



**Universitat de les  
Illes Balears**

Facultat de Ciències

**Memòria del Treball de Fi de Grau**

# Estudio de las interacciones entre la neuromedina C y algunos cationes metálicos.

Ana Belén Uceda Mayo

**Grau de Química**

Any acadèmic 2016-17

Treball tutelat per Bartolomé Vilanova Canet  
Departament de Química

S'autoritza la Universitat a incloure aquest treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació

Autor		Tutor	
Sí	No	Sí	No
X		X	

Paraules clau del treball:

Neuromedina C, cationes metálicos, motivo ATCUN, constantes de unió, parámetros termodinámicos, fluorescencia.



# ÍNDICE

---

<b>Resumen</b>	4
<b>1. Introducción y antecedentes</b>	5
1.1 Importancia de los cationes metálicos en el organismo	5
1.2 Formación de complejos entre proteínas y cationes metálicos	5
1.2.1 Motivo de unión con afinidad por cationes como el Cu(II) y el Ni(II) (motivo ATCUN)	5
1.3 Neuromedina C (NMC)	7
1.3.1 Composición y actividad biológica	7
1.3.2 Propiedades estructurales de la NMC y formación de complejos	8
1.3.2.1 Estudios conformacionales de la NMC en función del disolvente	8
1.3.2.2 Formación de complejos (motivo ATCUN)	8
<b>2. Objetivo</b>	9
<b>3. Metodología</b>	10
3.1 Reactivos	10
3.2 Procedimientos y técnicas experimentales	10
3.2.1 Preparación de disoluciones	10
3.2.2 Medidas de fluorescencia	11
3.2.2.1 – Estudio del efecto del pH sobre el espectro de fluorescencia de la NMC	11
3.2.2.2 – Estudio de la interacción entre la NMC y los cationes metálicos	11
3.2.3 Experimentos de calorimetría de valoración isoterma (ITC)	12
3.3 Tratamiento matemático de los resultados experimentales	12
3.3.1 Determinación de las constantes de unión	12
3.3.2 Ajuste de los resultados cinéticos	13
3.3.3 Obtención de los parámetros termodinámicos	14
3.3.4 Tratamiento de los datos obtenidos a partir de los experimentos de ITC	14
<b>4. Resultados y discusión</b>	15
4.1 Dependencia del espectro de fluorescencia de la NMC con el pH	15
4.2 Estudio de la interacción entre la NMC y el Cu(II)	16
4.2.1 Efecto del pH en la constante de formación del complejo	18
4.2.2 Efecto de la temperatura en la constante de formación del complejo	20
4.2.3 Constante de equilibrio de formación del complejo y parámetros termodinámicos determinados mediante ITC	21
4.3 Estudio de la interacción entre la NMC y el Ni(II)	22
4.3.1 Efecto del pH en la formación del complejo	22
4.3.2 Efecto de la temperatura en la formación del complejo	25
4.4 Estudio de la interacción entre la NMC y el Co(II)	26
<b>5. Conclusiones</b>	28
<b>6. Bibliografía</b>	29

## RESUMEN

Los cationes metálicos son esenciales para la vida ya que desarrollan funciones en el organismo que no pueden llevarse a cabo por ninguna otra entidad. De hecho, ciertas enfermedades humanas se han relacionado con deficiencias y excesos en la concentración de los cationes metálicos respecto a la concentración que se considera óptima en el organismo. Para evitar estos problemas es imprescindible disponer de un sistema de regulación encargado de captar el catión metálico, transportarlo, almacenarlo y eliminarlo. Con este objetivo, los sistemas biológicos han desarrollado una serie de proteínas especializadas en cada uno de los procesos indicados.

Los cationes metálicos presentes en el organismo suelen encontrarse formando complejos con proteínas, tanto cuando llevan a cabo su función como en los procesos de captación, transporte, almacenamiento y eliminación.

El motivo proteico conocido como ATCUN, del inglés "*Amino Terminal Cu(II)-, Ni(II)-binding*", es uno de los sitios de unión entre proteínas y cationes metálicos mejor caracterizado y se ha relacionado con el transporte de Cu(II) y Ni(II) en el organismo. Está ampliamente demostrado que el motivo ATCUN es capaz de inhibir enzimas, de fragmentar cadenas de ácidos nucleicos, de impedir la agregación de péptidos  $\beta$ -amiloides (relacionados con la enfermedad de Alzheimer) y presenta acción antimicrobiana.

La Neuromedina C (NMC) es un decapeptido que contiene el motivo ATCUN en su estructura. Este péptido se encuentra en mamíferos y tiene actividad como neurotransmisor, neuromodulador, factor de crecimiento y regulador de la secreción de hormonas gastrointestinales y jugos pancreáticos. Adicionalmente, se ha visto que podría estar relacionado con la regulación de los cationes Cu(II) y Ni(II) en el sistema nervioso central y que su mal funcionamiento podría ser la causa de enfermedades neurológicas como la enfermedad de Menkes y la enfermedad de Wilson, relacionadas con un transporte deficiente de Cu(II) en el organismo.

Algunos autores han demostrado que los cationes Cu(II) y Ni(II) son capaces de formar un complejo con la NMC, enlazándose al motivo ATCUN, promoviendo un cambio en la conformación del péptido desde una estructura desordenada a una hélice  $\alpha$ . Sin embargo, hasta el momento, no se tiene información detallada de las constantes de unión entre el péptido y el catión metálico.

En este trabajo se ha estudiado la interacción de la NMC con los cationes Cu(II), Ni(II) y Co(II). Los resultados obtenidos confirman la formación de un complejo entre el decapeptido y los tres cationes metálicos indicados, siendo las constantes de unión a pH 6,6 y a 25°C del orden de  $10^5$ ,  $10^4$  y  $10^3 \text{ M}^{-1}$ , respectivamente. En este estudio se ha comprobado que la cinética de formación del complejo depende del catión metálico considerado. Los resultados obtenidos han demostrado, además, que el pH es un factor determinante en la formación del complejo con la NMC. Por otro lado, se ha demostrado que el proceso de formación del complejo es espontáneo, endotérmico y supone un aumento de la entropía del sistema.

# 1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

## 1.1. Importancia de los cationes metálicos en el organismo

Está ampliamente aceptado que los cationes metálicos desarrollan funciones importantes en el organismo [Ma, 2009]. Por ejemplo, se ha demostrado que actúan como agentes estructurales (Ca, Zn, Si), como transferidores de señales entre células (Ca), como transportadores de electrones (Fe, Cu, Mo) y como catalizadores en ciertas reacciones redox (Mn, V, Fe, Co, Ni, Cu, W) y ácido-base (Zn, Fe, Ni, Mn). Además, la presencia de algunos de ellos en proteínas es imprescindible para estabilizar su conformación estructural [Williams, 2013].

Dada la importancia que los cationes metálicos tienen en el organismo, es imprescindible mantener una concentración óptima de los mismos. El proceso que regula la concentración de estos cationes (homeostasis) está mediado por el equilibrio entre la captación del catión metálico, su acumulación y su eliminación. Adicionalmente, es necesario disponer de un sistema encargado de transportar y distribuir el catión metálico, asegurando una buena biodisponibilidad. Para ello, los sistemas biológicos han desarrollado una serie de proteínas especializadas en cada uno de los procesos indicados.

Se ha visto que un gran número de enfermedades humanas están relacionadas con alteraciones en la homeostasis y en el transporte de los cationes metálicos. Estos trastornos generan deficiencias y excesos en la concentración del catión metálico que hacen que muchos procesos biológicos no puedan llevarse a cabo y que aparezcan problemas de toxicidad [Nelson, 1999].

En el caso de los cationes metálicos utilizados en este trabajo, se ha comprobado que el Cobre participa como cofactor catalítico en la respiración mitocondrial, en la absorción de hierro y en la maduración de algunos neurotransmisores, y deficiencias en su transporte derivan en enfermedades neurológicas como la enfermedad de Menkes y la enfermedad de Wilson [Sankararamakrishnan, 2005]. En el caso del Níquel, se ha visto que elevadas concentraciones del mismo producen alergias en la piel, cáncer de pulmón y problemas cardiovasculares [Wang, 2010]. Por otra parte, el Cobalto forma parte de la Vitamina B12 y participa en la síntesis de aminoácidos y proteínas y una deficiencia en su concentración genera anemia, hipotiroidismo y problemas mentales [Czarnek, 2015].

## 1.2 Formación de complejos entre proteínas y cationes metálicos

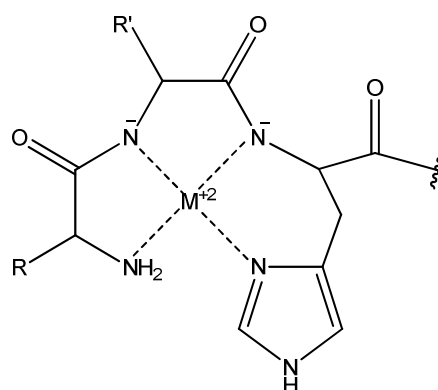
La mayoría de los cationes metálicos presentes en el organismo se encuentran formando complejos con proteínas. La formación de estos compuestos es indispensable para la actividad de muchas proteínas y regula los procesos de homeostasis y transporte de los cationes metálicos en el organismo.

Los complejos se forman mediante la interacción de los cationes (con orbitales de valencia desocupados) con átomos o iones que disponen de electrones libres. Habitualmente, las especies que rodean al catión metálico son el nitrógeno del anillo imidazólico de residuos histidina, el oxígeno de la cadena lateral de aspartato y glutamato, nitrógenos del esqueleto peptídico y átomos de azufre de residuos cisteína y metionina [Williams, 2013].

### 1.2.1 Motivo de unión con afinidad por cationes como el Cu(II) y el Ni(II) (motivo ATCUN)

El motivo conocido como ATCUN, del inglés “*Amino Terminal Cu(II)-, Ni(II)-binding*”, es uno de los sitios de unión entre proteínas y cationes metálicos mejor caracterizado. Este motivo se encuentra en el extremo N-terminal de algunas proteínas y presenta afinidad por el Cu(II) y el Ni(II).

El motivo ATCUN está constituido por cuatro nitrógenos correspondientes al nitrógeno amino terminal del primer residuo del péptido, dos nitrógenos desprotonados del esqueleto peptídico y un nitrógeno del anillo imidazólico de un residuo histidina que se encuentra en tercera posición (Figura 1) y cuya presencia es indispensable, tal y como han demostrado varios autores [Appleton, 1971; Dixon, 1974; Laussac, 1984; Predki, 1992].



**Figura 1.** Estructura del motivo ATCUN, donde se muestra la secuencia  $H_2N-X^1-X^2-H^3$  (X es un aminoácido arbitrario).

Originalmente, el motivo ATCUN fue caracterizado en las albúminas bovina y humana, pero también se encuentra en la protamina de esperma humano P2a, en la histatina-5, en la hepcidina y en las neuromedinas C y K [Harford, 1997]. En la Tabla 1 se indican las secuencias del extremo N-terminal de estos péptidos y proteínas, donde puede verse que, a pesar de que los dos primeros residuos no son iguales, presentan un residuo histidina en tercera posición que les permite interactuar con ciertos cationes metálicos.

