

Bases moleculares del cambio conformacional y
aglomeración de la β -2-microglobulina. Efecto del Cu^{+2}
como mediador en la formación de fibras amiloides

Mario Alberto Barón Rodríguez

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2012

**Bases moleculares del cambio conformacional y
aglomeración de la β -2-microglobulina. Efecto del Cu^{+2}
como mediador en la formación de fibras amiloides**

Mario Alberto Barón Rodríguez

Tesis sometida para optar por el título de:
Doctor en Química

Asesor
Cristian Blanco Tirado
Químico, Ph.D.

Universidad Industrial de Santander
Facultad de Ciencias
Escuela de Química
Grupo de Fisicoquímica Teórica y Experimental
2012

“Los ángeles no están en el cielo y aún así caen todos los días en la tierra. Ellos no reciben su alas por estirpe, se las otorgamos por sus bondadosos actos.”

Esta tesis se la dedico a Roci, mi compañera de vida, quién ha estado constantemente apoyando cada uno de los chiflados proyectos que se me ocurren en la vida. También se la dedico a Mateo, el angel guardian de nuestros sueños.

Agradecimientos

En este momento quisiera aprovechar la oportunidad para agradecer a personas que han estado a mi lado para lograr finalizar este magnífico trabajo.

- Especialmente a Roci, Mateo y Majo porque son el impulso constante de mis desafíos profesionales. Además, porque durante estos últimos años han tenido una enorme tolerancia y han renunciando a anhelos propios para estar a mi lado.
- A toda mi familia por que me apoyaron en la realización de mis estudios profesionales y doctorales.
- A mis compañeros de grupo de investigación, por las extensas charlas a cerca de ideas formidables.
- A todos mis amigos, especialmente a Luis, Diego, Arnold, Ciro y Jose por las extensas discusiones de como “el hombre nace bueno y sociedad lo corrompe”. Además, por hacerme partícipe der sus expectativas de vida.
- Al profesor Cristian Blanco, por dirigir mis estudios doctorales y capacitarme para lograr un trabajo laborioso y vanguardista.
- Al profesor Richard W. Vachet, por su valioso tiempo en la discusión de los resultados de este trabajo y por acogerme en su grupo de investigación.
- Al profesor Rodrigo Torres por brindarme una mano, aún cuando poco me conocía, y por sus valiosos aportes conceptuales en el área de la bioquímica.

- A todas las personas que me hicieron crecer como científico y especialmente como persona.

También quisiera agradecer a la Universidad Industrial de Santander por otorgarme la beca de sostenimiento para estudiantes de doctorado durante 4 años. Además, por brindarme apoyo económico para la realización de las dos pasantías realizadas durante los estudios doctorales.

Finalmente, quisiera agradecer a COLCIENCIAS por el apoyo económico para la elaboración de la tesis y las pasantías realizadas a través de los proyectos de investigación “Bases moleculares de la amiloidosis inducida por diálisis” con código **1102-452-21245** y “Estudio molecular de la formación de proto-fibras de la β -2-microglobulina. Primera etapa en la descripción de la amiloidosis relacionada con diálisis” con código **1102-521-28856**.

Tabla de contenido

Introduction	25
1. Estado del arte	27
1.1. Formación de fibras amiloides en la DRA	35
1.1.1. Coordinación del Cu^{2+} sobre la superficie de la $\beta 2m$	35
1.1.2. Cambio conformacional de la $\beta 2m$ promovido por el Cu^{2+}	37
1.1.3. Formación de proto-fibras a partir del complejo $\beta 2m-Cu^{2+}$	38
2. Coordinación del Cu^{+2} en la superficie de la $\beta 2m$	43
2.1. Superficie electrostática de la β -2-microglobulina	45
2.2. <i>Docking</i> Cu^{2+} en la superficie de la β -2-microglobulina	47
2.2.1. <i>Docking</i> rígido	47
2.2.2. <i>Docking</i> flexible	49
3. Cambios conformacionales de la $\beta 2m$ promovidos por la interacción con el Cu^{+2}	55
3.1. Superposición de la proteínas	56
3.2. <i>Coordinate driving</i>	61
3.3. Dinámica molecular	63
3.3.1. Desviación de la estructura secundaria.	65
3.3.2. Movilidad de la estructura secundaria	67
3.3.3. Análisis por agrupamiento	70
3.4. Validación de los cambios conformacionales	80
3.4.1. Area superficial accesible al solvente.	80
3.4.2. <i>Docking</i> proteína - DEPC	84
3.4.2.1. <i>Coordinate driving</i>	86

TABLA DE CONTENIDO

3.4.2.2. Dinámica molecular	87
4. Formación de dímeros	91
4.1. Efecto del Cu^{2+} sobre el acoplamiento proteína-proteína	91
4.2. Efecto de la mutación H13F sobre el acoplamiento proteína-proteína . .	94
4.3. Dimerización de la β -2-microglobulina salvaje en presencia del Cu^{2+} . .	102
5. Formación de tetrámeros	105
6. Metodología	109
6.1. Coordinación del Cu^{+2} en la superficie de la β 2m	109
6.1.1. Determinación de la potencial electrostático de la superficie de la β -2-microglobulina	111
6.1.2. <i>Docking</i> Cu^{+2} en la superficie de la β -2-microglobulina	112
6.2. Cambios conformacionales de la β 2m promovidos por la interacción con el Cu^{+2}	114
6.2.1. Cambio conformacional mediante <i>Coordinate driving</i>	115
6.2.2. Cambio conformacional mediante dinámica molecular	116
6.2.3. Validación de los cambios conformacionales	118
6.2.3.1. Área superficial accesible al solvente.	119
6.2.3.2. <i>Docking</i> molecular DEPC sobre la β 2m	119
6.3. Formación dímeros	119
6.3.1. Determinación del efecto del Cu^{2+} sobre el acoplamiento proteína - proteína	120
6.3.2. Determinación del efecto de la mutación H13F en el acoplamiento proteína - proteína	121
6.3.3. Determinación de dímeros a partir de la β -2-microglobulina salvaje.	122
6.4. Formación del tetrámero	123
7. Conclusiones	125
7.1. Resumen de contribuciones	127
7.2. Futuras investigaciones	127

TABLA DE CONTENIDO

8. Publicaciones	129
8.1. Artículos	129
8.2. Presentaciones orales	129
8.3. Presentaciones escritas	130
Bibliografía	133
Anexos	143

Lista de figuras

1.1. Estructura de β -2-microglobulina	28
1.2. Etapas generales de la amiloidosis relacionada con diálisis	29
1.3. Fibras amiloides formadas a diferentes pH.	31
1.4. Dímero de la $\beta 2m_{2F8O}(P32A)$	39
1.5. Modelo del Cu^{2+} como mediador del proceso de formación de fibras a partir de la $\beta 2m$	40
1.6. Hexámero de la $\beta 2m_{3CIQ}(H13F)-Cu^{2+}$	41
2.1. $\beta 2m_{1DUZ}$ vs proteínas Apo.	44
2.2. Puntos de mayor y menor potencial electrostático superficial en la apo-proteína $\beta 2m$	46
2.3. Adsorción del Cu^{2+} mediante <i>docking</i> rígido.	48
2.4. Lugares de adsorción del Cu^{2+} , Cu^{1+} y Cu^0 mediante <i>docking</i> rígido.	50
2.5. Lugares de adsorción del Cu^{2+} mediante <i>docking</i> flexible.	51
2.6. Configuración del lugar de adsorción del Cu^0 obtenida mediante las simulaciones de <i>docking</i> flexible.	52
2.7. Distancia entre el Asp59 y el Cu^0	53
3.1. Diferencias estructurales entre $\beta 2m_{1DUZ}$ y $\beta 2m$ promotora de proto-fibras.	56
3.2. Diferencias estructurales en la región N-terminal entre la $\beta 2m_{1DUZ}$ y las proteínas que forman proto-fibras.	58
3.3. Interpolación entre la $\beta 2m_{1DUZ}$ y la holo-proteína $\beta 2m_{3CIQ}(H13)_m$	61
3.4. Superficie de energía potencial del cambio conformacional de la proteína(sn) a la $\beta 2m_{3CIQ}(H13)_m$	62

LISTA DE FIGURAS

3.5. Configuración de los complejos metal - proteína evaluados por dinámica molecular.	64
3.6. RMSD del esqueleto de la $\beta 2m$ en ausencia y presencia del Cu^{2+}	65
3.7. RMSF del esqueleto de la $\beta 2m$ en ausencia y presencia del Cu^{2+}	68
3.8. Superposición de las conformaciones más representativas de la dinámica molecular.	73
3.9. Superficie hidrofóbica de las conformaciones representativas.	76
3.10. Ubicación de amino ácidos marcados con DEPC.	81
3.11. Área superficial accesible al solvente.	82
3.12. Agrupamiento aromático en el bucle DE de la holo-proteína H3.	84
3.13. DEPC en las proximidades de la His31 de la proteína Apo.	85
3.14. DEPC en las proximidades de la Ser33 de la $\beta 2m(sn)$	85
3.15. DEPC en las proximidades de la Ser33 de la $\beta 2m_{3CIQ}(H13)_m-Cu^{2+}$	86
3.16. DEPC en las proximidades de la His31 de las holo-proteínas H1 y H4.	88
3.17. DEPC en las proximidades de la Ser33 de la holo-proteína H3.	89
4.1. Modelos de las diferentes conformaciones de dímeros obtenidos por <i>docking</i> proteína-proteína.	92
4.2. Dímeros de $\beta 2m_{3CIQ}(H13F)-Cu^{2+}$	93
4.3. Posición de la mutación H13F en el dímero $\beta 2m_{3CIQ}(H13F)-Cu^{2+}$	94
4.4. Potencial electrostático superficial de la $\beta 2m_{3CIQ}(H13F)-Cu^{2+}$	95
4.5. Distribución de los modelos de dímeros a partir de la holo-proteína $\beta 2m_{3CIQ}(H13F)-Cu^{2+}$	96
4.6. Dímero antiparalelo $\beta 2m_{3CIQ}(H13)-Cu^{2+}$	97
4.7. Dímero antiparalelo $\beta 2m_{3CIQ}(H13)-Cu^{2+}$. Amino ácidos evaluados experimentalmente.	98
4.8. Variación del campo electrostáticos por efecto de la variación Phe13His en el dímero $\beta 2m_{3CIQ}(H13F)-Cu^{2+}$	100
4.9. Distribución de los modelos de dímeros a partir de la holo-proteína $\beta 2m_{1DUZ}-Cu^{2+}$	103
5.1. Modelos de tetrameros representativos de los estudios de <i>docking</i> dímero - dímero.	106
5.2. Modelo de tetramero paralelo.	107

LISTA DE FIGURAS

6.1. Restricción tipo NOE	116
A.1. Conformación de la $\beta 2m_3CIQ(H13)-Cu^{2+}$ en la región N-terminal. . . .	145
B.1. Distribución de los modelos de dímeros a partir de la holo-proteína ${}_3CIQ(H13F)-Cu^{2+}$	147
B.2. Configuraciones de dímeros a partir de $\beta 2m_3CIQ(H13F)-Cu^{2+}$	149
B.3. Configuraciones de dímeros a partir de $\beta 2m_3CIQ(H13F)-Cu^{+1}$	150
B.4. Configuraciones de dímeros a partir de $\beta 2m_3CIQ(H13F)-Cu^0$	151
B.5. Configuraciones de dímeros a partir de $\beta 2m_3CIQ(H13F)$	152
B.6. Configuraciones de dímeros a partir de $\beta 2m_3CIQ(H13)-Cu^{2+}$	153
B.7. Configuraciones de dímeros a partir de $\beta 2m_3CIQ(H13F)-Cu^{2+}$	154
B.8. Configuración de dímeros a partir de $\beta 2m_3CIQ(H13^+)-Cu^{2+}$	155
B.9. Configuraciones de dímeros a partir de $\beta 2m_3CIQ(H13^+)$	156
B.10. Configuraciones de dímeros a partir de la $\beta 2m_3CIQ(H13)_m-Cu^{2+}$	157
B.11. Configuraciones de dímeros a partir de la $\beta 2m_3CIQ(H13)_m$	158
B.12. Configuraciones de dímeros a partir de la $\beta 2m_1DUZ-Cu^{2+}$	159
B.13. Conformaciones de dímeros a partir de la $\beta 2m_1DUZ$	160
C.1. Conformaciones de tetrámeros a partir de dímeros de $\beta 2m_3CIQ(H13F)-$ Cu^{2+}	163

Lista de tablas

2.1. pKa de histidinas presentes en la apo-proteína $\beta 2m$	45
3.1. Análisis por agrupamiento	71
3.2. pK_a de amino ácidos en la $\beta 2m$ y $\beta 2m-Cu^{2+}$	78
6.1. Complejos Cu^{2+} -proteína.	117
B.1. Puntuación de las conformaciones diméricas obtenidas por <i>docking</i> proteína - proteína.	148
C.1. Puntuación de las conformaciones tetraméricas obtenidas por <i>docking</i> dímero - dímero.	161

Lista de Anexos

A. Cambios conformacionales de la $\beta 2m$ promovidos por la interacción con el Cu^{2+}.	145
B. Formación de dímeros.	147
C. Formación de tetrámeros.	161

Figuras

A.1. Conformación de la $\beta 2m_{3CIQ}(H13)-Cu^{2+}$ en la región N-terminal. . . .	145
B.1. Distribución de los modelos de dímeros a partir de la holo-proteína $_{3CIQ}(H13F)-Cu^{2+}$	147
B.2. Configuraciones de dímeros a partir de $\beta 2m_{3CIQ}(H13F)-Cu^{2+}$	149
B.3. Configuraciones de dímeros a partir de $\beta 2m_{3CIQ}(H13F)-Cu^{+1}$	150
B.4. Configuraciones de dímeros a partir de $\beta 2m_{3CIQ}(H13F)-Cu^0$	151
B.5. Configuraciones de dímeros a partir de $\beta 2m_{3CIQ}(H13F)$	152
B.6. Configuraciones de dímeros a partir de $\beta 2m_{3CIQ}(H13)-Cu^{2+}$	153
B.7. Configuraciones de dímeros a partir de $\beta 2m_{3CIQ}(H13F)-Cu^{2+}$	154
B.8. Configuración de dímeros a partir de $\beta 2m_{3CIQ}(H13^+)-Cu^{2+}$	155
B.9. Configuraciones de dímeros a partir de $\beta 2m_{3CIQ}(H13^+)$	156
B.10. Configuraciones de dímeros a partir de la $\beta 2m_{3CIQ}(H13)_m-Cu^{2+}$	157
B.11. Configuraciones de dímeros a partir de la $\beta 2m_{3CIQ}(H13)_m$	158
B.12. Configuraciones de dímeros a partir de la $\beta 2m_{1DUZ}-Cu^{2+}$	159
B.13. Conformaciones de dímeros a partir de la $\beta 2m_{1DUZ}$	160
C.1. Conformaciones de tetrámeros a partir de dímeros de $\beta 2m_{3CIQ}(H13F)-Cu^{2+}$	163

LISTA DE TABLAS

Tablas

B.1. Puntuación de las conformaciones diméricas obtenidas por <i>docking</i> proteína - proteína.	148
C.1. Puntuación de las conformaciones tetraméricas obtenidas por <i>docking</i> dímero - dímero.	161

Resumen

Título:

Bases moleculares del cambio conformacional y aglomeración de la β -2-microglobulina. Efecto del Cu^{2+} como mediador en la formación de fibras amiloides. *

Autor:

Mario Alberto Barón Rodríguez †

Palabras claves:

β -2-microglobulina, Cu^{2+} , dinámica molecular, *docking* proteína - proteína.

Descripción:

Se estudiaron las bases moleculares que posibilitan la formación de fibras amiloides a partir de unidades de β -2-microglobulina (β 2m) utilizando métodos computacionales. Estas fibras se acumulan en el sistema músculo esquelético de pacientes con insuficiencia renal crónica, afección conocida como la amiloidosis relacionada con largos tratamientos de diálisis. De acuerdo con recientes estudios experimentales la formación de proto-fibras discretas, i.e. dímeros, tetramero y hexámeros, es inducida por la unión del Cu^{2+} a la proteína.

Para entender como se inicia el proceso de precipitación de la proteína se estudió el cambio conformacional y aglomeración de la β 2m. Se realizaron múltiples simulaciones de *docking* ion - proteína, dinámica molecular, *docking* proteína - proteína y minimizaciones de energía para lograr este propósito.

Los resultados de *docking* ion - proteína muestran que el Cu^{2+} se ubica en la vecindad de los residuos N-terminales y alrededor de la His31, en concordancia con las evidencias experimentales. Los resultados de dinámica molecular (DM) revelan la importancia del Cu^{2+} como factor desestabilizante de la conformación nativa de la proteína.

Por otra parte, los resultados de *docking* holo-proteína - holo-proteína confirman la importancia del acoplamiento antiparalelo entre los dos monómeros, los cuales se unen a través de las láminas ABED - ABED. También se corroboró la importancia de la conformación aplegada del bucle DE, consecuencia de la unión del Cu^{2+} en la proteína, en el acoplamiento antiparalelo. Además, los análisis de momentos multipolares muestran como el cambio de grupos funcionales en las láminas ABED de los monómeros promueven una pérdida de complementariedad electrostática en la interfase del dímero.

Finalmente, los resultados de *docking* dímero- β 2m - dímero- β 2m evidencian las distintas posibilidades de las cofiguraciones tetraméricas de la holo-proteína. Además, muestran que la estructura más estable es el acoplamiento paralelo de dímeros mediado por la interacción entre los fragmentos D de un dímero con las hojas G del dímero complementario.

*Trabajo de grado.

†Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: Cristian Blanco Tirado.

Abstract

Title:

Molecular Basis of β -2-microglobulin Aggregation. Effect of Cu^{2+} in Amyloids Formation. [‡]

Author:

Mario Alberto Barón Rodríguez [§]

Keywords:

β -2-microglobulin, Cu^{2+} , molecular dynamics, protein - protein *docking*.

Description:

In this work was used computational techniques to study molecular basis that enable formation of amyloid fibrils from β -2-microglobulin (β 2m) . These fibers accumulate in the skeletal muscle of patients with chronic renal failure, this condition was called dialysis related amyloidosis. Experimental studies shown that Cu^{2+} binding to protein and induce proto-fibril formation, i.e. dimer, tetramer and hexamer.

In this study we focus to understand molecular basis of amyloid fibrils formation from β 2m. To achieve this purpose, it was performed multiple ion - protein docking, molecular dynamics, protein - protein docking simulations and energy minimizations.

Results of ion - protein docking show that Cu^{2+} is located near N-terminal residues and His31, this result is consistent with experimental data. Results of molecular dynamics simulations also reveal the importance of Cu^{2+} as a destabilizing factor which promotes protein conformational change.

Results of holo-protein - holo-protein docking simulations also confirmed the importance of antiparallel coupling between two monomers, which bind through the ABED - ABED sheets, via electrostatic and van der Waals interactions. Importantly, the hydrophobic residues tend to stay away from the surface area exposed to solvent. Furthermore, change of functional groups on ABED sheets shown change in multipole moments of monomers, these change promote decrease of electrostatic complementarity in interface of dimer.

Finally, results of β 2m dimer - β 2m dimer docking shown different possibilities of tetrameric configurations of holo-protein. In addition, shown that the most stable structure is the parallel coupling of dimers mediated by interaction between D fragment dimer with G sheets of complementary dimer.

[‡]Research work

[§]Science Faculty. Chemistry Department. Advisor: Cristian Blanco Tirado.

β 2m	β -2-microglobulina
β 2m(sn)	β 2m salvaje de conformación nativa
HLA-A	Antígeno Leucocitario humano; siglas en inglés de <i>Human Class I Histocompatibility Antigen</i>
DRA	Amiloidosis relacionada con largos tratamientos de diálisis; siglas en inglés de <i>Dialysis Related Amyloidosis</i>
Estructura	Disposición de los átomos en una molécula
Apo-proteína	Proteína que no está acomplejada con un grupo prostético, e.g. grupo hemo o ion metálico. En este estudio se denominará apo-proteína a la β 2m libre de Cu^{2+}
Holo-proteína	Proteína conjugada, i.e. proteína con un grupo prostético unido. En este estudio se denominará holo-proteína a la β 2m- Cu^{2+} .
DM	Dinámica molecular
NOE	Efecto nuclear Overhauser; siglas en inglés de <i>Nuclear Overhauser Effect</i>
PDB	Base de datos de proteínas; siglas en inglés de <i>Protein Data Bank</i>
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
aa	Amino ácido
Å	Angstrom
RMSD	Desviación; siglas en inglés de <i>Root Mean Square Deviation</i>
RMSF	Fluctuación; siglas en inglés de <i>Root Mean Squae Fluctuation</i>
RMN	Resonancia magnética nuclear
MS	Espectrometría de masas; siglas en inglés de <i>Mass Spectrometry</i>
MCO	Oxidación catalizada por metales; siglas en inglés de <i>Metal Catalysis Oxidation</i>
DLS	Dispersión de luz dinámica; siglas en inglés de <i>Dispersion Light Scatennig</i>
SEC	Cromatografía de exclusión por tamaño; siglas en inglés de <i>Selection Exclution Chromatography</i>
DEPC	Dietilpirocarbonato; siglas en inglés de <i>diethylpyrocarbonate</i>
GdnHCl	Hidrocioruro de guanidina; siglas en inglés <i>Guanidine Hydrochloride</i>

Introducción

La amiloidosis relacionada con largos tratamientos de diálisis – DRA de sus siglas en inglés *Dialysis Related Amyloidosis* – es una de las complicaciones más frecuentes y que mayor contribuye a la morbilidad de los pacientes con insuficiencia renal crónica avanzada. Es una seria complicación que se presenta en muchos de los pacientes que son sometidos a largos tratamientos de hemodiálisis. Las manifestaciones clínicas incluyen síndrome del túnel carpiano y dolor articular con hinchazón, que son el reflejo de la precipitación de fibras amiloides en los tejidos, i.e. aglomerados proteicos insolubles en matrices fisiológicas (1).

Se ha encontrado que estas fibras amiloides están formadas por unidades de β -2-microglobulina (β 2m) (2, 3). Se cree que la aglomeración de la β 2m se debe a un cambio conformacional de la proteína como consecuencia de su interacción con el Cu^{+2} , presente en las membranas de diálisis, y posterior agregación. El resultado del proceso es la formación de fibras insolubles que precipitan en las articulaciones causando dolor (2). Se desconoce el mecanismo mediante el cual la presencia del Cu^{+2} promueve el cambio conformacional y la formación de fibras de β 2m. Se han desarrollado estudios experimentales (4, 5, 6, 7) y teóricos (8, 9) con el fin de determinar las bases moleculares de este proceso, con la esperanza de desarrollar tratamientos que controlen la producción de estos aglomerados proteicos; sin embargo, aún no se tiene una explicación clara del mecanismo.

En esta tesis se propuso desarrollar un modelo teórico, que describiera a nivel molecular las etapas de la formación de proto-fibras a partir de unidades de β 2m y Cu^{2+} , i.e. i) la importancia electrónica del acoplamiento del Cu^{2+} en la β 2m, ii) el cambio conformacional de la proteína como consecuencia de la coordinación del Cu^{2+} , ii) la

Introducción

importancia de este cambio conformacional en la aglomeración de monómeros, iv) la configuración de dímeros y v) tetrámeros estables. Para lograr estos objetivos se desarrollaron múltiples simulaciones de dinámica molecular y de Monte Carlo. La validación del modelo se realizó corroborando los resultados con datos de espectrometría de masas desarrollados por el grupo de investigación del profesor Richard W. Vached, profesor asociado a la Universidad de Massachusetts, Amherst, US (10, 11).

Capítulo 1

Estado del arte

La $\beta 2m$ es una proteína de 99 amino ácidos y de aproximadamente 12 kDa, cuya secuencia aparece en la figura 1.1 A. En su estado nativo adopta una conformación de siete hojas plegadas tipo *beta*. Éstas se organizan para formar dos láminas *beta*. Una lámina β está conformada por las hojas A, B, D y E mientras que la otra está formada por las hojas C, F y G, como se muestra en la figura 1.1 B. La estructura terciaria de la proteína se estabiliza por interacción entre las láminas tipo β y un enlace disulfuro formado entre la Cys25 y la Cys80 (12).

La $\beta 2m$ es el fragmento proteico más liviano del complejo mayor de histocompatibilidad tipo I que en humanos se denomina antígeno de histocompatibilidad o antígeno leucocitario humano – HLA de sus siglas en inglés *Human Leukocyte Antigen* –. El HLA se muestra en la figura 1.1 C. (13).

El complejo HLA se encuentra ubicado en la superficie de todas las células nucleadas. Es el encargado del reconocimiento inmunológico y de la señalización entre células del sistema inmune (14). La $\beta 2m$ es transportada por el torrente sanguíneo después de su liberación del complejo HLA para ser ultrafiltrada en los riñones, readSORBIDA y catabolizada en los túbulos proximales (15, 16). En pacientes con desórdenes renales crónicos los niveles de $\beta 2m$ aumentan, en la mayoría de los casos de 50 a 100 veces la concentración fisiológica normal (17, 18, 19), debido a la deficiente función de los riñones e insuficiente remoción por las membranas de diálisis. Estos pacientes, sometidos a largos tratamientos de diálisis, sufren manifestaciones clínicas como el síndrome

1. Estado del arte

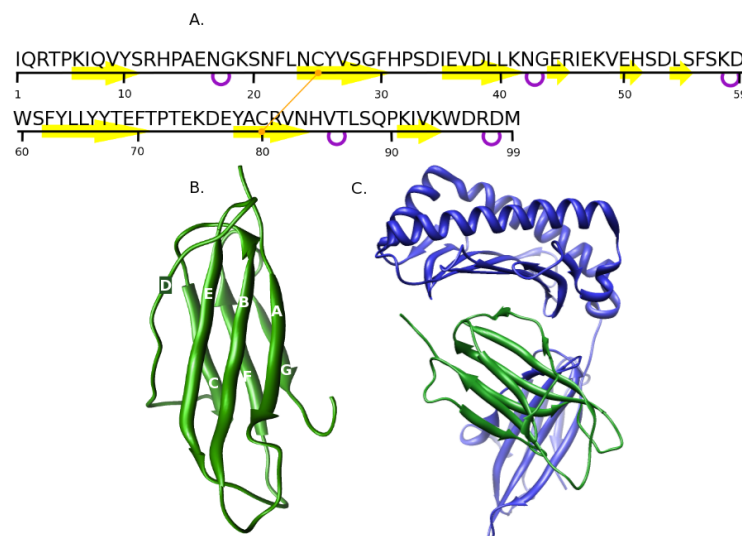


Figura 1.1: Estructura de β -2-microglobulina - A. Estructura primaria de la β 2m. Hojas *beta* en flechas amarillas. Bucles en púrpura. B. Estructura de la β 2m indicando la nomenclatura de las hojas *beta*. C. Antígeno leucitario humano (HLA-A 02001). β 2m en verde. (13).

del túnel carpiano y dolor articular con hinchazón, los cuales son el reflejo de la precipitación de fibras amiloides en los tejidos (1). Estas fibras amiloides están formadas por unidades de β 2m (2, 3, 20). En particular estas complicaciones asociadas con tratamientos de diálisis se conocen con el nombre de amiloidosis relacionada con diálisis (DRA). Esta es una de las complicaciones más frecuentes y que mayor contribuye a la morbilidad de los pacientes con insuficiencia renal crónica avanzada sometidos a largos tratamientos de diálisis (1).

En los últimos años se han desarrollado estudios orientados a entender el mecanismo de la formación de las fibras amiloides asociadas con la insuficiencia renal crónica. Se ha demostrado que la estructura microscópica de estas fibras amiloides es similar a las de otras enfermedades tales como el Alzheimer y Parkinson (21). Esta similitud sugiere que la aglomeración de las fibras sigue la misma ruta en las diversas enfermedades. Actualmente, los mecanismos propuestos en la literatura acerca de la formación de fibras amiloides muestran las siguientes etapas: i) una transformación de la conformación nativa de la proteína, i.e. un cambio en la estructura secundaria, ii) agregación de monómeros para la formación de proto-filamentos y iii) la aglomeración de proto-

filamentos para la construcción de la fibra amiloide (22). En la figura 1.2 se muestran las etapas generales de la DRA.

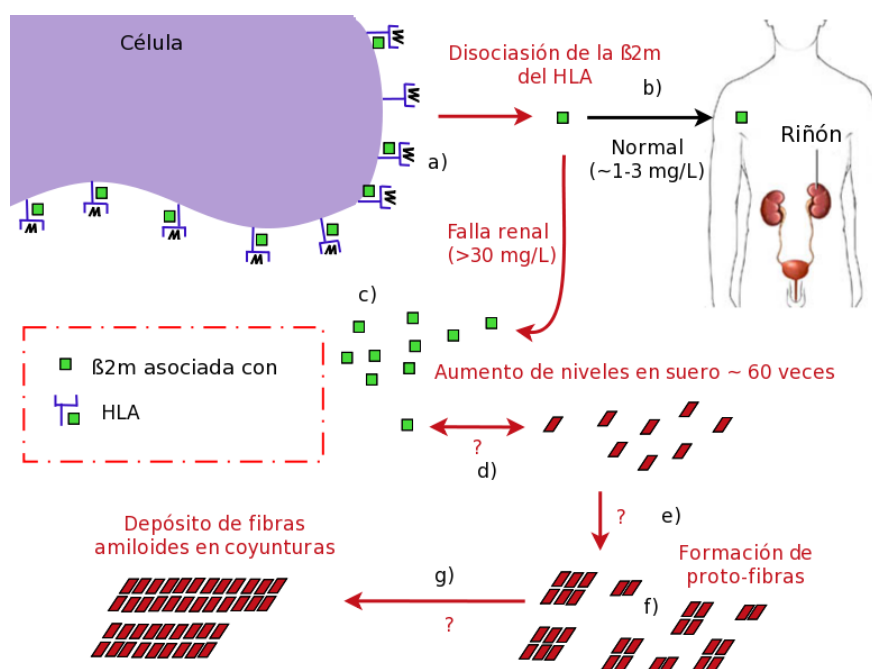


Figura 1.2: Etapas generales de la amiloidosis relacionada con diálisis - Diagrama de las etapas generales de la formación de fibras amiloides asociada a largos tratamientos de diálisis. a) Disociación de la $\beta 2m$ del complejo HLA (13). b) Transporte de la $\beta 2m$ hacia los riñones, para su catabolismo (18). c) Aumento de las concentraciones de $\beta 2m$ en el suero (19). d) Cambio conformacional de la $\beta 2m$ (23). e) Agregación de monómeros de $\beta 2m$ no-nativa (7, 10, 24). f) Formación de proto-fibras (24, 25). g) Depósito de fibras amiloides en las articulaciones. Adaptada de Radford *et al.* (26).

Se han realizado estudios *ex vivo* e *in vitro* que intentan reproducir las condiciones fisiológicas de formación de fibras amiloides debido a que es imposible estudiar su formación *in vivo*. Solo hasta la década de los ochenta Sethi y Gower demostraron que la alta concentración de la $\beta 2m$ no es una condición suficiente para lograr la formación de fibras amiloides (27). Por otra parte, Davison encontró depósitos amiloides en pacientes que no habían sido sometidos a terapias de diálisis, lo cual sugiere que el proceso de diálisis no es el factor principal pero si un factor acelerador de la DRA (28).

A partir de estos trabajos se han desarrollado diferentes estudios para entender

1. Estado del arte

cuales son los factores que afectan realmente la formación de fibras amiloides en los procesos relacionados con diálisis. Estos estudios de formación de fibras amiloides de la DRA se pueden clasificar en las siguientes categorías:

1. **Condiciones ácidas con valores de pH entre 1,2 y 4,0.** Gojyo *et al.* *ex vivo* demostraron que a condiciones ácidas las fibras amiloides pueden ser elongadas usando monómeros de $\beta 2m$ (29). Por esta razón Radford *et al.* en estudios *in vitro* evaluaron el efecto que tiene el pH sobre la formación, el crecimiento y la morfología de las fibras. Los autores encontraron que la formación de fibras se lleva a cabo en soluciones con valores de pH menor a 5,0 y fuerza iónica mayor a 50 mM. También evidenciaron que el pH ácido es un factor desestabilizante de la conformación nativa de la proteína (30). Además evidenciaron que la estructura final que adopta la polimerización es consecuencia de la conformación de la $\beta 2m$. Por ejemplo a pH 1,6 las fibras son largas como las que aparecen en la figura 1.3 A.; mientras que a pH cercano a 4,0 las fibras formadas son cortas y curvilíneas. Ver figura 1.3 B.(31). En estos estudios se demuestra que el pH y la fuerza iónica de la solución son factores que influyen sustancialmente en el crecimiento de las fibras (30, 31).
2. **Reducción del puente disulfuro entre la Cys25 y la Cys80.** Los datos obtenidos a partir de soluciones ácidas (30, 31) son consistentes con el modelo general de la formación de fibras amiloides a partir de la $\beta 2m$ (22) en el cual una o más proteínas parcialmente plegadas se asocian para formar ensambles fibrosos. Con el objeto de evaluar el rol de la desestabilización de la proteína en la formación de las fibras amiloides, Radford *et al.* estudiaron *in vitro* la capacidad de formación de fibras amiloides de la $\beta 2m$ reducida en el puente disulfuro Cys25 - Cys80. Estos estudios se realizaron a valores de pH que oscilan entre 1,5 y 4,0. Los resultados muestran que la $\beta 2m$ sin puente disulfuro forma fibras atípicas, filamentos delgados y flexibles, diferentes a las observadas en tejidos de pacientes. Los estudios concluyen que el mecanismo de formación de fibras utilizando esta metodología es muy diferente al mecanismo de formación de fibras con la $\beta 2m$ nativa. Por esta razón, se descarta que la reducción del puente disulfuro sea un

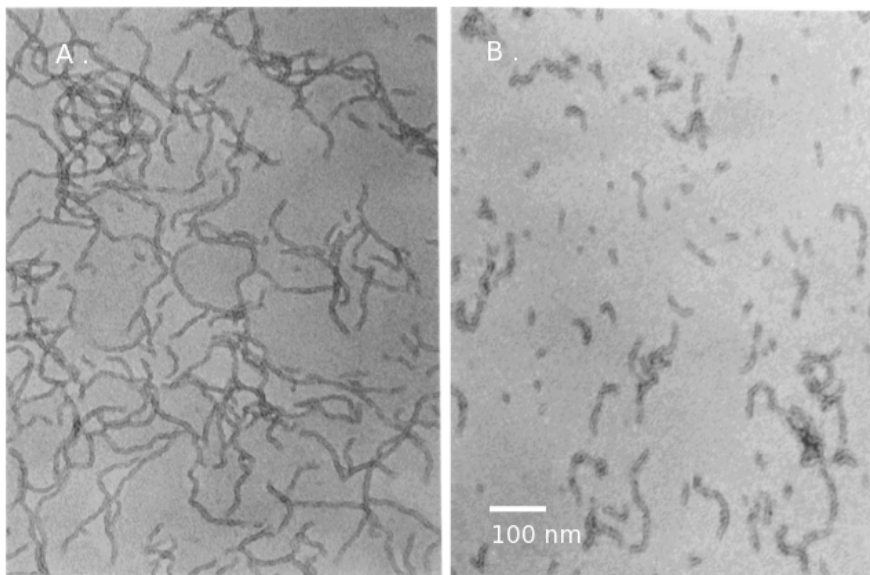


Figura 1.3: Fibras amiloides formadas a diferentes pH. - Imagen de microscopía electrónica de las fibras de $\beta 2m$ formadas a diferentes valores de pH. A. pH1,6 y B. pH 3,4 (31).

paso importante en el mecanismo de formación de fibras amiloides en la DRA (32, 33, 34, 35).

3. Síntesis de la $\beta 2m$ sin los primeros seis residuos N-terminales ($\Delta N6\beta 2m$).

Ferri *et al.* demostraron que la mayor modificación de la $\beta 2m$ en fibras *ex vivo* es la proteólisis en los sitios C-terminales de la Lys6 y Tyr10. En especial la $\Delta N6\beta 2m$ mostró una elevada tendencia a la auto-agregación en comparación con la $\beta 2m$ nativa (16). Por esta razón Bellotti *et al.* sintetizaron la $\Delta N6\beta 2m$ y promovieron la formación de fibras. El propósito del estudio fue investigar las posibles implicaciones que tiene este fragmento de $\beta 2m$ sobre la dinámica y estabilidad de la proteína durante la formación de fibras. Los resultados mostraron que la $\Delta N6\beta 2m$ forma con facilidad agregados proteicos y fibras. Además, sugiere que las hojas E de diferentes proteínas interaccionan para estabilizar los trímeros y tetrámeros formados a partir este polipéptido. Por último, la cinética de la formación de estas fibras mostró la existencia de una etapa lenta asociada a la maduración de la fibra amiloide necesaria para obtener una estructura tipo *beta* cruzada propia de la DRA (36).

4. Presencia de colágeno a condiciones fisiológicas de temperatura y pH.

Como se mencionó anteriormente, la mayoría de las fibras amiloides se localizan en las articulaciones de los pacientes con insuficiencia renal crónica. Los primeros agregados del material amiloide se generan en los tendones y en los cartílagos periarticulares (37). Arakawa *et al.* demostraron mediante estudios *in vitro* que la $\beta 2m$ se une principalmente a la estructura del colágeno con alta especificidad (38). Por otro lado, Bellotti *et al.* demostraron que a condiciones fisiológicas de pH y temperatura se formaban fibras amiloides utilizando colágeno como semilla de nucleación. En estos estudios se utilizaron la $\beta 2m$ nativa y la $\Delta N6\beta 2m$ como péptidos de partida para la generación de las fibras. Los resultados muestran que la morfología de las fibras obtenidas es similar a las observadas *ex vivo*. Los autores sugieren que el direccionamiento en la formación de las fibras se logra gracias a la distribución de cargas sobre la superficie del colágeno (39, 40).

5. Mutaciones que influyen en la cinética del desdoblamiento parcial de la $\beta 2m$.

El cambio conformacional de la estructura secundaria de la $\beta 2m$ nativa hacia una conformación con propiedades amiloidogénicas es una de las etapas limitantes en la formación de fibras amiloides (3, 41). Desde 1984 se sabe que la isomerización *cis-trans* del ángulo *omega* de la prolina es uno de los factores más relevantes en los cambios conformacionales de las proteínas. Además se conoce que esta isomerización genera conformaciones meta-estables (42). Pensando en esto Goto *et al.* sintetizaron, desdoblaron parcialmente y evaluaron la cinética del re-plegamiento de la $\beta 2m$ y de la $\beta 2m$ con la mutación P32V. Los resultados de Dicroísmo Circular – CD de sus siglas en inglés *Circular Dichroism* – muestran que la fase lenta del re-plegamiento de la $\beta 2m$ desaparece ante la mutación P32V. Además, el aumento en la dispersión del corrimiento químico asociado a la Val32, en los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN), sugieren la rápida interconversión del ángulo *omega* de la Val32 en comparación con la Pro32 en la $\beta 2m$ salvaje ($\beta 2m(s)$). Este resultado muestra que la Pro32 es responsable por la estabilidad de la conformación parcialmente desdoblada de la $\beta 2m$ (43, 44). Con base en estos resultados, Radford *et al.* sintetizaron la $\beta 2m(s)$ y la $\beta 2m(P32G)$ para evaluar las capacidades de isomerismo, re-plegamiento y propiedades amiloidogénicas de las dos proteínas. Usando RMN heteronuclear como técnica analíti-

ca de la isomerización *cis-trans* de la posición 32 mostraron bandas diseminadas asociadas a la Gly32. Los autores sugieren que esta dispersión de la señal del corrimiento químico en la $\beta 2m(P32G)$ es el reflejo de la interconversión rápida del ángulo *omega* de la Gly32, a comparación de la lenta interconversión de la Pro32. Los resultados de fluorescencia intrínseca revelaron un complejo mecanismo del re-plegamiento mediante la participación de múltiples intermediarios y rutas paralelas. Además, en este trabajo se evaluó la capacidad amiloidogénica de la proteína, la proteína mutada y de los intermediarios del proceso de re-plegamiento. Los resultados indican que los intermediarios del re-plegamiento de la $\beta 2m(P32G)$ presentan una capacidad amiloidogénica mayor que los intermediarios asociados a la proteína salvaje de conformación nativa (45).

6. **Mutaciones que estabilizan el bucle DE.** Los grupos funcionales hidrofóbicos e hidrofílicos del bucle DE de la $\beta 2m$ son esenciales para la correcta función del complejo HLA. Este bucle queda expuesto al solvente luego de que la $\beta 2m$ se disocia del complejo. Estudios desarrollados por Goto *et al.*, utilizando mutaciones sitio dirigidas y fluorescencia intrínseca, muestran que el Trp60 juega un papel importante en la formación de fibras amiloides (46) .

Por estas razones Bellotti *et al.* quisieron evidenciar la importancia de la función del Trp60 en el plegamiento nativo de la $\beta 2m$ y a lo largo de su transición hacia la formación de fibras amiloides. Para lograr este propósito sintetizaron la proteína salvaje y la $\beta 2m(W60G)$, por mutagénesis sitio dirigida. Los resultados de fluorescencia intrínseca muestran tres diferencias como consecuencia del reemplazo del Trp60 por Gly: estabilización de la $\beta 2m$, inhibición de la formación de fibras amiloides y debilitamiento de las interacciones con la cadena larga del complejo HLA. La estabilidad de la $\beta 2m$ mutada es debida a que la Gly60 permite que el bucle DE adquiera una conformación regular de vuelta *beta* sin tensión en el esqueleto de la proteína, contrario a la presencia del triptófano en esta posición (47, 48).

Con el fin de caracterizar mejor el papel de la tensión geométrica y la hidrofobicidad del bucle DE, Bolognesi *et al.* reportaron la síntesis y caracterización biofísica de dos mutantes de la $\beta 2m$, $\beta 2m(W60C)$ y $\beta 2m(D59P)$. La sustitución del triptófano por cisteína mantiene las mismas restricciones estereoquímicas de

1. Estado del arte

la proteína salvaje. La estructura cristalina de la $\beta 2m(W60C)$ revela que el bucle DE adopta la misma conformación de vuelta *beta* que en la $\beta 2m(W60G)$; sin embargo, presenta la misma eficiencia en la producción de fibras amiloides que la proteína salvaje. Esto indica que la conformación del bucle DE de la $\beta 2m(W60G)$ no es el único factor estructural que determina la inhibición de la formación de fibras amiloides. Con base en estos resultados los autores quisieron evaluar los efectos del incremento de la rigidez en el bucle DE, por esta razón sintetizaron la $\beta 2m$ con la variante D59P. La estructura resuelta por difracción de rayos X muestra la tensión del esqueleto en el residuo 59, aumentando la rigidez del bucle DE. Además, los resultados evidencian la pérdida de la estabilidad térmica de la proteína y el aumento de la capacidad de formación de fibras amiloides (49). En conclusión estos resultados experimentales soportan la hipótesis de que la tensión conformacional del bucle DE afecta la estabilidad y las propiedades amiloidogénicas de la $\beta 2m$.

Los estudios anteriormente mencionados muestran que el pH ácido, fragmentos de $\beta 2m$, el colágeno, la inestabilidad del bucle DE y la isomerización *cis-trans* de la Pro32 son factores que inducen la formación de fibras amiloides. Estos estudios también muestran la formación de estas fibras a condiciones extremas, alejadas de las condiciones normales en las cuales se forman las fibras amiloides en la DRA. En adición a los factores mencionados existe otro factor fisiológico que induce espontáneamente la formación de fibras amiloides a partir de la proteína salvaje: el Cu^{2+} en solución.

En este trabajo se estudió el efecto del Cu^{2+} como uno de los factores importantes en la formación de las fibras amiloides por las siguientes razones:

- i) Existen estudios que muestran la relación directa de la enfermedad con la terapia de diálisis. En especial cuando los procesos de diálisis se realizaban con membranas y tuberías que contenían cobre (1, 50).
- ii) La asociación de cationes metálicos divalentes, e.g. Cu^{2+} y el Zn^{2+} , en procesos de aglomeración. Especialmente el Cu^{2+} asociado con la formación de agregados β -amiloides en las enfermedades de Alzheimer (51, 52), proteína prion (53) y la formación de agregados a partir de la cadena liviana de la inmunoglobulina (54).

