



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

ESTUDIO TEÓRICO DE LA INTERACCIÓN ENTRE
COBRE (II) Y FRAGMENTOS DEL POLIPÉPTIDO
hIAPP

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:
Q. RODRIGO CORTÉS MEJÍA

TUTOR: DR. JORGE MARTÍN DEL CAMPO RAMÍREZ
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO, JUNIO, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El Jurado, designado por el Subcomité de Permanencia, Ingreso y Egreso de la Maestría del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas de la UNAM, fue integrado por los siguientes miembros:

Presidente	Dr. Juan Manuel Aceves Hernández
Vocal	Dra. Martha Elena Sosa Torres
Vocal	Dr. Marcelo Enrique Galván Espinoza
Vocal	Dr. Carlos Amador Bedolla
Secretario	Dr. Juan Raúl Álvarez Idaboy

Agradecimientos

Al Dr. Jorge Martín del Campo, por el tiempo dedicado, las enseñanzas, los consejos, pero sobre todo, por la confianza y la amistad. Gracias por motivarme a seguir creciendo.

A la Dra. Liliana Quintanar Vera y Dra. Carolina Sánchez López, por invitarnos a contribuir con su investigación y por permitirnos germinar este proyecto. Gracias por invitarnos a construir ciencia.

A los miembros del jurado, Dr. Juan Manuel Aceves Hernández, Dra. Martha Elena Sosa Torres, Dr. Marcelo Enrique Galván Espinoza, Dr. Carlos Amador Bedolla y Dr. Juan Raúl Álvarez Idaboy, por sus comentarios y sugerencias, los cuales contribuyeron al enriquecimiento de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo económico otorgado a través de la beca No. 576697.

A la Coordinación y Personal del Posgrado en Ciencias Químicas, por la asistencia brindada durante mi estancia en el Programa.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM, DGAPA-UNAM, por los recursos económicos asignados a través del proyecto IA-104516.

A la Dirección General de Cómputo y de Tecnologías de la Información y Comunicación, DGTIC, por los recursos computacionales proporcionados mediante el proyecto SC16-1-IR-12.

A los viejos y nuevos amigos, por lo bueno y no tan bueno, por las incontables horas de estudio y compañía, y por estar siempre cerca, aún a pesar de la distancia. Me debo en buena parte a todos ustedes.

A mis padres, Elvira Mejía y José Luis Cortés, por todo lo que han hecho para ayudarme a llegar a donde estoy. Son mi inspiración y mi fuerza.

A mi hermana, Mariana, por motivarme a dar lo mejor.

A María Andrea Enríquez, por impulsarme para no dejar de lado mis sueños, por incitarme a seguir haciendo lo que me apasiona y por nunca dejar de creer en mí. Gracias por no rendirte, sé que no fue fácil. Te amo.

Este trabajo fue desarrollado en el Departamento de Física y Química Teórica de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

La producción académica derivada de este proyecto se lista a continuación:

- R. Cortés-Mejía, C. Sánchez-López, L. Quintanar, J. M. del Campo. *Caracterización de la interacción entre Cu(II) y fragmentos de amilina mediante DFT*, sesión de carteles en la XIII Reunión Mexicana de Fisicoquímica Teórica, Morelia, Mich. Noviembre, 2014.
- R. Cortés-Mejía, C. Dezi, C. Sánchez-López, L. Quintanar, J. Ireta-Moreno, J. M. del Campo. *Estudio de la interacción de Cu con el polipéptido amiloide de los islotes humano por medio de dinámicas moleculares tipo Born-Oppenheimer*, sesión de carteles de la XIV Reunión Mexicana de Fisicoquímica Teórica, Tonalá, Jal. Noviembre, 2015.
- R. Cortés-Mejía, C. Sánchez-López, L. Quintanar, J. M. del Campo. *DFT approach on the structural study of Cu (II) coordination to 18-22 fragment of human amylin peptide*, sesión de carteles del simposio "Frontiers in Computational Chemistry 2016", Ciudad de México. Agosto, 2016.
- R. Cortés-Mejía, C. Sánchez-López, L. Quintanar, J. M. del Campo. *DFT approach on the structural study of Cu (II) coordination to human amylin peptide involved in type 2 diabetes*, sesión de carteles de la "V Latin American Meeting on Biological Inorganic Chemistry", Querétaro, Qro. Octubre, 2016.
- C. Sánchez-López, R. Cortés-Mejía, M. C. Mito, A. Binolfi, C. O. Fernández, J. M. del Campo y L. Quintanar. Copper coordination features of human islet amyloid polypeptide (hIAPP): The type 2 diabetes peptide. *Inorg. Chem.* (2016) DOI: 10.1021/acs.inorgchem.6b01963.
- R. Cortés-Mejía, J. M. del Campo. *Estudio de la afinidad del fragmento 18-22 de la hIAPP hacia Zn(II)*, sesión de carteles de la XV Reunión Mexicana de Fisicoquímica Teórica, Mérida, Yuc. Noviembre, 2016.



Resumen

En varias enfermedades amiloidogénicas existe una alteración en la homeostasis de ciertos metales de transición, como Cu(II), Zn(II) y Fe(II). De este tipo de padecimientos, la Diabetes tipo 2 (DT2) está asociada con la formación de depósitos (o fibras) amiloides del polipéptido amiloide de los islotes humano (amilina o hIAPP, por sus siglas en inglés), que son altamente tóxicas para las células β del páncreas [1]. Se ha propuesto que las interacciones Cu(II)-amilina tienen la capacidad de mediar la toxicidad de los agregados [2]. Además, se sabe que al coordinarse al segmento 18-22, el cobre (II) inhibe, en cierta medida, la formación de fibras. Bajo condiciones fisiológicas, este sitio tiene un modo de coordinación 3N1O: un nitrógeno del imidazol de la histidina 18, dos nitrógenos de amida desprotonada de la cadena principal de las serinas 19 y 20 y un oxígeno, cuya naturaleza aún no está del todo resuelta [3].

Como respuesta a las interrogantes respecto al oxígeno ligante, esta contribución se encargó del estudio de varios modelos de coordinación del ion Cu(II) con el fragmento hIAPP(18-22), mediante el uso de cálculos de estructura electrónica, en el marco de la teoría de los funcionales de la densidad (DFT, por sus siglas en inglés). Los resultados obtenidos muestran que el agua tiene un papel indispensable en el comportamiento del fragmento observado experimentalmente, contribuyendo con la estabilización de estructuras, así como con la distribución del ambiente electrónico que rodea al centro paramagnético. Adicionalmente, se observó que la participación de la asparagina 22 como ligante axial al plano, en una especie de esfera secundaria de coordinación, mejora los resultados en cuanto al parámetro de EPR g_z . En ese sentido, la inclusión de ligantes axiales modifica las distancias en el centro de coordinación, particularmente la del O, que tiene el mayor efecto sobre los parámetros de EPR. Finalmente, las simulaciones BOMD revelan que es posible tener más de un modo de coordinación en el medio, induciendo una competencia entre los diferentes conformeros y la formación de fibras, contribuyendo a la inhibición de estas últimas.

Índice general

Producción Académica	VII
Resumen	XI
1 Introducción	1
2 IAPP	5
2.1 Expresión y procesamiento	5
2.2 Importancia fisiológica	8
2.3 Agregados amiloides	9
2.3.1 Amiloides de IAPP	10
2.3.2 DT2 y amiloides de hIAPP	12
2.3.3 Diferencias entre fibras y oligómeros	14
2.3.4 Oligómeros de amilina	15
2.4 Relación entre la hIAPP y el ion Cu(II)	19
3 Primeras propuestas	23
3.1 Modelos de partida: optimización local en fase gas	23
3.2 Cálculo de parámetros de EPR	24
3.3 Ligantes con oxígeno en la Serina 20: -CO y -OH	27
3.4 Sitios alternativos con oxígeno	27
3.5 EPR: $3N1O_{CO/S20}-0W$, $3N1O_{OH/S20}-0W$ y $3N1O_{CO/N22}-0W$	28
4 Microsolvatación del fragmento hIAPP(18-22)	32
4.1 $3N1O_{OH/S20}$ con 1 y 2 H_2O	33
4.2 $3N1O_{CO/S20}$ con 1 y 2 H_2O	37
5 Estudios conformacionales y de solvatación con BOMD	42
5.1 Dinámicas moleculares Born-Oppenheimer	42
5.2 Prevalencia de los modos de coordinación	43
5.2.1 Inestabilidad y evolución de $3N1O_{CO/N22}$	45

5.3	Interacción de cuatro H ₂ O con hIAPP(18-22)	48
5.4	Asparagina 22 como ligante axial	51
5.4.1	Interacciones tipo puente de hidrógeno	54
6	Conclusiones y perspectivas	60
6.1	Perspectivas	62
	Referencias	64
	Apéndice A: Publicación	67

Índice de figuras

2.1	Esquema de la secuencia de aminoácidos que ejemplifica el proceso de maduración de la prolAPP	6
2.2	Comparación de la secuencia de la prolAPP de varias especies de mamíferos.	8
2.3	Estructura de fibras amiloides a partir de dos protofibras.	10
2.4	Modelo estructural de la fibra de hIAPP e interacciones que la estabilizan.	11
2.5	Propuesta de la formación de amiloides de amilina.	14
2.6	Modelos de interacción de los oligómeros de hIAPP con membranas.	16
3.1	Diagramas de las propuestas iniciales para el complejo Cu(II)-HSSNN	24
3.2	Estructura y parámetros geométricos selectos para el modelo 3N1O_{CO/S20}-0W	28
3.3	Estructura y parámetros geométricos selectos para el modelo 3N1O_{OH/S20}-0W	29
3.4	Estructura y parámetros geométricos selectos para el modelo 3N1O_{CO/N22}-0W	30
4.1	Definición de las caras del centro de coordinación Cu(II)-HSSNN.	32
4.2	Árbol de solvatación del modelo N1O _{OH/S20} con hasta 2 moléculas de H ₂ O.	34
4.3	Árbol de solvatación del modelo 3N1O _{CO/S20} con hasta 2 moléculas de H ₂ O.	38
5.1	Perfiles de energía de las BO-MD de 3NO _{CO/S20} , 3NO _{OH/S20} y 3NO _{CO/N22}	44
5.2	Estructuras optimizadas de los mínimos extraídos de las BOMD: 3N1O _{OH/S20} y 3N1O _{CO/S20}	45
5.3	Evolución del modelo inestable 3NO _{CO/N22} a lo largo de la simulación BOMD, comparada con 3NO _{CO/S20} y 3NO _{OH/S20}	46

5.4	Perfiles de energía de dos simulaciones BOMD del modelo $3\text{NO}_{\text{CO}/\text{N}22}$ que llevan a estructuras distintas.	47
5.5	Geometrías optimizadas de puntos extraídos de las BOMD de la figura 5.1.	49
5.6	$3\text{N}1\text{O}_{\text{CO}/\text{S}20}$ con el oxígeno del carbonilo de $\text{N}22$ como ligante axial debajo y sobre el plano.	51
5.7	Modelos $3\text{N}1\text{O}_{\text{CO}/\text{S}20}$ y $3\text{N}1\text{O}_{\text{OH}/\text{S}20}$ optimizados con carbonilo de $\text{N}22$ axial.	52
5.8	Geometrías optimizadas de $3\text{N}1\text{O}_{\text{CO}/\text{S}20} \text{O}_{\text{Ax}/\text{N}22}^{-1}$ y $3\text{N}1\text{O}_{\text{OH}/\text{S}20} \text{O}_{\text{Ax}/\text{N}22}^{-1}$ con 4 H_2O	54
5.9	Estructuras optimizadas de los puntos de menor energía extraídos de la BOMD a 150K.	57

Introducción

A lo largo de muchos años de investigación, se ha identificado a la acumulación y depósito de ciertas proteínas como la causa de enfermedades etiquetadas como amiloidogénicas, de entre las cuales destacan: la enfermedad de Alzheimer, el mal de Parkinson, la enfermedad de Kreuzfeld-Jakob y la diabetes mellitus tipo 2 (DT2), vinculadas, respectivamente, con las proteínas: β -amiloide ($A\beta$), α -sinucleína, proteína prion (PrP) y amilina (o polipéptido amiloide de los islotes humanos o hIAPP, por sus siglas en inglés) [4]. Estos padecimientos se caracterizan por la formación de fibras y oligómeros protéicos (llamados amiloides) con propiedades citotóxicas, producto de la agregación de monómeros que han sufrido modificaciones en su estructura secundaria para agregarse más fácilmente, pero cuya amiloidogenicidad está vinculada directamente con su estructura primaria [5].

Originalmente consideradas como la causa patogénica de sus enfermedades asociadas, las fibras amiloides son el producto de la agregación de oligómeros y monómeros de los péptidos antes mencionados. Se ha descubierto que la formación de oligómeros es termodinámicamente desfavorable hasta cierta concentración crítica, sobre la cual inicia un proceso de nucleación. El núcleo formado es la estructura más inestable en solución, pero al tener capacidades de formación de agregados de mayor estabilidad, la adición de monómeros y oligómeros se ve favorecida [6]. Una vez formadas, las fibras amiloides tienen diámetros de entre 60 y 120 Å, son rígidas (atribuido a su estructura ordenada de hoja β apilada) y tienen longitud indefinida. Su toxicidad está principalmente relacionada con alteraciones en membrana [7], considerándose como una etapa en una cascada mucho más compleja, que eventualmente lleva a la apoptosis de la célula.

Por otra parte, hay observaciones experimentales que han llevado a considerar a los oligómeros y cuerpos prefibrilares como las especies más tóxicas en padecimientos amiloidogénicos [8]. Se ha visto que los oligómeros solubles, formados en las primeras etapas de las enfermedades, causan un deterioro celular mucho más severo que las especies formadas posteriormente [9]. Esto puede deberse a una mayor exposición de grupos funcionales que les permiten

interaccionar con membranas, otras especies presentes en el citosol y otros oligómeros amiloides. Además, el tamaño relativamente pequeño de estos agregados les confiere una gran movilidad, permitiéndoles esparcirse más fácilmente dentro y fuera del medio celular.

En el particular caso de la amilina (hormona peptídica compuesta por 37 aminoácidos con secuencia 1-KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGAILSSTNVGSNTY-37, ubicada en las células β del páncreas), se han identificado tres regiones distintas que le confieren una enorme propensión a agregarse: i) región fibrillogénica alteradora de membrana (residuos 1-19), ii) región amiloidogénica (residuos 20-29) y iii) región mejoradora de formación de amiloide (residuos 30-37) [1]. A pesar de esto, al interior de los gránulos en donde es almacenada y de donde, eventualmente, es secretada, no se ha observado agregación considerable. Entre las causas por las cuales no hay agregados al interior de los gránulos, resalta la presencia de iones Zn^{2+} en concentraciones relativamente altas.

En contraste con lo anterior, se ha observado en la gran mayoría de pacientes con DT2 una incidencia muy alta de fibras y oligómeros amiloides dentro de las células β , responsables de la pérdida de dichas células, que además están encargadas de la producción de insulina. Debido a que un síntoma común de la DT2 es la deficiencia de Zn (II), y que, además, se ha observado pérdida de homeóstasis de otros iones metálicos divalentes (como Cu(II) y Fe(II)), varios grupos de investigación han propuesto a estos iones divalentes como inhibidores del mecanismo de fibrilación, identificándolos simultáneamente como promotores de formación de oligómeros (solubles y no solubles) [8].

Aunque los mecanismos por los cuales los iones Zn(II) y Cu(II) inhiben la formación de fibras siguen sin conocerse totalmente, hay evidencias que apuntan a que la coordinación de estos iones en ciertas regiones de los péptidos restringe la estructura (de forma más o menos localizada), retrasando el proceso de formación de fibras y favoreciendo la permanencia de oligómeros [10]. Desafortunadamente, dada la heterogeneidad estructural y las características metaestables de los péptidos, resulta extremadamente difícil poder estudiarlos bajo condiciones fisiológicas, e incluso utilizando técnicas de estabilización la tendencia por formar agregados predomina. Recientemente, L. Rivillas-Acevedo *et al.* identificaron al fragmento 18-22 como la secuencia

mínima necesaria para coordinar Cu(II) a la hIAPP [3]. Se demostró también que el modo de coordinación de estos complejos es 3N1O (a pH fisiológico), existiendo cierta discrepancia respecto al oxígeno, que podría provenir de un carbonilo de la cadena peptídica o el hidroxilo de una serina.

Los efectos del Cu(II) sobre la conformación de la amilina, que han podido observarse, han dejado muy claro que es necesario elucidar el mecanismo de acción de los iones sobre los monómeros y oligómeros de estos péptidos [11]. Esta situación ha servido como motivación para utilizar simulaciones y cálculos teóricos, los cuales permiten evitar muchas de las complicaciones experimentales para poder estudiar las interacciones específicas con las cuales el Cu(II), y otros metales, se coordinan con los monómeros, oligómeros y fibras amiloides, así como la forma en que pueden afectar las conformaciones y procesos de agregación de los mismos.

La presente contribución se centra en el estudio, mediante un enfoque computacional, de la estructura e interacción del fragmento 18-22 con el ion metálico Cu(II), pues conocer la forma en que este ion afecta la conformación local del fragmento puede brindar información acerca del efecto que tendrían sobre la estructura del péptido completo, así como sobre la formación de oligómeros y fibras amiloides. Caracterizar estas interacciones es de gran relevancia en la búsqueda de posibles estrategias terapéuticas para combatir un padecimiento que afecta a casi 9% de la población mundial (~ 422 millones de personas) mayor de 18 años [12].

El **polipéptido amiloide de los islotes** (IAPP, por sus siglas en inglés), o amilina, fue nombrado tras una de sus características más representativas: la alta propensión por formar agregados amiloides. Estos agregados, mayormente observados en pacientes con diabetes tipo 2 (DT2), están vinculados con la pérdida de células β del páncreas [1], además de contribuir mediante otros mecanismos con la patogénesis de dicha enfermedad. Sin embargo, bajo condiciones normales, este péptido está encargado de desempeñar funciones relacionadas con la regulación glicémica. Se presume que la acción nociva de la amilina surge, como en muchos otros casos, por defectos de plegamiento y maduración de la misma, aunque la intervención de otros factores del medio no se han descartado. En este contexto, esta sección tiene como objetivo presentar al sujeto de estudio de este trabajo de investigación mediante la descripción de algunas de sus características fisiológicas más relevantes, así como el papel que desempeñan en la formación de agregados amiloides y la relación de estos últimos con los sistemas en los que se originan.

2.1 Expresión y procesamiento

El polipéptido amiloide de los islotes es expresado, principalmente, en los islotes de Langerhans de las células β del páncreas, como parte de un pre péptido de 89 residuos de aminoácidos (aa), llamado pre-proamilina (preproIAPP) [13]. Esta pre-proteína cuenta con un segmento de señalización de 22 aminoácidos, el cual es removido dentro del retículo endoplásmico rugoso, generando la proIAPP. Posteriormente, el péptido de 67 aa es procesado por dos endoproteasas, dentro de los gránulos secretores, que eliminan secuencias auxiliares del plegamiento de la proteína, pero que en su forma funcional no tienen utilidad: la prohormona convertasa 2 (PC2), encargada de reconocer al sitio Lys10Arg11, hacia el lado N terminal, para remover un segmento de 11 residuos; y la prohormona convertasa 1/3 (PC1/3), que identifica al sitio Lys50Arg51, ubicado hacia C terminal, para eliminar otro segmento de 16 aa. El proceso de maduración

es completado por la carboxipeptidasa E (CPE), al eliminar la lisina y arginina restantes, tras el tratamiento con la PC1/3, exponiendo al C terminal para ser amidado. La forma funcional de la IAPP, ya de 37 aminoácidos, se obtiene tras formarse un puente disulfuro entre las cisteínas 2 y 7. Esta secuencia de pasos se esquematiza en la figura 2.1.

La IAPP en estado monomérico, y en solución, no tiene una forma globular compacta, como otros monómeros relacionados con enfermedades amiloides, sino que se trata de una proteína nativamente desdoblada, aunque esto no implica que se trata de un péptido desordenado, pues se ha visto, mediante experimentos de RMN, que la región comprendida entre los residuos 5 y 20 adquiere una conformación de hélice, al estar en solución [14]. Incluso, la IAPP puede adquirir arreglos relativamente más ordenados al interactuar con membranas y ambientes similares. Existen pruebas que muestran la formación de dos hélices unidas por una asa en sistemas de amilina humana (hIAPP) con bicapas lipídicas, indicando la propensión del C terminal para formar hélices. En contraste, en experimentos similares hechos con amilina de rata (rIAPP), se tiene que el lado C terminal permanece desordenado. Esto se atribuye a la presencia de varios residuos de prolina en rIAPP que no están presentes en hIAPP (figura 2.2).

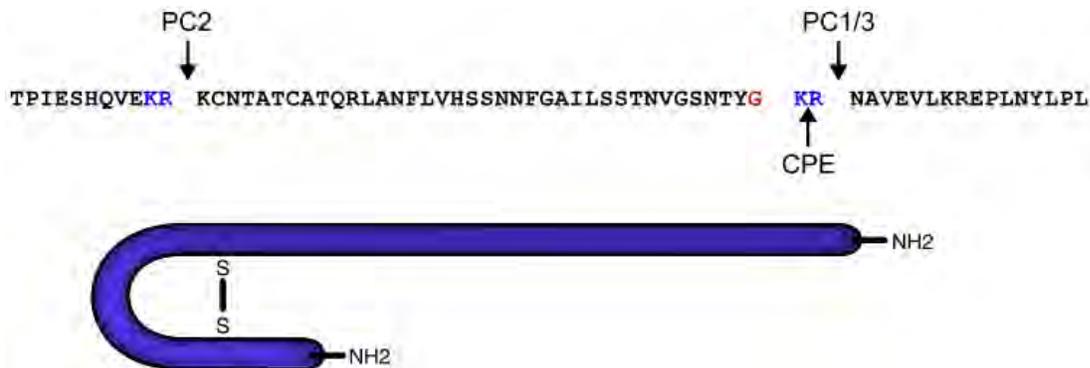


Figura 2.1: Esquema de la secuencia de aminoácidos que ejemplifica el proceso de maduración de la proIAPP. Las flechas indican los sitios de corte de las endoproteasas: a la izquierda (N terminal) se indica el sitio de la PC2, mientras que a la derecha (C terminal) se muestra el de la PC1/3. En azul se muestran los sitios de reconocimiento KR, que del lado C terminal es eliminado por la CPE para amidar el sitio COOH terminal. La figura morada esquematiza la formación del puente disulfuro [1].

La expresión de la IAPP está encomendada a un gen altamente conservado ubicado en el cromosoma 12, en contraste con la insulina y otras calcitoninas, que son codificadas en genes relacionados evolutivamente con el cromosoma 11. Tanto los genes de la amilina, como de la insulina contienen elementos promotores similares y el factor de transcripción PDX1, que regula el efecto de la glucosa sobre ambos genes. Tras estimular a las células β con glucosa, se obtiene una respuesta con expresión paralela de insulina y amilina, aunque existen factores que pueden alterar dicha respuesta. Ambas son almacenadas en los mismos gránulos secretores y procesadas por las mismas enzimas, aunque en sitios distintos. La proporción de secreción IAPP/insulina es 1:10, aunque la rapidez de maduración de la primera es considerablemente menor que la segunda [15].

Aunque la amilina es expresada principalmente en las células β del páncreas, también se ha observado en células δ de rata, en el tracto intestinal de ratón, rata y humano, y en ciertas neuronas sensoriales de rata y ratón. Esta hormona peptídica altamente conservada también se expresa en pollos, principalmente en el cerebro e intestino, y en mucha menor proporción en el páncreas. Los mecanismos de síntesis, almacenamiento y secreción en sitios fuera del páncreas se desconocen [1].

Dentro de los gránulos secretores, la insulina forma hexámeros asociados con zinc (componente principal de los gránulos), mientras la IAPP, junto con otros componentes permanecen en el medio. Dada la agresiva naturaleza amiloidogénica de la amilina, junto con las relativas altas concentraciones de esta dentro de los gránulos, es necesario protegerla para evitar la formación de agregados [16]. De los posibles mecanismos de protección, destacan las propiedades ácido base de los sitios: la estructura de formas protonadas y las repulsiones electrostáticas entre residuos cargados evitan la agregación [17]. Adicionalmente, existe una composición bastante compleja que promueve interacciones inhibitorias: se ha observado que la insulina tiene una alta capacidad para inhibir la formación de agregados, al interactuar con el segmento corto de la IAPP (previo al puente disulfuro) [16]. Cualquier alteración a las concentraciones en el medio y los gránulos de insulina e IAPP podría traducirse en agregación y formación de fibras.

2.2 Importancia fisiológica

La función de la IAPP no se entiende del todo, aunque se sabe que desempeña un papel muy importante, pues la secuencia principal está altamente conservada, en comparación con sus residuos complementarios, los cuales presentan más variaciones al comparar entre especies (figura 2.2). Como se mencionó anteriormente, la IAPP es almacenada junto con la insulina dentro de vesículas secretoras. A raíz de esto, resultó razonable pensar que se encontraba vinculada con tareas similares a las de la insulina, como el metabolismo de la glucosa. Poco después de su identificación, se descubrió que la amilina inhibe la absorción de glucosa estimulada por insulina, así como la síntesis de glucógeno en músculo. También se mostró que puede interferir en el transporte de glucosa inducido por insulina, lo cual llevó a creer que tenía la capacidad de inducir resistencia a la insulina. Gracias a los trabajos acerca de la IAPP, actualmente se le atribuyen dos papeles fisiológicos principales: como una molécula paracrina en los islotes de Langerhans y como hormona con efectos sobre el sistema nervioso central.

	1	10	20	30	40	50	60	
Humano	TPIES	HQVEKR	KCNTATCATQRLANFLVHS	SNNFGAILSS	TNVGSNTYG	KRNAVEVLKREPLNYLPL	(29,257)	
Macaco	TPIES	HQVEKR	KCNTATCATQRLANFLVRS	SNNFGTILSS	TNVGSDTYG	KRNAVEVLKREPLNYLPL	(268)	
Mandrill	TPIES	HQVEKR	ICNTATCATQRLANFLVRS	SNNFGTILSS	TNVGSDTYG	KRNAVEVLKREPLNYLPL	(120)	
Gato	TPIES	NQVEKR	KCNTATCATQRLANFLIRS	SNNLGAILSP	TNVGSNTYG	KRSTVDILNREPLNYLPP	(256)	
Perro	TPIKS	HQMEKR	KCNTATCATQRLANFLVRT	SNNLGAILSP	TNVGSNTYG	KRNTIEILNRGPLNYLPL	(9,162,268)	
Rata	TPVSGGTNPQVDKR	KCNTATCATQRLANFLVRS	SNNLGPVLP	TNVGSNTYG	KRNAEDPNRESLDFLL	(197,256)		
Ratón	TPVRSGSNPQMDKR	KCNTATCATQRLANFLVRS	SNNLGPVLP	TNVGSNTYG	KRNAAGDPNRESLDFLLV	(256)		
Hamster	TPVRSGTNHQMDKR	KCNTATCATQRLANFLVHS	NNNLGPVLS	TNVGSNTYG	KRSAAEIPDGDSDLDFLL	(255)		
Cuyo	TSIASDTGHQVGKR	KCNTATCATQRLTNFLVRS	SHNLGAALLP	TDVGSNTYG	KRNAPQISDRELLHYLPL	(256)		
Degu	TPIASDTHRVDKR	KCNTATCATQRLTNFLVRS	SHNLGAALLP	TKVGSNTYG	RRNA EVVDVELLHYLPL	(258)		
Vaca	GGGKPTESHQMEKR	KCGTATCETQRLANFLAPS	SNKLGALFSP	TKMGSNTYG	KRKKVEILKREPLSYLPI	(108)		

Figura 2.2: Comparación de la secuencia de la proIAPP de varias especies de mamíferos. Se observa la alta conservación del péptido, salvo por la región 31-40 (marcada por el recuadro rojo), que corresponde con el fragmento 20-29 de la IAPP madura. Las especies que no desarrollan amiloides tienen una mayor cantidad de prolina en esta zona [1].

En cuanto al efecto sobre las células β de los islotes, se observó en experimentos con ratas que la IAPP tiene un funcionamiento dual, pues limita la cantidad de insulina secretada como respuesta a la presencia de glucosa, pero también limita la rapidez con la que se elimina la glucosa presente en la sangre [18]. Adicionalmente, aunque con resultados menos contundentes, se ha visto que la IAPP puede inhibir la secreción de glucagón.

Fuera del efecto directo sobre los islotes, la influencia de la amilina sobre la ingesta de alimentos está documentada. Se han encontrado receptores para IAPP en varios sitios del cerebro, así como sitios de expresión, aunque no se sabe si este proceso de señalización tiene efectos relevantes sobre la alimentación [19]. Lo que sí es cierto es que, a través de la interacción con receptores cerebrales, la amilina tiene la capacidad de inhibir el vaciado gástrico, ayudando a evitar picos de glucosa en períodos postprandiales [1].

2.3 Agregados amiloides

Agregado amiloide es un término genérico utilizado para hacer referencia a una forma específica de agregados protéicos en los cuales los componentes, habiendo adquirido una estructura de pasador, o fibra β , se asocian principalmente por interacciones de puentes de hidrógeno, creando estructuras altamente estables con forma de fibras cortas en una conformación conocida como β *cruzada*, en donde los monómeros se orientan de forma perpendicular al eje de elongación de las protofibras [1, 20], las cuales se envuelven mutuamente conforme la fibra se alarga. La formación de fibras amiloides se esquematiza en la figura 2.3.

La formación de agregados amiloides ocurre en una gran cantidad de proteínas dentro de una amplia variedad de organismos (en los humanos existen 25 proteínas reportadas con esta capacidad). Entre el grupo de proteínas que pueden formar agregados amiloides, existe predominancia de hormonas peptídicas, posiblemente por el tamaño reducido de sus cadenas, así como su existencia en altas concentraciones y la falta de una estructura secundaria bien definida.

En el caso particular de la de la amilina, la agregación nociva no ocurre únicamente en humanos, sino también en otras especies de mamíferos, como consecuencia de su alto grado de conservación. Sin embargo, existen variaciones que parecen contribuir a la inhibición de estos agregados. Un ejemplo destacable surge entre la hIAPP y la rIAPP, las cuales difieren únicamente en 6 aa en la región 20-29 (ver figura 2.2). Como consecuencia de estas diferencias, la hIAPP cuenta con una forma de pasador β que es inexistente para la IAPP

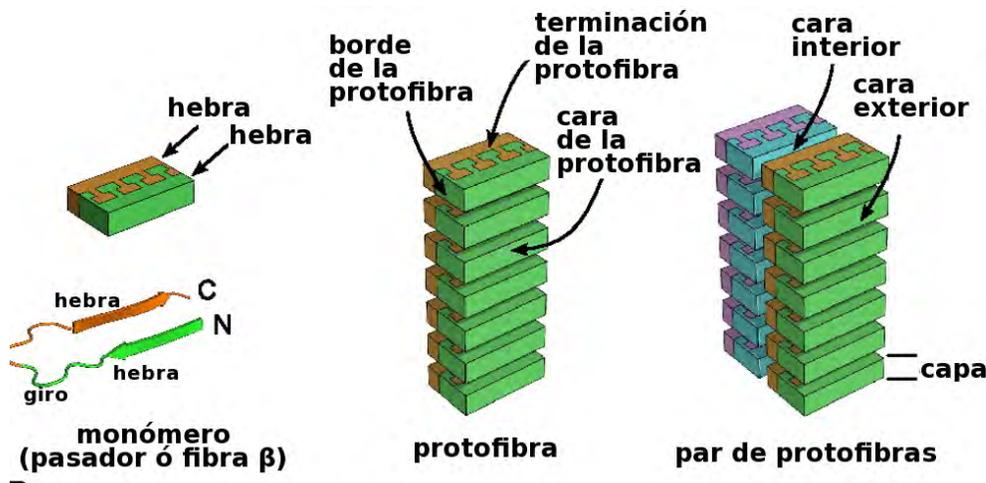


Figura 2.3: Estructura de fibras amiloides a partir de dos protofibrilas. De izquierda a derecha: los monómeros adquieren forma de pasador, con dos hebras con residuos intercalados unidas por un giro; los monómeros se apilan en capas antiparalelas para que los extremos N y C terminal (amarillo y verde, respectivamente) queden agrupados en cada cara de la protofibrila, mientras que los bordes quedan conformados por los giros alternados; el par de protofibrilas se forma por la interacción de la cara formada por los C (o N) terminal de dos fibras paralelas [20].

de rata, ya que esta sólo adquiere una estructura helicoidal, más compacta, hacia N terminal [21].