**Tabla 1.** Secuencias del extremo N-terminal de la Albúmina sérica humana (HSA), Albúmina sérica bovina (BSA), Protamina de esperma humano (P2a), Histatina-5, Hepcidina y Neuromedina C y K.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<b>HSA</b>	Asp	Ala	<b>His</b>	Lys	Ser	Glu	Val	Ala	His	Arg	Phe	Lys	Asp	Leu
<b>BSA</b>	Asp	Thr	<b>His</b>	Lys	Ser	Glu	Ile	Ala	His	Arg	Phe	Lys	Asp	Leu
<b>P2a</b>	Arg	Thr	<b>His</b>	Gly	Gln	Ser	His	Tyr	Arg	Arg	Arg	His	Cys	Ser
<b>Histatina-5</b>	Asp	Ser	<b>His</b>	Ala	Lys	Arg	His	His	Gly	Tyr	Lys	Arg	Lys	Phe
<b>Hepcidina</b>	Asp	Thr	<b>His</b>	Phe	Pro	Ile	Cys	Ile	Phe	Cys	Cys	Gly	Cys	Cys
<b>Neuromedina C</b>	Gly	Asn	<b>His</b>	Trp	Ala	Val	Gly	His	Leu	Met	NH <sub>2</sub>			
<b>Neuromedina K</b>	Asp	Met	<b>His</b>	Asp	Phe	Phe	Val	Gly	Leu	Met	NH <sub>2</sub>			

Algunos estudios han demostrado que el motivo ATCUN interviene en el transporte del Cu(II) y el Ni(II) en el organismo. Además, se ha comprobado que el motivo unido al Cu(II) es capaz de fragmentar cadenas de ácidos nucleicos [Harford, 1997]; de inhibir la actividad de algunas enzimas [Gokhale, 2008]; de impedir la agregación de péptidos  $\beta$ -amiloides relacionados con la enfermedad del Alzheimer [Folk, 2010] y que presenta acción antimicrobiana [Libardo, 2015]. Por este motivo, se ha propuesto como un potente candidato para fármacos que presenten actividad como inhibidores selectivos e irreversibles de enzimas, como antimicrobianos y anticancerígenos. No obstante, es necesario llevar a cabo un estudio exhaustivo de las características que presenta la unión del motivo con los cationes metálicos para asegurar la estabilidad del mismo en el organismo [Miyamoto, 2013].

Hasta el momento, se han determinado las constantes de unión de las albúminas, de la histatina-5, y de la hepcidina con ciertos cationes metálicos. Sin embargo, no se tiene información detallada de la interacción entre la neuromedina C y los cationes metálicos.

## 1.3 Neuromedina C

### 1.3.1 Composición y actividad biológica

La neuromedina C (NMC) es un decapeptido endógeno (Figura 2) presente en mamíferos que pertenece a la familia de péptidos análogos a la bombesina, un neurotransmisor propio de los anfibios que consta de catorce aminoácidos [Minamino, 1984].

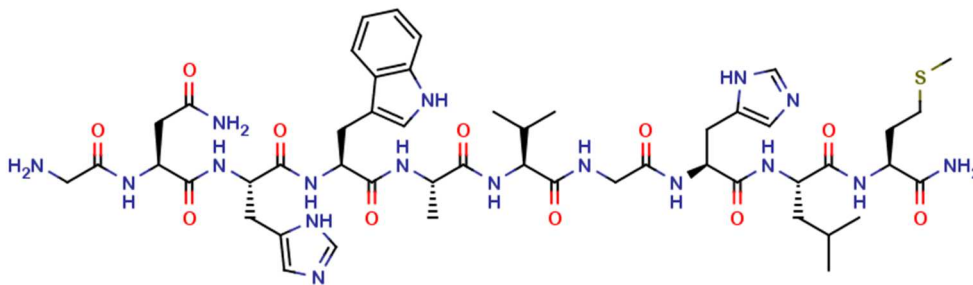


Figura 2. Estructura química de la neuromedina C (GNHWAVGHLM-NH<sub>2</sub>).

La NMC fue aislada por primera vez en 1984 a partir de la médula espinal porcina [Minamino, 1984]. Diversos estudios han demostrado que el decapeptido lleva a cabo funciones fisiológicas como neurotransmisor, neuromodulador, factor de crecimiento y regulador de la secreción de hormonas gastrointestinales y jugos pancreáticos [Jensen, 2008; Guglietta, 1985]. Por ejemplo, se ha visto que la NMC es capaz de inducir la contracción de algunos tejidos musculares lisos [Minamino, 1984]; de activar neuronas específicas mediante la disminución del transporte de potasio en el sistema nervioso central [Reynolds, 1997]; de reducir la sensación de apetito [Tachibana, 2010]; de modular la producción de interleucina-1 en células de los bronquiolos alveolares, interviniendo, por tanto, en algunos procesos inmunológicos e inflamatorios de los pulmones [Lemaire, 1991]; y de estimular la secreción de la hormona del crecimiento en terneros [Zhao, 2012] y de insulina en rumiantes [Zhao, 2016]. En los últimos años, se ha observado que la NMC puede regular el crecimiento y la diferenciación de tumores humanos en un amplio rango de tejidos, incluyendo carcinomas de páncreas, de estómago, de pulmón, de mama, de próstata y de colon [Cornelio, 2007]. Debido a ello, algunos grupos de investigación han dirigido sus estudios al desarrollo de fármacos capaces de diagnosticar y tratar el cáncer, actuando sobre los receptores con los que la NMC interacciona para llevar a cabo su función, los cuales se ha visto que son sobreexpresados en las células tumorales [Yong, 2010]. Algunos ejemplos de ello son el peptidomimético de la NMC RC-3095 [Schwartzmann, 2006] o el compuesto <sup>99m</sup>Tc-demomedin C, un análogo del decapeptido capaz de retener un isótopo de Tc radiactivo [Marsouvanidis, 2013].

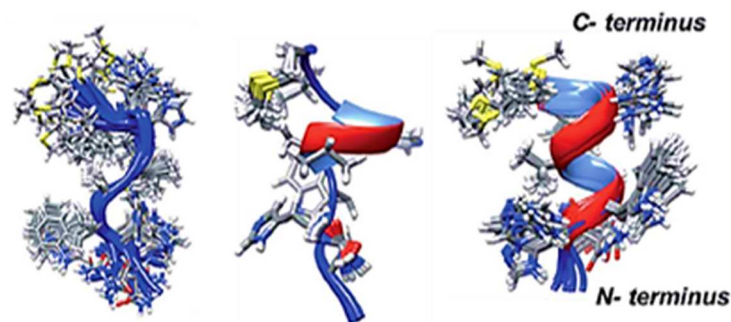
Como se ha indicado en el apartado anterior, la NMC presenta el motivo ATCUN en su estructura, por lo que se ha planteado que puede estar implicada en el transporte de Cu(II) en el sistema nervioso central y se la ha relacionado con enfermedades neurológicas como la enfermedad de Menkes y la enfermedad de Wilson, ambas debidas a trastornos en el metabolismo del Cu(II). Sin embargo, sería necesario llevar a cabo más estudios sobre ello para comprobar si la NMC se encarga realmente de transportar el cobre o si éste interfiere en el resto de sus funciones fisiológicas [Harford, 1995].

### 1.3.2 Propiedades estructurales de la NMC y formación de complejos

Hasta ahora, los estudios llevados a cabo con el decapeptido se han centrado en analizar la conformación estructural de la NMC en función de la polaridad del medio y de la presencia de cationes metálicos con los que puede formar complejos, lo cual es muy importante si se tiene en cuenta que la interacción entre la NMC y sus receptores (BB<sub>2</sub>R) requiere de una conformación concreta de ambos [Harford, 1995].

#### 1.3.2.1 Estudios conformacionales de la NMC en función del disolvente

Recientemente se ha demostrado mediante varias técnicas experimentales que la NMC presenta una estructura desordenada en disolución acuosa. No obstante, la presencia de 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) en el medio induce una transición conformacional a hélice  $\alpha$ , inicialmente en la zona C-terminal y, posteriormente, en la zona N-terminal (Figura 3). Además, la NMC interacciona con micelas de SDS, comprobándose que adopta la conformación de hélice  $\alpha$ . Este hecho sugiere que el péptido tiene preferencia por esta conformación y que su adquisición no se debe al hecho de haber utilizado TFE, un compuesto químico que suele inducir la hélice  $\alpha$  en polipéptidos [Adrover, 2015].



**Figura 3.** Análisis de la evolución que experimenta la conformación de la NMC a distintas concentraciones de TFE en el medio (de izquierda a derecha: 0%, 40% y 90% de TFE). En cada figura se representan las diez estructuras más bajas en energía de la NMC determinadas mediante experimentos de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) [Adrover, 2015].

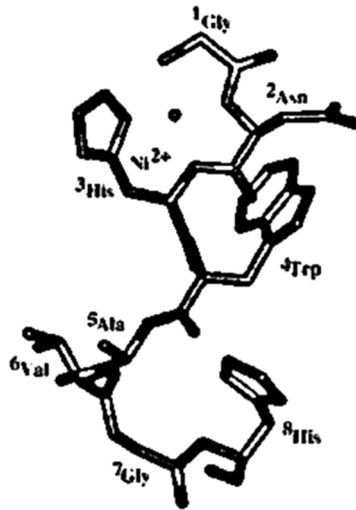
#### 1.3.2.2 Formación de complejos (motivo ATCUN)

En los últimos años, también se ha estudiado la conformación de la NMC en presencia de cationes metálicos en medios fisiológicos.

Mediante estudios espectrofotométricos llevados a cabo en la región del visible se comprobó que la NMC presenta cierta afinidad por el Cu(II) y el Ni(II). Además, se demostró que el enlace que se establece entre el péptido y los cationes metálicos es específico y que depende del estado de protonación del péptido, ya que los espectros realizados a una misma concentración NMC-cación metálico a distintos pHs mostraban que la longitud de onda de absorción máxima se mantenía en todo el rango de pH estudiado y que la absorbancia aumentaba en la zona de 500-550 nm a medida que se incrementaba la basicidad del medio [Harford, 1995]. No obstante, estas variaciones en el espectro UV-Visible, debidas a la presencia de residuos Trp e His en la cadena peptídica, eran demasiado pequeñas como para determinar las constantes de unión entre el decapeptido y los cationes metálicos.

Mediante experimentos de dicroísmo circular y Resonancia Magnética Nuclear (RMN) se ha demostrado, además, que la NMC pasa de una estructura desordenada en ausencia del catión metálico a una conformación de hélice  $\alpha$  en presencia del mismo (Figura 4), por formación del complejo entre ambos [Harford, 1995; Gasmi, 1997; Yorita, 2008].





**Figura 4.** Disposición estructural de la NMC en presencia del catión metálico Ni(II). Estructura elucidada a partir de los estudios de RMN [Gasmi, 1997].

Los estudios de RMN también han demostrado que la geometría del complejo que se forma es plano cuadrada, dando un complejo paramagnético cuando el catión metálico es el Cu(II) y diamagnético en el caso del Ni(II). Además, se ha comprobado que la estequiometría NMC-catión metálico es 1:1 y que la formación del complejo es inmediata cuando se trata del Cu(II). No obstante, la formación del complejo entre la NMC y el Ni(II) es un proceso cinéticamente lento, necesitando varias horas, e incluso días, para que tenga lugar [Gasmi, 1997].