- iii) Estudios *in vitro* a condiciones fisiológicas de pH, temperatura, fuerza iónica, concentración de iones y concentración de proteína en solución muestran que el Cu^{2+} es fundamental en la formación de fibras amiloides a partir de $\beta 2m$ (10, 11, 24, 25, 55).

A continuación se muestran los trabajos más relevantes, encontrados en la literatura, que intentan describir el mecanismo de asociación del Cu^{2+} a la proteína y posterior formación de fibras.

1.1. Formación de fibras amiloides en la DRA

Se cree que la formación de fibras amiloides a partir de la $\beta 2m$ como consecuencia del acomplejamiento del Cu^{2+} se puede desarrollar en las siguientes etapas: i) la coordinación del Cu^{2+} sobre la $\beta 2m$, ii) el cambio conformacional de la proteína salvaje de conformación nativa por efecto del acomplejamiento del Cu^{2+} , iii) agregación de la proteína formando proto-filamentos que posteriormente se aglomeran para formar las fibras amiloides. La evidencia experimental y teórica de cada una de estas etapas se muestra a continuación.

1.1.1. Coordinación del Cu^{2+} sobre la superficie de la $\beta 2m$

Como vimos anteriormente, el Cu^{2+} es un elemento fundamental en la formación de fibras amiloides de la $\beta 2m$. La primera etapa involucra el acomplejamiento del Cu^{2+} sobre la superficie de la proteína. Por esta razón, técnicas espectroscópicas como RMN y espectrometría de masas – MS por sus siglas en inglés *Mass Spectrometry* – han sido utilizadas para determinar la ubicación del Cu^{2+} en la proteína. Los primeros estudios de MS y fluorometría aseguran que el Cu^{2+} se coordina estereoespecíficamente en un lugar sobre la superficie de la $\beta 2m$, sin embargo no revelan el lugar del acomplejamiento (50).

Luego, Esposito *et al.* muestran que el Cu^{2+} se asocia principalmente a la His31 y en menor proporción a la His13 de la $\beta 2m$. El experimento consistió en medir la atenuación en la señal de los espectros TOCSY – siglas en inglés de *TOTAL Correlation Spectroscopy* – para las histidinas de la cadena poli-peptídica como consecuencia de la

1. Estado del arte

perturbación paramagnética producida por Cu^{2+} (56).

Por otra parte, Miranker *et al.* encontraron que la His31 es el único residuo de la microglobulina nativa involucrado en el enlace con el Cu^{2+} . Estos estudios de RMN, MS y fluorescencia intrínseca también muestran que el Cu^{2+} se une a la His13, His51 e His84 de la estructura no nativa de la proteína. Como consecuencia de esta coordinación múltiple, Cu^{2+} - proteína, los autores concluyen que la presencia del Cu^{2+} estabiliza la conformación no nativa de la proteína. Aunque estos estudios refuerzan las observaciones de Esposito *et al.* (56), demuestran que pueden existir múltiples sitios de coordinación Cu^{2+} - $\beta 2m$ (4).

Por otra parte, la espectrometría heteronuclear de RMN permite determinar cambios en la dinámica del esqueleto de amino ácidos en las proteínas. Utilizando esta técnica Goto *et al.* correlacionaron el aumento en la dinámica conformacional de la $\beta 2m$ con el acomplejamiento del Cu^{2+} . Los estudios llevados a cabo a pH 7,0 sugieren que el Cu^{2+} se coordina de manera independiente a través de los anillos imidazoles de las histidinas 13, 31 y 51 (57).

Estos estudios demuestran que identificar con certeza el sitio de unión del metal de transición en la $\beta 2m$ es una tarea difícil utilizando técnicas convencionales de RMN y MS, debido a limitaciones propias de los métodos y a que la $\beta 2m$ es propensa a precipitarse rápidamente en presencia del Cu^{2+} (50). Por ejemplo, los picos anchos no específicos en los espectros de RMN dificultan el análisis estructural (57). Por esta razón han surgido métodos alternativos a partir de las técnicas convencionales. Un ejemplo es el método de oxidación catalizada por metales –MCO de sus siglas en inglés *Metal Catalysis Oxidation*– acoplado a MS. Con este método Lim y Vachet determinaron la región donde el Cu^{+2} se acopla en la conformación nativa y no nativa de la $\beta 2m$. Los resultados de este estudio indican que la Ile1, Gln2 e His31, y probablemente el Asp59, son responsables de la coordinación del Cu^{+2} en la estructura nativa de la proteína. Este estudio es importante porque revela un método confiable en la determinación de los amino ácidos que coordinan el Cu^{+2} en la $\beta 2m$ a condiciones fisiológicas, i.e. a concentraciones equimolares (100 μM) de proteína y Cu^{+2} (58).

En conclusión, el uso de técnicas de RMN brinda excelentes aproximaciones del lugar del acomplejamiento del Cu^{2+} en proteínas (59); sin embargo, el empleo del método de oxidación catalizada por metales acoplado a espectrometría de masas (MS/MCO) ha generado datos confiables asociados a la región en la cual se coordina el Cu^{2+} sobre la $\beta 2m$, i.e. el residuo N-terminal y la His31 (58). A pesar de estos resultados, encontrar el lugar de asociación del Cu^{2+} es un tema de permanente investigación.

1.1.2. Cambio conformacional de la $\beta 2m$ promovido por el Cu^{2+}

La unión del Cu^{2+} en la superficie de la $\beta 2m$ nativa debe contribuir al cambio conformacional de la proteína para que la nucleación sea un proceso espontáneo (60). Con el fin de determinar cambios conformacionales de la $\beta 2m$, asociados a la unión del Cu^{2+} , se han desarrollado diversos estudios.

Las primeras evidencias de cambios estructurales de la $\beta 2m$ promovidos por el acomplejamiento del Cu^{2+} se mostraron mediante la desnaturalización de la proteína utilizando urea a diferentes temperaturas (50). En un estudio posterior de RMN desarrollado por Goto *et al.* también se corroboró que el acomplejamiento del Cu^{2+} en la proteína induce la desestabilización del estado nativo de la $\beta 2m$ y estabiliza el precursor amiloide. El estudio mostró el incremento en la dinámica de la hoja D de la proteína de pico a nanosegundos (57).

Con el fin de aportar al entendimiento del cambio conformacional y dinámico de la $\beta 2m$, Cieplak *et al.* realizaron estudios computacionales de dinámica molecular (DM). El Cu^{+2} reemplazó la posición que debía ser ocupada por el átomo de hidrógeno del nitrógeno *delta* ($H_{\delta 1}$) del grupo imidazol, en cada una de las histidinas superficiales. El análisis de la trayectoria presentado como correlación del enlace Cu^{+2} y flexibilidad de la proteína sugirió que los cambios en el ambiente hidrofóbico cerca del sitio de unión del Cu^{+2} disminuyen la barrera de transición conformacional y estabiliza la conformación de mayor entropía. Adicionalmente, los autores mostraron que el enlace del Cu^{2+} en el anillo imidazol de la His31 causó cambios conformacionales y dinámicos significativos, mientras que el enlace en la His13 mostró cambios mínimos (8).

1. Estado del arte

Valiéndose de la modificación de amino ácidos superficiales de la $\beta 2m(s)$ mediante unión covalente del dietilpirocarbonato – DEPC de sus siglas en inglés *diethylpyrocarbonate* – y posterior análisis por MS, Vachet *et al.* determinaron la presencia de cambios conformacionales causados por la coordinación del Cu^{2+} en el residuo N-terminal (23, 58). El cambio en la reactividad del DEPC con la Thr4 y la Ser33 sugiere un cambio conformacional en los alrededores del lugar del acomplejamiento del metal de transición. La disminución significativa en la reactividad del DEPC sobre la His31 evidencia una vez más que el grupo imidazol es parte del anillo de coordinación del cobre. Por el contrario, amino ácidos que no mostraron cambio en la reactividad, como la His13, His51 y Ser88, sugieren que cerca de estos residuos no hay un cambio conformacional apreciable (23). Estos resultados corroboran las evidencias publicadas previamente (58).

1.1.3. Formación de proto-fibras a partir del complejo $\beta 2m-Cu^{2+}$

Como se muestra en la etapa e) de la figura 1.2, se cree que la siguiente fase importante en el proceso de formación de fibras amiloides es la generación de proto-fibras. Estas proto-fibras sirven de bloques constructores en la elongación de las fibras amiloides.

Los datos reportados por Goto *et al.* (57) y Radford *et al.* (30) sobre el rol de la isomerización *cis-trans* del residuo 32 en la cinética del desdoblamiento de la proteína sirvieron como base para que Miranker *et al.* propusieran un cambio conformacional *cis-trans* de la Pro32 como consecuencia de la coordinación del Cu^{2+} . Para evaluar la validez de su hipótesis los autores diseñaron la variante $\beta 2m(P32A)$. Los cambios ocasionados por la variación P32A permiten la formación del dímero, el cual fue cristalizado y su estructura resuelta por difracción de rayos X. La estructura tridimensional se muestra en la figura 1.4. Los autores sugieren que la $\beta 2m(P32A)$ adopta aproximadamente el estado intermediario de la proteína en las primeras etapas de la formación de fibras, i.e. adopta la conformación de la proteína con propiedades amiloidogénicas. Esta proteína obtenida presenta propiedades cinéticas y termodinámicas como las de la holo-proteína – $\beta 2m(s)$ con Cu^{2+} en su estructura–. La conformación del dímero sugiere que el área interfacial entre los monómeros son las láminas antiparalelas ABED - DEBA. También sugiere que las uniones proteína - proteína se producen mediante

1.1 Formación de fibras amiloides en la DRA

interacciones anfipáticas. Por último, los datos de difracción sugieren que la formación del dímero es mediada por la interacción antiparalela de las dos hojas D (7).

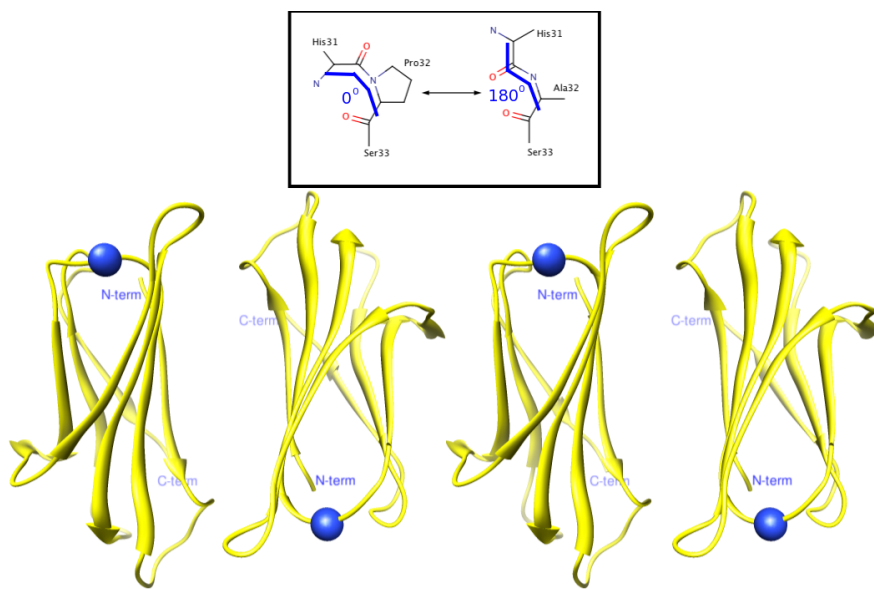


Figura 1.4: Dímero de la $\beta 2m_{F8O}$ (P32A). - Arriba: variación P32A. Abajo: vista estéreo del dímero formado por la $\beta 2m_{F8O}$ (P32A) (PDB ID:2F8O) (7). Las esferas azules denotan la posición de la variación P32A.

Con el fin de evaluar la formación de fibras amiloides a partir de monómeros de $\beta 2m$ a condiciones fisiológicas Vachet *et al.* utilizando técnicas de MS, dispersión de luz dinámica – DLS siglas en inglés de *Dynamic light Scattering* – y cromatografía de exclusión por tamaño – SEC siglas en inglés de *Size-Exclusion Chromatography* – observaron la formación de proto-fibras como etapa precedente a la formación de fibras amiloides. Estos estudios sugieren un proceso de agregación por etapas como se muestra en la figura 1.5 donde ocurre: 1) Anclaje del Cu^{2+} a la proteína nativa, 2) Formación de dímeros que contienen Cu^{2+} , 3) agregación de dos dímeros para formar tetrameros estables, 4) pérdida de cuatro unidades de Cu^{2+} en el tetramero, 5) incorporación de dos unidades de $\beta 2m$ libre de Cu^{2+} al tetramero, 6) formación de proto-fibras de más de seis unidades de $\beta 2m$ y 7) construcción de fibras amiloides a partir de las proto-fibras generadas en la etapa seis (6). Este estudio sugiere la importancia mediadora del Cu^{2+} en la formación de las fibras, así como la ausencia de este en las proto-fibras de más de

1. Estado del arte

cuatro unidades de proteína (24).

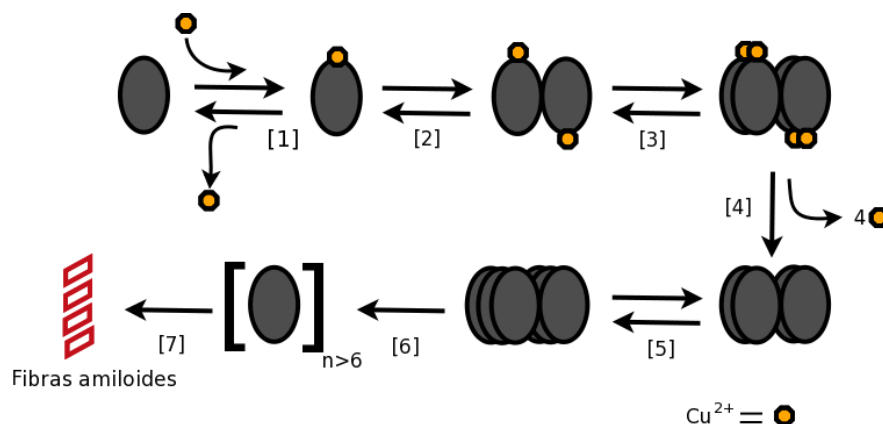


Figura 1.5: Modelo del Cu^{2+} como mediador del proceso de formación de fibras a partir de la $\beta 2m$. - Etapas de la formación de proto-fibras estables, cimientos de la elongación de fibras amiloides. 1. Unión del Cu^{2+} a la $\beta 2m$. 2. Formación de dímeros, dos unidades de $\beta 2m-Cu^{2+}$. 3. Formación de tetrameros, por acoplamiento de dos dímeros. 4. Eliminación de cuatro unidades de Cu^{2+} en el tetramero. 5. Formación del hexámero, por acoplamiento de dos unidades de $\beta 2m$. Adaptado de Vachet *et al.* (24)

Con el objeto de conocer a nivel molecular la conformación de las proto-fibras a partir de $\beta 2m$, Miranker *et al.* incubaron la variante H13F de la $\beta 2m$ con cantidades estequiométricas de Cu^{2+} . La estructura resuelta por difracción de rayos X, acelerados por sincrotrón, revelan la formación de hexámeros. Como se muestra en la figura 1.6 el hexámero resuelto está formado por la asociación de tres dímeros. Esta estructura permite confirmar varias observaciones realizadas hasta la fecha: i) la coordinación del ion metálico sobre la Met0, Ile1 y la His31, en concordancia con los resultados reportados por Vachet *et al.* (23, 58), ii) la isomerización *cis-trans* de la Pro32 que confirma la hipótesis previamente descrita por ese mismo grupo (7), iii) la formación de dímeros como primer agregado del proceso de formación de proto-fibras y iv) la presencia de las láminas ABED-DEBA como unidades interfaciales monoméricas del dímero, coincidiendo con los resultados obtenidos anteriormente utilizando la variante P23A. Con este resultado los autores proponen que la formación de fibras amiloides se lleva a cabo mediante acoplamiento de los hexámeros (25). Sin embargo, este hexámero no concuerda completamente con los datos de MS, que a condiciones fisiológicas muestran como el Cu^{2+} se acompleja con la $\beta 2m(s)$ y cumple un efecto mediador en la formación de

hexámeros libres de Cu^{2+} (24). Además, se ha demostrado que este hexámero no promueve la formación de fibras.

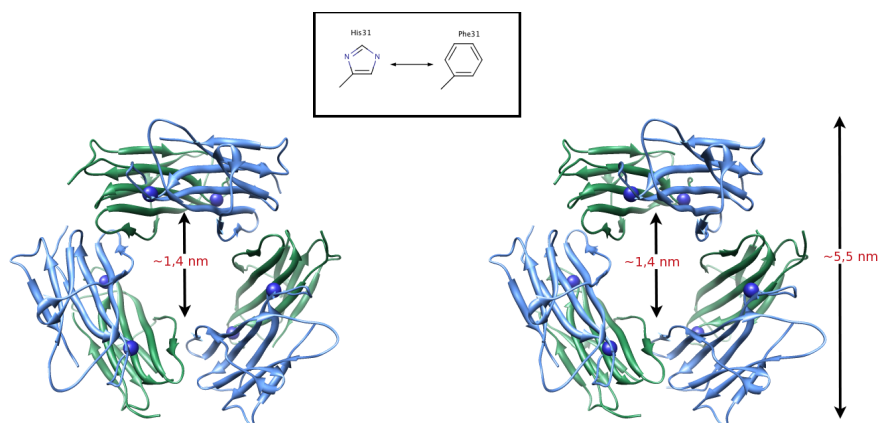


Figura 1.6: Hexámero de la $\beta 2m_{3CIQ}(H13F)-Cu^{2+}$. - Arriba: variación H13F. Abajo: vista estéreo el hexámero formado por la $\beta 2m_{3CIQ}(H13F)-Cu^{2+}$ (PDB ID:3CIQ) (25). En esferas azules, se denota la posición de la variación H13F.

Aunque estos resultados experimentales muestran evidencias relevantes en la formación de proto-fibras amiloides a partir de la $\beta 2m$, no permiten una descripción molecular del proceso. Por esta razón no hay una descripción mecanística de la manera como ocurren las primeras etapas del proceso de nucleación. Con el objeto de entender el mecanismo de formación de fibras amiloides, se hace necesario conocer las etapas precedentes a la precipitación y sus características biomoleculares: i) la ubicación del Cu^{2+} en la región N-terminal, ii) el cambio conformacional y dinámico de la proteína salvaje, iii) la agregación de dos unidades de holo-proteína, iv) la agregación de dos dímeros para la formación de tetrameros, y v) la formación de hexámeros a partir de tetrameros libres de Cu^{2+} y dos unidades de apo-proteína – proteína sin ion metálico como grupo prostético-. Un mayor entendimiento de estos procesos moleculares podría brindar más información relevante que permita el diseño de terapias que prevengan y/o mitiguen el padecimiento de la amiloidosis en pacientes con insuficiencia renal crónica.

Teniendo en cuenta la importancia de explicar y describir a nivel atómico las etapas de la formación de proto-fibras amiloides a partir de la $\beta 2m(s)$ de conformación nativa, en las cuales el Cu^{2+} actúa como mediador en el cambio conformacional y en

1. Estado del arte

la agregación protéica, se realizó este trabajo de investigación. El objetivo general fue estudiar el efecto del Cu^{2+} en el cambio conformacional y en la formación de dímeros y tetrameros de $\beta 2m$, mediante el uso de herramientas computacionales. Con el objeto de lograr este propósito se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar las causas moleculares de la ubicación del Cu^{2+} en los amino ácidos N-terminales e His31, utilizando *docking* molecular.
2. Evaluar los cambios conformacionales de la $\beta 2m$ promovidos por la unión del Cu^{2+} en la proteína, mediante dinámica molecular.
3. Determinar los cambios conformacionales requeridos para el correcto acoplamiento entre dos unidades de holo-proteína e identificar las características estructurales que hacen importantes estas conformaciones, utilizando *docking* proteína - proteína. Igualmente, determinar las estructuras de dímeros y tetrameros producto de la aglomeración de unidades de holo-proteína mediante el uso de técnicas computacionales de *docking* proteína-proteína.

En los siguientes capítulos se muestran los resultados del por qué el Cu^{2+} se une a la región N-terminal, de su efecto mediador en el cambio conformacional de la $\beta 2m(s)$ de conformación nativa – $\beta 2m(sn)$ – y de la agregación de la holo-proteína en dímeros y tetrameros. Además, se mostrará la racionalización de los resultados experimentales reportados en la literatura con base en nuestros resultados computacionales. Finalmente en el capítulo 6 se muestra la metodología utilizada en la realización de este trabajo.

Capítulo 2

Coordinación del Cu^{+2} en la superficie de la $\beta 2m$

La $\beta 2m$ debe disociarse del complejo HLA antes de interaccionar con el Cu^{2+} , por esta razón nuestros estudios iniciaron con la determinación de conformaciones estables de la apo-proteína en medio acuoso. Para esto se realizaron tres simulaciones de dinámica molecular donde la apo-proteína se solvató con un modelo explícito de moléculas de agua. Se seleccionó la conformación más estable de la dinámica molecular, i.e. la conformación que representa estadísticamente la estructura de la proteína a las condiciones termodinámicas de la simulación, como la estructura representativa de la $\beta 2m$ en solución acuosa o proteína Apo. Las tres proteínas Apo, i.e. modelos Apo_A, Apo_B y Apo_C, presentan un promedio de desviación – RMSD siglas en ingles de *Root Mean Square Deviation* – de la posición de los átomos del esqueleto de 0,088 nm con respecto a la $\beta 2m_{1DUZ}$, extraída del complejo HLA (13). En la figura 2.1 se muestra la superposición de cada una de las proteínas Apo con la $\beta 2m_{1DUZ}$. Las mayores diferencias se observan en los residuos N-terminal y C-terminal. Además, se encuentran otras diferencias en los bucles AB, BC y DE. Aunque nuestras simulaciones son de solo 5 ns, reflejan la estabilidad de la $\beta 2m$ a condiciones fisiológicas de temperatura y presión. Este resultado es consistente con pruebas experimentales donde muestran que la $\beta 2m$ es estable en soluciones acuosas a condiciones fisiológicas (14, 56, 61).

La adsorción del Cu^{2+} en el monómero de $\beta 2m$ es la primera etapa del proceso molecular de la formación de fibras amiloides (24). Evidencias experimentales sugieren

2. Coordinación del Cu^{+2} en la superficie de la $\beta 2m$

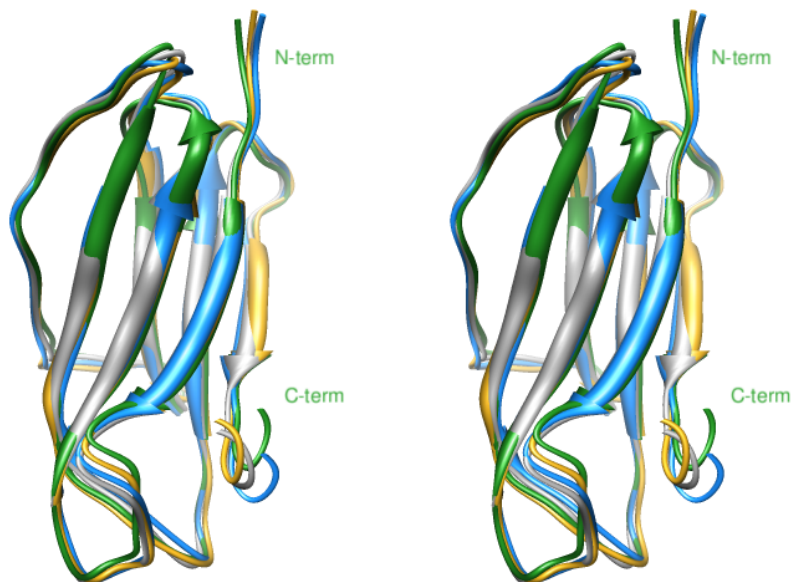


Figura 2.1: $\beta 2m_{1DUZ}$ vs proteínas Apo. - Vista estéreo de la superposición de la $\beta 2m_{1DUZ}$ con: i) modelo A en azul, RMSD= 0,087 nm. ii) modelo B en gris oscuro, RMSD= 0,093 nm. iii) modelo C en oro, RMSD=0,083 nm. Estructuras más representativas en cada una de las simulaciones de DM.

que el Cu^{2+} se une selectivamente a las histidinas superficiales de la proteína. En la proteína nativa se une a la His31 y los residuos N-terminales (23, 25), mientras que en la proteína no nativa se une a todas las histidinas superficiales, i.e. His13, His31 e His51 (4).

El estudio de las características biofísicas de las histidinas, de los modelos obtenidos por DM, es fundamental porque brinda información acerca de la selectividad de la unión Cu^{2+} . Por esta razón, como se ve en la tabla 2.1 se determinaron los valores de pKa de cada histidina presente en la proteína. La determinación del valor de pKa determina la probabilidad de protonación de los anillos imidazoles como consecuencia de la presencia de interacciones electrostáticas con los grupos funcionales más cercanos (62, 63, 64, 65). Los resultados evidencian que la His31 presenta un marcado descenso de su valor de pKa, producto de la interacción electrostática con el grupo amida N-terminal, amina de la Arg3 y grupos carboxilo del Asp34 y Asp59. Esta disminución del valor del pKa se traduce en el aumento de la probabilidad de encontrar la His31 en su forma neutra a pH fisiológico (7,0). Por el contrario, la His13, His51 e His84 presen-

2.1 Superficie electrostática de la β -2-microglobulina

tan valores de pKa cercanos a 7,0, este resultado sugiere la fácil protonación de estos grupos imidazoles en soluciones fisiológicas. En conclusión, bajo estas circunstancias se ve favorecida la asociación del Cu^{2+} con la His31 debido a que las otras histidinas podrían presentar repulsión electrostática por estar en su forma protonada.

Proteína	$\beta 2m_{1DUZ}$	Apo_A	Apo_B	Apo_C
His				
13	6,09	6,26	6,15	6,13
31	5,85	5,84	5,62	5,84
51	6,91	6,33	6,33	6,31
84	6,31	6,36	6,17	6,13

Tabla 2.1: pKa de histidinas presentes en la apo-proteína $\beta 2m$. - $pK_a(EstandarHis)$ = 6,50.

2.1. Superficie electrostática de la β -2-microglobulina

Una manera de determinar los posibles sitios de coordinación del Cu^{2+} es mediante la exploración del potencial electrostático superficial (PES) de la proteína. En este estudio se calculó el PES sobre la superficie de Connolly utilizando como sistema de prueba una esfera de radio 0,07 nm que equivale al radio de van der Waals del Cu^{2+} .

La evaluación del PES de la proteína, en los diferentes modelos de $\beta 2m$, reveló las siguientes características.

- Las diferencia en la variación de cargas positivas y negativas entre los amino ácidos de la lámina ABED es significativamente mayor que en la lámina CFG.
- Los menores valores del PES en todos los modelos se encuentran en las aristas AG; debido a grupos carboxilos de los aspartatos, glutamatos y del residuo C-terminal de la proteína (Figura 2.2).

2. Coordinación del Cu^{+2} en la superficie de la $\beta 2m$

- Tres de los cuatro modelos presentan los valores más positivos del PES localizados alrededor de la Arg3 como consecuencia de la carga positiva de este amino ácido además de la carga positiva del grupo amina del residuo N-terminal (Figura 2.2).

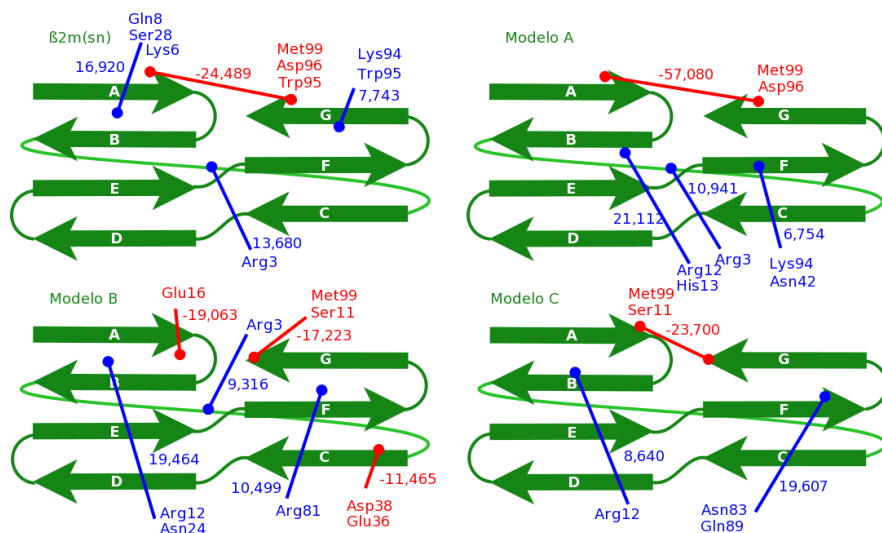


Figura 2.2: Puntos de mayor y menor potencial electrostático superficial en la apo-proteína $\beta 2m$ - Los puntos se ubican en representaciones abiertas de la estructura de la proteína, manteniendo las láminas β . El eje de la abertura son los bucles CD y EF. Las flechas verdes denotan las hojas β de la proteína. En puntos rojos se muestra la ubicación de los valores más negativos de las láminas. En puntos azules se muestra la localización de los valores más positivos en las láminas. Los valores del potencial electrostático superficial están dados en $K_b * T/e_c$. Las representaciones ●—● denotan un mismo punto.

De acuerdo con estos resultados mostrados en la figura 2.2, se demuestra que: i) Los sitios de menor PES no son correspondientes con el lugar de coordinación del Cu^{2+} reportado en la literatura, i.e. los amino ácidos N-terminal y His31 (23, 25, 58). Como lo muestra la figura 2.2 algunos de los modelos presentan un elevado valor positivo del PES en el bucle BC, sitio de unión del Cu^{2+} . Estos valores son debidos a la cercanía de varios centros cargados positivamente como la Arg3 y el residuo N-terminal. Este resultado muestra que el potencial electrostático superficial calculado no puede describir correctamente la localización del Cu^{2+} . ii) La diferencia del PES de los diferentes modelos de la apo-proteína sugiere que la dinámica de la macromolécula, a condiciones fisiológicas, posibilita múltiples cambios conformacionales que permiten la coordinación del Cu^{2+} . Sin embargo, debido a que el modelo utilizado para el cálculo del PES

2.2 Docking Cu^{2+} en la superficie de la β -2-microglobulina

utiliza cargas parciales, no es posible capturar en nuestras simulaciones las variaciones cuánticas en las cargas de cada uno de los residuos de la proteína. Por lo tanto se espera que los resultados del docking molecular no concuerden necesariamente con los datos experimentales.

2.2. Docking Cu^{2+} en la superficie de la β -2-microglobulina

Con el objeto de encontrar los lugares específicos de adsorción del Cu^{2+} sobre la superficie de la apo-proteína se utilizó *docking* ciego ion - proteína. Para esta etapa del estudio se utilizaron los cuatro modelos de apo-proteína anteriormente seleccionados, i.e. la β 2m_{1DUZ} y los modelos Apo_A, Apo_B y Apo_C.

2.2.1. Docking rígido

Las energías de adsorción producto de las simulaciones de *docking* molecular rígido del Cu^{2+} de los cuatro modelos muestran una energía de enlace promedio de $-43,731 \pm 1,369$ kJ/mol. Los lugares de adsorción más representativos en las simulaciones realizadas son los grupos carboxilo de los glutamatos y aspartatos superficiales, i.e. Asp34, Glu36, Glu44, Glu47, Asp53, Asp96 y Asp98, como se muestra en la figura 2.3. En general el lugar más representativo de la adsorción del Cu^{2+} sobre la apo-proteína es la región C-terminal, i.e. Asp96 - Asp98, como se observa en la figura 2.4 A. Estos resultados concuerdan con los menores valores del PES de la apo-proteína, determinados en la sección 2.1.

Debido a la naturaleza de las simulaciones de mecánica molecular las interacciones electrostáticas son responsables en gran medida del acercamiento de las especies en estudio, es así como se favorece la unión del Cu^{2+} con grupos funcionales que presentan exceso de carga negativa. Debido a que hay varios grupos superficiales con carga negativa neta los resultados de *docking* muestran que el Cu^{2+} se une a la proteína en sitios que no corresponden con las evidencias experimentales (50, 58). Es necesario destacar que este resultado tiene tres implicaciones importantes: Primero, demuestra que se debe tener cuidado con la interpretación de los resultados de *docking* para este tipo de sistemas. Segundo, los modelos de *docking* y del PES utilizados no son adecuados

2. Coordinación del Cu^{+2} en la superficie de la $\beta 2m$

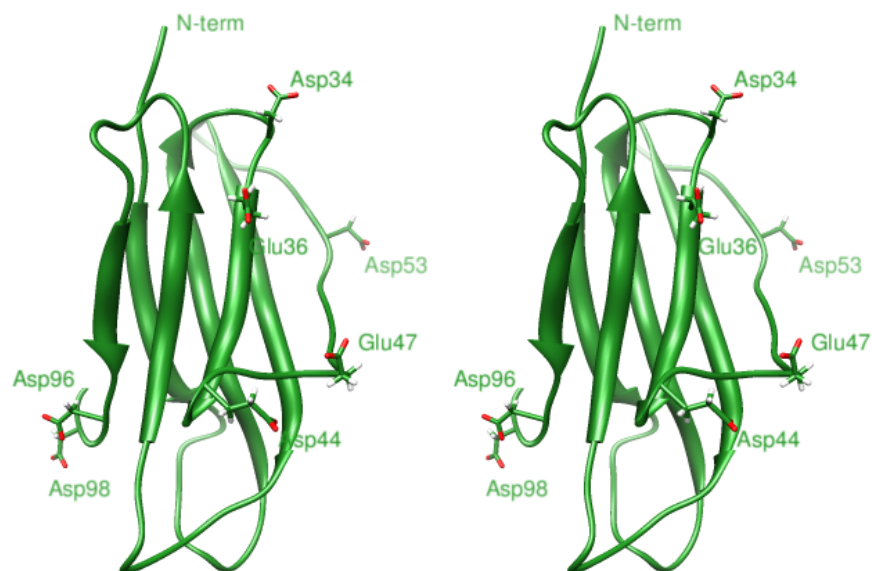


Figura 2.3: Adsorción del Cu^{2+} mediante *docking* rígido. - Vista stereo de los sitios de adsorción del Cu^{2+} sobre la $\beta 2m$. En barras los amino ácidos a los que se une el metal de transición, resultado de múltiples simulaciones de *docking* iom - proteína.

para describir el lugar del acomplejamiento del Cu^{2+} sobre la $\beta 2m$. Tercero, aunque las interacciones electrostáticas deben jugar un papel importante durante las primeras etapas de la coordinación del Cu^{2+} , la dinámica de la proteína permite que haya una redistribución de cargas imposible de capturar mediante los programas que describen clásicamente el sistema. Por otra parte, aunque la opción natural para estudiar estos sistemas es la mecánica cuántica, es claro que debido al tamaño de la proteína es imposible obtener resultados en tiempos suficientemente cortos. Por otra parte, consideramos que no solo las fuerzas electrostáticas juegan un papel importante en la asociación del Cu^{2+} con la $\beta 2m$. El tamaño iónico también debe jugar un papel importante en esta asociación. Para estudiar el efecto del tamaño del Cu^{2+} se decidió realizar las mismas simulaciones de *docking* cambiando las cargas parciales del cobre, con cargas de +1 y 0. Aunque estos estados de oxidación no son reales, i.e. el ion Cu^{2+} no cambia su estado de oxidación a condiciones fisiológicas, es una forma de eliminar la fuerte influencia de la interacción electrostática del proceso de exploración del PES en la búsqueda de sitios selectivos de unión del ion metálico.

2.2 Docking Cu^{2+} en la superficie de la β -2-microglobulina

El *docking* molecular rígido del Cu^{1+} con los cuatro modelos de la apo-proteína mostró que el cobre se adsorbió en glutamatos y aspartatos superficiales, con una energía promedio de $-16,004 \pm 1,682$ kJ/mol. Los sitios de unión del Cu^{1+} sobre la proteína muestran la misma tendencia que se observa con el Cu^{2+} . Por otra parte, los datos obtenidos utilizando el Cu^0 muestran energías promedios de absorción de $-0,418 \pm 0,034$ kJ/mol. Bajo estas condiciones el Cu^0 se une con menor ΔG_{enlace} , i.e. más espontáneamente, y en repetidas ocasiones a dos sitios específicos:

1. Como se muestra en figura 2.4 B. a los anillos fenilo de la Phe30 y Phe56. La frecuencia relativa de encontrar a la fenilalanina coordinando con iones metálicos es muy baja (66). Sin embargo, evidencias experimentales sugieren que el Cu^{2+} causa cambios estructurales en la β 2m como la rotación de los enlaces peptídicos en el bucle BC de la proteína ocasionando la traslación del anillo aromático de la Phe30 desde un medio interno hidrofóbico a la superficie hidrofílica, sugiriendo que el Cu^{2+} se encuentra muy cerca a esta posición (25). Por otra parte, este sitio es cercano los residuos N-terminales, que según los resultados experimentales es la región donde se forma el complejo de coordinación.
2. Como se muestra en la figura 2.4 C. el Cu^0 se une al anillo fenilo de la Phe56, oxígeno amida de la Ser57 y al oxígeno hidroxilo de la Ser61. Esta región de la proteína es ideal para que el Cu^{2+} se coordine a varios centros donadores de electrones (67, 68, 69).

Los resultados muestran que el tamaño iónico del Cu^{2+} juega un papel importante en la unión del metal con la proteína. Además, muestra que los parámetros de van der Waals ubican correctamente el Cu^{2+} en las cercanías del residuo N-terminal. Con base en estos resultados podemos concluir que el Cu^{2+} posee las dimensiones correctas para ubicarse en el bolsillo que genera la estructura de la β 2m en los alrededores del residuo N-terminal.

2.2.2. Docking flexible

Con el objeto de refinar los resultados del *docking* rígido, se desarrollaron múltiples simulaciones donde se permitía que la estructura de la proteína se relajara después de

2. Coordinación del Cu^{+2} en la superficie de la $\beta 2m$

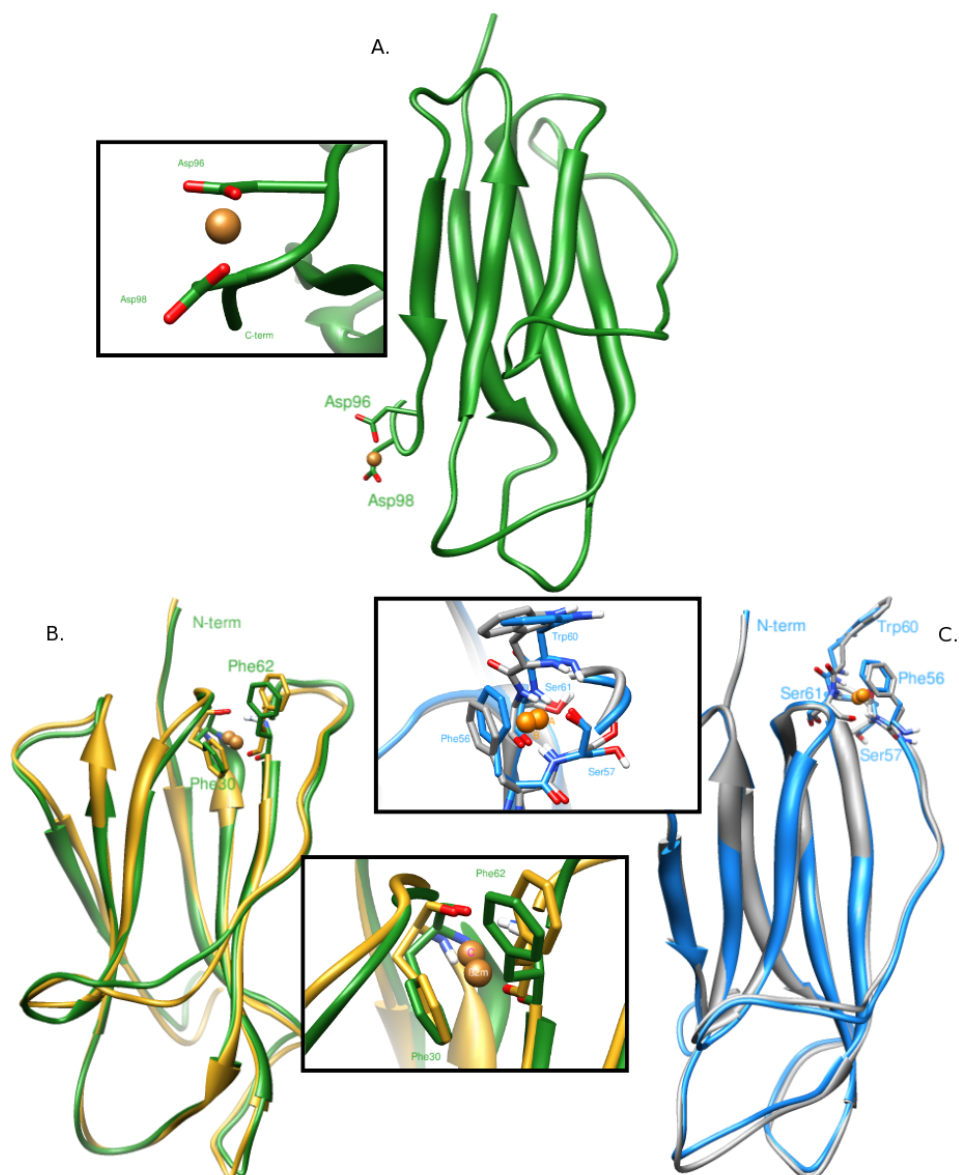


Figura 2.4: Lugares de adsorción del Cu^{2+} , Cu^{1+} y Cu^0 mediante *docking* rígido. -
A. Modelo $\beta 2m_{1DUZ}$, ubicación del Cu^{2+} y Cu^{1+} en Asp96 y Asp98; B. Modelos $\beta 2m_{1DUZ}$ y ApoC, ubicación del Cu^0 en Phe30 y Phe62; C. Modelos ApoA y ApoB, ubicación del Cu^0 en Phe56, Ser57, Trp60 y Ser61.

2.2 Docking Cu^{2+} en la superficie de la β -2-microglobulina

anclar el cobre.

Los resultados del cobre con carga parcial +2 (Cu^{2+}) generaron configuraciones como las mostradas en la figura 2.5. El cobre se ancla principalmente a los grupos carboxilos de los amino ácidos Glu36, Asp59, Glu69, Asp96 y Asp98. Los sitios que más favorecen la adsorción del Cu^{2+} en la superficie de la proteína son el Glu69 con una energía libre de unión de -107,098 kJ/mol y el Asp59 con una energía libre de unión de -93,658 kJ/mol. La Glu69 se encuentra al final de la hoja E de la β 2m alejada de la región N-terminal, como se observa en la figura 2.5. Sin embargo, el Asp59 está próximo a la región N-terminal, donde se ha demostrado que se coordina el cobre con la proteína (23, 25, 58). Estas dos conformaciones no se habían detectado utilizando *docking* rígido, por esta razón se sugiere que la coordinación del Cu^{2+} sobre la apo-proteína es un proceso dinámico de reorganización molecular.