2.3.1 Amiloides de IAPP

En relación a la formación de amiloides, se considera que la amilina tiene tres regiones relevantes para el proceso: la primera se ubica entre los residuos 1 a 19 y es conocida como N terminal fibrillogénico disruptor de membrana (aunque se esperaría que los primeros siete residuos no participen a causa de restricciones conformacionales causadas por el puente disulfuro), el cual tiene la mayor influencia sobre la cinética de formación de fibras; la segunda es la zona amiloidogénica (cuya participación en el proceso de fibrilación es, quizás, la mas importante), contenida en la zona 20-29 y, finalmente, el segmento C terminal, relacionado con mejorar la formación de amiloides [10].

Existen dos propuestas para la formación y estabilización de fibras de amilina, las cuales comparten ciertos aspectos. Ambas parten de un arreglo paralelo,

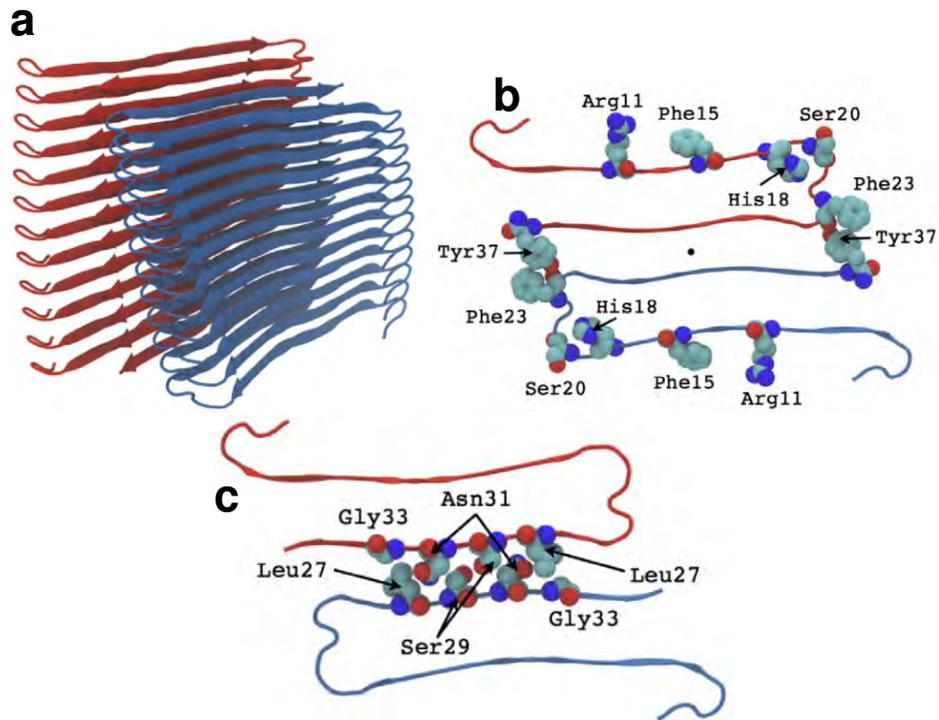


Figura 2.4: Modelo estructural de la fibra de hIAPP e interacciones que la estabilizan. La figura **a** esquematiza la manera en que se apilan los monómeros (dos fibras unidas por una asa) para formar las protofibras (columnas roja y azul) que darán lugar a la fibra amiloide. Las figuras **b** y **c** contienen secciones transversales de las fibra de la figura **a** con los residuos clave resaltados, las cuales muestran los mecanismos propuestos para la estabilización de protofibras: en **b** los residuos Arg11, Ala13 y Phe15 quedan expuestos al medio, mientras que la estabilización se da por la interacción de los residuos Phe23 y Tyr37 de las columnas vecinas; en **c** se presenta la estabilización por medio de cierres estéricos, formados principalmente por intercalamineto de los residuos Leu27, Ser29, Asn31 y Gly33 de ambas cadenas [14].

y alineado, de monómeros en conformación de pasadores β apilados, en donde cada monómero tiene una conformación de dos hebras β unidas por un giro (figura 2.4a). Las fibras están compuestas por dos columnas (protofibras) de estos arreglos de monómeros, los cuales forman puentes de hidrógeno intermoleculares con los pasadores β adyacentes de la misma columna (hacia el eje de elongación de la fibra). En la primera propuesta, derivada de RMN, las fibras β de cada pasador están hechas de los segmentos 8-17 y 28-37, y el giro incluye a los aminoácidos 18-27. Al alinearse las columnas, los residuos Arg11, Ala13 y Phe15 de los pasadores quedan expuestos al medio, estabilizando a las fibras mediante la interacción intermolecular entre los residuos Phe23 y

Tyr37 de las columnas vecinas [1, 14]. La conformación de las fibras β y las interacciones que las estabilizan se esquematizan en la figura 2.4b.

La segunda propuesta (figura 2.4c), basada en estudios cristalográficos, presenta arreglos distintos en cuanto al empaquetamiento en la región del giro, así como diferencias en la interfaz entre monómeros de hIAPP y en la alineación de las cadenas laterales encargadas del intercalamiento y estabilización de las fibras por medio de cierres estéricos, formados principalmente por los residuos Leu27, Ser29, Asn31 y Gly33 de ambas cadenas [14].

Como puede notarse, la región 20-29, llamada amiloidogénica, no participa en ninguna de las fibras β , sino que permanece en la región asociada con el giro que las conecta. Si se considera que es en esta región en donde existe la mayor cantidad de diferencias entre hIAPP y rIAPP (que no tiene la capacidad de formar fibras), resulta inevitable pensar que se trata de una secuencia determinante para el proceso de agregación. Además de participar en la estabilización de la forma de pasador β de los monómeros, se cree que esta región (en adición a la His 18) tiene la capacidad de influir sobre la alineación de los monómeros a lo largo de las protofibras, teniendo incluso la capacidad de determinar el tipo de cierre estérico que estabilizará a la fibra completa [22].

2.3.2 DT2 y amiloides de hIAPP

La diabetes tipo 2 (DT2) es un padecimiento que comprende a un conjunto de factores interconectados muy complejos, aunque puede simplificarse a dos principales: la disminución de efectividad en la acción de la insulina secretada, que induce una mayor demanda de la hormona para compensar esta falla, y la pérdida de células β del páncreas, encargadas de sintetizar insulina [1]. El descubrimiento de la relación entre la IAPP y la DT2 surgió de la identificación de una importante cantidad de fibras amiloides en el tejido del páncreas de individuos con este padecimiento, los cuales presentaban una considerable pérdida de islotes de células β , así como una alteración evidente a la respuesta de la insulina. Este descubrimiento estableció una conexión indudable entre la formación de fibras amiloides de IAPP y la patogénesis de la diabetes tipo 2 [1].

A pesar de que los mecanismos de formación de amiloides hacen que su estudio *in vivo* en humanos sea sumamente complicado, existen trabajos realizados con otras especies, como gatos domésticos, simios y roedores, en donde se ha encontrado relación entre los amiloides y padecimientos análogos a la DT2 humana. Los hallazgos hechos en estos estudios apuntan al efecto directo de los agregados amiloides en la falla y muerte de células β característica de la DT2, aunque aún se desconoce a ciencia cierta si los depósitos de IAPP son causa o consecuencia del padecimiento [1, 23].

La gran mayoría de trabajos se basa en el uso de especies transgénicas (ratones y ratas), modificadas para expresar la variante humana de la amilina. Estos experimentos parecen indicar que la acumulación de amilina y formación de fibras sucede en la región extracelular, aunque existe la controversia del efecto de uso de sujetos con sobre expresión de la IAPP, los cuales podrían estar afectando los resultados por efectos de excreción incrementada. Otra hipótesis, esquematizada en la figura 2.5, propone que las primeras etapas de agregación ocurren dentro de las células β , posiblemente por exceso de proIAPP no tratada. Esto induce la muerte de la célula, liberando al agregado amiloide al medio extracelular y funcionando como punto de nucleación para IAPP del medio [1]. Adicionalmente, existen reportes sobre siembra cruzada de amiloides, en donde un núcleo de péptido amiloidogénico es capaz de iniciar el proceso de fibrilación por agregación de otro péptido [24, 25]. La determinación del origen de los agregados (intra o extracelular) es indispensable en el desarrollo de potenciales estrategias terapéuticas [14].

Los efectos de la pérdida de células β , dentro del cuadro etiológico de la DT2, se atribuye a un número significativo de factores, de entre los que destacan: inflamación del tejido, acumulación de colesterol y formación de amiloide de amilina [14]. Las rutas por las cuales ejercen su acción nociva los agregados amiloides no queda del todo clara, aunque existen evidencias que apuntan a acumulación, por fallas en las rutas metabólicas, de lipoproteínas, ácidos grasos, leptinas y citoquinas (producto de la respuesta inflamatoria a la presencia de amiloide, entre otros factores), induciendo un desgaste pronunciado en las células β el cual inevitablemente provoca apoptosis [26]. Otro de los mecanismos destacables es la capacidad de alterar las membranas celulares. Se sabe que tanto oligómeros, como fibras maduras, tienen la capacidad de

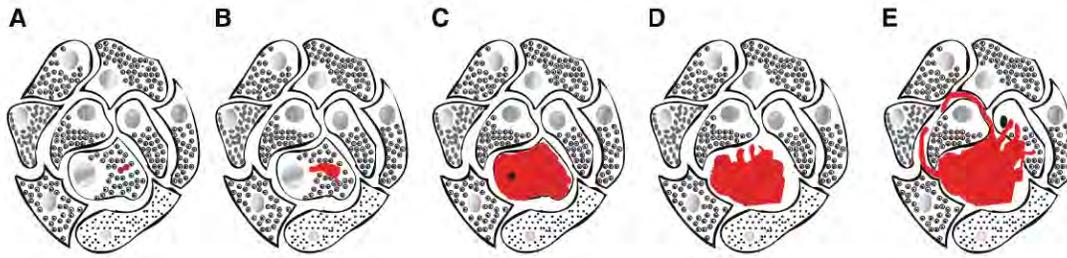


Figura 2.5: Propuesta de las etapas en la formación de amiloides de amilina. A: la agregación inicial de IAPP y proIAPP ocurre dentro de los gránulos de almacenaje dentro de la célula. B: los agregados crecen suficientemente como para comprometer las membranas de los gránulos y comienzan a asociarse entre sí. C: los depósitos amiloides ocupan la mayor parte del la matriz celular, llevando a la apoptosis de la célula. D: el amiloide expulsado permanecerá en el medio extra celular funcionando como punto de agregación y crecimiento. E: la propagación continúa con la IAPP madura secretada por las células [1].

interaccionar con membranas ya sea anclándose al exterior, o permeando en ellas [27].

2.3.3 Diferencias entre fibras y oligómeros

Actualmente se presume que las fibras amiloides maduras carecen de efectos citotóxicos, o que son extremadamente bajos. Su acción patológica surge más bien de mecanismos de respuesta a su presencia, como alteración de membranas, obstrucción de vascularización del tejido o por inducción de procesos inflamatorios [26, 28]. Esto llevó a estudiar el papel de los intermediarios de menor tamaño, de varias proteínas, generados a lo largo del proceso de fibrilogénesis, apuntando a que la acción tóxica de las proteínas amiloidogénicas se debe a la interacción de agregados pequeños con membranas [5].

Las fibras tienen una estructura compacta y ordenada, mientras que la línea que define qué es un oligómero amiloide es difusa, pues se sabe que existe una enorme cantidad de arreglos que surgen durante las diferentes etapas de la fibrilogénesis, que además son increíblemente sensibles a variaciones en las condiciones del medio de crecimiento (como presencia de membranas, pH, concentración de iones metálicos, así como del mismo péptido), complicando aún más su estudio [1, 29].

Las formas oligoméricas presentes durante la formación de las fibras influyen en los mecanismos de asociación de los mismos, dando lugar a caminos atípicos de fibrilación. Además, a diferencia de las fibras, que normalmente permanecen en sitios fijos, los oligómeros presentan una mayor movilidad dentro y fuera de las células, como consecuencia de su tamaño reducido. Esto les permite esparcirse a través del tejido, induciendo la formación de agregados en sitios alejados y esparciendo sus efectos [5].

2.3.4 Oligómeros de amilina

La correcta caracterización de los oligómeros ha resultado sumamente difícil, como consecuencia, no sólo de su naturaleza transitoria, sino de la variedad conformacional y de tamaño que puede ocurrir simultáneamente. Existen pocos métodos eficientes para estabilizar a estas especies, los cuales pueden llegar a ser demasiado específicos como para poderse usar de modo general. Esto ha llevado a usar métodos alternos basados en herramientas computacionales, siendo las dinámicas moleculares las más destacadas. La complejidad de estos estudios se incrementa cuando hay presencia de alguna especie con efectos inhibitorios de fibras, originando especies oligoméricas poco comunes con mecanismos de agregación atípicos [1, 30].

El proceso de agregación de los monómeros requiere de alcanzar una concentración crítica para poder ocurrir, pues su proceso de nucleación está poco favorecido termodinámicamente. Tras iniciarse, se forma una especie poco estable conocida como *núcleo crítico*, que es la estructura de menor tamaño capaz de iniciar la formación de agregados mayores. A partir de este punto, y para estabilizar a los sistemas, la adición de monómeros a los oligómeros, y crecimiento de protofibras, se convierte en un proceso favorecido. Adicional a lo anterior, los agregados más grandes pueden fragmentarse parcialmente para formar nuevos centros de nucleación, acelerando el proceso [5].

A pesar de que la hIAPP puede formar una especie de dominio helicoidal hacia N terminal (sección 2.3), su estructura primaria la convierte en una proteína intrínsecamente desdoblada. Esto le hace posible adquirir una conformación de pasador β , la cual ha sido propuesta como la responsable no sólo de formar los dímeros más estables, sino la que tiene la mayor propensión por propagar

la formación de oligómeros de fibras β , que además son indispensables para las protofibras que integrarán a las fibras amiloides [6, 21].

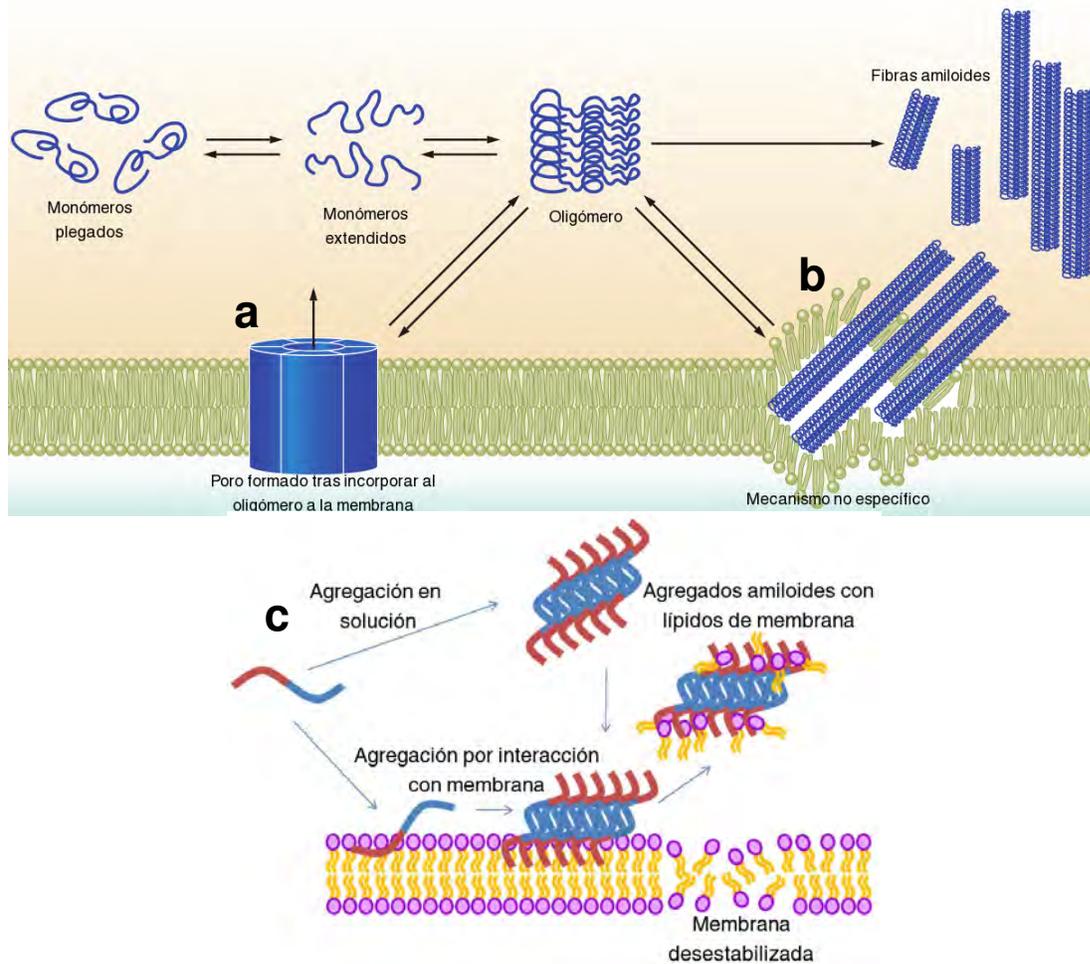


Figura 2.6: Las figuras muestran los mecanismos por los cuales la hIAPP interacciona y compromete a las membranas celulares: a) los monómeros modifican su estructura, se asocian y forman un oligómero que se inserta en la membrana, originando un poro; b) los oligómeros se introducen en la membrana y funcionan como punto de nucleación, promoviendo el crecimiento de fibras, las cuales alteran mecánicamente a la membrana; c) los oligómeros se forman, ya sea en la membrana o en el medio celular, e interaccionan con los lípidos de la membrana, sustrayéndolos mediante un efecto de detergente [1, 27].

Respecto a su toxicidad, se ha demostrado que algunas de las vías por las cuales los oligómeros ejercen su acción nociva es a través de alteración de receptores y membranas. Para el caso particular de la hIAPP, su principal vía

de acción es la alteración de las membranas celulares por tres mecanismos posibles [27]:

1. Poro oligomérico: la hIAPP se agrega y genera un intermediario tóxico que, al interactuar con la membrana, crea un poro (figura 2.6a).
2. Un mecanismo no específico en el cual la membrana se ve alterada como consecuencia de estrés mecánico inducido por el crecimiento de la fibra (figura 2.6b).
3. Detergente: monómeros u oligómeros de la amilina interactúan con la membrana celular, extrayendo lípidos de la bicapa, los cuales son asimilados por los agregados amiloides o descartados al medio como formas micelares. Esto induce permeabilidad por adelgazamiento de la membrana (figura 2.6c).

En relación al proceso de agregación de oligómeros, las concentraciones normales de IAPP en el torrente sanguíneo, tras ser secretada, es muy baja (picomolar) como para poder iniciar el proceso de nucleación. Esto apoya la hipótesis de que las primeras etapas de la fibrillogénesis inician al interior de los gránulos secretores, en donde las concentraciones de amilina alcanzan el orden milimolar. Al comparar estudios *in vitro* e *in vivo*, se vio que en escenarios artificiales, los gránulos amiloides pueden formarse en cuestión de minutos, mientras que en organismos vivos, toma varias horas [30]. Además, a diferencia de otros péptidos amiloides, como la β amiloide ($A\beta$, responsable de las placas amiloides presentes en pacientes con la enfermedad de Alzheimer), la secuencia de IAPP expresada en individuos sanos y con DT2 es la misma, indicando la existencia de mecanismos regulatorios que por alguna razón dejan de funcionar correctamente [23].

Las pruebas anteriores han dirigido la atención de muchos grupos de investigación a explorar las propiedades de los gránulos secretores en busca de información acerca de los factores que podrían estar regulando, tanto la oligomerización, como la toxicidad de estos agregados pequeños. Estos experimentos han apuntado a tres causas: el pH, interacciones con otras proteínas y concentración de iones metálicos.

Se estima que los gránulos secretores tienen un pH interno de entre 5 y 6, lo que favorece una forma soluble de la IAPP y evita agregación. Este mecanismo está relacionado con la histidina 18 (His18), cuyo anillo de imidazol presenta un pKa (aproximadamente 5) menor que lo esperado, promoviendo la protonación del sitio dentro de los gránulos, lo que induce repulsión electrostática entre monómeros protonados adyacentes, prolongando el tiempo de formación de agregados, así como del crecimiento de fibras [17]. Finalmente, el pH tiene efecto sobre la conformación nativa de la hAIPP, lo que se traduce en formación de agregados con estructuras diferentes: a valores de pH ligeramente más básicos se observa la formación de protofibras, mientras que si son más ácidos, se tienen oligómeros amorfos, por efectos de la His18 protonada sobre la estructura local [30].

La composición protéica dentro de los gránulos secretores es otro elemento a considerar al estudiar la formación de agregados. Al interior, además de hAIPP, hay insulina y péptido-C, que es un péptido resultante del tratamiento de la proinsulina. La insulina tiene un efecto inhibitorio sobre la fibrillogénesis de la hAIPP, el cual se cree que surge como consecuencia de una interacción de puente salino entre los fragmentos 7-16 y 8-25 de la amilina e insulina, respectivamente, aunque la interacción con otras regiones no se ha descartado. En relación al péptido-C, existen evidencias encontradas respecto a su efecto sobre la agregación, por lo que se requiere mayor investigación.

Por último, se han identificado concentraciones atípicamente altas de ciertos iones metálicos (Cu(II), Zn(II) y Fe(II), por mencionar algunos) en depósitos amiloides de pacientes con enfermedades amiloidogénicas, junto con deficiencia de estos en sitios en los que son necesarios, apuntando a fallos en los mecanismos de regulación. Una presencia descontrolada de estas especies puede alterar las cadenas metabólicas en las que participan dichas proteínas, así como contribuir a generar especies reactivas que sometan a las células a estrés oxidativo [31]. Un ejemplo de esto es el efecto del Zn(II). Este metal, bajo condiciones normales, está presente en los gránulos secretores con concentraciones milimolares (una de las más altas en el cuerpo); sin embargo, los pacientes con diabetes presentan serias deficiencias del ion. Además, el Zn(II) participa en la regulación de la glucosa en múltiples pasos, como comunicación parácrina, almacenamiento de insulina y cascadas metabólicas inducidas por glucosa, por lo que está también relacionado con la hAIPP [30].

Administrar suplementos con Zn(II) a los pacientes de DT2 produjo una mejora en la regulación glicémica [31]. Se sabe que el Zn(II) tiene un efecto inhibitorio sobre la agregación, tanto de amilina, como de A β . En la hIAPP se hallaron dos sitios de unión al Zn, siendo uno de ellos la His18, los cuales permiten la estabilización de complejos solubles de carácter multimérico con el Zn(II), que a su vez evitan el crecimiento de fibras [10].

2.4 Relación entre la hIAPP y el ion Cu(II)

Otro metal que ha despertado interés por su elevada presencia en los agregados amiloides es el Cu(II), que además tiene la particularidad de catalizar la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), sugiriendo alguna conexión con el desarrollo de la DT2. Estudios realizados con cobre y amilina mostraron la capacidad del Cu(II) de formar y estabilizar agregados no amiloidogénicos, mientras que otros trabajos han evidenciado su participación en la mediación de las interacciones hIAPP-membrana [10]. Adicionalmente, y en relación con lo anterior, se mostró un efecto negativo considerable, del Cu(II), sobre la viabilidad de las células β . Sin embargo, se descartó la participación de las ROS, indicando que las interacciones Cu(II)-hIAPP favorecen, o bien a intermediarios tóxicos, o a mecanismos de formación de oligómeros tóxicos no fibrillogénicos [30].

Los efectos globales del Cu(II) sobre la pérdida de células β , así como su conexión con el origen de la diabetes tipo 2 siguen siendo sujeto de discusión. Existen propuestas que apoyan el papel protector del Cu(II), que al interactuar con la amilina forma complejos metalo protéicos con propiedades de agregación muy bajas, y que además tienen la capacidad de amortiguar la presencia de especies oxidantes [32]. De manera contrastante, hay otra vertiente de resultados que parecen demostrar que la formación de especies Cu(II)-hIAPP tiene efectos considerablemente más nocivos sobre la viabilidad de las células [33]. Esta polémica requiere de conocer la forma específica en que los diferentes actores involucrados interactúan entre sí durante las primeras etapas, las cuales pueden resultar determinantes en entender sus consecuencias en los organismos.

En este contexto, la información disponible en relación con los efectos estructurales de la interacción del Cu(II) con amilina son escasos. Estudios con fragmentos de este péptido demostraron que la coordinación del ión Cu(II) se encuentra a cargo del fragmento 18-22 de la hIAPP. Tras realizar una amplia serie de pruebas espectroscópicas (UV-visible, dicroísmo circular y EPR) y de modificación de fragmentos de la hIAPP, Rivillas-Acevedo *et. al* identificaron a la His18 como sitio indispensable para coordinar al ion de cobre con la amilina humana [3]. Además, hallaron una dependencia en el pH para el resto de los sitios que estabilizan al complejo, teniendo a pH fisiológico a las serinas y asparaginas subsecuentes hacia el extremo C terminal (Ser19, Ser20, Asn21 y Asn22), formando un complejo con geometría de cuadrado plano cuyo modo de coordinación es 3N1O, en donde participan 3 nitrógenos (uno del anillo de imidazol de la His18 y dos de las amidas desprotonadas de la serina 19 y 20) y un oxígeno ligante, que no pudo ser caracterizado totalmente, pero que se propuso como proveniente del hidroxilo de la Ser20 o del carbonilo de la cadena principal del mismo residuo. Debido a las características del péptido, aún no ha sido posible conocer de manera detallada las bases estructurales, y consecuencias, de la interacción de la secuencia completa de hAIPP con cobre.

La formación de este complejo en el sitio 18-22 induce una alteración local en la estructura de la amilina, evitando que adquiera la conformación necesaria para formar cuerpos prefibrilares y fibras [3, 10]. Experimentos adicionales indican que, como consecuencia de la asociación con Cu(II), el mecanismo de agregación de la amilina es claramente distinto al de la amilina libre, pues parecen no haber muchos intermediarios comunes en el proceso. Así mismo, se cree que el Cu(II) estabiliza estructuras intermedias entre los oligómeros pequeños y las fibras. En relación a la toxicidad de los oligómeros, se piensa que el cobre promueve la formación de especies con residuos altamente hidrofóbicos expuestos. En estado libre, la amilina tendría una conformación tal que estos residuos estarían protegidos del medio (pasadores β); sin embargo, al no estarlo, su poca afinidad al solvente favorece la interacción con ambientes también hidrofóbicos, como la interfaz de las bicapas de las membranas celulares [8].

Los hallazgos de los últimos años en relación al papel de los metales han dejado claro que se necesita elucidar los efectos que estos tienen sobre los

monómeros y oligómeros amiloides. Para esto, es necesario profundizar acerca de los sitios en los que se coordinan y su estructura, la forma en que las propiedades de los péptidos coordinados con metales influye en la estructura de los amiloides, así como los posibles efectos de las diferentes conformaciones sobre la coordinación de los iones [10]. Con estas necesidades en mente, el objetivo del presente trabajo se centró en el estudio de la estructura del fragmento 18-22 de la hIAPP coordinado con cobre(II). Esta aportación tiene como finalidad contribuir con el conocimiento que se tiene respecto a la influencia del cobre (II) en la estructura nativa de la amilina, y, en consecuencia, los potenciales efectos que esta podría tener sobre la generación de amiloides de amilina y el desarrollo de la DT2.

Primeras propuestas

Como consecuencia de sus características estructurales, el polipéptido amiloide de los islotes humano posee una tendencia, que podría llegar a considerarse agresiva, por asociarse y formar agregados amiloides. Esta propensión ha introducido serias limitaciones a la hora de intentar estudiar su estructura, tanto en solución, como en cristales [3]. Como consecuencia de esto, la información disponible acerca del arreglo espacial de monómeros completos, así como de fragmentos derivados es escasa. En este sentido, a diferencia de algunos estudios relacionados con otros péptidos amiloidegénicos y cobre, como la proteína prion o la proteína β -amiloide, para los cuales sí hay datos estructurales derivados de experimentos de rayos X [34, 35], la poca información disponible acerca de la estructura de la amilina y, en particular, de la secuencia 18-22, origina la necesidad de proponer uno o más modelos que muestren consistencia con los resultados experimentales existentes [3].

Con lo anterior en mente, la primera parte de este proyecto se centró en proponer y modelar estructuras (en fase gas) del fragmento 18-22 coordinado con Cu(II), que surgen como respuesta a las interrogantes producto de las observaciones de L. Rivillas-Acevedo *et al.* [3] respecto a la procedencia del donador de oxígeno: carbonilo de la amida de la serina 20 (3N1O_{CO/S20}-0W) o hidroxilo de la misma serina (3N1O_{OH/S20}-0W). Adicionalmente, se probaron otros modelos en donde el oxígeno provenía de los residuos ubicados hacia el lado C-terminal (asparaginas 21 y 22). En este caso, la única especie estable, en donde la coordinación con el oxígeno prevaleció fue el modelo 3N1O_{CO/N22}-0W, cuyo O ligante proviene de la cadena principal de la asparagina 22.

3.1 Modelos de partida: optimización local en fase gas

La primera etapa de este trabajo consistió en estudiar, en fase gas, los modelos posibles del fragmento 18-22 de la hIAPP coordinados con Cu(II). Estos fueron inicialmente construidos utilizando el visualizador molecular Molden [36], usan-

do el fragmento completo 18-22 (HSSNN) de la amilina humana coordinada con cobre. Los ligantes del centro de Cu(II) propuestos son: un nitrógeno de imidazol de la histidina 18, dos nitrógenos de las amidas desprotonadas de la cadena principal provenientes de las serinas 19 y 20 y un donador de oxígeno, que puede provenir de la cadena peptídica o del medio (solvente). El origen de este último depende del modelo propuesto y se ve reflejado en la notación utilizada: $3N1O_{CO/S20}-0W$ (oxígeno del carbonilo de la serina 20), $3N1O_{OH/S20}-0W$ (oxígeno del hidroxilo de la serina 20) y $3N1O_{CO/N22}-0W$ (oxígeno del carbonilo de la cadena lateral de la N22), etc., como se indica en la figura 3.1. Los grupos amino y carbonilo terminales fueron acetilados y amidados, respectivamente, dando como resultado estructuras con 75 átomos en total. Las estructuras construidas se sometieron a optimizaciones de geometría en fase gas utilizando el programa de estructura electrónica TeraChem [37-39], bajo un esquema Kohn-Sham sin restricción de espín (se fijó una multiplicidad de espín igual a 2 para todos los modelos), utilizando el funcional de intercambio y correlación de gradiente generalizado (GGA) PBE [40] y la versión implementada en el código deMon2k [41] del conjunto de base de doble zeta de valencia con polarización DZVP [42]. Las geometrías obtenidas mediante el procedimiento anterior proporcionaron las bases sobre las cuales se construyó el resto de los modelos empleados en este estudio.

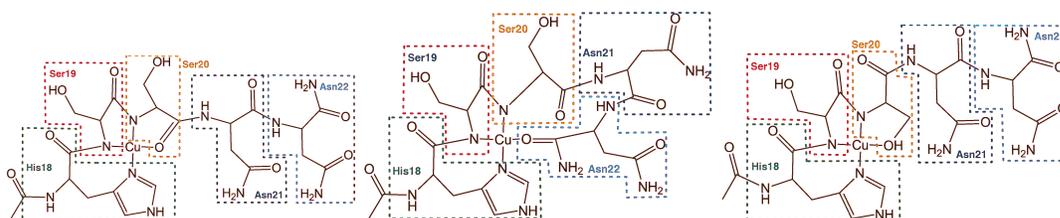


Figura 3.1: Modelos de coordinación propuestos para el complejo Cu(II)-HSSNN. El panel izquierdo muestra coordinación con el carbonilo de Ser20 (modelo $3N1O_{CO/S20}$), el panel central está coordinado con el carbonilo de Asn22 ($3N1O_{CO/N22}$) y el panel de la derecha muestra coordinación con el hidroxilo de la Ser20 ($3N1O_{OH/S20}$).

3.2 Cálculo de parámetros de EPR

Tomando como justificación las reglas empíricas de Peisach-Blumberg [43], así como las observaciones hechas por L. Rivillas-Acevedo *et al.* [3], el presente estudio tomó el cálculo de los parámetros de espectroscopía de EPR como

uno de sus principales ejes, con el objetivo de hacer posible una asignación estructural capaz de explicar los resultados de los experimentos hechos con amilina, por lo que la mayoría de los modelos obtenidos (principales y derivados) se sometieron a esta prueba.

