los enlaces Cu-nitrógeno, lo cual indica interacciones débiles entre el Cu(II) y este grupo funcional.

Por tanto, la coordinación del Cobre con el Asp59 puede causar interacciones Cu- $\beta$ 2m suficientemente fuerte para inducir cambios estructurales que llevan a la formación de las fibras amiloides e interacciones suficientemente débiles para que los oligómeros progresen a la formación de las fibras amiloides libres de Cobre. El Asp59 es un residuo que se ubica lejos de la cadena del N-terminal en la estructura cristalina de la  $\beta$ 2m (22). Sin embargo, la presencia del Cu(II) en esta región puede reposicionar el Asp59 hacia el N-terminal. Esta reposición se puede observar en la estructura cristalina de la H13F (42), donde la cadena lateral del Asp59 ha girado más de 100° y se encuentra más cerca al N-terminal que en el monómero (figura 13).



**Figura 13.** Comparación de la estructura cristalina del monómero de  $\beta 2m$  (verde) (*pdb* 1LDS) (22) y una subunidad del hexámero H13F (azul) (*pdb* 3CIQ) (42) que ilustra la reposición del Asp59 en presencia del Cobre.

La reposición del Asp59 es un cambio estructural que permite la formación de un puente salino a través de interacciones electrostáticas entre la cadena lateral de este residuo y la Lys19, en la formación del dímero (figura 14). Vachet y colaboradores (5) de igual forma atribuyen que la formación de un puente salino entre la Arg3 y el Glu16 (figura 14), se debe a una repulsión entre la Arg3 y el enlace metálico, debido a que este residuo no presentó modificaciones en las reacciones de MCO/MS. En el hexámero H13F se puede observar que la cadena lateral de la Arg3 (R3) se encuentra a más de 10 Å del Cobre.



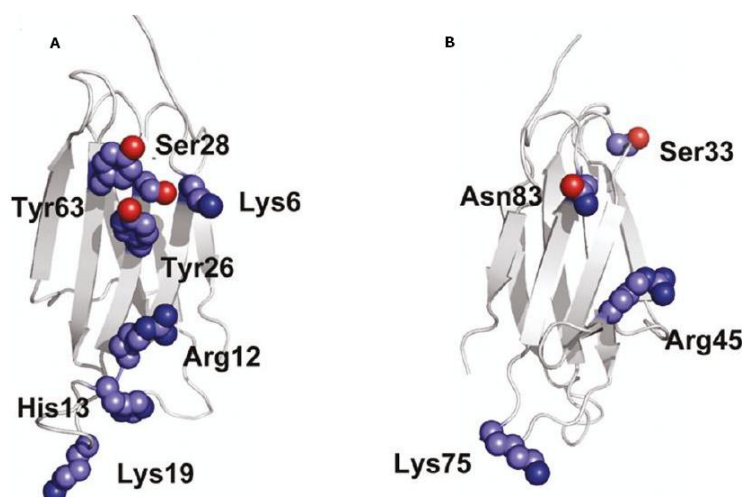
**Figura 14.** Interacciones entre la cadena B y C en el hexámero H13F (*pdb* 3CIQ) (42), mostrando los puentes salinos formados entre el Asp59 (D59)- Lys19 (K19) y la Arg3 (R3)-Glu16 (E16).

Vachet y colaboradores (5) brindan información adicional sobre cómo el Cu(II) facilita cambios estructurales en la  $\beta$ 2m, los cuales llevan a la formación de oligómeros. En el monómero, el Cu(II) se enlaza al N-terminal, el enlace amida entre la Ile1 y la Gln2, la His31 y el Asp59, lo cual genera la reposición del Asp59 y la Arg3, que facilitan la formación de puentes salinos en el proceso de formación del dímero.

Recientemente Vachet y colaboradores (51) estudiaron las interacciones  $\beta$ 2m- $\beta$ 2m en solución, utilizando un marcaje covalente con detección por MS. En este método se reportó información de los aa que intervienen en la formación del dímero, en la proteína nativa. Sus resultados indican que una interface del dímero esta dada por interacciones entre las cadenas D-D de separadas unidades de proteína. Los aminoácidos que presentaron una disminución en la reactividad a medida que avanzaba la formación del dímero se muestran en la figura 15.

Todos estos residuos son localizados en las hojas A, B y E de la  $\beta 2m$ . Por tanto, estas medidas son consistentes con una estructura de dímero, donde la hoja ABDE es parte de la interfaz del dímero. Los residuos implicados en esta interfaz de contacto proteína-proteína son de interés para el seguimiento del mecanismo propuesto por Vachet, del rol catalítico del Cobre (figura 8). Además Vachet y colaboradores (51) observaron importantes cambios en la reactividad de ciertos residuos debido a la presencia de Cobre. La reactividad del N-terminal, Arg3, His31, Ser33, Tyr67, Lys91 y Arg97 disminuyó en presencia del metal, lo cual proporciona una idea de los posibles cambios estructurales causados por el enlace del Cobre, que llevan a la proteína a formar dímeros.

Esta disminución en la reactividad de estos residuos por los agentes de marcaje covalente (DEPC), es debido a su compromiso con el enlace metálico. Uno de los cambios postulados por los investigadores fue la formación de un puente salino entre el Asp59 y la Lys19, con un arreglo anti paralelo, los cuales fueron recientemente postulados como una de las interacciones de importancia causadas por el enlace del Cobre al monómero de  $\beta 2m$  (figura 14).



**Figura 15.** Aminoácidos que están localizados en las hojas (A) ABDE Y (B) CFG de la  $\beta 2m$  (adaptado de 51).

En conclusión, es necesario determinar cómo y dónde se coordina el Cobre en la  $\beta 2m$ , en la primera etapa del proceso de oligomerización. Para esto, es necesario conocer las posibles bases moleculares de la primera etapa de oligomerización, que en conjunto con las evidencias experimentales, pueden recopilar información adicional para comprender el proceso de formación de fibras amiloides en la DRA.

Las herramientas computacionales son fundamentales para estudiar a nivel atómico las interacciones de este tipo de sistemas biomoleculares. Por esta razón, Deng y colaboradores (52) estudiaron en una serie de simulaciones de DM el efecto del Cu(II) en la  $\beta 2m$ . Los estudios revelaron que el enlace del Cu(II) a la His-13 tiene muy poco efecto en la estabilidad conformacional de la  $\beta 2m$ , mientras que el enlace del Cu(II) a la His-31 y en menor extensión a la His-51 son principalmente los responsables del cambio conformacional y dinámico observados en la  $\beta 2m$ .

En este método los autores consideraron que la contribución de cada sitio de enlace iónico era aditiva. Es decir, el Cu(II) fue simulado en la dirección del átomo de hidrógeno  $\delta 1$  del grupo imidazol de la histidina protonada, hasta que la distancia Cobre-N alcanzará 2.1 Å, la cual es el promedio de la longitud del enlace coordinado en varias estructuras de proteínas que contienen Cobre en la PDB.

En la literatura se han reportado estudios de DM (52, 53) y técnicas docking (12) las cuales han sugerido información de los posibles mecanismos de formación de las fibras amiloides de la  $\beta 2m$ . Sin embargo, no se ha estudiado a nivel atómico las interacciones Cobre- $\beta 2m$ , en la primera etapa del proceso de oligomerización.

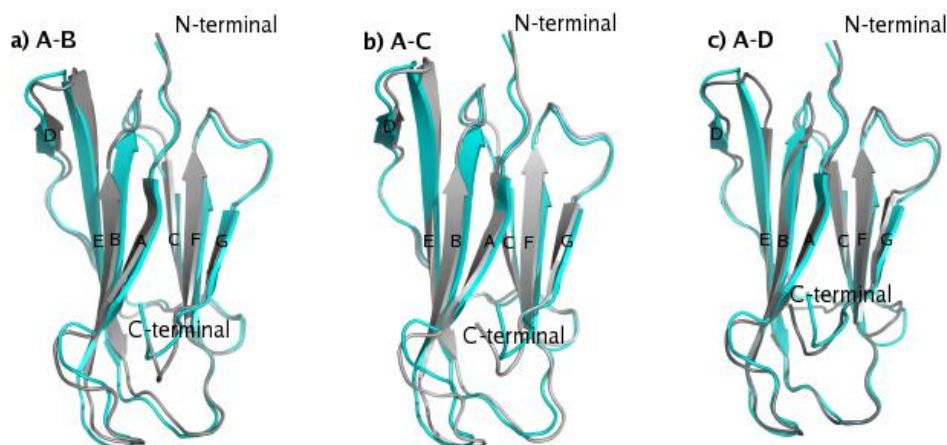
Por tanto, en esta investigación se realizó un estudio de docking molecular, para elucidar bases moleculares de la primera etapa de formación de fibras amiloides. Se buscó determinar cómo y dónde se adsorbe el Cobre en el monómero de  $\beta$ 2m, debido a que no se conoce a nivel atómico la ubicación específica de este metal en la proteína.

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1 Determinación de los sitios de adsorción

##### 3.1.1 Selección de estructuras de partida

Para desarrollar el estudio de docking molecular, fueron extraídos los parámetros geométricos de la  $\beta 2m$  incorporados en el CMH-I (código PDB 1DUZ). Luego la  $\beta 2m$  se introdujo en una caja cúbica (con una distancia mínima de 1,2 nm entre la proteína y el borde de la caja). Se solvató la proteína con moléculas de  $H_2O$  utilizando el modelo TIP3P (54). Las interacciones de VdW se evaluaron mediante el potencial de 6 -12 de Lenard-Jones. La optimización de la geometría se realizó mediante el método “*Steepest descent*”, (55) bajo condiciones periódicas de contorno y con el campo de fuerza AMBER94 (32), para esta etapa se utilizó el programa GROMACS 3.3.3 (56). De este proceso de minimización se escogieron los tres modelos más representativos.



**Figura 16.** Comparación entre los modelos más representativos del proceso de minimización de energía (B, C, D) (gris) con la estructura de partida (A) (azul), código PDB 1DUZ (19). Desviación del *backbone* a) r.m.s= 1.409 Å entre el modelo A-B b) r.m.s= 1.412 Å entre el modelo A-C d) r.m.s= 1.220 Å entre el modelo A-D.

Se seleccionaron cuatro estructuras de partida para las simulaciones de docking, con el fin de determinar posibles diferencias en la adsorción del Cobre, debido al proceso de dinámica de la  $\beta 2m$ . La estructura extraída del código 1DUZ, estructura A, y las tres escogidas del proceso de minimización, estructuras B, C, D (figura 16).

Los parámetros del Cobre, radio de VdW (1.4 Å), energía potencial de VdW (0.09 KCal/mol) y volumen de solvatación atómica (1.6 Å<sup>3</sup>) fueron incluidos en el campo de fuerza AMBER94 (32). Los residuos Histidinas fueron considerados como neutros.

### **3.1.2 Docking molecular: Rígido y Flexible**

El *docking molecular* se realizó con diferentes cargas del Cobre (i.e., 0, +1 y +2), para estudiar la influencia del efecto electrostático en el sitio de adsorción. Las simulaciones de docking molecular se realizaron con Autodock4 (60) utilizando el algoritmo LGA (31).

En todas las simulaciones se evaluaron quinientas mil (500.000) conformaciones distintas. Para cada simulación se tomaron las 25 conformaciones de menor energía docking, las cuales se agruparon por clusters de similitud conformacional. Cada conformación representa un estado específico del Cobre en la  $\beta 2m$ . El mejor resultado de docking, puede ser considerado a ser la conformación con más baja energía docking.