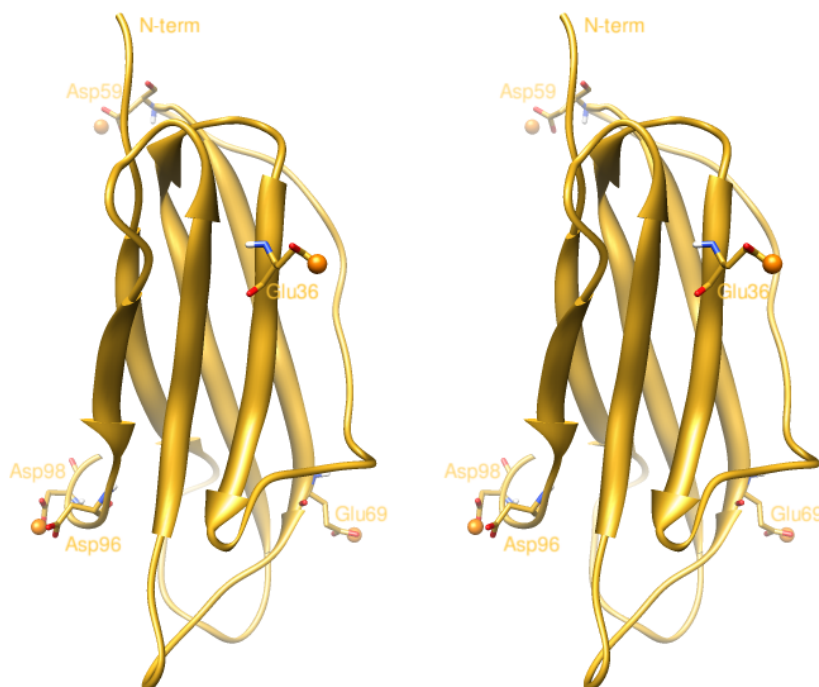


Figura 2.5: Lugares de adsorción del Cu^{2+} mediante *docking* flexible. - Vista estéreo del modelo Apo_B de la β 2m. Diferentes sitios de adsorción del Cu^{2+} durante el proceso de *docking* flexible. Glu69 y Asp59 lugares de menor energía libre de enlace.

2. Coordinación del Cu^{+2} en la superficie de la $\beta 2m$

Por otra parte las configuraciones de menor energía libre de enlace (-59,368 kJ/mol) producto de las simulaciones de docking flexible para el Cu^0 , concuerdan con las evidencias experimentales reportadas en la literatura, donde el ion metálico se une a los aminoácidos Ile1, Gln2 e His31 (23, 58). La figura 2.6 A. muestra el complejo de coordinación de la $\beta 2m-Cu^{2+}$ resuelto por difracción de rayos X (25) y la figura 2.6 B. muestra la estructura obtenida por *docking* molecular flexible donde el metal de transición está ubicado entre los átomos O_{amida} .Ile1, N_{ϵ} .Gln2, N_{δ} .His31 y N_{amida} .Pro32. La similitud de las estructuras sugieren que la $\beta 2m$ salvaje de conformación nativa presenta un bolsillo en los alrededores de estos amino ácidos, cavidad adecuada para albergar el Cu^{2+} . Es interesante destacar que en esta cavidad los átomos que rodean el Cu permiten una geometría de coordinación intermedia entre la pirámide cuadrada, cuadrado planar y tetrahédrica; geometrías características de los complejos de coordinación de Cu^{2+} en los sistemas biológicos (70). Además, este resultado concuerda con otros sistemas biomoleculares similares donde las evidencias experimentales aseguran que los átomos electronegativos de la cadena principal de la proteína y del anillo imidazol de la histidina están involucrados en la coordinación del Cu^{2+} (67, 68).

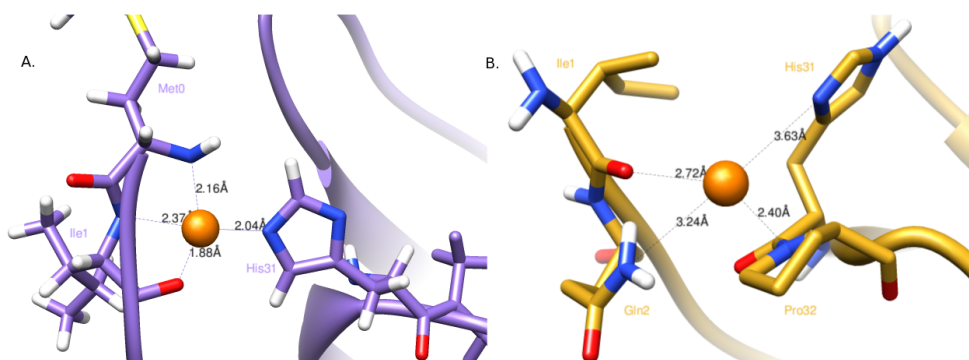


Figura 2.6: Configuración del lugar de adsorción del Cu^0 obtenida mediante las simulaciones de *docking* flexible. - A. Conformación de la estructura reportada en la literatura (PDB ID: 3CIQ) (25) y B. Conformación producto de *docking* flexible Cu^0 - proteína (Modelo Apo_B).

Con el fin de evaluar la participación del grupo carboxilo del Asp59 en la unión del Cu^{2+} , que según estudios de MS reportados por Vachet *et al.* (58) juega un papel importante en la coordinación con la proteína, se permitió que el grupo funcional de este amino ácido se relajara. La figura 2.7 muestra la configuración de la adsorción del Cu^0

2.2 Docking Cu^{2+} en la superficie de la β -2-microglobulina

en la región N-terminal de la proteína. Los 1,131 nm que separan el grupo carboxilo del cobre es una distancia suficiente para confirmar que bajo estas condiciones no están directamente enlazados. El impedimento de esta unión se debe a varios factores que interfieren en la asociación entre los dos grupos: i) la existencia de la Arg3 bloqueando la interacción directa $Cu - COO^-$ y presentando un puente salino con el grupo carboxilo del aspartato, y ii) la conformación plegada del bucle DE impide el acercamiento del grupo carboxilo al metal de transición. Para que exista una asociación directa entre el Cu^{2+} y el grupo carboxilo del Asp59 es necesaria una reorganización molecular de la proteína en los primeros instantes de la adsorción del cobre como una repulsión de la Arg3 y el desdoblamiento del bucle DE.

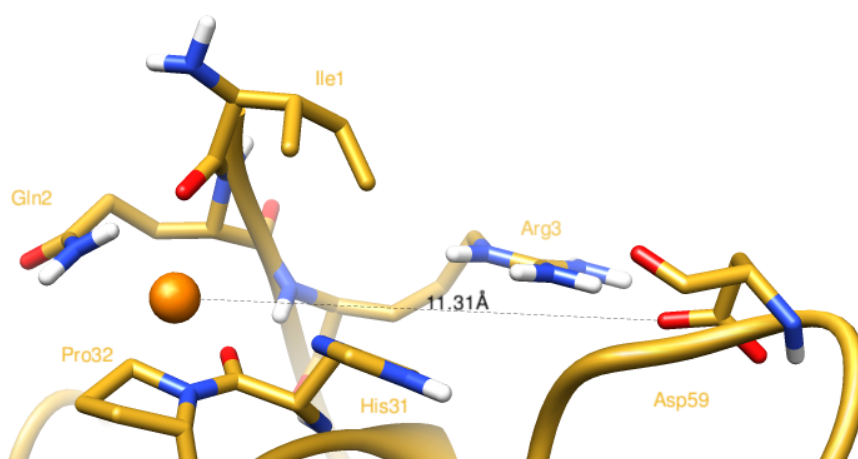


Figura 2.7: Distancia entre el Asp59 y el Cu^0 . - Configuración de la adsorción del Cu^0 en la región N-terminal. Distancia en angstrom entre el Cu^0 y el O δ .Asp59.

Lo anterior muestra que utilizar resultados de *docking* molecular, basado en mecánica molecular, para establecer mecanismos de anclaje del Cu^{2+} sobre la β 2m no es una metodología confiable. Entre otras cosas por que los sistemas dinámicos permiten redistribuir rápidamente las cargas ante la presencia del Cu^{2+} . El modelo utilizado usa cargas puntuales que no reflejan la fenomenología de la interacción del metal con la proteína. Para tener una descripción atómica sobre la interacción Cu^{2+} - β 2m se requiere desarrollar estudios de mecánica cuántica que permitan determinar como es el proceso de asociación del ion metálico. Estas simulaciones son demasiado costosas y no

2. Coordinación del Cu^{+2} en la superficie de la $\beta 2m$

se llevaron a cabo en este trabajo.

En conclusión, los resultados del PES de la apo-proteína y del *docking* molecular del cobre sobre la superficie de los cuatro modelos de la apo-proteína evaluados revelan aspectos importantes nunca antes mencionados de la coordinación del Cu^{2+} en la superficie de la proteína.

1. Los resultados del PES de la apo-proteína mostrados en la figura 2.2 revelan que esta metodología no es apta para determinar sitios específicos de unión del Cu^{2+} por determinación de puntos superficiales de menor potencial electrostático por dos razones: i) Porque hay muchos puntos con potencial negativo sobre la superficie de la proteína y ii) porque el punto de menor potencial electrostático se encuentra en la región de los residuos C-terminales, discrepando con las evidencias experimentales (23, 25, 58).
2. El modelo de *docking* molecular utilizado para determinar el sitio de coordinación del Cu^{2+} en la superficie de la proteína no es adecuado, pues limita la evaluación de las interacciones intermoleculares Cu^{2+} -proteína únicamente a las interacciones electrostáticas y de van der Waals. Por esta razón, nuestros resultados muestran asociación del ion metálico cargado positivamente a los grupos carboxilos superficiales. Un estudio más riguroso de este sistema debería incluir características electrónicas utilizando métodos de mecánica cuántica.
3. Los resultados muestran que existe una cavidad, entre los amino ácidos N-terminales y His31-Pro32, que por su característica energética y espacial resulta adecuado para la adsorción del Cu^{2+} .
4. El necesario cambio conformacional de la Arg3 y desdoblamiento del bucle DE posterior al acoplamiento del Cu^{2+} con el fin de permitir el acercamiento del ion metálico con el grupo carboxilo del Asp59, como lo sugieren los resultados de MS (58).

Capítulo 3

Cambios conformacionales de la $\beta 2m$ promovidos por la interacción con el Cu^{+2}

Experimentalmente se ha demostrado que no son suficientes las altas concentraciones de $\beta 2m$ en solución para que se promueva la formación de fibras (27). Es necesaria la presencia de Cu^{2+} para que varias unidades de proteína tiendan a aglomerarse (10, 11, 24, 25, 55). Aunque no existe evidencia de que el cambio conformacional sea necesario para iniciar la precipitación, la comparación de la proteína nativa con proteínas que forman proto-fibras brinda información relevante que consideramos puede servir para entender como se inicia el proceso de aglomeración. Por ejemplo la superposición de la $\beta 2m_{1DUZ}$ (13) con la $\beta 2m_{3CIQ}(H13F)-Cu^{2+}$ (25) muestra diferencias que, como veremos más adelante, son fundamentales para la agregación y formación de fibras. En vista de que se encontraron diferencias relevantes entre los monómeros se continuó evaluando los cambios conformacionales mediante dos metodologías: Primero se construyó un camino de interpolación entre las dos estructuras para explorar si existen barreras energéticas asociadas al cambio conformacional y segundo se desarrollaron simulaciones de dinámica molecular para evaluar la movilidad de la estructura.

3. Cambios conformacionales de la $\beta 2m$ promovidos por la interacción con el Cu^{+2}

3.1. Superposición de la proteínas

La superposición de la estructura $\beta 2m_{1DUZ}$, apo-proteína salvaje de conformación nativa extraída del complejo HLA (PDB ID: 1DUZ) (13), y proteínas que forman proto-fibras es clave para determinar características conformacionales de la $\beta 2m$ con propiedades amiloidogénicas. Por esta razón se superpuso la $\beta 2m_{1DUZ}$ con i) la holo-proteína $\beta 2m_{3CIQ}(H13F)-Cu^{2+}$, monómero extraído del hexámero resuelto por difracción de rayos X (PDB ID: 3CIQ) (25), y ii) la apo-proteína $\beta 2m_{2F8O}(P32A)$, monómero extraído del dímero resuelto por difracción de rayos X (PDB ID: 2F8O) (7).

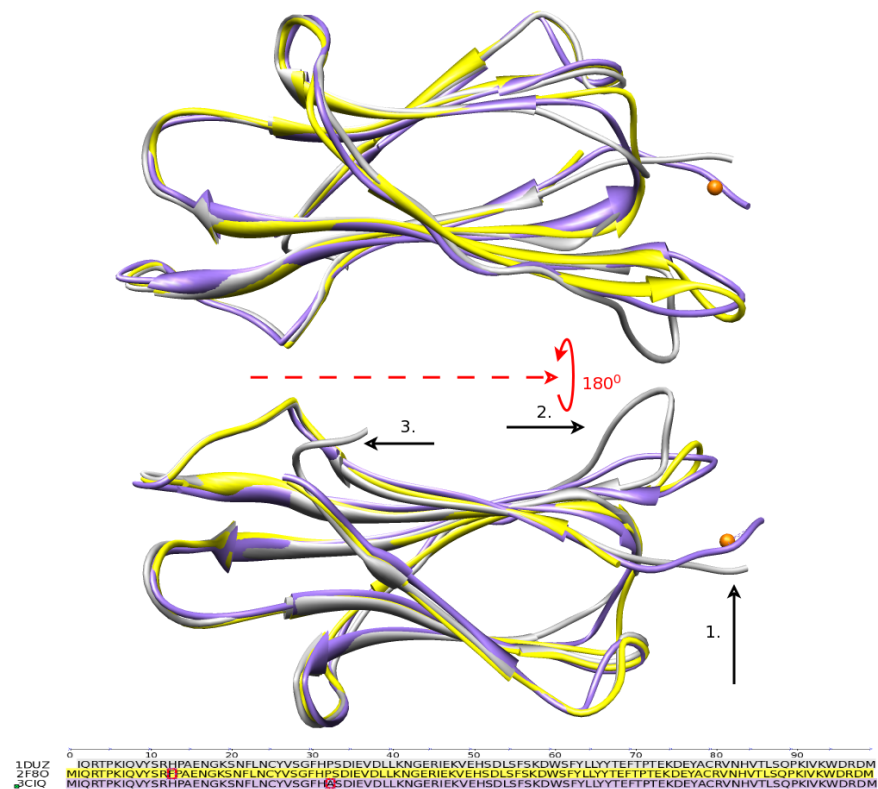


Figura 3.1: Diferencias estructurales entre $\beta 2m_{1DUZ}$ y $\beta 2m$ promotora de proto-fibras. - Superposición de estructura de la $\beta 2m_{1DUZ}$, $\beta 2m_{3CIQ}(H13F)-Cu^{2+}$ y $\beta 2m_{2F8O}(P32A)$. $\beta 2m_{3CIQ}(H13F)-Cu^{2+}$ en púrpura, $\beta 2m_{2F8O}(P32A)$ en amarillo, y $\beta 2m_{1DUZ}$ en gris. Diferencias apreciables en la superposición de la estructura: 1. Desplazamiento de los 5 amino ácidos N-terminales; 2. Desdoblamiento del bucle DE; 3. Ausencia de los residuos C-terminales Asp98 y Met99.

3.1 Superposición de la proteínas

En la figura 3.1 se muestran las diferencias conformacionales entre la estructura secundaria de la $\beta 2m_{1DUZ}$ y la holo-proteína $\beta 2m_3CIQ(H13F)-Cu^{2+}$. Las diferencias de la holo-proteína respecto a la $\beta 2m_{1DUZ}$ son debidas a modificaciones en la estructura primaria, al acomplejamiento del Cu^{2+} en la proteína y/o a la formación del dímero mediante el acoplamiento entre monómeros de holo-proteína. Los cambios relevantes mostrados en la figura 3.1 son:

1. Presencia del residuo N-terminal Met0, ligando del Cu^{2+} . El residuo N-terminal Met0 está presente debido a que la estructura corresponde a la proteína recombinante sobre-expresada en *Escherichia coli* (E.coli); microorganismo carente de metionina aminopeptidasa.

Además, distorsión de la posición original de los residuos N-terminales: Ile1, Gln2, Arg3, Thr4 y Pro5. Es posible que esta diferencia entre las dos proteínas se deba a la coordinación del Cu^{2+} en la región N-terminal de la proteína.

2. Despliegue del bucle DE de la proteína. Este desplazamiento es causado probablemente por interacciones electrostáticas del Cu^{2+} con residuos del bucle DE. Algunas interacciones de largo alcance del Cu^{+2} con átomos electronegativos del bucle DE como i) los oxígenos carboxilo y oxígeno amida del Asp59, ii) el nitrógeno y oxígeno amida del Trp60 y iii) el nitrógeno amida de la Ser58 (Ver Anexo) sugieren que el despliegue del bucle es causado por la atracción electrostática del Cu^{2+} con estos átomos electronegativos. Igualmente, estas interacciones pueden ser fuertes como para mantener el bucle DE recogido hacia el plano Ile1- Cu^{2+} -His31 de la proteína.

Además la presencia de un agrupamiento aromático entre el anillo naftilo, del Trp60, y el fenilo, de la Phe56, estabiliza la conformación adquirida. La importancia de este agrupamiento aromático se ve reflejado en los estudios realizados por Bolognesi *et al.* donde sustituyeron el Trp60 por la glicina y evidenciaron la inhibición de la agregación proteica (71).

3. La elevada movilidad de los residuos C-terminales Asp98 y Met99. La imposibilidad de determinar por difracción de rayos X estos residuos de la $\beta 2m(H13F)-Cu^{2+}$ se debe a que estos fragmentos presentan alta movilidad en el hexámero, por esta razón no aparecen las posiciones atómicas en el archivo 3CIQ.pdb de la

3. Cambios conformacionales de la $\beta 2m$ promovidos por la interacción con el Cu^{2+}

proteína (25).

Un análisis más detallado de las diferencias conformacionales en la región N-terminal entre la $\beta 2m_{1DUZ}$ y la holo-proteína $\beta 2m_{3CIQ}(H13F)-Cu^{2+}$ se muestra en la figura 3.2. La figura muestra el Cu^{2+} y los residuos ligandos en la región N-terminal de la proteína, además muestra la distancia entre cada uno de los átomos que coordinan el ion metálico. El análisis cuantitativo de las diferencias muestra que el desplazamiento de los cinco residuos N-terminales, i.e. Ile1, Glu2, Arg3, Thr4 y Pro5, presenta un $RMSD_{promedio} = 0,253$ nm y el desplazamiento del bucle DE, i.e. Ser57, Lys58, Asp59, Trp60 y Ser61, presenta un $RMSD_{promedio} = 0,465$ nm. El amino ácido con mayor desplazamiento ($RMSD = 0,719$ nm) es el Asp59, residuo que se cree involucrado en el proceso de acomplejamiento con el Cu^{2+} (23).

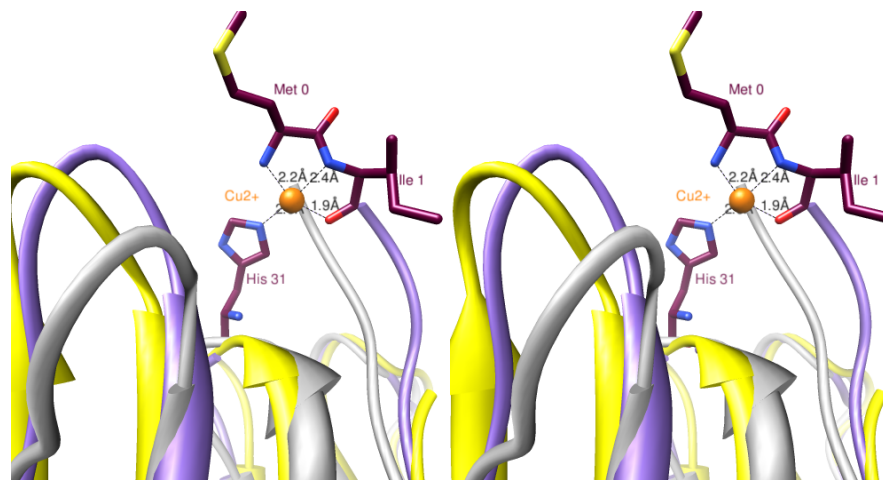


Figura 3.2: Diferencias estructurales en la región N-terminal entre la $\beta 2m_{1DUZ}$ y las proteínas que forman proto-fibras. - Vista estéreo de la superposición de la $\beta 2m_{1DUZ}$, $\beta 2m_{3CIQ}(H13F)-Cu^{2+}$ y $\beta 2m_{2F8O}(P32A)$. Coordinación del Cu^{2+} con la Met0, Ile1 e His31 de la $\beta 2m_{3CIQ}(H13F)$. $\beta 2m_{3CIQ}(H13F)$ en púrpura, $\beta 2m_{2F8O}(P32A)$ en amarillo y $\beta 2m_{1DUZ}$ en gris.

Otra diferencia entre la estructura secundaria de la $\beta 2m_{1DUZ}$ y la holo-proteína $\beta 2m_{3CIQ}(H13F)-Cu^{2+}$, que no se observa fácilmente en la figura 3.1, es el cambio conformacional del bucle BC, i.e. i) isomerización *cis-trans* de los ángulos ω de la Pro32 y ϕ de la Gly29 e ii) isomerización *trans-cis* de los ángulos ϕ de la His31, ψ de la Pro32

3.1 Superposición de la proteínas

y Asp34.

Las diferencias conformacionales entre la estructura de la $\beta 2m_{1DUZ}$ y la $\beta 2m_{2F8O}$ (P32A) también se muestran en la figura 3.1. Estas diferencias son debidas a la mutación P32A con el objeto de promover la isomerización *cis-trans* en la posición 32 de la proteína (ubicada en el bucle BC) (7) y/o por el proceso de acoplamiento entre dos monómeros. Las diferencias importantes de la $\beta 2m_{2F8O}$ (P32A) con respecto a la $\beta 2m_{1DUZ}$ mostradas en la figura 3.1 son:

1. Elevada movilidad de los residuos N-terminales Ile1, Gln2 y Arg3.
2. Despliegue del bucle DE.
3. Elevada movilidad de los residuos C-terminales Asp98 y Met99.

Al igual que en el hexámero de $\beta 2m$ (H13F)- Cu^{2+} , en el dímero de la proteína $\beta 2m$ (P32A) se imposibilita la determinación de las posiciones atómicas de los fragmentos N-terminal (Ile1, Gln2 y Arg3) y C-terminal (Asp98 y Met99) por su elevada movilidad. Por esta razón no se encuentran estos residuos en el archivo 2F8O.pdb de la proteína.

Además la $\beta 2m_{2F8O}$ (P32A) presenta el mismo cambio conformacional del bucle BC, i.e. isomerización *cis-trans* del ángulo ω del residuo 32, debido a la mutación P32A. La similitud estructural entre la $\beta 2m_{3CIQ}$ (H13F)- Cu^{2+} y la $\beta 2m_{2F8O}$ (P32A) muestran la validez de la hipótesis de Miranker *et al.* quienes proponen que el Cu^{2+} en las proximidades de los residuos N-terminales juega un papel importante en el cambio conformacional del bucle BC (7).

Por otra parte, en la figura 3.1 difícilmente se muestra la diferencia conformacional del fragmento D, i.e. Glu50-Ser55, de la $\beta 2m_{2F8O}$ (P32A) con respecto a la $\beta 2m_{1DUZ}$. En la apo-proteína $\beta 2m_{2F8O}$ (P32A) el fragmento D se encuentra como una hoja β mientras que en la apo-proteína $\beta 2m_{1DUZ}$ no tiene una estructura secundaria definida, al igual que en la holo-proteína $\beta 2m_{3CIQ}$ (H13F)- Cu^{2+} . Esta comparación sugiere dos aspectos importantes en el proceso de formación de fibras amiloides a partir de la $\beta 2m$: Primero, que no es necesaria una estructura secundaria tipo β en el fragmento D para que ocurra la formación espontánea de dímeros de $\beta 2m$ - Cu^{2+} . Segundo, no se puede

3. Cambios conformacionales de la $\beta 2m$ promovidos por la interacción con el Cu^{2+}

concluir que el cambio conformacional del fragmento D de la proteína sea causado por la coordinación del Cu^{2+} en la región N-terminal o por la isomerización *cis-trans* de la posición 32 de la proteína.

Es necesario destacar que las proteínas $\beta 2m_{3CIQ}(H13F)-Cu^{2+}$ y $\beta 2m_{2F8O}(P32A)$ presentan formación espontánea de dímeros antiparalelos y en relación con la $\beta 2m_{1DUZ}$ presentan diferencias similares en la estructura terciaria. En la figura 3.1 se distinguen tres regiones de disparidad estructural con respecto a la $\beta 2m_{1DUZ}$ que se encuentran asociadas a la lámina ABED de la proteína, entendida como la interfase de dímero antiparalelo (7, 23, 25). Las dos regiones en la $\beta 2m_{1DUZ}$ que pueden bloquear el empalme antiparalelo proteína-proteína son: El bucle DE y el fragmento C-terminal. Aunque la conformación plegada del bucle DE en la $\beta 2m_{1DUZ}$ imposibilita el acoplamiento antiparalelo con otro homólogo, se sabe que este bucle en la $\beta 2m-Cu^{2+}$ muestra una dinámica elevada permitiendo un rápido cambio conformacional (4, 25). Por otra parte, los aminoácidos C-terminales Asp98 y Met99 en forma de gancho, esenciales en la estabilización de la $\beta 2m$ en el complejo HLA-A, presentan alta movilidad permitiendo la dimerización antiparalela sin intervenir en el proceso.

De esta manera para promover la formación espontánea de dímeros antiparalelos con propiedades amiloidogénicas a partir de la $\beta 2m_{1DUZ}$ es indispensable promover cambios conformacionales de la proteína hacia estructuras muy similares a la $\beta 2m_{3CIQ}(H13F)-Cu^{2+}$ o $\beta 2m_{2F8O}(P32A)$. Se sabe que el Cu^{2+} promueve estos cambios conformacionales (23, 25, 58). Sin embargo, no se tiene claridad de como el Cu^{2+} influye en la adopción de la conformación monomérica que presenta propiedades amiloidogénicas, i.e. conformación *trans* del ángulo ω de la Pro32 y despliegue del bucle DE.

Para evaluar los cambios conformacionales de la $\beta 2m_{1DUZ}$ promovidos por la coordinación del Cu^{2+} en la región N-terminal se utilizaron dos metodologías. Primero se construyó un camino de interpolación que une las estructuras $\beta 2m_{1DUZ}$ y la $\beta 2m_{3CIQ}(H13)$. Segundo se desarrollaron simulaciones de dinámica molecular de los cinco primeros nanosegundos del Cu^{2+} coordinado en la $\beta 2m_{1DUZ}$.

3.2. Coordinate driving

La influencia del Cu^{2+} en el cambio conformacional de la proteína salvaje de conformación nativa es importante para entender cómo y por qué ocurre el cambio estructural y funcional de la proteína. La determinación de una posible estructura de holo-proteína salvaje con propiedades amiloidogénicas es importante como información de partida para iniciar el proceso de aglomeración de unidades de $\beta 2m$. Por estas razones, desarrollamos una trayectoria entre la estructura de la $\beta 2m_{1DUZ}$ y la holo-proteína $\beta 2m_{3CIQ}(H13)_m$, i.e. $\beta 2m_{3CIQ}(H13F)$ modificada (Ver la sección 6.2.1). En la figura 3.3 se muestra la interpolación de estructuras entre la proteína nativa y la proteína con posibles propiedades amiloidogénicas.

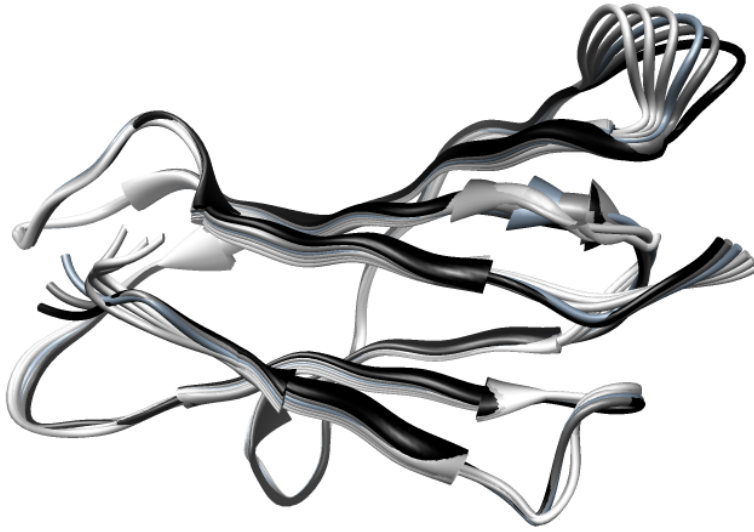


Figura 3.3: Interpolación entre la $\beta 2m_{1DUZ}$ y la holo-proteína $\beta 2m_{3CIQ}(H13)_m$ - $\beta 2m_{1DUZ}$ en gris claro. $\beta 2m_{3CIQ}(H13)_m$ en negro. Para este estudio, la $\beta 2m_{3CIQ}(H13F)$ fue modificada de la siguiente manera: se eliminó el residuo Met0, se intercambió la Phe por His en el residuo 13 y se adicionaron los residuos C-terminales Asp98 y Met99.

La superficie de energía potencial de la trayectoria se muestra en la figura 3.4. La superficie de energía muestra fluctuaciones asociadas a barreras energéticas que se deben vencer para que la $\beta 2m_{1DUZ}$ logre la conformación de $\beta 2m_{3CIQ}(H13)_m$. Se observa una barrera energética pronunciada cerca a la conformación 30 que debe ser vencida por la $\beta 2m$ en ausencia del Cu^{2+} . Además, se observan otras barreras energéticas pronuncia-

3. Cambios conformacionales de la $\beta 2m$ promovidos por la interacción con el Cu^{2+}

das alrededor de las conformaciones 45 a 50 que debe vencer la proteína, en ausencia y presencia del Cu^{2+} , para adquirir la conformación de $\beta 2m_{CIQ}(H13)_m$.

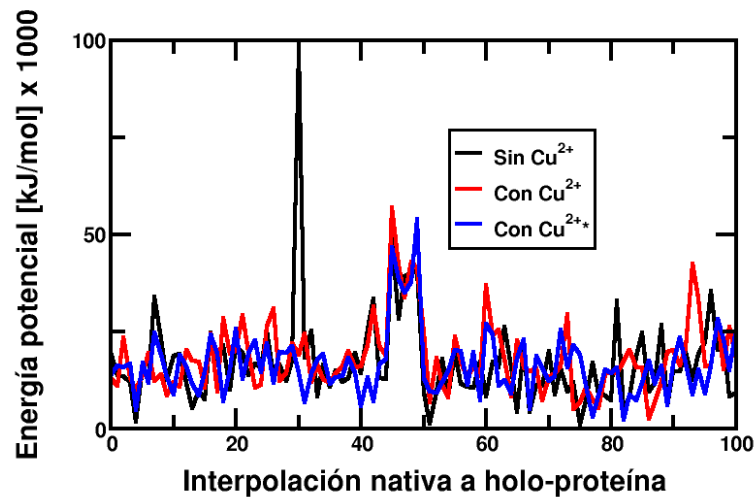


Figura 3.4: Superficie de energía potencial del cambio conformacional de la proteína(sn) a la $\beta 2m_{CIQ}(H13)_m$. - Superficie de energía potencial del cambio conformacional de la proteína nativa (silvestre), i.e. $\beta 2m(sn)$, hacia la proteína(s) con propiedades amiloidogénicas, i.e. $\beta 2m_{CIQ}(H13)_m$. Negro apo-proteína; rojo holo-proteína (tres restricciones); azul holo-proteína *(cuatro restricciones). Ver metodología (Sección 6.2.1).

La barrera energética observada en la configuración 30 de la apo-proteína en la figura 3.4 está asociada a la isomerización *cis-trans* del ángulo ω de la Pro32. En presencia del Cu^{2+} , líneas roja y azul, se observa que esta barrera no existe. Este resultado sugiere que el Cu^{2+} favorece la interconversión entre las dos conformaciones; además, concuerda con los datos experimentales reportados por Miranker *et al.* donde sugieren que el Cu^{2+} estabiliza conformaciones no nativas de la $\beta 2m$ (4).

La isomerización de los ángulos ϕ de la Phe30 y ω de la Pro32 requiere que el anillo bencénico de la Phe30 cambie su posición hacia la superficie, originalmente inmerso en un ambiente hidrofóbico. La isomerización de los ángulos pertenecientes a la cadena principal de la proteína y el cambio estéricamente impedido de la posición del anillo bencénico ocasionan un aumento energético del sistema. Este aumento energético se

muestra como la barrera energética comprendida entre las conformaciones 43 a 50 de la 3.4.

Es necesario resaltar que aún cuando cada conformación intermedia entre la $\beta 2m_{1DUZ}$ y $\beta 2m_{3CIQ}$ (H13) fue optimizada (Ver sección 6.2.1), pueden existir otras posibles trayectorias que sigan caminos de mínima energía. Para explorar esas trayectorias es necesario definir rigurosamente la coordenada intrínseca del cambio conformacional, que para ese sistema es muy compleja debido al gran número de grados de libertad.

En conclusión, este estudio resalta la función del Cu^{2+} como agente mediador del cambio conformacional de la $\beta 2m$, promoviendo la disminución de barreras energéticas de conformaciones no estables. La disminución de estas barreras energéticas facilitan el cambio conformacional de la proteína, una de las etapas trascendentales en el procesos de formación de fibras amiloides.

3.3. Dinámica molecular

La dinámica de la $\beta 2m$, en ausencia y presencia del Cu^{2+} , es indispensable para determinar bases moleculares de cambios conformacionales, movilidad y estabilidad de la estructura proteica. Con el fin de evaluar la dinámica de los primeros nanosegundos de la asociación del Cu^{2+} en la superficie de la proteína, se realizaron múltiples simulaciones de dinámica molecular. Se evaluó la desviación y movilidad del esqueleto de la proteína. También, se realizó un análisis por grupos de conformaciones semejantes. Para determinar la validez de los resultados se extrajeron de las simulaciones las estructuras representativas de la dinámica y se compararon con resultados recientes de MS.

Los sistemas, complejo Cu^{2+} - proteína, evaluados en las simulaciones de dinámica molecular se muestran en la figura 3.5. Estos sistemas hacen referencia a las predicciones reportadas en la literatura a partir de datos experimentales.

3. Cambios conformacionales de la $\beta 2m$ promovidos por la interacción con el Cu^{+2}

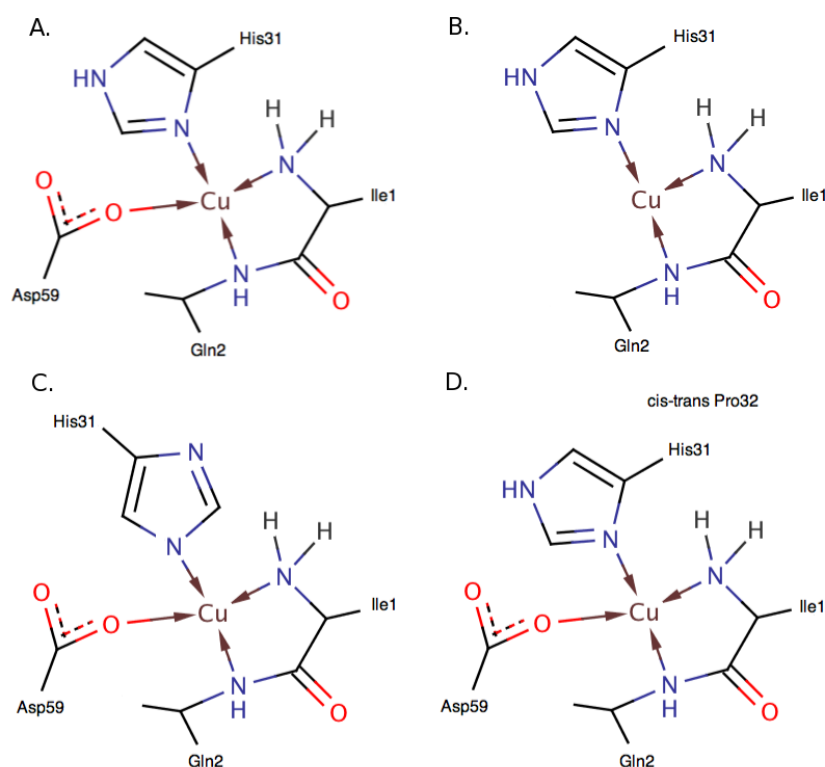


Figura 3.5: Configuración de los complejos metal - proteína evaluados por dinámica molecular. - Las flechas indican el lugar de la restricción tipo NOE de dos cuerpos, ver detalles en la sección 6.2.1 de la metodología. A. Complejo de coordinación en la holo-proteína $\beta 2m_{1DUZ}-Cu^{2+}_{ComplejoA}$ (H1). (23, 58); B. Complejo de coordinación en la holo-proteína $\beta 2m_{1DUZ}-Cu^{2+}_{ComplejoB}$ (H2) (58); C. Complejo de coordinación en la holo-proteína $\beta 2m_{1DUZ}-Cu^{2+}_{ComplejoC}$ (H3)(25); y D. Complejo de coordinación en la holo-proteína $\beta 2m_{1DUZ}-Cu^{2+}_{ComplejoD}$ (H4)(55, 58).

3.3.1. Desviación de la estructura secundaria.

Se evaluó la desviación (RMSD) de las posiciones atómicas del esqueleto de la proteína (N_{amida} , H_{amida} , C_{α} , C_{amida} , O_{amida}) respecto a la geometría de partida, con el objeto de evaluar el cambio conformacional de la estructura secundaria de la $\beta 2m$ durante la dinámica molecular de 5 ns. En la figura 3.6 se observa que en promedio a partir del primer nanosegundo ya ha ocurrido un cambio conformacional significativo de la $\beta 2m$ en los sistemas que presentan Cu^{2+} en su estructura. Además, a partir del primer nanosegundo la estabilización de la desviación de los átomos del esqueleto de las proteínas sugieren que la estructura de los diferentes modelos tiende a estabilizarse. Igualmente, desde los primeros instantes de las simulaciones se alcanza a apreciar las diferencias en las velocidades del cambio conformacional, visto como desviaciones, para los diferentes sistemas.

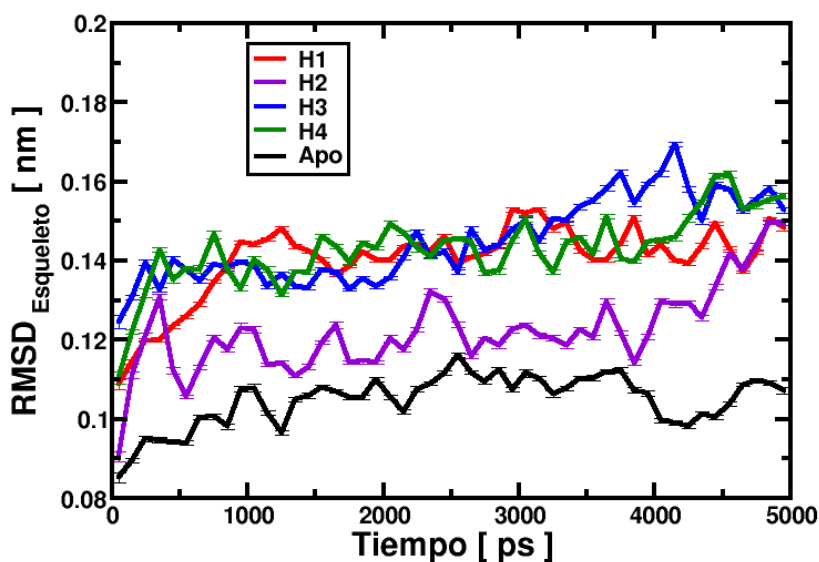


Figura 3.6: RMSD del esqueleto de la $\beta 2m$ en ausencia y presencia del Cu^{2+} .
- Desviación del esqueleto de holo-proteínas y la apo-proteína durante el transcurso de la simulación de dinámica molecular. Promedio de tres simulaciones. Las barras de error representan el 95 % del límite de confianza respecto a la media, calculado como se muestra en la ecuación 6.5.

3. Cambios conformacionales de la $\beta 2m$ promovidos por la interacción con el Cu^{2+}

La primera característica notable de la figura 3.6 es que la proteína Apo muestra alta estabilidad, reflejada en el poco cambio de las posiciones atómicas de la cadena principal. Al comparar este comportamiento con el de los sistemas que presentan Cu^{2+} en su estructura se observa que el cobre promueve el cambio conformacional de la proteína. Este resultado corrobora las evidencias mostradas por Goto *et al.* (57). Además, la figura 3.6 muestra que la ubicación del Cu^{2+} en la región N-terminal de la proteína es fundamental pues promueve el cambio casi inmediato de la proteína.

También la figura 3.6 muestra la influencia de la unión del Asp59 (O_{δ} .Asp59) con el Cu^{2+} en la desestabilización de la estructura nativa de la proteína. En los primeros cuatro nanosegundos la holo-proteína H2 que no presenta la unión Cu^{2+} - $O_{\delta 1}$.Asp59 muestra desviaciones intermedias entre la proteína Apo y holo-proteína H1. Este resultado indica que el efecto desestabilizador del Cu^{2+} se ve mitigado por la ausencia de la unión Cu^{2+} - $O_{\delta 1}$.Asp59. Sin embargo, al finalizar el cuarto nanosegundo se observa un nuevo incremento de la desviación, esto sugiere un nuevo cambio conformacional de la proteína H2. Estas evidencias apuntan a que: i) aunque el cambio conformacional de esta proteína es lento en comparación con el de la holo-proteína H1, un tiempo más prolongado de simulación podría mostrar que la proteína adquiere la misma conformación; y ii) el cambio conformacional hacia una estructura con propiedades amiloidogénicas puede ocurrir en varias etapas como resultado del acomodamiento de la proteína pasando por varias estructuras meta-estables durante el proceso. Además, que la holo-proteína H2 presenta una velocidad del cambio conformacional menor que la establecida para la holo-proteína H1. En conclusión, este resultado muestra la importancia de la unión Cu^{2+} - $O_{\delta 1}$.Asp59 como aspecto sobresaliente en la velocidad del cambio conformacional de la proteína.

En la región N-terminal el Cu^{2+} se puede unir a cualquiera de los dos nitrógenos del anillo imidazol de la His31 como se muestra en la figura 3.5, las holo-proteínas H1 y H3 representan las dos opciones. En la figura 3.6 se muestra la diferencia del $RMSD_{Esqueleto}$ entre estas dos proteínas. En comparación con la holo-proteína H1, en la figura 3.6 se muestra que la holo-proteína H3 presenta mayor velocidad del cambio conformacional al inicio de la simulación. Por lo demás, la figura muestra que la holo-proteína H3 pre-

senta un comportamiento muy similar al exhibido por la holo-proteína H1.

Por último, se evaluó el comportamiento de la $\beta 2m-Cu^{2+}$ con la conformación *trans* del ángulo ω de la Pro32, i.e. holo-proteína H4. La figura 3.6 muestra que la holo-proteína H4 presenta una mayor velocidad en el cambio conformacional en el inicio de la simulación en comparación con la holo-proteína H1. Sin embargo, al terminar el primer nanosegundo de la simulación la proteína mantiene la desviación promedio de las proteínas que presentan Cu^{2+} . Alrededor del cuarto nanosegundo de simulación, ocurre otro cambio conformacional apreciable, visto como otro incremento en la desviación del esqueleto. Estos sucesivos cambios, atípicos de las holo-proteínas H1 y H3, sugieren que esta restricción es un factor importante en el cambio conformacional de la proteína como lo revela los datos de difracción de rayos X (25).

En general, estos resultados prueban que la presencia del Cu^{2+} desestabiliza la estructura nativa de la $\beta 2m$, como lo sugieren varios autores (55, 60, 72). La desestabilización de la $\beta 2m$, con el Cu^{2+} unido a su estructura, está asociada al incremento en la velocidad del cambio conformacional de la estructura secundaria de la proteína y a la promoción de conformaciones susceptibles de agregación. Este resultado es realmente importante por que es la primera vez que se evidencia claramente a nivel atómico el efecto desestabilizador que tiene el Cu^{2+} sobre la estructura secundaria de la $\beta 2m$.

3.3.2. Movilidad de la estructura secundaria

Se determinó la fluctuación del esqueleto de cada residuo de la proteína ($RMSF_{Esqueleto}$), con el objeto de mostrar cuales regiones de la proteína son más propensas al cambio de su posición. El $RMSF_{Esqueleto}$ se evaluó después de equilibrado el sistema, i.e. después del primer nanosegundo. La figura 3.7 muestra como los bucles de la proteína presentan una elevada movilidad, más del doble con respecto a las hojas β . Además, en algunas regiones se aprecia el aumento de la movilidad por causa de la unión del Cu^{2+} en las proximidades del residuo N-terminal e His31.