Los parámetros de EPR fueron calculados utilizando el módulo `epr_nmr` implementado en la versión 3.0.2 del código de estructura electrónica ORCA [44, 45]. Estos fueron obtenidos usando el funcional híbrido de intercambio y correlación PBE0 [46-48], en conjunto con las bases DGAUSS (doble zeta de valencia con polarización) y CoreProperties (base doble zeta sin contracción en la parte *s* a la cual se le adicionan tres funciones primitivas ajustadas *s*, descripción tipo triple zeta en la parte *d* y dos funciones *p* de polarización en la región de valencia) [49] para átomos de la familia principal y para cobre, respectivamente. Cabe mencionar algunas consideraciones adicionales empleadas en estos cálculos: se usó un mallado especial y una precisión de integración de siete para el cobre (II) (en concordancia con lo sugerido por el manual de ORCA); así mismo, se utilizó el centro de carga eléctrica (center of electric charge) como origen de indicador (gauge origin), el método de localización Pipek-Mezey y una ventana de energía orbital con intervalo de -1000 a 1000 Hartree. Se incluyó acoplamiento espín-órbita (SOC) solicitando las banderas SOCflags 1, 3, 3, 1 [50].

La elección del funcional de intercambio y correlación, así como de los conjuntos de base se hizo tomando como referencia los resultados y observaciones del estudio teórico y computacional de la estructura hiperfina y superhiperfina de los ligantes en complejos de Cu(II) realizado por F. Neese [51]. En relación al funcional, en el trabajo mencionado se concluyó que la introducción de una fracción de intercambio de Hartree-Fock, a través del uso de funcionales híbridos, ayuda a compensar la sobreestimación de la covalencia de las interacciones metal-ligante, proporcionando resultados comparables con los experimentales en cuanto a los acoplamientos hiperfinos (HFC, por sus siglas en inglés) isotrópicos, pero sobreestimando considerablemente los anisotrópicos. Para una buena determinación de los HFC se necesita una base que pueda describir adecuadamente los electrones de valencia y de la parte externa del núcleo, si se recurre a una base doble zeta (como es el caso del presente trabajo), es necesario descontrar las funciones de la parte de valencia y exterior del núcleo, siendo las funciones *s* más externas de vital importancia en la

descripción de metales de transición [52]. A pesar de la alta sensibilidad a la forma del potencial de intercambio y correlación en el cálculo de constantes hiperfinas para complejos de metales de transición, se ha observado que para una misma familia de funcionales (GGA, GGA híbridos, meta-GGA, etc.), la elección del funcional tiene poca influencia sobre el valor del tensor g . Así mismo, existe poca sensibilidad a la elección de conjunto de base, obteniendo una descripción razonable al emplear conjuntos de valencia separada y una función de polarización [53].

El cálculo de los EPR de las estructuras optimizadas en fase gas, sin solvente explícito, se realizó sin considerar modelos de solvatación implícitos; para las pruebas posteriores que sí incluyeron aguas explícitas, se empleó COSMO (COnductor-like Screening MOdel) [54] como modelo de solvatación implícita, tomando una ϵ de 80.4 para simular agua[55].

Es importante destacar que, dadas ciertas características, tanto de la metodología de cálculo, como de la determinación experimental, es necesario hacer ciertas consideraciones al comparar ambos resultados. Las técnicas y equipo de espectroscopía paramagnética electrónica permiten determinar únicamente valores absolutos para las constantes de acoplamiento hiperfino (**A**). En contraste, el cálculo de **A** permite asignar un signo a estos valores. Con esto en mente, en principio es posible comparar ambos valores, pues se desconoce si el parámetro e acoplamiento hiperfino experimental tiene o no un signo. Consistente con lo anterior, y para facilitar la lectura y comparación de resultados, los resultados calculados de **A** se presentan como valores absolutos, de acuerdo con la propuesta de W. Ames y S. Larsen [56].

Finalmente, en relación con la exactitud de la metodología elegida, la amplia diversidad en la estructura electrónica de los compuestos de coordinación con metales de transición hace que la elección del mejor método dependa fuertemente del sistema, por lo que una combinación de cierto funcional y base no es universalmente aplicable. Algunos trabajos relacionados con la confiabilidad de distintos métodos de la teoría de los funcionales de la densidad (DFT, por sus siglas en inglés) aplicados al cálculo de parámetros de EPR de complejos con metales de transición mostraron que los funcionales híbridos arrojan los mejores resultados, con una precisión de entre 5% y 10% para los HFC respecto a los experimentos [52] y un coeficiente de correlación

de 0.981 para el tensor g [53]. En este sentido, a pesar de que no hay un estudio de referencia que establezca la exactitud del método respecto a las propiedades del complejo Cu(II)-hIAPP(18-22), la existencia de trabajos en sistemas similares, tanto teóricos [51], como aplicados [34, 57, 58], establece un antecedente para el cálculo de parámetros de EPR, en donde existe un acuerdo razonable, tanto con cálculos de referencia CCS(D), como con los experimentos.

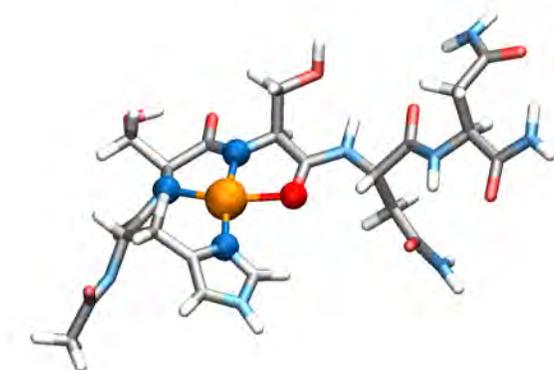
3.3 Ligantes con oxígeno en la Serina 20: -CO y -OH

Las figuras 3.2 y 3.3 muestran las estructuras, y algunos parámetros estructurales relevantes, de las dos primeras variantes del centro de coordinación: $3N1O_{CO/S20}-0W$ y $3N1O_{OH/S20}-0W$, respectivamente, en ausencia de moléculas explícitas de agua. Estas propuestas se plantearon de forma consistente con las observaciones experimentales [3], en donde se determinó que el centro metálico está interaccionando con cuatro donadores en un modo de coordinación con 3 átomos de nitrógeno (teniendo al imidazol como punto clave) y un oxígeno ($3N1O$), cuya procedencia no está del todo determinada. En ambos casos se usó una geometría de cuadrado plano para el centro de coordinación, junto con una estructura relativamente extendida para los residuos que no están involucrados directamente en dicho centro. En el caso de $3N1O_{CO/S20}-0W$, el oxígeno que participa en la coordinación del cobre es provisto por el grupo carbonilo de la serina 20, mientras que en el caso de $3N1O_{OH/S20}-0W$, este oxígeno proviene del grupo hidroxilo de la cadena lateral de la misma serina.

3.4 Sitios alternativos con oxígeno

Adicional a las propuestas anteriores, se plantearon una serie de estructuras en las que el oxígeno ligante provenía de los residuos ubicados hacia C terminal: asparaginas 21 y 22 (Asn21 y Asn22, respectivamente). Ambos residuos contaban con dos sitios potenciales para coordinar al ion metálico, pues poseen un carbonilo amidado en la cadena principal, así como un segundo

Figura 3.2: Estructura y parámetros geométricos selectos para el modelo **3N1O_{CO/S20}-0W** del complejo Cu(II)-hiAPP(18-22). N_{H18} es el N1 del anillo de imidazol de la His18, N_{S19} pertenece a la amida desprotonada de la cadena principal de Ser19, N_{S20} se refiere a la amida desprotonada de la cadena principal de la Ser20 y O_{CO/S20} indica que el donador de oxígeno es el carbonilo de Ser20.



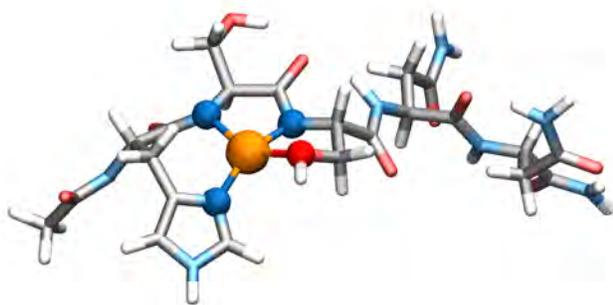
Distancias de enlace [Å]	
Cu-N _{H18}	1.95
Cu-N _{S19}	2.04
Cu-N _{S20}	1.90
Cu-O _{CO/S20}	2.20
Ángulos de enlace [°]	
N _{H18} -Cu-N _{S19}	105.57
N _{S19} -Cu-N _{S20}	83.58
N _{S20} -Cu-O _{CO/S20}	79.10
O _{CO/S20} -Cu-N _{H18}	91.76
N _{H18} -Cu-N _{S20}	170.85
N _{S19} -Cu-O _{CO/S20}	162.31
Ángulos de torsión [°]	
O _{CO/S20} -Cu-N _{H18} -N _{S20}	3.20
N _{S20} -Cu-O _{CO/S20} -N _{S19}	-11.81

carbonilo de amida en la cadena lateral. Los modelos utilizados en esta parte del estudio fueron generados modificando las estructuras 3N1O_{CO/S20}-0W y 3N1O_{OH/S20}-0W mediante el visualizador Avogadro [59]. En esta búsqueda se encontró que la coordinación con residuos más alejados de la His18 estaban poco favorecidos. Todas las estructuras coordinadas con la Asn21 resultaron inestables, y en el caso de la Asn22, sólo se logró conservar una variante que partió de 3N1O_{OH/S20}-0W en donde el oxígeno provenía de la cadena principal del residuo. Este modelo fue nombrado 3N1O_{CO/N22}-0W. Su estructura y parámetros geométricos se muestran en la figura 3.4.

3.5 EPR: 3N1O_{CO/S20}-0W, 3N1O_{OH/S20}-0W y 3N1O_{CO/N22}-0W

La tabla 3.1 muestra las energías relativas y los parámetros de EPR correspondientes con las propuestas estructurales de esta sección. En esta, se observa que el modelo más estable es 3NO_{OH/S20}-0W; con un valor de A_z (471 MHz) muy cercano al experimental (474 MHz), pero cuyo parámetro g_z es bastante

Figura 3.3: Estructura y parámetros geométricos selectos para el modelo **3N1O_{OH/S20}-0W** del complejo Cu(II)-hIAPP(18-22). N_{H18} es el N1 del anillo de imidazol de la His18, N_{S19} pertenece a la amida desprotonada de la cadena principal de Ser19, N_{S20} se refiere a la amida desprotonada de la cadena principal de la Ser20 y O_{OH/S20} indica que el donador de oxígeno es el hidroxilo de Ser20.



Distancias de enlace [Å]	
Cu-N _{H18}	1.98
Cu-N _{S19}	1.99
Cu-N _{S20}	1.92
Cu-O _{OH/S20}	2.19
Ángulos de enlace [°]	
N _{H18} -Cu-N _{S19}	108.99
N _{S19} -Cu-N _{S20}	86.04
N _{S20} -Cu-O _{OH/S20}	80.07
O _{OH/S20} -Cu-N _{H18} -Cu-N _{S19}	95.66
N _{H18} -Cu-N _{S20}	155.58
N _{S19} -Cu-O _{OH/S20}	145.97
Ángulos de torsión [°]	
O _{OH/S20} -Cu-N _{H18} -N _{S20}	-78.26
N _{S20} -Cu-O _{OH/S20} -N _{S19}	62.27

más bajo que el medido (2.239). En el caso de 3NO_{CO/S20}-0W, se tiene una estructura que está sólo 1.19 kcal/mol por encima del modelo más estable, con una constante de acoplamiento hiperfino ($A_z = 480$) ligeramente por encima del experimento y un g_z de 2.1582, que es incluso menor al de 3NO_{CO/S20}-0W. El modelo 3NO_{CO/N22}-0W es considerablemente inestable (24.88 kcal/mol) respecto a sus dos antecesores, y aunque presenta la peor consistencia con el experimento en cuanto a la constante de acoplamiento hiperfino, de las tres opciones iniciales es la que más se acerca al de g_z real.

Al analizar los datos estructurales junto con los valores de la tabla 3.1, se observa que el centro de coordinación con la geometría más plana corresponde con el modelo 3NO_{CO/S20}-0W, mientras que 3NO_{OH/S20}-0W y 3NO_{CO/N22}-0W tienen una evidente distorsión fuera del plano. En general, las distancias de los ligantes respecto al Cu(II) se conservan razonablemente, salvo para el oxígeno de 3NO_{CO/N22}-0W, que está aproximadamente 0.05 Å más alejado que el de sus contrapartes, posiblemente como consecuencia de una estructura más tensionada, afectando los valores de EPR.

Figura 3.4: Estructura y parámetros geométricos selectos para el modelo **3N1O_{CO/N22}-0W** del complejo Cu(II)-hIAPP(18-22). N_{H18} es el N1 del anillo de imidazol de la His18, N_{S19} pertenece a la amida desprotonada de la cadena principal de Ser19, N_{S20} se refiere a la amida desprotonada de la cadena principal de la Ser20 y O_{CO/N22} indica que el donador de oxígeno es el carbonilo de la cadena principal de la N22.



Distancias de enlace [Å]	
Cu-N _{H18}	2.04
Cu-N _{S19}	2.00
Cu-N _{S20}	1.97
Cu-O _{CO/N22}	2.26
Ángulos de enlace [°]	
N _{H18} -Cu-N _{S19}	105.93
N _{S19} -Cu-N _{S20}	82.83
N _{S20} -Cu-O _{CO/N22}	90.92
O _{CO/N22} -Cu-N _{H18} -Cu-N1	83.54
N _{H18} -Cu-N _{S20}	166.10
N _{S19} -Cu-O _{CO/N22}	162.61
Ángulos de torsión [°]	
O _{CO/N22} -Cu-N _{H18} -N _{S20}	-67.06
N _{S20} -Cu-O _{CO/N22} -N _{S19}	68.51

La información generada a raíz de esta parte del estudio muestra que, en términos de energías relativas, existen dos modelos viables para continuar este estudio: 3NO_{CO/S20}-0W y 3NO_{OH/S20}-0W. Si bien la semejanza de los parámetros de EPR calculados en relación con los medidos es buena, esta sección establece un antecedente para continuar con la inclusión de moléculas de solvente explícitas, así como de modelos de solvatación implícitos, con la intención de mejorar la descripción del sistema estudiado para poder explicar las observaciones experimentales.

Tabla 3.1: Energías relativas y parámetros de EPR de los modelos iniciales estables en fase gas y sin solvatación explícita: 3NO_{CO/S20}-0W, 3NO_{OH/S20}-0W y 3NO_{CO/N22}-0W. La primera columna muestra los resultados obtenidos por C. Sánchez-López *et al.* para el compuesto Cu(II)-hIAPP(18-22) [60].

	Experimento	3NO _{CO/S20} -0W	3NO _{OH/S20} -0W	3NO _{CO/N22} -0W
Erel[kcal/mol]	N.A.	1.19	0	24.88
Parámetros EPR				
g _x	2.055	2.0449	2.0475	2.0452
g _y	2.087	2.0541	2.0542	2.0543
g _z	2.239	2.1582	2.1613	2.1674
A _z [MHz]	474	480	471	507

Microsolvatación del fragmento hIAPP(18-22)

A raíz de algunos reportes que muestran que la inclusión de moléculas de agua explícitas ofrecen la mejor concordancia entre parámetros de EPR calculados y experimentales para compuestos de coordinación de cobre (II) con modo 3N1O [34, 35, 57, 58], se decidió solvatar de manera explícita los modelos más estables de la sección previa.

La adición de moléculas de H₂O se hizo de forma axial al plano formado por el centro metálico y sus ligantes. Dado que existen dos posibles lados de adición de las moléculas de solvente, se decidió tomar como referencia, para definir los planos superior e inferior al centro de coordinación, las estructura sin solvente explícito colocada de modo que el anillo de imidazol quedara orientado hacia adelante y los ligantes N_{S19}, N_{S20} y O_x (x=OH/S20 ó CO/S20) posicionados alrededor del Cu(II) en sentido contrario a las manecillas del reloj. A partir de esta orientación se etiquetó al lado inferior como **a** y al superior como **b**.

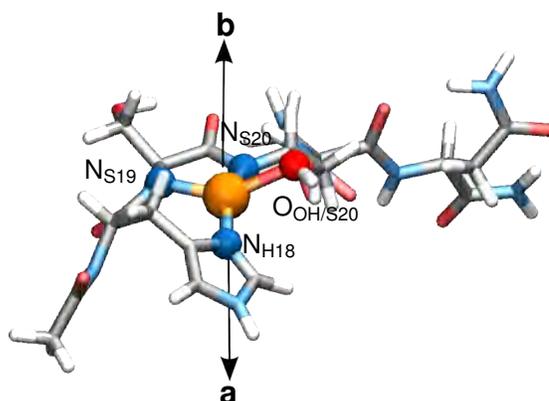


Figura 4.1: Estructura optimizada 3N1O_{OH/S20} orientada para definir las caras del centro de coordinación: el anillo de imidazol (N_{H18}) hacia adelante y los ligantes N_{S19}, N_{S20} y O_{OH/S20} posicionados alrededor del Cu(II) en sentido contrario a las manecillas del reloj. La flecha inferior indica la cara **a**, mientras que la superior hace referencia a la cara **b**.

En el caso de la primera adición (1W), cada molécula de H₂O fue colocada directamente sobre (o debajo) del Cu(II) a una distancia de 2 Å del mismo. Las

estructuras resultantes fueron optimizadas utilizando la metodología descrita en la sección 3.1, dando lugar a los modelos **3N1O_x-1Wa** y **3N1O_x-1Wb**.

La inclusión de una segunda molécula de agua (2W) se hizo sobre las estructuras más estables obtenidas tras optimizar los modelos 1W, en un esquema similar, adicionando a las caras superior e inferior del modelo predecesor una nueva molécula de H₂O, centrada nuevamente en el Cu(II). De manera complementaria, se muestran los valores de energía relativa (para cada nivel (entre paréntesis)). Los valores de los parámetros de EPR calculados para los modelos de esta sección se encuentran en las tablas 4.1 y 4.3.

4.1 3N1O_{OH/S20} con 1 y 2 H₂O

La secuencia de microsolvatación de 3N1O_{OH/S20}, esquematizada en la figura 4.2 muestra las estructuras derivadas de adicionar moléculas de disolvente a 3N1O_{OH/S20}. El nivel superior contiene al modelo obtenido en la sección 3.3, en el cual el ligante de oxígeno proviene del hidroxilo de la serina 20. Adicionar una molécula de H₂O da lugar al siguiente nivel (hacia abajo), compuesto por las estructuras 3N1O_{OH/S20}-1Wa y 3N1O_{OH/S20}-1Wb, en donde la molécula adicionada se estabilizó a 3.21 Å y 3.29 Å del centro metálico, formando un ángulo con N_{S18} y el Cu(II) de 78.78° y 104.02°, respectivamente. La posición de las aguas respecto a los centros metálicos sirve como indicador de que el solvente no se está coordinando directamente con el Cu(II), de manera consistente con los espectros de EPR obtenidos experimentalmente.

Cada uno de los modelos monohidratados presenta alguna mejora sobre su contraparte: 3N1O_{OH/S20}-1Wa es más estable (figura 4.2) y el valor de A_z asociado (450 MHz) es más cercano al valor experimental (474 MHz) que el modelo hidratado por la cara inferior (tabla 4.1); por otra parte, 3N1O_{OH/S20}-1Wb presenta una mejor consistencia con las observaciones en relación a g_z (2.1808). Contrario a lo esperado, la inclusión de solvatación explícita, así como la introducción de COSMO como modelo implícito, tiene un efecto desfavorable en los resultados obtenidos al calcular las constantes de acoplamiento hiperfino al alejarlos de los valores deseados. Por otra parte, la consideración de la

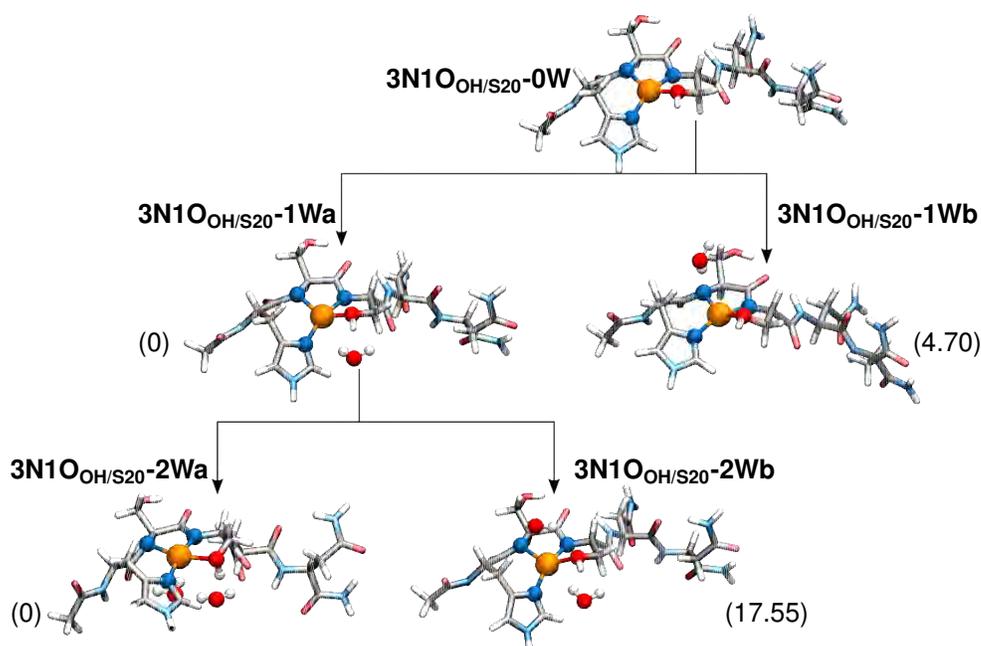


Figura 4.2: Estructuras optimizadas del complejo Cu(II)-hIAPP(18-22) con modo de coordinación $3N1O_{OH/S20}$ con diferente número de moléculas de agua explícitas (0-2). Los números entre paréntesis son los valores de energía relativa, en kcal/mol, para cada adición de H_2O .

participación de agua como solvente representa, en general, una mejora en los valores de g , como puede observarse en la tabla 4.1.

Tabla 4.1: Parámetros de EPR de las estructuras $3N1O_{OH/S20}-xW$ presentadas en la figura 4.2. Se incluye una columna (Exp.) con los resultados experimentales [60].

	Exp.	$3N1O_{OH/S20}-0W$	$3N1O_{OH/S20}-1Wa$	$3N1O_{OH/S20}-1Wb$	$3N1O_{OH/S20}-2Wa$	$3N1O_{OH/S20}-2Wb$
g_x	2.055	2.0475	2.0522	2.0492	2.0433	2.0445
g_y	2.087	2.0542	2.0603	2.0662	2.0595	2.0745
g_z	2.239	2.1613	2.1776	2.1808	2.1611	2.1826
A_z [MHz]	474	471	450	407	456	357

Aunque las dos estructuras que incluyen una molécula de agua explícita podrían servir como base para introducir un agua adicional, se decidió trabajar sobre el modelo $3N1O_{OH/S20}-1Wa$ basados en un criterio de estabilidad, no sin ignorar las mejoras en A_z y g . A partir de este modelo se construyeron y optimizaron $3N1O_{OH/S20}-2Wa$ y $3N1O_{OH/S20}-2Wb$, incluidos en el nivel inferior de la figura 4.2. En este caso, nuevamente se observa que las molécula de agua adicional se estabiliza relativamente alejada del Cu(II) (3.26 Å con un ángulo $N_{H18}-Cu(II)-$

O_{H_2O} de 93.97° en $3N1O_{OH/S20}-2Wa$ y 2.93 \AA en $3N1O_{OH/S20}-2Wb$, cuyo ángulo $N_{H18}-Cu(II)-O_{H_2O}$ es 112.21°). En cuanto a la estabilidad relativa, se puede ver que el modelo en el que las dos moléculas de agua se encuentran en la cara inferior es bastante más estable que la versión con una molécula en cada lado, teniendo una diferencia de más de 17 kcal/mol . Por otra parte, de acuerdo con la tabla 4.1, $3N1O_{OH/S20}-2Wa$ tiene una A_z (456 MHz) más cercana al experimento que su estructura predecesora, aunque la mejora no es sustancial, mientras que $3N1O_{OH/S20}-2Wb$ arroja un mejor valor de g_z que $3N1O_{OH/S20}-2Wa$.

Ames y Larsen reportaron previamente variaciones en los parámetros de EPR para compuestos de cobre (II), con un modo de coordinación $3N1O$, como consecuencia de cambios en la distancia $Cu(II)-O$ [56]. En ese trabajo ellos mostraron que la distancia de enlace entre el $Cu(II)$ y el oxígeno ligante es particularmente relevante para el cálculo de los valores A_z y g_z , y que su modificación tiene mayor influencia sobre estos parámetros que la distancia del resto de los ligantes (siempre y cuando permanezcan enlazados). Dicho comportamiento es atribuido a la capacidad de deslocalización de electrón desapareado del centro metálico: a menor distancia $Cu-O$, mayor deslocalización electrónica entre estos dos átomos, lo que se traduce en una mayor interacción con los centros que rodean al cobre, incrementando el valor de la constante de acoplamiento hiperfino y disminuyendo g_z (pues se asemeja más al de un electrón libre).

Considerando el antecedente establecido por el trabajo de Ames y Larsen junto con las variaciones obtenidas en los parámetros calculados, se decidió analizar las distancias cobre-oxígeno ligante ($r_{Cu(II)-OH}$, tabla 4.2), así como las distancias agua- $Cu(II)$ ($r_{H_2O-Cu(II)}$), en conjunto con los valores de EPR calculados de la tabla 4.1 para intentar identificar el efecto de la presencia de H_2O cerca del centro metálico sobre el ligante de oxígeno y cómo afecta a los EPR.

La distancia $Cu-OH$ de referencia está definida por $3NO_{OH/S20}-0W$, con un valor de 2.1931 \AA . Al adicionar la primera H_2O por la cara **a** (que se estabiliza a 3.2086 \AA) se induce un alargamiento en el enlace $Cu(II)-O$ de 0.0057 \AA , induciendo una disminución de A_z (de 471 a 450 MHz) y un ligero incremento en g (2.1613 a 2.1776), de manera consistente con Ames y Larsen. Por otro

Tabla 4.2: Distancias Cu(II)-oxígeno ligante ($r_{\text{Cu(II)-OH}}$) y agua-Cu(II) ($r_{x\text{-H}_2\text{O-Cu(II)}}$, con $x=1$ para la primera molécula y $x=2$ para la segunda) de las estructuras optimizadas mostradas en la figura 4.2, obtenidas tras adicionar moléculas explícitas de H_2O .

Modelo	$r_{\text{Cu(II)-OH}}$ [Å]	$r_{1\text{-H}_2\text{O-Cu(II)}}$ [Å]	$r_{2\text{-H}_2\text{O-Cu(II)}}$ [Å]
3NO _{OH/S20} -0W	2.1931	-	-
3NO _{OH/S20} -1Wa	2.1988	3.2086	-
3NO _{OH/S20} -1Wb	2.1737	3.2931	-
3NO _{OH/S20} -2Wa	2.1532	3.2117	3.2580
3NO _{OH/S20} -2Wb	2.2482	3.3254	2.9313

lado, hacer la adición sobre la cara **b** provoca que el enlace Cu-O se acorte a 2.1737 Å, mientras que la molécula de agua queda a 3.2931 Å del centro metálico. Curiosamente, en este caso A_z disminuye su valor hasta 407 MHz, mientras que g_z incrementa a 2.1808. Esto puede deberse a que el agua parece estar formando una interacción tipo puente de hidrógeno (1.9403 Å y un ángulo $N_{\text{S19-O-H}}$ de 11 °) con el nitrógeno de la serina 19.

Al continuar hacia las estructuras dihidratadas, se tiene que el modelo 3NO_{OH/S20}-2Wa presenta una distancia entre el centro metálico y su ligante de oxígeno de 2.1532 Å, que es la distancia más corta para esta familia de estructuras, mientras que las aguas permanecen a 3.2117 y 3.2580 Å. Esto se ve reflejado nuevamente en los parámetros calculados, con una A_z y g_z de 456 MHz y 2.1611, respectivamente. En esta ocasión, la única interacción de puente de hidrógeno entre las aguas y los ligantes ocurre con el hidroxilo de la Ser 20, que ayuda a estabilizar una de las moléculas de solvente. La distancia Cu-OH para 3NO_{OH/S20}-2Wb es de 2.2482 Å, haciéndola la más larga de la serie y también la estructura con el menor valor de constante de acoplamiento hiperfino (357 MHz). Las aguas están a 3.3252 y 2.9313 Å, siendo esta última la molécula de agua más cercana al cobre para este modo de coordinación, que además tiene una interacción de puente de hidrógeno con el N de la Ser19 (2.07 Å y 13.05°).

La distancia de las moléculas de agua respecto al cobre parece influir en el valor de la distancia Cu(II) y su oxígeno ligante, teniendo una relación inversa. En ese sentido, se observa que las distancias más cortas Cu(II)-H₂O ocurren cuando el agua está interaccionando con grupos que permitan la formación de puentes de hidrógeno. Si esto se cumple con alguno de los

átomos que participan directamente en la coordinación del Cu(II), entonces se observa una disminución muy considerable en el valor de la constante de acoplamiento hiperfino y un incremento en g_z , como consecuencia del cambio en la distribución del electrón desapareado.

4.2 $3N1O_{CO/S20}$ con 1 y 2 H_2O

Las estructuras resultantes de las pruebas de microsolvatación del modelo $3N1O_{CO/S20}$ se muestran en la figura 4.3. En el nivel superior se encuentra $3N1O_{CO/S20}-0W$, de donde parten el resto de los modelos. En el nivel de en medio se encuentran las estructuras optimizadas que incluyen una sola molécula de agua: $3N1O_{CO/S20}-1Wa$ y $3N1O_{CO/S20}-1Wb$. Para estos modelos se tiene que las moléculas de agua se estabilizaron a 2.6373 y 3.1067 Å, con ángulos de 91.35° y 75.06° entre el oxígeno del agua, el N_{S19} y el cobre. Similar a lo ocurrido en el caso anterior, el agua en estas estructuras no forma parte del centro de coordinación. Sin embargo, la inclusión de solvatación tanto implícita, como explícita, induce un cambio en los parámetros de EPR muy drástico, alejando A_z casi 100 MHz, aunque g_z mejora respecto a la estructura en fase gas. Analizando las estructuras en busca de interacciones tipo puente de hidrógeno que pudieran estar influyendo en los resultados como en el caso de $3N1O_{OH/S20}-1Wb$, se encontró únicamente que el agua del modelo $3N1O_{CO/S20}-1Wb$ participa en este tipo de interacción (1.9277 Å y 10.85°) con el nitrógeno de la amida de la serina 20. A diferencia de este, la molécula de H_2O de $3N1O_{CO/S20}-1Wa$ no está participando en la formación de puentes de hidrógeno con los ligantes del cobre.

En la parte inferior de la figura 4.3 se encuentran las estructuras con dos moléculas explícitas de disolvente, $3N1O_{CO/S20}-2Wa$ y $3N1O_{CO/S20}-2W-b$, las cuales se derivan de $3N1O_{CO/S20}-1Wa$, tomando como criterio las energías relativas. Las nuevas H_2O se encuentran a 3.9613 y 2.6409 Å de distancia de los centros de cobre, con ángulos $N_{S19}-Cu(II)-O_{H2O}$ de 75.35° y 90.54°, respectivamente. La inclusión de estas moléculas no modifica el modo de coordinación del centro metálico, pero en el caso de $3N1O_{CO/S20}-2Wa$, se forma un puente de hidrógeno entre el agua recién añadida y el oxígeno ligante. Respecto a los parámetros de EPR, no existen mejoras sustanciales en comparación con los modelos

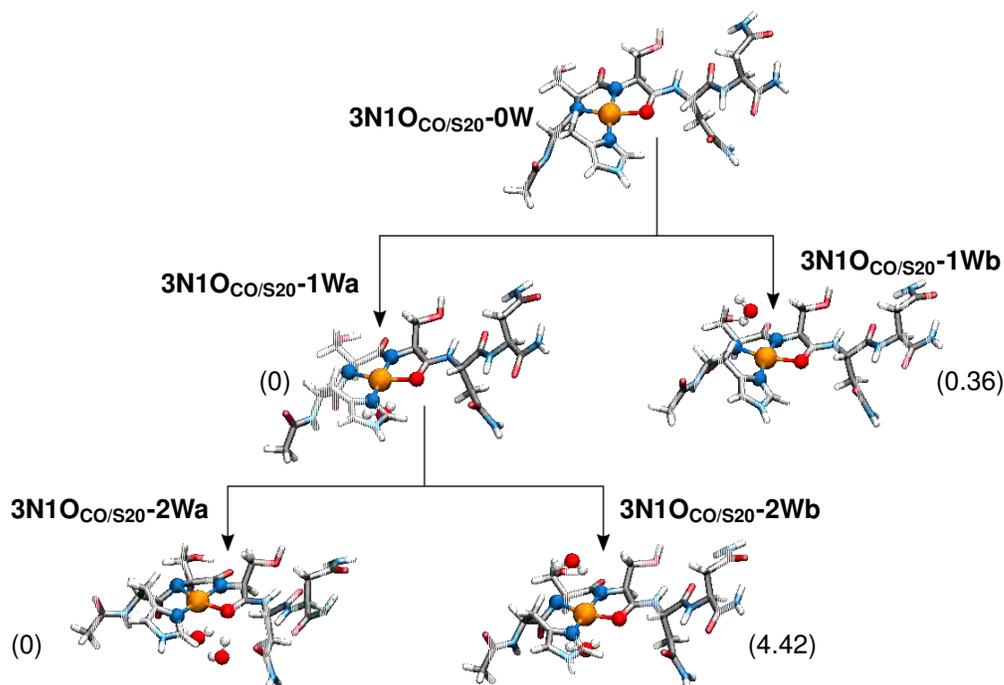


Figura 4.3: Estructuras optimizadas del complejo Cu(II)-hIAPP(18-22) con modo de coordinación $3N1O_{CO/S20}$ con diferente número de moléculas de agua explícitas (0-2). Los números entre paréntesis son los valores de energía relativa, en kcal/mol, para cada adición de H_2O .

monosolvatados, contrario a lo sucedido para la familia con dos moléculas de agua con el hidroxilo de la serina 20 como oxígeno donador.