## 2. OBJETIVO

Dada la importancia que tiene la formación de complejos entre la NMC y ciertos cationes metálicos en el organismo y en vista de que no se tiene información detallada de sus constantes de unión, el objetivo global del trabajo es realizar un estudio de la interacción que se establece entre el decapeptido y algunos cationes metálicos.

Partiendo de varias investigaciones que han demostrado la interacción de la NMC con el Cu(II) y el Ni(II), se ha decidido seguir utilizando estos cationes metálicos para realizar este trabajo. Además, se ha añadido al estudio el Co(II), otro catión divalente de la serie 3d de la tabla periódica.

Para estudiar la interacción entre la neuromedina C y los cationes metálicos indicados, se plantean los siguientes objetivos parciales:

- Determinar las constantes de unión entre la NMC y los cationes Cu(II), Ni(II) y Co(II). La presencia de un residuo triptófano en la cadena peptídica permitirá aplicar la técnica de espectroscopia de fluorescencia para llevar a cabo dicha determinación. En este estudio se analizará la dependencia de las constantes de unión con el pH del medio.
- Determinar algunas magnitudes termodinámicas de la interacción entre la NMC y los cationes metálicos, a un único pH. Para llevar a cabo este objetivo parcial se utilizarán dos técnicas:
  - a) Espectroscopia de fluorescencia a diferentes temperaturas.
  - b) Calorimetría de Valoración Isotérmica (ITC) para comparar los resultados con los obtenidos por fluorescencia.

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1 Reactivos

La NMC fue suministrada por la distribuidora *Hölzel Diagnostika Handels GmbH*. El resto de reactivos fueron adquiridos de las siguientes empresas comerciales:

- *Scharlau*: Nitrato de cobalto(II) hexahidratado, Cloruro de níquel(II) hexahidratado, Acetato de sodio trihidratado, Hidrogeno fosfato de disodio, Ácido clorhídrico (1N), Hidróxido de sodio (1N).
- *Panreac*: Cloruro de cobre(II) dihidratado.
- *Sigma-Aldrich*: Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico hidratado (MES).

#### 3.2 Procedimientos y técnicas experimentales

##### 3.2.1 – Preparación de disoluciones

###### a) Disoluciones tampón

Todos los experimentos realizados en este trabajo se llevaron a cabo en un medio tamponado. Las disoluciones tampón utilizadas, así como los pHs a los que se realizaron los experimentos, se indican a continuación:

- Tampón acetato ( $\text{CH}_3\text{COOH} / \text{CH}_3\text{COONa}$ ) 10 mM a pH 4,0; 5,0 y 5,7.
- Tampón MES ( $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_4\text{S} / \text{C}_6\text{H}_{12}\text{NNaO}_4\text{S}$ ) 10 mM a pH 6,2; 6,6 y 7,0.
- Tampón fosfato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 / \text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) 10 mM a pH 8,0.

Las disoluciones tampón se prepararon con agua milli-Q y se utilizó ácido clorhídrico o hidróxido sódico 1N para ajustar el valor de pH, el cual fue medido con un pH-metro digital *Crison* modelo Basic 20+ que presenta un electrodo de vidrio *Crison* modelo 50 29 y que fue calibrado diariamente. Las disoluciones obtenidas se filtraron a través de un filtro de membrana de nailon con un diámetro de poro de 45  $\mu\text{m}$  y se mantuvieron a 5°C hasta su utilización.

###### b) Disoluciones de NMC

Se preparó una disolución madre de NMC 5 mM en tampón acetato 10 mM y a pH 4. A partir de ésta se prepararon otras disoluciones de NMC 0,5 mM en el mismo tampón, las cuales fueron utilizadas en los experimentos de fluorescencia. Además, se preparó una disolución de NMC 60  $\mu\text{M}$  en tampón acetato 10 mM y a pH 5 para realizar los experimentos de calorimetría de valoración isoterma (ITC).

###### c) Disoluciones del catión metálico

Se pesó cierta cantidad del catión metálico, se disolvió y se llevó hasta el volumen deseado con el tampón que debía ser utilizado en el experimento. Las concentraciones fueron de 30 mM en el caso del Co(II), 20 mM para el Ni(II) y 4 mM para el Cu(II). Estas disoluciones se prepararon el mismo día o el día previo al experimento para que no hubiera problemas de precipitación o degradación por la luz. Además, se tuvo en cuenta el producto de solubilidad de cada catión metálico para evitar la formación de hidróxidos.

### 3.2.2 – Medidas de fluorescencia

En este trabajo, se aplicó la espectroscopia de fluorescencia, ya que la NMC presenta un residuo triptófano en su estructura (Trp<sup>4</sup>), cuya aromaticidad le aporta la propiedad de emitir radiación después de haber sido excitada a la longitud de onda adecuada.

La técnica se utilizó para estudiar el efecto que el pH tiene sobre el espectro de fluorescencia de la NMC y para determinar tanto las constantes de unión entre la NMC y los cationes metálicos, como los parámetros termodinámicos de la interacción entre ambos.

En todos los experimentos, se utilizó un fluorímetro modelo *Varian Cary Eclipse*, equipado con un porta-cubetas controlado con un Peltier que permitió mantener la temperatura constante.

#### 3.2.2.1 – Estudio del efecto del pH sobre el espectro de fluorescencia de la NMC

Se registraron los espectros de emisión de disoluciones tamponadas de NMC 10  $\mu\text{M}$  en el intervalo de pH comprendido entre 4 y 8. Estos espectros se recogieron en el rango de longitudes de onda de emisión comprendidas entre 290 y 500 nm, utilizando una longitud de onda de excitación de 280 nm, que corresponde al máximo de absorbancia del triptófano [Edelhoch, 1967]. Las medidas se llevaron a cabo a 25°C y con la misma sensibilidad del fluorímetro.

#### 3.2.2.2 – Estudio de la interacción entre la NMC y los cationes metálicos

La interacción de la NMC con los distintos cationes metálicos (Cu(II), Ni(II), Co(II)) se estudió mediante experimentos de fluorescencia basados en el quenching que produce la unión de éstos al deca péptido, entendiendo esto como una atenuación de la fluorescencia intrínseca de la NMC. Este método ha sido utilizado por otros autores para estudiar la interacción de cationes metálicos con proteínas que presentan el motivo ATCUN en su estructura [Bal, 2013; Plotnikova, 2016].

A continuación, se describe la metodología utilizada para cada catión metálico:

##### a) Interacción de la NMC con el Cu(II):

En el caso del Cu(II), se siguió la variación de fluorescencia de una disolución tamponada de NMC 10  $\mu\text{M}$  tras la adición de alícuotas de una disolución preparada con el catión metálico (a una concentración y un pH dados). Después de cada adición, la mezcla (contenida en una microcubeta de cuarzo) se homogeneizó y se introdujo en el fluorímetro. Durante cinco minutos se esperó a que la temperatura del aparato se estabilizara y, posteriormente, se registró el espectro de emisión entre los 290 y 500 nm, utilizando una longitud de onda de excitación de 280 nm. El proceso se repitió hasta que la intensidad de fluorescencia no se modificaba.

Estos experimentos se realizaron por triplicado y a distintos pHs (4,0; 5,0; 5,7; 6,6; 7,0) y temperaturas (25, 30, 38, 45°C). Además, para cada una de las condiciones en las que se llevaron a cabo las medidas, en lo que se refiere a pH y temperatura, se estudió el efecto de la dilución sobre la intensidad de fluorescencia de la NMC. Para ello, se llevó a cabo el proceso descrito anteriormente pero añadiendo tampón en lugar del catión metálico.

##### b) Interacción de la NMC con los cationes Ni(II) y Co(II):

En el caso del Ni(II) y el Co(II), se observó por fluorescencia que la formación del complejo era un proceso cinéticamente lento. En función de las condiciones del experimento, se necesitaron entre 10

minutos y 12 horas para alcanzar el equilibrio. Debido a ello, en vez de proceder de la forma anterior, se llevaron a cabo medidas cinéticas.

Para realizar el experimento se añadió un cierto volumen de la disolución preparada con el catión metálico a una disolución tamponada de NMC 10  $\mu\text{M}$  y se midió la intensidad de fluorescencia a 355 nm, utilizando una longitud de onda de excitación de 280 nm. La longitud de onda a la que se hizo la medida corresponde al máximo del espectro de emisión de la NMC (debido al grupo Trp).

Los experimentos con el Ni(II) se realizaron por duplicado y a diferentes pHs (5,0 – 6,6), temperaturas (15, 25 y 35°C) y concentración del catión metálico. Mientras que con el Co(II) se llevó a cabo un experimento a pH 6,6 y a 25°C, por duplicado, a distintas concentraciones del catión metálico.

### **3.2.3 Experimentos de calorimetría de valoración isoterma (ITC)**

Además de la espectroscopía de fluorescencia, se utilizó la calorimetría de valoración isoterma para determinar las constantes de unión, la estequiometría, la entalpía y la entropía correspondientes a la interacción entre la NMC y el Cu(II).

La calorimetría de valoración isoterma permite determinar varios parámetros termodinámicos a partir de un único experimento. Debido a ello, su uso es habitual en trabajos que estudian la formación de complejos proteína-ligando [Zhang, 2000; Trapaidze, 2012; Makowska, 2016].

La interacción péptido-catión metálico se estudia midiendo el calor liberado o absorbido al inyectar, en pasos sucesivos, alícuotas de una disolución del catión metálico en la disolución que contiene el péptido y que se encuentra situada en la celda de medida del calorímetro. El instrumento cuenta, además, con una celda de referencia que no participa en la valoración, de manera que la diferencia de temperatura entre esta celda y la de medida, debido al calor liberado o absorbido por la formación del complejo, se compensa automáticamente mediante un sistema de retroalimentación. De este modo, la energía eléctrica necesaria para mantener la misma temperatura en las celdas tras cada inyección se registra en forma de picos cuya integral corresponde al calor producido o absorbido a consecuencia de la interacción en estudio.

Las mediciones de ITC se realizaron en un instrumento de la marca TA, modelo nano-ITC a 25°C por duplicado. La celda de medida (190  $\mu\text{L}$ ) se llenó con una disolución tamponada de NMC 60  $\mu\text{M}$  y se agitó a 250 rpm; mientras que la disolución tamponada de Cu(II) (0,5 mM, pH 5) se introdujo en la jeringa de inyección. Ambas disoluciones fueron desgasificadas antes de su uso. Por último, la disolución de NMC fue valorada en una secuencia de 20-30 inyecciones de 1,5  $\mu\text{L}$ , fijando un tiempo de 400 s entre inyecciones sucesivas.

## **3.3. Tratamiento matemático de los resultados experimentales**

### **3.3.1 Determinación de las constantes de unión**

Como se ha avanzado anteriormente, los cationes metálicos actúan de atenuadores de la fluorescencia intrínseca de la NMC, haciendo que ésta disminuya debido a la interacción que se produce con el Trp<sup>4</sup>.

El mecanismo de quenching puede ser de dos tipos, dinámico o estático, y, en ambos casos, se requiere el contacto molecular del atenuador con el fluoróforo. En el caso del quenching dinámico, el atenuador colisiona con el fluoróforo cuando éste se encuentra en su estado excitado, lo cual hace que recupere rápidamente su estado fundamental sin la emisión de un fotón. Mientras que en el

quenching estático, la disminución de la fluorescencia se debe a la formación de un complejo que no es fluorescente [Lakowicz, 2006]. En ambos casos, el mecanismo de quenching puede describirse mediante la ecuación de Stern-Volmer (1):

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[Q] \quad (1)$$

donde  $F_0$  y  $F$  son las intensidades de fluorescencia en ausencia y presencia de quencher, respectivamente;  $K_{SV}$  es la constante de Stern-Volmer; y  $[Q]$  es la concentración de quencher.