En la figura 3.7 se observa un aumento de la movilidad de la hoja A, Thr4-Ser11, por efecto del enlace del Cu^{2+} . Esta tendencia se observa en las holo-proteínas H1, H2

3. Cambios conformacionales de la $\beta 2m$ promovidos por la interacción con el Cu^{2+}

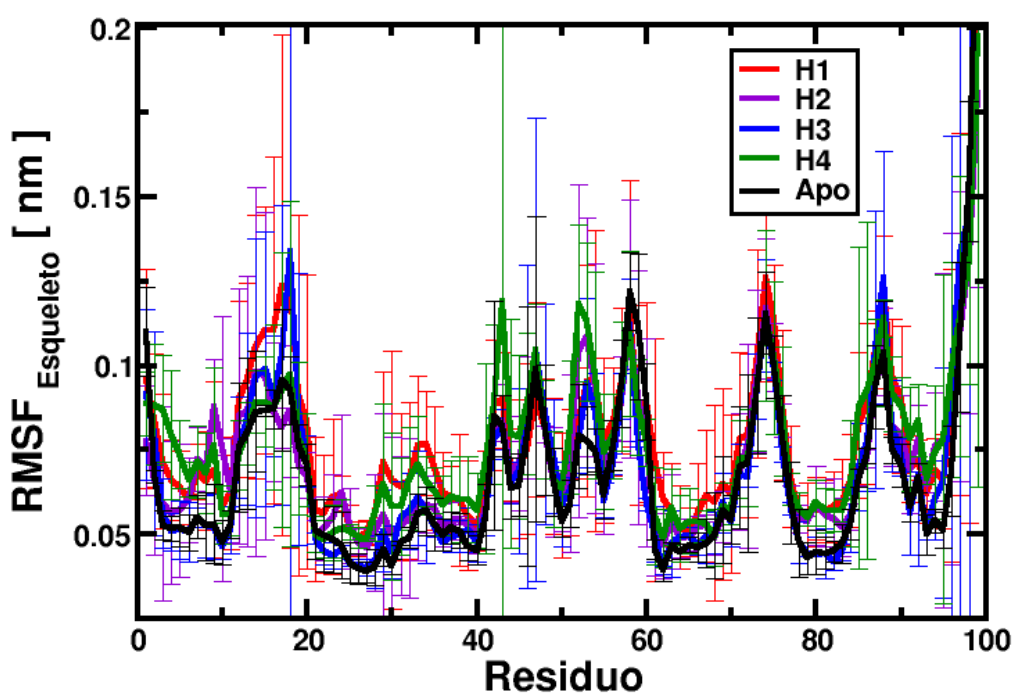


Figura 3.7: RMSF del esqueleto de la $\beta 2m$ en ausencia y presencia del Cu^{2+} .
- Fuctuación del esqueleto de holo-proteínas y de la proteína Apo durante las simulación de dinámica molecular. Promedio de tres simulaciones. Las barras de error representan el 95 % del límite de confianza respecto a la media, calculado como se muestra en la ecuación 6.5.

y H4, sistemas que presentan un complejo Cu^{2+} unido a $N_{Nterm}.Ile1$, $N_{amida}.Gln2$ y $N_{\delta}.His31$. Esto evidencia que la unión del Cu^{2+} con el $O_{\delta1}.Asp59$ o la conformación *trans* de la Pro32 no son causantes del aumento de la movilidad en la hoja A. Por otra parte, la holo-proteína H3 no presenta aumento de la movilidad en la hoja. Este resultado evidencia que la unión del ion metálico al $N_{Nterm}.Ile1$, $N_{amida}.Gln2$ y $N_{\delta}.His31$ produce un aumento de la movilidad de la hoja A. Esto sugiere que la configuración de la coordinación del Cu^{2+} modifica la dinámica de regiones de la proteína, especialmente las cercanas al lugar de coordinación.

Otro efecto marcado en la movilidad de las holo-proteínas se encuentra en el bucle BC, i.e. His31-Ile35. El bucle BC de la proteína Apo no presenta mayor movimiento debido a que es un bucle que une las dos láminas β de la proteína y adicionalmente presenta interacciones con las hojas E y F. Sin embargo, la coordinación del Cu^{2+} en la región N-terminal ocasiona un aumento en la movilidad del bucle, como se muestra en la figura 3.7. Curiosamente, los sistemas intermedios que simulan la isomerización *cis-trans* de la Pro32, i.e. holo-proteínas H1 y H4, presentan la mayor movilidad en este bucle. Esto sugiere que la unión del ion metálico en la región N-terminal e His31 aumenta la probabilidad de promover la isomerización *cis-trans*, como se reporta en la literatura (4, 25).

Por otra parte, en la figura 3.7 se muestra el aumento de la movilidad en el fragmento Val49-Ser55 en las holo-proteínas a comparación de la proteína Apo. Curiosamente, Goto *et al.* atribuyen este aumento de la movilidad a la unión del Cu^{2+} en la His51; debido a la propagación de la fluctuación hacia los residuos vecinales (57). Por el contrario, nuestro estudio evidencia que la unión del Cu^{2+} en la región N-terminal, en las cuatro holo-proteínas, induce el incremento de la fluctuación en esta región como aspecto desestabilizante de la conformación nativa. Este resultado tiene dos consecuencias importantes. Primero, el Cu^{2+} unido a la región N-terminal induce el aumento de la movilidad del fragmento Val49-Ser55. Esto promueve el cambio conformacional del fragmento y por consiguiente aumenta la probabilidad de que el fragmento forme la estructura tipo hoja β que no se presenta en la estructura nativa, como lo revelan estructuras resueltas por difracción de rayos X (7, 25) y RMN (14). Segundo, las evidencias experimentales del aumento de la movilidad en algunas regiones de la $\beta 2m$

3. Cambios conformacionales de la $\beta 2m$ promovidos por la interacción con el Cu^{2+}

como consecuencia de la unión del Cu^{2+} no necesariamente indican que el Cu^{2+} se ha unido en las cercanías de estos fragmentos.

En la figura 3.7 también se muestra que la presencia del Cu^{2+} produce un aumento de la fluctuación del fragmento Glu50-Ser55. Este fragmento no tiene estructura definida en la $\beta 2m(sn)$ y es fundamental en la asociación con el complejo HLA (13). Sin embargo, este fragmento es resuelto como hoja β D en algunos monómeros, dímeros y hexámeros resueltos por difracción de rayos X y RMN (7, 14, 25). El incremento de la movilidad de este fragmento en la holo-proteína, a comparación de la apo-proteína, aumenta la probabilidad de la formación de la estructura secundaria tipo hoja β .

Por otra parte, en la figura 3.7 se evidencia que en todas las estructuras se muestra alta movilidad de la estructura secundaria perteneciente a los aminoácidos Ser57 a Ser61, i.e. bucle DE. La alta movilidad del bucle DE sugiere que su conformación plegada puede espontáneamente adquirir una conformación desplegada, propicia para la formación de dímeros. Por último, en la figura se muestra la alta movilidad del residuo C-terminal de todas las proteínas evaluadas. Esta característica coincide con las estructuras analizadas por difracción de rayos X, donde las posiciones atómicas de los residuos C-terminales no pueden ser resueltas debido precisamente a su alta movilidad.

En conclusión, los resultados mostrados en este apartado logran aclarar algunos datos reportados en la literatura asociados a la movilidad de la proteína en ausencia y presencia del Cu^{2+} y mostrar los efectos del Cu^{2+} como mediador del cambio conformacional de la $\beta 2m$. Además consideramos que las simulaciones de dinámica molecular constituyen una herramienta valiosa y complementaria a los datos experimentales en el entendimiento de procesos biológicos como los estudiados en este trabajo.

3.3.3. Análisis por agrupamiento

A partir del primer nanosegundo de la simulación de dinámica molecular se agruparon estructuras con desviaciones del esqueleto ($RMSD_{Esqueleto}$) menores a 0,05 nm. El análisis por agrupamientos se realizó por dos motivos: Primero, para determinar

3.3 Dinámica molecular

conformaciones representativas de las simulaciones de dinámica molecular, i.e. estructuras estables durante el transcurso de las simulaciones. Segundo, para comparar las conformaciones representativas de las diferentes proteínas evaluadas.

Proteína evaluada	Cantidad de agrupamientos generados	Cantidad de conformaciones en el grupo más grande
H1	1719	49
H2	1240	137
H3	883	526
H4	1577	49
Apo	1066	258

Tabla 3.1: Análisis por agrupamiento - Promedios de tres simulaciones realizadas. El agrupamiento se realizó con $\text{RMSD}_{\text{Esqueleto}} < 0,05$ nm.

En la tabla 3.1 se muestra que en los primeros nanosegundos de la unión del Cu^{2+} con la proteína nativa se presenta un mayor número de agrupamientos de la holo-proteína en comparación con la proteína Apo. Este resultado evidencia una vez más la importancia de la presencia del Cu^{2+} en la desestabilización de la conformación nativa de la $\beta 2\text{m}$. Otro aspecto sobresaliente de los resultados de la tabla 3.1 es la proporcionalidad inversa entre el número de agrupamientos y la cantidad de estructuras en el agrupamiento más grande para cada sistema evaluado.

Las holo-proteínas H1 y H4 son las proteínas que presentan mayor agrupamientos de conformaciones en la tabla 3.1, esto sugiere que las geometrías de coordinación con el Cu^{2+} de estas proteínas son las que generan mayor desestabilización de la conformación nativa de la proteína.

Además se muestra que la dinámica molecular de la holo-proteína H2 exploró más conformaciones estables que la holo-proteína H1 y H4. Este resultado junto con el resultado mostrado en la figura 3.6 sugieren que el acomplejamiento del Cu^{2+} en la holo-proteína H2 genera menos desestabilización de la conformación nativa de la $\beta 2\text{m}$ que el acomplejamiento de las holo-proteínas H1 y H4. Este resultado es fundamental porque muestra la importancia de la posible unión Cu^{2+} - Asp59, hipótesis planteada

3. Cambios conformacionales de la $\beta 2m$ promovidos por la interacción con el Cu^{2+}

por Vachet *et al.* (23).

Por otra parte, la holo-proteína H3 presentó la menor cantidad de agrupamientos, aún menos que en la proteína Apo. Este resultado muestra la presencia de conformaciones no nativas estables de la $\beta 2m-Cu^{2+}$. También revela que el cambio de la posición del Cu^{2+} , aún en el anillo imidazol de la His31, ocasiona cambios en la flexibilidad y estabilidad de conformaciones no nativas de la proteína. Además sugiere que la correcta configuración de unión Cu^{2+} - proteína es requerida para determinar las consecuencias reales de la unión del metal de transición.

Las principales propiedades moleculares de las proteínas responsables de su actividad superficial son la estabilidad, el tamaño, la forma de la estructura, la distribución de cargas y la localización de zonas hidrofóbicas/hidrofílicas (73). La estabilidad de la proteína se trató en las secciones 3.3.1 y 3.3.2. Para evaluar los cambios en las propiedades moleculares restante se tomó la conformación más representativa de cada sistema evaluado, i.e. la conformación del agrupamiento con mayor cantidad de estructuras.

Cambio conformacional del esqueleto

En las secciones anteriores se han mostrado pruebas de la importancia del Cu^{2+} en la desestabilización de la estructura nativa de la $\beta 2m$; sin embargo, no se han mostrado los cambios conformacionales ocasionados por el acomplejamiento del cobre en la proteína. Con el objeto de mostrar los cambios conformacionales de la $\beta 2m$ producto del acomplejamiento del Cu^{2+} en la región N-terminal de la proteína, se superpusieron las conformaciones más representativas de los cinco sistemas evaluados. La figura 3.8 muestra la superposición de las conformaciones.

La figura 3.8 muestra que las conformaciones representativas de las holo-proteínas y la proteína Apo presentan una elevada similitud estructural 3D, i.e. las estructuras secundaria y terciaria son semejantes. Las diferencias conformacionales más significativas que se observan en la figura son:

1. En el fragmento N-terminal. Se observan diferencias apenas notorias, aún cuando se esperan cambios significativos por los distintos entornos químicos entre la

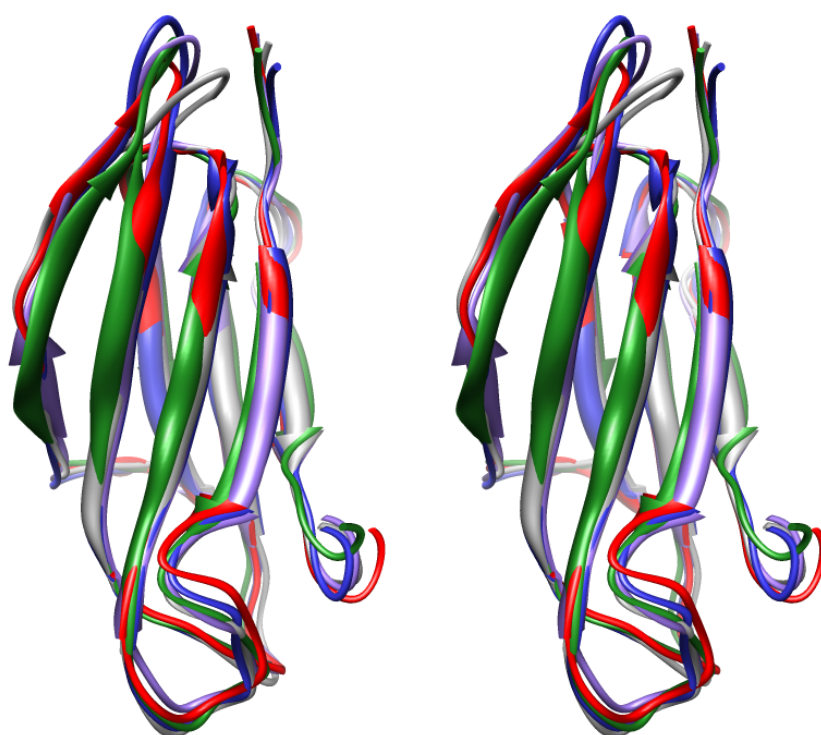


Figura 3.8: Superposición de las conformaciones más representativas de la dinámica molecular. - En rojo holo-proteína H1. En púrpura holo-proteína H2. En azul holo-proteína H3. En verde holo-proteína H4. En gris proteína Apo.

3. Cambios conformacionales de la $\beta 2m$ promovidos por la interacción con el Cu^{2+}

proteína Apo y las holo-proteínas alrededor del fragmento N-terminal; la libertad de los residuos N-terminales en la proteína Apo y la presencia restricciones en los amino ácidos Ile1 y Gln2, ligantes del Cu^{2+} .

2. En la región C-terminal. Las diferencias notorias de la conformación del fragmento C-terminal de la proteína Apo y las holo-proteínas posiblemente son causadas por la elevada movilidad del fragmento, como se reveló en la sección 3.3.2.
3. La hoja D. Se observa la formación de la hoja β D en la conformación de la holo-proteína H4, $\beta 2m$ en verde, con respecto a las otras conformaciones. Este cambio conformacional concuerda con la elevada movilidad del fragmento discutido en la sección 3.3.2.
4. En el bucle DE. El despliegue de este bucle en las holo-proteínas es una de las diferencias que presentan mayor desviación con respecto a la proteína Apo, como se mostró anteriormente en la sección 3.1. Ahora está evidentemente claro que la causa del despliegue es por el acomplejamiento del Cu^{2+} en la región N-terminal y en la His31.

Es importante destacar que los cambios conformacionales mostrados en la figura 3.8 se localizan en la lámina ABED. Una de las diferencias conformacionales en la lámina ABED entre la proteína Apo y la holo-proteína H4 es la formación de la hoja β en el fragmento D. La holo-proteína H4 presenta la formación completa de la hoja β , mientras que las holo-proteínas H1 y H2 presentan formación parcial. Aunque la formación de la hoja β en el fragmento D de la $\beta 2m$ parece no ser requisito para la formación espontánea de dímeros, como se muestra en las figuras 1.4 y 1.6, este cambio conformacional es importante por localizarse en la lámina ABED.

Otra diferencia se encuentra en el bucle DE. En la sección 3.1, donde se compararon las proteínas $\beta 2m_{1DUZ}$ y $\beta 2m_{3CIQ}(H13F)-Cu^{2+}$ se mostró que el despliegue del bucle DE es una de las diferencias significativas entre la conformación nativa de la $\beta 2m$ y aquella con propiedades amiloidogénicas. Además, en esa sección se sugirió la importancia de la conformación aplegada del bucle DE en la formación de dímeros, proto-fibras con propiedades amiloidogénicas. Por esta razón es interesante observar

en la figura 3.8 el bucle DE desplegado en todas las conformaciones que acomplejan el Cu^{2+} a comparación de la proteína Apo. La primera impresión sugiere que este despliegue se forma en las holo-proteínas con la restricción enlazante Cu^{2+} - Asp59, porque el Asp59 se encuentra en el bucle DE y una restricción enlazante con el Cu^{2+} obliga el bucle a desplazarse. Sin embargo, esta modificación estructural también ocurre en la conformación representativa de la holo-proteína H2, que no presenta la restricción enlazante Cu^{2+} - Asp59. Este resultado demuestra que el desplazamiento del bucle DE es consecuencia del acomplejamiento del Cu^{2+} en la región N-terminal y His31, y no necesariamente de la restricción Cu^{2+} - Asp59.

En conclusión, la evidencia del despliegue del bucle DE únicamente en las holo-proteínas tiene una trascendencia significativa para el entendimiento del cambio conformacional de la $\beta 2m$; porque este resultado revela que el despliegue del bucle DE es consecuencia del acomplejamiento del Cu^{2+} en la región N-terminal y His31, y no del proceso de acoplamiento entre proteínas en la formación de dímeros. Además, como se discutirá en la sección 4.3 la conformación estable de la holo-proteína con el bucle DE desplegado es más apropiada para el acoplamiento proteína - proteína que la conformación estable de la proteína Apo.

Cambios en la superficie hidrofóbica.

El balance entre la superficie polar y no polar – naturaleza anfipática – es una de las principales propiedades moleculares responsables de la actividad superficial de las proteínas debido a que influencia la orientación de la agregación entre proteínas (73). La superficie hidrofóbica representa la naturaleza anfipática de la superficie de las proteínas (74). Con el objeto de determinar cambios en los agrupamientos hidrofóbicos e hidrofílicos de la $\beta 2m$ promovidos por el acomplejamiento del Cu^{2+} se determinó la superficie hidrofóbica de la proteína,.

En la figura 3.9 se muestra que la ubicación del Cu^{2+} en la superficie de la proteína varía dependiendo del modelo de holo-proteína. En las holo-proteínas H1 y H2 se muestra el Cu^{2+} parcialmente protegido del solvente por algunos amino ácidos de la región N-terminal; sin embargo, en la holo-proteína H3 se muestra el Cu^{2+} totalmente

3. Cambios conformacionales de la $\beta 2m$ promovidos por la interacción con el Cu^{+2}

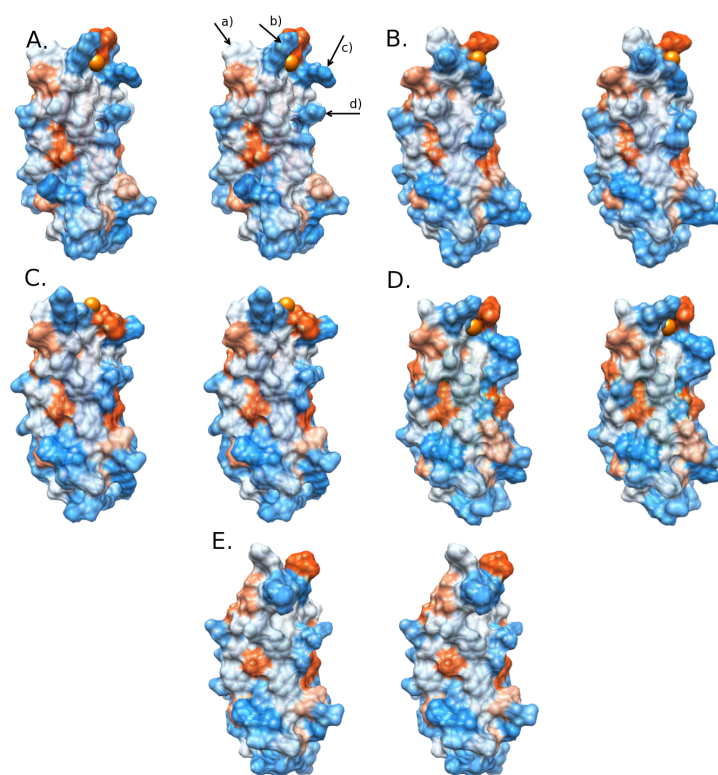


Figura 3.9: Superficie hidrofóbica de las conformaciones representativas. - Vista estéreo de la lámina ABED de los diferentes sistemas evaluados. A. holo-proteína H1, B. Holo-proteína H2, C. Holo-proteína H3, D. Holo-proteína H4 y E. Proteína Apo. Amino ácidos hidrofóbicos en rojo hasta amino ácidos hidrofílicos en azul. a) Trp60, b) Lys58, c) Arg3 y d) Lys6.

expuesto al solvente. La ubicación superficial del Cu^{2+} en la holo-proteína H3 es debida a la unión del Cu^{2+} en el anillo imidazol de la His31; mientras que en las holo-proteínas H1 y H2 el Cu^{2+} está unido al N_δ en la holo-proteína H3 está unido al N_ϵ . Por otra parte, la holo-proteína H4 muestra el Cu^{2+} protegido del solvente por amino ácidos de la región N-terminal, esta conformación es promovida por la fuerte coordinación del Cu^{2+} en la proteína. En la holo-proteína con la isomerización *cis-trans* de la Pro32 el Cu^{2+} se encuentra mayormente sepultado, hacia el interior de la proteína, por los grupos que lo acomplejan.

También se muestra que la presencia del Cu^{2+} en la $\beta 2m$ promueve cambios conformacionales en la proteína, principalmente en la región N-terminal. Las variaciones más significativas son la direccionalidad de los grupos funcionales de la Arg3, Lys58 y Trp60. Los grupos cargados positivamente de la Arg3 y Lys58, por repulsión electrostática con el Cu^{2+} , se alejan de la región N-terminal. Además, las fuertes interacciones electrostáticas en la región N-terminal desplazan el Trp60 hacia la lámina CFG de la proteína.

Por otra parte, en el centro de la lámina ABED se observa un agrupamiento constituido por los residuos Tyr63, Tyr26 y Tyr10. Este agrupamiento parcialmente hidrofóbico se conserva en todos los modelos, en ausencia o presencia del Cu^{2+} . Sin embargo, la presencia del Cu^{2+} promueve una reorganización de los anillos aromáticos, por lo tanto un cambio en la forma del agrupamiento.

Por último, en la parte inferior de las superficies mostradas en la figura se observa la presencia de un agrupamiento hidrofílico que no cambia su forma aún en presencia del cobre. Este resultado sugiere que la coordinación del Cu^{2+} en la región N-terminal promueve cambios conformacionales en las proximidades de su ubicación pero no en el extremo opuesto de la proteína.

En conclusión los cambios conformacionales promovidos por la presencia del Cu^{2+} en la $\beta 2m$ se localizan en las proximidades de los residuos N-terminales como consecuencia de las fuertes interacciones electrostáticas. Además, las superficies no mostraron la formación o cambios en los agrupamientos hidrofóbicos de los modelos.

3. Cambios conformacionales de la $\beta 2m$ promovidos por la interacción con el Cu^{2+}

Cambio del pK_a de amino ácidos

En bioquímica la valoración del pK_a de grupos protonables se ha convertido en una de las formas de describir y predecir interacciones electrostáticas en las proteínas. Con el fin de determinar cambios conformacionales, mediante cambio de las interacciones electrostáticas, como consecuencia de la coordinación del Cu^{2+} en la $\beta 2m$ se determinó el pK_a de las histidinas. Los resultados del pK_a de los diferentes modelos se muestran en la tabla 3.2, la discusión de la variación de los valores del pK_a se mostró como consecuencia de la coordinación del Cu^{2+} en la $\beta 2m$.

<u>Modelo</u> <u>AA</u>	H1	H2	H3	H4	Apo
His13	$6,37 \pm 0,52$	$6,41 \pm 0,38$	$6,27 \pm 0,31$	$6,13 \pm 0,11$	$6,18 \pm 0,07$
His31	$5,63 \pm 0,15$	$5,49 \pm 0,11$	$5,54 \pm 0,12$	$5,59 \pm 0,08$	$5,77 \pm 0,13$
His51	$6,22 \pm 0,08$	$6,50 \pm 0,20$	$6,31 \pm 0,08$	$6,60 \pm 0,11$	$6,32 \pm 0,01$
Asp59	$2,10 \pm 0,33$	$0,83 \pm 0,34$	$1,66 \pm 0,74$	$1,63 \pm 0,38$	$2,16 \pm 0,21$
His84	$6,23 \pm 0,12$	$6,42 \pm 0,10$	$6,19 \pm 0,06$	$6,42 \pm 0,11$	$6,22 \pm 0,12$

Tabla 3.2: pK_a de amino ácidos en la $\beta 2m$ y $\beta 2m-Cu^{2+}$. - Promedio del pK_a de tres conformaciones representativas de cada modelo. $pK_{a(Estandar\ His)} = 6,50$, $pK_{a(Estandar\ Asp)} = 3,80$

Las holo-proteínas no mostraron cambio en las interacciones de Coulomb y del pK_a de la His13 a comparación de la proteína Apo. La permanencia de las interacciones electrostáticas de la His13 con la Arg12 y Glu16 y la ausencia de cambios conformacionales en el bucle AB, i.e. parte inferior de las superficies mostradas en la figura 3.9, sugieren que la coordinación del Cu^{2+} en la región N-terminal no promueve cambios conformacionales en el extremo opuesto de la proteína.

Por otra parte, la unión del Cu^{2+} provocó disminuciones leves no significativas del pK_a de la His31. Las variaciones en el pK_a fueron promovidas por los cambios conformacionales del entorno químico, i.e. cambios en las interacciones electrostáticas del anillo imidazol. En la proteína Apo la His31 interacciona electrostáticamente con el grupo amina N-terminal, el grupo funcional de la Arg3 y el grupo imidazol de la His84.

Mientras que en las holo-proteínas el anillo imidazol de la His31 presenta interacciones de Coulomb con el Cu^{2+} , el grupo carboxilo del Asp59 (aún en la holo-proteína H2) y el grupo imidazol de la His84.

Al igual que en la His13 el pK_a de la His51 y la His84 no varía significativamente entre las holo-proteínas y la proteína Apo. Este resultado se debe a que el anillo imidazol de las histidinas mantienen las mismas interacciones de puente de hidrógeno y de Coulomb de la proteína, aún en presencia del Cu^{2+} . La preservación de las interacciones electrostáticas de los grupos imidazoles con su entorno, en ausencia y presencia del Cu^{2+} , sugiere que las regiones alrededor de estos grupos funcionales no presentan cambios conformacionales significativos como consecuencia de la unión del cobre en la región N-terminal.

En la figura 3.8 se mostró el cambio en la estructura secundaria del bucle DE promovido por la coordinación del Cu^{2+} en la región N-terminal. Con el fin de determinar cambios en las interacciones electrostáticas de grupos protonables en el bucle se evaluó el pK_a del Asp59. En la tabla 3.2 se muestra que el pK_a del Asp59 no cambia significativamente en las holo-proteínas H1, H3 y H4 a comparación de la proteína Apo. Sin embargo, las interacciones electrostáticas del Asp59 en las holo-proteínas y la proteína Apo difieren. Mientras el grupo carboxilo del Asp59 en la proteína Apo presenta interacciones de Coulomb con la Lys6, His31 y Arg3; en las holo-proteínas presenta interacciones con el Cu^{2+} , His31 y Arg3.

Por otra parte, el pK_a del Asp59 en la holo-proteína H2 presenta una disminución considerable. Aunque en la holo-proteína H2 el Asp59 interacciona electrostáticamente con los mismos grupos funcionales que en las holo-proteínas H1, H3 y H4, el aumento de la distancia entre el grupo carboxilo del Asp59 y el Cu^{2+} se ve compensada por el acercamiento del grupo protonable de la Arg3 al Asp59. La conformación obtenida de la holo-proteína H2 promueve un descenso considerable del pK_a del grupo carboxilo del Asp59.

En conclusión los resultados muestran que la coordinación del Cu^{2+} en la región N-terminal promueve cambios en las interacciones electrostáticas de la $\beta 2m$. Este cambio

3. Cambios conformacionales de la $\beta 2m$ promovidos por la interacción con el Cu^{+2}

conformacional favorece el cambio en el pK_a de los grupos protonables alrededor de la región N-terminal. Estos resultados concuerdan con los datos de MS donde los amino ácidos cercanos al lugar de coordinación del Cu^{2+} , i.e. Thr4, His31 y Ser33, disminuyen la reactividad hacia el Dietil-pirocarbamato (DEPC) (23).

3.4. Validación de los cambios conformacionales

En resultados publicados por Vachet *et al.* 2008, se muestra el DEPC como marcador utilizado en la determinación de cambios estructurales en las proteínas. El estudio reveló la reactividad del DEPC sobre la Thr4, His13, His31, Ser33, His51 y Ser88 de la $\beta 2m$ en presencia y ausencia del Cu^{2+} . La ubicación de estos aa – amino ácidos – se muestran en la figura 3.10. Los autores correlacionaron el cambio en la reactividad del DEPC principalmente a la accesibilidad, i.e. área superficial accesible al solvente, y al entorno químico del grupo funcional de los aa (23). En este orden de ideas una disminución de la reactividad del DEPC sobre un grupo funcional sugiere una disminución del área superficial accesible al solvente. Con el fin de validar el modelo teórico se compararon las características biomoleculares de las estructuras obtenidas por simulación de dinámica molecular con estos resultados de MS. Para cumplir este propósito se desarrollaron dos procedimientos: i) Determinación del cambio en el área superficial de los amino ácidos y ii) determinación del cambio en la afinidad del DEPC en los aa.

3.4.1. Área superficial accesible al solvente.

El área superficial accesible al solvente – SASA de sus siglas en inglés *Solvent Accessible Surface Area* – de la His13, His31, Ser33, His51, Trp60 y Ser88 se muestran en la figura 3.11. Se escogieron estos aa porque: i) la His31, Ser33 y Trp60 se encuentran próximos a la región N-terminal; ii) la His13, His31 y His51 son las tres histidinas superficiales de la proteína y muestran reactividad frente al DEPC; iii) las Ser33 y Ser88 muestran reactividad frente al DEPC y iv) el Trp60 en la figura 3.9 mostró cambio conformacional en la ubicación de su grupo funcional.

3.4 Validación de los cambios conformacionales

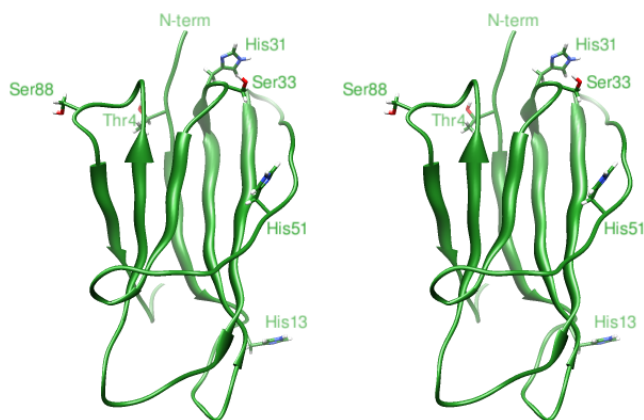


Figura 3.10: Ubicación de amino ácidos marcados con DEPC. - Vista estéreo de la ubicación de los amino ácidos, en la $\beta 2m(su)$ (13), marcados con DEPC y posterior análisis por MS (23).

En general la figura 3.11 muestra que el SASA de la His13, His31 y Ser33 en las holo-proteínas evaluadas, inclusive en la holo-proteína $\beta 2m_3CIQ(H13)-Cu^{2+}$, no presenta cambio alguno a comparación de la proteína Apo; mientras que la His51, Trp60 y Ser88 muestran disminución significativa del SASA.

En la figura 3.10 se muestra que la His13 se encuentra en el extremo opuesto de la región N-terminal, lugar de unión del Cu^{2+} en la proteína. En la figura 3.9 se muestra que el extremo opuesto de la región N-terminal no sufre cambios conformacionales significativos como consecuencia de la unión del Cu^{2+} en la proteína, y además en la tabla 3.2 se muestra que el pK_a de la His13 no cambia significativamente. Finalmente en la figura 3.11 A. se muestra la ausencia del cambio del SASA de la His13. Estos resultados sugieren que la unión del Cu^{2+} en la región N-terminal no promueve cambios conformacionales en el extremo opuesto de la proteína.

El SASA de la His31 y Ser33 tampoco mostró variación como consecuencia de la coordinación del Cu^{2+} en la región N-terminal. Aunque el anillo imidazol de la His31 es uno de los grupos ligantes del Cu^{2+} y la Ser33 está próxima a la localización del Cu^{2+} , los cambios conformacionales promovidos por la unión del Cu^{2+} en la proteína no causan cambios en el SASA de estos aa. Este resultado sugiere que el descenso en la reactividad de estos aa frente a el DEPC, observado en estudios de MS (23), es debido

3. Cambios conformacionales de la $\beta 2m$ promovidos por la interacción con el Cu^{+2}

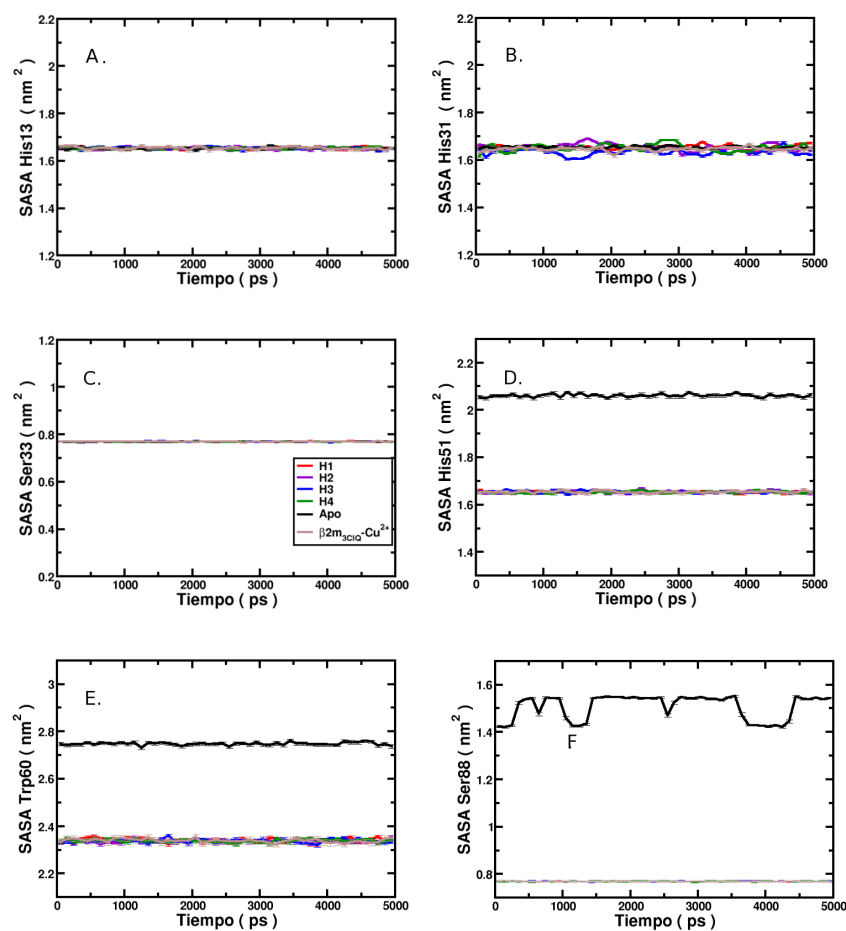


Figura 3.11: Área superficial accesible al solvente. - Área superficial durante el transcurso de la simulación de dinámica molecular de la His13, His31, Ser33, His51, Trp60 y Ser88. A. His13; B. His31; C. Ser33; D. His51; E. Trp60; F. Ser88. Promedio de tres simulaciones. Las barras de error representan el 95 % del límite de confianza respecto a la media, calculado como se muestra en la ecuación 6.5.

3.4 Validación de los cambios conformacionales

a factores bioquímicos asociados a la unión del Cu^{2+} . Razón por la cual se realizaron estudios de *docking* molecular del DEPC sobre la superficie de la $\beta 2m$, estudios que se muestran en la sección posterior.

Por otra parte, en la figura 3.11 D. se muestra la disminución del SASA de la His51 en las holo-proteínas a comparación de la proteína Apo. Este resultado muestra que la unión del Cu^{2+} en la región N-terminal de la proteína promueve cambios conformacionales en los alrededores de la His51. En la figura 3.7 también se muestra como la unión del Cu^{2+} en la región N-terminal promueve el aumento de la movilidad del fragmento D de la $\beta 2m$. Estas evidencias sugieren que los alrededores de la His51 se ven modificados por el acomplejamiento del Cu^{2+} en la proteína.

Otro resultado interesante, la disminución del SASA del Trp60 se muestra en la figura 3.11 E. Este aa es esencial en la estabilidad de la $\beta 2m$ en el HLA (13), por esta razón el grupo indol permanece expuesto al solvente en la proteína Apo. Sin embargo en las holo-proteínas, el grupo indol busca asociarse con otros grupos funcionales hidrofóbicos para mantener las moléculas de H_2O alejadas de su estructura formando agregados aromáticos con los grupos fenilos de las Phe56 y Phe62. En la figura 3.12 se observa el agrupamiento hidrofóbico en la holo-proteína H3. Este resultado muestra y confirma evidencias de las primeras etapas del cambio conformacional hacia una estructura con propiedades amiloidogénicas, como lo reportan los cambios en la fluorescencia intrínseca de la $\beta 2m$ (50) y las estructuras resueltas por difracción de rayos X (25).

Por otra parte, la figura 3.11 F. muestra la disminución del SASA de la Ser88 de las holo-proteínas a comparación de la proteína Apo. Como lo muestra la figura 3.10 la Ser88 está espacialmente cercana a la ubicación de la coordinación Cu^{2+} en la proteína. Este resultado evidencia nuevamente el cambio conformacional en las proximidades del residuo N-terminal.

En conclusión los cambios conformacionales promovidos por la unión del Cu^{2+} en la proteína se localizan en los alrededores de la región N-terminal y quizás algunos cambios difícilmente apreciables en la mitad de la proteína. También se concluye que el extremo opuesto la proteína no sufre cambios conformacionales por la coordinación

3. Cambios conformacionales de la $\beta 2m$ promovidos por la interacción con el Cu^{+2}

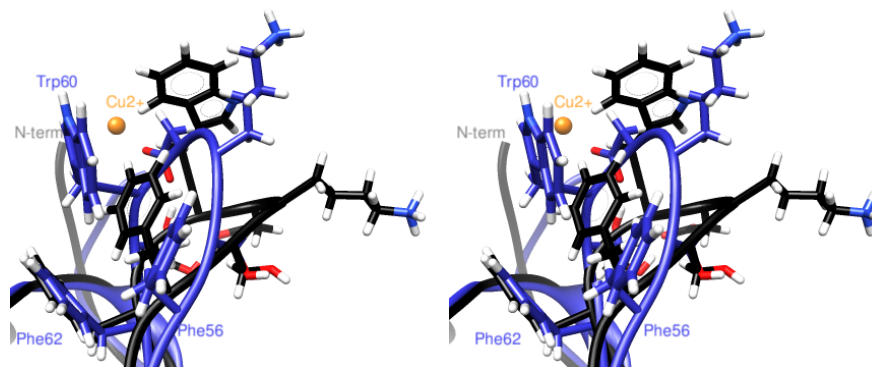


Figura 3.12: Agrupamiento aromático en el bucle DE de la holo-proteína H3. - Vista estéreo del agrupamiento aromático generado por la Phe56, Trp60 y Phe62 en la $\beta 2m$ promovido por el acomplejamiento del Cu^{2+} en su estructura. En Negro proteína Apo. En azul holo-porteína H3.

del Cu^{2+} .

3.4.2. *Docking* proteína - DEPC

Algunos de los resultados del SASA mostrados en la sección anterior (Sección 3.4.1) no exhiben una relación directa con la reactividad del DEPC (23). Con el objeto de incluir en el modelo teórico propiedades bioquímicas de la asociación del DEPC sobre la superficie de la $\beta 2m$, en ausencia y presencia del Cu^{2+} , se desarrollaron múltiples simulaciones de *docking* molecular DEPC - $\beta 2m$. Las apo-proteínas utilizadas hacen referencia a la $\beta 2m(sn)$ y a la proteína Apo. Asimismo las holo-proteínas utilizadas hacen referencia a las estructuras obtenidas en las secciones 3.2 y 3.3.

Los resultados de *docking* molecular muestran que el DEPC se asocia espontáneamente a los grupos imidazol de la His31 e hidroxilo del la Ser33 de las apo-proteínas. Además, las figuras 3.13 y 3.14 muestran configuraciones adecuadas para la posterior modificación de los grupos funcionales de la His31 y Ser33.

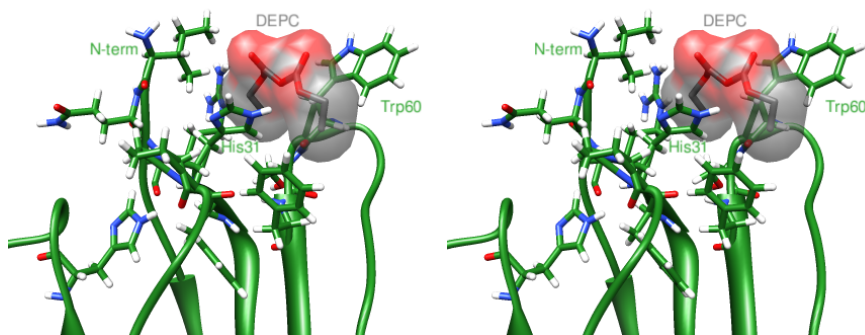


Figura 3.13: DEPC en las proximidades de la His31 de la proteína Apo. - Vista estéreo de la ubicación de menor energía *docking* del DEPC en las cercanías de la His31 en la proteína Apo. Conformación con energía *docking* de -11,346 kJ/mol.

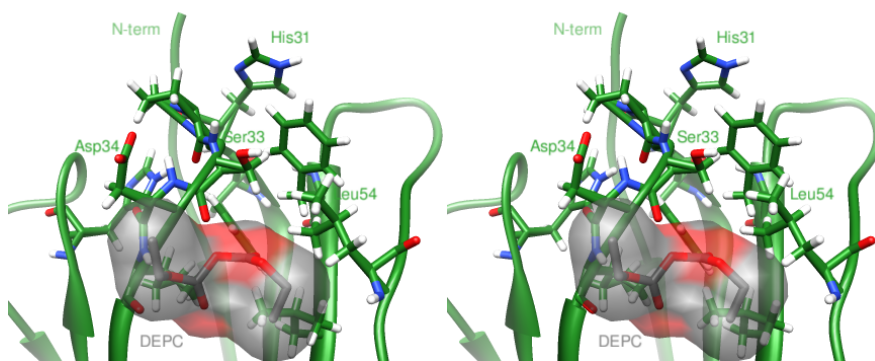


Figura 3.14: DEPC en las proximidades de la Ser33 de la $\beta 2m(sn)$. - Vista estéreo de la ubicación de menor energía *docking* del DEPC en las cercanías de la Ser33 en la $\beta 2m(sn)$. Configuración con energía *docking* de -8,541 kJ/mol.

3. Cambios conformacionales de la $\beta 2m$ promovidos por la interacción con el Cu^{2+}

3.4.2.1. *Coordinate driving*

Los resultados de *docking* molecular holo-proteína $\beta 2m_{3CIQ}(H13)_m-Cu^{2+}$ - DEPC muestran que el DEPC no se adsorbe espontáneamente en las proximidades del anillo imidazol de la His31, como si lo hace en las apo-proteínas. Este resultado sugiere que el entorno químico de la His31 en la holo-proteína no es adecuado para que el DEPC se adsorba y favorezca la modificación química del anillo imidazol. Además, la unión no espontánea aclara el fenómeno de disminución de la reactividad del anillo imidazol de la His31 frente a el DEPC (23).