Tabla 4.3: Parámetros de EPR de las estructuras presentadas en la figura 4.3. Se incluye una columna (Exp.) con los resultados experimentales [60].

	Exp.	$3NO_{CO/S20-0W}$	$3NO_{CO/S20-1Wa}$	$3NO_{CO/S20-1Wb}$	$3NO_{CO/S20-2Wa}$	$3NO_{CO/S20-2Wb}$
g_x	2.055	2.0449	2.0438	2.0436	2.0430	2.0450
g_y	2.087	2.0541	2.0752	2.0630	2.0715	2.0730
g_z	2.239	2.1582	2.1772	2.1686	2.1735	2.1782
A_z [MHz]	474	480	374	395	379	391

Al examinar las distancias del $O_{CO/S20}$, y de las aguas, respecto al cobre (presentadas en la tabla 4.4), se aprecia que para el conjunto 1W existe una contracción de las distancias Cu(II)-CO en comparación con el sistema en fase gas. La reducción de esta distancia es mayor en el modelo solvatado por la cara b (0.0260 Å), mientras que para la variante 1Wa es de 0.0065 Å. A su vez, la molécula de disolvente se encuentra más cerca del cobre en

3NO_{CO/S20}-1Wa. Si bien la tendencia de que a mayor distancia Cu(II)-O menor será el valor calculado de la constante de acoplamiento hiperfino se ve reflejada, no es posible explicar la caída de estos valores atribuyéndola únicamente a cambios en esta distancia, pues en el caso del modelo 3NO_{OH/S20}-1Wx, las distancias son ligeramente mayores, pero A_z es considerablemente más cercana al experimento.

Al solvatar con la segunda molécula de agua, el enlace Cu-CO permanece casi igual tras optimizar la estructura 3NO_{CO/S20}-2Wa; sin embargo, en 3NO_{CO/S20}-2Wb se contrae hasta 2.1567 Å y, contrario a lo esperado, el valor de la constante de acoplamiento hiperfino prácticamente no cambia. Estos resultados parecen indicar que la coordinación del Cu(II) con el oxígeno del carbonilo de la serina 20 es incapaz de reproducir los resultados experimentales.

Tabla 4.4: Distancias Cu(II)-oxígeno ligante ($r_{\text{Cu(II)-CO}}$) y agua-Cu(II) ($r_{\text{x-H}_2\text{O-Cu(II)}}$, con $x=1$ para la primera molécula y $x=2$ para la segunda) de las estructuras optimizadas mostradas en la figura 4.3, obtenidas tras adicionar moléculas explícitas de H₂O.

Modelo	$r_{\text{Cu(II)-CO}}$ [Å]	$r_{1\text{-H}_2\text{O-Cu(II)}}$ [Å]	$r_{2\text{-H}_2\text{O-Cu(II)}}$ [Å]
3NO _{CO/S20} -0W	2.1960	-	-
3NO _{CO/S20} -1Wa	2.1895	2.6373	-
3NO _{CO/S20} -1Wb	2.1700	3.1067	-
3NO _{CO/S20} -2Wa	2.1893	2.7598	3.6913
3NO _{CO/S20} -2Wb	2.1567	3.2838	2.6409

Los efectos del disolvente sobre la familia de compuestos 3NO_{OH/S20} y 3NO_{CO/S20} son inesperados, pues al partir de estructuras en fase gas que tenían una concordancia razonable con los experimentos, resultaba lógico pensar que mejorando la descripción de los sistemas, mejorarían las propiedades de interés. En cualquier caso, no es posible negar la importancia de la participación del disolvente. La forma en que interacciona con las diferentes partes de las estructuras de interés influye de manera directa (interacción con el centro de coordinación) e indirecta (alterando la estructura del péptido) en el cálculo de propiedades que dependen tan cercanamente de la estructura de un compuesto.

Por este motivo es indispensable continuar con el estudio de la importancia del disolvente sobre la geometría del complejo Cu(II)-hIAPP(18-22) en solución. Para poder llevar a cabo esto, es necesario considerar más moléculas de

disolvente, con el objetivo de intentar reproducir lo más cercanamente posible las condiciones a las cuales está sujeto el fragmento en los experimentos. En este sentido es importante destacar que, a pesar de que el método de solvatación usado arroja algunas ideas sobre el comportamiento del agua al interactuar con el péptido complejado con cobre, la información sigue siendo limitada, sobre todo al aumentar la cantidad de moléculas de H_2O , considerando que, a pesar de usar un fragmento relativamente pequeño de la amilina, este sigue contando con una gran libertad conformacional, así como con una notable cantidad de sitios que pueden interactuar con las moléculas de disolvente.

Estudios conformacionales y de solvatación con BOMD

Si bien los resultados obtenidos en la sección anterior son muy relevantes, la metodología empleada puede llegar a causar ciertas interrogantes, pues la forma de inserción de las moléculas de agua es un tanto arbitraria y no solo eso, ya que, dada la complejidad de los sistemas, las estructuras obtenidas en las optimizaciones podrían ser mínimos locales poco representativos. Con esto en mente, en este capítulo se propuso usar una metodología alterna (basada en dinámicas moleculares tipo Born-Oppenheimer) que, en principio, debería ofrecer un panorama más amplio, no solo de la interacción del agua, sino del comportamiento conformacional del fragmento 18-22 de la amilina coordinada con cobre.

5.1 Dinámicas moleculares Born-Oppenheimer

Las estructuras iniciales se basaron en los modelos optimizados $3N1O_{OH/S20}-2Wb$ y $3N1O_{CO/S20}-2Wb$ (1 molécula de agua en cada cara del centro de coordinación, secciones 4.1 y 4.2) sobre las cuales se adicionaron dos moléculas de H_2O más (una de cada lado). Tras un cálculo de optimización, empleando el método descrito en la sección 3.1, se obtuvieron los modelos con cuatro aguas $3N1O_{OH/S20}-4W$ y $3N1O_{CO/S20}-4W$ que fueron utilizados como puntos de partida para las dinámicas correspondientes. Adicionalmente, se generó el modelo $3N1O_{CO/N22}-4W$ agregando cuatro H_2O a la estructura $3N1O_{CO/N22}-0W$, de manera análoga a los dos anteriores.

Las simulaciones de dinámica molecular tipo Born-Oppenheimer (BOMD, por sus siglas en inglés, en donde se resuelve el problema de estructura electrónica, que en este caso se hizo mediante DFT, en cada paso de la dinámica, dado un conjunto de coordenadas nucleares en determinado momento y propagando el movimiento de los núcleos vía dinámica clásica) se realizaron considerando un ensamble NVT, utilizando nuevamente TeraChem [37, 38] a lo largo de 60 ps,

con un tamaño de paso de 1 fs, fijando la temperatura a 300K y reescalando las temperaturas cada 50 pasos. Complementariamente, se fijaron condiciones de frontera esféricas para evitar efectos de evaporación. Una vez obtenidas las trayectorias, y descartadas las etapas de equilibración térmica, se realizó un muestreo para extraer los confórmeros de menor energía, los cuales fueron sujetos de minimización de energía a 0K.

Las estructuras más estables fueron utilizadas como puntos de partida para una segunda simulación, liberando las condiciones de frontera esféricas, con una duración de 20 ps, de los cuales se descartaron los primeros 3 ps (etapa de equilibrio térmico). Las estructuras de menor energía se extrajeron y optimizaron para ser usadas como nuevos puntos de partida para una segunda simulación de 20 ps sin restricciones esféricas. Esta segunda simulación sirvió como confirmación de la prevalencia de los modos de coordinación obtenidos durante los 20 ps previos. Concluida esta segunda BOMD, se extrajeron las estructuras correspondientes con los puntos de menor energía para su posterior optimización y cálculo de parámetros de EPR (secciones 3.1 y 3.2).

5.2 Prevalencia de los modos de coordinación

Uno de los principales objetivos de haber usado simulaciones de dinámica molecular en este trabajo fue ampliar la búsqueda de confórmeros estables, intentando evitar las limitaciones de las optimizaciones locales. Aunque los tiempos de simulación pueden parecer cortos para observar cambios conformacionales muy drásticos y/o extensivos, no debe restarse importancia a la relevancia de los resultados obtenidos tras haber realizado simulaciones Born-Oppenheimer con tal cantidad de puntos. Estas no sólo permitieron evaluar el comportamiento de las moléculas de agua de forma más exhaustiva, sino que ayudaron a evitar mínimos locales y descartar geometrías que parecían estables.

La figura 5.1 muestra las trayectorias de la segunda simulación de 20 ps a 300K para los modelos $3N1O_{OH/S20}$ (azul) y $3N1O_{CO/S20}$ (verde) y la primera de 20 ps para $3N1O_{CO/N22}$ (rojo) con cuatro moléculas de agua. La notación nWx (con $n=0,1,2$ y x =cara del centro de coordinación) usada para distinguir a

los modelos anteriores se descartó a partir de esta sección para simplificar la notación de las pruebas sucesoras, además de que todas estas utilizan cuatro moléculas de disolvente.

En las trayectorias de la figura 5.1 existen dos aspectos importantes a resaltar: el primero es la caída abrupta del perfil del modelo $3N1O_{CO/N22}$ alrededor de los 8 ps, que sirve como evidencia de la existencia de una estructura poco estable que tuvo que modificar drásticamente su estructura para poder adquirir un arreglo de menor energía; el segundo es que, para los intervalos de tiempo y condiciones utilizadas en las dinámicas, existe un traslape de los perfiles energéticos de las trayectorias de los modelos $3N1O_{OH/S20}$ y $3N1O_{CO/S20}$, que además no sufren cambios radicales en sus modos de coordinación, invitando a pensar que, además de ser estables, existe la posibilidad de coexistencia de ambos modos.

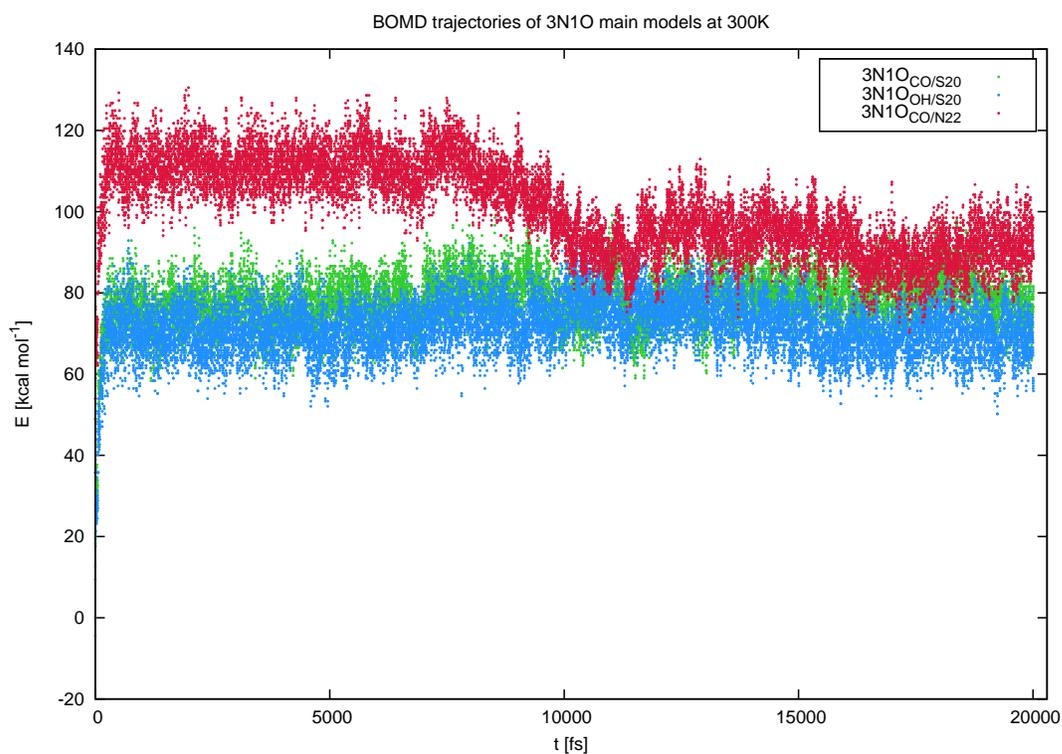


Figura 5.1: Perfiles de energía de las BO-MD de tres modelos del complejo HSNN con Cu(II). Los modelos presentados son: $3NO_{CO/S20}$ (verde), $3NO_{OH/S20}$ (azul) y $3NO_{CO/N22}$ (rojo).

Tras analizar la trayectoria azul, que corresponde a $3N1O_{OH/S20}$, se observó que, una vez descartada la etapa de calentamiento, el oxígeno de la Ser20 per-

manece coordinado al cobre, así como el resto de los nitrógenos originalmente propuestos, a lo largo de todas las simulaciones realizadas. Lo anterior puede observarse en la figura 5.2a, que es el confórmero de menor energía extraído de la dinámica, y cuya estructura fue optimizada, y que posee la misma estructura alrededor del centro de Cu(II). Las oscilaciones observadas a lo largo del perfil se atribuyen a cambios ligeros en el arreglo espacial de los grupos pertenecientes a las asparaginas del C-terminal. Los cambios estructurales más perceptibles ocurren, sobre todo, en la distribución y arreglo de las aguas (discutido más adelante en la sección 5.3).

De manera similar, el modelo 3N1O_{CO/S20}, denotado por el perfil verde, conserva la estructura alrededor del centro metálico prácticamente sin cambio alguno. Nuevamente, las modificaciones respecto a la estructura de partida suceden mayoritariamente en los últimos dos residuos y en el arreglo de las moléculas de agua. La estructura del mínimo energético, que además es representativa del resto de la simulación, se muestra en la figura 5.2b).

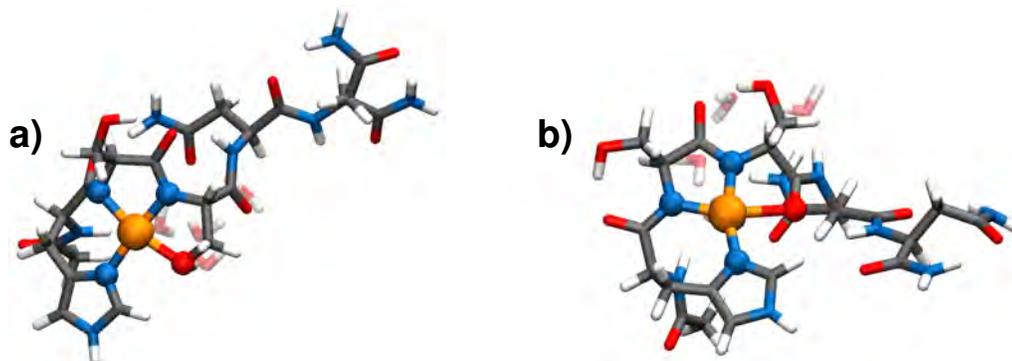


Figura 5.2: Estructuras optimizadas de los mínimos energéticos extraídos de las segundas dinámicas de 20 ps a 300K (figura 5.1) de: a) 3N1O_{OH/S20} y b) 3N1O_{CO/S20}.

La discusión de lo sucedido con el modelo 3N1O_{CO/N22} se incluye en la siguiente sección.

5.2.1 Inestabilidad y evolución de 3N1O_{CO/N22}

Dada la forma inesperada en que se dio el desarrollo del modelo 3N1O_{CO/N22}-4W se decidió hacer un seguimiento más minucioso de lo ocurrido a lo largo del perfil rojo de la figura 5.1. A diferencia de esta última, la figura 5.3 muestra

una serie de insertos etiquetados con letras (a-e) con las estructuras alrededor de los puntos más relevantes a lo largo del perfil de $3\text{N1O}_{\text{CO}/\text{N22}}\text{-4W}$ (indicados con líneas de color rojo).

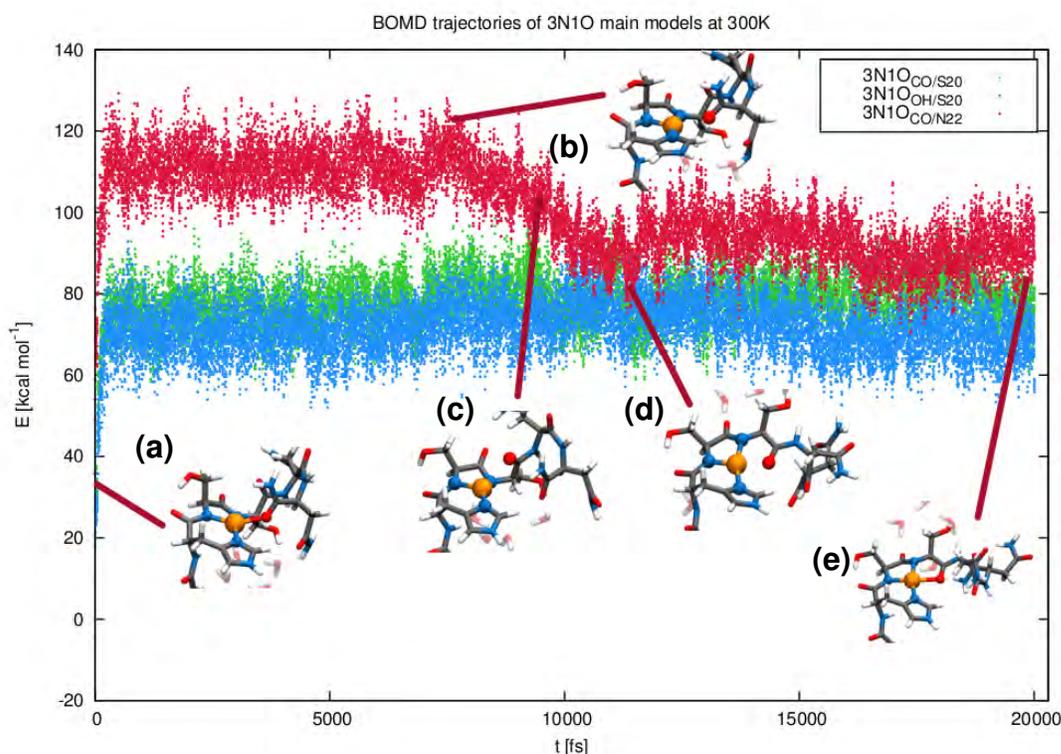


Figura 5.3: Perfiles de energía de las BO-MD de tres modelos del complejo HSNN con Cu(II). Los modelos presentados son: $3\text{NO}_{\text{CO}/\text{S20}}$ (verde), $3\text{NO}_{\text{OH}/\text{S20}}$ (azul) y $3\text{NO}_{\text{CO}/\text{N22}}$ (rojo). Las estructuras (etiquetadas con letras) pertenecen únicamente a la trayectoria del modelo $3\text{NO}_{\text{CO}/\text{N22}}$. Los perfiles azul y verde se conservan como referencia.

Al inicio de la dinámica, se encuentra la estructura del punto de partida (punto a), el cual fue extraído de la simulación de 60 ps a 300K con restricciones esféricas, en donde ya es posible apreciar al conjunto de aguas agrupadas en un cúmulo en la cara inferior del compuesto. El siguiente punto importante, etiquetado como (b), se ubica alrededor de 8 fs. Este marca el inicio de la caída del perfil energético, teniendo como característica principal un alargamiento del enlace Cu(II)- $\text{O}_{\text{CO}/\text{N22}}$ (que va de 2.17 Å en la estructura inicial a 2.43 Å en b). Este incremento en la distancia desestabiliza al sistema, induciendo un proceso de cambio en el modo de coordinación considerablemente drástico: en el punto (c) el oxígeno ligante se aleja hasta 5.36 Å del cobre, dejando un centro con modo de coordinación 3N.

La etapa de cambios drásticos continúa hasta llegar al punto (d), a partir del cual se observa una nueva etapa de estabilización, iniciada por la aproximación del oxígeno del carbonilo de la serina 20 al cobre (CO/S20 queda a 5.87 Å mientras que CO de N22 queda a 2.11 Å de distancia). Finalmente, al concluir el tiempo de simulación, es posible observar que la última estructura ha recuperado el modo 3N1O, con el carbonilo de Ser20 ya coordinado con el Cu(II) a 2.2619 Å de distancia.

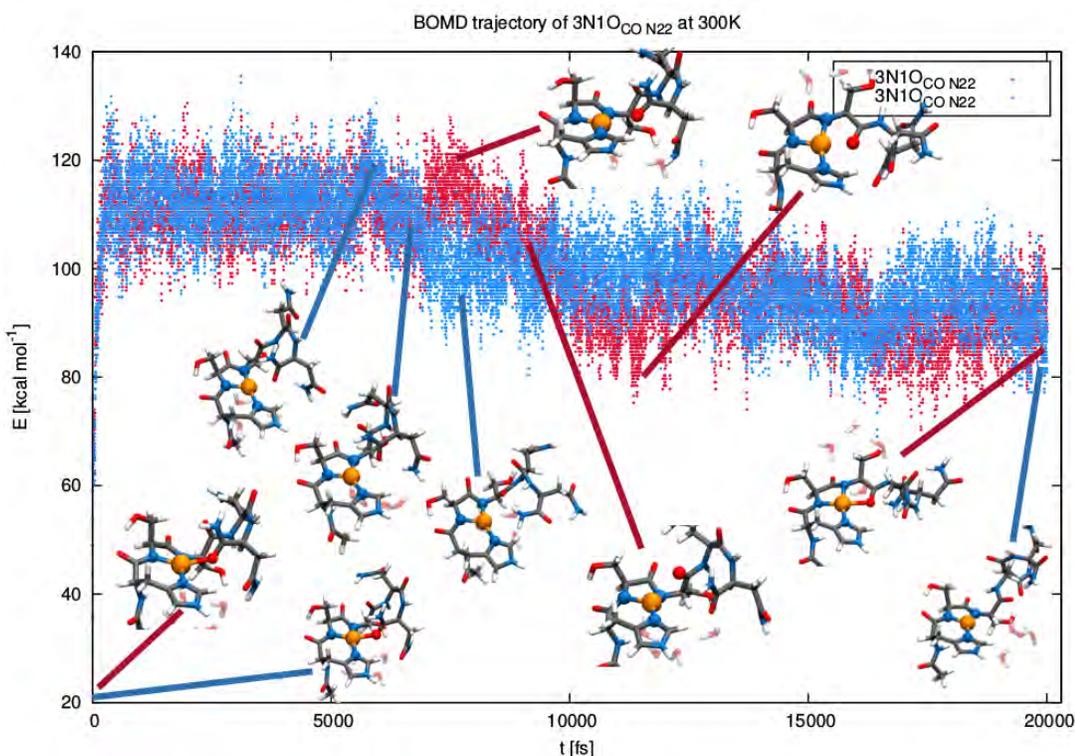


Figura 5.4: Perfiles de energía de las BO-MD de dos simulaciones BOMD del modelo $3N_{CO/N22}$: el perfil rojo llega a un modo $3N_{CO/S20}$, mientras que el azul permanece como 3N, demostrando la inestabilidad del punto de partida. Las estructuras iniciales difieren en 1.2 kcal/mol, como consecuencia de variaciones ligeras en las Asn 21, 22 y aguas.

Un proceso de reestructuramiento similar puede verse en la figura 5.4. En esta, se compara el perfil energético de la trayectoria del modelo $3N_{CO/N22}$ -4W de la figura 5.3, (perfil rojo) con uno nuevo (azul, figura 5.4), calculado bajo las mismas condiciones (20 ps, 300K, etc.) pero partiendo del segundo punto de menor energía de la simulación con restricciones esféricas (1.4 kcal/mol por encima del más estable). Aunque el punto de partida es esencialmente el mismo que el de la figura 5.1, y las únicas diferencias surgen de ligeras

variaciones en los residuos hacia el extremo C-terminal y las moléculas de H_2O , se presenta nuevamente un cambio en el modo de coordinación, indicado por el cambio relativamente pronunciado en el perfil.

En este caso, la coordinación con el carbonilo de Asn22 se pierde alrededor de los 6 ps, pero, a diferencia de la trayectoria roja, la azul sigue un proceso de relajación estructural que concluye en un modo de coordinación 3N, con los residuos accesorios (**Asn 21 y N22**) más extendidos que al inicio, en vez de optar por coordinarse con algún otro grupo del péptido para estabilizarse. Al comparar las energías relativas de las estructuras finales de ambas simulaciones, se tiene que el punto final de la azul es 6.15 kcal/mol más alta que el punto tipo $3NO_{CO/N22}$. Esto confirma que el modelo $3NO_{CO/N22}$ es poco estable y es capaz de seguir más de un camino para reestructurarse y llegar a una geometría más estable. Por esto fue necesario modificar un poco el tratamiento de este modelo respecto a lo planteado en la metodología (sección 5.1), pues en vista de la incapacidad de conservar la coordinación tras una dinámica completa, fue necesario recurrir a una estructura previa a la pérdida de la coordinación con el $O_{CO/N22}$. La finalidad de esto fue continuar la comparación de los EPR y corroborar la dependencia estructural de tales propiedades.

5.3 Interacción de cuatro H_2O con hIAPP(18-22)

El uso de las BO-MD, dentro de este estudio, fue pensado originalmente para buscar la mejor forma de solvatar al fragmento de amilina, evitando sesgos, así como mínimos locales no representativos. Tras haber sometido los diferentes modelos a la metodología propuesta, y haber analizado los resultados, fue evidente que esta herramienta podía arrojar más resultados de los esperados, como se vio en la sección anterior.

A la par de la búsqueda de los confórmeros más estables (figura 5.2), considerando las limitaciones (en cuanto a estabilidad) de los sistemas, fue posible estudiar el comportamiento de las moléculas de disolvente interaccionando con el fragmento y entre ellas. Las geometrías de $3N1O_{OH/S20}$, $3N1O_{CO/S20}$ y $3N1O_{CO/N22}$ extraídas de las BOMD se muestran en la figura 5.5, mientras las

energías relativas, así como los parámetros estructurales y de EPR correspondientes están contenidos en la tabla 5.1.

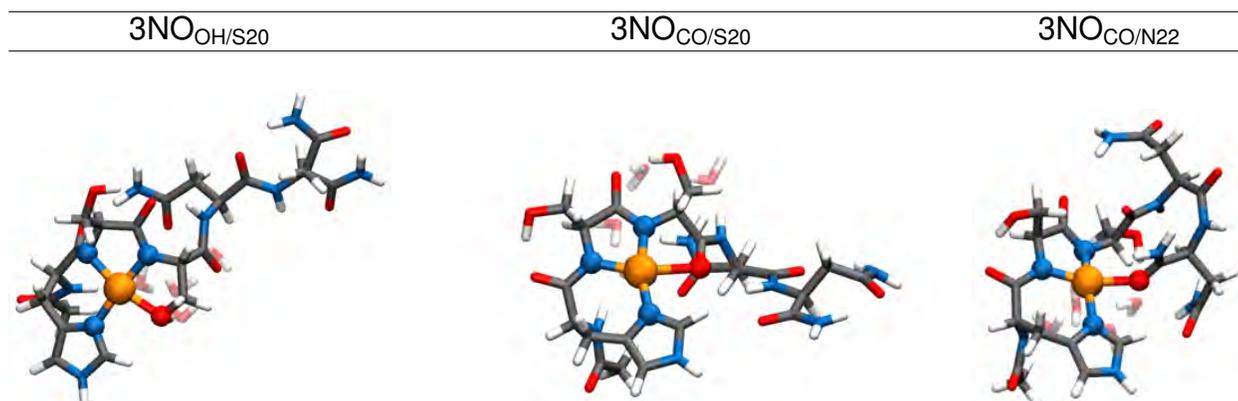


Figura 5.5: Geometrías optimizadas de puntos extraídos de las BOMD de la figura 5.1. $3\text{N1O}_{\text{OH}/\text{S}20}$ y $3\text{N1O}_{\text{CO}/\text{S}20}$ surgen de la segunda simulación de 20 ps a 300K, mientras que $3\text{N1O}_{\text{CO}/\text{N}22}$ se extrajo de la primera, antes de cambiar su modo de coordinación. En todos los casos, las moléculas de agua están situadas en la cara inferior de los compuestos.

En cuanto a los intereses de esta sección, el aspecto más importante a resaltar es, quizás, la gran afinidad de las moléculas de agua por sí mismas. Esto se hizo evidente tras la primera etapa de las simulaciones (dinámicas con restricciones esféricas), en donde, a pesar de haber partido de propuestas con dos moléculas de agua distribuidas en cada lado del plano del centro de coordinación, las moléculas de solvente formaron cúmulos en las caras inferiores, sin interactuar de forma destacable con el centro metálico del compuesto de coordinación, salvo por el modelo $3\text{N1O}_{\text{CO}/\text{N}22}$, en donde se puede ver que una de las aguas se ubica directamente sobre el cobre, indicando, posiblemente, una interacción débil (el O se ubica a 3.11 Å del Cu(II)). Para los modelos $3\text{N1O}_{\text{OH}/\text{S}20}$ y $3\text{N1O}_{\text{CO}/\text{S}20}$, las moléculas de H_2O permanecen juntas, pero a diferencia de $3\text{N1O}_{\text{CO}/\text{N}22}$, la interacción con el fragmento no sucede con el cobre, sino con grupos funcionales del péptido, siendo particularmente favorecidos los nitrógenos de las amidas desprotonadas en la serina 20. En ninguno de los casos se observó que los cúmulos de agua alteraran significativamente la estructura del centro de coordinación o del resto del péptido.

Sorprendentemente, el protocolo utilizado proporcionó estructuras considerablemente más consistentes con los resultados experimentales, como puede verse en la tabla 5.1. El valor de A_z es particularmente bueno, tanto para

Tabla 5.1: Energías relativas (E_{rel}), parámetros de EPR y geométricos pertenecientes a los modelos de la **figura 5.5**. Ox se refiere al ligante de oxígeno, que puede ser: OH/S20, CO/S20 o CO/N22. De haber alguna molécula de agua axial al plano del centro de coordinación, se hace referencia a esta con O_{Ax/H_2O} .

MODELO Erel[kcal/mol]	3N1O _{OH/S20} 0	3N1O _{CO/S20} 3.36	3N1O _{CO/N22} 38.73
parametros EPR			
g_x	2.0420	2.0470	2.0538
g_y	2.0570	2.0660	2.0571
g_z	2.1570	2.1760	2.1852
A_z	486	437	519
Distancias de enlace [Å]			
Cu-N _{H18}	1.974	1.947	2.010
Cu-N _{S19}	2.051	1.994	2.000
Cu-N _{S20}	1.902	1.914	2.010
Cu-Ox	2.120	2.397	2.170
Cu-O _{Ax/H₂O}	-	-	3.110
Ángulos de enlace			
N _{H18} -Cu-N _{S19}	101.56	111.82	108.14
N _{S19} -Cu-N _{S20}	84.41	82.39	81.34
N _{S20} -Cu-Ox	82.17	77.85	90.61
Ox-Cu-N _{H18}	95.92	88.18	85.61
N _{H18} -Cu-N _{S20}	173.98	165.50	155.45
N _{S19} -Cu-Ox	166.11	157.26	162.27
Ángulos de torsión			
Ox-Cu-N _{H18} -N _{S20}	10.70	22.00	-81.82
N _{S20} -Cu-Ox-N _{S19}	-15.00	-30.20	62.53
N _{H18} -Cu-N _{S19} -O _{Ax/H₂O}	-	-	-96.64

3N1O_{OH/S20}, como para 3N1O_{CO/S20} (486 y 437 MHz, respectivamente). Como se mencionó antes, en ninguno de estos modelos existe interacción destacable con el centro de cobre, pero sí con el N de la amida de la serina 20. Una vez más parecen cumplirse las observaciones de Ames y Larsen [56] respecto a la relación entre la distancia Cu(II)-O y el valor de la constante hiperfina (sección 4.1): a menor distancia, mayor A_z . En comparación con el trabajo experimental de C. Sánchez-López et al. [60], el modelo que más se acerca a los resultados experimentales es 3N1O_{OH/S20}. Por otra parte, el mejor valor de g_z (2.1852) para esta serie surge de 3N1O_{CO/N22}. Además, aunque la distancia cobre-oxígeno no es la más corta, el valor de la constante de acoplamiento hiperfina es la más alta, rompiendo con las observaciones anteriores.