La energía *docking* ó energía de enlace es la suma de la energía intermolecular, la energía total, la energía torsional, menos la energía de no enlace (Ecuación 3). La energía intermolecular es la suma de la energía electrostática y de VdW.

El *docking* se desarrolló en dos partes: un *docking rígido*, proceso en el que se mantiene la macromolécula de interés sin ningún tipo de movimiento en sus cadenas laterales, y un *docking flexible*, lo cual permite la flexibilidad en las cadenas laterales de la biomolécula.

En los dos procedimientos se tomó un tamaño de *grid* de 126 x 126 x 126 en las direcciones x, y, .z respectivamente, con un espaciamiento de 0.375Å para cubrir totalmente la proteína. Este procedimiento es conocido como *blind docking* ó docking ciego, en el cual se realiza una búsqueda en la superficie entera de la proteína, cuando no se tiene un conocimiento específico del centro activo del receptor. En nuestro caso, cuando no se conoce específicamente los aa implicados en el proceso de adsorción del metal.

Las inserciones del Cobre en la  $\beta 2m$  se llevaron a cabo aleatoriamente con el método *Monte Carlo* (80). Las interacciones entre el metal y la proteína se evaluaron con el campo de fuerza AMBER94 (32).

En los procedimientos de docking rígido y flexible se realizó una búsqueda aleatoria en toda la superficie de la  $\beta 2m$ , variando la carga del metal. En el primer procedimiento se mantuvo rígida la proteína y en el docking flexible se permitió que el sistema se relajara, haciendo flexibles ciertos residuos. Los procedimientos de docking flexible se describen a continuación:

#### *Docking Flexible I*

El primer estudio de docking flexible se realizó con base en los resultados del docking rígido. La estructura A fue la geometría de partida. Se determinó la afinidad del Cu(+1) y el Cu(+2) en la superficie entera de la proteína, haciendo flexibles la cadena lateral de los aa Asp96, Asp98 y aa cercanos a éstos (Glu74, Gln77, Lys94, Trp95, Arg97, Met99). Para el Cu(0) los residuos flexibles fueron la Phe30, Phe62 y otros residuos cercanos a estos (His31, Ser33, Phe56, Ser57, Trp60).

El docking flexible se realizó por triplicado para las tres cargas respectivas del Cobre.

#### *Docking Flexible II*

Para evaluar la afinidad del Cobre en los cuatro modelos (A, B, C, D) se realizaron una serie de simulaciones, permitiendo la flexibilidad de las cadenas laterales de las histidinas (13, 31, 51, 84) y aspartatos (34, 38, 53, 59, 76, 96, 98). Estos aa están expuestos en su mayoría en la superficie de la  $\beta 2m$ .

### *Docking Flexible III*

Se evaluó la afinidad de la adsorción del Cu(0) en los cuatro modelos (A, B, C, D), haciendo flexibles aa cercanos a la His31 (Ile1, Gln2, Arg3, Asp59, Trp60, Ser61, Phe62) y la His84 (Val85 y Thr86), debido a que fueron los sitios de mayor espontaneidad ( $< \Delta G$  de enlace) elucidados en el docking flexible II. Además, se evaluó la afinidad del Cu(+2) en el modelo C. Para estas simulaciones se redujo el espacio de búsqueda. Se tomó un tamaño de *grid* de 80 x 80 x 80 en las direcciones x, y, .z respectivamente, con un espaciamiento de 0.375Å.

## **3.2 Determinación de la afinidad de la adsorción**

Se determinó la afinidad de la adsorción del Cobre en la  $\beta 2m$ , evaluando la energía libre de enlace (energía *docking*) ( $E_c$  3) y las distancias interatómicas. Las conformaciones de mayor espontaneidad ( $< \Delta G$  de enlace), fueron seleccionadas como las conformaciones de mayor afinidad, en la primera etapa del proceso de adsorción.

## **3.3 Validación de resultados**

Se validaron los resultados producto de las simulaciones docking molecular con los datos reportados experimentalmente de los sitios de coordinación del Cu(II) en la  $\beta 2m$ . Se estudio el posible efecto electrostático en el sitio de adsorción.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

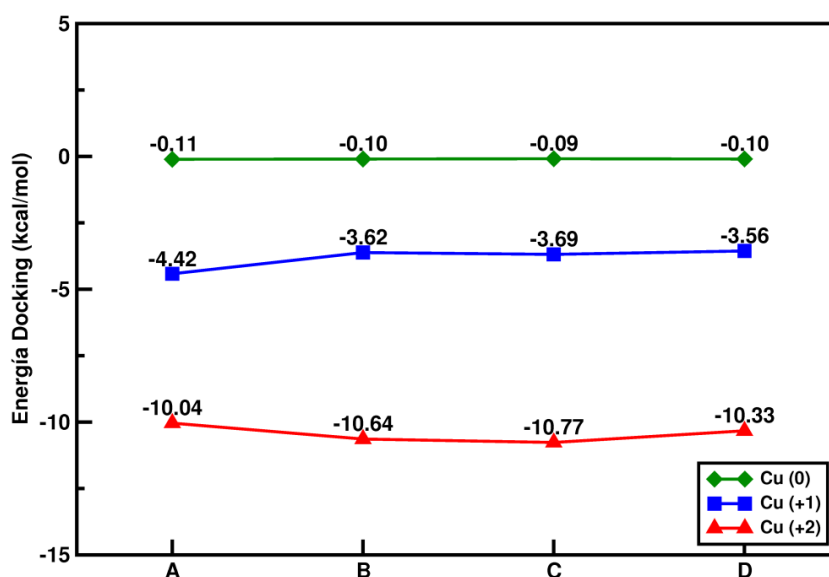
### 4.1 Sitios de adsorción del Cobre en la $\beta 2m$

Se determinaron los sitios de adsorción del Cobre en la  $\beta 2m$ . El cobre se adsorbió en diferentes regiones de la proteína determinadas por el efecto electrostático en el sitio de adsorción, debido a la variación de la carga del metal.

La adsorción de este metal en el monómero de  $\beta 2m$ , es la primera etapa del modelo catalítico propuesto por Vachet y colaboradores (4), expuesto en la figura 8. Los aa que participan en el proceso de adsorción, fueron elucidados en el procedimiento de docking rígido y flexible que se muestra a continuación.

#### 4.1.1 Docking molecular

#### 4.1.2 Docking rígido



**Figura 17.** Energías de adsorción representativas ( $< \Delta G$  de enlace) de los cuatro modelos de  $\beta 2m$ , producto de las simulaciones de docking molecular rígido, con las diferentes cargas del Cobre.

Las energías de adsorción, producto de las simulaciones de docking molecular rígido (figura 17), para los cuatro modelos A, B, C, D, muestran una variabilidad energética mayor a 4KCal/mol, para las diferentes cargas del Cobre, lo cual es debido a las diferencias en la contribución de energía electrostática (Tabla3). En la tabla 3 se tabulan las energías de las conformaciones de  $\Delta G$  de enlace, para las tres diferentes cargas del Cobre.

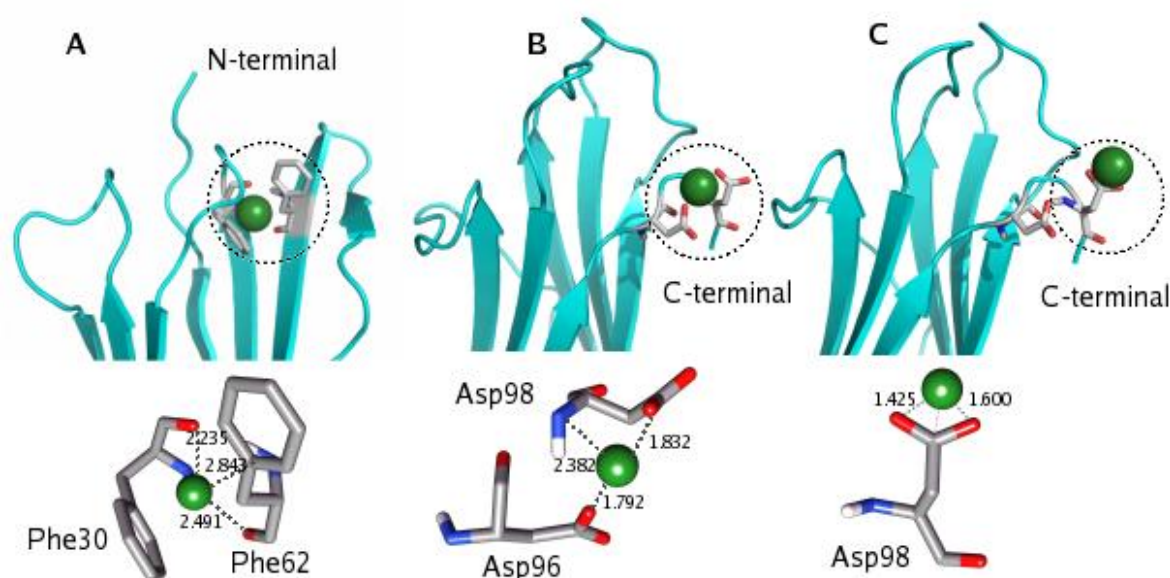
Energía (KCal/mol)	Cu(0)	Cu(+1)	Cu(+2)
Enlace	-0.11	-4.42	-10.77
Intermolecular	-0.38	-4.43	-11.04
Interna Total	0.00	0.00	0.00
De no Enlace	0.00	0.0	0.0
Torsional	0.27	0.27	0.27
Electrostática	0.00	-4.56	-13.72
VdW_hb_desolv	-0.38	0.13	2.68

**Tabla 3.** Energías del proceso de adsorción del Cobre en la  $\beta 2m$ . Para el Cu(0)-modelo A, el Cu(+1)-modelo A, el Cu(+2)-modelo C.

Para una carga específica del metal no se observó una variación energética considerable. Es decir, la energía *docking* en el proceso de adsorción del Cobre es similar entre los modelos (A, B, C, D). Sin embargo, se puede observar que el Cu(+2) se adsorbe con mayor espontaneidad (-10.77KCal/mol) en el modelo C.

En la figura 18 se presentan las conformaciones más representativas ( $\Delta G$  de enlace) de las simulaciones de docking rígido. En los cuatro modelos de  $\beta 2m$  se observó que la phe30 y la Phe62, son los aa implicados en la adsorción del Cu(0) (Figura 18A).

El Cu(0) se adsorbe en la  $\beta$ 2m, a través de interacciones de VdW con el oxígeno y nitrógeno del *backbone* de la Phe30 y la Phe62. Estos dos residuos son cercanos ( $< 10 \text{ \AA}$ ) a la His31, el cual se presume como uno de los posibles sitios de coordinación del Cobre en solución (5-7).



**Figura 18.** Mejores conformaciones ( $< \Delta G$  de enlace) de las simulaciones de docking molecular rígido. A) Adsorción del Cu(0) en el modelo A (-0.11KCal/mol), B) Adsorción del Cu(+1) en el modelo A (-4.42KCal/mol), C) Adsorción del Cu(0) en el modelo C (-10.77KCal/mol). Las distancias de adsorción están dadas en  $\text{\AA}$ .

La frecuencia relativa de encontrar a la fenilalanina coordinada con iones metálicos es muy baja (72). Sin embargo, se han presentado evidencias que el enlace del Cobre en la  $\beta$ 2m causa algunos cambios estructurales en la proteína, en los que se destaca la rotación de la Phe30 desde el medio hidrofóbico a la superficie accesible al solvente, como consecuencia del enlace metálico (42).