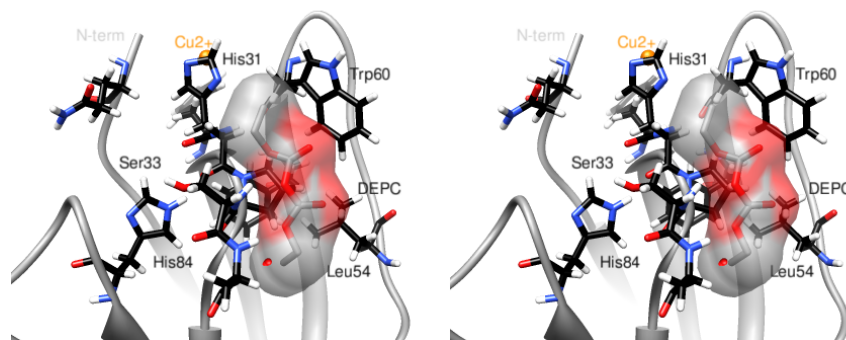


Figura 3.15: DEPC en las proximidades de la Ser33 de la $\beta 2m_{3CIQ}(H13)_m-Cu^{2+}$.
- Vista estéreo de la ubicación de menor energía *docking* del DEPC en las cercanías de la Ser33 en la $\beta 2m_{3CIQ}(H13)_m-Cu^{2+}$. Configuración con energía *docking* de -12,686 kJ/mol.

Por otra parte, al evaluar la adsorción del DEPC en las proximidades de la Ser33, a 0,692 nm de la His31, se encontraron configuraciones donde la Ser33 interacciona con el ligando. Sin embargo, la figura 3.15 muestra que la ubicación del ligando no es adecuada para la posterior modificación del grupo hidroxilo.

Estos resultados corroboran como los cambios conformacionales de la proteína promovidos por el acomplejamiento del Cu^{2+} en la $\beta 2m$, provocan variaciones en la reactividad de la proteína hacia sustratos como el DEPC.

3.4.2.2. Dinámica molecular

Al igual que con la holo-proteína $\beta 2m_{3CIQ}(H13)-Cu^{2+}$, los resultados de *docking* molecular del DEPC sobre las superficie de las holo-proteínas H1, H2, H3 y H4 muestran pérdida de la afinidad del DEPC con el grupo imidazol de la His31 y del grupo hidroxilo de la Ser33.

En la figura 3.16 A. y B. se muestran conformaciones del DEPC inadecuadas para la posterior modificación del grupo imidazol. En la figura 3.16 A. muestra la ubicación del DEPC cerca al anillo imidazol de la holo-proteína H1; sin embargo la interacción se presenta en el lado opuesto de los nitrógenos del anillo imidazol. Por otra parte, en la figura 3.16 B. se muestra el DEPC adsorbida en la región N-terminal de la holo-proteína H4. No obstante, la interacción entre el DEPC y el anillo imidazol de la His31 se ve impedida por el Cu^{2+} .

Por otra parte, los resultados de *docking* molecular DEPC - holo-proteínas mostraron que los cambios conformacionales promovidos por el acomplejamiento del Cu^{2+} en la proteína provocan la pérdida de la reactividad de la Ser33 frente al DEPC. Por una parte, la mitad de los modelos de holo-proteína evaluados mostraron que no se presentó interacción del DEPC con la Ser33; mientras que la otra mitad mostró que la interacción no es adecuada para una posterior modificación del grupo hidroxilo.

Estos resultados corroboran dos aspectos importantes: i) que los cambios conformacionales determinados en los primeros 5 ns del acomplejamiento del Cu^{2+} en la proteína muestra los primeros cambios conformacionales de la $\beta 2m$ hacia la formación de la conformación con propiedades amiloidogénicas y ii) que el análisis computacional es una valiosa herramienta en el análisis a nivel atómico de los resultados experimentales, como los reportados por Vachet et al. 2008 (23).

3. Cambios conformacionales de la $\beta 2m$ promovidos por la interacción con el Cu^{+2}

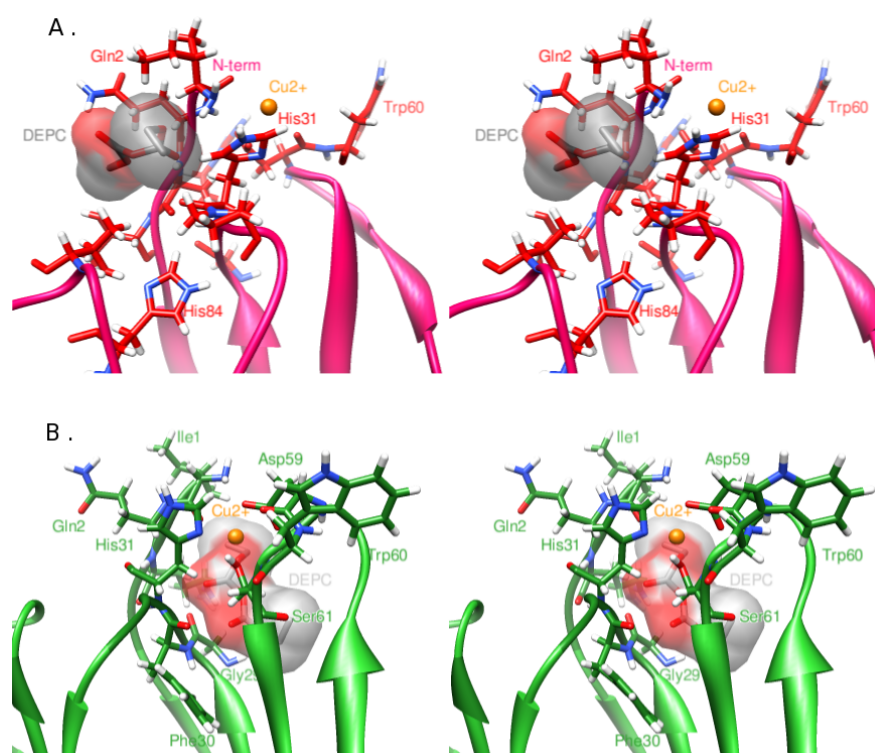


Figura 3.16: DEPC en las proximidades de la His31 de las holo-proteínas H1 y H4. - **A.** Vista estéreo de la ubicación de menor energía *docking* del DEPC en las cercanías de la His31 en la holo-proteína H1. Conformación con una energía *docking* de -12,518 kJ/mol. **B.** Vista estéreo de la ubicación de menor energía *docking* del DEPC en las cercanías de la His31 en la holo-proteína H4. Conformación con una energía *docking* de -12,853 kJ/mol.

3.4 Validación de los cambios conformacionales

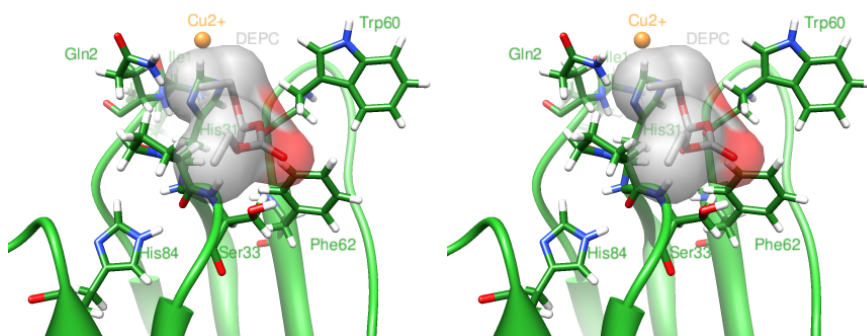


Figura 3.17: DEPC en las proximidades de la Ser33 de la holo-proteína H3. - Vista estéreo de la ubicación de menor energía *docking* del DEPC en las cercanías de la Ser33 en la holo-proteína H3. Conformación con energía *docking* de -10,341 kJ/mol.

Capítulo 4

Formación de dímeros

Con el fin de construir un modelo que describa el acoplamiento de dos unidades de $\beta 2m-Cu^{2+}$ hacia la formación del dímero con propiedades amiloidogénicas se desarrollaron extensos estudios de *docking* proteína - proteína con posterior optimización de geometría. Inicialmente se evaluó la formación de dímeros a partir de la holo-proteína $\beta 2m_{3CIQ}(H13F)-Cu^{2+}$, monómero extraído del hexámero 3CIQ.pdb resuelto por difracción de rayos X (25). Luego se evaluó la formación de dímeros a partir de la holo-proteína $\beta 2m_{1DUZ}-Cu^{2+}$, $\beta 2m$ salvaje extraída del complejo HLA resuelta por difracción de rayos X con adición del Cu^{2+} en su estructura. La comparación de los resultados obtenidos promovieron la determinación de descriptores biofísicos indispensables para el correcto acoplamiento en el proceso de formación de dímeros de la $\beta 2m(s)-Cu^{2+}$.

En los estudios de *docking* proteína - proteína se valoraron las diez conformaciones de mayor puntuación debido a que son los dímeros que tienen mayor probabilidad de formarse (75, 76). Además, los autores del programa de *docking* proteína - proteína certifican que uno de estos diez dímeros representa el dímero real.

4.1. Efecto del Cu^{2+} sobre el acoplamiento proteína-proteína

La primera etapa para el desarrollo de nuestro modelo fue corroborar que las estructuras de los dímeros obtenidos con la metodología seleccionada de *docking* proteína - proteína concuerdan con los datos experimentales. Para lograr este propósito, se par-

4. Formación de dímeros

tió de dos unidades de holo-proteína $\beta 2m_{3CIQ}(H13F)-Cu^{2+}$ y se evaluó su acoplamiento utilizando *docking* molecular. Los dímeros obtenidos se compararon con las estructuras originales determinadas por difracción de rayos X (25).

Primero se valoró la parametrización del campo de fuerza asociada a la carga del cobre en la dimerización de la holo-proteína $\beta 2m_{3CIQ}(H13F)-Cu^{2+}$. Para esto se realizaron múltiples simulaciones de *docking* holo-proteína - holo-proteína con diferente carga atómica parcial del cobre, i.e. +2, +1, 0, y múltiples simulaciones de *docking* apo-proteína - apo-proteína.

Los resultados obtenidos a partir de la holo-proteína $\beta 2m_{3CIQ}(H13F)-Cu^{2+}$ muestran la formación de dímeros con variadas configuraciones. Ver Anexo. Las diferentes configuraciones con características estructurales semejantes se agruparon por modelos, los modelos más representativos se muestran en la figura 4.1.

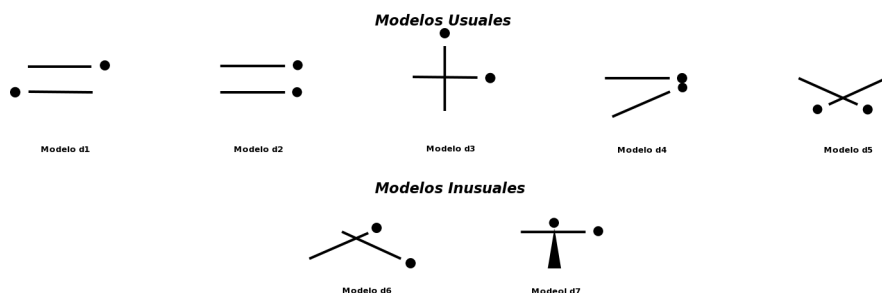


Figura 4.1: Modelos de las diferentes conformaciones de dímeros obtenidos por *docking* proteína-proteína. - Modelos representativos de las diferentes configuraciones obtenidas utilizando estudios de *docking* proteína-proteína de la $\beta 2m$. El punto indica la posición del Cu^{2+} en la holo-proteína o la posición del residuo N-terminal en la apo-proteína $\beta 2m$.

En el Anexo se muestra la presencia de dímeros antiparalelos acoplados a través de las láminas ABED de las holo-proteínas $\beta 2m_{3CIQ}(H13F)-Cu^{2+}$. Además se muestra que este tipo de dímeros, designados como modelos d1, presenta el 50 % de las configuraciones con mayor puntuación de *docking*. En la figura 4.2 se evidencia la similitud configuracional del dímero antiparalelo resuelto por difracción de rayos X (25) y del dímero de mayor puntuación de los resultados de *docking* proteína - proteína. Esta similitud

4.1 Efecto del Cu^{2+} sobre el acoplamiento proteína-proteína

evidencia la adecuada selección del método de estudio en la formación de dímeros a partir de la holo-proteína.

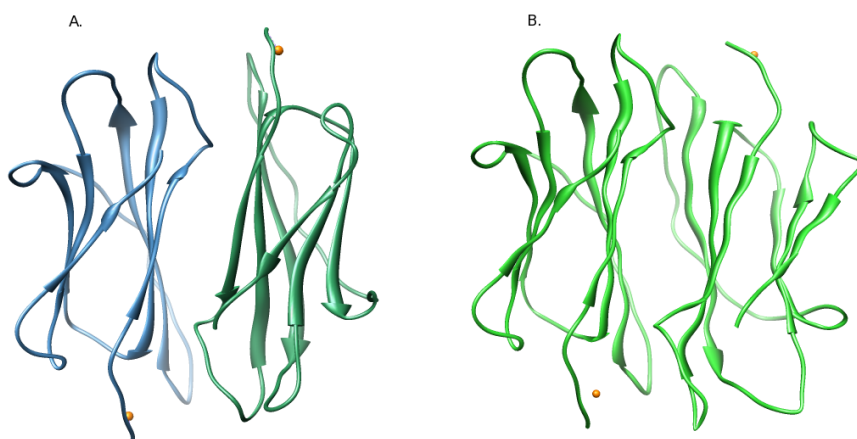


Figura 4.2: Dímeros de $\beta 2m_{3CIQ}(H13F)-Cu^{2+}$. - Configuraciones de dímeros resultado de la asociación entre dos unidades de holo-proteína. **A.** Dímero determinado por difracción de rayos X (3CIQ.pdb) (25) y **B.** Dímero determinado por *docking* holo-proteína - holo-proteína.

También en el Anexo se muestra una diferencia en la distribución de conformaciones generadas en función de la carga y presencia del cobre. Las simulaciones con carga parcial del cobre, +2 o +1, presenta el 50 % de conformaciones antiparalelas, conformaciones reportadas en la literatura (7, 10, 25). Mientras que en ausencia del cobre o sin carga parcial las configuraciones antiparalelas representan el 30 %. El porcentaje de conformaciones restantes están asociadas a los modelos d2, d3, d4 y d5 de la figura 4.1. Estos resultados permiten corroborar la correcta parametrización del método en la aglomeración de unidades de $\beta 2m-Cu^{2+}$, por esta razón las posteriores simulaciones de *docking* holo-proteína - holo-proteína se realizaron con una carga parcial de +2 para el ion metálico.

4. Formación de dímeros

4.2. Efecto de la mutación H13F sobre el acoplamiento proteína-proteína

Establecida la influencia del cobre en la dimerización de la holo-proteína $\beta 2m_{3CIQ}(H13F)-Cu^{2+}$ se evaluó la influencia de la mutación H13F sobre el acoplamiento de la misma. Se realizó un análisis detallado del dímero $\beta 2m_{3CIQ}(H13F)-Cu^{2+}-\beta 2m_{3CIQ}(H13F)-Cu^{2+}$, resuelto por difracción de rayos X (25), en la cercanía de la posición 13. En la figura 4.3 se muestra que el anillo fenilo de la Phe13 de la cadena B posiblemente está estabilizando el dímero mediante interacción $\pi-\pi$ en forma de T (77) con el anillo aromático de la Tyr63 de la cadena C.

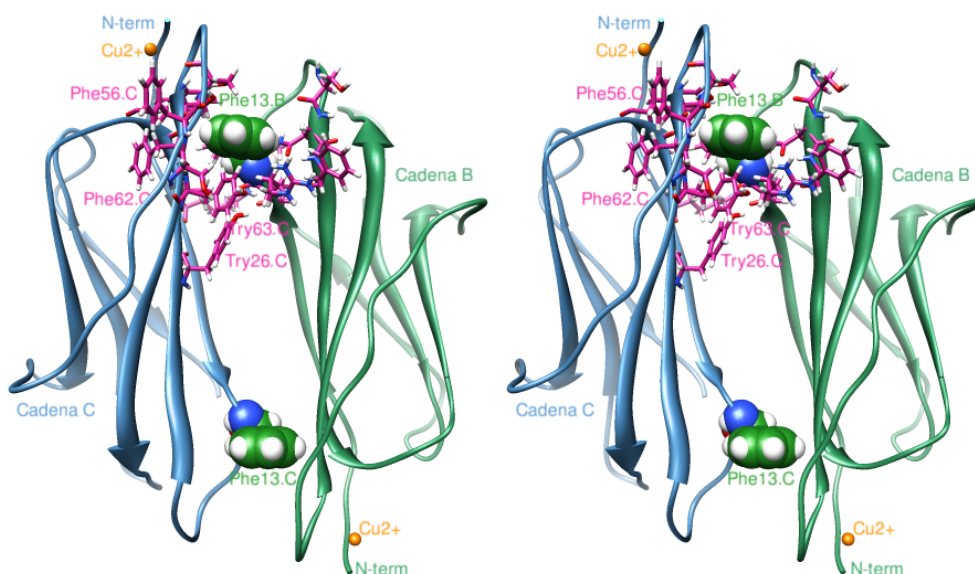


Figura 4.3: Posición de la mutación H13F en el dímero $\beta 2m_{3CIQ}(H13F)-Cu^{2+}$. - Vista estéreo del dímero resuelto por difracción de rayos X (25). En esferas verdes la Phe13 y en barras púrpura aminoácidos a una distancia máxima de 0,5 nm del residuo 13.

La His13 también podría generar la misma interacción con la Tyr63, como consecuencia de la aromaticidad del anillo imidazol. Sin embargo, la interacción $\pi-\pi$ en forma de T se ve perjudicada por la carga positiva que mantiene el anillo imidazol (78) como se muestra en la figura 4.4. Estos cambios en el potencial electrostático de la superficie de la holo-proteína fundamentan la evaluación del efecto de la mutación de la posición

4.2 Efecto de la mutación H13F sobre el acoplamiento proteína-proteína

13 en la formación de dímeros.

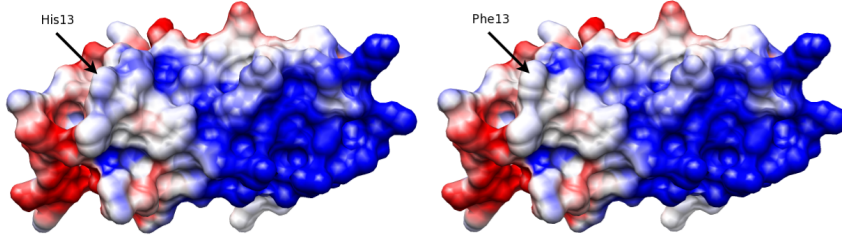


Figura 4.4: Potencial electrostático superficial de la $\beta 2m_3CIQ(H13F)-Cu^{2+}$. - Superficie electrostática con un potencial entre $-2,5$ y $2,5 k_bT/e_c$. Izquierda: holo-proteína $\beta 2m_3CIQ(H13)-Cu^{2+}$, potencial electrostático del anillo imidazol en la His13 entre $0,3$ y $1,1 k_bT/e_c$. Derecha: holo-proteína $\beta 2m_3CIQ(H13F)-Cu^{2+}$, potencial electrostático del anillo fenilo en la Phe13 entre $0,1$ y $0,5 k_bT/e_c$.

Con el objeto de evaluar los efectos de la mutación H13F en el proceso de acoplamiento del dímero, se realizaron múltiples simulaciones de *docking* proteína - proteína con la holo-proteína $\beta 2m_3CIQ(H13F)-Cu^{2+}$ intercambiando la Phe por His en la posición 13.

La figura 4.5 muestra los resultados del efecto del intercambio Phe-His en la posición 13 de la holo-proteína $\beta 2m_3CIQ(H13F)-Cu^{2+}$. En esta figura se observa un cambio en la distribución de la población de los modelos representativos de dímeros a comparación de la distribución obtenida con la holo-proteína $\beta 2m_3CIQ(H13F)-Cu^{2+}$. El intercambio Phe-His en la holo-proteína $\beta 2m_3CIQ(H13F)-Cu^{2+}$, i.e. $\beta 2m_3CIQ(H13)-Cu^{2+}$, inclusive en la apo-proteína ocasiona una disminución representativa de la presencia del modelo d1 en las estructuras obtenidas por *docking* y del valor de puntuación respectivo. Este resultado muestra la importancia de la Phe13 como amino ácido promotor del dímero antiparalelo reportado en la literatura (25) cuya estructura se muestra en la figura 4.2. Por otra parte, es importante resaltar que la presencia de la His13 en la proteína promueve el aumento de la presencia de conformaciones paralelas, cruzadas y oblicuas, i.e. modelos d2, d3, d4 y d6.

4. Formación de dímeros

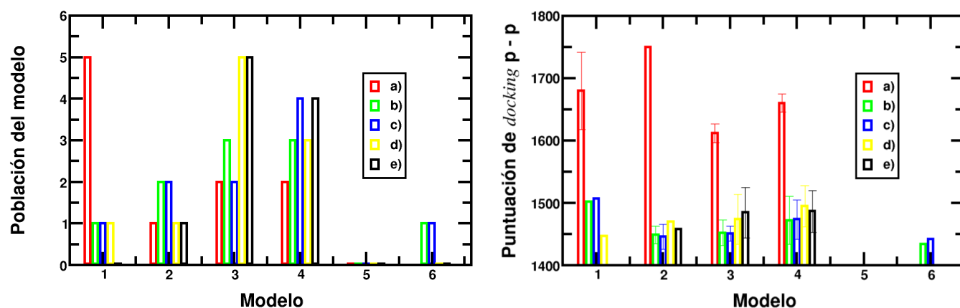


Figura 4.5: Distribución de los modelos de dímeros a partir de la holo-proteína $\beta 2m_3CIQ(H13F)-Cu^{2+}$. - Izquierda: Distribución de los dímeros generados por *docking* proteína-proteína en los modelos de la figura 4.1. a) $\beta 2m_3CIQ(H13F)-Cu^{2+}(25)$; b) $\beta 2m_3CIQ(H13)-Cu^{2+}$; c) $\beta 2m_3CIQ(H13)-Cu^{2+}$, sin cargas atómicas parciales en el grupo imidazol de la His13 durante el proceso de *docking*; d) $\beta 2m_3CIQ(H13^+)-Cu^{2+}$; e) $\beta 2m_3CIQ(H13^+)$ sin Cu^{2+} . Derecha: Promedios de la puntuación del *docking* proteína-proteína. Barras de error representan la desviación estándar.

El registro de un dímero antiparalelo en el acoplamiento teórico de dos monómeros de $\beta 2m_3CIQ(H13)-Cu^{2+}$, como se muestra en el diagrama de barras de la figura 4.5, revela la probabilidad de su formación. En la figura 4.6 A. se muestra la conformación antiparalela obtenida por simulación de *docking* $\beta 2m_3CIQ(H13)-Cu^{2+}$ - $\beta 2m_3CIQ(H13)-Cu^{2+}$. En esta figura se observa el corrimiento de la configuración antiparalela a comparación del dímero obtenido por acoplamiento de la $\beta 2m_3CIQ(H13F)-Cu^{2+}$, mostrado en la figura 4.2. Esta consecuencia es causada exclusivamente por el intercambio de la Phe-His en la posición trece (13) de la holo-proteína. En las figuras 4.6 B. y C. se muestran las interacciones anfipáticas que promueven el acoplamiento antiparalelo del dímero. Las asociaciones entre tirosinas de las hojas ABE de los dos monómeros e interacciones electrostáticas entre grupos cargados son características que se preservan en los dímeros $\beta 2m_3CIQ(H13)-Cu^{2+}$ y $\beta 2m_3CIQ(H13)-Cu^{2+}$. Además en la figura 4.6 C. se observa que la His13 no se encuentra en la interfase del dímero formado, a comparación del dímero en la figura 4.3. Sin embargo, la His13 presenta interacciones de van der Waals con la Met0 de la cadena homóloga promoviendo la asociación entre proteínas. Estos resultados son las primeras evidencias relevantes de la variación H13F de la $\beta 2m_3CIQ-Cu^{2+}$ en el proceso de agregación de monómeros.

4.2 Efecto de la mutación H13F sobre el acoplamiento proteína-proteína

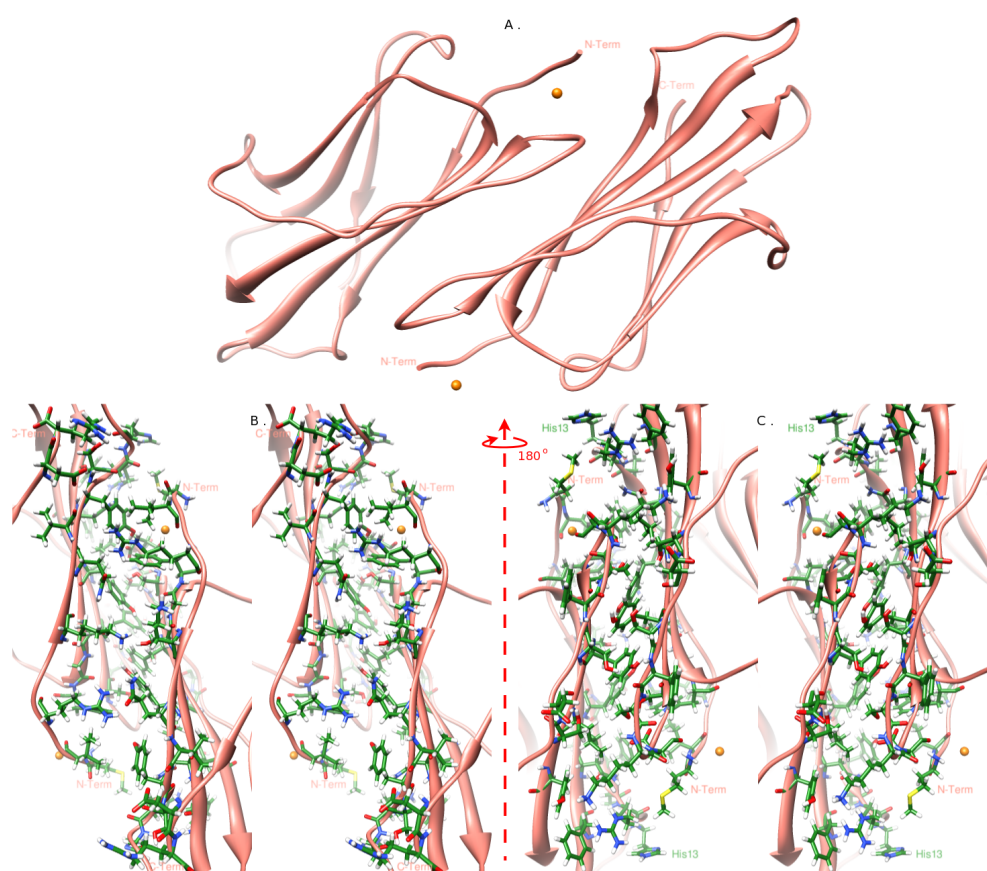


Figura 4.6: Dímero antiparalelo $\beta 2m_3CIQ(H13)-Cu^{2+}$. - A. Estructura cuaternaria del dímero antiparalelo obtenido por *docking* $\beta 2m_3CIQ(H13)-Cu^{2+}$ - $\beta 2m_3CIQ(H13)-Cu^{2+}$; B. Vista estéreo de la interface del dímero donde las hojas A se observan en el frente; C. Vista estéreo de la interface del dímero donde las hojas D se observan en el frente.

4. Formación de dímeros

Una característica importante del dímero $\beta 2m_3CIQ(H13)-Cu^{2+}-\beta 2m_3CIQ(H13)-Cu^{2+}$ es que su estructura concuerda con los resultados de MS reportados por Vachet *et al.* (10). En la figura 4.7 se señalan los amino ácidos que presentan cambio en la reactividad del DEPC, NHSA y BD como consecuencia de la formación del dímero. Estos amino ácidos son la Arg3, Arg12, Tyr26, Ser28, Ser57, Lys58, Tyr63, Tyr76 y Arg97. La mayoría de los amino ácidos señalados se encuentran en la interfase del dímero obtenido por *docking* holo-proteína - holo-proteína. Además de la similaridad estructural de los dímeros comparados, i.e. $\beta 2m_3CIQ(H13F)-Cu^{2+}(25)$ y $\beta 2m_3CIQ(H13)-Cu^{2+}$, ésta particularidad brinda relevancia al dímero obtenido computacionalmente.

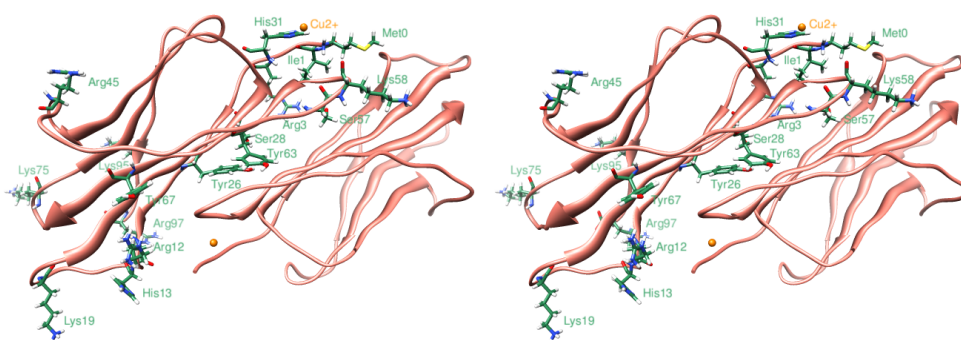


Figura 4.7: Dímero antiparalelo $\beta 2m_3CIQ(H13)-Cu^{2+}$. Amino ácidos evaluados experimentalmente. - Vista estéreo del dímero antiparalelo determinado por *docking*. En barras verdes amino ácidos que cambian su reactividad ante compuestos orgánicos en el proceso de formación del dímero.

En el proceso computacional del acoplamiento entre dos unidades de $\beta 2m_3CIQ(H13F)-Cu^{2+}$ ninguno de los átomos perteneciente al grupo fenilo de la Phe13 presenta carga parcial, mientras que en las unidades de $\beta 2m_3CIQ(H13)-Cu^{2+}$ se presentan cargas parciales en el grupo imidazol. Con el fin de descartar la variación de las cargas parciales de la posición 13 como causas de la forma de acoplamiento entre monómeros se realizó *docking* holo-proteína - holo-proteína con dos unidades de $\beta 2m_3CIQ(H13)-Cu^{2+}$ sin carga parcial en ninguno de los átomos del anillo imidazol de la posición 13. Los resultados obtenidos muestran la limitada dependencia de la distribución de las configuraciones diméricas en función de la carga parcial de los átomos en el anillo imidazol de la His13, por el contrario muestra una alta dependencia de la energía de desolvatación de este

4.2 Efecto de la mutación H13F sobre el acoplamiento proteína-proteína

grupo funcional (75, 76).

La interacción de Coulomb entre la His13 y la Arg12 de la proteína produce un valor de $pK_{a_{His13}}$ de 6,08, 0,42 unidades por debajo del valor estándar para la histidina. Este valor de pK_a indica que en solución acuosa a pH 7,0 el 89 % de las His13 están en su forma neutra, mientras que el 11 % están en su forma protonada. Por esta razón, decidimos evaluar la influencia de la His13 protonada ($His13^+$) en la forma del acoplamiento proteína - proteína, mediante simulaciones de *docking* molecular de la holo-proteína $\beta 2m_{3CIQ}(H13^+)-Cu^{2+}$. Los resultados mostrados como barras amarilla en la figura 4.5 indican que la protonación de la His13 promueve la formación de dímeros antiparalelos, paralelos, cruzados y oblicuos, i.e. modelos d1, d2, d3 y d4, de la misma manera como ocurre en la $\beta 2m_{3CIQ}(H13)-Cu^{2+}$. Además la estructura antiparalela obtenida es similar a la mostrada en la figura 4.6 A. Este resultado sugiere la formación de dímeros antiparalelos con propiedades amiloidogénicas a partir de la holo-proteína $\beta 2m_{3CIQ}(H13)-Cu^{2+}$, aún cuando la His13 está en su forma protonada.

Por otra parte, se realizaron simulaciones de *docking* proteína - proteína de la apo-proteína $\beta 2m_{3CIQ}(His13^+)$ con el objeto de evaluar la formación de dímeros de esta conformación en ausencia del Cu^{2+} . Los resultados mostrados en la figura 4.5 en barras negras indican que la configuración de los dímeros se conserva a comparación de la formación de dímeros a partir de la holo-proteína $\beta 2m_{3CIQ}(H13)-Cu^{2+}$. Esto muestra la importancia de la conformación de la proteína en el acoplamiento antiparalelo proteína - proteína.

En conclusión, cuando se realiza la sustitución Phe-His en la posición 13 de la $\beta 2m$ cambian las conformaciones de los dímeros obtenidos por *docking* proteína-proteína, lo cual demuestra la importancia del grupo funcional del residuo trece de la $\beta 2m$ en el acoplamiento entre holo-proteínas para la formación de proto-fibras.

Los datos mostrados en la figura 4.5 sugieren la necesidad de estudiar los cambios de las interacciones moleculares como consecuencia del intercambio de Phe-His en el dímero $\beta 2m_{3CIQ}(H13F)-Cu^{2+}$ - $\beta 2m_{3CIQ}(H13F)-Cu^{2+}$, reportado en la literatura (25). Las interacciones moleculares son impulsadas por interacciones electrostáticas, debido

4. Formación de dímeros

a esto se evaluó la variación de los tres principales momentos multipolares de la expansión del campo electrostático por el intercambio Phe13-His del dímero mostrado en la figura 4.3, utilizando mecánica cuántica.

Los resultados obtenidos son mostrados en la figura 4.8 como diferencias euclidianas de la carga, dipolo, cuadrupolo y momento multipolar total de cada amino ácido, a un radio de 0,7 nm de la Phe13. La figura muestra que el anillo imidazol de la histidina presenta una carga, dipolo y cuadrupolo diferente al generado por el anillo fenilo de la Phe13. En esta posición el cambio total en la carga no es muy pronunciado debido a que el intercambio del anillo fenilo por el imidazol no altera la carga total del sistema. Sin embargo, la carga positiva que se localiza en el anillo imidazol ocasiona un cambio significativo en el mapa electrostatico de la proteína. El dipolo presenta la mayor diferencia ya que el anillo imidazol presenta un elevado momento dipolar (3.6 D), mientras que el anillo fenilo presenta un momento dipolar nulo. Por otra parte, el momento cuadrupolar presenta menor diferencia por la diversa naturaleza de los grupos funcionales intercambiados (imidazol - fenilo). Debido a estos cambios en los momentos multipolares se genera un cambio apreciable en el momento multipolar total del residuo 13; donde el dipolo aporta la mayor variación. Este cambio del grupo funcional ocasiona una reorganización del potencial electrostático en la vecindad, promoviendo cambios en los momentos multipolares de los aminoácidos cercanos a la posición 13.

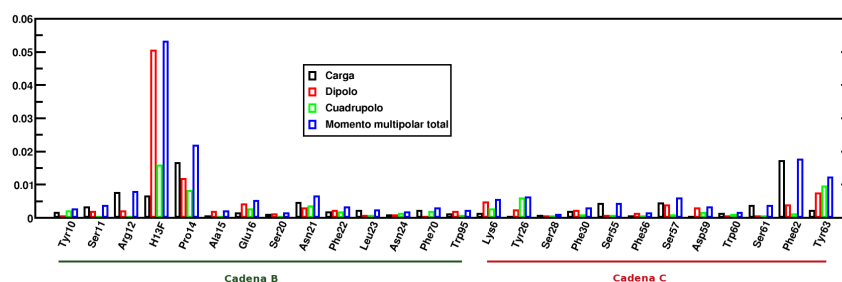


Figura 4.8: Variación del campo electrostáticos por efecto de la variación Phe13His en el dímero $\beta 2m_{3CIQ}(H13F)-Cu^{2+}$. - Diferencias Euclidianas de la carga, dipolo, cuadrupolo y momento cuadrupolar total de los amino ácidos a un radio de 0,7 nm de la Phe13.

4.2 Efecto de la mutación H13F sobre el acoplamiento proteína-proteína

La reorganización del potencial electrostático se ve reflejada principalmente en el cambio de los momentos multipolares de i) la Pro14, ii) Arg12 (cadena B), iii) Phe62 y iv) Tyr63 (cadena C); amino ácidos que rodean el grupo funcional de la Phe13 en la cadena B del dímero mostrado en la figura 4.3.

En la figura 4.8 se observan las variaciones de la carga, el dipolo y el cuadrupolo de la Pro14 donde la carga es la propiedad electrostática más afectada. Además, las variaciones en el dipolo y cuadrupolo sugieren que el intercambio Phe-His ocasiona una reorganización electrónica que conduce a un cambio en las cargas atómicas parciales. Un análisis estructural detallado evidencia que esta variación es debida a la presencia cercana del nitrógeno *delta* (N_δ) del anillo imidazol como agente atractor de electrones. Este mismo efecto ocasiona un cambio en la carga parcial del anillo aromático de la Phe62.

Por otra parte, se ve reflejada la presencia del nitrógeno *epsilon* (N_ϵ) de la His13 en el cambio de la carga parcial del grupo funcional de la Arg12. Éste grupo funcional se encuentra en dirección al hidrógeno *epsilon* del anillo imidazol. La presencia del hidrógeno *epsilon* mitiga el efecto electro-atrayente del nitrógeno *epsilon*, por esta razón la variación de la carga parcial del grupo funcional de la Arg12 no se ve mayormente afectada.

Por último, el intercambio del grupo funcional presenta una variación en el potencial electrostático del anillo aromático de la Tyr63. El momento cuadrupolar es el más afectado debido a la relación intrínseca con el anillo de la posición 13: interacción π - π en forma de T de los grupos funcionales. Esto evidencia la fuerte interacción entre las dos nubes electrónicas π , indispensables en la estabilidad del dímero, y como la variación del grupo funcional afecta la interacción molecular.

Estos resultados muestran que el intercambio Phe-His en el dímero resuelto por difracción de rayos X (25), ocasiona un cambio en las interacciones moleculares que estabilizan el dímero. Además, muestran la importancia de las interacciones π - π en forma de T como factores determinantes en la estabilidad del dímero.

4. Formación de dímeros

En conclusión, el acoplamiento de dos unidades de la holo-proteína $\beta 2m_3CIQ(H13)-Cu^{2+}$ genera dímeros antiparalelos desplazados, como se muestra en la figura 4.6, a comparación de los dímeros antiparalelos generados por la holo-proteína $\beta 2m_3CIQ(H13F)-Cu^{2+}$. El hecho que se formen dímeros cuasi antiparalelos diferentes a los de la $\beta 2m_3CIQ(H13F)-Cu^{2+}$ sugiere que muy probablemente estas pequeñas diferencias son las responsables de la formación de fibras amiloides y no hexámeros exclusivamente. Además, la concordancia estructural de los datos reportados en la literatura (10) con la geometría del dímero antiparalelo desplazado destaca la validez de las configuraciones obtenidas por *docking* holo-proteína - holo-proteína. Por otra parte, la variación F13H en el dímero de dos unidades de $\beta 2m_3CIQ(H13F)-Cu^{2+}$ produce cambio en el potencial electrostático interfacial. Este resultado muestra una explicación de la disminución del acoplamiento antiparalelo reportado por Miranker *et al.* (25) en los resultados de *docking* holo-proteína - holo-proteína salvaje.

4.3. Dimerización de la β -2-microglobulina salvaje en presencia del Cu^{2+}

Como se observan en los resultados de la sección anterior y datos comparativos de *docking* molecular, un mínimo cambio configuracional en los grupos funcionales de la holo-proteína $\beta 2m_3CIQ(H13F)-Cu^{2+}$ promueve un decaimiento del empalme entre proteínas para formar el dímero antiparalelo, precursor de fibras amiloides. Por esto es indispensable determinar las posibles conformaciones diméricas de la $\beta 2m$ salvaje cuando el Cu^{2+} se a unido a la proteína. i.e. la holo-proteína salvaje.

Con el objeto de determinar las posibles conformaciones diméricas de la holo-proteína $\beta 2m$ salvaje y la influencia del cambio conformacional promovido por la unión del Cu^{2+} en la proteína, se realizaron multiples estudios de *docking* molecular.

Al evaluar el *docking* holo-proteína - holo-proteína de la $\beta 2m_3CIQ(H13)_m$, en presencia y ausencia del Cu^{2+} , en la figura 4.9 se observó el favorecimiento de la formación de los modelos d6, d3, d1 y d5 en orden decreciente. Aunque la puntuación del *docking* es bajo, comparado con las simulaciones anteriormente reportadas en la sección 4.1,

4.3 Dimerización de la β -2-microglobulina salvaje en presencia del Cu^{2+}

presenta uniformidad del valor para todos los modelos. Es interesante notar que la distribución de las conformaciones presenta dos conformaciones antiparalelas del modelo d1; esto indica la posibilidad de la formación de dímeros precursores de fibras amiloides a partir de la holo-proteína $\beta 2m_{3CIQ}(H13)_m-Cu^{2+}$ como indica la literatura (10, 23, 25).

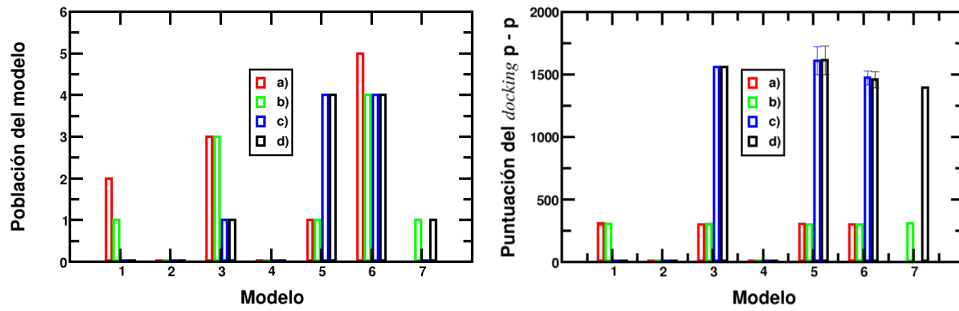


Figura 4.9: Distribución de los modelos de dímeros a partir de la holo-proteína $\beta 2m_{1DUZ}-Cu^{2+}$. - Izquierda: Distribución de los dímeros generados por *docking* proteína-proteína en los modelos de la figura 4.1. a) holo-proteína $\beta 2m_{3CIQ}(H13)_m-Cu^{2+}$, estructura final de la sección 3.2; b) apo-proteína $\beta 2m_{3CIQ}(H13)_m$, estructura final de la sección 3.2 sin Cu^{2+} ; c) holo-proteína(sn) $\beta 2m_{1DUZ}-Cu^{2+}$, $\beta 2m$ (sn) extraída del complejo HLA (1DUZ.pdb) (13) con unión del Cu^{2+} en la región N-terminal de la proteína; d) apo-proteína $\beta 2m_{1DUZ}$. Derecha: Promedios de la puntuación del *docking* proteína-proteína. Barras de error representan la desviación estándar.

Por el contrario, en la figura 4.9 se muestra que el *docking* molecular con la $\beta 2m$ (sn), en ausencia o presencia del Cu^{2+} , no generó un acople antiparalelo. El acoplamiento obtenido se asocia principalmente con los modelos oblicuos, i.e. 5 y 6, con una elevada puntuación de *docking* a comparación de los modelos obtenidos con la $\beta 2m_{3CIQ}(H13)_m$. Este resultado refleja que las diferencias conformacionales entre la $\beta 2m$ (sn) y la $\beta 2m_{3CIQ}(H13)_m$, i.e. el desplazamiento del bucle DE y el reordenamiento del fragmento C-terminal en forma de gancho como se muestran en la figura 3.1, son esenciales como iniciadores en la formación dímeros antiparalelos. De esta manera, nuestros resultados muestran la importancia de la conformación aplegada del bucle DE y la conformación recta del fragmento C-terminal, en la asociación de dos unidades de la holo-proteína $\beta 2m(s)-Cu^{2+}$, para generar el dímero con capacidades amiloidogénicas (23, 25).