5.4 Asparagina 22 como ligante axial

Esta propuesta surgió como consecuencia de una serie de experimentos que demostraron que al modificar el fragmento 18-22 de la amilina, cambiando la asparagina 22 (Asn22 o N22) por Leucina, y por tanto intercambiando la cadena lateral $-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}_2$ por $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, provocaba un corrimiento y cambio de intensidad en los espectros de dicroísmo circular [60]. Estas evidencias parecían indicar que la Asn22 participa al coordinar al cobre, pero no como parte del centro de coordinación principal, sino como un ligante ubicado fuera del plano, probablemente axial al centro metálico.

Para investigar esta variante, se propuso, como primer paso, modificar las estructuras de los modelos $3\text{N1O}_{\text{OH}/\text{S20}}$ y $3\text{N1O}_{\text{CO}/\text{S20}}$ utilizando el código de visualización y edición molecular Avogadro [59], para orientar al carbonilo de la cadena lateral de la Asn22 de modo que el oxígeno quedase como ligante debajo y sobre el plano (Ax1 y Ax2, respectivamente en la figura 5.6). Estas estructuras se optimizaron en fase gas, sin moléculas de agua explícitas, utilizando la metodología ya descrita (sección 3.2).

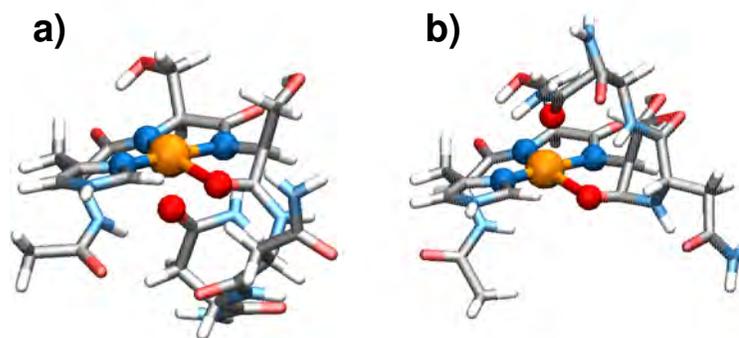


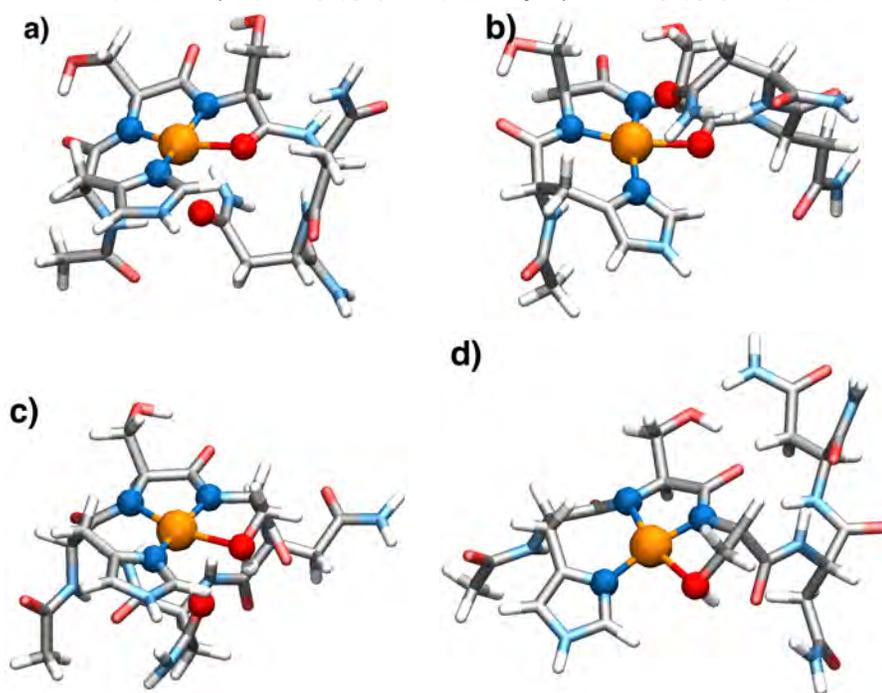
Figura 5.6: Modelo $3\text{N1O}_{\text{CO}/\text{S20}}$ con el oxígeno del carbonilo de la cadena lateral de la N22 como ligante axial debajo y sobre el plano (a y b respectivamente). Se construyeron variantes similares para el modelo $3\text{N1O}_{\text{OH}/\text{S20}}$.

Posteriormente, a las estructuras de los modelos $3\text{N1O}_{\text{OH}/\text{S20}} \text{O}_{\text{Ax}/\text{N22}}\mathbf{1}$ (más estable) y $3\text{N1O}_{\text{CO}/\text{S20}} \text{O}_{\text{Ax}/\text{N22}}\mathbf{1}$, se agregaron 4 moléculas de agua con arreglos

similares a los que se habían observado anteriormente. Se hicieron varias pruebas de diferentes arreglos de agua para cada fragmento peptídico para buscar la estructura de menor energía posible. Estas geometrías se optimizaron en TeraChem [37-39] (sección 3.1). Una vez minimizada la energía, se calcularon los parámetros de EPR correspondientes en ORCA [44, 45], incluyendo solvente implícito mediante COSMO.

Para evaluar la persistencia de los modelos con coordinación axial de carbonilo, se utilizaron las formas de menor energía obtenidas en la pruebas con cuatro H_2O en cada caso ($3\text{N1O}_{\text{CO}/\text{S20}}$ y $3\text{N1O}_{\text{OH}/\text{S20}}$) como puntos de partida para una dinámica molecular BO en TeraChem. Las trayectorias se calcularon a lo largo de 20ps con T_{inicial} y T_{final} de 300K. Las estructuras de menor energía se extrajeron y optimizaron nuevamente en TeraChem.

Figura 5.7: Estructuras optimizadas de los modelos $3\text{N1O}_{\text{CO}/\text{S20}}$ y $3\text{N1O}_{\text{OH}/\text{S20}}$ con carbonilo axial adicional. Los modelos etiquetados con un 1 tiene al $\text{O}_{\text{Ax}/\text{N22}}$ por debajo del plano, mientras que los etiquetados con 2 lo tiene sobre el plano. Las figuras de la serie son: a) $3\text{N1O}_{\text{CO}/\text{S20}} \text{O}_{\text{Ax}/\text{N22}}-1$, b) $3\text{N1O}_{\text{CO}/\text{S20}} \text{O}_{\text{Ax}/\text{N22}}-2$, c) $3\text{N1O}_{\text{OH}/\text{S20}} \text{O}_{\text{Ax}/\text{N22}}-1$ y d) $3\text{N1O}_{\text{OH}/\text{S20}} \text{O}_{\text{Ax}/\text{N22}}-2$



Como se mencionó antes, se consideraron los modos $3\text{N1O}_{\text{OH}/\text{S20}}$ y $3\text{N1O}_{\text{CO}/\text{S20}}$ con el carbonilo de la Asn22 ($\text{O}_{\text{Ax}/\text{N22}}$) por encima y debajo del plano (fig. 5.6)

para identificar a los modelos con coordinación con $O_{Ax/N22}$ de menor energía. Las estructuras optimizadas se muestran en la figura 5.7, mientras que sus parámetros de EPR y energías relativas están en la tabla 5.2.

Tabla 5.2: Energía relativa, E_{rel} (en kcal/mol, fase gas, tomando como referencia al modelo $3N1O_{OH/S20}-0W$, sección 3.5) y parámetros EPR experimentales y calculados para el complejos Cu(II)-HSSNN con coordinación $3N1O_{O_{Ax/N22}}$ por debajo (1) y encima (2) del plano, sin moléculas de agua. Las columnas $\%g_z$, y $\%A_z$ muestran el porcentaje de desviación absoluta con respecto a los valores experimentales.

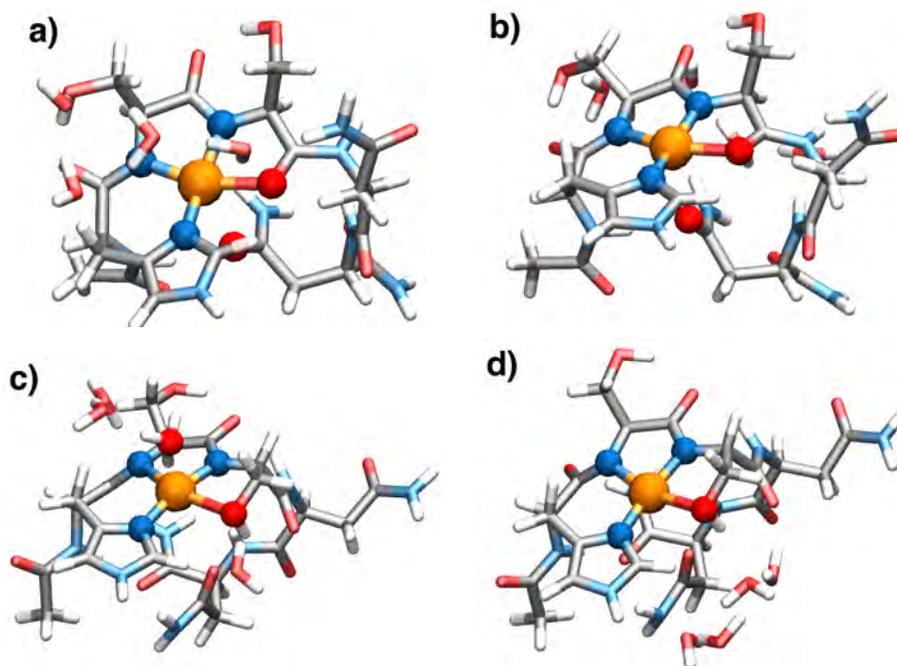
Estructura	E_{rel}	g_x	g_y	g_z	$\%g_z$	A_z	$\%A_z$
exp	-	2.055	2.087	2.239	-	474	-
$3N1O_{OH/S20}-0W$	0	2.042	2.065	2.168	3.17	340	28.17
$3N1O_{CO/S20} O_{Ax/N22} 1$	5.74	2.054	2.077	2.191	2.14	496	4.73
$3N1O_{CO/S20} O_{Ax/N22} 2$	3.89	2.051	2.073	2.187	2.33	475	0.23
$3N1O_{OH/S20} O_{Ax/N22} 1$	-8.78	2.045	2.076	2.180	2.65	383	19.10
$3N1O_{OH/S20} O_{Ax/N22} 2$	2.75	2.042	2.065	2.167	3.22	357	24.63

En este caso, los valores de los parámetros de EPR fueron calculados con COSMO, motivo por el cual los valores obtenidos para $3N1O_{OH/S20}$ en la sección 3.5 (en donde se hicieron cálculos en fase gas) no coinciden con los presentados en la tabla 5.2. Incluso, es posible observar que la introducción de tal aproximación tiene un efecto poco favorable, particularmente para A_z . Comparativamente, la inclusión del carbonilo de la asparagina 22 como ligante axial produce mejoras sustanciales en cuanto a los parámetros de EPR, particularmente para los modelos $3N1O_{CO/S20} O_{Ax/N22} 1$ y **2**. Sin embargo, dado que estos modelos no incluyen aguas explícitas, su verdadero propósito es proporcionar estructuras base para adicionar moléculas de agua y poder buscar geometrías que puedan reproducir las observaciones experimentales.

De los modelos anteriores se tomaron las estructuras $3N1O_{OH/S20} O_{Ax/N22} 1$ (más estable) y $3N1O_{CO/S20} O_{Ax/N22} 1$ (análogo al modelo con OH/S20) como base para adicionar moléculas de H_2O en diferentes arreglos alrededor del fragmento de amilina. La figura 5.8 muestra las dos estructuras de menor energía para ambos modelos con 4 aguas adicionales, ya optimizadas.

Las energías relativas resultantes, en conjunto con los valores de EPR se incluyen en la tabla 5.3. Estos valores muestran que, a pesar de no estar participando directamente en el centro de coordinación, la inclusión de agua en los sistemas mejora los resultados respecto a los experimentos. Los resultados

Figura 5.8: Estructuras optimizadas de los modelos $3N1O_{CO/S20} O_{Ax/N22}^{-1}$ y $3N1O_{OH/S20} O_{Ax/N22}^{-1}$ con 4 H_2O . Se muestran las estructuras de menor energía obtenidas: a) $3N1O_{CO/S20} O_{Ax/N22}^{-1-w1}$, b) $3N1O_{CO/S20} O_{Ax/N22}^{-1-w2}$, c) $3N1O_{OH/S20} O_{Ax/N22}^{-1-w1}$ y d) $3N1O_{OH/S20} O_{Ax/N22}^{-1-w2}$.



obtenidos en esta serie de pruebas muestran, una vez más, que el disolvente tiene una gran influencia sobre el ambiente electrónico alrededor del centro paramagnético de Cu(II).

5.4.1 Interacciones tipo puente de hidrógeno

Tras analizar los datos obtenidos de las pruebas anteriores, en conjunto con las estructuras optimizadas, se observó que las estructuras que mejor se apegaban a los resultados experimentales tenían, como elementos en común, la participación de los ligantes en interacciones de tipo puente de hidrógeno, ya sea con alguna de las moléculas de agua o con algún grupo funcional dentro del mismo fragmento peptídico (determinadas por criterio de distancia). El efecto de estas sobre la polarización de espín afectará al ambiente electrónico y, por tanto, se verá reflejado en el parámetro g , así como en la constante de acoplamiento hiperfino.

Tabla 5.3: Energía relativa , E_{rel} (en kcal/mol, fase gas, respecto al modelo $3N1O_{OH/S20}$ de la sección 5.3) y parámetros EPR experimentales y calculados para las estructuras $3N1O_{CO/S20} O_{Ax/N22} 1-w(1 \text{ y } 2)$, $3N1O_{OH/S20} O_{Ax/N22} 1-w(1 \text{ y } 2)$ y los puntos mínimos optimizados de las BOMD, todas incluyendo 4 moléculas de H_2O . Las columnas $\%g_z$ y $\%A_z$ muestran el porcentaje de desviación absoluta con respecto a los valores experimentales.

Estructura	E_{rel}	g_x	g_y	g_z	$\%g_z$	A_z	$\%A_z$
exp	-	2.055	2.087	2.239	-	474	-
$3N1O_{OH/S20}$	0	2.042	2.057	2.157	3.66	486	2.58
$3N1O_{CO/S20} O_{Ax/N22} 1-w1$	20.20	2.054	2.068	2.184	2.47	532	12.31
$3N1O_{CO/S20} O_{Ax/N22} 1-w2$	14.32	2.055	2.081	2.194	2.02	477	0.54
$3N1O_{OH/S20} O_{Ax/N22} 1-w1$	22.43	2.030	2.122	2.198	1.79	421	11.25
$3N1O_{OH/S20} O_{Ax/N22} 1-w2$	10.63	2.045	2.071	2.174	2.89	424	10.61
$3N1O_{CO/S20} O_{Ax/N22} 1-MD12044$	6.77	2.050	2.052	2.164	3.35	597	26.04
$3N1O_{OH/S20} O_{Ax/N22} 1-MD7577$	0.87	2.044	2.071	2.1737	2.91	346	26.98

La descripción de estas interacciones para los modelos con mejores EPR (ver tablas 5.2 y 5.3) se encuentran en la tabla 5.4. La notación en la columna "INTERACCIÓN" se explica a continuación: **átomo (o grupo) electrodonador / residuo al que pertenece el donador** → **átomo (o grupo) electroaceptor / residuo al que pertenece el aceptor**. Las letras "mn" indican que el grupo está en la cadena principal del péptido, mientras "sd" indica que forma parte de la cadena lateral. Los grupos son: OH = hidroxilo, CO = carbonilo, N = amina (secundaria o terciaria) y H_2O = agua.

Comparando los resultados de los cálculos de EPR con las observaciones de la tabla 5.4, se identificaron las siguientes tendencias:

1. La mejora más sustancial en g_z ocurre cuando el carbonilo lateral de la Asn22 dona a un grupo NH.
2. Un ligante ecuatorial (en el plano Cu(II)-3NO) como donador hace que A_z baje un poco. Al mismo tiempo un ligante ecuatorial como donador mejora g_z ligeramente.
3. H_2O coordinada axialmente hace que A_z incremente de manera considerable.

Estas observaciones nos llevaron a realizar una nueva BOMD a baja temperatura, pues consideramos que al disminuir la energía promedio del sistema, podría

Tabla 5.4: Distancias (r) de interacciones tipo puente de hidrógeno identificadas en los modelos con mejores EPR con y sin moléculas de agua. La notación en la columna "INTERACCIÓN" es: átomo (o grupo) electrodonador / residuo al que pertenece el donador \rightarrow átomo (o grupo) electroceptor / residuo al que pertenece el aceptor. OH=hidroxilo, CO=carbonilo, N=amina (secundaria o terciaria) y H₂O=agua; "mn" denota pertenencia a cadena principal, mientras que "sd" se refiere a la cadena lateral del péptido.

MODELO	INTERACCIÓN	r [Å]
Sin H₂O		
3N1O _{OH/S20} O _{Ax/N22} -1	Nmn/S20 \rightarrow NHmn/N22	2.7965
3N1O _{OH/S20} O _{Ax/N22} -2	CO/S20 \rightarrow OH/S20	1.7111
3N1O _{CO/S20} O _{Ax/N22} -1	COsd/N22 \rightarrow NHmn/H18	1.9412
3N1O _{CO/S20} O _{Ax/N22} -2	CO/S20 \rightarrow NHmn/N22	2.0500
Incluyendo 4 H₂O		
3N1O _{OH/S20} O _{Ax/N22} 1-w2	Nmn/S20 \rightarrow NHmn/N22	2.8283
3N1O _{OH/S20} O _{Ax/N22} 1-w1	OH/S20 \rightarrow H ₂ O	1.9120
	Nmn/S20 \rightarrow NHmn/N22	2.9784
	Nmn/S19 \rightarrow H ₂ O	1.8715
3N1O _{CO/S20} O _{Ax/N22} 1-w2	COsd/N22 \rightarrow NHmn/H18	1.9502
3N1O _{CO/S20} O _{Ax/N22} 1-w1	COsd/N22 \rightarrow NHmn/H18	1.9375
	H ₂ O \rightarrow CO-S20	2.0642

facilitarse la formación de las interacciones tipo puente de hidrógeno ayudando, posiblemente, a estabilizar un modelo que pueda explicar los experimentos. Esta BOMD, al igual que en casos anteriores, se calculó con 20000 pasos (20 ps) partiendo de una temperatura de 300K, pero a diferencia de las anteriores, se propuso una T_{final} de 150K, que es la temperatura a la cual se han realizado las mediciones de EPR del fragmento de amilina coordinados con cobre. Se tomó el modelo **3N1O_{OH/S20} O_{Ax/N22}1-w1** como estructura de partida, siendo el modelo con el mejor valor para g_z (2.198).

De la dinámica a 150K se extrajeron dos estructuras de baja energía que se alejaban notoriamente del promedio (puntos 8291 y 15219). Ambas fueron optimizadas en TeraChem y, posteriormente, estas geometrías se utilizaron para calcular los EPR en ORCA. Los resultados de energía, relativa al modelo **3N1O_{OH/S20}**, y parámetros de EPR se muestran en la tabla 5.5. Las estructuras correspondientes se encuentran en la figura 5.9.

Tras analizar la geometrías obtenidas, se observó que la interacción con el carbonilo de Asn22 no es particularmente favorecida, aunque al no alejarse totalmente, podría estar participando en una especie de segunda esfera de

Tabla 5.5: Energía relativa , E_{rel} (en kcal/mol, fase gas, respecto al modelo $3N1O_{OH/S20}$) y parámetros EPR experimentales y calculados para el las estructuras $3N1O_{CO/S20} O_{Ax/N22} 1-w(1 \text{ y } 2)$, $3N1O_{OH/S20} O_{Ax/N22} 1-w(1 \text{ y } 2)$ y los puntos mínimos optimizados de las BOMD. Las columnas $\%g_z$ y $\%A_z$ muestran el porcentaje de desviación absoluta con respecto a los valores experimentales.

Estructura	E_{rel}	g_x	g_y	g_z	$\%g_z$	A_z	$\%A_z$
exp	-	2.055	2.087	2.239	-	474	-
$3N1O_{OH/S20} O_{Ax/N22} 1-150K_{8291}$	15.41	2.031	2.144	2.216	1.05	418	11.82
$3N1O_{OH/S20} O_{Ax/N22} 1-150K_{15219}$	13.47	2.029	2.146	2.217	0.99	417	11.96

coordinación. Las trayectorias muestran, de manera consistente con las estructuras recuperadas, que hay cierta preferencia por coordinar una molécula de agua al cobre. Todo esto se ve reflejado en mejoras sustanciales a g_z , pero, desafortunadamente la diferencia entre g_x y g_y se aleja considerablemente del rango esperado. Al analizar los valores g_x y g_y , se observa que hay una separación de alrededor de 0.1 unidades, que es demasiado para un compuesto con geometría plana (característico de Cu(II)). Un espectro de EPR con esas características (con un carácter predominantemente rómbico), estaría describiendo a un compuesto con características estructurales distintas a las reportadas [3]. El análisis de las estructuras muestra que a medida que se acerca alguna molécula de agua al centro metálico, mayor será la distancia del OH de la Ser20, causando un mayor distanciamiento entre los valores g_x y g_y .

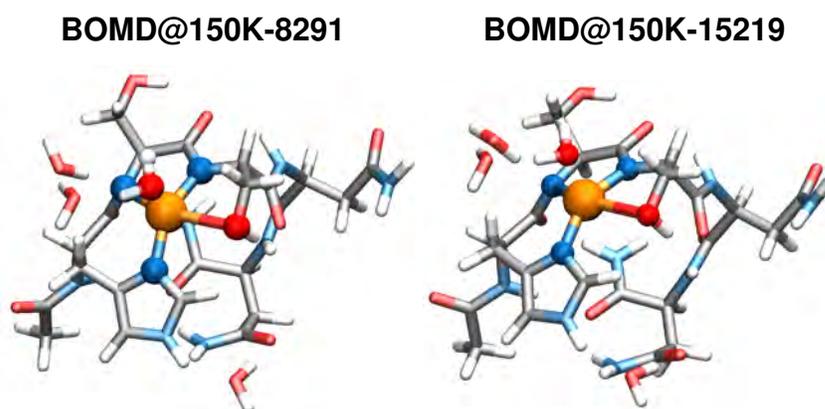


Figura 5.9: Estructuras optimizadas de los puntos de menor energía extraídos de la BOMD a 150K. Puede observarse que la coordinación con el carbonilo de Asn22 se pierde, pero una molécula de agua se coordina con el Cu(II).

Las observaciones hechas en esta serie de pruebas nos permiten resaltar lo siguiente, en relación a la importancia de las interacciones adicionales a las del centro metálico con sus ligantes:

1. De los dos grupos funcionales de la cadena lateral de la N22 (amino y carbonilo), el CO es el que tiene mayor propensión a permanecer como ligante axial, aunque ninguno de los dos está particularmente favorecido.
2. Las pruebas realizadas parecen indicar que la importancia de la cadena lateral de la Asn22 en el centro de coordinación no radica en ser un ligante axial fuerte, sino permitir el plegamiento del péptido, de modo que se incrementen las interacciones intramoleculares (puentes de H).
3. La conformación plegada permite estabilizar a las moléculas de agua en una de las caras del plano formado por el centro de coordinación, lo cual se traduce en una mejora sensible en los parámetros de EPR. Estas permanecen en las dinámicas.
4. Las interacciones de puentes de H entre átomos del centro de coordinación y el resto del sistema inducen cambios en la distribución de densidad de spin, los cuales se ven reflejados al calcular los espectros de resonancia paramagnética electrónica.

Como respuesta a la incertidumbre en cuanto al ligante de oxígeno en la coordinación del ión Cu(II) y el fragmento 18-22 de la hIAPP [3], se propusieron tres estructuras en donde dicho ligante fue proporcionado por el hidroxilo de la serina 20 ($O_{OH/S20}$), el carbonilo de la S20 ($O_{CO/S20}$) y el carbonilo de la cadena principal de la asparagina 22 $O_{CO/N22}$. Siendo que estos modelos únicamente proporcionaron una idea general del sistema, se utilizaron como base para la continuación de este estudio al incluir solvatación explícita e implícita, así como variaciones a las estructuras de los complejos.

La introducción de moléculas explícitas de agua hizo evidente la importancia de la participación del disolvente para la correcta (o mejor) descripción de los sistemas estudiados. A pesar de no participar directamente en el centro de coordinación, se observó que esta desempeña un papel sumamente importante al interactuar con los ligantes, influyendo en las propiedades electrónicas de los complejos, como muestran los datos de EPR. Otro punto a favor de la inclusión de agua explícita surge de su capacidad de estabilizar ciertos arreglos estructurales mediante la formación de redes de puentes de hidrógeno. El hecho de que las aguas se aglomeren y no interaccionen con el centro metálico no implica que no tengan una labor notable.

El uso de dinámicas moleculares tipo Born-Oppenheimer hizo posible una exploración conformacional más extensa de lo que hubiera sido posible utilizando únicamente optimizaciones locales, tanto del arreglo de las moléculas de disolvente alrededor del péptido, como de la conformación del centro de coordinación y cadenas laterales del fragmento coordinado con Cu(II). El muestreo de estructuras de baja energía permitió la obtención de modelos razonablemente consistentes con los resultados experimentales obtenidos [60].

Adicional a la exploración estructural, el uso de BO-MD permitió evaluar la estabilidad de algunos de nuestros modelos más representativos, tomando como indicador su prevalencia dentro de las ventanas de tiempo usadas en las simulaciones. Si bien estas podrían llegar a considerarse breves, esta serie de pruebas ofrece una idea más clara sobre la viabilidad de las estructuras

planteadas. Una estructura poco estable, como el caso del modelo $3NO_{CO/N22}$ (oxígeno proporcionado por el carbonilo de la cadena principal de la asparagina 22) modificará drásticamente su estructura para disminuir su energía, mientras que un modelo estable permanecerá dentro de cierto valor energético sin cambios estructurales abruptos (modelos $3NO_{CO/S20}$ y $3NO_{OH/S20}$). Esto, junto con los parámetros de EPR calculados, sirvió como criterio para poder descartar la propuesta coordinada ecuatorialmente con el carbonilo de la Asn22. Al mismo tiempo, nuestras dinámicas apuntan hacia la posible coexistencia de $3NO_{CO/S20}$ y $3NO_{OH/S20}$ a 300K en solución.

En relación a la participación de ligantes axiales al plano $3N1O$, la coordinación axial con N22 está más favorecida energéticamente que con H_2O . La presencia de donadores en esta posición induce cambios en las distancias entre el centro de cobre y los ligantes principales, particularmente en relación a la separación Cu(II)-O. El mayor cambio de esta distancia se aprecia cuando existe una molécula de agua en posición axial, lo que se refleja como un incremento en el valor de g_z (el electrón desapareado está más localizado alrededor del Cu(II)). La inclusión de la cadena lateral de la Asn22 como ligante axial representa una de las mejoras más significativas en cuanto al cálculo de los parámetros de EPR, siendo el modelo $3N1O_{CO/S20}O_{Ax/N22} \cdot w2$ (tabla 5.3) el que más se acerca a los experimentos, aunque, al tratarse de una estructura considerablemente más tensionada, evidentemente no se espera que sea el modelo de menor energía (14.3kcal/mol por encima de $3N1O_{OH/S20}$).

El panorama ofrecido por este trabajo refuerza la participación del cobre como inhibidor de fibrillogénesis de la amilina humana. Este efecto no proviene únicamente de la coordinación con un sitio clave (His18) en la estructura de los monómeros, sino que los resultados obtenidos apuntan a que el Cu(II) contribuye a la formación y/o estabilización de una vasta colección de estructuras, las cuales podrían estar compitiendo con las geometrías que favorecen a las fibras por diferentes mecanismos, como equilibrios entre modos de coordinación o por inducción de cambios conformacionales poco convenientes para la obtención de pasadores β , indispensables en la construcción de las protofibras. Las observaciones también refuerzan el papel del Cu(II) en la generación de especies oligoméricas, pues parece estabilizar estructuras atípicas que, evidentemente, no seguirán los mecanismos convencionales de fibrillogénesis.

6.1 Perspectivas

Este estudio complementa los trabajos realizados alrededor de la coordinación del Cu(II) con el fragmento 18-22 de la amilina humana, que es el principal responsable de la asociación del péptido con dicho metal. Sin embargo, dadas las características del péptido, resulta sumamente difícil estudiar cadenas más largas, por no decir a la hIAPP completa. El uso de fragmentos puede resultar poco representativo de la verdadera naturaleza de la proteína, de ahí que se sugiera el uso más extensivo de herramientas computacionales para investigar estos sistemas.

A raíz de esto, las interrogantes obvias, y posibles direcciones para encaminar la continuación de este trabajo, son: el estudio del cobre con otros segmentos del péptido, pues recientemente se ha sugerido que la coordinación del Cu(II) ocurre hacia el extremo C terminal y no N terminal, como sostienen C. Sánchez-López *et. al* [60]; otro posible camino es estudiar la interacción del cobre con la totalidad de la secuencia de la amilina y los efectos que el compuesto Cu(II)-hIAPP tendría sobre los mecanismos de agregación. Esto último podría utilizarse en estudios comparativos de los mecanismos de agregación en que participa la amilina libre y complejando al cobre.

Adicionalmente, dada la importancia del Zn(II) en los gránulos secretores, y en la regulación glicémica, en general, una tercera ruta de estudio podría encaminarse a analizar la influencia de este metal sobre el mismo fragmento para ampliar el panorama de la importancia y las diferencias que este tiene en relación a la amilina y el cobre.

Referencias

- [1] P Westermark, A Andersson y G. T. Westermark, *Physiol Rev* **2011**, *91*, 795-826.
- [2] L. Ma, X. Li, Y. Wang, W. Zheng y T. Chen, *Journal of Inorganic Biochemistry* **2014**, *140*, 143 -152.
- [3] L. Rivillas-Acevedo, C. Sánchez-López, C. Amero y L. Quintanar, *Inorganic chemistry* **2015**, DOI 10.1021/ic502945k.
- [4] J. F. Boas, S. C. Drew y C. C. Curtain, *European biophysics journal : EBJ* **2008**, *37*, 281-94.
- [5] L. Nagel-Steger, M. C. Owen y B. Strodel, *ChemBioChem* **2016**, *17*, 657-676.
- [6] J. D. Schmit, K. Ghosh y K. Dill, *Biophysical Journal* **2011**, *100*, 450-458.
- [7] N. P. Reynolds, A. Soragni, M. Rabe et al., *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133*, 19366-19375.
- [8] S. J. C. Lee, T. S. Choi, J. W. Lee et al., *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 5398-5406.
- [9] M. Bucciantini, E. Giannoni, F. Chiti et al., *Nature* **2002**, *416*, 507-511.
- [10] M. Rowińska-Żyrek, *Dalton Trans.* **2016**, *45*, 8099-8106.
- [11] V. Wineman-Fisher, D. N. Bloch e Y. Miller, *Coordination Chemistry Reviews* **2016**, DOI 10.1016/j.ccr.2016.04.010.
- [12] World Health Organization, Global report on diabetes, **2016**, http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204871/1/9789241565257_eng.pdf.
- [13] C. Betsholtz, V. Svensson, F. Rorsman et al., *Experimental Cell Research* **1989**, *183*, 484 -493.
- [14] P. Cao, P. Marek, H. Noor et al., Islet amyloid: From fundamental biophysics to mechanisms of cytotoxicity, **2013**.
- [15] A. Leckström, K. Björklund, J. Permert, R. Larsson y P. Westermark, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1997**, *239*, 265 -268.