Para el Cu(+1) y el Cu(+2) la adsorción se dio principalmente en la región del C-terminal. En esta región el Cobre se puede adsorber a través de interacciones electrostáticas con las cadenas laterales de aa cargados negativamente, e.g., el Asp96 y Asp98.

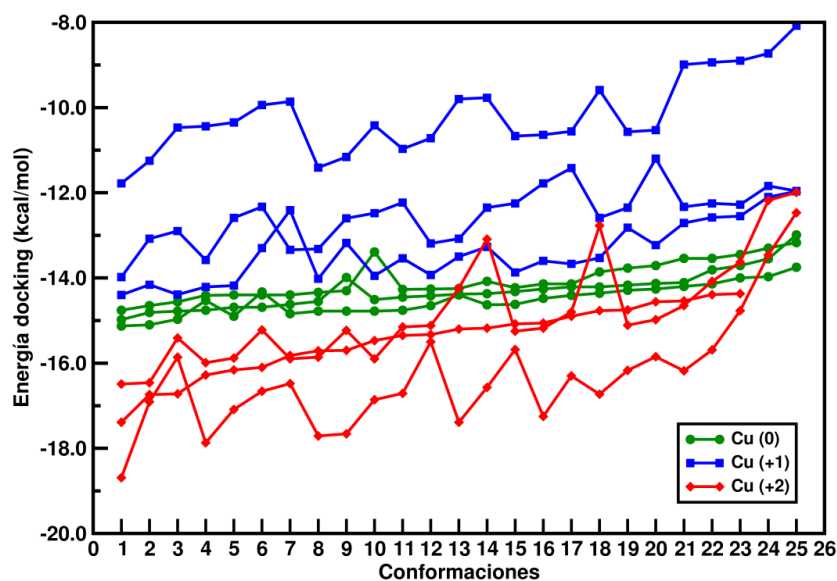
El Asp96 y el Asp98 son aa expuestos en la superficie de la proteína (Figura 18B). De hecho, esta región del C-terminal fue propuesta como un posible sitio de enlace del Cobre, en los reportes de Lim y Vachet (44). Además, Miranker y colaboradores (7) previamente habían argumentado que en presencia de un exceso de Cobre la  $\beta 2m$  podría coordinarse con más de un ión metálico.

En conclusión, las múltiples simulaciones de docking rígido evidenciaron dos posibles regiones de adsorción del Cobre en la  $\beta 2m$ . Una región que involucra a la Phe30, y la Phe62, donde el Cu(0) se adsorbe con estos aa a través de interacciones de VdW. Una segunda región de adsorción, es el C-terminal, en la cual el Cu(+1) y el Cu(+2) pueden adsorberse a través de fuerzas de Coulomb.

Los resultados de docking rígido evidencian un posible efecto electrostático en la etapa de adsorción. Para estudiar en más detalle las regiones de adsorción del Cobre elucidadas en el docking rígido, se tuvieron en cuenta los efectos estéricos en los sitios de adsorción. Por tanto, se realizaron una serie de simulaciones de docking flexible, permitiendo la flexibilidad en aa cercanos a la Phe30 y la Phe62 para el Cu(0) y el Asp96 y Asp98, para el Cu(+1) y el Cu(+2).

#### **4.1.4 Docking flexible**

## Parte I



**Figura 19.** Energías de adsorción, producto de las simulaciones de docking molecular del Cobre en el modelo A. Para cada carga del metal (0,+1 y +2) se realizaron simulaciones por triplicado. Se obtuvo un total de 25 conformaciones.

La energía de adsorción, producto de las simulaciones de docking molecular flexible (figura 19) para el modelo A, muestra una variabilidad energética menor a 4KCal/mol, comparando las diferentes cargas del metal (i.e.,0, +1,+2).

Para el Cu(0) se observó la menor variabilidad energética entre las réplicas. Para el Cu(+1) y el Cu(+2) se observó una variabilidad energética de aproximadamente 5KCal/mol. A continuación se destacan las conformaciones de menor energía docking de las réplicas y el número de conformaciones en cada clúster, para las diferentes cargas del metal.

Para el Cu(0) (figura 20) la conformación de menor energía docking (-15.13 KCal/mol) (1/25), involucra el oxígeno y el nitrógeno del *backbone* de la Lys91 y la Val82 (figura 20A). La Lys 91 fue uno de los residuos elucidados por Vachet y colaboradores a estar implicada en el enlace metálico, en los experimentos de marcaje covalente con DEPC.

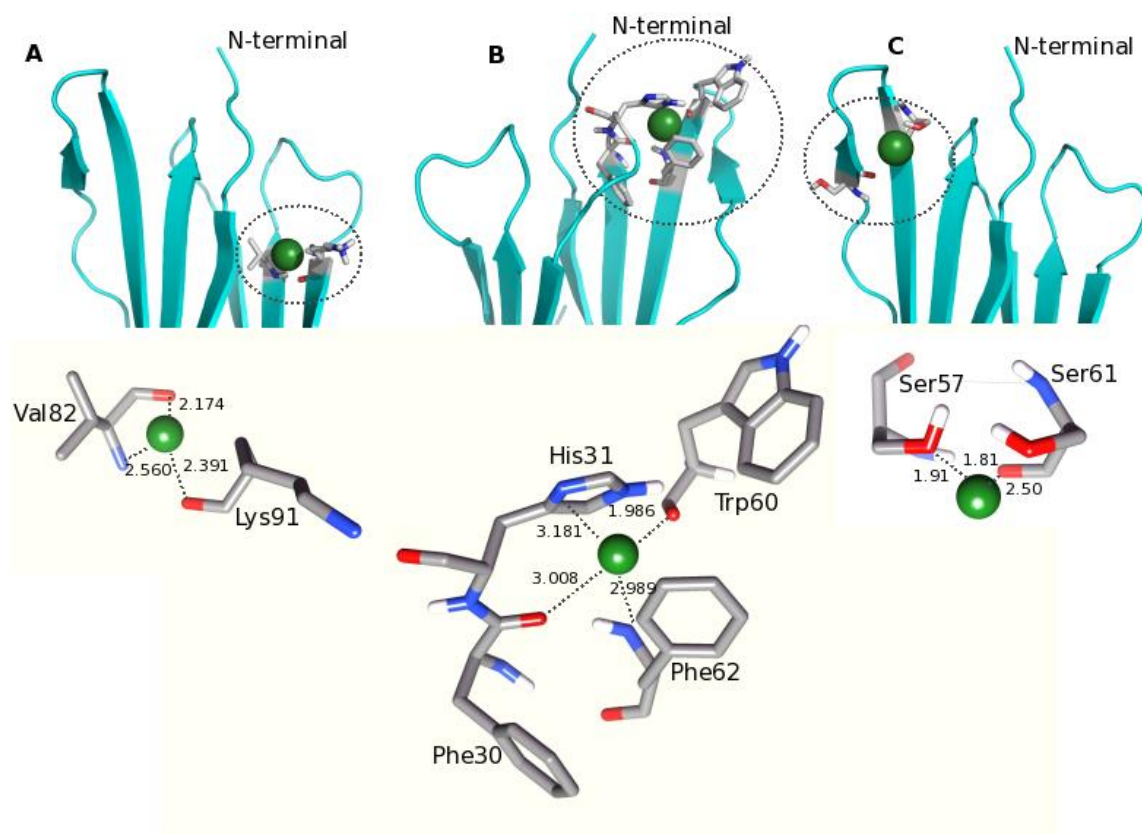
La segunda conformación (-14.98 KCal/mol) (1/25), revela un importante sitio de adsorción reportado ampliamente en la literatura, en el cual, el Cu(0) se adsorbe en la región de la His31, a través de interacciones de VdW con el anillo imidazol, el oxígeno del *backbone* del Trp60 y la Phe30 y el nitrógeno de la Phe62 (figura 20B).

En la tercera conformación (-14.76 KCal/mol) (1/25), el Cu(0) se adsorbió a través de interacciones con los oxígenos de los grupos hidroxilo de la Ser57 y la Ser61, el nitrógeno y el oxígeno del *backbone* de cada aa respectivamente (figura 20C). Las tres conformaciones de menor energía docking y el análisis por clúster para el Cu(0) presentan similitud en la preferencia de adsorción. Por tanto, se podría decir que el Cu(0) se puede adsorber en cualquiera de los tres sitios presentados anteriormente, en la primera etapa de adsorción.

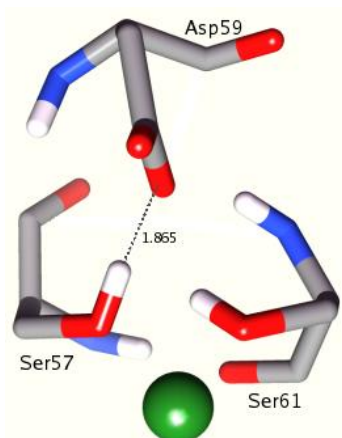
En el proceso de adsorción y de relajación de la proteína se observó la formación de algunos puentes de hidrógeno en las conformaciones de menor energía de docking. Para la conformación de la figura 20C, se observó la formación de un puente de hidrógeno entre la Ser57 (HG) y el Asp59 (OD1) con una energía de -3.921 KCal/mol (figura 21).

El Cu(+1) y el Cu(+2) se adsorbieron en diferentes regiones de la proteína que involucran aa con carga negativa en las cadenas laterales e.g. los Asp y Glu. Las conformaciones de menor energía docking de las múltiples simulaciones destacan dos sitios de mayor afinidad en el proceso de adsorción del Cobre (figura 22).

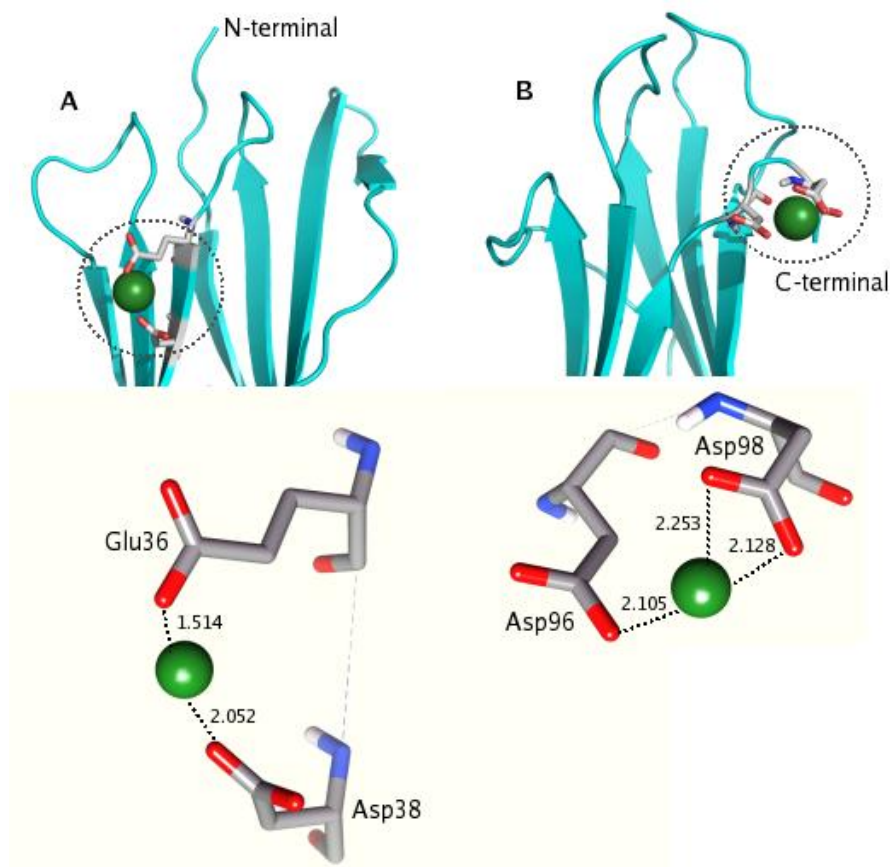
El Cu(+2) se adsorbió a través de interacciones electrostáticas en dos regiones de la proteína, que involucran al Glu36 y el Asp38 (figura 22A), la conformación de menor energía docking (-18.69 KCal/mol), y la región del C-terminal con el Asp96 y el Asp98 (-16.18 KCal/mol) (figura 22B).