4. Formación de dímeros

En conclusión, nuestros resultados de *docking* proteína-proteína brindan una primera aproximación a nivel atómico de la asociación de unidades de $\beta 2m$ hacia la formación de dímeros con propiedades amiloidogénicas. Los resultados muestran la importancia de la conformación de la proteína, promovida por la coordinación del Cu^{2+} en la región N-terminal. Primero, muestra la importancia de la His13 en la formación de dímeros antiparalelos con posibles propiedades amiloidogénicas, diferentes a los mostrados con la Phe13 que se agregan para formar hexámeros pero no fibras amiloides. Segundo, muestra la importancia de la conformación aplegada del bucle DE para el correcto empalme de las láminas ABED de los monómeros. Por último, muestra la importancia de la movilidad de los residuos C-terminales como fragmentos que se acondicionan al acoplamiento de dos monómeros de $\beta 2m$.

Capítulo 5

Formación de tetrámeros

En la figura 1.5 se muestra como en el proceso de nucleación después de la formación de dímeros ocurre una etapa de agregación de los mismos para formar tetrámeros (24). Con el objeto de valorar las posibles geometrías de los tetrámeros, i.e. la forma y los amino ácidos involucrados en la superficie interfacial de los dímeros, su estabilidad y las fuerzas que los mantienen unidos, se realizaron múltiples simulaciones de *docking* dímero - dímero.

Las conformaciones de los tetrámeros formados se agruparon por modelos, como previamente se realizó para los dímeros en la sección 4.1. Los seis modelos definidos mostrados en la figura 5.1, identifican posibles estructuras tetraméricas a partir de la $\beta 2m$.

Las configuraciones de todos los tetrámeros formados muestran la importancia de la arista AG de los dímeros, conformada por las hojas A y G de los monómeros; debido a que repetitivamente se presentó como superficie interfacial entre dímeros. Por ejemplo, en la figura 5.1 se muestra que el área interfacial del modelo t1 y t4 son las hojas AG de los cuatro monómeros. En los modelos t2 y t6 el dímero azul oscuro interacciona por sus hojas AG y el dímero azul claro interacciona por la lámina CFG. En el modelo t3 el dímero azul claro interacciones por medio de los bucles AB y EF de un monómero y DE del otro monómero. Ver Anexo. En el modelo t5 el dímero azul claro interacciona por medio del bucle CD de uno de los monómeros.

5. Formación de tetrámeros

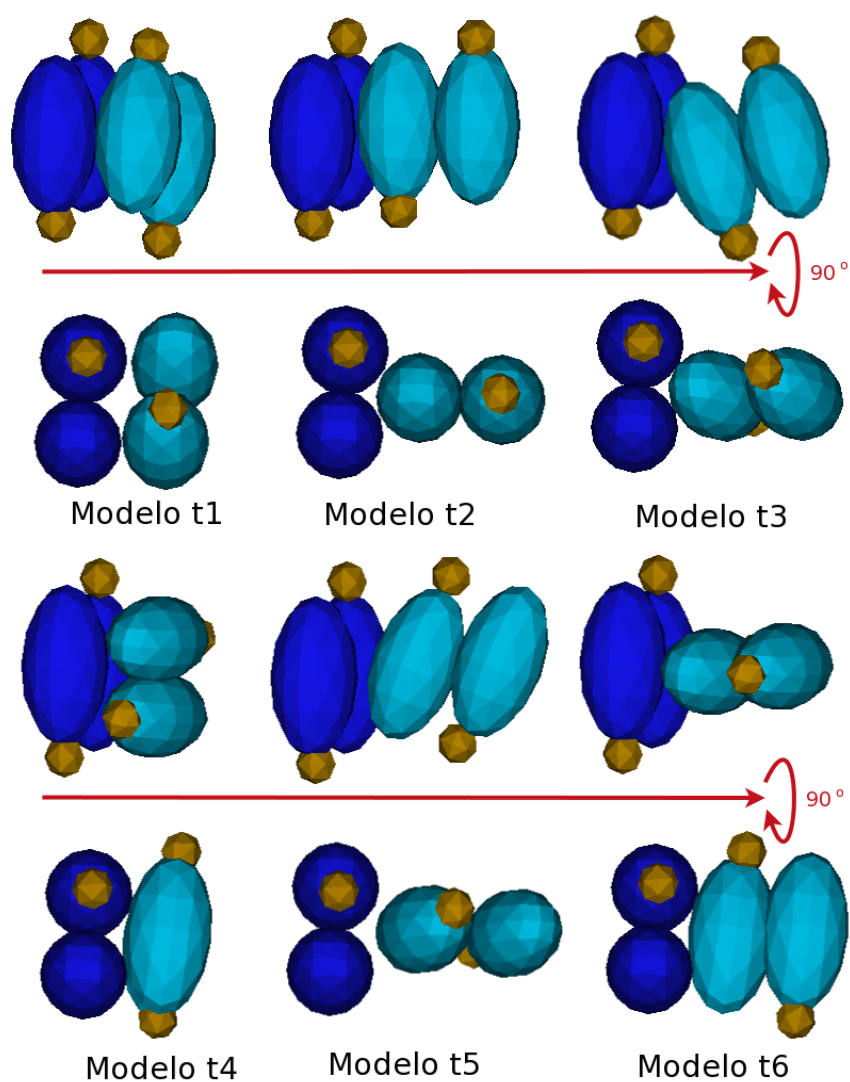


Figura 5.1: Modelos de tetrámeros representativos de los estudios de *docking* dímero - dímero. - Dímero que interacciona por las hojas AG en azul oscuro. Dímero en azul claro interacciona por diferentes regiones. Representación de los átomos de Cu^{2+} en esferas naranja.

Este resultado concuerda con los datos de la superficie electrostática de la $\beta 2m$, reportados en la sección 2.1; donde la arista AG presenta el valor más negativo del potencial electrostático de la superficie.

En un estudio conjunto con el grupo de investigación del profesor Richard W. Vachet se evaluaron los amino ácidos interfaciales de la formación de tetrámeros, a partir de dímeros de $\beta 2m$ salvaje, mediante marcado selectivo por unión covalente de moléculas orgánicas, con posterior fragmentación y análisis de MS. Los análisis de MS muestran la disminución en la reactividad de las especies orgánicas sobre las hojas D y G, en la formación del tetrámero, evidencian que la interface del tetrámero esta formada por la interacción de las hojas D de un dímero con las hoja G del otro dímero. Por esta razón, se desarrolló otro modelo de tetrámero, donde la las hojas D de un dímero interaccionan con las hojas G del homólogo Ver figura 5.2.

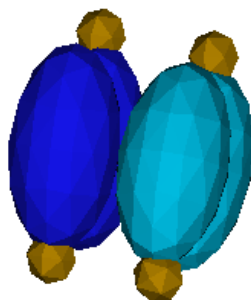


Figura 5.2: Modelo de tetrámero paralelo. - Modelo que se ajusta a las evidencias experimentales de MS. Las hojas D de un dímero interaccionan con las hojas G de su homólogo. Representación de los átomos de Cu^{2+} en esferas naranjas.

Estos resultados de marcado covalente unido a simulaciones de *docking* molecular permitieron la construcción de un modelo de tetrámero, indicando como la proteína se podría acoplar para la formación de oligómeros de orden superior (11).

Capítulo 6

Metodología

6.1. Coordinación del Cu^{2+} en la superficie de la $\beta 2m$

Con el objeto de desarrollar un modelo teórico que describa los sitios de adsorción y coordinación del Cu^{2+} sobre la superficie de $\beta 2m$ se desarrollaron múltiples simulaciones de mecánica molecular. Primero se determinó la conformación representativa de la $\beta 2m$ en solución acuosa. Seguidamente con el objeto de establecer criterios de reactividad de la superficie de la proteína se determinó el potencial electrostático de los modelos representativos de $\beta 2m$. Por último, se desarrolló *docking* Cu^{2+} -proteína con el fin de valorar lugares de adsorción del ion metálico en la superficie de la $\beta 2m$.

Determinación de la estructura de partida

Con el fin de seleccionar una conformación representativa de la $\beta 2m$ (sn) en solución acuosa, i.e. libre del complejo HLA-A, se realizaron múltiples simulaciones de dinámica molecular con la proteína mediante el uso del programa GROMACS (79, 80, 81).

Se partió de la $\beta 2m$ (sn), β -2-microglobulina salvaje de conformación nativa (PDB ID:1DUZ) (13). Estructura 3D de la $\beta 2m$ resuelta por difracción de rayos X como parte estructural del HLA-A. Se eliminó el residuo Met0 mediante el uso del visualizador PY-MOL (82); ya que la estructura corresponde a la proteína recombinante sobre-expresada en *Escherichia coli* (*E.coli.*), carente de metionina aminopeptidasa, y posterior purificación.

6. Metodología

Previa simulación de dinámica molecular se optimizó la geometría de la proteína mediante minimización de la energía de la siguiente forma: Se determinó el pKa de los amino ácidos protonables mediante el modelo de perturbaciones ambientales utilizando el programa PROPKA versión 3.1 (62, 63, 64, 65) con el fin de definir los residuos cargados a pH 7,0. Con base en los valores de pKa se adicionaron la totalidad de los hidrógenos asumiendo que el sistema se encuentra a pH 7,0. De esta manera, las lisinas, argininas y el grupo amino terminal cargados positivamente; los ácidos aspárticos, glutámicos y carboxilo terminal cargados negativamente; y las histidinas se consideraron neutras, como lo muestran los estudios de resonancia magnética nuclear (RMN) realizados por Esposito *et al.* 2002 (56). La $\beta 2m(sn)$ se introdujo en una caja cúbica de arista de 7,2 nm, considerando que la distancia mínima entre cualquier átomo de la proteína y el borde de la caja es de 1,2 nm. Se usó el modelo de agua tipo tip3p (83) para representar la solvatación explícita de la proteína. Se utilizaron condiciones periódicas de contorno – PBC de su siglas en inglés *periodic boundary conditions* – para evitar fenómenos de frontera. Se evaluaron las interacciones electrostáticas (Quinto término de la ecuación 6.1) por el método *particle mesh Ewald* – PME de sus siglas en inglés Particle Mesh Ewald– y el potencia de van der Waals (Cuarto término ecuación 6.1) mediante interacciones de tipo Lennard-Jones. Se utilizó el método *steeped descent* con el campo de fuerza AMBER94 (84) para realizar la optimización de la geometría.

$$\begin{aligned}
 E_{Total} = & \sum_{enlace} K_r(r - r_{eq})^2 + \sum_{angular} K_\theta(\theta - \theta_{eq}) + \sum_{torcional} \frac{V_r}{2}[1 + \cos(n\phi - \gamma)] \\
 & + \sum_{i < j} \left[\frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^6} \right] + \sum_{i < j} \left[\frac{q_i q_j}{\epsilon R_{ij}} \right]
 \end{aligned} \tag{6.1}$$

La dinámica molecular se realizó por triplicado a 310 K, presión constante de 1 atmósfera y PBC. Se seleccionó la conformación representativa de cada simulación de dinámica molecular como la conformación de mayor población en el análisis por agrupamientos. El análisis por agrupamiento se realizó comparando cada una de las estructuras de la dinámica con las otras estructuras y agrupando estructuras con un RMSD

6.1 Coordinación del Cu^{2+} en la superficie de la $\beta 2m$

del esqueleto menor a 0,05 nm. Se compararon las conformaciones más representativas de cada simulación con el objeto de determinar cambios estructurales en la proteína.

Para los estudios del lugar de adsorción del Cu^{2+} en la superficie de la proteína se utilizaron cuatro modelos representativos de la $\beta 2m$ (sn): i) la estructura original como modelo $\beta 2m_{1DUZ}$, i.e. β (sn), extraída del HLA-A (13), y ii) los modelos de $\beta 2m$ Apo_A, Apo_B, Apo_C como conformaciones representativas de cada simulación de dinámica molecular.

Determinación del pK_a de las histidinas superficiales.

El pK_a de las histidinas en las apo-proteínas, al igual que otros amino ácidos en diferentes modelos de proteína a lo largo de la metodología, se evaluó mediante el modelo de perturbaciones ambientales utilizando el programa PROPKA versión 3.1 (62, 63, 64, 65).

6.1.1. Determinación de la potencial electrostático de la superficie de la β -2-microglobulina

La caracterización de las propiedades electrostáticas de la superficie de las biomoléculas es fundamental para el entendimiento de la relación estructura - función. Debido a que las interacciones Cu^{2+} - proteína son impulsadas por interacciones electrostáticas, se evaluó la superficie electrostática de las conformaciones representativas para determinar posibles sitios de unión del Cu^{2+} . Si el lugar de unión del Cu^{2+} es principalmente guiado por interacciones de Coulomb la ubicación de zonas con valores del potencial electrostático más negativos sugieren la adsorción del metal de transición.

Con el objeto de elucidar el potencial electrostático de la superficie de los cuatro modelos de la $\beta 2m$ se resolvió la ecuación de Poisson-Boltzmann (APBS) (85) con los parámetros del campo de fuerza AMBER94 (84). El solvente se representó como un continuo dieléctrico con constante dieléctrica de 78 y fuerza iónica de 0,2 mM, condiciones reportadas en la literatura para la formación de fibras amiloides (23).

6. Metodología

6.1.2. *Docking* Cu^{2+} en la superficie de la β -2-microglobulina

Con el objeto de desarrollar un modelo teórico que describa los sitios de unión del Cu^{2+} a partir de características intrínsecas del metal de transición se desarrolló un estudio de *docking* Cu^{2+} - proteína. Para este estudio, se utilizaron los cuatro modelos, i.e. $\beta 2m_{1DUZ}$, Apo_A, Apo_B y Apo_C, desarrollados en al inicio de la sección 6.1. Los archivos de entrada se generaron a partir del visualizador Auto Dock Tools (86). Los grupos carboxilo de los aspartatos, glutamatos y carboxilo terminal permanecieron con carga negativa; las lisinas, argininas y el grupo amino terminal con positivas; y las histidinas se mantuvieron neutras como se determinó en la primera parte de esta sección.

Fue necesario incluir el radio y energía de van der Waals (0,07 nm y 0,058 kJ/mol, respectivamente) y el volumen de solvatación atómica ($1,6 \times 10^3 \text{ nm}^3$) del Cu^{2+} al campo de fuerza AMBER94 (84) para describir el ion en el proceso de adsorción sobre la superficie de la proteína.

Con el fin de realizar un *docking* ciego, o *blind docking*, se evaluó toda la superficie de la proteína. Para determinar el espacio 3D de búsqueda, inserción del cobre en la $\beta 2m$, la proteína se ubicó en el centro de una caja cúbica de 4,725 nm de arista permitiendo la valoración total de la proteína.

25.000.000 inserciones del cobre en la proteína se llevaron a cabo aleatoriamente con el método de Monte Carlo (87). Las interacciones entre el cobre y la $\beta 2m$ se evaluaron con el campo de fuerza AMBER94 (Ecuación 6.1) (84). Las configuraciones se agruparon por similitud estructural con RMSD menor a 0.02 nm mediante el algoritmo genético Lamarckian (LGA) (88), luego se seleccionaron los 25 grupos de menor energía *docking* para su análisis. El proceso de inserción del Cu^{2+} sobre la superficie de la $\beta 2m$, la agrupación y la evaluación de las energías libres de cada configuración se desarrolló con programa Autodock4 (88).

Autodock calcula la energía libre de Gibbs (Ecuación ??) a partir del potencial de la configuración (Ecuación ??) con base en los parámetros del campo de fuerza. Mediante este proceso se determinaron las energías libre de docking, distancias interatómicas,

6.1 Coordinación del Cu^{+2} en la superficie de la $\beta 2m$

ángulos de tres y cuatro cuerpos de las configuraciones adquiridas.

$$\begin{aligned} \Delta G_{docking} = & (V_{enlace}^{Cu^{2+}-Cu^{2+}} - V_{no\ enlace}^{Cu^{2+}-Cu^{2+}}) + (V_{enlace}^{P-P} - V_{no\ enlace}^{P-P}) \\ & (V_{enlace}^{P-Cu^{2+}} - V_{no\ enlace}^{P-Cu} + \Delta S_{conf}) \end{aligned} \quad (6.2)$$

La energía *docking* ó energía libre de enlace es la suma de la energía intermolecular, energía total, menos la energía de no enlace (Ecuación 6.2). Donde la energía intermolecular es la suma de la energía electrostática y van der Waals (Ecuación 6.3). La energía libre de enlace muestra la espontaneidad de la unión Cu^{2+} - proteína.

$$\begin{aligned} V = & W_{vdW} \sum_{ij} \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) + W_{puenteh} \sum_{i,j} E(t) \left(\frac{C_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{r_{ij}^{10}} \right) \\ & + W_{elec} \sum_{ij} \frac{q_i q_j}{\epsilon(r_{ij}) r_{ij}} \end{aligned} \quad (6.3)$$

El *docking* Cu^{2+} - proteína se desarrolló en dos partes: i) *docking* rígido, proceso en el que las cadenas laterales de los residuos no presentan ningún tipo de movimiento, y ii) *docking* flexible, el cual se permitió movilidad de tres y cuatro cuerpos en los grupos funcionales de los amino ácidos de la proteína. Además se evaluó el efecto de tamaño del Cu^{2+} en la adsorción por esto se evaluó el ion con carga parcial de +2, +1 y en ausencia de carga parcial. El *docking* se realizó por triplicado para valorar la reproducibilidad de los datos obtenidos.

El estudio de *docking* flexible se realizó con base en los resultados del *docking* rígido y pruebas preliminares en zonas que presentaron mayor espontaneidad de la adsorción. En el *docking* flexible con el Cu^{2+} se permitió la flexibilidad de las cadenas laterales de histidinas (13, 31, 51 y 84) y aspartatos (34, 38, 53, 59, 76, 96 y 98), amino ácidos en su mayoría superficiales. El *docking* flexible con el Cu^0 se desarrolló permitiendo

6. Metodología

flexibilidad de los grupos funcionales de los amino ácidos cercanos a la His31, i.e. Ile1, Gln2, Arg3, Asp59, Trp60, Ser61, Phe62, His84, Val85 y Thr86.

Con esto se determinó la espontaneidad de las posibles ubicaciones del Cu^{+2} en la $\beta 2m$. Además, se compararon los datos obtenidos con resultados experimentales de MS publicados en la literatura (23, 58) con el fin de validar el modelo.

6.2. Cambios conformacionales de la $\beta 2m$ promovidos por la interacción con el Cu^{+2}

Estudios de MS (23), RMN (57) y difracción de rayos X (25) muestran el cambio conformacional y dinámico de la $\beta 2m$ al interactuar con el Cu^{2+} . Con el objeto evaluar a nivel atómico los cambios conformacionales de la proteína promovidos por la unión del Cu^{2+} y evidenciar las causas moleculares de los cambios conformacionales se desarrollaron múltiples simulaciones de mecánica molecular mediante dos metodologías:

1. *Coordinate driving* entre la proteína salvaje de conformación nativa, i.e. $\beta 2m_{1DUZ}$, con Cu^{2+} y una modificación de la holo-proteína que presenta formación espontánea de hexámeros, trimero de dímeros (25), i.e. $\beta 2m_{3CIQ}(H13)_m$. La modificación realizada consta de la eliminación del residuo N-terminal Met0 y la adición de los residuos C-terminales Asp98 y Met99 a la $\beta 2m_{3CIQ}(H13)$.
2. Dinámica molecular de los primeros 5 ns de la unión del Cu^{2+} en la superficie de la $\beta 2m_{1DUZ}$.

Selección de la estructura inicial

Se partió de la misma geometría que la sección anterior (Sección 6.1), i.e. estructura de la $\beta 2m(sn)$ extraída del complejo HLA-A (13) con modificaciones en la estructura. Se realizó el mismo procedimiento de adición de hidrógenos y de solvatación en una caja cúbica. Además, las simulaciones se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones de temperatura, presión y PBC. Igualmente, las interacciones de dos, tres y cuatro cuerpos se evaluaron de la misma manera.

6.2 Cambios conformacionales de la $\beta 2m$ promovidos por la interacción con el Cu^{2+}

6.2.1. Cambio conformacional mediante *Coordinate driving*

En estudios de rayos X por sincrotrón, Miranker *et al.* evidenciaron la formación de hexámeros, trimeros de dímeros, a partir de la holo-proteína $\beta 2m_{3CIQ}(H13F)-Cu^{2+}$ (25). Con el propósito de valorar la barrera energética que debe vencer la $\beta 2m_{1DUZ}$ con el Cu^{2+} coordinado en su estructura y lograr la conformación adecuada, i.e. holo-proteína $\beta 2m_{3CIQ}(H13)_m-Cu^{2+}$, que se aglomera de forma espontánea se determinaron 100 conformaciones intermedias entre la $\beta 2m_{1DUZ} - Cu^{2+}$ y la $\beta 2m_{3CIQ}(H13)_m-Cu^{2+}$. Las conformaciones se determinaron con una razón curvada mediante el uso del método de interpolación Corkscrew (89). Se optimizó la estructura de cada una de las configuraciones intermedias como se explicó en la sección 6.1. Durante el proceso de optimización se mantuvieron fijas las posiciones atómicas del esqueleto de la proteína para asegurar que no ocurriera un cambio conformacional de la estructura secundaria durante el proceso de minimización de la energía.

Con el objeto de simular la coordinación del Cu^{2+} se preservó el lugar del ión metálico en la $\beta 2m_{3CIQ}(H13F)-Cu^{2+}$. Se modificaron los lugares en los cuales el Cu^{2+} se enlaza debido a que la proteína salvaje no presenta la Met0. De esta manera, el Cu^{2+} se unió al nitrógeno amina del residuo N-terminal Ile1 al nitrógeno amida de la Gln2, al oxígeno amida de la Gln2 y al nitrógeno *epsilon* (N_ϵ) de la His31. Para simular la interacción $Cu^{2+} - N$ (ó O) se utilizó el potencial tipo Efecto nuclear Overhauser – NOE de sus siglas en inglés *Nuclear Overhauser Effect* – mostrado en la figura 6.4 y Ecuación 6.4; debido a que la interacción presente entre un ion metálico de transición y un átomo electronegativo no se debe representar con modelos enlazantes convencionales.

$$V_{dr}(r_{ij}) = \begin{cases} \frac{1}{2}k_{dr}(r_{ij} - r_0)^2 & \text{para } r_{ij} < r_0 \text{ Negro} \\ 0 & \text{para } r_0 \leq r_{ij} < r_1 \text{ Rojo} \\ \frac{1}{2}k_{dr}(r_{ij} - r_1)^2 & \text{para } r_1 \leq r_{ij} < r_2 \text{ Azul} \end{cases} \quad (6.4)$$

En la ecuación 6.4 r_{ij} es la distancia entre los dos átomos y K_{dr} es la constante del oscilador. En nuestro estudio $r_0 = 0,2, r_1 = 0,3, r_2 = 0,4$ y $K_{dr} = 7*1200kJ/mol*nm^2$.

6. Metodología

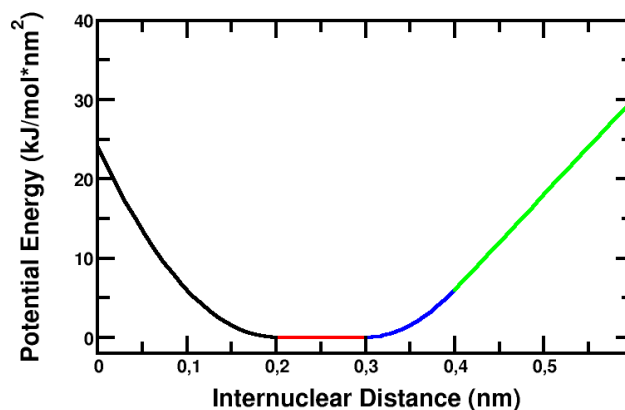


Figura 6.1: Restricción tipo NOE - Potencial de tipo Efecto nuclear Overhauser.

En este modelo la His31 no presenta hidrógenos en los nitrógenos del anillo imidazol debido a que el Cu^{+2} sustituye el hidrógeno *epsilon* (H_e). Además el nitrógeno amina N-terminal no se configuró cargado positivamente debido a que el Cu^{2+} sustituye uno de los hidrógenos.

Se realizó la misma colección de simulaciones con restricción adicional para el oxígeno carboxilo del Asp59, $Cu^{2+}-O_\delta$; debido a que estudios preliminares de MS sugieren que este amino ácido está involucrado en la coordinación del Cu^{2+} (58).

Adicionalmente, se realizaron simulaciones en ausencia del Cu^{2+} para determinar las barreras energéticas que debe vencer la proteína libre del metal de transición para lograr adquirir la conformación que presenta formación de protofibras.

Se determinó la energía interna de cada conformación y se realizó la superficie de energía potencial de cada sistema.

6.2.2. Cambio conformacional mediante dinámica molecular

Con el fin de definir la dinámica del sistema, i.e. la flexibilidad y el cambio conformacional de la proteína, se realizaron múltiples simulaciones de dinámica molecular

6.2 Cambios conformacionales de la $\beta 2m$ promovidos por la interacción con el Cu^{2+}

como se realizó para la apo-proteína $\beta 2m_{1DUZ}$ en la sección 6.1.

Con el objeto de simular las interacciones del Cu^{2+} se utilizó la restricción tipo NOE como se muestra en la sección 6.2.1 para dos, tres y cuatro cuerpos. Se evaluaron tres complejos diferentes debido a las hipótesis basadas en datos experimentales (Tabla 6.1).

Sistema	Enlace con Cu^{2+}	Descripción
Sin Cu^{2+}	sin Cu^{2+}	(90)
H1	N-ter:Ile1, N:Gln2, N_δ :His31, O_δ 1:Asp59	(58)
H2	N-ter:Ile1, N:Gln2, N_δ :His31	(58)
H3	N-ter:Ile1, N:Gln2, N_ϵ :His31, O_δ 1:Asp59	
H4	N-ter:Ile1, N:Gln2, N_δ :His31, O_δ 1:Asp59 *	

Tabla 6.1: Complejos Cu^{2+} -proteína. - Cinco sistemas evaluados por dinámica molecular. * Sistema con isomerización *cis-trans* del ángulo *omega* de la Pro32.

La holo-proteína H1 de la tabla 6.1 muestra el efecto de la coordinación del Cu^{2+} con la interacción del oxígeno *delta* del Asp59 en la dinámica de la proteína. La holo-proteína H2 muestra el efecto de la ausencia del grupo carboxilo (Asp59) en la unión del metal de transición. La holo-proteína H3 muestra el efecto de la unión del Cu^{2+} en la posición *epsilon* del anillo imidazol de la His31 (25). La holo-proteína H4 muestra el efecto de la isomerización *cis-trans* del ángulo ω de la Pro32 mediante restricción tipo NOE (7).

Después de desarrolladas las simulaciones de dinámica molecular se determinaron cambios conformacionales de la proteína evaluando los siguientes parámetros:

1. Desviación (RMSD) de la estructura secundaria, i.e. átomos del esqueleto de la proteína, durante cada paso de la simulación.
2. Movilidad (RMSF) de la estructura secundaria de la proteína desde el primer nanosegundo (1 ns) hasta terminar la simulación (5 ns).

6. Metodología

3. Diferencias en la geometría, i.e. cambios conformacionales de la estructura secundaria. Además, reorientaciones de los grupos funcionales de los residuos de la proteína.
4. Superficie hidrofóbica de la proteína mediante la metodología Kyte and Doolittle (74). Con el objeto de visualizar zonas de interacción entre proteínas.
5. pK_a de grupos funcionales protonables, mediante el programa PROPKA (Ver sección 6.1).

Se compararon estos resultados con los datos obtenidos en la sección 6.1 donde se evaluó la dinámica de la proteína salvaje libre del complejo HLA, con el objeto de determinar el efecto del Cu^{2+} sobre la flexibilidad y estabilidad de la proteína.

Se realizó un análisis estadístico de los datos obtenidos de cada simulación por triplicado; para mostrar diferencias significativas de los cambios promovidos por el Cu^{2+} en la estructura protéica. Se determinaron promedios de los datos obtenidos de las tres simulaciones. Además, se determinó el 95 % del límite de confianza respecto a la media mediante la ecuación 6.5 (91).

$$Error\ est. = t_{95\%} * \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \quad (6.5)$$

6.2.3. Validación de los cambios conformacionales

Se compararon los datos teóricos con resultados experimentales de MS (23, 58) publicados en la literatura con el fin de certificar los datos obtenidos y validar nuestro modelo teórico. Para este propósito se evaluó el cambio conformacional de la proteína mediante i) el área superficial accesible al solvente y ii) los cambios en la afinidad del DEPC sobre la superficie de la proteína.

6.2.3.1. Área superficial accesible al solvente.

Se evaluó el SASA del grupo funcional de los amino ácidos de referencia His13, His31, Ser33, His51, Trp60 y Ser88 durante el transcurso de la simulación. El análisis se realizó mediante la metodología de la superficie de Connolly (92) utilizando un radio de prueba de 0,14 nm. Los amino ácidos seleccionados están asociados con los amino ácidos marcados en los estudios de MS (23).

6.2.3.2. *Docking* molecular DEPC sobre la $\beta 2m$

Se realizó una búsqueda sistemática de los posibles sitios de adsorción del DEPC sobre la superficie de los diferentes modelos de la $\beta 2m$, en ausencia y presencia del Cu^{2+} , para determinar la afinidad del DEPC en las distintas conformaciones estudiadas. La búsqueda de sitios de adsorción sobre la superficie de la proteína se realizó de forma aleatoria mediante el método de Montecarlo (87) y el campo de fuerza AMBER94 (84) usando el programa Autodock4 (88). Resultados preliminares sugirieron una evaluación por secciones de la proteína. Por esta razón, se realizaron seis simulaciones para cada modelo ubicando la caja cúbica de $2,48\text{ nm}^3$, donde se evaluará la adsorción, centrada en cada uno de los amino ácidos de referencia, i.e. His13, His31, Ser33, His51 y Ser88. Los archivos de entrada se generaron a partir del visualizador Auto Dock Tools (86).

Se determinaron energías de *docking* y distancias interatómicas. Con esto se determinó la espontaneidad de las posibles ubicaciones del DEPC en la $\beta 2m$. Se reportaron únicamente las configuraciones de *docking* DEPC sobre las His31 y Ser33 debido a que fueron las únicas ubicaciones que presentaron diferencias significativas entre la $\beta 2m$ de conformación nativa y de conformación con propiedades amiloidogénicas.

6.3. Formación dímeros

Con el fin de construir un modelo de formación de protofibras amiloides a partir de la $\beta 2m-Cu^{2+}$ que se amolde a las evidencias experimentales de MS, DLS, SEC (24) y difracción de rayos X (7, 25) se realizaron múltiples simulaciones de mecánica molecular

6. Metodología

y mecánica cuántica.

El modelo de agregación proteica se desarrollo por etapas, como modelo de nucleación (93, 94, 95):

1. Formación de dímeros a partir de monómeros de $\beta 2m-Cu^{2+}$
2. Formación de tetrámeros a partir de dímeros de $\beta 2m-Cu^{2+}$ - $\beta 2m-Cu^{2+}$.

El primero paso del proceso de nucleación es la formación de dímeros. Con el objeto de evidenciar descriptores, causas moleculares y posibles estructuras diméricas, importantes en el proceso de agregación se inició con el acoplamiento y análisis de dímeros determinados por difracción de rayos X (25). Con el fin de determinar posibles sitios de interacción entre unidades de holo-proteína salvaje con el cobre en su estructura, i.e. holo-proteína $\beta 2m_{1DUZ}-Cu^{+2}$, se prosiguió a realizar el acoplamiento entre monómeros. Además se compararon los resultados con evidencias experimentales de MS (10) para darle validez a los resultados.

6.3.1. Determinación del efecto del Cu^{2+} sobre el acoplamiento proteína - proteína

Se tomó el dímero de dos unidades de $\beta 2m_3CIQ(H13F)-Cu^{2+}$, cadenas B y C del hexámero resuelto por difracción de rayos X (PDB ID: 3CIQ) (25), como estructura de partida para valorar los parámetros moleculares de la formación de dímeros a partir de la $\beta 2m$ con Cu^{2+} en su estructura. La cadena B y C se separaron y se realizó el proceso de *docking* proteína - proteína. Se tomaron las diez (10) estructuras con mayor puntuación del *docking* como configuraciones representativas del dímero formado, como lo sugiere la literatura (76).

Se realizó *docking* molecular teniendo en cuenta tres aspectos fundamentales en el reconocimiento proteína-proteína: i) el potencial electrostático de la superficie de las proteínas, ii) la forma complementaria de la interface proteína-proteína y iii) la energía de desolvatación utilizando el campo de fuerza CHARMM (96, 97). Este proceso se

desarrollo mediante el programa Zdock versión 3.0.1 (75, 76, 98, 99). Posteriormente, las estructuras diméricas obtenidas por *docking* molecular se ubicaron en una caja cúbica de 12,076 nm de arista y como se realizó en la sección 6.1 se optimizaron con el campo de fuerza AMBER94 (84) mediante el uso del programa GROMACS (79, 80, 81). Con el objeto de imitar la asociación del Cu^{2+} en la $\beta 2m$ se usó el potencial de tipo NOE como se explicó en la sección 6.2.1.

Los distintos dímeros se agruparon por similitud configuracional, i.e. antiparalelos, paralelos, cruzados y oblicuos, y se representaron mediante modelos generales.

6.3.2. Determinación del efecto de la mutación H13F en el acoplamiento proteína - proteína

Con el objeto de evaluar la influencia de la mutación H13F en el acoplamiento de los monómeros B y C de la estructura cristalina 3CIQ.pdb (25) se intercambió la fenilalanina presente en la posición 13 de los monómeros por histidina. Se evaluó el acoplamiento de los monómeros mediante desarrollo del *docking* proteína - proteína como se realizó en la sección 6.3.1.

Con el fin de evaluar la carga parcial de la His13 en la formación de estructuras diméricas se eliminaron las cargas parciales de los átomos del anillo imidazol de la His13 en la estructura de partida y se realizó nuevamente *docking* holo-proteína - holo-proteína.

Datos de pKa sugieren que la His13 podría presentar protonación a pH 7,0. Por esta razón, también se evaluó la His13 cargada positivamente en el proceso de dimerización de la holo-proteína, i.e. $\beta 2m_{3CIQ}(H13^+)-Cu^{2+}$.

Los datos obtenidos revelan que la forma del acoplamiento difiere por el intercambio de fenilalanina por histidina. Por esta razón se realizaron simulaciones del cambio en el potencial electrostático para determinar los cambios en las interacciones electrostáticas de la superficie interfacial del dímero. Para lograr este propósito se evaluó el cambio

6. Metodología

de los tres principales momentos multipolares, i.e. carga, dipolo y cuadrupolo, y el momento multipolar total como consecuencia del intercambio de Phe por His.

La función del potencial electrostático de un compuesto puede ser expresado como una expansión en serie de momentos multipolares de acuerdo con la ecuación 6.6:

$$V(r, \theta) = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \left[\frac{1}{r} \int_V \rho(r) d\tau + \frac{1}{r^2} \int_V \rho(r) \cos \theta d\tau + \frac{1}{r^3} \int_V \rho(r) r^2 \left(\frac{3}{2} \cos^2 \theta - \frac{1}{2} \right) d\tau + \dots \right]$$

Donde $V(r, \theta)$ es el potencial en un punto en el espacio, r y θ son las coordenadas polares de ese punto, ϵ_0 es la permitividad en el vacío y $d\tau$ es el volumen infinitesimal donde $V(r, \theta)$ será evaluado. Los tres términos más importantes en la expansión son el monopolo o la carga $\left(\frac{1}{r} \int_V \rho(r) d\tau \right)$, el momento dipolar $\left(\frac{1}{r^2} \int_V \rho(r) \cos \theta d\tau \right)$, y el momento cuadrupolar $\left(\frac{1}{r^3} \int_V \rho(r) r^2 \left(\frac{3}{2} \cos^2 \theta - \frac{1}{2} \right) d\tau \right)$ (100).

Se calcularon los tres primeros términos de la ecuación 6.6 del los amino ácidos en el dímero, a una distancia de 0,7 nm alrededor de la posición 13 en presencia de la Phe13 e His13. Éstos términos brindaron una aproximación al potencial electrostático del área interfacial del dímero. Los términos se calcularon a partir de las cargas atómicas de Mulliken, las cargas se determinaron mediante simulaciones de mecánica cuántica con el método Hartree Fock y con el grupo de funciones base 6-31G 6D 7F. Para este propósito se utilizó el programa Gaussssian03 (101).

Con estos datos se calcularon las diferencias euclidianas de la carga, dipolo, cuadrupolo y momento multipolar total de los amino ácidos evaluados.

6.3.3. Determinación de dímeros a partir de la β -2-microglobulina salvaje.

Con el fin de determinar la configuración del dímero a partir de la β 2m salvaje con propiedades amiloidogénicas, i.e β 2m_{3CIQ}(H13)_m-Cu²⁺, se realizaron extensos estudios

de *docking* molecular con la geometría de la proteína producto del proceso de *coordinate driving* de la sección 6.2.1.

Las simulaciones de *docking* proteína - proteína se realizaron al igual que se realizó en la sección 6.3.1. En los estudios de *docking* holo-proteína $\beta 2m_3CIQ(H13)_m-Cu^{2+}$ - $\beta 2m_3CIQ(H13)_m-Cu^{2+}$ se usó el potencial tipo NOE para imitar la unión del Cu^{2+} a los átomos de la región N-terminal, como se mencionó en la sección 6.2.1. Además se evaluó la apo-proteína $\beta 2m_3CIQ(H13)_m$ para evaluar el efecto de la ausencia del ion metálico en la formación del dímero.

Por otra parte, se evaluó la formación de dímeros a partir de la conformación nativa de la $\beta 2m$, i.e. $\beta 2m_1DUZ$, en presencia y ausencia de Cu^{2+} . El desarrollo de estas simulaciones de *docking* proteína - proteína se realizaron para determinar el efecto del cambio conformacional promovido por la unión del Cu^{2+} en la proteína en el proceso de la agregación de la proteína.

6.4. Formación del tetrámero

La siguiente etapa en el proceso de nucleación hacia la formación de fibras amiloides como lo muestra la figura 1.5 es la formación de tetrámeros a partir de dímeros (24). Con el objeto de determinar las conformaciones de los tetrámeros, el área interfacial entre dímeros y determinar las interacciones que mantienen unidos estas unidades se realizaron múltiples simulaciones de *docking* dímero - dímero.

El proceso de agregación de unidades diméricas se realizó como se detalló en la sección 6.3.1. Este estudio se inició con el dímero $\beta 2m_3CIQ(H13F)-Cu^{2+}$ como estructura de partida.

El *docking* molecular se realizó con Zdock versión 3.0.1 (75, 76) y la optimización de la geometría de los tetrámeros, mediante minimización de energía, se realizó con el campo de fuerza AMBER94 (84) implementado en el programa GROMACS (79, 80, 81). Se usó el potencial tipo NOE para imitar la unión del Cu^{2+} a los átomos de la región

6. Metodología

N-terminal como se mostró en la sección 6.2.1.

Capítulo 7

Conclusiones

En este trabajo se mostraron aspectos importantes en el proceso de formación de proto-fibras amiloides a partir de la $\beta 2m$. Se inició con el estudio de la interacción Cu^{2+} - β -2-microglobulina nativa y se culminó con la generación de configuraciones de tetrameros con posibles propiedades amiloidogénicas. También se destacó la importancia del Cu^{2+} en el cambio conformacional de la proteína, necesario para el correcto empalme entre monómeros.

Los resultados del PES de la apo-proteína y del *docking* molecular del cobre sobre la superficie de la proteína nativa muestran que estas técnicas de mecánica molecular no son adecuadas para la determinación del lugar de coordinación del Cu^{2+} en la superficie de la proteína. Sin embargo, algunos resultados del *docking* molecular muestran que existe una cavidad entre los amino ácidos N-terminales y la His31-Pro32 que por su característica energética y espacial resulta adecuada para la adsorción del Cu^{2+} .

Los estudios de *coordinate driving* y dinámica molecular realizados brindaron información de los cambios conformacionales de la proteína promovidos por el Cu^{2+} unido en la región N-terminal. En el estudio de *coordinate driving* se mostró que el Cu^{2+} actúa como agente mediador del cambio conformacional de la $\beta 2m$ al disminuir barreras energéticas de conformaciones no estables. La disminución de barreras energéticas facilita el cambio conformacional de la proteína, una de las etapas limitantes en el proceso de formación de fibras amiloides. Por otra parte, los estudios de dinámica molecular demostraron que la presencia del Cu^{2+} desestabiliza la estructura nativa de la

7. Conclusiones

$\beta 2m$, como lo sugieren varios reportes de la literatura (55, 60, 72). El cambio conformational más significativo mostrado en las simulaciones de dinámica molecular de las holo-proteínas evaluadas es el despliegue del bucle DE. Este resultado es muy importante por que muestra que el despliegue del bucle DE es consecuencia del acomplejamiento del Cu^{2+} en la región N-terminal y no del proceso de agregación entre proteínas en la formación de dímeros. Otro resultado importante del acomplejamiento del Cu^{2+} es el aumento de la movilidad del bucle BC, esa característica estructural puede llegar a promover la isomerización *cis-trans* del ángulo ω de la Pro32 (7). Estos resultados son realmente importantes por que es la primera vez que se evidencia claramente a nivel atómico el efecto desestabilizador promovido por la unión del Cu^{2+} en la proteína. Por tanto, las simulaciones de dinámica molecular constituyen una herramienta valiosa en el entendimiento de procesos biológicos como la aglomeración de la $\beta 2m$ promovida por la unión del Cu^{2+} .

Los estudios de *docking* holo-proteína - holo-proteína a partir de dos unidades de $\beta 2m_{3CIQ}(H13)-Cu^{2+}$ muestran la formación de dímeros antiparalelo desplazados. Estos dímeros son diferentes a los generados a partir de la $\beta 2m_{3CIQ}(H13F)-Cu^{2+}$. Este resultado muestra la importancia de estudiar experimental y teóricamente la proteína salvaje y no proteínas mutadas, como las reportadas por Miranker *et al.* (7, 25). Además, la estructura de los dímeros determinados por *docking* concuerdan con los estudios experimentales a condiciones fisiológicas (10). Por otra parte, las diferencias de los tres principales momentos multipolares del intercambio F13H muestran que las interacciones $\pi-\pi$ en forma de T entre la Phe13 de un monómero y la Tyr63 de su homólogo son importantes para la estabilidad del dímero $\beta 2m_{3CIQ}(H13F)-Cu^{2+}$ - $\beta 2m_{3CIQ}(H13F)-Cu^{2+}$ (25). De igual forma, los resultados muestran la pérdida de la complementaridad electrónica al intercambiar fenilalanina por histidina en la posición 13 del dímero resuelto por difracción de rayos X.

Por último, los resultados de *docking* dímero - dímero en la formación de tetrameros muestran que la estructura más estable es la agregación paralela de dímeros mediado por la interacción entre las hojas AG-AG de los dímeros. También muestran la importancia de la arista AG-AG de los dímeros en la formación de tetrameros estables.

7.1. Resumen de contribuciones

Las contribución principal de esta tesis doctoral es el desarrollo de un modelo teórico a nivel atómico que describe las primeras etapas de la formación de fibras amiloides: i) Ubicación del Cu^{2+} ; ii) cambio conformacional de la proteína necesario para la formación espontánea de dímeros, primeras estructuras proto-fibrilares; iii) configuración de dímeros probables a partir de la holo-proteína salvaje $\beta 2m_{3CIQ}(H13)_m-Cu^{2+}$ y iv) configuración de tetrameros probables a partir de dímeros antiparalelos.

7.2. Futuras investigaciones

Con las contribuciones aportadas por este trabajo y los datos adquiridos se sugieren realizar las siguientes actividades para refinar el modelo descriptor:

1. Desarrollar un modelo teórico que describa selectivamente el lugar de adsorción del Cu^{2+} mediante la utilización de campos de fuerza polarizables.
2. Desarrollar simulaciones de dinámica molecular de la $\beta 2m(s)-Cu^{2+}$ en escala de microsegundos con el objeto de visualizar factores relevantes en el proceso del cambio conformacional de la proteína.
3. Desarrollar un modelo teórico que describa la agregación de fragmentos de $\beta 2m$ con el objeto de evaluar bases moleculares de la agregación de pequeñas unidades de péptidos, segmentos de la proteína.
4. Desarrollar simulaciones de dinámica molecular de la estabilidad de tetrameros en ausencia del Cu^{2+} para valorar los cambios configuracionales de la estructura cuaternaria que promuevan la eliminación de cuatro unidades de Cu^{2+} .