- [16] P. Westermark, Z.-C. Li, G. T. Westermark, A. Leckström y D. F. Steiner, *FEBS Letters* **1996**, *379*, 203 -206.
- [17] S. Jha, J. M. Snell, S. R. Sheftic et al., *Biochemistry* **2014**, *53*, 300-310.
- [18] B. Åkesson, G. Panagiotidis, P. Westermark e I. Lundquist, *Regulatory Peptides* **2003**, *111*, 55 -60.
- [19] D. L. Hay, S. Chen, T. A. Lutz, D. G. Parkes y J. D. Roth, *Pharmacological Reviews* **2015**, *67*, 564-600.
- [20] J. C. Stroud, C. Liu, P. K. Teng y D. Eisenberg, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2012**, *109*, 7717-22.
- [21] N. F. Dupuis, C. Wu, J. E. Shea y M. T. Bowers, *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133*, 7240-7243.
- [22] A. B. Soriaga, S. Sangwan, R. Macdonald, M. R. Sawaya y D. Eisenberg, *The Journal of Physical Chemistry B* **2015**, acs.jpcc.5b09981.
- [23] D. Gupta y J. L. Leahy, *Journal of Clinical Investigation* **2014**, *124*, 3292-3294.
- [24] R. Hu, M. Zhang, H. Chen, B. Jiang y J. Zheng, *ACS Chemical Neuroscience* **2015**, *6*, 1759-1768.
- [25] M. Zhang, R. Hu, B. Ren et al., **2016**, DOI 10.1021/acscchemneuro.6b00247.
- [26] M. Y. Donath, J. A. Ehses, K. Maedler et al., *Diabetes* **2005**, *54*, S108-S113.
- [27] A. Martel, L. Antony, Y. Gerelli et al., *Journal of the American Chemical Society* **2016**, jacs.6b06985.
- [28] E. T. Jaikaran y A. Clark, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **2001**, *1537*, 179 -203.
- [29] M. F. Tomasello, A. Sinopoli y G. Pappalardo, *Journal of diabetes research* **2015**.
- [30] A. S. Detoma, S. Salamekh, A. Ramamoorthy y M. H. Lim, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 608-621.
- [31] G. Forte, B. Bocca, A. Peruzzu et al., *Biological Trace Element Research* **2013**, *156*, 79-90.
- [32] E. C. Lee, E. Ha, S. Singh et al., *Physical chemistry chemical physics : PCCP* **2013**, *15*, 12558-71.
- [33] I. Riba, P. E. Barran, G. J. Cooper y R. D. Unwin, *International Journal of Mass Spectrometry* **2015**, *391*, 47-53.
- [34] L. Rivillas-Acevedo, R. Grande-Aztatzi, I. Lomelí et al., *Inorganic chemistry* **2011**, *50*, 1956-72.

- [35] C. Z. Gomez-Castro, A. Vela, L. Quintanar et al., *The journal of physical chemistry. B* **2014**, *118*, 10052-64.
- [36] G Schaftenaar y J. H. Noordik, *Journal of computer-aided molecular design* **2000**, *14*, 123-34.
- [37] I. S. Ufimtsev y T. J. Martinez, *Journal of Chemical Theory and Computation* **2009**, *5*, 2619-2628.
- [38] A. V. Titov, I. S. Ufimtsev, N. Luehr y T. J. Martinez, *Journal of Chemical Theory and Computation* **2013**, *9*, 213-221.
- [39] J. Kästner, J. M. Carr, T. W. Keal et al., *Journal of Physical Chemistry A* **2009**, *113*, 11856-11865.
- [40] J. Perdew, K Burke y M Ernzerhof, *Physical review letters* **1996**, *77*, 3865-3868.
- [41] A. M. Köster, P. Calaminici, M. E. Casida, V. D. Dominguez, R. Flores-Moreno, G. U. Gamboa, G. Geudtner, A. Goursot, T. Heine, A. Ipatov, F. Janetzko, J. M. del Campo, J. U. Reveles, A. Vela, B. Zuñiga and D. R. Salahub, *deMon2k*, The International deMon Developers Community, Cinvestav-IPN, México City, **2011**.
- [42] N. Godbout, D. R. Salahub, J. Andzelm y E. Wimmer, *Can J Chem* **1992**, *70*, 560-571.
- [43] J. Peisach y W. Blumberg, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1974**, *165*, 691-708.
- [44] F. Neese, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science* **2012**, *2*, 73-78.
- [45] F. Neese, *Journal of Chemical Physics* **2001**, *115*, 11080-11096.
- [46] M. Ernzerhof, G. E. Scuseria y I Introduction, *Journal of Chemical Physics* **1999**, *110*.
- [47] C. Adamo y V. Barone, *The Journal of Chemical Physics* **1999**, *110*, 6158.
- [48] F. Neese, *Journal of Chemical Physics* **2007**, *127*, DOI 10.1063/1.2772857.
- [49] F. Neese, *Inorganica Chimica Acta* **2002**, *337*, Protagonists in Chemistry: Karl Wieghardt, 181 -192.
- [50] F. Neese, *Journal of Chemical Physics* **2005**, *122*, DOI 10.1063/1.1829047.
- [51] F. Neese, *The Journal of Physical Chemistry A* **2001**, *105*, 4290-4299.
- [52] M. L. Munzarová en *Calculation of NMR and EPR Parameters*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2004**, págs. 461-482.

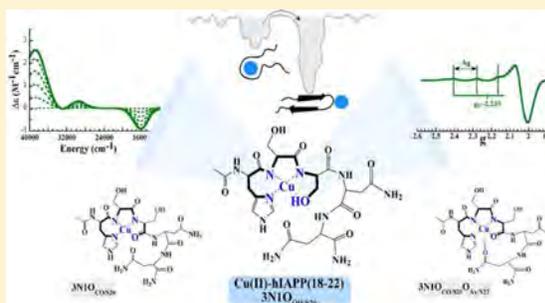
- [53] S. Patchkovskii y G. Schreckenbach en *Calculation of NMR and EPR Parameters*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2004**, págs. 505-532.
- [54] A. Klamt y G. Schuurmann, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1993**, 799-805.
- [55] S. Sinnecker, A. Rajendran, A. Klamt, M. Diedenhofen y F. Neese, *Journal of Physical Chemistry A* **2006**, *110*, 2235-2245.
- [56] W. M. Ames y S. C. Larsen, *Journal of Physical Chemistry A* **2009**, *113*, 4305-4312.
- [57] L. Quintanar, L. Acevedo, R. Grande-Aztatzi et al., *Coordination Chemistry Reviews* **2013**, *257*, 429-444.
- [58] R. Grande-Aztatzi, L. Rivillas-Acevedo, L. Quintanar y A. Vela, *Journal of Physical Chemistry B* **2013**, *117*, 789-799.
- [59] M. D. Hanwell, D. E. Curtis, D. C. Lonie et al., *Journal of Cheminformatics* **2012**, *4*, 17.
- [60] C. Sánchez-López, R. Cortés-Mejía, M. C. Miotto et al., *Inorganic Chemistry* **2016**, acs.inorgchem.6b01963.

Copper Coordination Features of Human Islet Amyloid Polypeptide: The Type 2 Diabetes Peptide

Carolina Sánchez-López,[†] Rodrigo Cortés-Mejía,[‡] Marco C. Miotto,[§] Andres Binolfi,[§] Claudio O. Fernández,[§] Jorge M. del Campo,[‡] and Liliana Quintanar*^{*,†}[†]Departamento de Química, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (Cinvestav), Mexico City, Mexico[‡]Departamento de Física y Química Teórica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City, Mexico[§]Max Planck Laboratory for Structural Biology, Chemistry and Molecular Biophysics of Rosario (MPLbioR, UNR-MPIbPC) and Instituto de Investigaciones para el Descubrimiento de Fármacos de Rosario (IIDEFAR, UNR-CONICET), Universidad Nacional de Rosario, Ocampo y Esmeralda, S2002LRK Rosario, Argentina

Supporting Information

ABSTRACT: Human islet amyloid polypeptide (hIAPP) is the major component of amyloid deposits found in pancreatic β -cells of patients with type 2 diabetes (T2D). Copper ions have an inhibitory effect on the amyloid aggregation of hIAPP, and they may play a role in the etiology of T2D. However, deeper knowledge of the structural details of the copper–hIAPP interaction is required to understand the molecular mechanisms involved. Here, we performed a spectroscopic study of Cu(II) binding to hIAPP and several variants, using electron paramagnetic resonance (EPR), nuclear magnetic resonance (NMR), electronic absorption, and circular dichroism (CD) in the UV–vis region in combination with Born–Oppenheimer molecular dynamics (BOMD) and density functional theory geometry optimizations. We find that Cu(II) binds to the imidazole N1 of His18, the deprotonated amides of Ser19 and Ser20, and an oxygen-based ligand provided by Ser20, either via its hydroxyl group or its backbone carbonyl, while Asn22 might also play a role as an axial ligand. Ser20 plays a crucial role in stabilizing Cu(II) coordination toward the C-terminal, providing a potential link between the S20G mutation associated with early onset of T2D, its impact in Cu binding properties, and hIAPP amyloid aggregation. Our study defines the nature of the coordination environment in the Cu(II)–hIAPP complex, revealing that the amino acid residues involved in metal ion binding are also key residues for the formation of β -sheet structures and amyloid fibrils. Cu(II) binding to hIAPP may lead to the coexistence of more than one coordination mode, which in turn could favor different sets of Cu-induced conformational ensembles. Cu-induced hIAPP conformers would display a higher energetic barrier to form amyloid fibrils, hence explaining the inhibitory effect of Cu ions in hIAPP aggregation. Overall, this study provides further structural insights into the bioinorganic chemistry of T2D.



INTRODUCTION

Human islet amyloid polypeptide (hIAPP) or amylin is an amyloidogenic C-terminally amidated peptide of 37 residues with sequence KCNTATCATQRLANFLVHSSNFG-AILSSTNVGSNTY-NH₂. It has a disulfide bridge between residues 2 and 7, and it is cosecreted with insulin by β -cells in the islets of Langerhans in the pancreas.¹ This peptide is the major component of amyloid deposits found in pancreatic islets affecting up to 80% of islets² in more than 90% of patients with type 2 diabetes.³

Type 2 diabetes is a multifactorial disease with genetic and environmental components, characterized by a decreased ability of insulin to stimulate glucose metabolism⁴ and a β -cell secretory dysfunction and/or decreased β -cell mass.⁵ Some mammalian species including humans, monkeys, felines

(domestic cat, lynx, cougars), and raccoons, are prone to form amyloid deposits in pancreatic islets, rendering them susceptible to type 2 diabetes. Remarkably, islet amyloid is not found in islets of rodents.⁶ Amyloid deposits are mostly present in extracellular sites in diabetic animals and may be extended to adjacent capillaries affecting islet function, which can be associated with the destruction and displacement of cells.² Moreover, it has been observed that patients with insulin resistance have higher plasma concentrations of hIAPP than healthy people.⁶ hIAPP is toxic to β -cells in vitro in its fibrillar form.⁷ Several studies suggest that the species with highest cytotoxicity are the protofibrils and oligomers, and not the

Received: August 12, 2016

Table 1. Peptide Sequences and EPR Parameters^a for Their Complexes with Cu(II)

peptide	sequence	g_{\parallel}	A_{\parallel} ($\times 10^{-4}$ cm ⁻¹)	coordination mode
hIAPP(15–22)	Ac-FLVHSSNN-NH ₂	2.234	164	3N1O
hIAPP(18–22)	Ac-HSSNN-NH ₂	2.239	158	3N1O
hIAPP(15–22)S19P	Ac-FLVHPSNN-NH ₂	2.233	173	2N2O
hIAPP(18–22) S19Sar ^b	Ac-HSarSNN-NH ₂	2.296	150	2N2O/1N3O
hIAPP(18–22) S20Sar ^b	Ac-HSSarNN-NH ₂	2.281	168	2N2O/1N3O
hIAPP(18–22) S19A	Ac-HASNN-NH ₂	2.240	159	3N1O
hIAPP(18–22) S20A	Ac-HSANN-NH ₂	2.246	151	3N1O
hIAPP(18–22) N21Q	Ac-HSSQN-NH ₂	2.239	156	3N1O
hIAPP(18–22) N22Q	Ac-HSSNQ-NH ₂	2.240	151	3N1O
hIAPP(18–22) N22L	Ac-HSSNL-NH ₂	2.244	146	3N1O

^a g_{\parallel} and A_{\parallel} values were obtained from the simulation of each spectrum; a full list of EPR parameters is given in Table S1. ^bSar = sarcosine or *N*-methylglycine.

mature fibrils formed by hIAPP.¹ Amyloid aggregates of hIAPP can induce apoptosis of β -cells through various mechanisms, which include disruption of lipid membranes, permeabilization of cell membranes, oxidative stress, activation of calpain-2, and mitochondrial dysfunction, among others.⁸

The process of amyloid formation has been studied extensively, leading to the identification of many factors that may affect its aggregation pathway, including genetic factors such as the S20G mutation in hIAPP,⁹ seeding process of the fragments of the hIAPP precursor (proIAPP) and hIAPP glycation.² The ability of hIAPP to form amyloid fibrils resides largely in its primary sequence. The region comprising residues 20–29 (SNNFGAILSS) is key to amyloid formation,^{1,8} but the regions 8–20 and 30–37 also form fibers.² The inability of rodent IAPP to form fibrils is attributed to sequence differences in the 20–29 region (SNNLGPVLPP for rodent IAPP), where the presence of three proline residues is thought to block the β -sheet formation.¹⁰

The formation of hIAPP amyloid fibrils can also be impacted by other molecules, such as proteins, peptide hormones (like insulin), and metal ions.¹¹ The role of metal ions in diseases associated with protein aggregation processes has been studied extensively, particularly for the case of amyloidogenic proteins, such as amyloid- β , α -synuclein, and prion protein. An important role for metal ions, mainly copper and zinc, has been identified in the amyloid aggregation of these proteins.^{12–14} In the case of hIAPP, various studies have suggested that zinc deficiency is associated with type 2 diabetes.¹⁵ The role of Zn(II) in the aggregation of hIAPP has been extensively studied, and it has been demonstrated *in vitro* that this metal ion delays the fibril formation of hIAPP by anchoring to His18 and affecting the local conformation around this residue.^{16,17} Zinc promotes the formation of early aggregates and affects their morphology and density.¹⁸ The binding affinity of zinc for hIAPP is associated with a $K_d = 1.12$ μ M,¹⁹ which is the same order of magnitude as the concentrations of zinc found in the extracellular space (15–25 μ M).²⁰

On the other hand, the role of the copper ion in amyloid formation of hIAPP is of particular interest given that serum copper levels in diabetic patients are higher in comparison to healthy people.^{21–25} It has been proposed that the deregulation of copper homeostasis could play a role in T2D.²⁶ Cu(II) also inhibits hIAPP amyloid fibrillogenesis²⁷ by binding to His18 residue in hIAPP^{17,28,29} Recent studies have shown that copper inhibits the proteolytic action of insulin-degrading enzyme (IDE), which is responsible for hIAPP degradation.³⁰ The

proposed mechanism involves specific coordination of the metal ion to hIAPP, which could induce conformational changes in the peptide, rendering it unavailable for enzymatic hydrolysis.³¹

The role of copper in the cytotoxicity of hIAPP has been explored by many groups in two aspects: (1) aggregation of the peptide and formation of oligomeric species in the presence of metal ion^{17,31–34} and (2) formation of reactive oxygen species (ROS) that could contribute to an increase of oxidative stress.^{31,34,35} Viability assays have demonstrated that copper induces the formation of oligomeric species, increasing the cytotoxicity of hIAPP;^{31,33,34} while other studies reveal cell apoptosis caused by copper–peptide complexes.^{33,34} Recent findings by Lee and co-workers¹⁷ showed that Cu(II)-containing oligomers of hIAPP form toxic aggregates with random coil conformations. On the other hand, experiments with catalase and electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy demonstrated that copper can stimulate the formation of H₂O₂ during amyloid formation, promoting progressive degeneration of β -cells.³⁵ It has been suggested that copper-induced formation of ROS can cause mitochondrial damage, leading to apoptosis.³⁴

Overall, it is clear that copper ions impact the amyloid aggregation properties of hIAPP and may play a role in its toxicity and in the etiology of type 2 diabetes. Understanding the mechanisms involved requires a deeper knowledge of the structural details of the interaction of copper with hIAPP. Our previous study showed that the interaction of copper with the region encompassing His18 and the residues that follow (18–22) competes with the formation of β -rich structures and delays the formation of hIAPP fibrils.²⁹ In the present work, we have performed a detailed spectroscopic study of Cu(II) binding to monomeric hIAPP, using EPR, nuclear magnetic resonance (NMR), electronic absorption and circular dichroism (CD) in the UV–vis region in combination with electronic structure calculations and Born–Oppenheimer molecular dynamics (BOMD). The construction of several variants of the hIAPP(18–22) peptide have allowed the evaluation of the role of each residue in copper binding. Our study defines the nature of the coordination environment around the metal ion in the Cu(II)–hIAPP complex, revealing that the amino acid residues involved in metal ion binding are also key residues for the formation of β -sheet structures and amyloid fibrils.

EXPERIMENTAL SECTION

Reagents. 9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) protected amino acids, Rink Amide MBHA resin, and ethyl (hydroxyimino)-

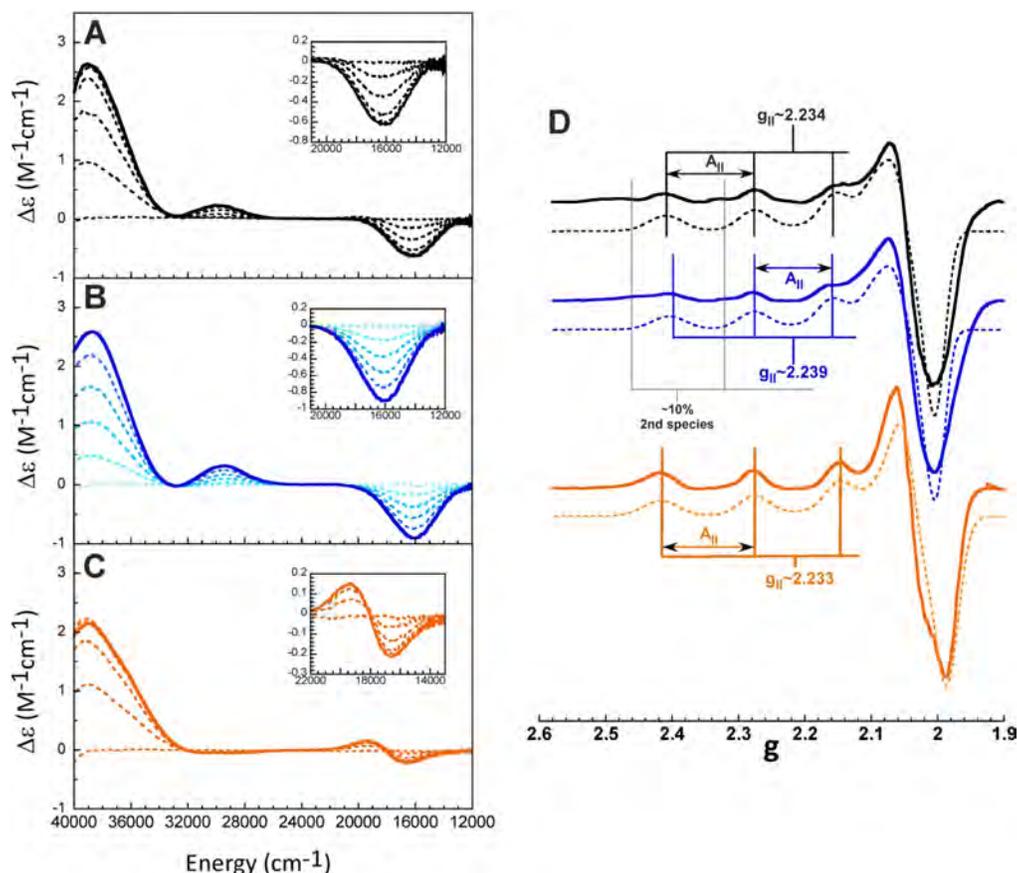


Figure 1. (A) Titration of hIAPP(15–22) (black) (A), hIAPP(18–22) (blue) (B), and hIAPP(15–22, S19P) (orange) (C) fragments with Cu(II) as followed by circular dichroism at pH 7.5. Spectra recorded after addition of 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 equiv (dashed light color lines) and 1.0 equiv of Cu(II) (continuous dark line) are shown. (D) EPR spectra of the Cu(II) complexes with hIAPP(15–22) (black), hIAPP(18–22) (blue), hIAPP(15–22, S19P) (orange), after addition of 1.0 equiv of metal ion. Dotted lines correspond to the simulated EPR spectra, using parameters listed in Table S1.

cyanoacetate (Oxyme Pure) for peptides synthesis were obtained from Novabiochem. The reagents and solvents were reagent grade from Sigma. HPLC-grade acetonitrile from Honeywell was used for peptide purification. Water was purified to a resistivity of 18 MΩ/cm using Millipore Gradient deionized system. Deuterium oxide and deuterated 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) buffer were purchased from Sigma.

Peptide Synthesis and Purification. The peptides listed in Table 1 were synthesized by solid-phase synthesis and Fmoc strategy, using Fmoc-Rink amide resin.^{36,37} All peptides were acetylated at the amino terminus, and the carboxylic terminal was amidated. Crude peptides were purified by HPLC using a semipreparative C18 reversed phase column. Peptide purity was determined by analytical HPLC and was found to be >95%. Electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) determined the molecular weight of each peptide, and all purified products presented the expected molecular mass.

Preparation of Peptide Samples. Peptide solutions were prepared in a mixture of 20 mM MES buffer and 20 mM *N*-ethylmorpholine (NEM) buffer. For the pH titrations, the pH was varied every 0.25 pH units by adding the necessary volume of NaOH or HCl solutions, and it was followed by CD spectroscopy. Peptide samples for EPR spectroscopy were prepared in the same buffer mixture with 50% glycerol to achieve adequate glassing. The addition of glycerol has no effect on the structure of the Cu(II)–peptide complexes, as evaluated by absorption and CD spectroscopy for all buffer solutions and pH values used in this study. Final peptide concentrations were on the order of 0.4 mM. The NMR experiments were performed on 5.0 mM (¹³C NMR) peptide samples dissolved in 100% deuterium oxide. For 1D-IR experiments the samples were

prepared in 100% deuterium oxide and 20 mM of deuterated MES buffer with a final concentration of 0.3 mM. In each case the pH was adjusted to 7.5 with NaOH in D₂O.

UV–Visible Absorption and Circular Dichroism (CD) Spectroscopy. Room temperature absorption spectra were recorded using an Agilent 8453 diode array spectrometer, and CD spectra were acquired on a Jasco J-815 CD spectropolarimeter at room temperature. A 1 cm path length quartz cell was used, and spectra were recorded between 230 and 830 nm sampling points every 2 nm and with a scanning speed of 100 nm/min.

EPR Spectroscopy. X-band EPR spectra were collected using an EMX Plus Bruker System, with an ER 041 XG microwave bridge and an ER 4102ST cavity. The following conditions were used: microwave frequency, 9.4 GHz; microwave power, 10.02 mW; modulation amplitude, 5 G; modulation frequency, 100 kHz; time constant, 327.68 ms; conversion time, 82 ms; and averaging over six scans. EPR spectra were recorded at 150 K using an ER4131VT variable temperature nitrogen system. EPR spectra were simulated with XSophe Computer Simulation Software Suite Version 1.1.4.

NMR Spectroscopy. NMR spectra were acquired on a Bruker 600 MHz Avance II equipped with cryogenically cooled triple resonance ¹H(¹³C/¹⁵N) TCI probe at 298 K. Proton and carbon resonances were assigned by 1D ¹H, ¹H–¹H TOCSY, ¹H–¹³C HMBC, and ¹H–¹³C HSQC experiments. Chemical shifts were referenced to DSS as an internal standard. Proton spin–lattice relaxation rates were measured with a standard inversion recovery (1D-IR) Bruker pulse sequence. The *T*₁ values were determined by a three-parameter fit of peak intensities to the following equation:

$$I(t) = I_0[1 - (1 + B) \exp(-t/T_1)]$$

where B is a variable parameter that considers nonideal magnetization whose value is less than unity.^{38,39} The paramagnetic contributions of Cu(II) to the spin–lattice relaxation rate, R_{1p} , were calculated according to⁴⁰

$$R_{1p} = R_{1\text{obs}} - p_f R_{1\text{free}} = \frac{p_b}{R_{1b}^{-1} + \tau_M}$$

where f and b refer to the free and metal-bound states, respectively, the p 's are fractional populations of the peptide, $R_{1\text{free}}$ and R_{1b} are the spin–lattice relaxation rates in the two environments, and τ_M (the inverse of the off-rate kinetic constant) is the residence time of the peptide in the metal coordination sphere. R_{1b} ($1/T_{1b}$) is accounted for by the Solomon equation describing the dipole–dipole nuclear spin–electron spin interaction, here reported for systems with $S = 1/2$:^{40,41}

$$R_{1b} = \frac{1}{10} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{2\hbar^2 \gamma_I^2 \gamma_S^2}{r^6} \left\{ \frac{\tau_C}{1 + (\omega_I - \omega_S)^2 \tau_C^2} + \frac{3\tau_C}{1 + \omega_I^2 \tau_C^2} + \frac{6\tau_C}{1 + (\omega_I - \omega_S)^2 \tau_C^2} \right\}$$

where μ_0 is the permeability of the vacuum, γ_I and γ_S are the nuclear and electron magnetogyric ratios, respectively, \hbar is the reduced Planck constant, ω_I and ω_S are the nuclear and electron Larmor frequencies, respectively, r is the proton–metal distance, and τ_C is the effective correlation time.

Acquisition, processing, and visualization of the NMR spectra were performed using TOPSPIN 3.2 (Bruker) and CcpNmr Analysis 2.4.2.⁴²

Theoretical Studies. The gas phase models for the Cu(II)–hIAPP(18–22) complex were constructed with Molden⁴³ using the full peptide fragment 18–22 (total number of atoms was 75) and optimized with TeraChem,⁴⁴ using spin-unrestricted Kohn–Sham theory within the linear combination of Gaussian-type orbitals to solve the Kohn–Sham equations. For all models, a spin multiplicity of two was imposed, employing the PBE⁴⁵ exchange–correlation functional and DZVP⁴⁶ basis set as implemented in the deMon2k⁴⁷ code. Explicit solvation was included by adding four water molecules to each model and reoptimizing the structures. NVT BOMD were performed with spherical boundary conditions using TeraChem code default options, namely, a time step of 1 fs was used to integrate the equations of motion, the temperature was controlled at 300 K by rescaling at each step the velocities of the atoms. The BOMD simulation was carried out for 60 ps. From this time window, a local search for minimum energy conformers at 0 K was performed, which made it possible to identify the lowest energy conformers through this sampling. We then performed two regular BOMD simulations of 20 ps (releasing the spherical boundary conditions) for the lowest energy optimized model, rescaling the temperature every 50 integration steps. Afterward, the first 3 ps of the simulation were discarded, and the energy minima were reoptimized to be used as a starting point for a second BOMD simulation with total of time length of 20 ps. This procedure was used because the system remained with the same coordination pattern along the first BOMD simulation. Selected points from this last BOMD sampling were used for successive geometry optimizations and spectroscopic simulation.

EPR parameters for selected models were calculated employing the eprnmr module implemented in the 3.0.2 version of the ORCA⁴⁸ electronic structure code. For such calculations, the hybrid exchange–correlation functional PBE0^{49,50} was used; a DGAUSS basis set was used for main row atoms, and the Core Property basis⁵¹ was used for the copper atom. It is important to mention that a special grid and an integral accuracy of seven for copper (as reported in the Orca manual) were also used. In all cases the center of electric charge was used as a gauge origin and the orbital energy window used was (–1000,1000) hartree. Although the models already included four explicit water molecules, the COSMO implicit solvation, as implemented in ORCA,

was also used. Spin–orbit coupling was requested with SOcflags 1,3,3,1.

RESULTS AND ANALYSIS

hIAPP(18–22) as a Model for Cu(II) Binding to Monomeric hIAPP.

Cu(II) coordination to hIAPP has been previously studied using the hIAPP(15–22) fragment. A titration of this peptide with Cu(II), followed by CD, shows the growth of signals associated with the hIAPP(15–22)–Cu(II) complex (Figure 1A), namely, a negative ligand field transition as 16 200 cm^{-1} ($\Delta\epsilon = -0.71 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), and three ligand-to-metal charge transfer (LMCT) bands: a positive band at 29 800 cm^{-1} ($\Delta\epsilon = 0.14 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), a negative band at 32 400 cm^{-1} with very low intensity ($\Delta\epsilon = -0.024 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), and a positive band at 39 000 cm^{-1} with high intensity ($\Delta\epsilon = 2.64 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). These LMCT bands have been assigned to the deprotonated backbone amide N^- , and the imidazole π_1 and π_2 to Cu(II) LMCT transitions, respectively.²⁹ Previous work supports the notion that this complex involves coordination to the C-terminal residues.²⁹ Here, we have studied Cu(II) binding to hIAPP(15–22 S19P), where the Pro residue at position 19 would prevent coordination of the metal ion toward the C-terminal. When a solution of hIAPP(15–22 S19P) was titrated with Cu(II) at pH 7.5, all CD signals were saturated at 1.0 equiv of Cu(II) indicating a 1:1 molar stoichiometry (Figure 1C). Two ligand field transitions become evident: a negative band at 16 580 cm^{-1} ($\Delta\epsilon = -0.21 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) and a positive band at 19 300 cm^{-1} ($\Delta\epsilon = 0.15 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), while LMCT bands are observed in the region above 32 000 cm^{-1} , possibly corresponding to imidazole to Cu(II) LMCT transitions. Clearly, the Cu(II)–hIAPP(15–22 S19P) complex displays a very different CD spectrum than that of the Cu(II)–hIAPP(15–22) complex (Figure 1A). Consistently, the EPR spectrum of the Cu(II)–hIAPP(15–22 S19P) complex displays very different A_{\parallel} and g_{\parallel} values, as compared to those associated with the Cu(II)–hIAPP(15–22) complex (Figure 1D and Table 1). Thus, by blocking the backbone amide of Ser19 and inducing a turn on the backbone with a Pro residue, coordination of Cu(II) toward the C-terminal is prevented, and a Cu(II)–peptide complex with a different coordination environment is formed. This is consistent with the notion that Cu(II) coordination to hIAPP(15–22) involves residues that follow His18 in the sequence. If this is the case, then the hIAPP(18–22) fragment would be a good model to study Cu(II) coordination to monomeric hIAPP. Cu(II) binding to the hIAPP(18–22) fragment was studied by titrating the peptide with Cu(II) at pH 7.5, followed by CD (Figure 1B). The CD signals are saturated at 1.0 equiv of Cu(II) indicating a 1:1 molar stoichiometry as in the case of the hIAPP(15–22) fragment (Figure 1A, black spectra). The CD spectrum of the Cu(II)–hIAPP(18–22) complex shows one d–d negative band at 16 050 cm^{-1} ($\Delta\epsilon = -0.89 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) and three transitions that correspond to LMCT bands: a positive band at 29 460 cm^{-1} ($\Delta\epsilon = 0.32 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) that corresponds to deprotonated backbone amide N^- to Cu(II) LMCT, a negative band at 32 700 cm^{-1} with very low intensity ($\Delta\epsilon = -0.02 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), and a positive band at 38 840 cm^{-1} with high intensity ($\Delta\epsilon = 2.60 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), corresponding respectively to a π_1 and a π_2 to Cu(II) LMCT bands arising from the interaction of the His18 imidazole with the metal ion.^{52,53} Clearly, the CD spectrum of the Cu(II)–hIAPP(18–22) complex is practically identical to that of the Cu(II)–hIAPP(15–22) complex. Moreover, their EPR spectra display very similar A_{\parallel} and g_{\parallel} values: $A_{\parallel} = 158 \times$

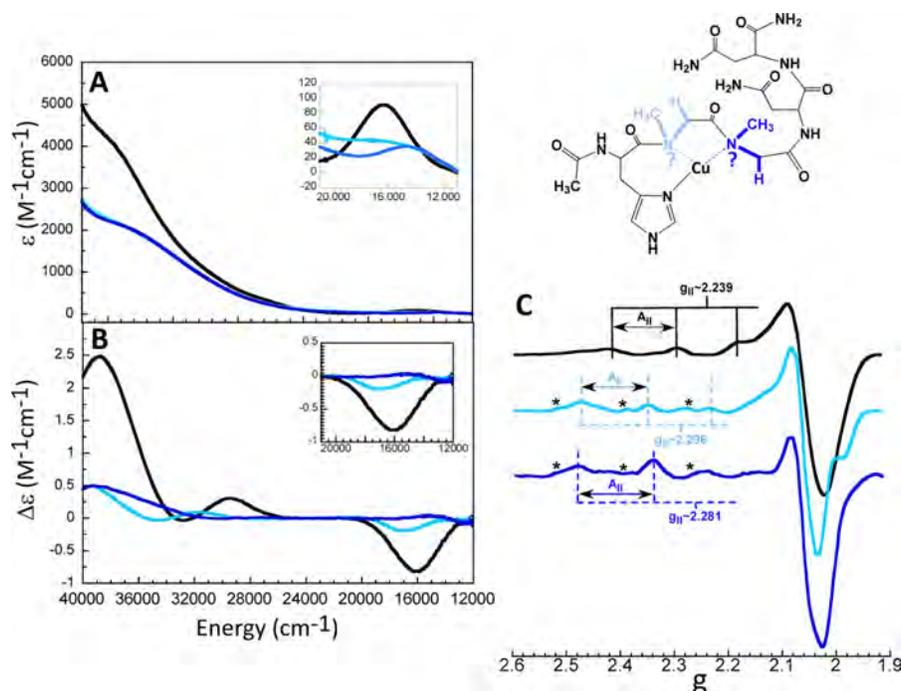


Figure 2. UV-vis absorption (A), CD (B), and EPR (C) spectra of Cu(II) complexes with hIAPP(18–22) (black), hIAPP (18–22, S19Sar) (light blue), and hIAPP (18–22, S20Sar) (dark blue) with 1.0 equiv of Cu(II) and pH 7.5. The asterisks in EPR spectra indicate the signals of Cu(II) in solution. The scheme at the upper right represents the variants with sarcosine where the N- from backbone amide is blocked with a methyl group.