**Figura 20.** Mejores conformaciones ( $< \Delta G$  de enlace) de las simulaciones de docking molecular para el Cu(0) en el modelo A. A) (-15.13KCal/mol), B) (-14.98KCal/mol), C) (-14.76KCal/mol). Las distancias de adsorción están dadas en Å.



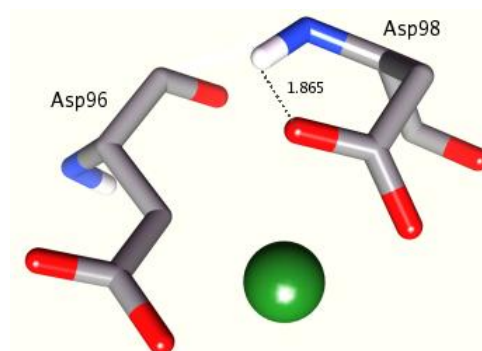
**Figura 21.** Formación de un puente de hidrógeno intermolecular entre la Ser57 (HG) y el Asp59 (OD1) con una energía de -3.921 KCal/mol. La distancia está dada en Å.



**Figura 22.** Mejores conformaciones ( $< \Delta G$  de enlace) de las simulaciones de docking molecular para el  $\text{Cu}(+2)$  en el modelo A. A) (-18.69KCal/mol) (3/25), B) (-16.18 KCal/mol), (1/25). Las distancias de adsorción están dadas en Å.

El análisis por clúster y las energías de adsorción de las mejores conformaciones docking señalan que la región de la figura 22A es la de mayor espontaneidad para la adsorción del  $\text{Cu}(+2)$  en el modelo A.

En la conformación de la figura 22B se observó la formación de un puente de hidrógeno intramolecular, entre el Asp98 (HN) y el Asp98 (OD2), con una energía de -0.145 KCal/mol (figura 23).



**Figura 23.** Formación de un puente de hidrógeno intramolecular entre Asp98 (HN) y el Asp98 (OD2), con una energía de -0.145 kCal/mol. La distancia esta dada en Å.

El Cu(+1) se adsorbió, al igual que el Cu(+2), en la región del Glu36 y Asp38 con una energía docking de -14.21 KCal/mol (4/25) y en el C-terminal con los Asp96 y Asp98, con una energía docking de -13.19 KCal/mol (1/25). Las energías de adsorción y el análisis por clúster, señalan que el Cu(+1) se adsorbe con mayor preferencia en la región del Glu36 y Asp38.

En la tabla 4 se presentan las energías del proceso de adsorción del Cobre en el modelo A, para las conformaciones de  $< \Delta G$  de enlace. Se observa diferencias significativas en la energía intermolecular, debido a la mayor contribución de la energía electrostática, para las diferentes cargas del metal. Estas diferencias favorecen el proceso de adsorción ( $< \Delta G$  de enlace) del Cu(+2) en el modelo A.

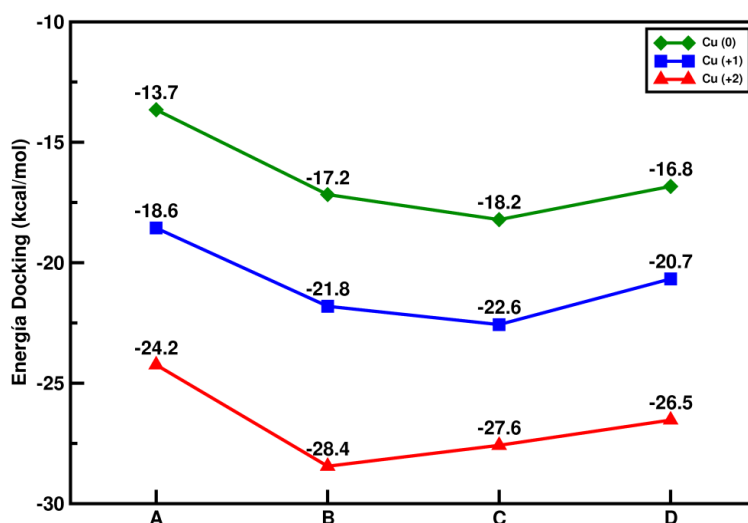
En conclusión, en las múltiples simulaciones de docking flexible (parte I), se pudo observar una mayor espontaneidad ( $< \Delta G$  de enlace) para el Cu(+2) en el proceso de adsorción en el modelo A. Lo cual, es debido a una mayor contribución de la energía electrostática y de la energía interna total.

Energía (KCal/mol)	Cu(0)	Cu(+1)	Cu(+2)
Enlace	-15.13	-14.21	-18.69
Intermolecular	-0.39	-3.96	-8.83
Interna Total	-18.52	-12.01	-13.73
De no Enlace	-3.57	-1.48	-3.65
Torsional	0.27	0.27	0.27
Electrostática	0.0	-4.68	-10.56
VdW_hb_desolv	-0.39	0.68	1.71

**Tabla 4.** Energías del proceso de adsorción del Cobre en el modelo A, para las conformaciones de menor energía docking de las tres cargas del metal.

Así mismo, la formación de puentes de hidrógeno en los sitios de adsorción, ya sea, por la presencia del metal y/o por la relajación de la proteína, son de importancia para lograr comprender el proceso de adsorción del Cobre en la  $\beta 2m$ .

## Parte II



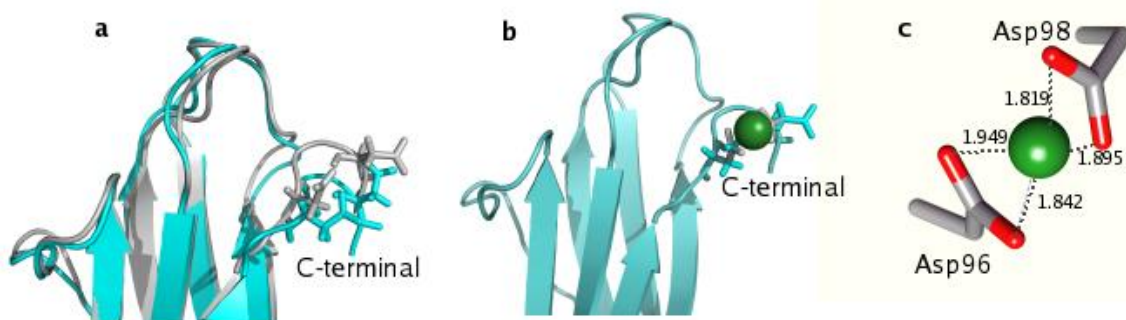
**Figura 24.** Energías de adsorción representativas ( $< \Delta G$  de enlace), de las simulaciones de docking molecular del Cobre en los cuatro modelos, variando las cargas del metal.

En la figura 24 se destacan las conformaciones de menor energía docking ( $< \Delta G$  de enlace) de las 25 conformaciones obtenidas para cada modelo (A, B, C, D), con las diferentes cargas del metal. El Cu(+2) presentó la menor energía de adsorción en los cuatro modelos.

El Cu(+2) se adsorbió en el modelo B con una energía docking de -28.45 KCal/mol (4/25), seguido por el modelo C con una energía de -27.6KCal/mol (1/25), el modelo D con una energía de -26.5KCal/mol (1/25) y por último en el modelo A con una energía docking de -24.2KCal/mol (1/25). En los cuatro modelos el Cu(+2) se adsorbió a través de interacciones electrostáticas con los grupos carboxilato del Asp96 y el Asp98. El análisis por clúster y las energías de adsorción de las mejores conformaciones docking para el Cu(+2), señala que este metal se adsorbe con mayor espontaneidad en el modelo B.

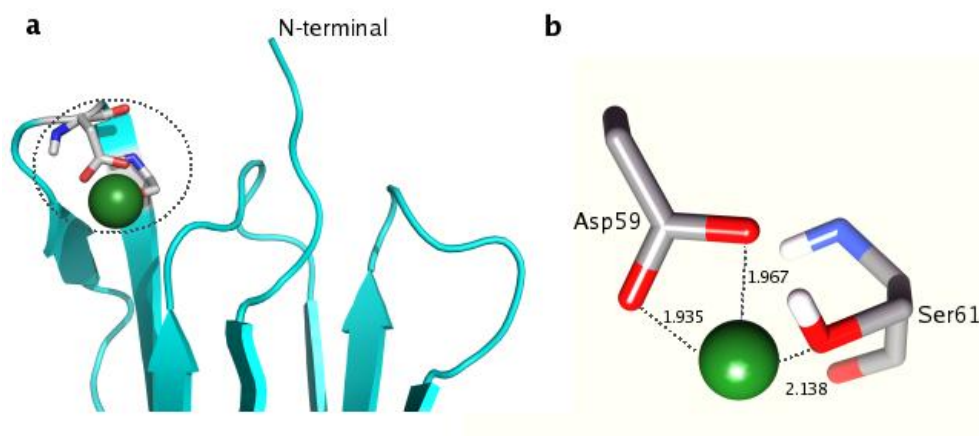
Para determinar algunas diferencias en la adsorción del Cu(+2), debido al proceso de dinámica de la proteína, se comparó la conformación de menor energía docking del proceso de docking (modelo B) con la estructura de partida del proceso de dinámica (modelo A) (figura 25a). Se observaron algunas diferencias en la región del C-terminal. En la figura 25b, se compara la estructura de partida B (azul) y la conformación del proceso de docking (gris). Se observó que en el proceso de relajación, el Asp98 pasa de estar expuesto en superficie hacia el interior del *loop* del C-terminal. En la figura 25c se presenta la conformación del proceso de adsorción.

De igual forma, el Cu(+1) presentó la mayor afinidad ( $< \Delta G$  de enlace) en la región del C-terminal, a través de interacciones electrostáticas con los grupos carboxilato del Asp96 y el Asp98, en los cuatro modelos (A, B, C, D). Con una mayor afinidad en el modelo C (-22.57 KCal/mol).



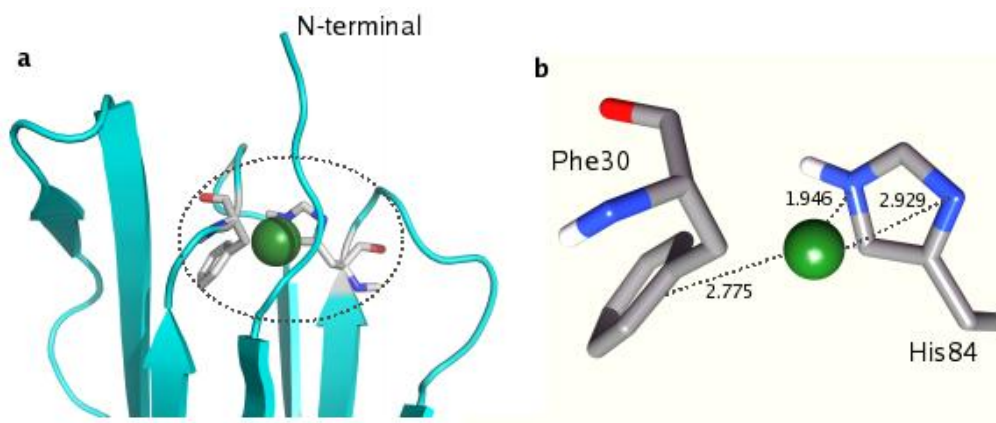
**Figura 25.** a) Comparación del modelo B(gris) con la estructura de partida del proceso de dinámica (modelo A-azul). Desviación del *backbone* r.m.s= 1.409 Å. b) Comparación de la estructura de partida B (azul) y la conformación del proceso de docking (gris). c) conformación del proceso de adsorción, con una energía docking de -28.45 KCal/mol (4/25). Las distancias de adsorción están dadas en Å.

