

Efecto de la unión de cobre y zinc en la agregación de la amilina, proteína asociada a la diabetes tipo 2.

Jorge Martín del Campo Ramírez
Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química

Avances

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 (ó polipéptido amiloide de los islotes humanos ó hIAPP, por sus siglas en inglés). Éstos 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 má fácilmente, pero cuya amiloidogenicidad está vinculada directamente con su estructura primaria¹.

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 favorecida². 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 membrana³, considerándose como una etapa en una cascada mucho más compleja, que eventualmente lleva a la apoptosis de la célula.

Por otra parte, hay una cantidad considerable de observaciones experimentales que han llevado a considerar a los oligómeros y cuerpos prefibrilares como las especies más tóxicas en padecimientos amiloidogénicos. 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 posteriormente⁴. Esto puede deberse a una mayor exposición de grupos funcionales que les permiten interactuar con membranas, otras especies presentes en el citosol y otros oligómeros amiloides. Además, el tamaño relativamente pequeño de estos agregados les confiere un agran 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-KCNTATC ATQRLANFLVHSSNNFGAILSSTNVGSNTY-37, ubicada en las células β del páncreas), se han identificado tres regiones distintas que le confieren una enorme propensión a

¹L. Nagel-Steger, M. C. Owen, and B. Strodel. *Chem Biochem.* **2016**, 17, 657.

²J. D. Schmit, K. Ghosh and K. Dill. *Biophys J.* **2011**, 100, 450.

³N. P. Reynolds *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 19366

⁴M. Bucciantini, *et al.* *Nature.* **2002**, 416, 507

agregarse: i) región fibrillogénica alteradora de membrana (resíduos 1-19), ii) región amiloidogénica (resíduos 20-29) y iii) región mejoradora de formación de amiloide (resíduos 30-37)⁵. 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, 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)⁶.

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 a 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. 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.*⁷ identificaron al fragmento 18-22 como la secuencia mínima necesaria para coordinar Cu(II) a la hIAPP. 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 ó 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 péptidos⁸. 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.

En esta primera etapa del proyecto se realizó el estudio de las interacciones del Cu(II) con el fragmento 18-22 de la amilina humana para elucidar la naturaleza del donador de oxígeno en el centro de coordinación, así como de la estabilidad de diferentes estructuras de complejos de coordinación por medio de dinámicas moleculares Born-Oppenheimer, complementando en todos los casos con cálculos de parámetros de espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica. Las tres propuestas que se estudiaron se muestran en la figura 1. Todos los modelos (con multiplicidad de espín dos) fueron optimizados en fase gas sin solvatación explícita en un esquema

⁵M. Rowińska-Żyrek. *Dalton trans.* **2016**, 45, 8099.

⁶S. J. C. Lee *et al.* *Chem. Sci.* **2016**, DOI: 10.1039/c6sc00153j.

⁷L. Rivillas-Acevedo, C. Sánchez-López, C. Amero, L. Quintanar. *Inorg. Chem.* **2015**, 54, 3788.

⁸V. Wineman-Fisher, D. N. Bloch and Y. Miller. *Coord. Chem. Rev.* **2016**, DOI: 10.1016/j.ccr.2016.04.010.

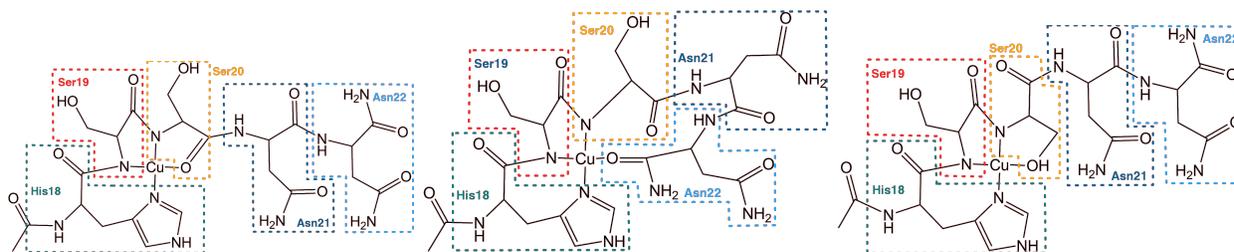


Figura 1: Estructuras de coordinación propuestas para el complejo HSSNN-Cu(II). El panel izquierdo muestra coordinación con el carbonilo de Ser20 (modelo 3N1O_{CO} S20), el panel central está coordinado con el carbonilo de Asn22 (3N1O_{CO} N22) y el panel de la derecha muestra coordinación con el hidroxilo de la Ser20(3N1O_{OH} S20).