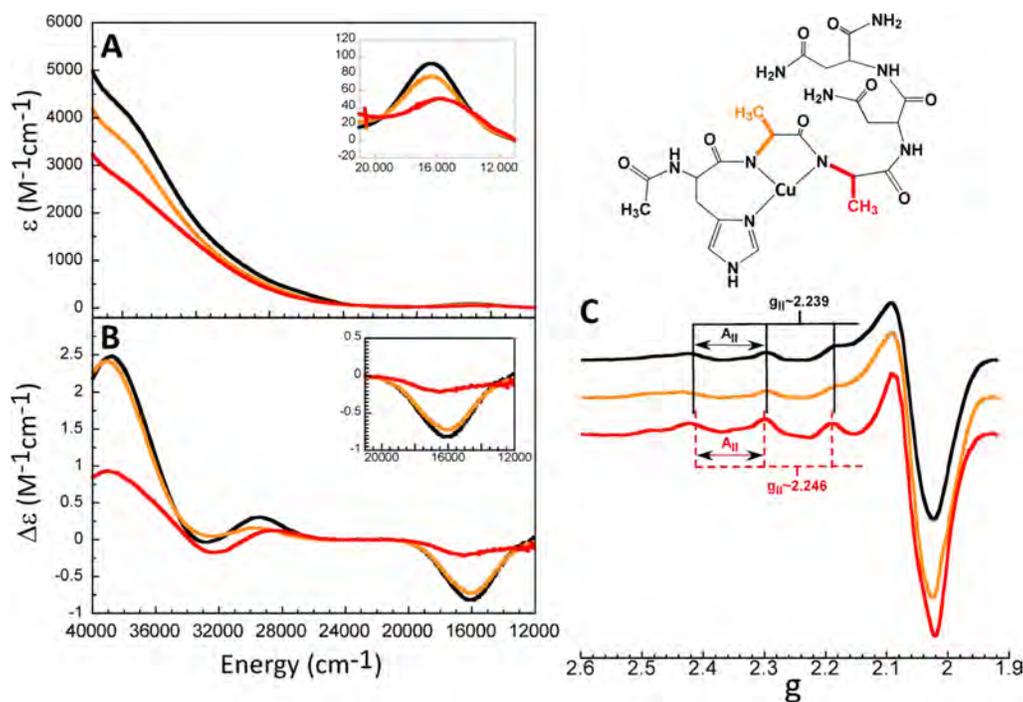


Figure 3. UV-vis absorption (A), CD (B), and EPR (C) spectra of Cu(II) complexes with hIAPP(18–22) (black), hIAPP (18–22, S19A) (orange), and hIAPP (18–22, S20A) (red) with 1.0 equiv of Cu(II) and pH 7.5. The scheme at the upper right represents the variants with alanine where the $-\text{CH}_2-\text{OH}$ group from serine has been replaced with $-\text{CH}_3$.

10^{-4} cm^{-1} and $g_{\parallel} = 2.239$ for the Cu(II)–hIAPP(18–22) complex, and $A_{\parallel} = 164 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ and $g_{\parallel} = 2.234$ for the Cu(II)–hIAPP(15–22) complex (Figure 1D, Tables 1 and S1), which correspond to an equatorial coordination mode with three nitrogens and one oxygen ligand, according to Peisach and Blumberg correlations.⁵⁴ In both cases, a small amount

(<10%) of a second species with $A_{\parallel} = 168 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ and $g_{\parallel} = 2.276$ also becomes evident in the EPR spectrum; given the pK_a values associated with the Cu(II)–hIAPP(18–22) (6.28 ± 0.01 , Figure S1) and the Cu(II)–hIAPP(15–22) complex (6.23 ± 0.13),²⁹ the second species likely corresponds to the protonated form of each complex.

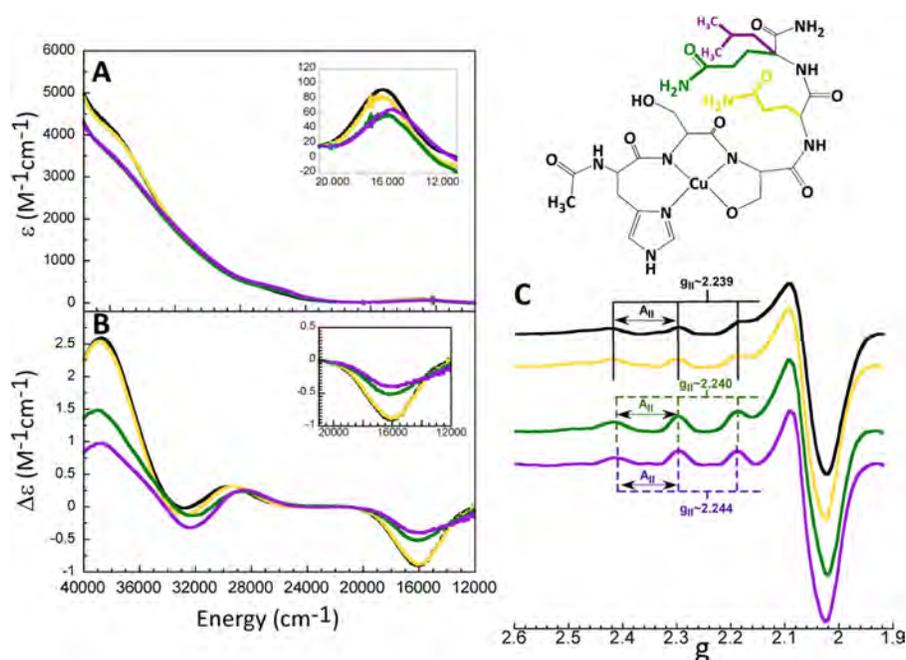


Figure 4. UV-vis absorption (A), CD (B), and EPR (C) spectra of Cu(II) complexes with hIAPP(18–22) (black), hIAPP (18–22, N21Q) (yellow), hIAPP (18–22, N22Q) (green), and hIAPP(18–22, N22L) (purple) with 1.0 equiv of Cu(II) and pH 7.5. The scheme at the upper right represents the variants with glutamine where the $-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}_2$ group from asparagine has been modified as $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}_2$ (yellow and green) and one variant with the R-group of leucine $-\text{CH}_2-\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$ (purple) in asparagine 22.

Overall, these results indicate that the hIAPP(18–22) peptide is an adequate model that reproduces the Cu(II) coordination features of the longer peptide hIAPP(15–22). Our findings are consistent with a study by Li and co-workers²⁸ showing by laser ablation electrospray ionization ion mobility separation mass spectrometry (LAESI-IMS-MS) that Cu(II) exhibits strong association with these residues -HSSNN- (18–22) of hIAPP.

Identifying the Backbone Amides Involved in Cu(II) Binding to hIAPP(18–22). In order to further characterize the role of backbone amide groups in the coordination of Cu(II) to hIAPP(18–22), two hIAPP(18–22) variants were synthesized: hIAPP(18–22 S19Sar) and hIAPP(18–22 S20Sar), where Sar corresponds to sarcosine, i.e., *N*-methylglycine. In these peptides, the backbone amide is blocked by the methyl group at the position of each sarcosine (scheme in Figure 2). The UV-vis electronic absorption (A), CD (B), and EPR (C) spectra of the Cu(II) complexes with these Ser to Sar variants are compared to those of the Cu(II)–hIAPP(18–22) complex in Figure 2. The UV-vis absorption spectrum of the Cu(II)–hIAPP(18–22) complex (black line) displays a ligand field band at $\sim 16\,300\text{ cm}^{-1}$ ($\epsilon = 91\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$), while this transition is shifted to $\sim 14\,400\text{ cm}^{-1}$ ($\epsilon = 36\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) for the Cu(II)–hIAPP(18–22 S20Sar) complex (dark blue line), and the absorption spectrum of the Cu(II)–hIAPP(18–22 S19Sar) complex (light blue line) has such low intensity that it is not possible to determine the energy for the ligand field transitions. The drastic effects of the Ser to Sar substitutions are also evident by CD (Figure 2B): the spectra for the Cu(II)–hIAPP(18–22 S19Sar) and Cu(II)–hIAPP(18–22 S20Sar) complexes have such low intensity that their transitions are hard to identify. The low intensity of the CD spectra for the Ser to Sar variants indicates that either the chirality of the complexes has changed (as in the case of the formation of a very different Cu(II) complex) and/or the

affinity of the peptide for Cu has decreased (since unbound Cu(II) would not contribute to CD intensity). Consistently, the EPR spectra for these variants indicate the presence of free Cu(II) in solution (indicated as asterisks in Figure 2C), and the formation of a Cu(II) complex with A_{\parallel} and g_{\parallel} values that are very different from those of the Cu(II)–hIAPP(18–22) complex (Figure 2C, Tables 1 and S1). In both cases, the Ser to Sar substitutions yielded Cu(II) complexes with more oxygen-rich equatorial coordination modes (2N2O/1N3O). Altogether, these results indicate that the backbone amide groups of Ser19 and Ser20 participate in the coordination sphere of the Cu(II)–hIAPP(18–22) complex.

Evaluating the Role of Hydroxyl Groups of Ser19 and Ser20. The participation of the hydroxyl groups of Ser19 and Ser20 in Cu(II) binding was evaluated by replacing Ser19 or Ser20 with Ala residues (Scheme in Figure 3). The UV-vis electronic absorption and CD spectra of Cu(II)–hIAPP(18–22 S19A) (Figure 3A,B, orange line) are practically identical to those of the Cu(II)–hIAPP(18–22) complex (black line), while significant changes are observed for the Cu(II)–hIAPP(18–22 S20A) complex (red line). Specifically, the ligand field band for the Cu(II)–hIAPP(18–22 S20A) complex (red line) is shifted to lower energy in the absorption spectrum (Figure 3A), as compared to that of the Cu(II)–hIAPP(18–22) complex (black line), while the CD intensity of all transitions is significantly decreased (Figure 3B). Consistently, the EPR spectra of the Cu(II)–hIAPP(18–22) complex (black spectrum) and Cu(II)–hIAPP(18–22 S19A) complex (orange spectrum, Figure 3C) are practically identical, while that for the Cu(II)–hIAPP(18–22 S20A) complex (red spectrum) displays different EPR parameters. Overall, these results indicate that the hydroxyl group from Ser19 is not participating in copper coordination, while that of Ser20 does contribute to Cu(II) binding at this site.

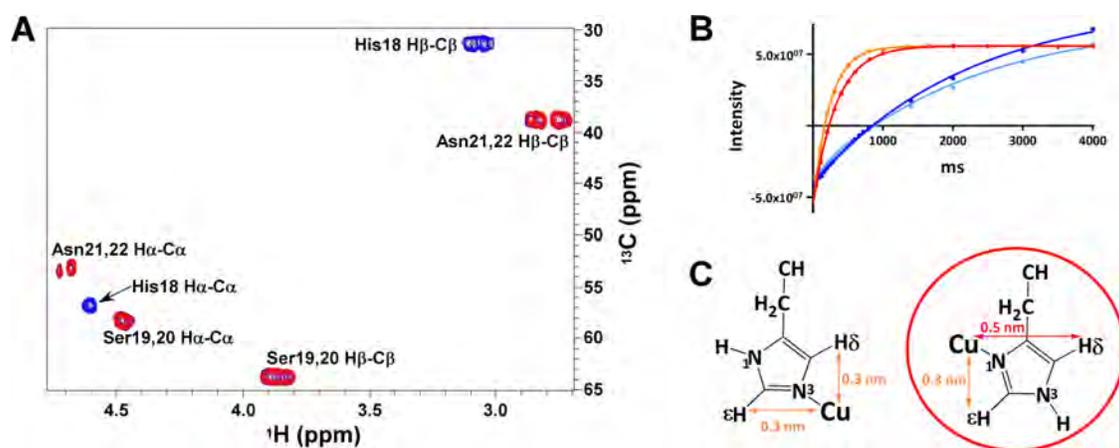


Figure 5. (A) Overlaid ^1H – ^{13}C HSQC spectra of hIAPP(18–22) in the absence (blue) and presence (red) of 0.2 equiv of Cu(II) in the aliphatic region. (B) Fits from proton spin–lattice relaxation rates by 1D-IR experiments of H ϵ and H δ of imidazole ring from His18 in the absence and presence of Cu(II). The free species correspond to H ϵ (light blue) and H δ (dark blue). The bound species to 0.02 equiv of Cu(II) correspond to H ϵ (orange) and H δ (red). Schema (C) represents the two possibilities of Cu(II) binding to N1 or N3 from imidazole and the distances in each case. Our results show that Cu(II) is binding to N1 represented by a red circle.

Evaluating the Role of Asparagines 21 and 22. In order to evaluate the role of Asn residues 21 and 22 in Cu(II) coordination, the N21Q, N22Q, and N22L variants of hIAPP(18–22) were prepared. In the first two, the R-group from asparagine, $-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}_2$, has been replaced by the longer group, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}_2$, and in the N22L variant the R-group of asparagine 22 has been replaced by an aliphatic group $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, as shown in the scheme of Figure 4. Overall, the UV–vis absorption and CD spectra of the Cu(II)–hIAPP(18–22) complex and the N21Q variant are practically identical (Figure 4A,B), while their EPR spectra display very similar EPR parameters (Figure 4C, Table 1), clearly indicating that Asn21 does not participate in Cu(II) coordination to the peptide. On the other hand, the absorption and CD spectra of the Cu(II)–hIAPP(18–22 N22Q) (green lines) and the Cu(II)–hIAPP(18–22 N22L) (purple lines) complexes display decreased intensity of their d–d band at $16\,200\text{ cm}^{-1}$ and LMCT π_2 transition at $39\,030\text{ cm}^{-1}$, while a small shift is evident at the LMCT transitions with respect to those of the Cu(II)–hIAPP(18–22) (black line). Consistently, the EPR spectra of the complexes with Asn22 substitutions show changes in their A_{\parallel} and g_{\parallel} values, most notably for the N22L variant (Figure 4C, Tables 1 and S1). Overall, these results suggest that Asn22 may play a role in Cu(II) coordination to hIAPP(18–22); however, the effects of its substitution for a noncoordinating residue in the spectroscopic features of the complex are mild, as compared to those observed upon the Ser to Sar or S20A substitutions. Thus, the role of Asn22 in Cu(II) binding to hIAPP(18–22) might be as an axial ligand or as part of the second sphere coordination shell.

Cu(II) Binding to hIAPP(18–22) as Probed by NMR.

^1H – ^{13}C nuclear magnetic resonance (NMR) signals were assigned using 1D ^1H , ^1H – ^1H TOCSY, ^1H – ^{13}C HSQC, and HMBC spectra. Figure 5A shows the overlaid aliphatic region of the ^1H – ^{13}C HSQC spectra of hIAPP(18–22) in the absence (blue) and presence (red) of 0.2 equiv of Cu(II). The paramagnetic effect of Cu(II) causes broadening of the signals due to relaxation enhancements,⁵⁵ and the most affected ones are the H β –C β and H α –C α of His18, which disappear completely upon addition of Cu(II), indicating that His18 is the main anchoring site for Cu(II). To gain further insight into

the structural features of Cu(II) binding to hIAPP(18–22), proton spin–lattice relaxation rates of the imidazole protons H ϵ and H δ were measured to determine to which nitrogen, N1 or N3 of His18 coordinates Cu(II).⁵⁶ Figure 5B displays the fits for T_1 of H ϵ (light blue) and H δ (dark blue) for the free peptide, and those for the bound species after addition of 0.02 equiv of Cu(II) (H ϵ (orange) and H δ (red)). The ^1H NMR spectra given in Figure S2 shows the broadening effect on both signals after addition of Cu(II). Table 2 shows the parameters

Table 2. Parameters from 1D-IR Experiment of the Protons H ϵ and H δ of His18

	T_1 free	T_1 bound	R_{1b} free	R_{1b} bound	R_{1p}	dist (nm)
H δ	2.2	0.334	0.455	2.994	2.549	0.506
H ϵ	2.2	0.239	0.455	4.184	3.739	0.3 (fixed)

T_1 , R_{1b} , R_{1p} , and the distance for the protons H ϵ and H δ to Cu(II) ion. $\tau_M = 1/k_{\text{off}}$ was calculated using a fixed distance of 0.3 nm from Cu(II) to H ϵ ⁵⁶ of His18, obtaining a value of 5.2 ms. A global correlation time τ_C of 0.4 ns was assumed.⁵⁷ Figure 5C compares the two possibilities of binding of Cu(II) to N1 or N3, where the distance of 0.3 nm from Cu(II) to H ϵ is fixed. These results clearly show that Cu(II) is binding to N1 of imidazole ring of His18.

Figure 6 shows the overlaid 1D ^{13}C NMR spectra of hIAPP(18–22) in the absence (blue) and presence (red) of 0.4 equiv of Cu(II). Upon addition of the metal ion, the signals for CO, C_{aromatic}, C α , and C β from His18 disappear completely, while all other signals display decreased intensity. The intensity of the signal of the Asn22 seems to be more affected than that of Asn21, consistent with the notion that Asn22 might be involved in Cu(II) coordination (vide supra).

Theoretical Studies of Cu(II) Binding to hIAPP(18–22).

On the basis of our spectroscopic results, it becomes clear that the three nitrogens in the equatorial coordination sphere of Cu bound to hIAPP(18–22) are provided by the imidazole nitrogen N1 of His18, the deprotonated amides of Ser19 and Ser20, and an oxygen-based ligand, which likely corresponds to the OH group of Ser20, while Asn22 might also play a role as an axial ligand. In order to shed light into the nature of the

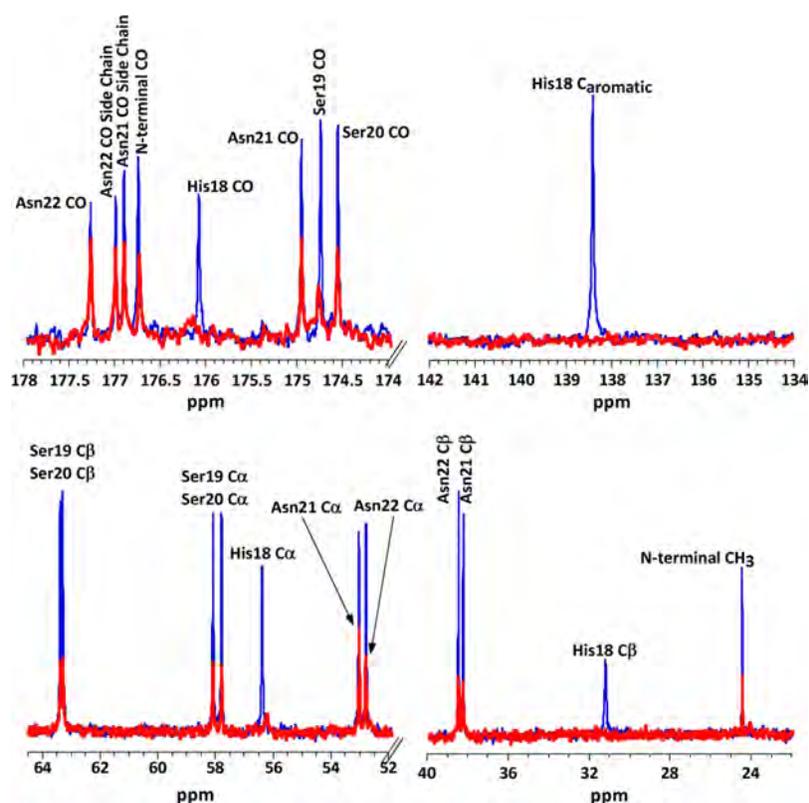


Figure 6. Overlaid 1D ^{13}C NMR spectra of hIAPP(18–22) in the absence (blue) and presence (red) of 0.4 equiv of Cu(II). CO, C_{aromatic} , C_{α} , and C_{β} from His18 disappear completely upon addition Cu(II). The arrows show each C_{α} from Asn21 and 22.

oxygen-based equatorial ligand and the role of Asn22 in Cu coordination, several models of the Cu(II)-hIAPP(18–22) complex were evaluated by electronic structure calculations and Born–Oppenheimer molecular dynamics. All models included a 3N1O equatorial coordination mode, where the three nitrogen ligands are provided by His18 and backbone amides of Ser19 and 20, as described above. Different possibilities for the equatorial oxygen-based ligand were evaluated, including the OH group from Ser20 (named $3\text{NO}_{\text{OH}/\text{S20}}$), the backbone carbonyl of Ser20 (named $3\text{NO}_{\text{CO}/\text{S20}}$), the backbone carbonyl of Asn22 (named $3\text{NO}_{\text{CO}/\text{N22}}$), or a water molecule. Furthermore, coordination of Cu(II) by the amino acid chain of Asn22 was also included for some models, where the CONH_2 moiety acts as an axial ligand, namely, $3\text{NO}_{\text{OH}/\text{S20}}\text{O}_{\text{axialCO}/\text{N22}}$ and $3\text{NO}_{\text{CO}/\text{S20}}\text{O}_{\text{axialCO}/\text{N22}}$. Solvation effects were included by geometry optimization of the models after adding four explicit water molecules. Figure 7 shows all geometry-optimized models; their structural and calculated EPR parameters are listed in Table S2, while selected parameters are listed in Table 3. It should be noted that a model with an equatorial water molecule could not be obtained, as the water ligand did not remain as part of the coordination shell upon geometry optimization. On the other hand, the model that includes the carbonyl group of Asn22 as an equatorial ligand has a relative energy of 38.7 kcal/mol, strongly suggesting that Asn22 would not participate as an equatorial ligand for Cu(II) in this complex.

The two most stable models correspond to those with no axial ligand, where the equatorial oxygen-based ligand is provided by either the OH group of Ser20 ($3\text{NO}_{\text{OH}/\text{S20}}$) or by the backbone carbonyl of Ser20 ($3\text{NO}_{\text{CO}/\text{S20}}$), with relative energies of 0.0 and 3.4 kcal/mol, respectively. This energetic

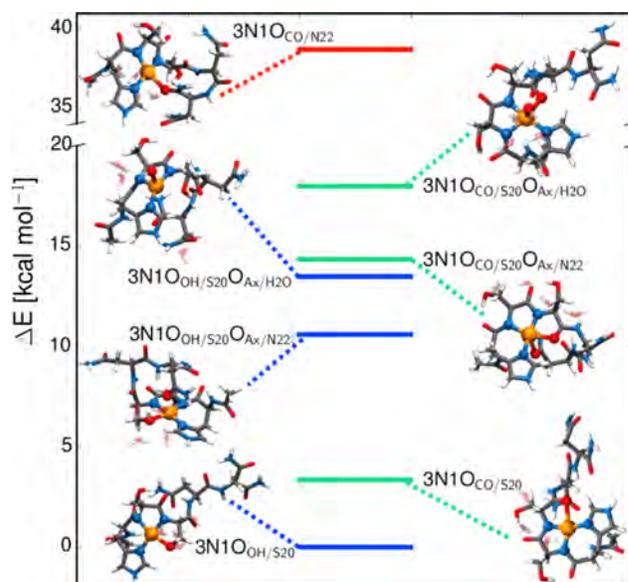


Figure 7. Optimized structural models for Cu(II) bound to the hIAPP(18–22) fragment.

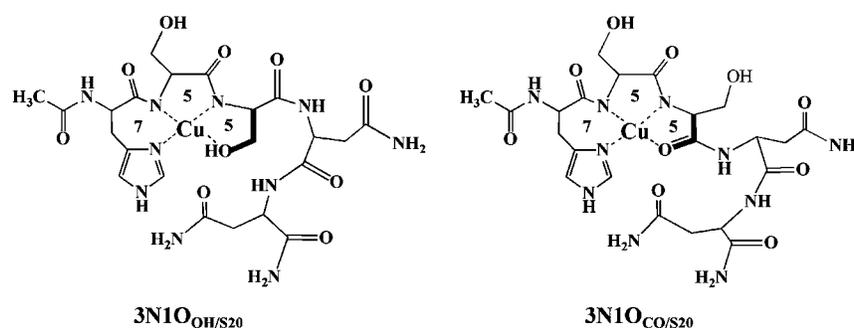
difference is very small, and in fact, a BOMD simulation with these two structures shows that their relative stabilities are very similar (Figure S3), and thus, both are plausible models for the equatorial coordination shell. Still, it should be noted that all models where the equatorial ligand is provided by the OH group of Ser20 are 3–5 kcal/mol more stable than the corresponding structures with the backbone carbonyl of Ser20 (Table 3). This observation is consistent with the experimental

Table 3. Relative Energies, Calculated EPR Parameters, and Bond Distances^a for Selected Models

model	exp	3NO _{OH/S20}	3NO _{OH/S20} O _{Ax/N22}	3NO _{OH/S20} O _{Ax/H2O}	3N1O _{CO/S20}	3NO _{CO/S20} O _{Ax/N22}	3NO _{CO/S20} O _{Ax/H2O}	3N1O _{CO/N22}
E_{rel} [kcal/mol]	N.A.	0.00	10.63	13.47	3.36	14.32	18.00	38.73
g_x	2.055	2.042	2.045	2.029	2.047	2.055	2.035	2.054
g_y	2.087	2.057	2.071	2.146	2.066	2.081	2.098	2.057
g_z	2.239	2.157	2.174	2.217	2.176	2.194	2.188	2.185
A_z (MHz)	474	-486	-424	417	-437	-477	-407	-519
Cu–N _{H18}	N.D.	1.97	1.95	1.96	1.95	2.01	1.98	2.01
Cu–N _{S19}	N.D.	2.05	2.03	2.16	1.99	2.04	2.03	2.00
Cu–N _{S20}	N.D.	1.90	1.91	1.92	1.91	1.93	1.95	2.01
Cu–O _{S20} ^b	N.D.	2.12	2.26	2.57	2.40	2.20	2.26	2.17
Cu–O _{Axial} ^c	N.D.		2.74	2.22		2.35	2.35	3.11

^aBond distances are given in Å. ^bCu–O_{S20} refers to equatorial Cu–O bond, which could be backbone CO or OH moiety from Ser20, depending on the model. ^cCu–O_{Axial} refers to axial Cu–O bond, which could be the amide CO moiety from Asn22 or an axial water, depending on the model.

Scheme 1. Two Proposed 3N1O Equatorial Coordination Modes for the Cu(II)–hIAPP Complex where the Oxygen-Based Ligand Is Provided by Either the Hydroxyl Group of Ser20 (3N1O_{OH/S20}) or the Backbone Carbonyl of the Same Residue (3N1O_{CO/S20})^a



^aIn both cases, Asn22 may act as an axial ligand (3NO_{S20}O_{Ax/N22}). These species may coexist, although the 3N1O_{OH/S20} structure is favored.

results that reveal an important role of the OH group of Ser20 in Cu(II) coordination to hIAPP(18–22). The calculated EPR parameters for these two complexes provide a reasonable description of the g_z and A_z values (Table 3), particularly for the hyperfine couplings, for which a difference between calculated and experimental values of ~5% is considered acceptable for this type of calculation.⁵⁸ Interestingly, the 3NO_{CO/S20} model provides a better description of the g_z value, while the 3NO_{OH/S20} model has a better match for the experimental A_z . These calculated EPR parameters are also consistent with the experimental results for the S20A variant. If we assume that both 3NO_{OH/S20} and 3NO_{CO/S20} are plausible models for the Cu(II)–hIAPP complex and may represent coexisting species; thus, the S20A variant would favor the 3NO_{CO/S20} species, which is predicted to have a higher g_z and a lower A_z value. This is precisely the trend observed experimentally for the S20A variant. Thus, it is plausible that these two coordination modes, 3NO_{OH/S20} and 3NO_{CO/S20}, could coexist; however, the drastic changes observed by CD for the S20A variant strongly suggest that the most populated coordination mode is 3NO_{OH/S20}.

Axial ligation by water molecules or by the CONH₂ moiety of Asn22 was also evaluated, using the two most stable equatorial coordination shells, 3NO_{OH/S20} and 3NO_{CO/S20}. The resulting structures with axial ligands are considerably higher in energy (about 10 kcal/mol for Asn22 and 13–15 kcal/mol for water) than the corresponding tetra-coordinated models with no axial ligation (Figure 7 and Table 3). The presence of a water molecule as an axial ligand improves significantly the description of the g_z value, but it lowers A_z to values that fall

outside the acceptable range for this parameter; moreover, it yields more distorted structures with very rhombic g_x and g_y values, as demonstrated by the 3NO_{OH/S20}O_{AxH2O} and 3NO_{CO/S20}O_{AxH2O} models in Table 3. EPR simulations of the experimental spectrum of the Cu(II)–hIAPP complex do not reflect such large rhombicity (Figure 1D, Tables 3 and S1). Thus, we conclude that axial ligation by a water molecule does not provide a good description of the Cu(II)–hIAPP complex. On the other hand, axial ligation by the CONH₂ moiety of Asn22 improves significantly the description of the g_z value, while keeping a good description of the Cu hyperfine coupling, as shown for the 3NO_{OH/S20}O_{Ax/N22} and 3NO_{CO/S20}O_{Ax/N22} models in Table 3. Particularly, the calculated EPR parameters for the 3NO_{CO/S20}O_{Ax/N22} structure are in excellent agreement with the experimental values. Thus, although the relative energy for this model is 11 kcal/mol higher than the corresponding model with no axial ligation, the possibility that Asn22 may play a role as an axial ligand cannot be discarded.

Overall, our electronic structure studies validate that the equatorial coordination shell in the Cu(II)–hIAPP complex involve the imidazole nitrogen N1 of His18, the deprotonated amides of Ser19 and Ser20, and an oxygen-based ligand that can be provided either by the OH group of Ser20 or its backbone carbonyl, possibly leading to two coexisting species (Scheme 1). Our calculations also help discard the participation of water molecules in the coordination shell and the possibility of Asn22 acting as an equatorial ligand, while the involvement of Asn22 as an axial ligand is plausible.

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

Copper Coordination to hIAPP. Our spectroscopic and theoretical studies have elucidated the coordination features of Cu(II) bound to hIAPP, confirming the involvement of His18 and the following residues toward the C-terminal region, and defining the residues HSSNN of hIAPP(18–22) as the minimal unit to model Cu binding to this peptide. Cu(II) coordinates to the N1 (oftentimes referred to as N δ) of His18, two deprotonated amides from Ser19 and Ser20 and one oxygen-based ligand provided by either the hydroxyl group or the backbone carbonyl of Ser20. For both of these two 3N1O coordination modes, a set of three chelate rings with seven, five, and five members is formed (Scheme 1); thus the impact of the chelate effect on the relative stability of these two species would be similar. Although we cannot discard the formation of the 3N1O coordination mode with the backbone carbonyl of Ser20, theoretical and spectroscopic results demonstrate that the binding mode with the hydroxyl group of Ser20 is favored, possibly due to the formation of a stronger Cu(II)–OH bond (Cu–O bond distance is 2.12 Å), as compared to a weaker and more distorted Cu(II)–O backbone carbonyl bond (with distance at 2.40 Å) (Table 3 and S2). In either case, it is clear that Ser20 plays a very important role in the overall stability of the complex, as it provides the backbone amide and the oxygen-based ligand needed to form the two five-membered rings in the 3N1O coordination mode.