Además de la ecuación de Stern-Volmer existe otra ecuación, conocida como ecuación de Stern-Volmer modificada (2), que deriva directamente de la primera y que aporta información de la constante de unión y de la estequiometría del complejo formado. Debido a ello, muchos estudios con péptidos y proteínas han utilizado esta segunda ecuación consiguiendo un análisis detallado de la interacción que se establece entre el péptido y el quencher [Wang, 2010; Plotnikova, 2016; Makowska, 2016].

$$\log \frac{F_0 - F}{F} = \log K_a + n \log [Q] \quad (2)$$

En este trabajo, se utilizó la ecuación de Stern-Volmer modificada para obtener tanto las constantes de unión ( $K_a$ ) entre la NMC y el Cu(II) como el número de sitios ( $n$ ) en los que el catión metálico se enlaza al decapeptido.

### 3.3.2 Ajuste de los resultados cinéticos

Los datos obtenidos de los experimentos cinéticos se analizaron con el programa DynaFit [Kuzmic, 1996], el cual permitió ajustar la variación de la intensidad de fluorescencia de la NMC en función del tiempo.

El DynaFit es un programa libre de ajuste de datos cinéticos bastante utilizado en investigación al incorporar los programas KINSIM [Barshop, 1983] (utilizado para hacer simulaciones) y FITSIM [Zimmerle, 1989] (usado para hacer ajustes por mínimos cuadrados). Este programa puede hacer ajustes de datos aportados de los compuestos que aparecen en el mecanismo y puede tratar como parámetros ajustables tanto la concentración de las especies químicas como ciertas propiedades físicas, tales como la absorción o la fluorescencia de una disolución.

Para realizar los ajustes con el DynaFit se deben crear dos archivos de entrada. El primer archivo contiene el tipo de experimento (que en este caso corresponde a un progreso de reacción, donde una mezcla de reactivos se sigue a lo largo del tiempo), la descripción del mecanismo, la estimación inicial de los valores de los parámetros de ajuste y la localización de los ficheros de datos (Figura 5). El segundo archivo contiene los datos experimentales separados en columnas y con la variable tiempo expresada en segundos, ya que el programa asume estas unidades por defecto.

Una vez preparados los archivos con los que el programa trabaja, la ejecución del mismo inició el análisis de las desviaciones entre los datos calculados en base al esquema propuesto y los datos experimentales. La regresión por mínimos cuadrados se llevó a cabo utilizando el algoritmo de Levenberg-Marquardt, propuesto por Reich [Reich, 1992], y el error estándar de los parámetros mediante raíces cuadradas de los elementos diagonales de la matriz varianza-covarianza.

```

[task]
  task = fit
  data = progress

[mechanism]
  P + L ---> PL : k1
  PL ---> P + L : k2

[constants]
  k1 = 100 ?
  k2 = 1 ?

[concentrations]
  P = 9.66e-6
  L = 1.40e-4

[responses]
  P = 8.2e7 ?
  PL = 2.7e4 ?

[data]
  file C:\DynaFit\Ni-15°C\Datos-Ni1.txt

[output]
  directory C:\DynaFit\Ni-15°C\output-Ni1

[end]

```

**Figura 5.** Fichero de entrada del programa DynaFit donde aparecen los siguientes apartados: a) *task*, que indica el tipo de ajuste realizado; b) *mechanism*, donde se especifica el mecanismo de reacción al que se han ajustado los datos experimentales; c) *constants*, donde se estima el valor inicial de cada constante; d) *concentrations*, donde se incluye la concentración inicial de cada compuesto; e) *responses*, donde se indica el valor aproximado de la señal observable en relación a la concentración inicial indicada; f) *data*, donde se define dónde se encuentra el archivo con los datos experimentales; g) *output*, donde se especifica el destino del archivo de salida con los valores de los parámetros ajustados.

### 3.3.3 Obtención de los parámetros termodinámicos

A partir de los experimentos de fluorescencia realizados con el Cu(II) y el Ni(II) a diferentes temperaturas pudieron determinarse los parámetros termodinámicos de la interacción con la NMC, utilizando la ecuación de van't Hoff (3) [Wang, 2008].

$$\ln K = -\frac{\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R} \quad (3)$$

En esta ecuación, K es la constante de unión, R es la constante de los gases ideales, T es la temperatura,  $\Delta H^0$  corresponde al incremento de entalpía y  $\Delta S^0$ , al de entropía.

### 3.3.4 Tratamiento de los datos obtenidos a partir de los experimentos de ITC

Los datos de calor liberado por unidad de tiempo ( $\mu\text{J/s}$ ) se integraron para obtener el cambio de entalpía en cada valoración. Para ello se utilizó el software de NanoAnalyze. Posteriormente, aplicando la ecuación (4) se determinó la constante de disociación de la interacción entre la NMC y el catión metálico [Huang, 2016].

$$Q = \frac{(1 + [M]nK_d + K_d[L_T]) - \left[ (1 + [M]nK_d + K_d[L_T])^2 - 4[M]nK_d^2[L_T] \right]^{\frac{1}{2}}}{\frac{2K_d}{V \cdot \Delta H}} \quad (4)$$

En esta ecuación V es el volumen de la celda del calorímetro,  $\Delta H$  es la entalpía,  $K_d$  es la constante de equilibrio de disociación,  $[L_T]$  es la concentración total de ligando y  $[M]$ , la de proteína.

La energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) se calculó a partir de la constante de unión determinada, de acuerdo a la ecuación (5), y la variación de entropía ( $\Delta S$ ), mediante la ecuación (6).

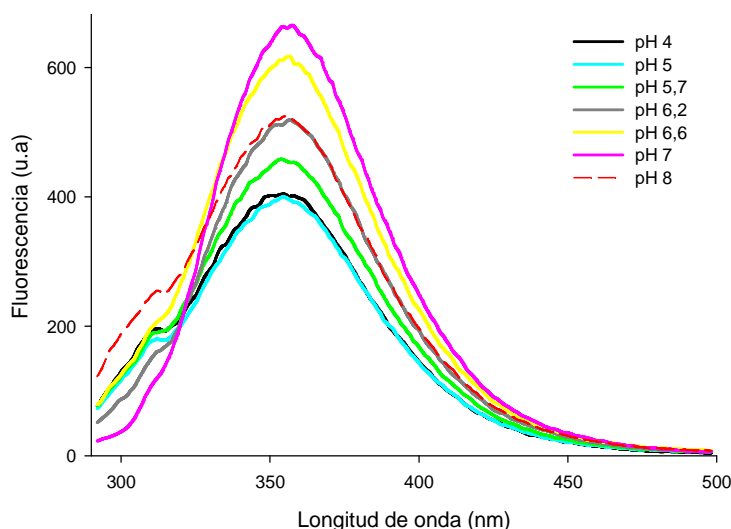
$$\Delta G = -R \cdot T \cdot \ln K \quad (5)$$

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S \quad (6)$$

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Dependencia del espectro de fluorescencia de la NMC con el pH

En la Figura 6 se muestra el espectro de fluorescencia de la NMC obtenido en el intervalo de pH comprendido entre 4 y 8. En ella se puede observar como la intensidad de fluorescencia aumenta con el pH, excepto a pH 8, donde la señal fue mucho más baja de lo esperado. Está descrito que la NMC disminuye su solubilidad a pHs ligeramente básicos, pudiendo ser esta la razón por la que se obtuvo una menor intensidad de fluorescencia a pH 8. En consecuencia, este valor de pH quedó descartado a la hora de llevar a cabo los experimentos para determinar la interacción entre el decapeptido y los cationes metálicos.

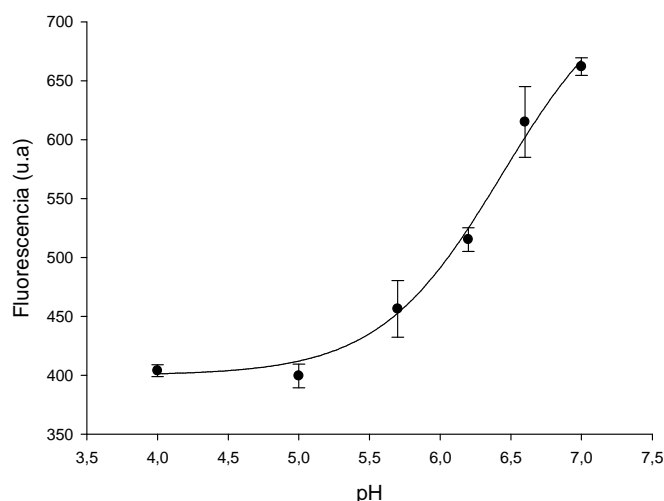


**Figura 6.** Espectros de fluorescencia de la NMC registrados a una misma concentración del decapeptido (10 $\mu$ M) y a distintos valores de pH, manteniendo una temperatura de 25°C.

Con el objetivo de analizar la dependencia de la intensidad de fluorescencia con el estado de protonación de la NMC se representó la intensidad obtenida a 355 nm frente al pH (Figura 7). Los datos experimentales se ajustaron a la ecuación (7) que tiene en cuenta un único estado de protonación del péptido.

$$I = \frac{I_{max.}}{1 + 10^{pK_a - pH}} + I_0 \quad (7)$$

En esta ecuación  $I$  es la intensidad de fluorescencia a cada valor de pH,  $I_0$  es la intensidad de fluorescencia inicial,  $I_{max}$  es la fluorescencia máxima alcanzada cuando las moléculas del péptido están desprotonadas (siempre que  $I_0$  sea igual a cero),  $pK_a$  hace referencia al logaritmo negativo de la constante de ionización y pH es la acidez o basicidad de la disolución en estudio.



**Figura 7.** Representación de la intensidad de fluorescencia a 355 nm de disoluciones 10  $\mu$ M en NMC en función del pH.

A partir de este ajuste, se determinó un valor de  $pK_a$  igual a  $6,43 \pm 0,08$ , el cual podría corresponder al  $pK_a$  del grupo imidazol del residuo His<sup>3</sup> presente en la estructura de la NMC, ya que es conocido que el grupo presenta un valor de  $pK_a$  en torno a 6,5 en las proteínas [Thurlkill, 2006]. Este hecho indica que el estado de protonación del residuo His<sup>3</sup> afecta a la fluorescencia del Trp<sup>4</sup>, aumentando su intensidad cuando el grupo imidazol está desprotonado. De acuerdo con esto y teniendo en cuenta que la His<sup>3</sup> forma parte del motivo de unión con los cationes metálicos (motivo ATCUN), el pH es un factor a tener en cuenta a la hora de estudiar la formación de complejos entre la NMC y los cationes metálicos.