Kohn-Sham sin restricción de espín, utilizando el funcional de intercambio y correlación PBE y un conjunto de base DZVP en el código de estructura electrónica TeraChem⁹. Posteriormente se adicionaron cuatro moléculas de agua (dos arriba y dos abajo del plano formado por el centro de coordinación) a los modelos 3N1O_{CO} S20 y 3N1O_{OH} S20 (que mostraron ser los más estables). Estas estructuras se optimizaron nuevamente y se usaron como punto de partida para cálculos de dinámica molecular Born-Oppenheimer (BOMD, por sus siglas en inglés) utilizando condiciones de frontera esféricas, nuevamente el código TeraChem⁴, con tamaño de paso de 1fs y control de temperatura a 300k a lo largo de 60ps. Una posterior búsqueda local a 0K hizo posible identificar a los conformeros de menor energía, los cuales fueron utilizados como estructuras de partida en nuevas dinámicas sin restricciones esféricas. Estas se llevaron a cabo por un período de 20fs, de donde se descartaron los primeros 3fs, se extrajeron y optimizaron los puntos de menor energía y se usaron como puntos de partida en una segunda simulación BOMD regular, que sirvió como confirmación de lo obtenido previamente.

De este segundo conjunto de simulaciones, nuevamente, se hizo un muestreo para extraer las estructuras de los conformeros más estables, las cuales serían utilizadas para los cálculos de EPR, mismos que fueron hechos utilizando el código de química computacional ORCA 3.0.2¹⁰. Los cálculos espectroscópicos se hicieron usando el funcional híbrido PBE0 en combinación con los conjuntos de base DGAUSS (para átomos ligeros) y CP (para el cobre (II)), así como el modelo COSMO para introducir agua como solvente implícito.

Los trabajos listados a continuación se encuentran relacionados de manera directa con el proyecto **Efecto de la unión de cobre y zinc en la agregación de la amilina, proteína asociada a la diabetes tipo 2:**

- Copper coordination features of human islet amyloid polypeptide (hIAPP): The type 2 diabetes peptide, C. Sánchez-López, R. Cortés-Mejía, M.C. Miotto, A. Binolfi, C.O. Fernández, J. M. del Campo, L. Quintanar, *Inorganic Chemistry* 55, 10727 (2016) (DOI:10.1021/acs.inorgchem.6b01963)
- DFT approach on the structural study of Cu(II) coordination to 18-22 fragment of human amylin peptide, R. Cortés-Mejía, C. Sánchez-López, L. Quintanar, J. M. del Campo, *Frontiers in Computational Chemistry* 2016, agosto de 2016, Facultad de Química UNAM

⁹I.S. Ufimtsev and T.J. Martinez, *J. Chem. Theory Comput.*, **2009**, 5, 2619

¹⁰F. Neese. *WIREs Comput Mol Sci*, **2012**, 2, 73-78

- DFT approach on the structural study of Cu (II) coordination to human amylin peptide involved in type 2 diabetes, R. Cortés-Mejía, C. Sánchez-López, L. Quintanar, J. M. del Campo, V Latin American Meeting on Biological Inorganic Chemistry (V LABIC), Querétaro, México, octubre, 2016
- Estudio de la afinidad del fragmento 18-22 de la hIAPP hacia Zn(II), R. Cortés-Mejía, J. M. del Campo, Reunión Mexicana de Físicoquímica Teórica XV, Mérida Yucatán, México, noviembre de 2016

Los trabajos listados a continuación no se encuentran relacionados con la línea de investigación de del proyecto **Efecto de la unión de cobre y zinc en la agregación de la amilina, proteína asociada a la diabetes tipo 2**, no obstante, a sido posible llevarlos a cabo en gran medida por el empleo de los equipos de cómputo y los nodos con tarjetas de procesamiento gráfico.

- Evaluation of three-centre electron repulsion integrals on graphics processing units, X. Huang, J. M. del Campo, Frontiers in Computational Chemistry 2016, agosto de 2016, Facultad de Química UNAM
- Evaluación de integrales de repulsión electrónica de tres centros en unidades de procesamiento gráfico, X. Huang, J. M. del Campo, Reunión Mexicana de Físicoquímica Teórica XV, Mérida Yucatán, México, noviembre de 2016

Contribución a la investigación

Este proyecto contribuye a estudiar la manera en que los iones metálicos se coordinan con las porciones no estructuradas de las proteínas para potencialmente entender el papel de estos en la formación de fibras amiloides y oligómeros de amilina. Estas estructuras han sido identificadas como sello característico de la enfermedad metabólica Diabetes Tipo 2, la cual es considerada un problema de salud mundial porque afecta actualmente a **415 millones de personas**¹¹, de modo que cualquier esfuerzo por entender las causas que la originan resulta de gran relevancia en el combate contra esta problemática mundial. Este estudio podría permitir la identificación de potenciales blancos moleculares que servirían de guía en el diseño de estrategias terapéuticas y/o preventivas más específicas y, en consecuencia, mucho más efectivas.

¹¹<http://www.idf.org/worlddiabetesday/toolkit/gp/facts-figures?language=es> *septiembre de 2016*