Para el Cu(0), en la conformación de menor energía (-18.21 kCal/mol) en el modelo C, el Cobre se adsorbió en la región del Asp59, interaccionado con el grupo carboxilato de este aa y el oxígeno hidroxilo de la Ser61 (Figura 26)



**Figura 26.** a) Región de mayor espontaneidad en el proceso de adsorción del Cu(0) en el modelo C. b) Conformación de menor energía docking (-18.21 KCal/mol) (2/25).

En el modelo B, la conformación con menor energía docking (-17.17KCal/mol), señala que el Cu(0) se adsorbe a través de interacciones de VdW con los nitrógenos del anillo imidazol de la His84 y el anillo aromático de la Phe30 (figura 27).



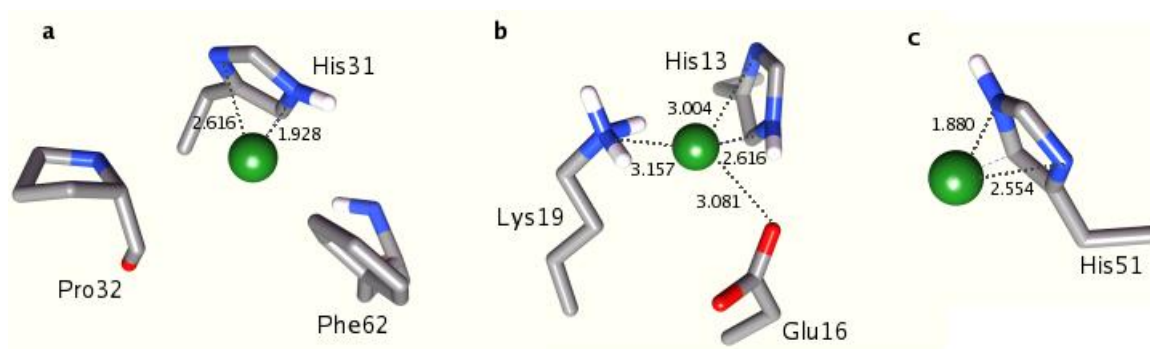
**Figura 27.** a) Región de mayor espontaneidad en el proceso de adsorción del Cu(0) en el modelo B. b) Conformación de menor energía docking (-17.17 kCal/mol) (1/25)

En los cuatro modelos se observó que el Cu(0) puede adsorberse en las regiones de las histidinas (13, 31, 51, 84). En la figura 28 se muestran algunas de las conformaciones encontradas en los diferentes modelos.

En el modelo C, el Cu(0) se adsorbió en la región de la His31, a través de interacciones de VdW con los nitrógenos del anillo imidazol y el anillo aromático de la Pro32 y la Phe62, con una energía docking de -18.05 KCal/mol (figura 28a). De igual forma, con la His13, el Glu16 y la Lys19 con una energía docking de -17.63KCal/mol (Figura 28b).

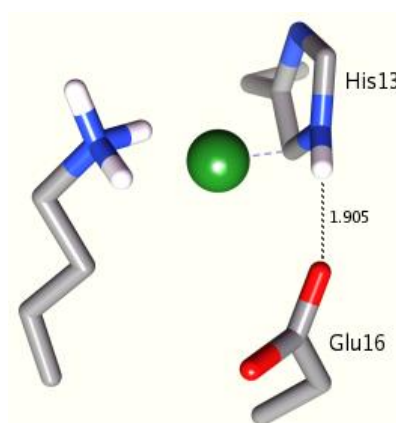
En el modelo D, el Cu(0) se adsorbió en las regiones de la His13 (-16.52KCal/mol), la His31(-15.56KCal/mol), la His51(-16.32KCal/mol) (figura 28c) y la His84 (-16.34KCal/mol) En el modelo A, los sitios de adsorción fueron principalmente la His31 (-13.47 KCal/mol), la His84 (-13.5KCal/mol) y la His51 (-13.47KCal/mol).

El análisis por clúster y las energías de adsorción del Cu(0) en las diferentes histidinas, revela que este metal se adsorbe con una mayor espontaneidad (-18.05 KCal/mol) en la región de la His31, en el modelo C



**Figura 28.** Conformaciones de menor energía docking en el proceso de adsorción del Cu(0). a) Modelo C (2/25)( -18.05 KCal/mol) ,b) Modelo C (1/25)( -17.63KCal/mol), c) Modelo D (1/25) (-16.32KCal/mol).

En la conformación de la figura 28b, se observó la formación de un puente de hidrógeno entre la His13 (HE2) y el Glu16 (OE2) con una energía de -3.264 KCal/mol (Figura 29).



**Figura 29.** Formación de un puente de hidrógeno intermolecular entre la His13 (HE2) y el Glu16 (OE2) con una energía de -3.264 KCal/mol. La distancia esta dada en Å.

En la tabla 5 se presentan las energías del proceso de adsorción del Cobre en  $\beta 2m$  para las conformaciones de  $< \Delta G$  de enlace, entre los modelos de la figura 24, para cada carga del metal.

Energía (KCal/mol)	Cu(0)	Cu(+1)	Cu(+2)
Enlace	-18.21	-22.57	-28.45
Intermolecular	-0.99	-6.13	-14.09
Interna Total	-17.33	-16.62	-14.59
De no Enlace	0.18	0.09	0.04
Torsional	0.27	0.27	0.27
Electrostática	0.0	0.39	0.12
VdW_hb_desolv	-0.14	0.21	0.51

**Tabla 5.** Energías del proceso de adsorción del Cobre en la  $\beta 2m$ . Cu(0)-modelo C, Cu(+1)-modelo C, el Cu(+2)-modelo B.

En la tabla 5 se observa la diferencia en la contribución de energía intermolecular para las tres cargas del metal. Lo cual, favorece la adsorción del Cu(+2) en el modelo B.

En conclusión, en las múltiples simulaciones de docking flexible (parte II), se pudo observar una mayor espontaneidad ( $< \Delta G$  de enlace) para el Cu(+2) en el proceso de adsorción en el modelo B. El Cu(0) y Cu(+1) se adsorbieron con mayor espontaneidad en el modelo C.

Se destacaron dos importantes regiones de adsorción. La primera, la región del C-terminal para el Cu(+1) y el Cu(+2). El Cobre se adsorbió a través de interacciones electrostáticas con los grupos carboxilato, con carga negativa, de los Asp96 y Asp98. Para el Cu(0), la región del Asp59 fue la de mayor espontaneidad ( $\langle \Delta G$  de enlace) en la adsorción. Así mismo, se elucidaron importantes sitios de adsorción del Cu(0) en la región de la His13, la His31, la His51 y la His84. Siendo la región de la His31 la de  $\langle \Delta G$  de enlace (-18.05 KCal/mol) en el modelo C.

Se determinaron posibles diferencias en la adsorción del Cobre, debido al proceso de dinámica de la  $\beta 2m$ . En todas las conformaciones, producto de las simulaciones de docking molecular, para las diferentes cargas del metal, el modelo A presentó la menor afinidad por el Cobre en el proceso de adsorción ( $\langle \Delta G$  de enlace)

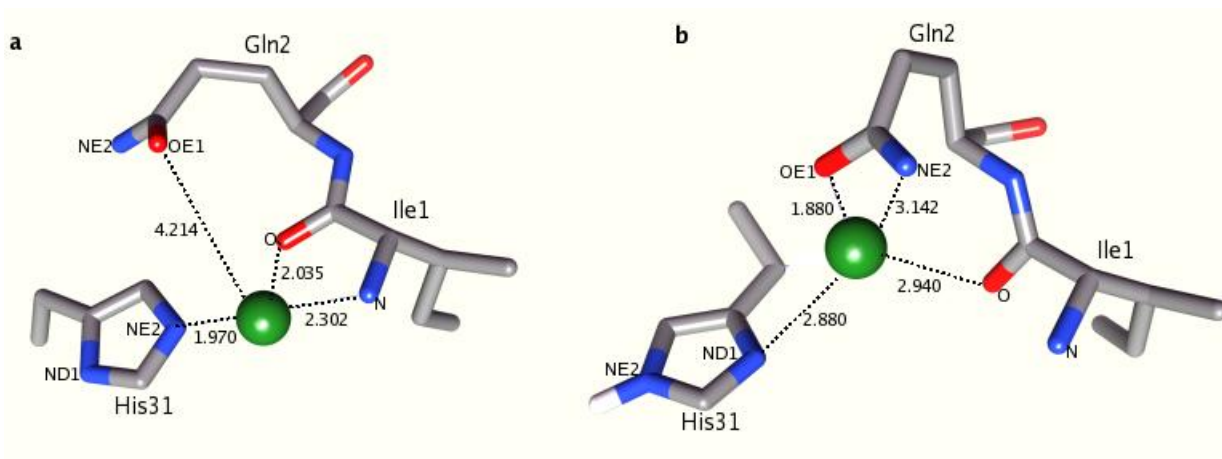
Así mismo, la formación de puentes de hidrógeno en los sitios de adsorción, ya sea, por la presencia del metal y/o por el proceso de relajación, son de importancia para lograr comprender el proceso de adsorción del Cobre en la proteína

### **Parte III**

Las conformaciones de menor energía docking ( $\langle \Delta G$  de enlace), producto de las simulaciones de docking flexible para el Cu(0), evidencian importantes sitios de adsorción en los modelos de  $\beta 2m$ .

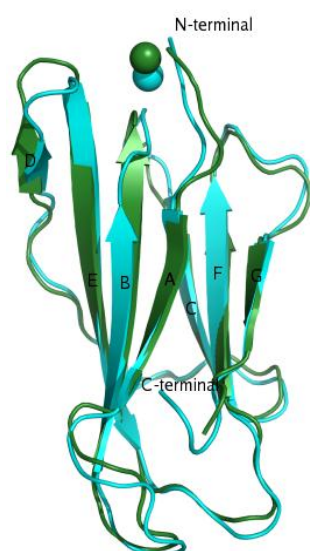
En el modelo C, el Cu(0) se adsorbió con una energía de -14.26 KCal/mol, en la región del N-terminal, a través de interacciones con el anillo imidazol (ND1), la Gln2 (OE1,NE2) y la Ile1 (O) (figura 30b).

En la Figura 30a se presenta el modo de coordinación del Cobre en una subunidad del hexámero mutante H13F (pdb 3CIQ). En las dos conformaciones se observa al anillo imidazol de la His31, la Ile1 y la Gln2, implicados en la interacción con el ion metálico.