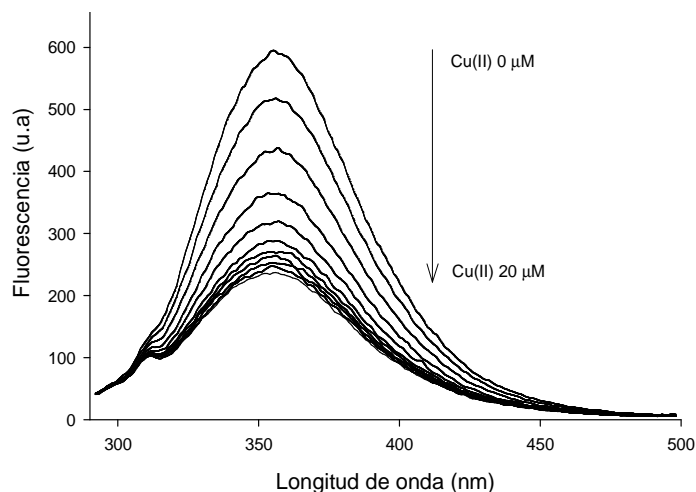
## 4.2 Estudio de la interacción entre la NMC y el Cu(II)

En la Figura 8 se muestra el espectro de fluorescencia de la NMC registrado a distintas concentraciones de Cu(II), a pH 5 y a 25°C. A partir de estos espectros se ha representado la intensidad de fluorescencia obtenida a 355 nm en función de la concentración del catión metálico (Figura 9). En ambas figuras se puede ver como la intensidad de fluorescencia disminuye a medida que la concentración de Cu(II) aumenta. Este hecho indica, por tanto, que el Cu(II) es capaz de atenuar la fluorescencia intrínseca de la NMC, lo que implica la formación de un complejo entre el péptido y el catión metálico. Además, el proceso se produce de forma inmediata.

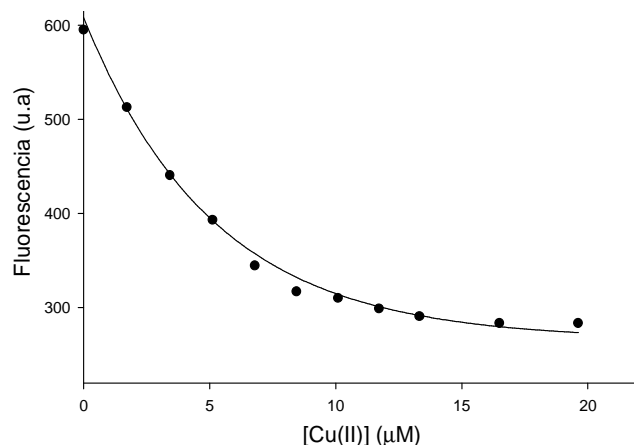
Gasmi y col. analizaron la formación de complejos con la NMC por RMN e indicaron que cuando se forma un complejo el Trp<sup>4</sup> queda situado muy próximo al catión y que el cambio conformacional que provoca la unión del catión metálico al decapeptido, desde una estructura desordenada hasta una hélice  $\alpha$ , hace que la His<sup>8</sup> quede en la disposición adecuada para interactuar con el Trp<sup>4</sup> [Gasmi, 1997]. Yorita y col. comprobaron, además, que entre el catión metálico y el Trp<sup>4</sup> se establece una interacción de tipo catión-pi [Yorita, 2008]. De acuerdo con esto, la atenuación de la fluorescencia observada en este trabajo se puede deber tanto a la interacción del catión metálico con el Trp<sup>4</sup> como a la interacción intramolecular entre la His<sup>8</sup> y el Trp<sup>4</sup>.

Por otro lado, en la Figura 8 puede observarse como la longitud de onda máxima de los espectros se mantiene a 355 nm, independientemente de la concentración de catión metálico presente en el medio. Teniendo en cuenta que la fluorescencia observada proviene de las moléculas de NMC que no han formado el complejo, el hecho de que la longitud de onda máxima se mantenga constante indica que el entorno del Trp<sup>4</sup> en estas moléculas no se ve modificado.





**Figura 8.** Espectro de emisión de fluorescencia de una disolución 10 $\mu$ M en NMC a distinta concentración de Cu(II), a pH 5 y 25°C.

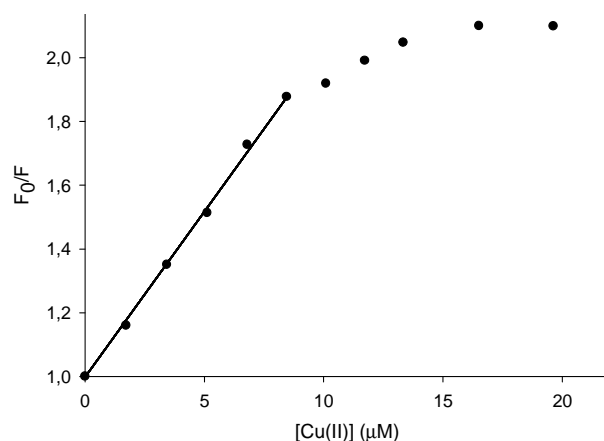


**Figura 9.** Intensidad de fluorescencia a 355nm de una disolución 10 $\mu$ M de NMC en función de la concentración de Cu(II), a pH 5 y 25°C.

En la Figura 10 se muestra el ajuste de los datos de fluorescencia de la NMC a distintas concentraciones de Cu(II) de acuerdo a la ecuación de Stern-Volmer (1). En ella se puede observar que la dependencia entre la fluorescencia y la concentración de Cu(II) es lineal hasta una concentración de Cu(II) igual a 9  $\mu$ M, donde se llega a la saturación del péptido. Este hecho demuestra que entre el Trp<sup>4</sup> y el catión metálico se produce un solo tipo de quenching, que en este caso es estático por la formación del complejo. Si en los experimentos hubieran tenido lugar los dos tipos de quenching, el ajuste hubiera mostrado una curva ascendente debido a la dependencia de la fluorescencia con el cuadrado de la concentración de quencher, tal y como indica la ecuación (8) [Fraiji, 1992].

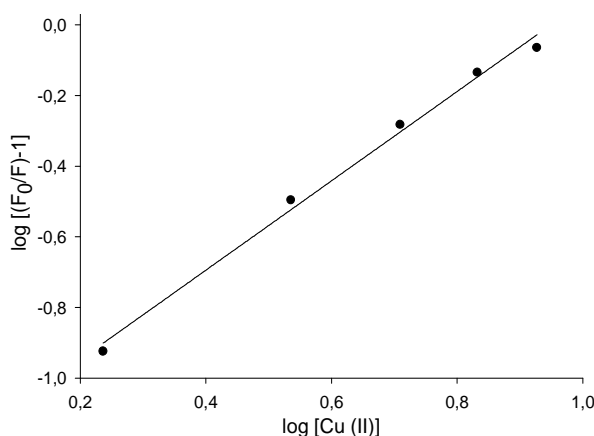
$$\frac{F_0}{F} = (1 + K_{SV}[Q]) \cdot (1 + K_a[Q]) \quad (8)$$

En esta ecuación  $F_0$  y  $F$  son las intensidades de fluorescencia en ausencia y presencia de quencher, respectivamente;  $K_{sv}$  es la constante de Stern-Volmer;  $[Q]$  es la concentración de quencher y  $K_a$  es la constante de unión o constante de equilibrio de formación del complejo.



**Figura 10.** Ajuste de los datos obtenidos de la adición de alícuotas de Cu(II) a una disolución de NMC 10µM, a pH 5 y 25°C, de acuerdo a la ecuación de Stern-Volmer.

En la Figura 11 se muestra el ajuste de los datos obtenidos a la ecuación de Stern-Volmer modificada (2). Con este ajuste se ha obtenido una recta de la que han podido obtenerse tanto la constante de unión entre el péptido y el catión metálico, como el número de sitios de unión entre ambos. Estos valores se indican en la Tabla 2 y serán discutidos en el siguiente apartado.



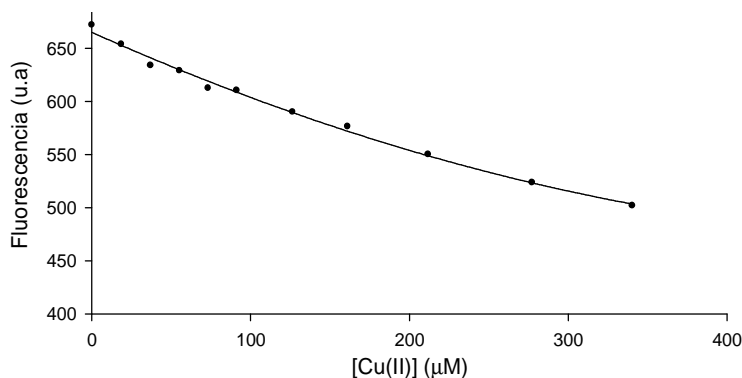
**Figura 11.** Ajuste de los datos obtenidos de la adición de alícuotas de Cu(II) a una disolución de NMC 10µM, a pH 5 y 25°C, de acuerdo a la ecuación de Stern-Volmer modificada.

#### 4.2.1 Efecto del pH en la formación del complejo

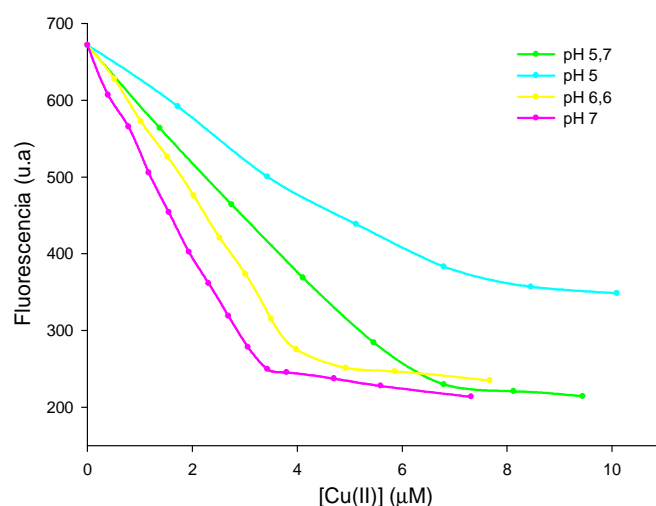
Analizando los datos obtenidos de los experimentos realizados a distintos pHs, manteniendo una temperatura de 25°C, se ha podido comprobar que la formación del complejo entre la NMC y el Cu(II) depende notablemente de este factor, tal y como habían afirmado otros estudios [Harford, 1995].

En las Figuras 12 y 13 se ha representado la intensidad de fluorescencia a 355nm de la NMC a distintas concentraciones de Cu(II) en el intervalo de pH estudiado (4,0 – 7,0). En ellas puede observarse como a medida que el pH aumenta, desde 4,0 a 5,7, la cantidad total de complejo que se forma también lo hace, lo cual se ve reflejado en la menor intensidad de fluorescencia que queda tras alcanzar la zona de saturación, teniendo en cuenta que esta fluorescencia residual equivale a la cantidad de NMC que no se ha enlazado al catión metálico y que, por tanto, no sufre el efecto de quenching sobre el fluoróforo. A partir de estas figuras puede observarse, además, que la concentración de Cu(II) necesaria para llegar a la saturación disminuye con el aumento de pH, reflejando que cuanto mayor es la basicidad del medio, más facilidad tiene el catión metálico para enlazarse al decapeptido. Este hecho es lógico si se tiene en cuenta que los nitrógenos que forman

parte del motivo de unión que presenta la NMC (motivo ATCUN) deben estar desprotonados para que tenga lugar la formación del complejo.



**Figura 12.** Variación de la intensidad de fluorescencia de una disolución 10μM de NMC en función de la cantidad de Cu(II) añadida, a pH 4 y 25°C.