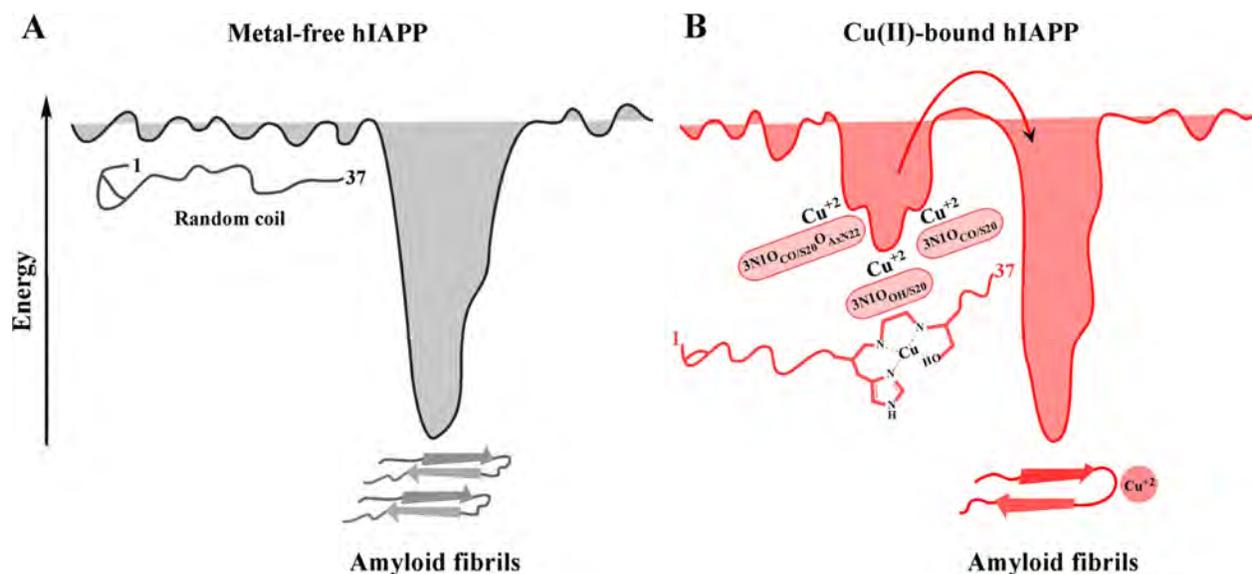
Initial Cu(II) binding toward the C-terminal region in His-containing peptides is less common, as compared to binding toward the N-terminal, because the latter forms a more stable six-membered ring with the imidazole group and the His backbone amide, while binding toward the C-terminal amide yields a seven-membered ring.⁵⁹ This has been the rationale used in a recent study by Magri et al, who erroneously concluded that copper coordination to hIAPP involves residues toward N-terminal domain.⁶⁰ However, several factors dictate this binding preference, including the nature of the side chains in the vicinity of the His residue, the relative stability of the ring patterns that are formed in the chelate, and the number of deprotonated amides involved in metal binding.⁶¹ Moreover, in a 3N1O complex with two deprotonated amides, Cu(II) binding toward the N-terminal amides yields a chelate with six-, five-, and seven-membered rings, which would be overall less stable than the resulting chelate from coordination toward the C-terminal amides, yielding a seven-, five-, and five-membered rings.⁶¹ One example of copper coordination toward the C-terminal region is the octarepeat region of the human prion protein, where the Pro residue in the metal ion binding motif –PHGGGWSQ– prevents coordination toward the N-terminal region.⁶² Remarkably, the spectroscopic features of this binding site, particularly the CD signals, are very similar to those observed in the hIAPP fragment studied here. In the case of hIAPP, the presence of bulky hydrophobic residues preceding His18 is likely the cause for Cu(II) coordination to occur toward the C-terminal region. Conversely, the insertion of a Pro in position 19 in our model peptide turned into a “break-point” in the metal ion coordination site,^{63,64} forcing Cu(II) coordination toward the N-terminal region, in a similar fashion as observed recently by Rowinska-Zyrek in the membrane disrupting fragment of hIAPP(1–19).⁶⁵ This fragment lacks Ser20, which is a key residue to stabilize Cu(II) coordination toward the C-terminal region; consistently, the spectroscopic features reported for the Cu(II) complex with the hIAPP(1–

19) fragment are remarkably similar to those observed here for the S19P variant. Overall, these observations and the fact that Ser to Sar substitutions have a significant impact on the spectroscopic features of the Cu(II)-hIAPP complex allow us to unequivocally conclude that Cu(II) coordination occurs toward the C-terminal, involving the deprotonated backbone amides of Ser19 and Ser20.

Copper Coordination Involves Key Residues for Aggregation. The coordination sphere around the metal ion in the Cu(II)–hIAPP complex involves key residues that play a very important role in hIAPP aggregation. His18 is the anchoring residue for Cu(II) coordination to the disordered peptide,²⁹ and at the same time, it is located right in the middle of the β -sheet structure in the hIAPP fibrils.^{66,67} Thus, Cu(II) binding to hIAPP inevitably competes with β -sheet formation,¹⁷ and it has an inhibitory effect in amyloid aggregation.²⁹ In this study we have also identified Ser20 as a key residue that stabilizes Cu(II) coordination to hIAPP, by providing the ligands needed to form a stable chelate with two five-membered rings. Interestingly, S20G is a natural mutation of hIAPP associated with early onset of type 2 diabetes in certain Asian populations, and it accelerates hIAPP amyloid aggregation *in vitro*.^{9,68,69} The impact of the S20G mutation in the folding of the peptide and the mechanism involved in its accelerated amyloid aggregation are unknown, although the less bulky Gly residue at position 20 might facilitate the formation of the β -sheet structure, as this residue is located at the loop turn in the fibril structure.⁶⁷ However, from what we now know about Cu(II) coordination to hIAPP, one would expect that the S20G natural mutation would impact significantly the ability of the peptide to coordinate Cu(II) ions, which in turn would affect its conformation and its ability to form amyloid fibrils. Given the inhibitory effect of Cu(II) coordination in hIAPP fibril formation, decreased Cu(II) binding to the S20G variant would result in increased amyloid aggregation, potentially explaining the early onset of type 2 diabetes in those patients.

It has been demonstrated that the amide side chains of the asparagine residues 21 and 22 can dictate specific interactions that contribute to the ability of hIAPP to form fibers.⁷⁰ Here, we found that these asparagines residues may also play a role in Cu(II) binding, particularly Asn22 as a potential axial ligand to copper. Although the relative energy of the coordination models that include this residue as an axial ligand are 10–14 kcal/mol higher than the most stable structure, the spectroscopic changes observed upon substitutions of Asn22 indicate a role for the amide side chain of this residue in Cu(II) coordination. Interestingly, the coordination mode that includes the backbone carbonyl of Ser20 as an equatorial ligand and the –CO–NH₂ moiety of Asn22 as an axial ligand (i.e., 3N_{CO/S20}O_{Ax/N22}) is the structure that best reproduces the experimental EPR parameters. Thus, it is tempting to propose that this coordination mode might coexist with the modes shown in Scheme 1, even if it might be less populated. If so, the participation of Asn22 in Cu(II) coordination would further contribute to the inhibitory effect of this metal ion in hIAPP amyloid aggregation. Moreover, for Asn22 to reach into the metal ion coordination shell, a larger conformational change in the peptide would be needed, thus favoring a potentially different set of peptide conformations.

Copper Binding May Impact hIAPP Conformation. Human IAPP is an intrinsically disordered peptide with a flexible random coil fold that would be capable of adopting different conformations upon interaction with other molecules.

Scheme 2. Conformational Energy Landscapes for Metal-Free and Cu(II)-Bound hIAPP^a

^aIntrinsically disordered peptides such as hIAPP have flexible random coil conformations and thus, have a “flatter” conformational energy landscape (A). hIAPP conversion to beta-sheet structures facilitate the irreversible formation of highly stable amyloid fibrils (energy well in A). Metal ion binding to hIAPP would impact this conformational energy landscape, stabilizing a set of conformers that would encounter a higher energy barrier (red arrow) for their conversion to β -sheet structures and amyloid aggregation (B).

In the secretory granules, hIAPP is exposed to insulin and hormone peptides, as well as metal ions such as zinc and copper.¹¹ Because of this, it is reasonable to propose that the interaction of hIAPP with some of these physiologically relevant molecules might impact its conformation and hence modulate its aggregation properties. For instance, it has been proposed that the interaction of insulin with hIAPP inhibits its amyloid aggregation,¹¹ perhaps favoring a particular set of hIAPP conformers. In this context, the notion that Cu(II) binding to hIAPP might lead to different coexisting coordination modes that in turn could favor different sets of Cu-induced conformational ensembles is appealing (Scheme 2). Similar to the case of the amyloid- β peptide associated with Alzheimer's disease,⁷¹ our study points to a scenario where Cu(II) binding to hIAPP might lead to the coexistence of more than one coordination mode, namely, $3\text{N}_{\text{OH}/\text{S}20}$ and $3\text{N}_{\text{CO}/\text{S}20}$, and possibly a coordination mode where Asn22 would act as an axial ligand ($3\text{N}_{\text{CO}/\text{S}20}\text{O}_{\text{Ax}/\text{N}22}$). Since each of these species would impose different strains in the backbone peptide conformation, this dynamic coordination scenario would lead to the stabilization of different sets of hIAPP conformers that would be distinct from those associated with metal-free hIAPP (Scheme 2). Indeed, a recent mass spectrometry and molecular dynamics study has determined that Cu(II) binding to hIAPP favors the formation of conformers and oligomeric species that differ from those observed in metal-free hIAPP samples.¹⁷

Metal-induced changes in the folding of hIAPP would impact different properties of this peptide. For instance, many studies have demonstrated that Cu(II) binding to hIAPP protects it from enzymatic degradation by the insulin-degrading enzyme (IDE), particularly in the region around His18.^{30,31} In a similar fashion as Cu(II) ions, Zn(II) and Ni(II) binding to His18 of hIAPP inhibits its amyloid aggregation by changing its local conformation nearby this residue.^{11,16,19} In this regard, the effect of His-binding metal ions in hIAPP differs from the

scenario observed for the amyloid- β peptide. The His residues that anchor Cu(II) and Zn(II) ions to the amyloid- β peptide are located in the hydrophilic N-terminal region and do not compete with the formation of β -sheet structures and fibrils.⁷² In contrast, the anchoring His residue for metal ions in hIAPP is located in the middle of the hydrophobic region of the peptide that participates in β -sheet formation.⁶⁷ Thus, Cu(II) binding to hIAPP would favor a set of peptide conformers that would not be amenable for conversion into β -sheet structures, raising the energetic barrier toward amyloid fibril formation (Scheme 2). Cu-induced hIAPP conformers would not only be less likely to form amyloid structures, but could actually promote the formation of off-pathway aggregates that may be more toxic to cells.¹⁷

In summary, our study has revealed structural details of the Cu(II)-hIAPP complex, and it has identified the key residues involved in metal ion coordination. Beyond the anchoring His18 residue, Ser19 and Ser20 also play important roles by providing the deprotonated backbone amides that yield a 3N equatorial coordination mode. Most importantly, Ser20 plays the crucial role of stabilizing Cu(II) coordination toward the C-terminal region of hIAPP, as it provides the oxygen-based equatorial ligand, either via its hydroxyl group or its backbone carbonyl, that yields two 3N1O coordination modes with a stable set of chelate rings. Our finding that Ser20 plays an important role in Cu(II) coordination to hIAPP provides a potential link between the S20G mutation associated with early onset of type 2 diabetes, its impact in Cu binding properties, and hIAPP amyloid aggregation. On the other hand, our study points to a scenario where Cu(II) binding to hIAPP might lead to the coexistence of more than one coordination mode, which in turn could favor different sets of Cu-induced conformational ensembles. Because metal ion coordination involves residues that are key for the formation of β -sheet structures, such Cu-induced hIAPP conformers would display a higher energetic barrier to form amyloid fibrils, hence explaining the inhibitory

effect of Cu ions in hIAPP aggregation. Overall, this study provides further structural insights into the bioinorganic chemistry of type 2 diabetes.

■ ASSOCIATED CONTENT

■ Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.inorgchem.6b01963.

pH titration of hIAPP(18–22)–Cu(II) complex as followed by CD; 1D ¹NMR spectra of hIAPP(18–22) in the absence and presence of Cu(II); total energies of the model systems along the BOMD trajectory; EPR parameters from simulation of the complexes and structural parameters for the models from theoretical studies. Cartesian coordinates for all models are available upon request (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Phone: +52-55-57473723. E-mail: lilianaq@cinvestav.mx.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

This research was funded by the National Council for Science and Technology in Mexico (CONACYT) through Grant No. 221134 to L.Q., and graduate fellowships to C.S.L. and R.C.M. J.M.C. acknowledges DGTIC-UNAM Project SC16-1-IR-12 for the use of their computational resources and DGAPA-UNAM Grant IA-104516. The authors would also like to thank Dr. Lina Rivillas-Acevedo for the initial characterization of Cu(II)–hIAPP(15–22) complex, I. Q. Geiser Cuellar for assistance with the acquisition of ESI–MS data, and Q. Atenea Villegas and Q. F. I. Yanahi Posadas-Torrentera for assistance with peptide synthesis and purification.

■ REFERENCES

- (1) Westermark, P.; Andersson, A.; Westermark, G. T. Islet amyloid polypeptide, islet amyloid, and diabetes mellitus. *Physiol. Rev.* **2011**, *91*, 795–826.
- (2) Jaikaran, E. T. A. S.; Clark, A. Islet amyloid and type 2 diabetes from molecular misfolding to islet pathophysiology. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Basis Dis.* **2001**, *1537*, 179–203.
- (3) Marzban, L.; Park, K.; Verchere, C. B. Islet amyloid polypeptide and type 2 diabetes. *Exp. Gerontol.* **2003**, *38*, 347–351.
- (4) Kahn, C. R. Insulin Action, Diabetogenesis, and the Cause of Type II Diabetes. *Diabetes* **1994**, *43*, 1066–1084.
- (5) Rhodes, C. J. Type 2 Diabetes—a Matter of β -Cell Life and Death? *Science* **2005**, *307*, 380–384.
- (6) Young, A. *Amylin: Physiology and Pharmacology*, 1st ed.; Elsevier Academic Press Inc.: Amsterdam, 2005; Vol. 52.
- (7) Lorenzo, A.; Razzaboni, B.; Weir, G. C.; Yankner, B. A. Pancreatic islet cell toxicity of amylin associated with type-2 diabetes mellitus. *Nature* **1994**, *368*, 756–760.
- (8) Cao, P.; Marek, P.; Noor, H.; Patsalo, V.; Tu, L.-H.; Wang, H.; Abedini, A.; Raleigh, D. P. Islet amyloid: from fundamental biophysics to mechanisms of cytotoxicity. *FEBS Lett.* **2013**, *587*, 1106–1118.
- (9) Cao, P.; Tu, L.-H.; Abedini, A.; Levsh, O.; Akter, R.; Patsalo, V.; Schmidt, A. M.; Raleigh, D. P. Sensitivity of amyloid formation by human islet amyloid polypeptide to mutations at residue 20. *J. Mol. Biol.* **2012**, *421*, 282–295.
- (10) Westermark, P.; Engström, U.; Johnson, K. H.; Westermark, G. T.; Betsholtz, C. Islet amyloid polypeptide: Pinpointing amino acid residues linked to amyloid fibril formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1990**, *87*, 5036–5040.
- (11) DeToma, A. S.; Salamekh, S.; Ramamoorthy, A.; Lim, M. H. Misfolded proteins in Alzheimer's disease and type II diabetes. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 608–621.
- (12) Binolfi, A.; Lamberto, G. R.; Duran, R.; Quintanar, L.; Bertoncini, C. W.; Souza, J. M.; Cerveñansky, C.; Zweckstetter, M.; Griesinger, C.; Fernández, C. O. Site-Specific Interactions of Cu(II) with α and β -Synuclein: Bridging the Molecular Gap between Metal Binding and Aggregation. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11801–11812.
- (13) Hureau, C. Coordination of redox active metal ions to the amyloid precursor protein and to amyloid- β peptides involved in Alzheimer disease. Part 1: An overview. *Coord. Chem. Rev.* **2012**, *256*, 2164–2174.
- (14) Younan, N. D.; Klewpatinond, M.; Davies, P.; Ruban, A. V.; Brown, D. R.; Viles, J. H. Copper(II)-induced secondary structure changes and reduced folding stability of the prion protein. *J. Mol. Biol.* **2011**, *410*, 369–82.
- (15) Taylor, C. G. Zinc, the pancreas, and diabetes: insights from rodent studies and future directions. *BioMetals* **2005**, *18*, 305–312.
- (16) Brender, J. R.; Hartman, K.; Nanga, R. P. R.; Popovych, N.; de la Salud Bea, R.; Vivekanandan, S.; Marsh, E. N. G.; Ramamoorthy, A. Role of Zinc in Human Islet Amyloid Polypeptide Aggregation. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 8973–8983.
- (17) Lee, S. J. C.; Choi, T. S.; Lee, J. W.; Lee, H. J.; Mun, D.-G.; Akashi, S.; Lee, S.-W.; Lim, M. H.; Kim, H. I. Structure and assembly mechanisms of toxic human islet amyloid polypeptide oligomers associated with copper. *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 5398–5406.
- (18) Brender, J. R.; Krishnamoorthy, J.; Messina, G. M. L.; Deb, A.; Vivekanandan, S.; La Rosa, C.; Penner-Hahn, J. E.; Ramamoorthy, A. Zinc stabilization of prefibrillar oligomers of human islet amyloid polypeptide. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 3339–3341.
- (19) Salamekh, S.; Brender, J. R.; Hyung, S.-J.; Nanga, R. P. R.; Vivekanandan, S.; Ruotolo, B. T.; Ramamoorthy, A. A Two-Site Mechanism for the Inhibition of IAPP Amyloidogenesis by Zinc. *J. Mol. Biol.* **2011**, *410*, 294–306.
- (20) Aspinwall, C. A.; Brooks, S. A.; Kennedy, R. T.; Lakey, J. R. T. Effects of Intravesicular H⁺ and Extracellular H⁺ and Zn²⁺ on Insulin Secretation in Pancreatic Beta Cells. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 31308–31314.
- (21) Zargar, A. H.; Shah, N. A.; Masoodi, S. R.; Laway, B. A.; Dar, F. A.; Khan, A. R.; Sofi, F. A.; Wani, A. I. Copper, zinc, and magnesium levels in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Postgrad. Med. J.* **1998**, *74*, 665–668.
- (22) Kazi, T. G.; Afridi, H. I.; Kazi, N.; Jamali, M. K.; Arain, M. B.; Jalbani, N.; Kandhro, G. A. Copper, chromium, manganese, iron, nickel, and zinc levels in biological samples of diabetes mellitus patients. *Biol. Trace Elem. Res.* **2008**, *122*, 1–18.
- (23) Tanaka, A.; Kaneto, H.; Miyatsuka, T.; Yamamoto, K.; Yoshiuchi, K.; Yamasaki, Y.; Shimomura, I.; Matsuoka, T.-A.; Matsuhisa, M. Role of Copper Ion in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes. *Endocr. J.* **2009**, *56*, 699–706.
- (24) Flores, C. R.; Puga, M. P.; Wrobel, K.; Garay Sevilla, M. E.; Wrobel, K. Trace elements status in diabetes mellitus type 2: Possible role of the interaction between molybdenum and copper in the progress of typical complications. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **2011**, *91*, 333–341.
- (25) Naka, T.; Kaneto, H.; Katakami, N.; Matsuoka, T.-a.; Harada, A.; Yamasaki, Y.; Matsuhisa, M.; Shimomura, I. Association of serum copper levels and glycemic control in patients with type 2 diabetes. *Endocr. J.* **2013**, *60*, 393–396.
- (26) Uriu-Adams, J. Y.; Keen, C. L. Copper, oxidative stress, and human health. *Mol. Aspects Med.* **2005**, *26*, 268–298.
- (27) Ward, B.; Walker, K.; Exley, C. Copper(II) inhibits the formation of amylin amyloid in vitro. *J. Inorg. Biochem.* **2008**, *102*, 371–375.
- (28) Li, H.; Ha, E.; Donaldson, R. P.; Jeremic, A. M.; Vertes, A. Rapid Assessment of Human Amylin Aggregation and Its Inhibition by Copper(II) Ions by Laser Ablation Electrospray Ionization Mass

- Spectrometry with Ion Mobility Separation. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 9829–9837.
- (29) Rivillas-Acevedo, L.; Sánchez-López, C.; Amero, C.; Quintanar, L. Structural Basis for the Inhibition of Truncated Islet Amyloid Polypeptide Aggregation by Cu(II): Insights into the Bioinorganic Chemistry of Type II Diabetes. *Inorg. Chem.* **2015**, *54*, 3788–3796.
- (30) Bellia, F.; Grasso, G. The role of copper(II) and zinc(II) in the degradation of human and murine IAPP by insulin-degrading enzyme. *J. Mass Spectrom.* **2014**, *49*, 274–279.
- (31) Sinopoli, A.; Magri, A.; Milardi, D.; Pappalardo, M.; Pucci, P.; Flagiello, A.; Titman, J. J.; Nicoletti, V. G.; Caruso, G.; Pappalardo, G.; Grasso, G. The role of copper (II) in the aggregation of human amylin. *Metallomics* **2014**, *6*, 1841–1852.
- (32) Hu, J.; Yu, Y.-P.; Cui, W.; Fang, C.-L.; Wu, W.-H.; Zhao, Y.-F.; Li, Y.-M. Cyclen-hybrid compound captures copper to protect INS-1 cells from islet amyloid polypeptide cytotoxicity by inhibiting and lysing effects. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 8023–8025.
- (33) Yu, Y.-P.; Lei, P.; Hu, J.; Wu, W.-H.; Zhao, Y.-F.; Li, Y.-M. Copper induced cytotoxicity: reactive oxygen species or islet amyloid polypeptide oligomer formation. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 6909–6911.
- (34) Ma, L.; Li, X.; Wang, Y.; Zheng, W.; Chen, T. Cu(II) inhibits hIAPP fibrillation and promotes hIAPP-induced beta cell apoptosis through induction of ROS-mediated mitochondrial dysfunction. *J. Inorg. Biochem.* **2014**, *140*, 143–152.
- (35) Masad, A.; Hayes, L.; Tabner, B. J.; Turnbull, S.; Cooper, L. J.; Fullwood, N. J.; German, M. J.; Kametani, F.; El-Agnaf, O. M. A.; Allsop, D. Copper-mediated formation of hydrogen peroxide from the amylin peptide: A novel mechanism for degeneration of islet cells in type-2 diabetes mellitus? *FEBS Lett.* **2007**, *581*, 3489–3493.
- (36) Jensen, K. J.; Shelton, P. T.; Pedersen, S. L. *Peptide Synthesis and Applications*, 2nd ed.; Humana Press: New York, 2013; p 253.
- (37) Subirós-Funosas, R.; Prohens, R.; Barbas, R.; El-Faham, A.; Albericio, F. Oxyma: an efficient additive for peptide synthesis to replace the benzotriazole-based HOBt and HOAt with a lower risk of explosion. *Chem. - Eur. J.* **2009**, *15*, 9394–9403.
- (38) Gaggelli, E.; Bernardi, F.; Molteni, E.; Pogni, R.; Valensin, D.; Valensin, G.; Remelli, M.; Luczkowski, M.; Kozłowski, H. Interaction Of The Human Prion PrP(106–126) Sequence With Copper(II), Manganese(II), And Zinc(II): NMR and EPR Studies. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 996–1006.
- (39) Huber, J. G.; Moulis, J.-M.; Gaillard, J. Use of ¹H Longitudinal Relaxation Times in the Solution Structure of Paramagnetic Proteins. Application to [4Fe-4S] Proteins. *Biochemistry* **1996**, *35*, 12705–12711.
- (40) Bertini, I.; Luchinat, C. *Coord. Chem. Rev.* **1996**, *150*, 1–292.
- (41) Solomon, I. Relaxation Processes in a System of Two Spins. *Phys. Rev.* **1955**, *99*, 559–565.
- (42) Vranken, W. F.; Boucher, W.; Stevens, T. J.; Fogh, R. H.; Pajon, A.; Llinas, M.; Ulrich, E. L.; Markley, J. L.; Ionides, J.; Laue, E. D. The CCPN data model for NMR spectroscopy: development of a software pipeline. *Proteins: Struct., Funct., Genet.* **2005**, *59*, 687–696.
- (43) Schaftenaar, G.; Noordik, J. H. Molden: a pre- and post-processing program for molecular and electronic structures. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **2000**, *14*, 123–134.
- (44) Ufimtsev, I. S.; Martinez, T. J. Quantum Chemistry on Graphical Processing Units. 3. Analytical Energy Gradients, Geometry Optimization, and First Principles Molecular Dynamics. *J. Chem. Theory Comput.* **2009**, *5*, 2619–2628.
- (45) Perdew, J. P.; Burke, K.; Ernzerhof, M. Generalized Gradient Approximation Made Simple. *Phys. Rev. Lett.* **1996**, *77*, 3865–3868.
- (46) Godbout, N.; Salahub, D. R.; Andzelm, J.; Wimmer, E. Optimization of Gaussian-type basis sets for local spin density functional calculations. Part I. Boron through neon, optimization technique and validation. *Can. J. Chem.* **1992**, *70*, 560–571.
- (47) Geudtner, G.; Calaminici, P.; Carmona-Espíndola, J.; del Campo, J. M.; Domínguez-Soria, V. D.; Moreno, R. F.; Gamboa, G. U.; Goursot, A.; Köster, A. M.; Reveles, J. U.; Mineva, T.; Vásquez-Pérez, J. M.; Vela, A.; Zúñiga-Gutiérrez, B.; Salahub, D. R. deMon2k. *WIREs Comput. Mol. Sci.* **2012**, *2*, 548–555.
- (48) Neese, F. The ORCA program system. *WIREs Comput. Mol. Sci.* **2012**, *2*, 73–78.
- (49) Ernzerhof, M.; Scuseria, G. E. Assessment of the Perdew–Burke–Ernzerhof exchange-correlation functional. *J. Chem. Phys.* **1999**, *110*, 5029.
- (50) Adamo, C.; Barone, V. Toward reliable density functional methods without adjustable parameters: The PBE0 model. *J. Chem. Phys.* **1999**, *110*, 6158–6170.
- (51) The ORCA basis set CoreProp was used. This basis is based on the TurboMole DZ basis developed by Ahlrichs and co-workers and obtained from the basis set library under ftp.chemie.unikarlsruhe.de/pub/basen
- (52) Daniele, P. G.; Prenesti, E.; Ostacoli, G. Ultraviolet-circular dichroism spectra for structural analysis of copper (II) complexes with aliphatic and aromatic ligands in aqueous solution. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1996**, 3269–3275.
- (53) Bernarducci, E.; Schwindinger, W. F.; Hughey, J. L.; Krogh-Jespersen, K.; Schugar, H. J. Electronic Spectra of Copper(II)-Imidazole and Copper(II)-Pyrazole Chromophores. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 1686–1691.
- (54) Peisach, J.; Blumberg, W. E. Structural implications derived from the analysis of electron paramagnetic resonance spectra of natural and artificial copper proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* **1974**, *165*, 691–708.
- (55) Bertini, I.; Luchinat, C.; Parigi, G.; Pierattelli, R. NMR spectroscopy of paramagnetic metalloproteins. *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1536–1549.
- (56) Gaggelli, E.; Kozłowski, H.; Valensin, D.; Valensin, G. NMR studies on Cu(II)-peptide complexes: exchange kinetics and determination of structures in solution. *Mol. Biosyst.* **2005**, *1*, 79–84.
- (57) Binolfi, A.; Rodríguez, E. E.; Valensin, D.; D'Amelio, N.; Ippoliti, E.; Obal, G.; Duran, R.; Magistrato, A.; Pritsch, O.; Zweckstetter, M.; Valensin, G.; Carloni, P.; Quintanar, L.; Griesinger, C.; Fernández, C. O. Bioinorganic chemistry of Parkinson's disease: structural determinants for the copper-mediated amyloid formation of alpha-synuclein. *Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 10668–10679.
- (58) Neese, F. Metal and ligand hyperfine couplings in transition metal complexes: The effect of spin-orbit coupling as studied by coupled perturbed Kohn–Sham theory. *J. Chem. Phys.* **2003**, *118*, 3939–3948.
- (59) Barry, S. D.; Rickard, G. A.; Pushie, M. J.; Rauk, A. The affinity of HGGG, GHGG, GGHG, and GGGH peptides for copper(II) and the structures of their complexes — An ab initio study. *Can. J. Chem.* **2009**, *87*, 942–953.
- (60) Magri, A.; La Mendola, D.; Nicoletti, V. G.; Pappalardo, G.; Rizzarelli, E. New Insight in Copper-Ion Binding to Human Islet Amyloid: The Contribution of Metal-Complex Speciation To Reveal the Polypeptide Toxicity. *Chem. - Eur. J.* **2016**, *22*, 13287–13300.
- (61) Grande-Aztatzi, R.; Rivillas-Acevedo, L.; Quintanar, L.; Vela, A. Structural models for Cu(II) bound to the fragment 92–96 of the human prion protein. *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 789–799.
- (62) Burns, C. S.; Aronoff-Spencer, E.; Dunham, C. M.; Lario, P.; Avdievich, N. I.; Antholine, W. E.; Olmstead, M. M.; Vrieling, A.; Gerfen, G. J.; Peisach, J.; Scott, W. G.; Millhauser, G. L. Molecular Features of the Copper Binding Sites in the Octarepeat Domain of the Prion Protein. *Biochemistry* **2002**, *41*, 3991–4001.
- (63) Bataille, M.; Formicka-Kozłowska, G.; Kozłowski, H.; Pettit, L. D.; Steel, I. The L-proline residues as a break-point in the coordination of metal-peptide systems. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1984**, 231–232.
- (64) Pettit, L. D.; Steel, I.; Formicka-Kozłowska, G.; Tatarowski, T.; Bataille, M. The L-Proline Residues as a Break-point in Metal-Peptide System. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1985**, 535–539.
- (65) Rowinska-Zyrek, M. Coordination of Zn(2+) and Cu(2+) to the membrane disrupting fragment of amylin. *Dalton Trans.* **2016**, *45*, 8099–8106.
- (66) Luca, S.; Yau, W.-M.; Leapman, R.; Tycko, R. Peptide Conformation and Supramolecular Organization in Amylin Fibrils:

Constraints from Solid-State NMR. *Biochemistry* **2007**, *46*, 13505–13522.

(67) Wiltzius, J. J.; Sievers, S. A.; Sawaya, M. R.; Cascio, D.; Popov, D.; Riek, C.; Eisenberg, D. Atomic structure of the cross-beta spine of islet amyloid polypeptide (amylin). *Protein Sci.* **2008**, *17*, 1467–1474.

(68) Sakagashira, S.; Hiddinga, H. J.; Tateishi, K.; Sanke, T.; Hanabusa, T.; Nanjo, K.; Eberhardt, N. L. S20G Mutant Amylin Exhibits Increased In Vitro Amyloidogenicity and Increased Intracellular Cytotoxicity Compared to Wild-Type Amylin. *Am. J. Pathol.* **2000**, *157*, 2101–2109.

(69) Xu, W.; Jiang, P.; Mu, Y. Conformation Preorganization: Effects of S20G Mutation on the Structure of Human Islet Amyloid Polypeptide Segment. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 7308–7314.

(70) Koo, B. W.; Hebda, J. A.; Miranker, A. D. Amide inequivalence in the fibrillar assembly of islet amyloid polypeptide. *Protein Eng., Des. Sel.* **2008**, *21*, 147–154.

(71) Faller, P.; Hureau, C.; La Penna, G. Metal ions and intrinsically disordered proteins and peptides: from Cu/Zn amyloid-beta to general principles. *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 2252–9.

(72) Nasica-Labouze, J.; Nguyen, P. H.; Sterpone, F.; Berthoumieu, O.; Buchete, N. V.; Cote, S.; De Simone, A.; Doig, A. J.; Faller, P.; Garcia, A.; Laio, A.; Li, M. S.; Melchionna, S.; Mousseau, N.; Mu, Y.; Paravastu, A.; Pasquali, S.; Rosenman, D. J.; Strodel, B.; Tarus, B.; Viles, J. H.; Zhang, T.; Wang, C.; Derreumaux, P. Amyloid beta Protein and Alzheimer's Disease: When Computer Simulations Complement Experimental Studies. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 3518–63.