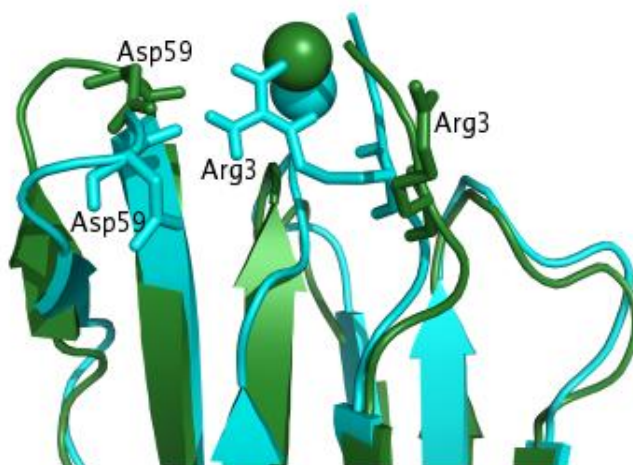
**Figura 30.** a) Coordinación del Cobre en una subunidad del hexámero mutante H13F (pdb 3CIQ) b) Conformación de menor energía docking (-14.26 KCal/mol) (1/25), de la adsorción del Cu(0) en el modelo C. Las distancias de adsorción están dadas en Å.

Las dos conformaciones presentan una desviación del backbone r.m.s = 1.303 Å (figura 31)



**Figura 31.** Comparación de la estructura cristalina de una subunidad del hexámero H13F (verde) (*pdb* 3CIQ) (42) y la conformación de la adsorción del Cu(0) en el modelo C (azul). Desviación del *backbone* r.m.s= 1.303 Å.

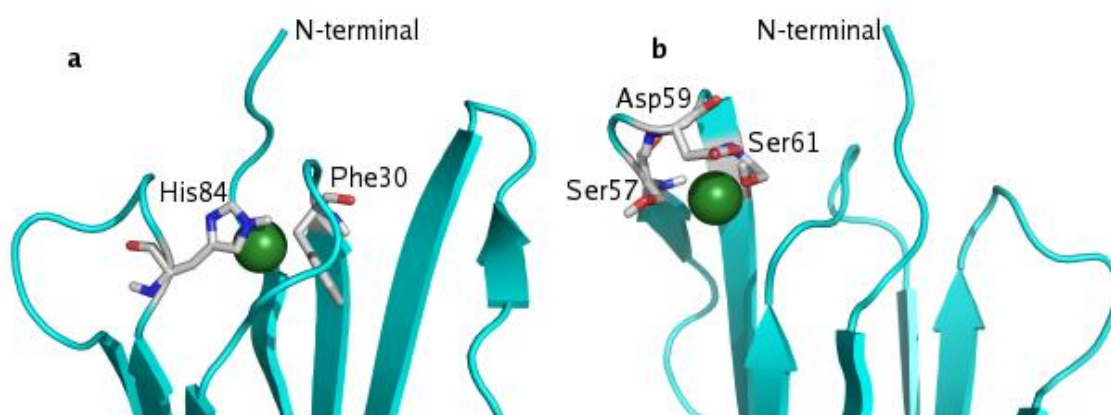
Recientemente Vachet y colaboradores (5) reportaron que la región del N-terminal es responsable del enlace del Cu(II) en la primera etapa de formación de la fibras amiloides. En esta región el Cu(II) puede coordinarse vía el N-terminal, el enlace amida entre la Ile1 y la Gln2, la His31 y el Asp59. En los resultados de docking molecular (figura 30b) se evidencia en detalle atómico la interacción del Cobre en la  $\beta$ 2m. Sin embargo, a diferencia de los resultados presentados por Vachet y colaboradores (5) no se encontró la participación del Asp59 en el proceso de adsorción del metal en el modelo C (figura 30b). Este aa se encuentra a más de 10Å del sitio de adsorción (figura 32) (azul). De igual forma, en la estructura cristalina (*pdb* 3CIQ), en una subunidad del hexámero, el Asp59 se encuentra a más de 6Å de distancia del metal (figura 32) (verde).



**Figura 32.** Comparación de la estructura cristalina de una subunidad del hexámero H13F (verde) (*pdb* 3CIQ) (42) y la conformación de la adsorción del Cu(0) en el modelo C (azul) que ilustra las diferencias en la reposición del Asp59 y la Arg3.

Además de la reposición del Asp59 propuesta por Vachet y colaboradores (5), como un posible cambio estructural que permiten la formación del dímero en el proceso de oligomerización (figura 14), estos investigadores propusieron una reposición de la Arg3, debida a la repulsión con el centro metálico. Sin embargo, en el modelo C (figura 31) (azul) no se observó la reposición de este aa, en comparación con la estructura cristalina de la subunidad del hexámero (figura 32) (verde).

La Arg3 se encuentra a más de 10 Å del Cobre en el hexámero y a menos de 4 Å en el modelo C. Esta diferencia en la reposición de la Arg3, pueden ser debido a la influencia del efecto electrostático en el sitio de adsorción. Debido a que el Cu(II) y la Arg3 pueden repelerse debido a la densidad de carga positiva en el sitio de adsorción. Mientras que en el proceso de adsorción del Cu(0) no se presenta esta repulsión con la Arg3, la cual presenta una carga parcial positiva a pH neutro. La participación del Asp59 en la adsorción del Cobre, se observó en el modelo B, con una energía de -16.42 KCal/mol. En esta región el Cu(0) puede adsorberse a través de interacciones con el backbone de las Ser57 y Ser61, y el grupo carboxilato del Asp59 (Figura 32b). En el modelo A, el Cu(0) se adsorbió con mayor espontaneidad ( $<\Delta G$  de enlace) en la regiones de la His84 (figura 33a). En el modelo D, la región del Glu36 fue la región de mayor espontaneidad (-12.18 KCal/mol) en el proceso de adsorción del Cu(0).



**Figura 33.** Mejores conformaciones ( $< \Delta G$  de enlace) de las simulaciones de docking molecular flexible III, para el Cu(0) a) (-14.36 KCal/mol)-modelo A (1/25), b) (-16.42 KCal/mol)-modelo B (1/25)

En la tabla 6 se presentan las energías del proceso de adsorción del Cu(0) en los cuatro modelos, para las conformaciones de menor energía docking ( $< \Delta G$  de enlace).

Energía (KCal/mol)	A	B	C	D
Enlace	-14.36	-16.42	-14.26	-12.18
Intermolecular	-0.74	-0.73	-0.71	-0.4
Interna Total	-16.07	-16.41	-17.36	-15.59
De no Enlace	-2.17	-0.46	-3.54	-3.53
Torsional	0.27	0.27	0.27	0.27
Electrostática	0.0	0.0	0.0	0.0
VdW_hb_desolv	-0.23	-0.2	-0.11	-0.39

**Tabla 6.** Energías del proceso de adsorción del Cu(0) en los modelos A, B, C, D, para las conformaciones de menor energía docking ( $< \Delta G$  de enlace).

En la tabla 6 no se observan diferencias en la contribución de energía para el proceso de adsorción del Cu(0). Sin embargo, se destaca que la adsorción del Cu(0) en el modelo B, es el proceso de mayor espontaneidad ( $< \Delta G$  de enlace).

Para el Cu(+2), se encontraron dos regiones de mayor espontaneidad ( $< \Delta G$  de enlace) en el proceso de adsorción en el modelo C. La región del Glu36 (r1) con una energía docking de -21.78 KCal/mol (10/25) y la región del Asp34 (r2) con una energía docking de -21.21KCal/mol (9/25).

Energía (kCal/mol)	r1	r2
Enlace	-21.78	-21.21
Intermolecular	-9.39	-8.93
Interna Total	-17.05	-16.95
De no Enlace	-4.39	-4.39
Torsional	0.27	0.27
Electrostática	-11.76	-11.99
VdW_hb_desolv	2.12	2.48

**Tabla 7.** Energías del proceso de adsorción del Cu(+2) en el modelo C, para las conformaciones de menor energía docking ( $<\Delta G$  de enlace).

El análisis por clúster y las energías de adsorción del Cu(+2) en el modelo C, señalan que las dos regiones (r1 y r2), tienen similar espontaneidad en el proceso de adsorción. Se evaluó la afinidad del Cu(+2) en el modelo C, con el fin establecer alguna similitud entre los sitios de adsorción del Cu(0) en el modelo C. Sin embargo, los sitios de adsorción del Cu(+2) están influenciados por las fuerzas de Coulomb en la región de la adsorción.

#### 4.2 Determinación de la afinidad

Se determinó la afinidad de la adsorción del Cobre en la  $\beta 2m$ , evaluando la energía libre de enlace (energía docking) ( $E_c$  3). Las conformaciones de mayor espontaneidad ( $<\Delta G$  de enlace) en el proceso de adsorción, fueron seleccionadas como las conformaciones de mayor afinidad en la primera etapa de interacción del Cobre con la  $\beta 2m$ .

De las múltiples simulaciones de docking molecular se destacan las conformaciones de mayor espontaneidad ( $<\Delta G$  de enlace)

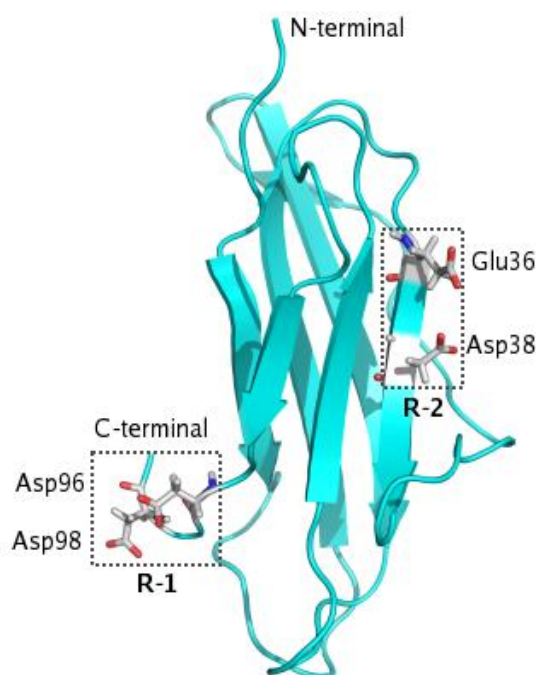
Conformaciones	df-parte	modelo	Cobre	$\Delta G$ KCal/mol
1 (Figura 24c)	II	B	Cu(+2)	-28.45
2 (Figura 24a)	I	A	Cu(+2)	-18.69
3	II	C	Cu(+1)	-22.57
4	I	A	Cu(+1)	-14.21
5 (Figura 25b)	II	C	Cu(0)	-18.21
6 (Figura 27a)	II	C	Cu(0)	-18.05
7 (Figura 27b)	II	C	Cu(0)	-17.63
8 (Figura 26)	II	B	Cu(0)	-17.17
9 (Figura 29)	III	C	Cu(0)	-14.26

**Tabla 8.** Conformaciones de mayor espontaneidad ( $<\Delta G$  de enlace) del docking flexible (df) (parte I,II,III).

Las conformaciones 1 y 3 destacan la región del C-terminal, en la cual el cobre puede adsorberse a través de interacciones electrostáticas con el grupo carboxilato del Asp96 y Asp98 (R-1). Las conformaciones 2 y 4 destacan la región del Glu36 y Asp38 (R-2).