**Figura 13.** Variación de la intensidad de fluorescencia de disoluciones 10μM de NMC en función de la cantidad de Cu(II) añadida para un rango de pH comprendido entre 5 y 7 y una temperatura de 25°C.

Los datos obtenidos en los experimentos a distintos pHs se ajustaron a la ecuación de Stern-Volmer (1) y a la ecuación de Stern-Volmer modificada (2). A partir de estos ajustes se han podido determinar las constantes de Stern-Volmer, las constantes de unión y el número de sitios por los que el Cu(II) se enlaza al decapeptido, los cuales se indican en la Tabla 2. A partir de estos valores, se ha podido comprobar que el quenching que sufre el Trp<sup>4</sup> por la formación del complejo aumenta con el pH y que la cantidad de complejo que se forma también lo hace, viendo como el valor de  $K_{SV}$  y  $K_a$  aumenta con la basicidad del medio. Además, el número de sitios de unión entre la NMC y el Cu(II) se mantiene próximo a uno, coincidiendo con la estequiometría determinada por Gasmí y col. en sus estudios de RMN [Gasmí, 1997].

**Tabla 2.** Constantes de Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ), constantes de unión ( $K_a$ ) y sitios de unión ( $n$ ) para la formación del complejo entre la NMC y el Cu(II) a distintos pHs y a 25°C.

pH	$K_{SV}$ ( $M^{-1}$ )	$K_a$ ( $M^{-1}$ )	$R^2$ ( $K_a$ )	$n$
4,0	$(7,03 \pm 0,22) \cdot 10^2$	$(2,05 \pm 0,16) \cdot 10^2$	0,988	$0,84 \pm 0,17$
5,0	$(1,11 \pm 0,09) \cdot 10^5$	$(6,99 \pm 0,76) \cdot 10^4$	0,990	$1,26 \pm 0,01$
5,7	$(2,49 \pm 0,18) \cdot 10^5$	$(1,25 \pm 0,10) \cdot 10^5$	0,983	$1,34 \pm 0,02$
6,6	$(3,14 \pm 0,19) \cdot 10^5$	$(2,37 \pm 0,06) \cdot 10^5$	0,980	$1,37 \pm 0,14$
7,0	$(3,25 \pm 0,46) \cdot 10^5$	$(2,70 \pm 0,20) \cdot 10^5$	0,992	$1,17 \pm 0,12$

Estudios realizados por otros autores en los que se analizó la interacción de proteínas que contienen el motivo ATCUN en su estructura con el Cu(II) indican valores de  $K_a$  en el intervalo  $10^7$ - $10^{11}$   $M^{-1}$  a pH fisiológico ( $K_a$  de la histatina-5 es  $3 \cdot 10^7$   $M^{-1}$  [Gusman, 2001]; para la hepcidina,  $5 \cdot 10^7$   $M^{-1}$  [Kulprachakarn, 2015] y para la albúmina bovina y humana,  $10^{11}$   $M^{-1}$  [Masouka, 1994]). Comparando estos valores con los obtenidos para la NMC, se puede observar como la constante de unión entre los cationes metálicos y el decapeptido es dos órdenes de magnitud inferior al obtenido para la histatina-5 y la hepcidina, y 6 órdenes de magnitud inferior al obtenido para la albúmina. Estos resultados indican que la constante de unión depende de la conformación estructural o del entorno proteico cercano al motivo ATCUN que alteran la unión del catión metálico. En relación a esto, algunos estudios han demostrado que la basicidad de la amina N-terminal es un factor clave en la estabilidad del complejo formado [Miyamoto, 2013].

En la Figura 14 se muestra el ajuste de las constantes de unión obtenidas a distintos pHs a la ecuación (7) indicada en el apartado 4.1. A partir de este ajuste se ha determinado un valor de  $pK_a$  igual a  $5,70 \pm 0,12$ . Este valor es similar al determinado en el apartado 4.1 ( $pK_a = 6,43 \pm 0,08$ ), el cual se ha asignado a la His<sup>3</sup> de la NMC.

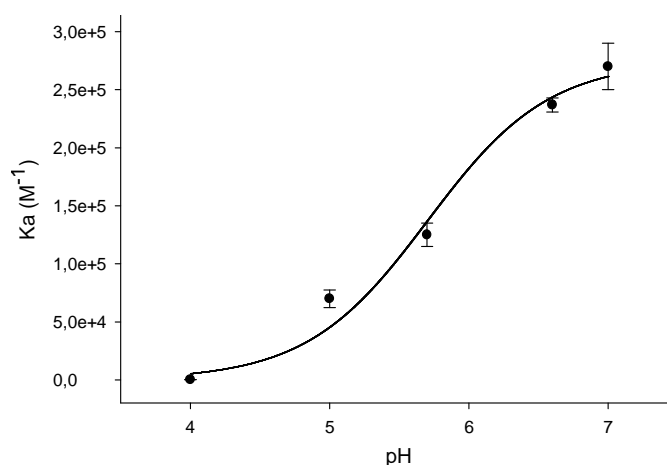


Figura 14. Ajuste de las constantes de unión del complejo entre la NMC y el Cu(II) a distintos pHs, según la ecuación (7).

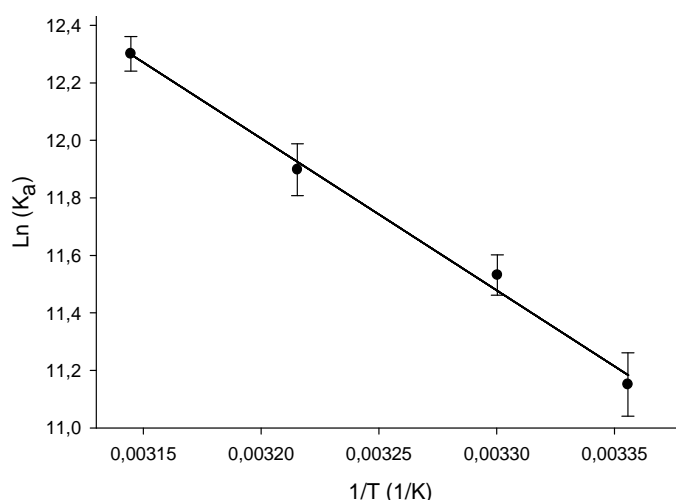
#### 4.2.2 Efecto de la temperatura en la formación del complejo

En la Tabla 3 se indica el valor de la constante de Stern-Volmer, la constante de unión y el número de sitios de unión entre la NMC y el Cu(II) a distintas temperaturas, manteniendo un valor de pH igual a 5. Estos valores se han obtenido del ajuste de los datos experimentales a la ecuación de Stern-Volmer (1) y a la ecuación de Stern-Volmer modificada (2). A partir de estos datos se ha podido determinar que la formación del complejo entre la NMC y el catión metálico también depende de la temperatura, viendo como la constante de unión aumenta con el incremento de la misma. Además, el número de sitios de unión se mantiene próximo a uno, coincidiendo una vez más con la estequiometría propuesta por Gasmi y col. [Gasmi, 1997].

Tabla 3. Constantes de Stern-Volmer ( $K_{sv}$ ), constantes de unión ( $K_a$ ) y sitios de unión ( $n$ ) para la formación del complejo entre la NMC y el Cu(II) en función de la temperatura, a pH 5.

Temperatura ( $^{\circ}C$ )	$K_{sv}$ ( $M^{-1}$ )	$K_a$ ( $M^{-1}$ )	$R^2$ ( $K_a$ )	$n$
25	$(1,11 \pm 0,09) \cdot 10^5$	$(6,99 \pm 0,76) \cdot 10^4$	0,990	$1,26 \pm 0,01$
30	$(1,15 \pm 0,03) \cdot 10^5$	$(1,02 \pm 0,07) \cdot 10^5$	0,990	$1,05 \pm 0,03$
38	$(2,12 \pm 0,15) \cdot 10^5$	$(1,47 \pm 0,21) \cdot 10^5$	0,989	$1,35 \pm 0,10$
45	$(2,90 \pm 0,09) \cdot 10^5$	$(2,20 \pm 0,10) \cdot 10^5$	0,991	$1,27 \pm 0,14$

En la Figura 15 se muestra el ajuste de las constantes de unión entre la NMC y el Cu(II) de acuerdo a la ecuación de van't Hoff (3). A partir de este ajuste se han podido determinar los parámetros termodinámicos de la interacción estudiada, los cuales se indican en la Tabla 4. Según estos datos, el proceso de formación del complejo entre el péptido y el catión metálico es espontáneo, lo cual se ve reflejado en el valor de energía libre de Gibbs negativo, y es endotérmico, obteniendo un valor de entalpía positivo, hecho que puede deberse a que se necesita más energía para desolvatar al catión metálico que la que se desprende de la interacción del mismo con los nitrógenos del motivo ATCUN. Por otro lado, se ha determinado que el proceso está impulsado por el aumento de la entropía. Este efecto entrópico se debe a la liberación de las moléculas de agua que formaban el acuo-complejo con el Cu(II) y al desplazamiento de los protones desde el decapeptido a la disolución a consecuencia de la formación del complejo [Trapaidze, 2012]. De esta forma, el número de partículas libres en disolución aumenta y la entropía del sistema también lo hace.



**Figura 15.** Ajuste de las constantes de unión del complejo entre la NMC y el Cu(II) de acuerdo a la ecuación de van't Hoff.

**Tabla 4.** Parámetros termodinámicos de la interacción entre la NMC y el Cu(II) a pH 5 determinados por fluorescencia e ITC.

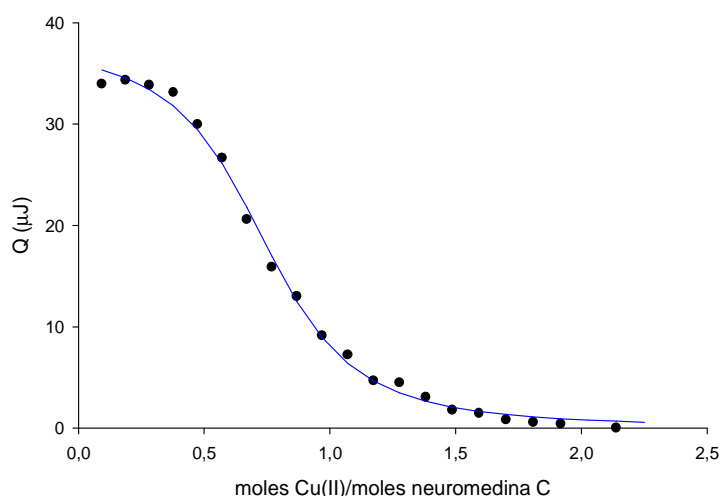
Técnica	$\Delta H$ (kJ/mol)	$\Delta G$ (kJ/mol) (25°C)	$\Delta S$ (J/K·mol)
Fluorescencia	$43,9 \pm 2,5$	$-27,7 \pm 3,4$	$240 \pm 8$
ITC	$48,7 \pm 0,8$	$-31,9 \pm 0,9$	$270 \pm 2$

Estudios realizados por Trapaidze y col. han demostrado que para el péptido DAHK, formado por los residuos Asp-Ala-His-Lys, que corresponden a la secuencia del extremo N-terminal de la albúmina sérica humana, los parámetros termodinámicos para la formación del complejo con el Cu(II) son: 11,3 kJ/mol para la entalpía, 301,3 J/K·mol para la entropía y -79,5 kJ/mol para la energía libre de Gibbs [Trapaidze, 2012]. Comparando estos parámetros con los determinados para la NMC se puede ver como los signos coinciden en ambos péptidos y las diferencias en el valor se deben a los diferentes residuos que forman el motivo ATCUN.