7. Conclusiones

5. Determinar estructuras hexaméricas y desarrollar un modelo tipo Ising de la formación de fibras amiloides a partir proto-fibras, i.e. hexámeros de $\beta 2m$.

Capítulo 8

Publicaciones

8.1. Artículos

1. Vanessa Leah Mendoza, Kwasi Antwi, **Mario A. Barón-Rodríguez**, Cristian Blanco and Richard W. Vachet. Structural insights into the Pre-Amyloid Tetramer of β -2-Microglobulin from Covalent Labeling and Mass Spectrometry. *Biochemistry*. **2011**, 50, 6711-6711.
2. Vanessa Leah Mendoza, Kwasi Antwi, **Mario A. Barón-Rodríguez**, Cristian Blanco and Richard W. Vachet. Structure of the Preamyloid Dimer of β -2-Microglobulin from Covalent Labeling and Mass Spectrometry. *Biochemistry*. **2010**, 49, 1522-1532.
3. **Mario A. Barón-Rodríguez**, Vanessa Leah Mendoza, Richard W. Vachet and Cristian Blanco. Conformational Change of β -2-microglobulina. Destabilization Effect of Cu^{2+} . *Submitted*.
4. **Mario A. Barón-Rodríguez**, Vanessa Leah Mendoza, Richard W. Vachet and Cristian Blanco. Molecular modeling of β -2-Microglobulin Dimers. During Protofibril Formation. *Submitted*.

8.2. Presentaciones orales

1. **Mario A. Barón-Rodríguez**, Richard W. Vachet, Cristian Blanco Tirado. Conformational Change of β -2-microglobulin play a Key role in Dimer Formation.

8. Publicaciones

43rd IUPAC World Chemistry Congress, 2011.

2. Deisy Y. Rodríguez, **Mario A. Barón-Rodríguez**, Richard W. Vachet, Cristian Blanco Tirado. β -2-microglobulin Segments Forms Dimer which Resemble native Protein Aggregates. *43rd IUPAC World Chemistry Congress, 2011.*
3. **Mario A. Barón-Rodríguez**, Cristian blanco Tirado. Cambio Conformacional y Dinámico de la β -2-Microglobulina como consecuencia del Enlace del Cu(II) en la His31. *III Encuentro de Químicos Teóricos y Computacionales, 2010.*

8.3. Presentaciones escritas

1. Claudia J. Ulloa-Rodríguez, **Mario A. Barón-Rodríguez**, Cristian Blanco Tirado. Interacción del Cobre (II) con la β -2-Microglobulina: Un Estudio de Docking Molecular. *Congreso Lationamericano de Química y Congreso Nacional de Química, 2010.*
2. Deisy Y. Rodríguez, **Mario A. Barón-Rodríguez**, Cristian Blanco Tirado. Energía Libre de Gibbs de la Formación del Dímero (83-89) β -2-Microglobulina. *Congreso Lationamericano de Química y Congreso Nacional de Química, 2010.*
3. C. Juliana Ulloa-Rodríguez, **Mario A. Barón-Rodríguez**, Cristian Blanco Tirado. Interacción del ión cobre (II) con la β -2-microglobulina: Un estudio de docking molecular. *III Encuentro de Químicos Teóricos y Computacionales, 2010.*
4. Deisy Y. Rodríguez-Sarmiento, **Mario A. Barón-Rodríguez**, Cristian Blanco Tirado. Energía libre de Gibbs de la formación de dímero β -2-microglobulina. *III Encuentro de Químicos Teóricos y Computacionales, 2010.*
5. **Mario A. Barón-Rodríguez**, Cristian Blanco Tirado. Enlace del Cu(II) en la β -2-microglobulina. Cambio conformacional de la proteína inducida por el ion metálico divalente. *XXXXV Congreso de Químicos Teóricos Expresión Latina, 2009.*
6. Claudia J. Ulloa, **Mario A. Barón-Rodríguez**, Cristian Blanco. Sitios de adsorción del Cu^{2+} sobre la superficie de la β -2-microglobulina. Poster. *II Encuentro Nacional de Químicos Teórico y Computacionales (IENQTC). 2008.*

7. Mario A. Barón-Rodríguez, Cristan Blanco. Desarrollo de parámetros Cu(II)-aminoácido para su implementación en dinámica molecular de estructuras proteicas. Poster. *II Encuentro Nacional de Químicos Teórico y Computacionales (IENQTC)*.**2008**

Bibliografía

- [1] L. M. Dember and J. B. Jaber. Dialysis-related amyloidosis: Late finding or hidden epidemic? *Seminars In Dialysis.*, 19:105–109, **2006**. 25, 28, 34
- [2] F. Gejyo, T. Yamada, S. Odani, Y. Nakagawa, M. Arakawa, T. Kunitomo, H. Kataoka, M. Suzuki, Y. Hirasawa, and T. Shirahama et al. A new form of amyloid protein associated with chronic hemodialysis was identified as β 2-microglobulin. *Biochem Biophys Res Commun.*, 129:701–706, **1985**. 25, 28
- [3] F. Chiti, E. De Lorenzi, S. Grossi, P. Mangione, S. Giorgetti, G. Caccialanza and C. M. Dobson, G. Merlini, G. Ramponi, and V. Bellotti. A partially structured species of beta 2-microglobulin is significantly populated under physiological conditions and invlved in fibrillogenesis. *J. Biol. Chem.*, 276(50):46714–46721, December **2001**. 25, 28, 32
- [4] C. M. Eakin, J. D. Knight, C. J. Morgan, M. A. Gelfand, and A. D. Miranker. Formation of a copper specific binding site in nonnative states of beta2microglobulin. *Biochemistry*, 41:10646–10656, **2002**. 25, 36, 44, 60, 62, 69
- [5] C. M. Eakin, F. J. Attenello, C. J. Morgan, and A. D. Miranker. Oligomeric assembly of native-like precursors precedes amyloid formation by β -2 microglobulin. *Biochemistry*, 43:7808–7815, **2004**. 25
- [6] C. M. Eakin and A. D. Miranker. From chance to frequent encounters: Origins of β 2-microglobulin fibrillogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1753:92–99, **2005**. 25
- [7] C. M. Eakin, A. J. Berman, and A. D. Miranker. A native to amyloidogenic transition regulated by a backbone trigger. *Nature Structural & Molecular Biology*, 13(3):202–208, March **2006**. 25, 29, 39, 40, 56, 59, 60, 69, 70, 93, 117, 119, 126
- [8] N. Deng, L. Yan, D. Singh, and P. Cieplak. Molecular basis for the cu^{2+} binding-induced destabilization of β 2microglobulin revealed by molecular dynamics simulation. *Biophysical Journal*, 90:3865–3879, **2006**. 25, 37

BIBLIOGRAFÍA

- [9] H. Benyamini, K. Guneseakaran, H. Wolfson, and R. Nussinov. Fibril modelling by sequence and structure conservation analysis combined with protein docking techniques: β_2 -microglobulin amyloidosis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1753:121–130, **2005**. 25
- [10] V. L. Mendoza, K. Antwi, M. A. Barón-Rodríguez, C. Blanco, and R. Vachet. Structure of the preamyloid dimer of β -2-microglobulin from covalent labeling and mass spectrometry. *Biochemistry*, 49:1522–1532, **2010**. 26, 29, 35, 55, 93, 98, 102, 103, 120, 126
- [11] V. L. Mendoza, M. A. Barón-Rodríguez, C. Blanco-Tirado, and R. W. Vachet. Structural insights into the pre-amyloid tetramer of β -2-microglobulin from covalent labeling and mass spectrometry. *Biochemistry*, 50(31):6711–6722, **2011**. 26, 35, 55, 107
- [12] P. J. Bjorkman, M. A. Saper, B. Samraoui, W. S. Bennett, J. L. Strominger, and D. C. Wiley. Structure of the human class i histocompatibility antigen, hlaa2. *Nature*, 329:506–512, **1987**. 27
- [13] A. R. Khan, B. M. Baker, P. Ghosh, W. E. Biddison, and D. C. Wiley. The structure and stability of an HLA-A*0201/octameric tax peptide complex with an empty conserved peptide-n-terminal binding site. *Journal of Immunology*, 164:6399–6405, **2000**. 27, 28, 29, 43, 55, 56, 70, 81, 83, 103, 109, 111, 114
- [14] C. H. Trinh, D. P. Smith, A. P. Kalverda, S. E. V. Phillips, and S. E. Radford. Crystal structure of monomeric human β -2-microglobulin reveals clues to its amyloidogenic properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:9771–9776, **2002**. 27, 43, 69, 70
- [15] D. Sundin, M. Cohen, R. Dahl, and S. Falk. Molitoris, characterization of the β_2 -microglobulin endocytic pathway in rat proximal tubule cells. *Am. J. Physiol.*, 267:F380–F389, **1994**. 27
- [16] V. Bellotti, P. Mangione, and M. Stoppini. Biological activity and pathological implications of misfolded proteins. *Cell Mol. Life Sci.*, 55:977–991, **1999**. 27, 31
- [17] J. Floege and G. Ehlerding. Beta2microglobulina associated amyloidosis. *Nephron*, 72:9–26, **1996**. 27
- [18] J. Floege and M. Ketteler. β_2 -microglobulin-derived amyloidosis: an update. *Kidney Int.*, 59:S164–S171, **2001**. 27, 29
- [19] S. Otsubo, N. Kimata, I. Otsubo K. Oshikawa, S. Ueda, H. Sugimoto, M. Mitobe, K. Uchida, K. Otsubo, K. Nitta, and T. Akita. Characteristics of dialysis-related amyloidosis in patients on haemodialysis therapy for more than 30 years. *Nephrol Dial Transplant*, 24:1593 – 1598, **2009**. 27, 29
- [20] P.D. Gorevic, T. T. Casey, W. J. Stone, C. D. Diraimodo, F. C. Prelli, and B. Frangione. β_2 -microglobulin is an amyloidogenic protein in man. *J. Clin. Invest.*, 76:2425–2429, **1985**. 28

-
- [21] J. Rochet and P. Lansbury Jr. Amyloid fibrillogenesis: themes and variations. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 10(1):13–15, February **2000**. 28
- [22] G. Merlini and V. Bellotti. Molecular mechanism of amyloidosis. *The New Eng. J. of Med.*, 349(6):583–596, **2003**. 29, 30
- [23] V. L. Mendoza and R. Vachet. Protein surface mapping using diethylpyrocarbonate with mass spectrometric detection. *Anal. Chem.*, 80:2895–2904, **2008**. 29, 38, 40, 44, 46, 51, 52, 54, 58, 60, 64, 72, 80, 81, 84, 86, 87, 103, 111, 114, 118, 119
- [24] K. Antwi, M. Mahar, R. Srikanth, M. Olbris, J. Tyson, and R. Vachet. Cu(ii) organizes β -2-microglobulin oligomers but is released upon amyloid formation. *Protein Science*, 17:748–759, **2008**. 29, 35, 40, 41, 43, 55, 105, 119, 123
- [25] M. F. Calabrese, C. M. Eakin, J. M. Wang, and A. D. Miranker. A regulatable switch mediates self-association in an immunoglobulin fold. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 15(9):965–971, September **2008**. 29, 35, 40, 41, 44, 46, 49, 51, 52, 54, 55, 56, 58, 60, 64, 67, 69, 70, 83, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 98, 99, 101, 102, 103, 114, 115, 117, 119, 120, 121, 126
- [26] S. E. Radford, W. S. Gosal, and G. W. Platt. Towards an understanding of the structural molecular mechanism of β_2 -microglobulin amyloid formation in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1753:51–63, **2005**. 29
- [27] D. Sethi and P. E. Gower. Synovial-fluid β_2 -microglobulin levels in dialysis arthropathy. *N. Engl. J. of Med.*, 315(22):1419–1420, **1986**. 29, 55
- [28] A. M. Davison. Amyloidosis in patients with end-stage renal failure: Uremia associated or dialysis related? *Contrib. Nephrol.*, 113:92–100, **1995**. 29
- [29] H. Naiki, N. Hashimoto, S. Suzuki, H. Kimura, K. Nakakuki, and F. Gejyo. Establishment of a kinetic model of dialysis-related amyloid fibril extension in vitro. *Amyloid int. J. Exp. and Clin. Invest.*, 4:223–232, **1997**. 30
- [30] V. McParland, A. P. Kalverda, S. W. Homans, and S. E. Radford. Structural properties of an amyloid precursor of β_2 -microglobulin. *Nature Structural Biology*, 9(5):326 – 331, **2002**. 30, 38
- [31] V. McParland, N. M. Kad, A. Kalverda, A. Brown, P. Kirwin-Jones, M.G. Hunter, M. Sundé, and S.E. Radford. Partially unfolded states of beta(2)-microglobulin and amyloid formation *in vitro*. *Biochemistry*, 39:8735–8746, **2000**. 30, 31
- [32] D. P. Smith and S. E. Radford. Role of the single disulphide bond of β_2 -microglobulin in amyloidosis in vitro. *Protein Science*, 10:1775 – 1784, **2001**. 31
- [33] Y. Ohhashi, Y. Hagihara, G. Kozhukh, M. Hoshino, K. Hasegawa, I. Yamaguchi, H. Naiki, and Y. Goto. The intrachain disulfide bond of β_2 -microglobulin is not essential for the

BIBLIOGRAFÍA

- immunoglobulin fold at neutral ph, but is essential for amyloid fibril formation at acidic ph. *J. Biochem.*, 131(1):45 – 52, **2002**. 31
- [34] H. Katou, T. Kanno, M. Hoshino, Y. Hagihara, H. Tanaka, T. Kawai, K. Hasegawa, H. Naiki, and Y. Goto. The role of disulfide bond in the amyloidogenic state of β_2 -microglobulin studied by heteronuclear nmr. *Protein Science*, 11:2218 – 2229, **2002**. 31
- [35] Y. Chen and N. V. Dokholyan. A single disulfide bond differentiates aggregation pathways of β_2 -microglobulin. *J. Mol. Biol.*, 354:473–482, **2005**. 31
- [36] G. Esposito, R. Michelutti, G. Verdone, P. Viglino, H. Hernández, C.V. Robinson, A. Amoresano, F. Dal Piaz, M. Monti, P. Pucci, P. Manfione, M. Stoppini, G. Merlini, G. Ferri, and V. Bellotti. Removal of the n-terminal hexapeptide from human β_2 -microglobulin facilitates protein aggregation and fibril formation. *Protein Science*, 9:831–845, **2000**. 31
- [37] M. Jadoul, C. Garbar, H. Noel, J. Sennesael, R. Vanholder, P. Bernaert, G. Rorive, G. Hanique, and C. van Ypersele de Strihou. Histological prevalence of beta 2-microglobulin amyloidosis in hemodialysis: a prospective post-mortem study. *Kidney Int.*, 51(6):1928–1932, June 1997. 32
- [38] N. Homma, F. Gejyo, M. Isemura, and M. Arakawa. Collagen-binding affinity of beta-2-microglobulin, a protein of hemodialysis-associated amyloidosis. *Nephron*, 53(1):37–40, 1989. 32
- [39] S. Giorgetti, A. Rossi, P. Mangione, S. Raimondi, S. Marini, M. Stoppini, A. Corazza, P. Viglino, G. Esposito, G. Cetta, G. Merlini, and V. Bellotti. β_2 -microglobulin isoforms display an heterogeneous affinity for type i collagen. *Protein Science*, 14:696–702, 2005. 32
- [40] A. Relini, C. Canale, S. De Stefano, R. Rolandi, S. Giorgetti, M. Stoppini, A. Rossi, F. Fogolari, A. Corazza, G. Esposito, and A. Gliozzi. Collagen plays an active role in the aggregation of β_2 -microglobulin under physiopathological conditions of dialysis-related amyloidosis. *J. Biol. Chem.*, 16:16521–16529, June **2006**. 32
- [41] T. Eichner and S. E. Radford. Understanding the complex mechanisms of β_2 -microglobulin amyloid assembly. *FEBS J.*, pages 1–16, **2011**. 32
- [42] A. Salahuddin. Proline peptide isomerization and protein folding. *J. Biosci.*, 6(4):349–355, 1984. 32
- [43] A. Kameda, M. Hoshino, T. Higurashi, S. Takahashi, H. Naiki, and Y. Goto. Nuclear magnetic resonance characterization of the refolding intermediate of β_2 -microglobulin trapped by non-native prolyl peptide bond. *J. Mol. Biol.*, 348(383 - 397), **2005**. 32

-
- [44] M. Sakata, E. Chatani, A. Kameda, K. Sakurai, H. Naiki, and Y. Goto. Kinetic coupling of folding and prolyl isomerization of β_2 -microglobulin studied by mutational analysis. *J. Mol. Biol.*, 382:1242–1255, **2008**. 32
- [45] T. R. Jahn, M. J. Parker, S. W. Homans, and S. E. Radford. Amyloid formation under physiological conditions proceeds via a native-like folding intermediate. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 13(3):195 – 201, **2006**. 33
- [46] M. Kihara, E. Charani, K. Iwata, K. Yamamoto, T. Matsuura, A. Nakagawa, H. Naiki, and Y. Goto. Conformation of amyloid fibrils of β_2 -microglobulin probed by tryptophan mutagenesis. *J. Biol. Chem.*, 281(41):31061–31069, 2006. 33
- [47] G. Esposito, S. Ricagno, A. Corazza, E. Rennalla, D. G'umral, M. Chiara Mimmi, E. Betto, C. Pucillo, F. Fogolari, P. Viglino, S. Raimondi, S. Giorgetti, B. Bolognesi, G. Merlini, M. Stoppini, M. Bolognesi, and V. Bellotti. The controlling roles of trp60 and trp95 in β_2 -microglobulin function, folding and amyloid aggregation properties. *J. Mol. Biol.*, 378:885–895, **2008**. 33
- [48] A. Corazza, E. Rennalla, P. Schanda, M. C. Mimmi, T. Cutuil, S. Raimondi, S. Giorgetti, F. Fogolari, P. Viglino, L. Frydman, M. Gal, V. Bellotti and B. Brutscher, and G. Esposito. Native-unlike long-lived intermediates along the folding pathway of the amyloidogenic protein β_2 -microglobulin revealed by real-time two-dimensional nmr. *J. Biol. Chem.*, 285(8):5827 – 5835, February **2010**. 33
- [49] S. Ricagno, M. Colombo, M. Rosa, E. Sangiovanni, S. Giorgetti, S. Raimondi, V. Bellotti, and M. Bolognesi. De loop mutations affect β_2 -microglobulin stability and amyloid aggregation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 377:146–150, **2008**. 34
- [50] C. J. Morgan, M. Gelfand, and C. Atreya A. D. Miranker. Kidney dialysis associated amyloidosis: a molecular role for copper in fiber formation. *J. Mol. Biol.*, 309(339–345), **2001**. 34, 35, 36, 37, 47, 83
- [51] C. S. Atwood, R. D. Moir, X. Huang, R. C. Scarpa, N. M. Bacarra, D. M. Romano, M. A. Hartshorn, R. E. Tanzi, and A. I. Bush. Dramatic aggregation of alzheimer a beta by cu(ii) is induced by conditions representing physiological acidosis. *J. Biol. Chem.*, 273:12817–12826, **1998**. 34
- [52] X. Huang, C. S. Atwood, R. D. Moir, M. A. Hartshorn, J. P. Vonsattel, R. E. Tanzi, and A. I. Bush. Zinc induced alzheimer's abeta1-40 aggregation is mediated by conformational factors. *J. Biol. Chem.*, 272:26464–26470, **1997**. 34
- [53] M. L. Kramer, H. D. Kratzin, B. Schmidt, A. Romer, O. Windl, S. Liemann, S. Horne-mann, and H. Kretzschmar. Prion protein binds copper within the physiological concentration range. *J. Biol. Chem.*, 276:16711–16719, **2001**. 34

BIBLIOGRAFÍA

- [54] D. P. Davis, G. Gallo, S. M. Vogen, J. L. Dul, K. L. Sciarretta, A. Kumar, R. Raffin, F. J. Stevens, and Y. Argon. Both the environment and somatic mutations govern the aggregation pathway of pathogenic immunoglobulin light chain. *J. Mol. Biol.*, 313:1021–1034, **2001**. 34
- [55] M. F. Calabrese and A. D. Miranker. Metal binding sheds light on mechanisms of amyloid assembly. *Prion*, 3(1):1–4, March **2009**. 35, 55, 64, 67, 126
- [56] G. Verdone, A. Corazza, P. Viglino, F. Pettirossi, S. Giorgetti, P. Mangione, A. Andreola, M. Stoppini, V. Bellotti, and G. Esposito. The solution structure of human β 2-microglobulin reveals the prodromes of its amyloid transition. *Protein Sci.*, 11:487–499, **2002**. 36, 43, 110
- [57] J. Villanueva, M. Hoshino, H. Katou, J. Kardos, K. Hasegawa, H. Naiki, and Y. Goto. Increase in the conformational flexibility of beta 2microglobulin upon copper binding: a possible role for copper in dialysis-related amyloidosis. *Protein Sci.*, 13:797–809, **2004**. 36, 37, 38, 66, 69, 114
- [58] J. Lim and R. W. Vachet. Using mass spectrometry to study copperprotein binding under native and nonnative conditions: β -2-microglobulin. *Anal. Chem.*, 76:3498–3504, **2004**. 36, 37, 38, 40, 46, 47, 51, 52, 54, 60, 64, 114, 116, 117??
- [59] J. H. Viles, D. Donne, G. Kroon, S. B. Prusiner, F. E. Cohen, H. J. Dyson, and P. E. Wrigh. Local structural plasticity of the prion protein. analysis of nmr relaxation dynamics. *Biochemistry*, 40:2743–2753, **2001**. 37
- [60] S. Campioni, E. Monsellier, and F. Chiti. *Why proteins misfold*, chapter 1, pages 3 – 20. WILEY, **2010**. 37, 67, 126
- [61] M. Okon, P. Bray, and D. Vucelic. 1h nmr assignments and secondary structure of human β 2microglobulin in solution. *Biochemistry*, 31:8906–8915, **1992**. 43
- [62] H. Li, A. D. Robertson, and J. H. Jensen. Very fast emperical prediction and rationalization of protein pka values. *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics*, 61:704–721, **2005**. 44, 110, 111
- [63] D. C. Bas, D. M. Rogers, and J. H. Jensen. Veri fast prediction and rationalization of pka values for protein-ligand complexes. *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics*, 73:765–783, **2008**. 44, 110, 111
- [64] M. H.M. Olsson, C. R. Sondergard, M. Rostkowski, and J. H. Jensen. Propka 3: Consistent treatment of internal and surface residues in empirical pka predictions. *J. Chem. Theory and Comput.*, 7(2):525–537, **2011**. 44, 110, 111

- [65] C. R. Sondergard, M. H.M. Olsson, M. Rostkowski, and J. H. Jensen. Improved treatment of ligands and coupling effects in empirical calculation and rationalization of pka values. *J. Chem. Theory and Comput.*, **2011**. 44, 110, 111
- [66] B. Utley and L. A. Angel. Effects of transition metal ion identity and π -cation interactions in metal-bis(peptide) complexes containing. *Eur. J. Mass Spectrom.*, 16(6):631–643, 2010. 49
- [67] C. S. Burns, E. Aronoff-Spencer, C. M. Dunham, P. Lario, N. I. Avdievich, W. E. Antholine, M. M. Olmstead, A. Vrielink, G. J. Gerfen, J. Peisach, W. G. Scott, and G. L. Millhauser. Molecular features of the copper binding sites in the octarepeat domain of the prion protein. *Biochemistry*, 41(12):3991–4001, March **2002**. 49, 52
- [68] C. S. Burns, E. Aronoff-Spencer, G. Legname, S. B. Prusiner, W. E. Antholine, G. J. Gerfen, J. Peisach, and G. L. Millhauser. Copper coordination in the full-length, recombinant prion protein. *Biochemistry*, 42(22):6794–6803, June **2003**. 49, 52
- [69] E. D. Walter, D. J. Stevens, M. P. Visconte, and G. L. Millhauser. The prion protein is a combined zinc and copper binding protein: zn^{2+} alters the distribution of cu^{2+} coordination modes. *J. Am. Chem. Soc.*, 129(50):15440–15441, **2007**. 49
- [70] T. Gareth. *Medicinal Chemistry: An Introduction*. Jhon Wiley & Sons Ltd, 2nd edition, **2007**. 52
- [71] S. Ricagno, S. Raimondi, S. Giorgetti, V. Bellotti, and M. Bolognesi. Human beta-2-microglobulin w60v mutant structure: Implications for stability and amyloid aggregation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 380:543–547, **2009**. 57
- [72] E. De Lorenzi, R. Colombo, S. Sabella, D. B. Corlin, and N. H. Heegaard. The influence of cu^{2+} on the unfolding and refolding of intact and proteolytically processed β_2 -microglobulin. *Electrophoresis*, 29:1734 – 1740, **2008**. 67, 126
- [73] S. Magdassi, A. Kamyshny, O. Toledano, K. D. Schwenke, F. F. Shilh, A. Kato, G. Hajós, J. Lefebvre, P. Relkin, M. N. Jones, M. E. Mangino, and W. J. Harper. *Surface Activity of Proteins. Chemical and Physicochemical Modifications*. Marcel Dekker, 1996. 72, 75
- [74] J. Kyte and R. F. Doolittle. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*, 157(1):105 – 132, **1982**. 75, 118
- [75] R. Chen and Z. Weng. Docking unbound proteins using shape complementary, desolvation, and electrostatics. *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics*, 47:281–294, **2002**. 91, 99, 121, 123
- [76] R. Chen, L. Li, and Z. Weng. Zdock: An initial-stage protein-docking algorithm. *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics*, 52:80–87, **2003**. 91, 99, 120, 121, 123

BIBLIOGRAFÍA

- [77] EA Meyer, RK Castellanos, and F Diederich. Interactions with aromatic rings in chemical and biological recognition. *Angewandte Chemie Int. Ed.*, 42(11):1210–1250, **2003**. 94
- [78] L. Wang, N. Sun, S. Terzian, X. Zhang, and D. R. Benson. A histidine/tryptophan π -stacking interaction stabilizes the heme-independent folding core of microsomal apocytochrome b₅ relative to that of mitochondrial apocytochrome b₅. *Biochemistry*, 45(46):13750 – 13759, 2006. 94
- [79] D. van der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, G. Groenhof, A. Mark, and H. Berendsen. Gromacs: Fast, flexible and free. *J. Comp. Chem.*, 26:1701–1719, **2005**. 109, 121, 123
- [80] E. Lindahl, B. Hess, and D. van der Spoel. Gromacs 3.0: A package for molecular simulation and trajectory analysis. *J. Mol. Mod.*, 7:306–317, **2001**. 109, 121, 123
- [81] H. Berendsen, D. van der Spoel, and R. van Drunen. Gromacs: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Comp. Phys. Comm.*, 91:43–56, **1995**. 109, 121, 123
- [82] W. L. DeLano. The pymol molecular graphics system. DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA. <http://www.pymol.org>, **2002**. 109
- [83] M. Mahoney and W. Jorgensen. A five-site model for liquid water and the reproduction of the density anomaly by rigid, nonpolarizable potential functions. *J. Chem. Phys.*, 112(20):8911–8922, May **2000**. 110
- [84] W. Cornell, P. Cieplak, C. Bayly, I. Gould, K. Merz, D. Ferguson, D. Spellmeyer, T. Fox, J. Caldwell, and P. Kollman. A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules. *J. Am. Chem. Soc.*, 117:5179–5197, **1995**. 110, 111, 112, 119, 121, 123
- [85] N. Baker, D. Sept, S. Joseph, M. Holst, and A. McCammon. Electrostatics of nanosystems: Application to microtubules and the ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 98(18):10037–10041, August **2001**. 111
- [86] M. F. Sanner. Python: A programming language for software integration and development. *J. Mol. Graphics Mod.*, 17:57–61, February **1999**. 112, 119
- [87] N. Metropolis. The monte carlo method. *J. Am. Stat. Assoc.*, 44:335–341, **1949**. 112, 119
- [88] G. M. Morris, D. S. Goodsell, R. S. Halliday, R. Huey, W. E. Hart, R. K. Belew, and A. J. Olson. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comput. Chem.*, **1998**. 112, 119
- [89] E. Pettersen, T. Goddard, C. Huang, G. Couch, D. Greenblatt, E. Meng, and T. Ferrin. UCSF chimera - a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.*, 25(13):1605–1612, **2004**. 115

- [90] E. Chatani and Y. Goto. Structural stability of amyloid fibrils of β_2 -microglobulin in comparison with its native fold. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1753:64–75, **2005**. 117
- [91] C. W. Garland, J. W. Nibler, and D. P. Shoemaker. *Experiments in physical Chemistry*. McGraw-Hill, 8th edition edition, **2009**. 118
- [92] M. L. Connolly. Analytical molecular surface calculation. *J. Appl. Cryst*, 16(5):548–558, Oct **1983**. 119
- [93] C. M. Dobson. Protein folding and misfolding. *Nature*, 18(426):884 – 890, **2003**. 120
- [94] V.N. Uversky and A. L. Fink. Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded. *Biochim. Biophys. Acta*, 6(1698):131–153, **2004**. 120
- [95] F. Chiti and C. M. Dobson. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu. Rev. Biochem.*, 75:333–366, **2006**. 120
- [96] A. D. Jr. MacKerell, D. Bashford, M. Bellot, R. L. Dunbrack Jr., J. D. Evanseck, M. J. Field, S. Fischer, J. Gao, H. Guo, S. Ha, D. JosephMcCarthy, L. Kuchnir, and et al. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *J. Phys. Chem. B.*, 102:3586–3616, **1998**. 120
- [97] F. A. Momany and R. Rone. Validation of the general purpose quanta 3.2/charmm forcefield. *J. Comput. Chem.*, 13:888–900, **1992**. 120
- [98] H. Hwang, T. Vreven, J. Janin, and Z. Weng. Protein-protein docking benchmark version 4.0. *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics*, 78:3111–3114, **2010**. 121
- [99] P. L. Kastiris, I. H. Moal, H. Hwang, Z. Weng, P. A. Bates, A. Bonvin, and J. Janin. A structure-based benchmark for protein-protein binding affinity. *Protein Science*, 20:482–491, **2011**. 121
- [100] C. Cárdenas, J. Villaveces, H. Bohórquez, E. Llanos, C. Suárez, M. Obregón, and M. Pararroyo. Quantum chemical analysis explains hemagglutinin peptide mhc class ii molecule hla-dr β 1*0101 interactions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 323:1265–1277, **2004**. 122
- [101] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery, Jr. T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C.

BIBLIOGRAFÍA

Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. AlLaham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez, , and J. A. Pople. Gaussian, inc. Wallingford CT, **2004**. 122

Anexos

Apéndice A

Cambios conformacionales de la $\beta 2m$ promovidos por la interacción con el Cu^{2+} .

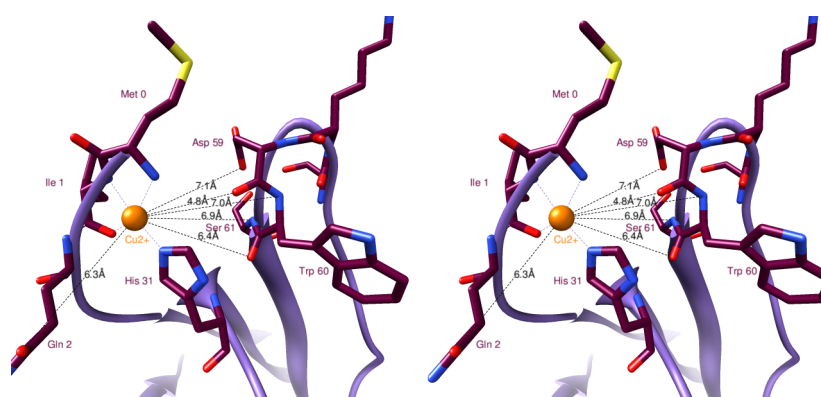


Figura A.1: Conformación de la $\beta 2m_{3CIQ}(H13)-Cu^{2+}$ en la región N-terminal.
- Distancia entre Cu^{2+} y átomos del bucle DE. Principales interacciones electrostáticas del Cu^{2+} con átomos electronegativos del bucle DE.

Apéndice B

Formación de dímeros.

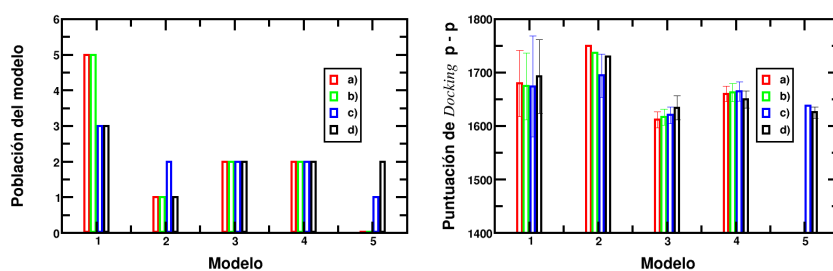


Figura B.1: Distribución de los modelos de dímeros a partir de la holo-proteína $3CIQ(H13F)-Cu^{2+}$. -Izquierda: Distribución de los dímeros generados por *docking* proteína - proteína de los modelos de la figura 4.1. a) $\beta 2m_3CIQ(H13F)-Cu^{2+}$; b) $\beta 2m_3CIQ(H13F)-Cu^{1+}$; c) $\beta 2m_3CIQ(H13F)-Cu^0$; d) $\beta 2m_3CIQ(H13F)$. Derecha: Promedios de la puntuación del *docking* proteína-proteína. Barras de error calculadas como lo muestra la ecuación 6.5.

Docking / Zdock score	Dim1	Dim2	Dim3	Dim4	Dim5	Dim6	Dim7	Dim8	Dim9	Dim10
$\beta 2m_3C_{1Q}(\text{H13F})-Cu^{2+}$	1784.116	1749.495	1681.988	1670.324	1665.573	1650.447	1641.705	1626.280	1622.370	1601.469
$\beta 2m_3C_{1Q}(\text{H13F})-Cu^{1+}$	1783.645	1737.224	1674.680	1665.597	1651.252	1649.184	1639.947	1627.531	1624.775	1606.120
$\beta 2m_3C_{1Q}(\text{H13F})-Cu^0$	1783.174	1723.225	1677.279	1665.620	1652.058	1638.188	1631.470	1623.271	1616.378	1609.655
$\beta 2m_3C_{1Q}(\text{H13F})$ de Cu^{2+}	1769.428	1730.154	1673.401	1660.936	1649.967	1638.770	1635.800	1632.887	1618.338	1617.994
$\beta 2m_3C_{1Q}(\text{H13})$	1502.201	1486.502	1475.370	1459.217	1454.023	1444.991	1439.438	1436.599	1434.010	1428.795
$\beta 2m_3C_{1Q}(\text{H13})$, His13 sin cargas atómicas parciales	1506.678	1494.360	1460.334	1459.803	1454.142	1447.359	1446.121	1442.495	1441.713	1432.119
$\beta 2m_3C_{1Q}(\text{H13}^+)-Cu^{2+}$	1542.685	1524.228	1502.292	1475.660	1470.259	1459.110	1455.663	1449.375	1447.345	1446.745
$\beta 2m_3C_{1Q}(\text{H13}^+)$	1551.270	1524.863	1503.903	1489.781	1476.337	1461.491	1457.954	1456.152	1454.067	1451.864
$\beta 2m_3C_{1Q}(\text{H13})_m-Cu^{2+}$	315.388	306.583	305.757	302.823	302.524	298.759	298.225	295.607	294.931	292.958
$\beta 2m_3C_{1Q}(\text{H13})_m$	309.573	309.113	307.714	307.157	305.345	302.246	298.268	296.722	295.961	293.679
$\beta 2m_1D_{UZ}$	1710.068	1689.024	1577.055	1575.916	1536.767	1494.843	1406.546	1388.942	1383.754	1371.735
$\beta 2m_1D_{UZ}-Cu^{2+}$	1731.398	1677.936	1558.459	1555.668	1524.778	1504.919	1457.782	1449.810	1430.973	1398.499

Tabla B.1: Puntuación de las conformaciones diméricas obtenidas por *docking* proteína - proteína. -

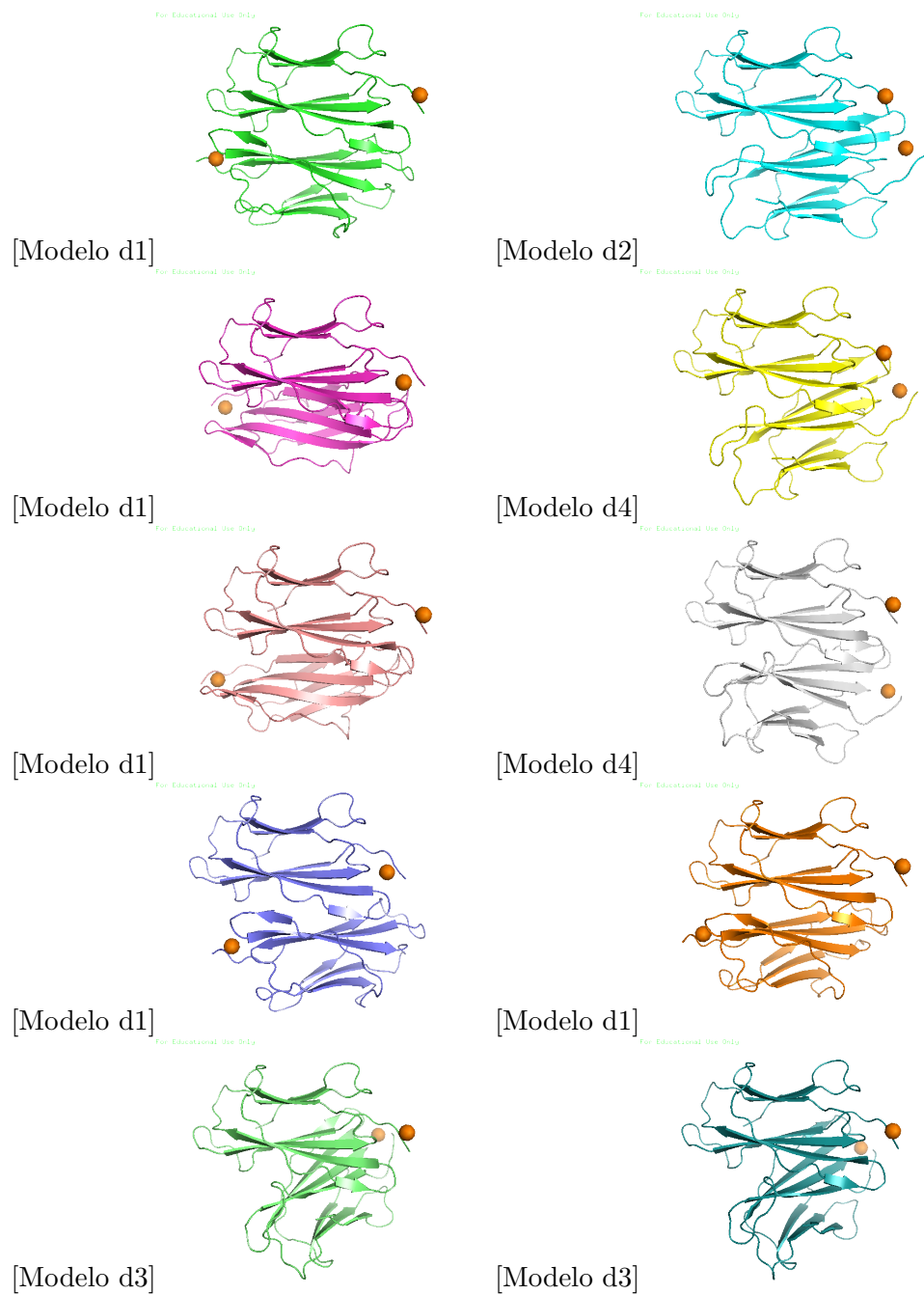


Figura B.2: Configuraciones de dímeros a partir de $\beta 2m_{3CIQ}(H13F)-Cu^{2+}$. - Cu^{+2} en esferas naranjas.

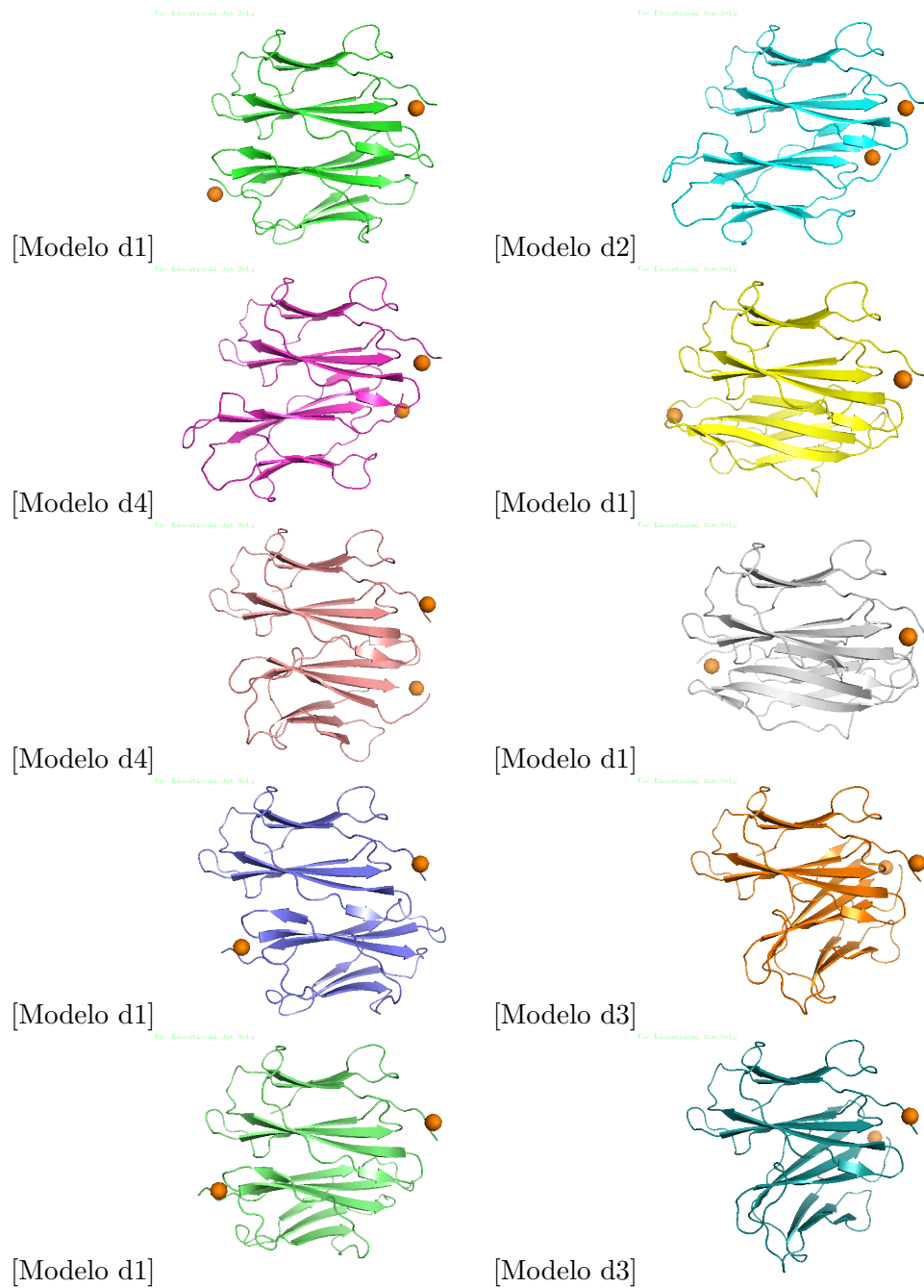


Figura B.3: Configuraciones de dímeros a partir de $\beta 2m_{3CIQ}(H13F)-Cu^{+1}$. - Cu^{+1} en esferas naranjas.