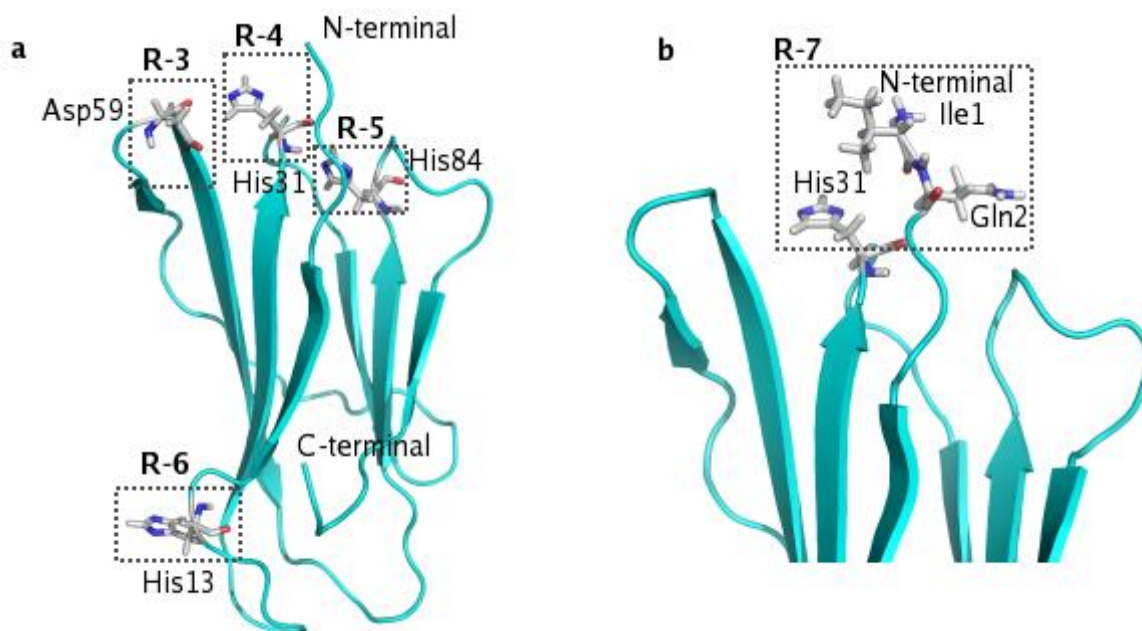
Estas dos regiones (figura 34) son las de mayor afinidad ( $<\Delta G$  de enlace) en el proceso de adsorción, para el Cobre con carga positiva, i.e., +2 y +1. Para el Cu(0) se destacaron varias regiones de afinidad en el proceso de adsorción. En la región de mayor afinidad (R-3), el Cobre se adsorbe a través de interacciones de VdW con el Asp59 y la Ser61 (conformación 5). Así mismo, la adsorción de este metal se puede llevar a cabo en las histidinas, especialmente en la His31 (conformación 6) (R-4), His13 (conformación 7) (R-6) y His84 (conformación 8) (R-5) (figura 35a)

La adsorción del Cobre en el N-terminal, es una región de relevancia(R-7), debido a que recientes reportes de Vachet y colaboradores (5), destacan que el Cobre se coordina con estos aa (Ile1, Gln2, His31) (figura 35b)



**Figura 34.** Regiones de mayor espontaneidad en el proceso de adsorción del Cu(+2) y el Cu(+1) en la  $\beta 2m$ .

Las regiones de mayor afinidad para el Cobre (figura 34 y 35), presentan notorias diferencias en el tipo de interacciones en el sitio de adsorción. Es decir, para el Cu(0) la adsorción esta determinada por las interacciones de VdW , en especial, con las histidinas expuestas en superficie y la región del N-terminal. Para el Cu(+1) y el Cu(+2) la adsorción esta determinada por las fuerzas de Coulomb, a través de interacciones electrostáticas, con aa con carga negativa en las cadenas laterales, tales como, Aspartatos y Glutamatos



**Figura 35.** Regiones de mayor espontaneidad en el proceso de adsorción del Cu(0) en la  $\beta 2m$ .

Además, se encontraron diferencias en la afinidad de la adsorción del Cobre entre los diferentes modelos. El modelo B, fue el más afín con el Cu(+2) y el modelo C, con el Cu(+1) , en el proceso de relajación del proteína para el docking flexible parte II.

Al evaluar la afinidad en el modelo A, para el docking flexible I, se encontró que las diferencias en la contribución de energía electrostática, para las diferentes cargas del metal, favorecieron el proceso de adsorción del Cu(+2), en las diferentes réplicas. Para el docking flexible III, no se observó una variación energética considerable en el proceso de adsorción del Cu(0) en los modelos A, B, C, D. Sin embargo, el Cu(0) se adsorbió con mayor afinidad en el modelo B.

### 4.3 Validación de resultados

Los resultados de las múltiples simulaciones de docking molecular se compararon con los resultados más relevantes reportados en la literatura, de los posibles sitios de coordinación del Cobre en solución.

La primera etapa en la formación de fibras amiloides es el proceso de coordinación del Cu(II), presente en las membranas de diálisis (1,3), en la superficie de la  $\beta 2m$  como monómero, el cual precede la formación de dímeros, tetrámeros y hexámeros, formados durante el proceso de oligomerización (4-5). Vachet y colaboradores (4), describieron el proceso de oligomerización en el modelo propuesto del papel catalítico del Cu(II) en la oligomerización de la  $\beta 2m$  (figura 8).

Con base en la teoría ABDB (13), el Cu(II) es considerado un ácido intermedio, el cual prefiere interactuar con bases intermedias ( i.e., imidazol, amina, amida) (tabla2). Los resultados más relevantes de los datos experimentales, señalan que el Cu(II) interactúa con el anillo imidazol de las histidinas (His31, His51, His84) expuesta en la superficie de la  $\beta 2m$ , en especial, con la His31 y el enlace amida entre la Ile1 y la Gln2, región del N-terminal (5).

Además, Lim y Vachet reportaron la posibilidad de un segundo sitio del enlace, donde el Cu(II) podría interactuar con las cadenas laterales polares (carga negativa) de los grupos carboxilato (base dura), del Asp96 y Asp98 (44).

En resumen, el Cu(II) en solución tiene una carga aparente de +2, actúa como ácido de Lewis con aa de carácter básico de la  $\beta 2m$ , en especial el anillo imidazol de las histidinas. En solución, el proceso de solvatación tiene gran influencia en la química de coordinación del metal en la formación de complejos de coordinación (16) (Ecuación 1). De lo anterior, se puede decir que en los complejos formados de Cobre, se puede presentar una disipación de la carga, debido a los efectos del solvatación.

Así, la influencia de la carga en estos complejos es un factor determinante para elucidar bases moleculares del proceso de adsorción del metal en la  $\beta 2m$ .

En las simulaciones de docking molecular, se estudió el efecto electrostático en el proceso de adsorción del Cobre en la  $\beta 2m$ . Los resultados destacan diferencias en las regiones de adsorción del metal en la superficie de la proteína. La región R-1 (figura 34) puede ser considerada como un sitio de enlace del metal, cuando predominan las fuerzas de Coulomb, que facilitan la adsorción del metal, a través de interacciones electrostáticas entre el ión metálico y los grupos carboxilato de carga opuesta, del Asp96 y Asp98.

Además, en la R-1 ya sea, por la presencia del metal y/o por el proceso de relajación de la proteína en solución, se pueden formar puentes de hidrógeno intramoleculares (figura 23), los cuales, sumados al efecto de adsorción del metal, pueden ser bases moleculares de la primera etapa de oligomerización de la  $\beta 2m$ .

La región R-3 (figura 35a) puede adsorber el Cobre a través de interacciones de VdW con el Asp59, la Ser57 y la Ser61. En este proceso la energía interna del sistema es un factor determinante en la etapa de adsorción. La reposición del Asp59 fue un cambio estructural propuesto por Vachet y colaboradores (5) para la formación de dímeros en la etapa de oligomerización. Esta reposición implica la rotación de este residuo hacia el N-terminal (figura 13). Sin embargo, en los resultados de docking molecular se observó que el Cobre se adsorbe con gran afinidad en la R-3, sin involucrar la región del N-terminal en la adsorción.

Además, en la R-3 ya sea, por la presencia del metal y/o por el proceso de relajación de la proteína, se pueden formar puentes de hidrógeno intermoleculares (figura 21), los cuales, sumados al efecto de adsorción del metal, pueden ser bases moleculares de la primera etapa de oligomerización de la  $\beta 2m$ .

En la Región R-5 (figura 35a), el Cobre se adsorbe a través de interacciones de VdW con los nitrógenos del anillo imidazol de la His84 y el anillo aromático de la Phe30. Estudios de RMN (7) y de MS (44) determinaron que la His84 está implicada en enlace metálico, en el estado no nativo de la proteína. Por tanto, los resultados de docking proporcionan a nivel atómico un posible complejo de coordinación del Cobre en el estado no nativo de la proteína.

Además, Vachet y colaboradores (5) reportaron que la Phe30, la Pro32, la Phe62 y la His84 son residuos que hacen parte de la vecindad del enlace metálico.

En la región R-6 (figura 34a), el Cobre se adsorbe a través de interacciones de VdW con el anillo imidazol de la His13, el grupo amina de la Lys19 y la cadena lateral del Glu16. Estos residuos están implicados en la interfaz de contacto entre proteína-proteína en la formación del dímero (figura15). De hecho, Vachet y colaboradores (5) propusieron la formación de dos puentes salinos que involucran a la Lys19 y el Glu16 (figura 14) en el proceso de formación del dímero. Es decir, la adsorción del metal en esta región de la proteína puede causar cambios en la estabilidad de la proteína, que lleven a aglomerarse con otro monómero, en el proceso de oligomerización (figura 8)

La región R-7 (figura 34b), es una de las regiones propuestas recientemente por Vachet y colaboradores (5), a estar implicada en el proceso de adsorción del Cu(II) en la primera etapa del mecanismo de formación de fibras amiloides. Los detalles a nivel atómico de un posible modo de coordinación se presentan en la figura 30. El cobre se adsorbe en la región del N-terminal, a través de interacciones de VdW con el oxígeno de la Ile1, el nitrógeno (NE2) y el oxígeno (OE1) de la Gln2, y el nitrógeno (ND1) del anillo imidazol de la His31

La región R-4 (figura 35a) fue la de mayor espontaneidad en el proceso de adsorción del Cu(0) entre las regiones de las diferentes histidinas. En la R-4, la His31, la Phe30, la Phe62 y el Trp60 son los aa implicados en etapa de adsorción del Cobre.

Por último, se determinó que el proceso de adsorción del Cobre, podría estar determinado por factores electrostáticos en los sitios de mayor afinidad del metal, en la superficie de proteína.

La región del C-terminal y el N-terminal, exponen en superficie aa por los cuales el Cobre presenta gran afinidad. En especial los Asp96 y Asp98, cuando se tienen en cuenta las interacciones de Coulomb. La His 31 y el N-terminal, cuando predominan las interacciones de VdW y cuando hay una contribución significativa de energía interna en el sitio de adsorción.

## 5. CONCLUSIONES

En el proceso de adsorción del Cobre en la proteína rígida se observó diferencias en la espontaneidad ( $<\Delta G$  de enlace), determinada por la contribución de energía electrostática. El  $\text{Cu}(+2)$  se adsorbió con mayor espontaneidad en la región del C-terminal, a través de interacción de Coulomb con las cadenas laterales de los Asp96 y Asp98. Además, para una carga específica del metal, no se observó una variación energética considerable. Es decir, no hay diferencias considerables entre los modelos (A, B, C, D) en el proceso de adsorción.

En el docking flexible I, la región del Glu36 y el Asp38 fue la de mayor espontaneidad ( $<\Delta G$  de enlace) en el proceso de adsorción del  $\text{Cu}(+2)$  en el modelo A. Lo cual, es debido a una mayor contribución de la energía electrostática y de la energía interna total.