#### 4.2.3 Constante de equilibrio de formación del complejo y parámetros termodinámicos determinados mediante ITC

En la Figura 16 se muestra el ajuste de los datos obtenidos de un experimento de ITC realizado con la NMC y el Cu(II) a pH 5 y 25°C. A partir de este ajuste se ha podido determinar la constante de unión, la estequiometría, la entalpía y la entropía de la interacción entre el decapeptido y el catión metálico.

Los parámetros termodinámicos determinados se indican en la Tabla 4. De acuerdo a estos valores, el proceso para la formación del complejo es espontáneo ( $\Delta G < 0$ ), supone un aumento del desorden del sistema ( $\Delta S > 0$ ) y es endotérmico ( $\Delta H > 0$ ), tal y como se ha determinado aplicando la espectroscopia de fluorescencia. Además, los valores de los parámetros termodinámicos obtenidos mediante ITC son similares a los obtenidos por fluorescencia, los cuales también se indican en la Tabla 4. Por otro lado, el valor obtenido mediante ITC para la estequiometría del complejo ( $n$ ) es  $0,71 \pm 0,04$  y para la constante de unión ( $K_a$ ),  $(3,95 \pm 0,32) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ . Como se puede observar, el número de sitios de unión entre la NMC y el Cu(II) se mantiene próximo a uno, tal y como se ha determinado anteriormente. En cuanto al valor de la constante de unión, hay que decir que mediante ITC se ha obtenido un valor mayor que por fluorescencia. Aun así, el valor de la constante determinada por ITC sigue siendo menor que las publicadas por otros autores para la histatina-5, la hepcidina y las albúminas bovina y humana, cuyas constantes son del orden de  $10^7$ - $10^{11} \text{ M}^{-1}$  [Grogan, 2001; Masouka, 1994; Kulprachakarn, 2015].



**Figura 16.** Ajuste de los datos obtenidos mediante ITC para estudiar la interacción entre la NMC y el Cu(II) a pH 5.

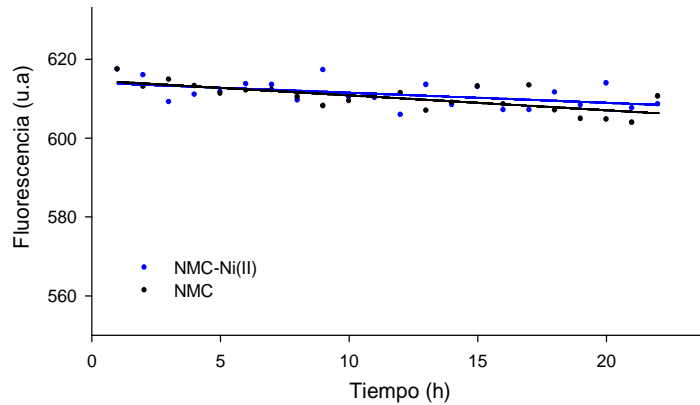
### 4.3 Estudio de la interacción entre la NMC y el Ni(II)

#### 4.3.1 Efecto del pH en la formación del complejo

Para estudiar la interacción entre la NMC y el Ni(II) se registró el espectro de fluorescencia en función del tiempo de incubación de los reactivos, después de comprobar que la formación del complejo era un proceso demasiado lento como para proceder de la forma en que se habían llevado a cabo los experimentos con el Cu(II). Estos resultados coinciden con lo observado por otros autores, los cuales afirman que la cinética de formación del complejo entre el decapeptido y el Ni(II) es lenta [Gasmi, 1997].

Partiendo de los resultados obtenidos para la formación del complejo entre la NMC y el Cu(II), en los que se determinó que a pH 4 la cantidad de complejo que se forma es mínima, se decidió empezar el estudio a pH 5, valor en el que se habían empezado a ver cambios notables en el espectro de fluorescencia de la NMC al añadir el Cu(II).

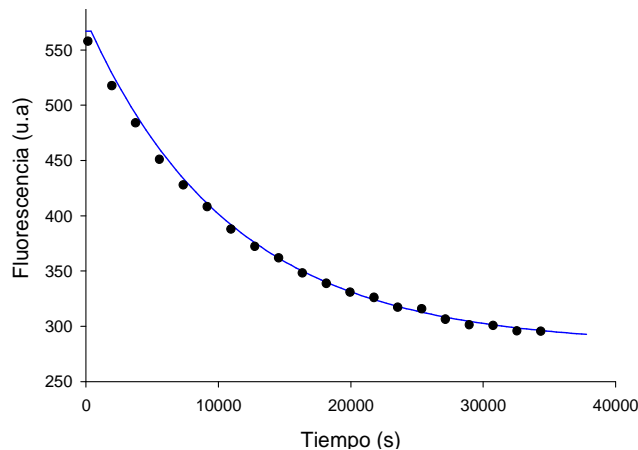
En la Figura 17 se muestra la variación de fluorescencia de dos disoluciones de NMC, en presencia y ausencia de Ni(II), durante 24 horas, a pH 5 y 25°C. En ambos casos, puede observarse una pequeña disminución de la señal, la cual no corresponde a la formación del complejo, ya que si así fuera, la intensidad de fluorescencia de la muestra que no contenía Ni(II) no hubiera disminuido.



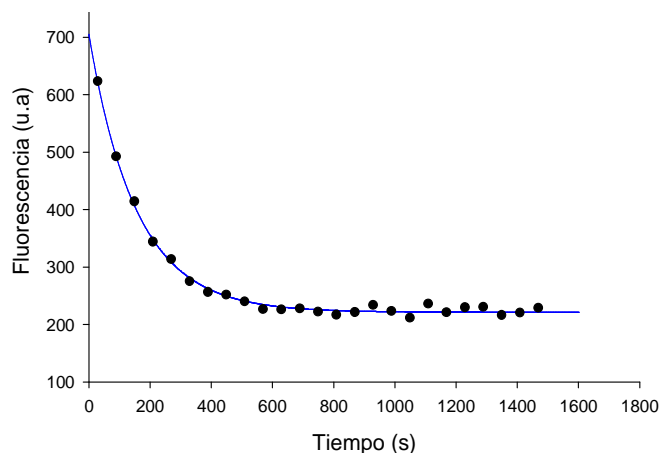
**Figura 17.** Variación de la intensidad de fluorescencia de la NMC en presencia y ausencia de Ni(II), a pH 5 y 25°C.

De acuerdo a los resultados obtenidos se decidió realizar experimentos a pHs mayores para comprobar si de esta manera la formación del complejo entre la NMC y el Ni(II) tenía lugar, ya que con el Cu(II) se había visto que cuanto mayor es el pH, más favorable es la formación del complejo.

En las Figura 18 y 19 se muestra el ajuste de los datos obtenidos en dos experimentos realizados a pH 5,7 y 6,6 y a una temperatura de 25°C. En ellas se puede observar una disminución de la intensidad de fluorescencia con el tiempo de reacción, lo que sugiere la formación de un complejo entre el deca péptido y el Ni(II). Además, se ha podido comprobar que la formación del complejo depende del pH, ya que el equilibrio se alcanza a diferentes tiempos de reacción, dependiendo del pH del medio (manteniendo la misma concentración de Ni(II) y NMC en ambos casos).



**Figura 18.** Ajuste de los datos cinéticos de una mezcla 10µM en NMC y 0,14 mM en Ni(II), a pH 5,7 y a 25°C.



**Figura 19.** Ajuste de los datos cinéticos de una mezcla 10µM en NMC y 0,14 mM en Ni(II), a pH 6,6 y a 25°C.

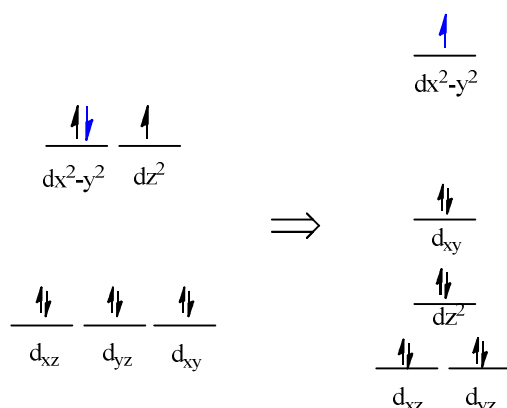
En la Tabla 5 se muestran las constantes cinéticas y de unión de los experimentos después de analizar los datos con el programa DynaFit. A partir de estos datos, se comprueba que el valor de la constante de unión aumenta con la basicidad del medio, favoreciendo la formación del complejo entre la NMC y el Ni(II).

**Tabla 5.** Constantes cinéticas y de unión de la formación del complejo entre la NMC y el Ni(II) a distintos pHs y a 25°C.

pH	$k_1$ (L/mol·s)	$k_{-1}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_a = k_1/k_{-1}$ (M <sup>-1</sup> )
5,7	0,336 ± 0,004	(4,16 ± 0,09)·10 <sup>-5</sup>	(8,08 ± 0,20)·10 <sup>3</sup>
	0,347 ± 0,002	(5,49 ± 0,06)·10 <sup>-5</sup>	(6,31 ± 0,08)·10 <sup>3</sup>
6,6	40,6 ± 0,8	(8,25 ± 0,31)·10 <sup>-4</sup>	(4,92 ± 0,21)·10 <sup>4</sup>
	42,1 ± 0,7	(8,70 ± 0,26)·10 <sup>-4</sup>	(4,84 ± 0,17)·10 <sup>4</sup>

Comparando los resultados obtenidos en este trabajo para la interacción de la NMC con el Cu(II) y el Ni(II) se pueden destacar varios hechos. Por un lado, se ha demostrado que para que la formación del complejo entre el Ni(II) y el péptido tenga lugar se necesita un pH mayor que con el Cu(II), viendo como el Ni(II) atenúa la fluorescencia de la NMC a partir de pH 5,7, mientras que el Cu(II) lo hace a partir de pH 4. Este hecho se debe a que el Ni(II) presenta un carácter como ácido de Lewis menor que el Cu(II), teniendo en cuenta que, para una misma carga, el tamaño del Ni(II) es mayor que el del Cu(II). Esta propiedad hace que el Ni(II) tenga menor afinidad por los nitrógenos dadores del motivo ATCUN y, por tanto, su capacidad para desplazar los protones de los nitrógenos mencionados es menor que la del Cu(II), necesitando una mayor basicidad del medio para formar el complejo [Zhang, 2002].

Por otro lado, la formación del complejo entre el Ni(II) y la NMC es un proceso cinéticamente lento; mientras que con el Cu(II) ocurre de forma inmediata. La razón de este hecho es que el Ni(II), con ocho electrones en sus orbitales d, sufre una reorganización de su distribución electrónica debido al cambio geométrico que implica pasar desde un complejo octaédrico en disolución acuosa (de alto espín y paramagnético) a un complejo plano cuadrado con la NMC (de bajo espín y diamagnético), lo cual necesita un cierto tiempo para llevarse a cabo [Kozlowski, 1999]. Mientras que en el caso del Cu(II), con nueve electrones en sus orbitales d, no tiene lugar un proceso adicional de apareamiento de espín (Figura 20). Además, el complejo de Cu(II) octaédrico en disolución acuosa sufre una distorsión de la geometría, conocida como distorsión de Jahn-Teller, que hace que los ligandos situados en el plano ecuatorial estén más próximos al catión metálico que los que se encuentran en axial [Helm, 2005]. Este hecho hace que los ligandos axiales se unan débilmente al catión y, por tanto, sean fácilmente intercambiables, contribuyendo a la facilidad que presenta el Cu(II) para formar el complejo con la NMC.