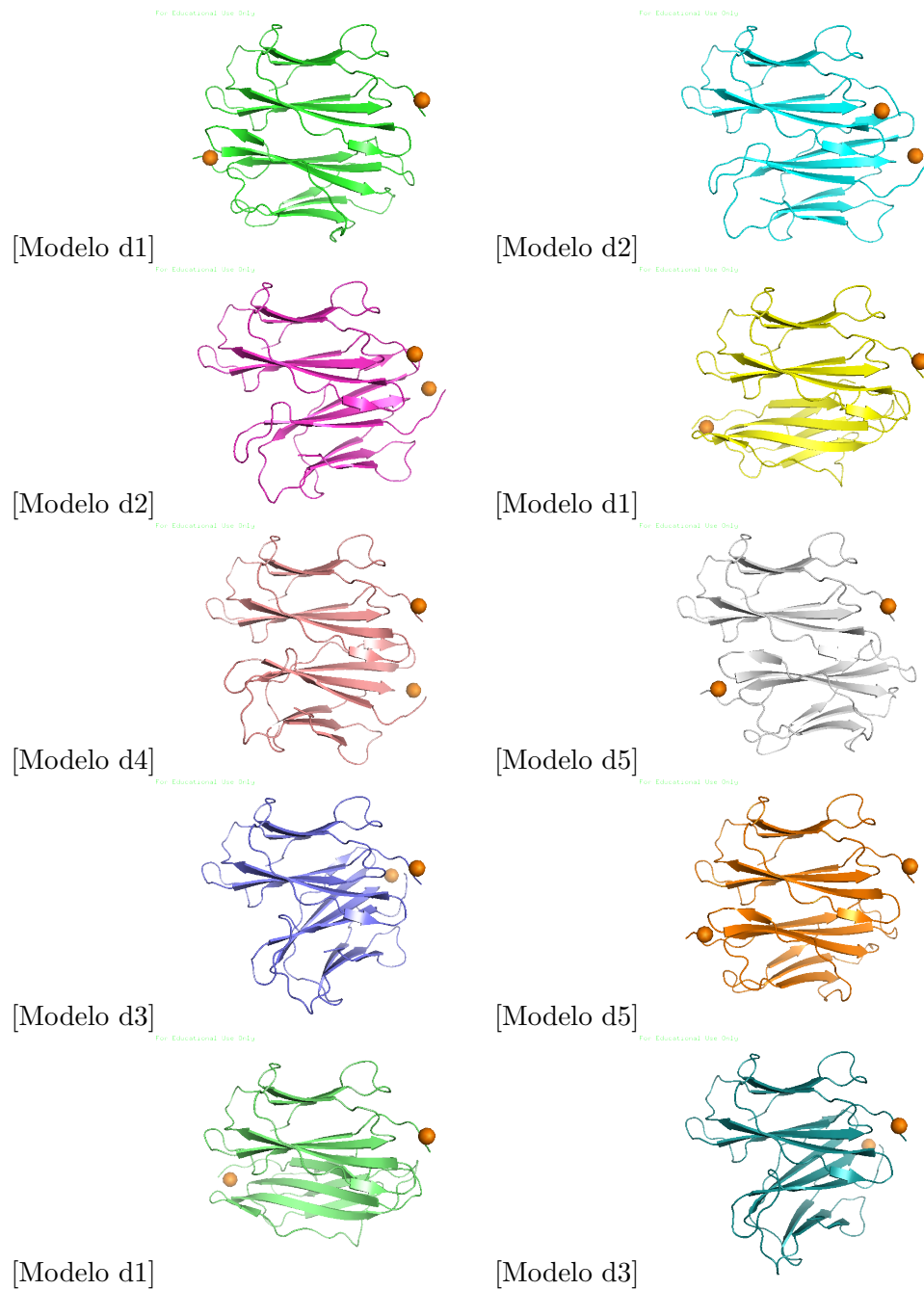


Figura B.4: Configuraciones de dímeros a partir de $\beta 2m_{3CIQ}(H13F)-Cu^0$. - Cu^0 en esferas naranjas.

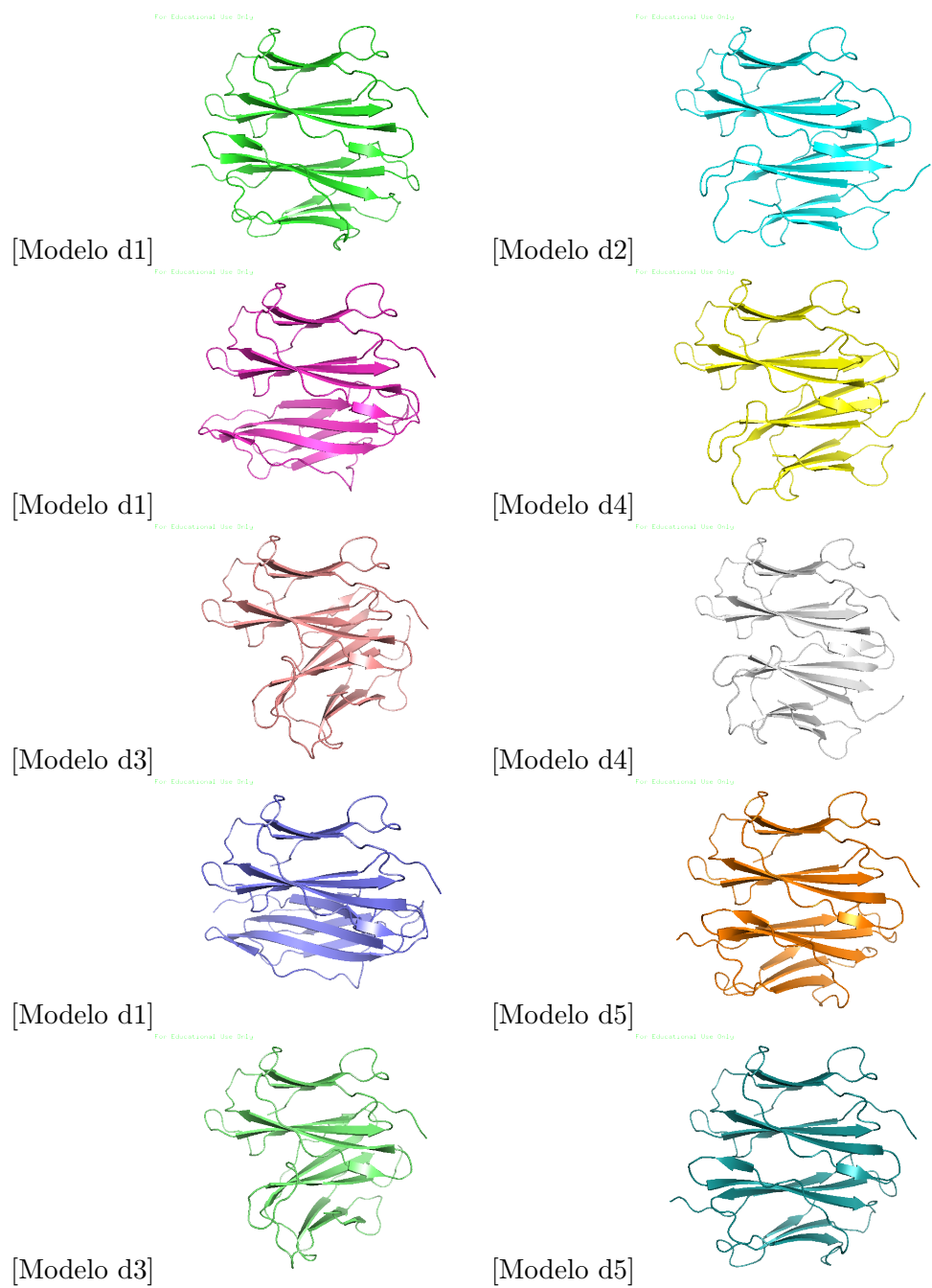


Figura B.5: Configuraciones de dímeros a partir de $\beta 2m_{3CIQ}(H13F)$. -

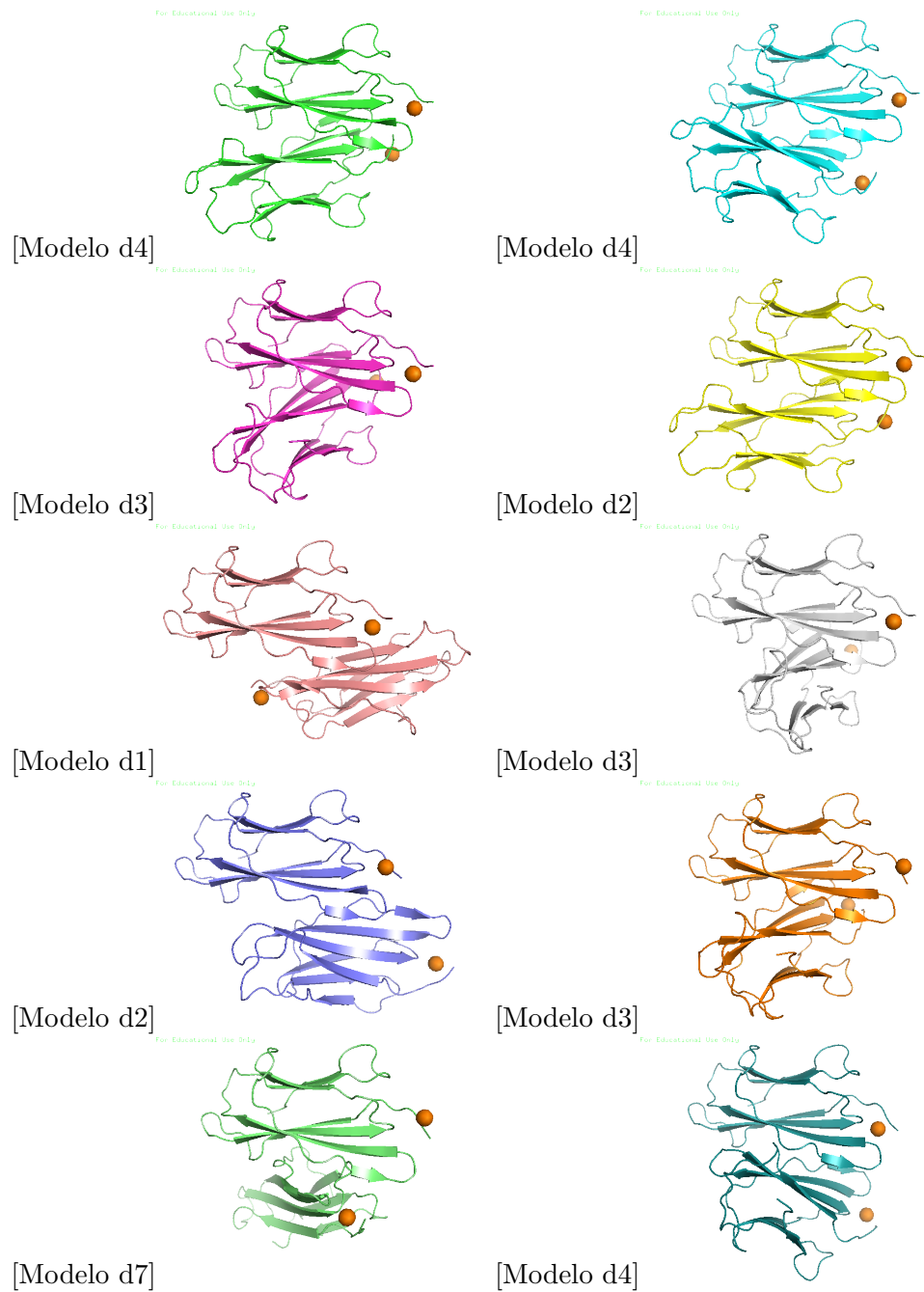


Figura B.6: Configuraciones de dímeros a partir de $\beta 2m_{3CIQ}(H13)-Cu^{2+}$. - El Cu^{+2} en esferas naranjas.

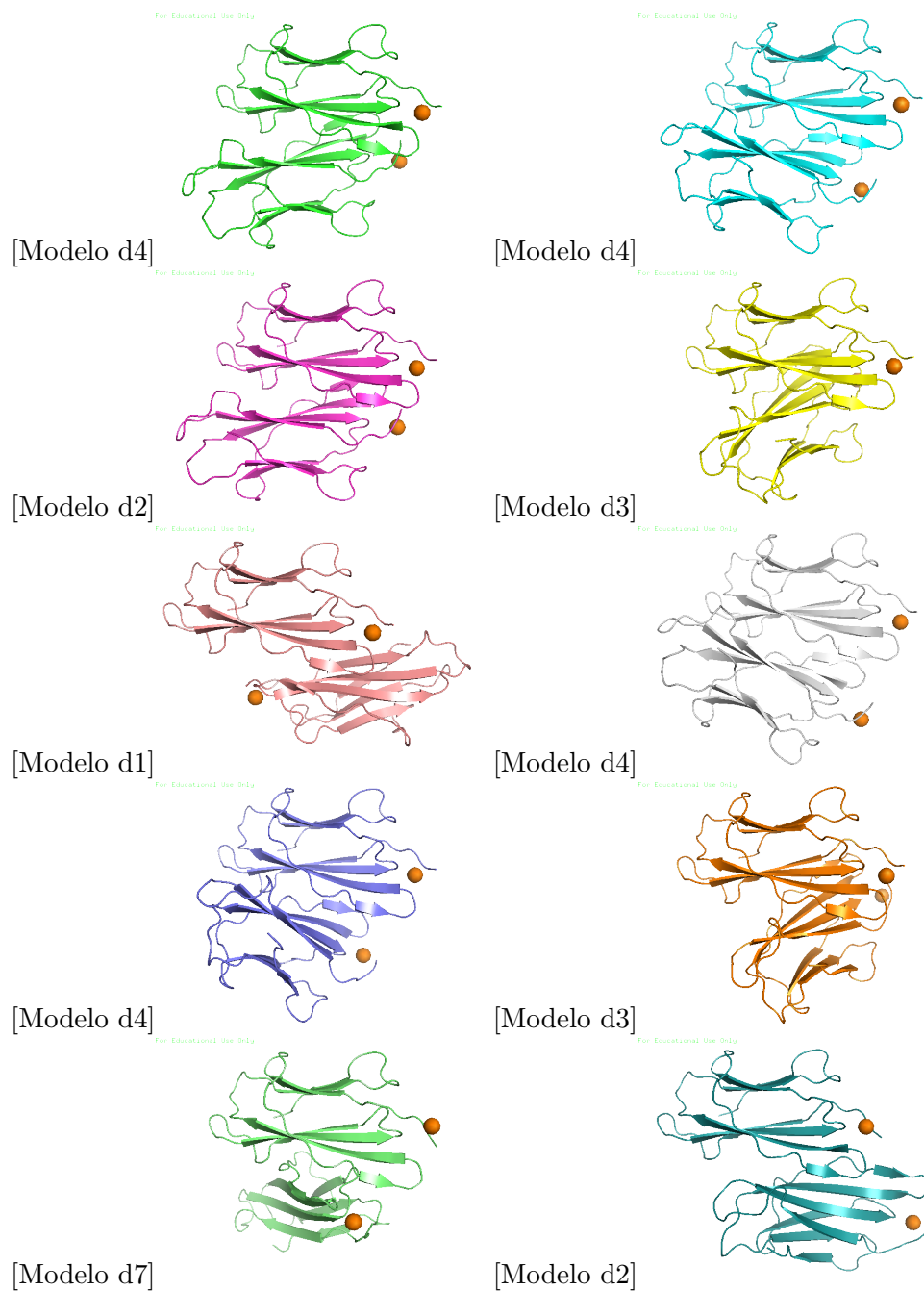


Figura B.7: Configuraciones de dímeros a partir de $\beta 2m_{3CIQ}(H13F)-Cu^{2+}$. - Cu^{+2} en esferas naranjas. Cargas atómicas parciales nulas en los átomos de la His13 durante el proceso de *docking* proteína-proteína.

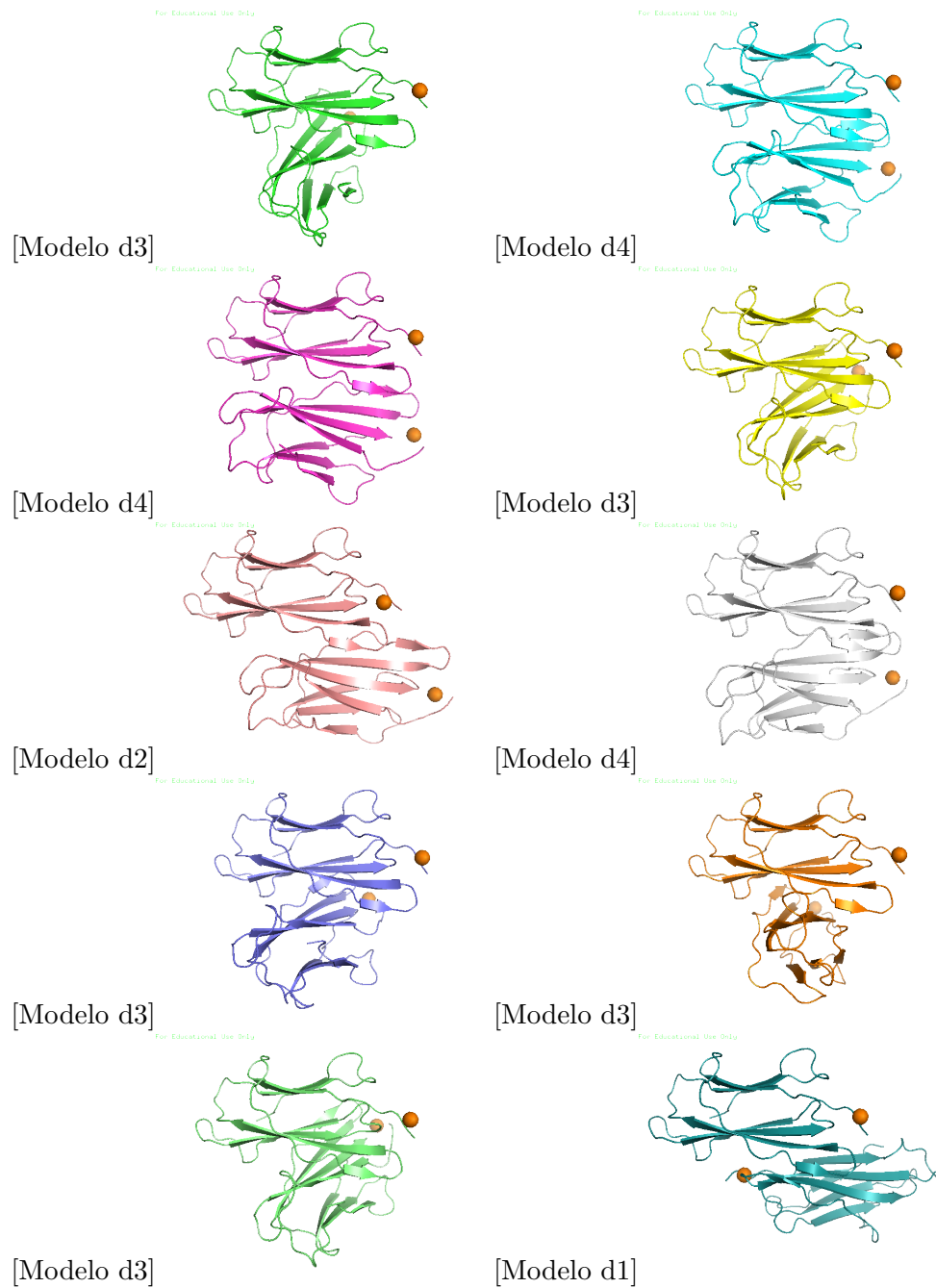


Figura B.8: Configuración de dímeros a partir de $\beta 2m_{3CIQ}(H13^+)-Cu^{2+}$. - Cu^{+2} en esferas naranjas. La His13 protonada durante el proceso de *docking*.

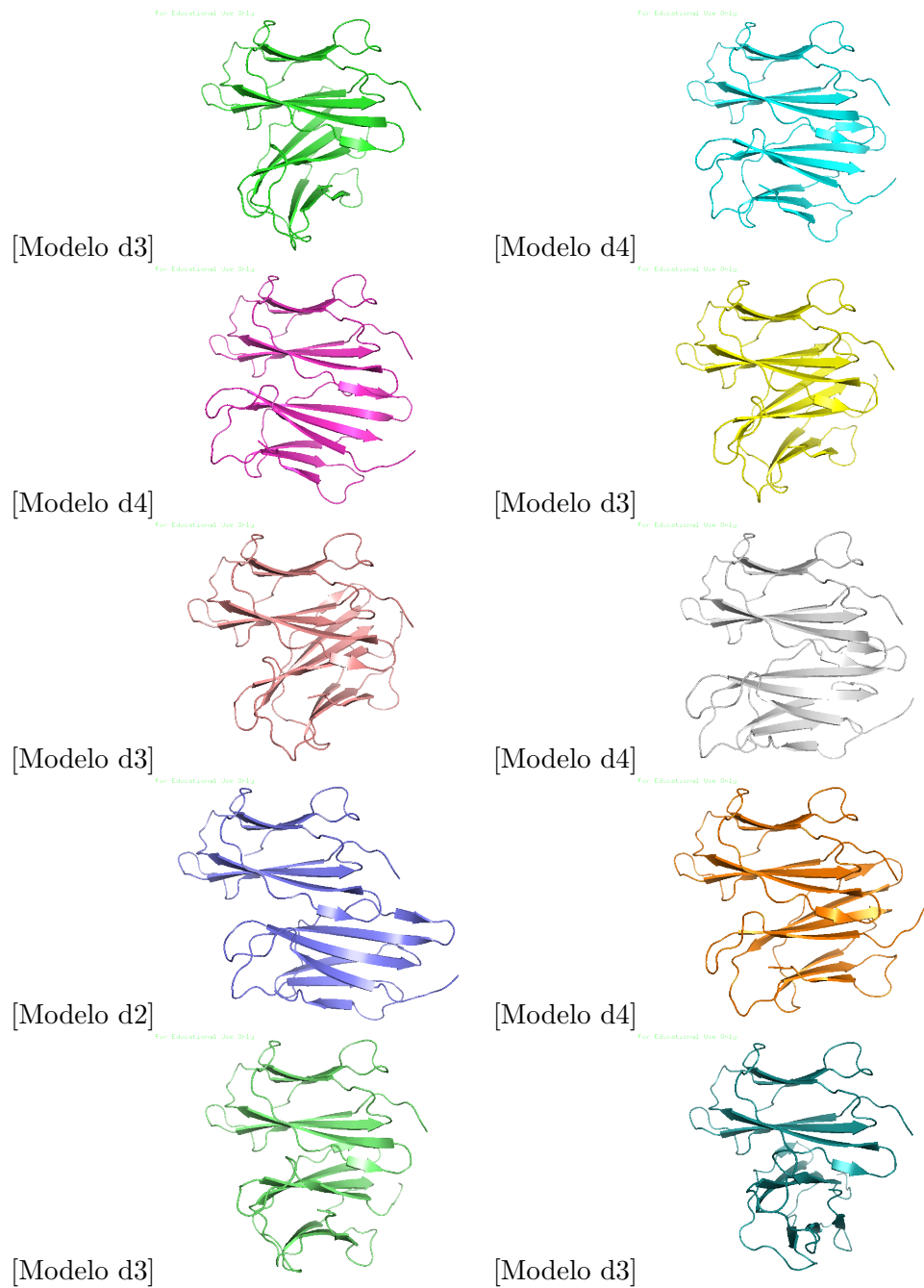


Figura B.9: Configuraciones de dímeros a partir de $\beta 2m_{3CIQ}(H13^+)$. - La His13 protonada en el proceso de *docking*.

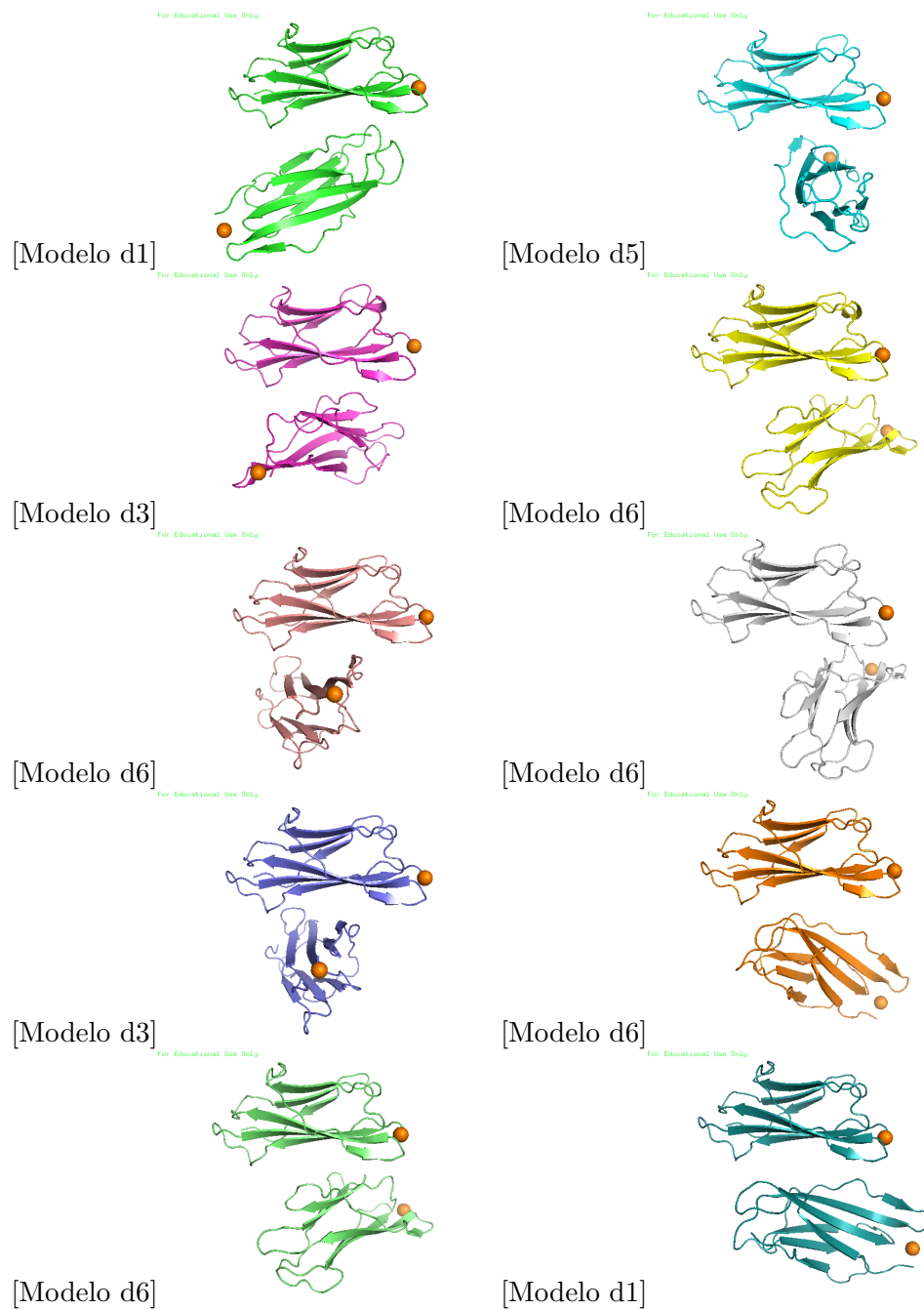


Figura B.10: Configuraciones de dímeros a partir de la $\beta 2m_{3CIQ}(H13)_m-Cu^{2+}$.

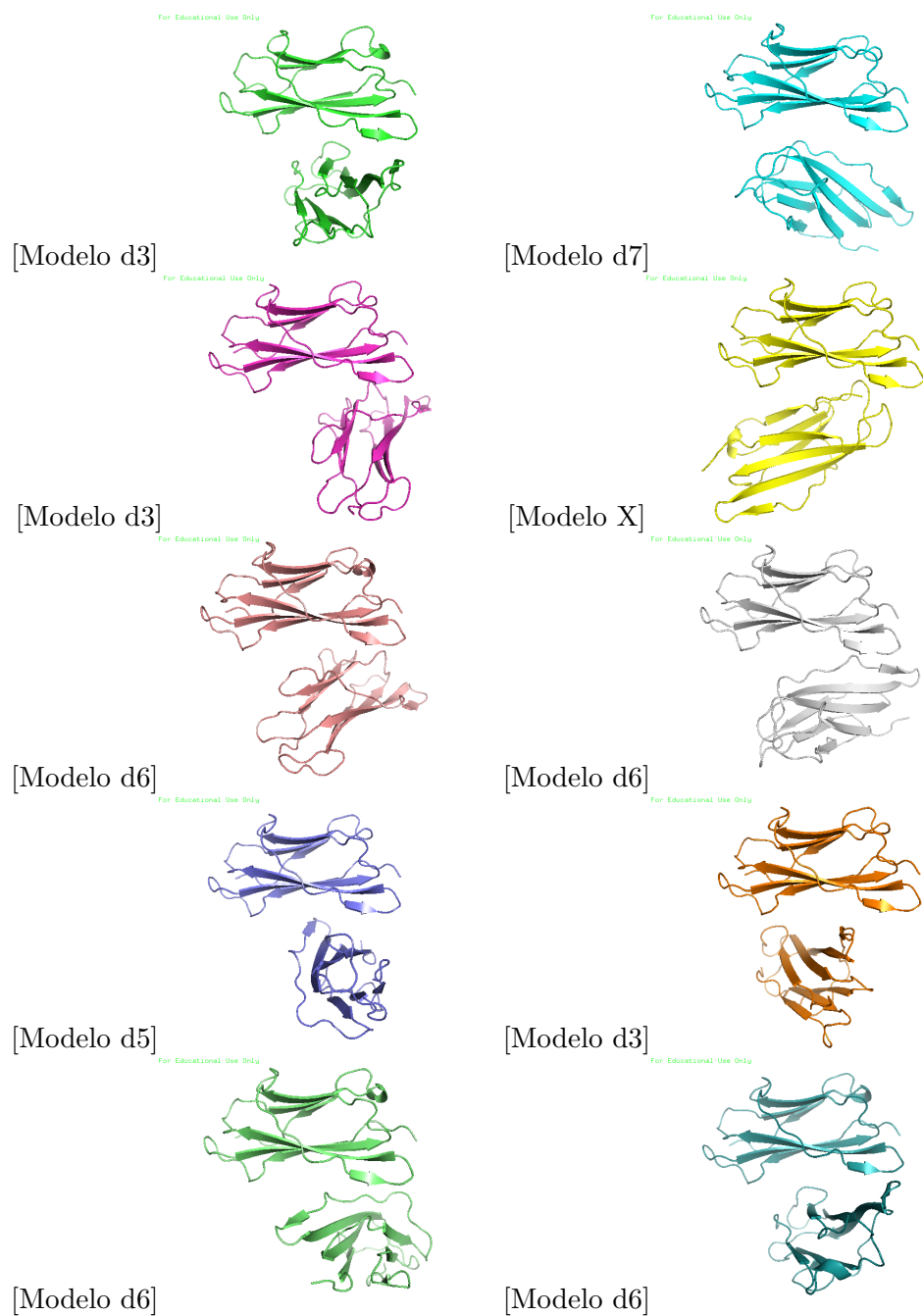


Figura B.11: Configuraciones de dímeros a partir de la $\beta 2m_{3CIQ}(H13)_m$. -

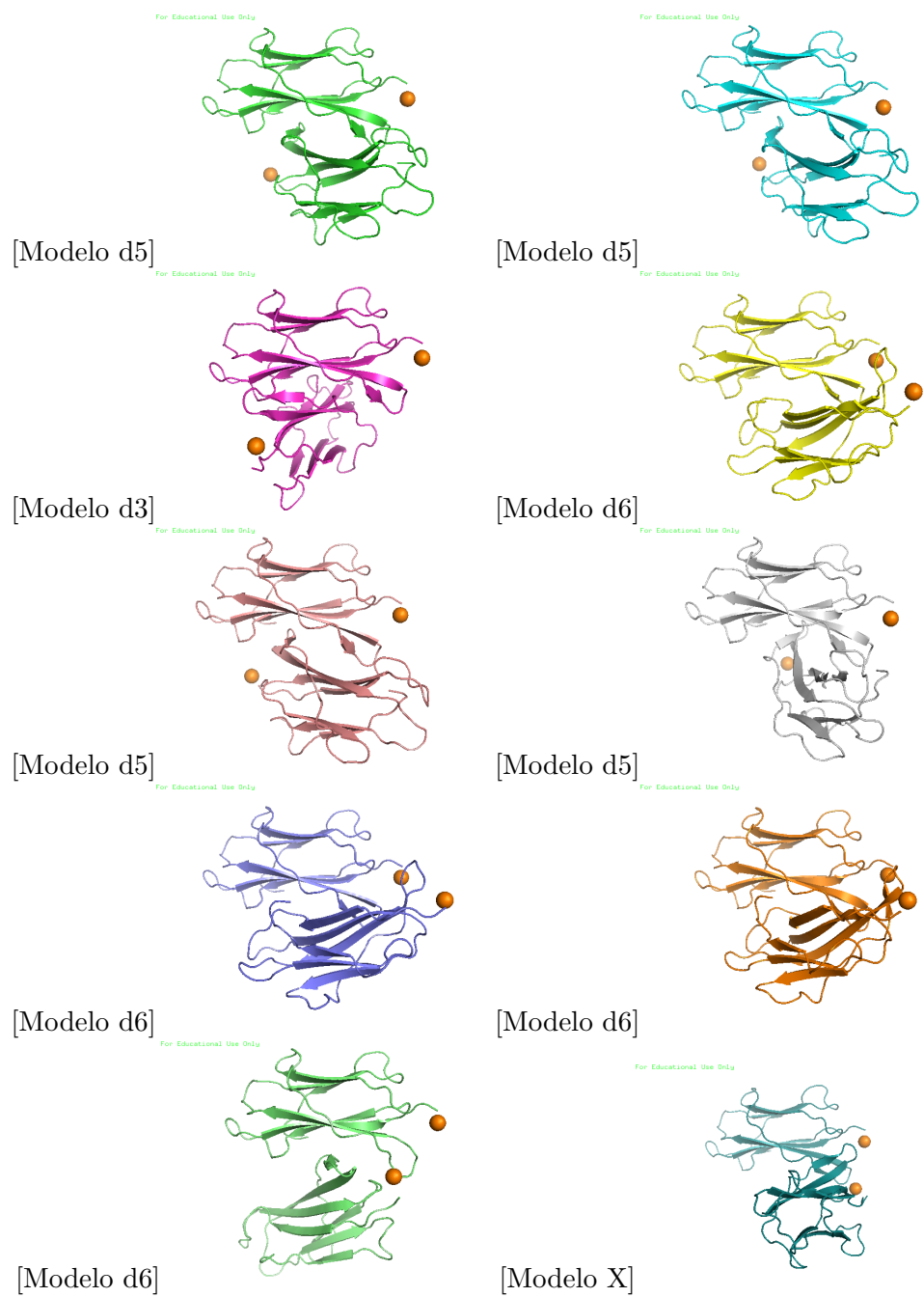


Figura B.12: Configuraciones de dímeros a partir de la $\beta 2m_{1DUZ}-Cu^{2+}$. -

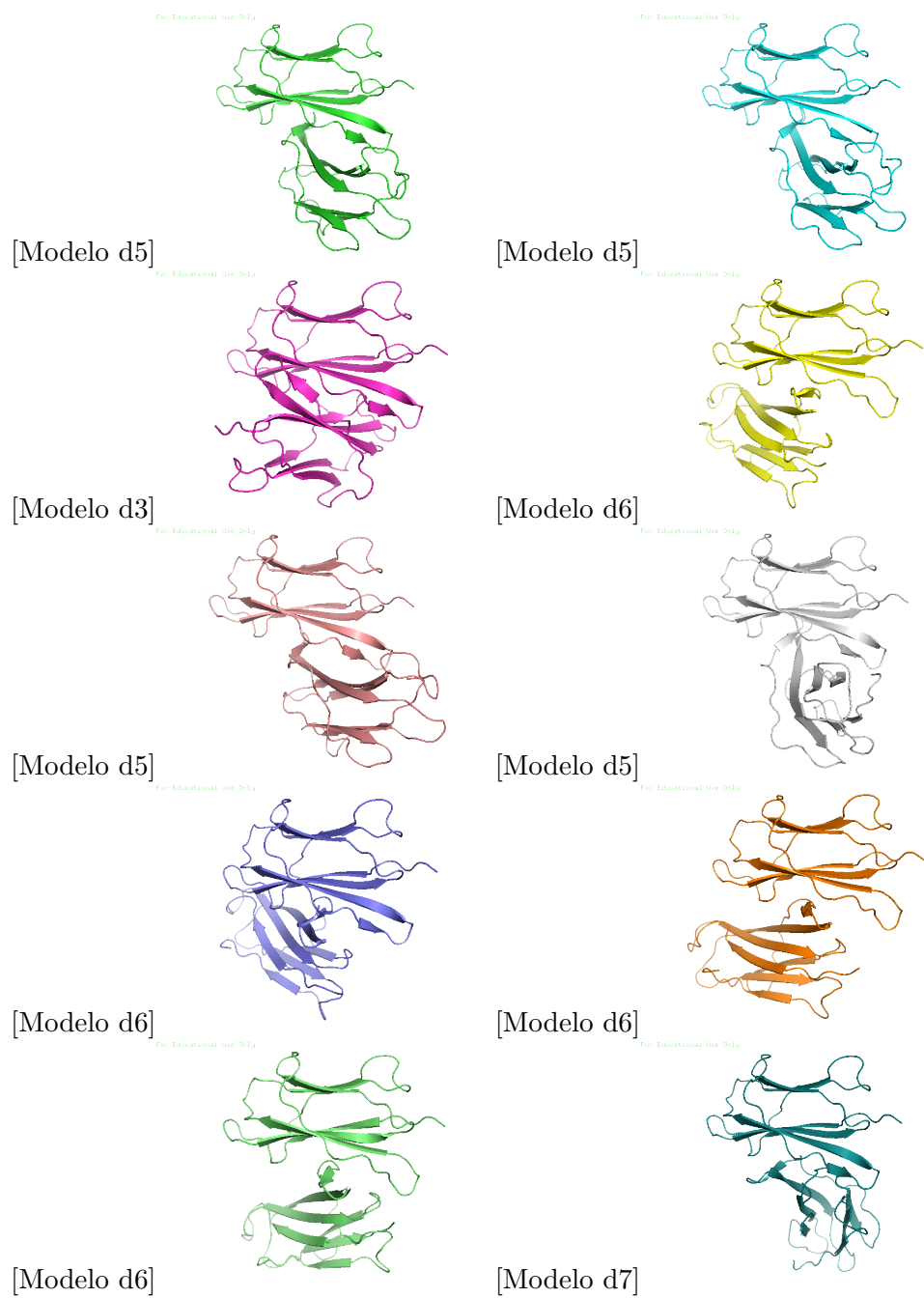


Figura B.13: Conformaciones de dímeros a partir de la $\beta 2m_{1DUZ}$. -

Apéndice C

Formación de tetrámeros.

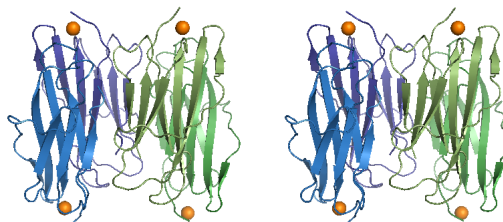
Docking / Zdock score	Tetr1	Tetr2	Tetr3	Tetr4	Tetr5
$\beta 2m_{3CIQ}(\mathbf{H13F})-Cu^{2+}$	955.824	945.234	915.578	913.023	903.086

Docking / Zdock score	Tetr6	Tetr7	Tetr8	Tetr9	Tetr10
$\beta 2m_{3CIQ}(\mathbf{H13F})-Cu^{2+}$	843.466	840.550	839.340	835.133	832.947

Tabla C.1: Puntuación de las conformaciones tetraméricas obtenidas por *docking* dímero - dímero. -

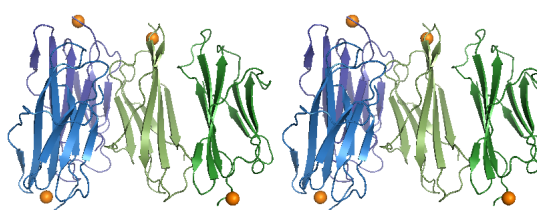
C. Formación de tetrámeros.

For Educational Use Only



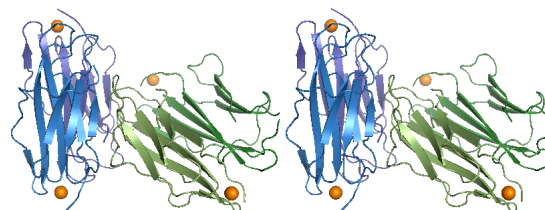
[Modelo t1]

For Educational Use Only



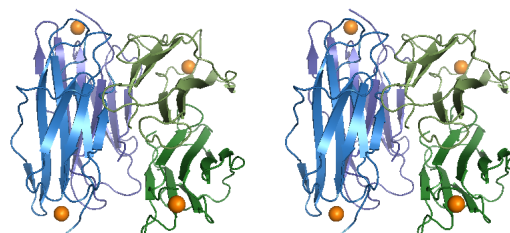
[Modelo t2]

For Educational Use Only



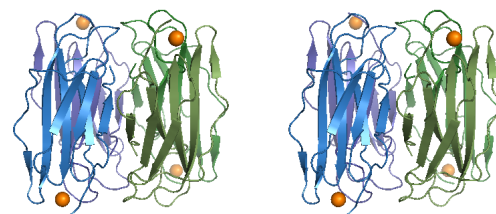
[Modelo t3]

For Educational Use Only



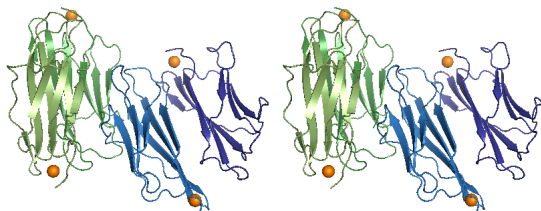
[Modelo t4]

For Educational Use Only



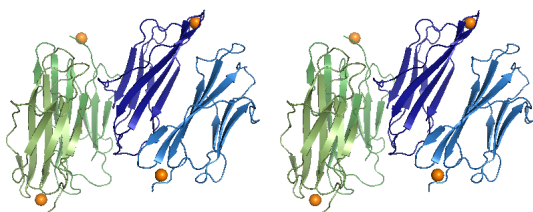
[Modelo t1]

For Educational Use Only



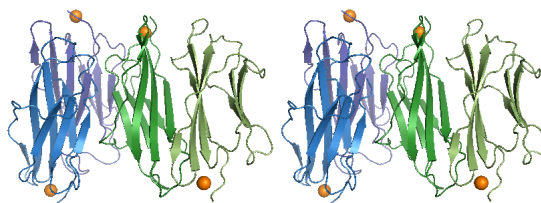
[Modelo t3]

For Educational Use Only



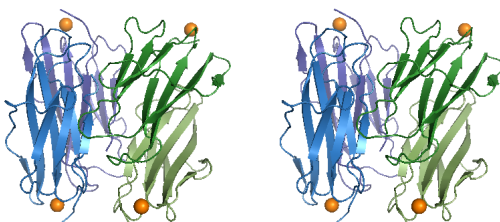
[Modelo t5]

For Educational Use Only



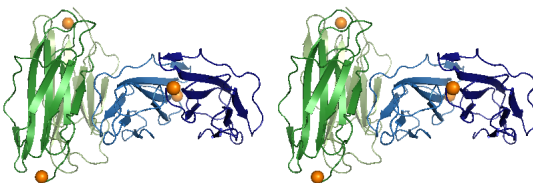
[Modelo t2]

For Educational Use Only



[Modelo t4]

For Educational Use Only



[Modelo t6]

Figura C.1: Conformaciones de tetrameros a partir de dímeros de $\beta 2m_3CIQ(H13F)-Cu^{2+}$. - Vista estéreo de la configuración de tetrameros. Cadena A en azul oscuro, B en azul cielo, C en verde bosque y D en verde tizón.