En el docking flexible II, el modelo B presentó la mayor afinidad ( $<\Delta G$  de enlace) por el  $\text{Cu}(+2)$ . El  $\text{Cu}(0)$  y  $\text{Cu}(+1)$  se adsorbieron con mayor afinidad en el modelo C. Se destacaron dos regiones de adsorción, la región del C-terminal para el  $\text{Cu}(+1)$  y el  $\text{Cu}(+2)$ . El Cobre se adsorbió a través de interacciones electrostáticas con los grupos carboxilato, con carga negativa, de los Asp96 y Asp98. Para el  $\text{Cu}(0)$ , la región del Asp59. Así mismo, el  $\text{Cu}(0)$  se adsorbió en la región de las histidinas (13,31,51 y 84), siendo la región de la His31 la de mayor afinidad en el modelo C.

En el docking flexible II, Se determinaron posibles diferencias en la adsorción del Cobre, debido al proceso de dinámica de la  $\beta 2m$ . En todas las conformaciones, producto de las simulaciones de docking molecular, para las diferentes cargas del metal, el modelo A presentó la menor afinidad por el Cobre en el proceso de adsorción ( $>\Delta G$  de enlace)

En el docking flexible III, se elucidó a nivel atómico un sitio de adsorción reportado en los recientes reportes de Vachet y colaboradores (5), donde el Cu(0) se adsorbe en el modelo C, a través de interacciones con el anillo imidazol (ND1), la Gln2 (OE1,NE2) y la Ile1 (O). Además, esta región de adsorción fue elucidada en la estructura cristalina (*pdb* 3CIQ).

De las múltiples simulaciones de docking molecular se puede concluir que la adsorción para el Cu(+1) y el Cu(+2) está determinada por las fuerzas de Coulomb, a través de interacciones electrostáticas con aa con carga negativa en las cadenas laterales, tales como, Aspartatos y Glutamatos, expuestos en la superficie de la  $\beta$ 2m. En especial en la región del C-terminal (Asp96 y Asp98). Para el Cu(0) la adsorción está determinada por las interacciones de VdW, en especial, con las histidinas expuestas en superficie (His31) y la región del N-terminal.

Se encontraron diferencias en la espontaneidad ( $\Delta G$  de enlace) en la adsorción del Cobre entre los diferentes modelos, en el proceso de relajación de la proteína. El modelo B y C, fueron las estructuras de mayor afinidad del metal, en el proceso de adsorción.

Los efectos electrostáticos, la formación de puentes de hidrógenos y la relajación de la proteína, lo cual, deja expuestos a ciertos aminoácidos en superficie, son factores que en solución pueden ser relevantes para iniciar el proceso de oligomerización de la  $\beta$ 2m, que precede la formación de fibras amiloides en la DRA.

En el modelo propuesto de adsorción, no se tienen en cuenta los efectos de dispersión de la carga del metal. Por tanto, se hacen necesarios estudios donde se evalúe el efecto de la dispersión de la carga en los sitios de adsorción.

## 6. RECOMENDACIONES

- Consideramos que un mayor refinamiento de los resultados, utilizando un nivel de teoría más alto, puede en principio estudiar el efecto de disipación de la carga del Cobre en los sitios de adsorción.
- Continuar con los estudios de adsorción del Cobre en la  $\beta 2m$ , para establecer las bases moleculares de la formación de fibras amiloides en la DRA, y así a futuro se puedan diseñar procedimientos y/o fármacos que controlen o mitiguen este fenómeno biológico.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Morgan, C.J., Gelfand, M., Atreya, C., and Miranker, A.D. (2001). *J. Mol. Biol.* 309, 339-345.
2. Floege, J. and Ehlerding, G. (1996). *Nephron.* 72, 9-26.
3. Eakin, C.M. and Miranker, A.D. (2005). *Biochim. Biophys. Acta.* 1753, 92-99.
4. Kwasi, A., Mahar, M., Srikanth, R., Olbris, M., Tyson, J., and Vachet, R.W. (2008). *Protein Science.* 17, 748-759.
5. Srikanth, R., Leah Mendoza, V., Bridgewater, J., Zhang, G., and Richard W. Vache. (2009). *Biochemistry.* 48, 9871-9881.
6. G. Verdone, A. Corazza, P. Viglino, F. Pettirossi, S. Giorgetti, P. Mangione, A. Andreola, M. Stoppini, V. Bellotti, G. Esposito. (2002). *Protein Sci.* 11, 487-499.
7. Eakin, C. M., Knight, J. D., Morgan, C. J., Gelfand, M. A., and Miranker, A. D. (2002). *Biochemistry* 41, 10646–10656
8. Villanueva, J., Hoshino, M., Katou, H., Kardos, J., Hasegawa, K., Naiki, H., and Goto, Y. (2004). *Protein Sci.* 13, 797-809.
9. Glenner, G. G. (1980). *N Engl J Med.* 302, 1283-1292
10. <http://www.bioportfolio.com/indepth/Amyloidosis.html>.
11. Toro, C.E., Quintana, M.A., Restrepo, J.F., Rondón, F., Páez, O., Iglesias, A (2007). *Rev. Colomb. Reumatol.* 14, 297-309
12. Hadar Benyamini<sup>1</sup>, K. Gunasekaran, Haim Wolfson and Ruth Nussinov<sup>1</sup>. (2003). *J. Mol. Biol.* 330, 159-174.
13. Pearson, R. G. (1963) *J. Am. Chem. Soc.* 85, 3533.
14. Stace, A.J. (2001). *Phys. Chem. Chem. Phys.* 3, 1935-1941.
15. Gareth Thomas (2007). *Medicinal Chemistry: An introduction.* Second Edition. John Wiley & Sons Ltd.
16. F. A. Cotton and G. Wilkinson, *Advanced Inorganic Chemistry*, Wiley, London, 1988.
17. Abbas, A.B.; Lichtman A.H. (2009). «Ch.3 Antigen capture and presentation to lymphocytes», *Basic Immunology. Functions and*

- disorders of the immune system*, 3rd edición, Saunders (Elsevier). ISBN 978-1-4160-4688-2
18. Strominger, J.L. (2002) Human histocompatibility proteins. *Immunol. Rev.* 185, 69–77.
  19. Khan, A.R., Baker, B.M., Ghosh, P., Biddison, W.E., Wiley, D.C. (2000). *J. Immunol.* 164, 6398-6405.
  20. Eakin, C.M., Attenello, F.J., Morgan, C.J., and Miranker, A.D. (2004). *Biochemistry.* 43, 7808-7815.
  21. Floege, J. and Ketteler, M. (2001). *Kidney Int.* 59, S164-S171.
  22. Trinh, C.H., Smith, D.P., Kalverda, A.P., Phillips, S.E. and Radford, S.E (2002). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99. 9771– 9776.
  23. Dokmanic, I., ikic, M., and S. Tomic. (2008). *Acta Crystallography.* 64, 257-263.
  24. R.C. Weast (Ed.), *Handbook of Chemistry and Physics*, Chemical Rubber Co., Cleveland, 1970.
  - M.C. Linder, M. Hazeg-Azam, *Am. J. Clin. Nutr.* 63 (1996) 797S.
  25. World Health Organization, *Guidelines for Drinking-Water Quality: Incorporating First Addendum*. Vol. 1, Recommendations, 3rd ed., Geneva, 2008.
  26. P.L. Wirth, M.C. Linder. (1985). *J. Nat. Cancer Inst.* 75, 277.
  27. Van Ypersele de Strihou, C., Jadoul, M., Malghem, J., Maldague, B. & Jamart, J. (1991). *Kidney Int.* 39, 1012-1019.
  28. A. Messerschmidt, R. Huber, T. Poulos, K. Wieghardt, *Handbook of Metalloproteins*, vol. 2, John Wiley & Sons, Ltd., New York, 2001.
  29. Cramer, Christopher J. (2004). *Essentials of computational chemistry theories and models*, second edition, WILEY, , pp62-64
  30. Morris, G. M. (1998). *J. Computational Chemistry.* 19, 1639-1662.
  31. Cornell, WD, Cieplak P, Bayly C. (1995). *Journal of the American Chemical Society.* 117, 5179-5197.
  32. Sanner, M.F., Stoffler, D., and Olson, A.J. (2002). 10<sup>th</sup> International Python Conference.
  33. Iorga, B., Herlem, D., Barre, E., and Guillou, C. (2006). *Journal of Molecular Modeling*, 12(3), 366-372.

34. Bush, A.I., and Tanzi, R.E. (2002). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 7317-7319.
- Cornell, W.D., Cieplack, P., Bayly, C.I., Gould, I.R., Merz, K. M., et al. (1995). *J. Am. Chem. Soc.* 117, 5179-5197.
35. Uversky, V.N., Li, J., and Fink, A.L. (2001). *J. Biol. Chem.* 276, 44284-44296.
36. McParland, V.J., Kad, N.M., Kalverda, A. P., Brown, A., Kirwin-Jones, P., Hunter, M. G., Sunde, M., and Radford, S. E. (2000). *Biochemistry.* 39, 8735-8746
37. Esposito, G., Michelutti, R., Verdone, G., Viglino, P., Hernandez, H., Robinson, C. V., Amoresano, A., Dal Piaz, F., Monti, M., Pucci, P., Mangione, P., Stoppini, M., Merlini, G., Ferri, G., and Bellotti, V. (2000). *Protein Sci.* 9, 831-845.
38. Relini, A., Canale, C., De Stefano, S., Rolandi, R., Giorgetti, S., Stoppini, M., Rossi, A., Fogolari, F., Corazza, A., Esposito, G., Gliozzi, A., and Bellotti, V. (2006). *J. Biol. Chem.* 281, 16521-16529.
39. Eakin, C.M., Berman, A.J., and Miranker, A.D. (2006). *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 202-208.
40. Calabrese, M.F. and Miranker, A.D. (2007). *J. Mol. Biol.* 367, 1-7.
41. Calabrese, M. F., Eakin, C. M., Wang, J. M., and Miranker, A. D. (2008). *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15, 965-971.
42. Burns C.S., Aronoff-Spencer E., Dunham C. M., Lario P., Avdievich N.I., Antholine WE, et al. (2002). *Biochemistry.* 41, 3991-4001.
43. Lim, J., and Vachet, R. W. (2004). *Anal. Chem.* 76, 3498-3504.
44. Ubbink, M., Worrall, J. A. R., Canters, G. W., Groenen, E. J. J., and Huber, M. (2002). *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 31, 393-422.
45. Lim, J and Vachet, R. W. (2003). *Anal. Chem.* 75, 1164-1172.
46. Bridgewater, J. D., Lim, J; and Vachet, R. W. (2006). *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 17, 1552-1559.
47. Mendoza, V and Vachet, R. (2008). *Anal. Chem.*, 80, 2895-2904.
48. Srikanth, R., Wilson, J., Burns, C. S., and Vachet, R. W. (2008). *Biochemistry* 47, 9258-9268.
49. Zheng, H., Chruszcz, M., Lasota, P., Lebioda, L., and Minor, W. (2008). *J. Inorg. Biochem.* 102, 1765-1776.

50. Vanessa Leah Mendoza; Kwasi Antwi; Mario A. Barón-Rodríguez; Cristian Blanco and Richard W. Vachet. (2010). *Biochemistry* 49, 1522–1532.
51. Deng, N.J., Yan, L., Singh, D and Piotr Cieplak. (2006). *Biophysical Journal*. 90, 3865-3879.
52. Chungwen Liang, Philippe Derreumaux, and Guanghong Wei. (2007). *Biophysical Journal*. 93, 3353-3362.
53. Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys* 1983, 79, 926-935.
54. MOPAC2009, James J. P. Stewart, Stewart Computational Chemistry, Colorado Springs, CO, USA, [HTTP://OpenMOPAC.net](http://OpenMOPAC.net) (2009).
55. GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis E. Lindahl (2001). *J. Mol. Model.* 7; 306-317.