**Figura 20.** Distribución electrónica de los complejos formados por el Cu(II) y el Ni(II). A la izquierda se muestra la disposición de los orbitales cuando el complejo es octaédrico y a la derecha cuando es plano cuadrado. El electrón adicional del Cu(II), respecto al Ni(II), se indica en color azul.



Por último, hay que destacar que la estabilidad de los complejos formados con la NMC es distinta cuando el catión metálico es el Cu(II) o el Ni(II). Por ejemplo, la constante de unión obtenida para el Ni(II) a pH 6,6 y 25°C tiene un valor de  $4,8 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ ; mientras que la del Cu(II), a ese mismo pH y temperatura, es de  $2,4 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ . Esta diferencia, además de estar promovida por la distinta afinidad que presentan los cationes metálicos por los nitrógenos del motivo ATCUN, como se ha mencionado anteriormente, se debe a que el Cu(II) adquiere una estabilidad adicional cuando forma el complejo plano cuadrado con la NMC, ya que la distribución energética de sus orbitales d en esta geometría hace que el electrón desapareado se encuentre en un orbital no degenerado en energía, suponiendo un estado electrónico muy estable para el catión metálico.

Estudios realizados por otros autores han demostrado que la estabilidad del complejo entre el Ni(II) y las albúminas bovina y humana, que presentan el motivo ATCUN, también es menor que la del Cu(II). Concretamente, la constante de unión para el complejo formado entre las albúminas y el Cu(II) a pH fisiológico es del orden de  $10^{11} \text{ M}^{-1}$  [Masouka, 1994] y con Ni(II),  $10^7 \text{ M}^{-1}$  [Sokolowska, 2002].

### 4.3.2 Efecto de la temperatura en la formación del complejo

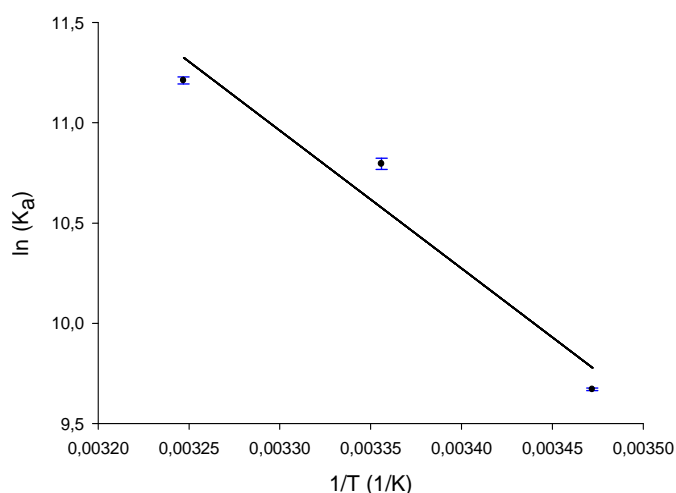
Además de estudiar el efecto del pH sobre la formación del complejo entre la NMC y el Ni(II), se llevaron a cabo experimentos a distintas temperaturas para determinar tanto las constantes de unión como los parámetros termodinámicos de la interacción. Estos experimentos se realizaron a pH 6,6 debido a que el tiempo requerido para que se forme el complejo es menor que a pHs más bajos, como se ha visto en el anterior apartado.

En la Tabla 6 se muestran las constantes cinéticas y de unión obtenidas del ajuste de los datos de los experimentos realizados a diferentes temperaturas. En esta tabla se puede observar que el valor de las constantes de unión determinadas se incrementa con la temperatura, al igual que ocurría con el Cu(II). Además, se debe destacar que los valores obtenidos para las constantes de unión entre la NMC y el Ni(II) continúan siendo más bajos que con el Cu(II).

**Tabla 6.** Constantes cinéticas y constantes de unión de la interacción entre el Ni(II) y la NMC a distintas temperaturas, manteniendo un pH de 6,6.

Temperatura (°C)	$k_1$ (L/mol·s)	$k_{-1}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_a = k_1/k_{-1}$ (M <sup>-1</sup> )
15	$13,8 \pm 0,1$	$(8,81 \pm 0,09) \cdot 10^{-4}$	$(1,56 \pm 0,02) \cdot 10^4$
	$14,8 \pm 0,1$	$(9,20 \pm 0,09) \cdot 10^{-4}$	$(1,61 \pm 0,02) \cdot 10^4$
25	$40,6 \pm 0,8$	$(8,25 \pm 0,31) \cdot 10^{-4}$	$(4,92 \pm 0,21) \cdot 10^4$
	$42,1 \pm 0,7$	$(8,70 \pm 0,26) \cdot 10^{-4}$	$(4,84 \pm 0,17) \cdot 10^4$
35	$58,3 \pm 0,4$	$(7,89 \pm 0,11) \cdot 10^{-4}$	$(7,38 \pm 0,12) \cdot 10^4$
	$60,4 \pm 0,6$	$(8,14 \pm 0,23) \cdot 10^{-4}$	$(7,42 \pm 0,22) \cdot 10^4$

En la Figura 21 se han ajustado los valores de las constantes obtenidas a la ecuación de van't Hoff (3). A partir de este ajuste se han determinado los parámetros termodinámicos indicados en la Tabla 7. Con estos datos, se puede afirmar que la formación del complejo entre el Ni(II) y la NMC es un proceso espontáneo ( $\Delta G < 0$ ), endotérmico ( $\Delta H > 0$ ) y conducido por un aumento de la entropía ( $\Delta S > 0$ ), tal y como se ha determinado para la formación del complejo entre el Cu(II) y el deca péptido.



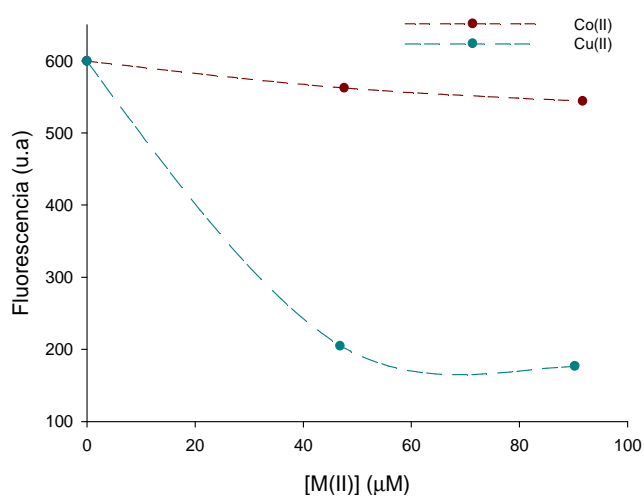
**Figura 21.** Ajuste de las constantes de unión del complejo que se forma entre el Ni(II) y la NMC a pH 6,6, de acuerdo a la ecuación de Van't Hoff.

**Tabla 7.** Parámetros termodinámicos de la interacción entre la NMC y el Ni(II) a pH 6,6.

$\Delta H$ (kJ/mol)	$\Delta G$ (kJ/mol) (25°C)	$\Delta S$ (J/K·mol)	$R^2$
57,1	-23,4	280	0,943

#### 4.4 Estudio de la interacción entre la NMC y el Co(II)

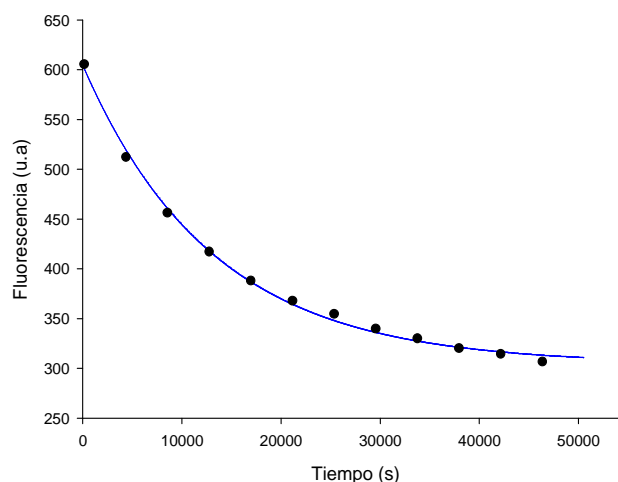
A diferencia de los otros dos cationes metálicos utilizados en este trabajo (Cu(II) y el Ni(II)), no se tenía ninguna información acerca de la interacción del Co(II) con la NMC. Debido a ello, lo primero que se llevó a cabo fue un experimento de fluorescencia en el que se fueron añadiendo alícuotas de una disolución de Co(II) a otra de NMC, a pH 5 y 25°C. Los resultados del experimento se muestran en la Figura 22 y se comparan con los obtenidos para el Cu(II) al mismo pH y temperatura. En esta figura se puede observar como el Co(II) no es capaz de formar el complejo con la NMC, aun trabajando a elevadas concentraciones de catión metálico, y la pequeña disminución de la intensidad de fluorescencia se debe a la dilución del péptido al añadir la disolución tamponada de Co(II).



**Figura 22.** Comparación de la atenuación de la fluorescencia de dos disoluciones 10µM de NMC tras añadir Co(II) y Cu(II), a pH 5 y 25°C.

En vista de los resultados obtenidos, se decidió llevar a cabo un experimento en función del tiempo, con el que se determinaría si, al igual que ocurre con el Ni(II), el Co(II) necesita un cierto tiempo para que tenga lugar la formación del complejo. Además, se optó por trabajar a un pH más elevado, para favorecer la desprotonación de los nitrógenos que forman el motivo ATCUN del decapeptido.

En la Figura 23 se muestra el ajuste de los datos cinéticos obtenidos del experimento realizado a pH 6,6 y 25°C. En ella se puede observar como, al igual que el Ni(II), el Co(II) necesita un cierto tiempo para alcanzar el equilibrio. Concretamente, se necesitaron 13 horas para alcanzar esta situación.



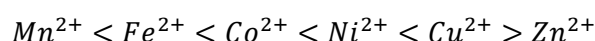
**Figura 23.** Ajuste de los datos cinéticos de una mezcla 10 μM en NMC y 0,32 mM en Co(II) a pH 6,6 y 25°C.

En la Tabla 8 se muestra el valor de las constantes cinéticas y la constante de unión determinadas a partir de los datos obtenidos en el experimento con el Co(II). A partir de estos datos, se puede afirmar que la estabilidad del complejo que se forma entre la NMC y este catión metálico es menor que en el caso del Ni(II) y el Cu(II), puesto que la constante de unión determinada es menor que en los otros dos casos, para un mismo pH y temperatura.

**Tabla 8.** Constantes cinéticas y constante de unión para la formación del complejo entre la NMC y el Co(II) a 25°C y pH 6,6.

$k_1$ (L/mol·s)	$k_{-1}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_a = k_1/k_{-1}$ (M <sup>-1</sup> )
0,148 ± 0,003	(2,92 ± 0,15)·10 <sup>-5</sup>	(5,07 ± 0,28)·10 <sup>3</sup>
0,183 ± 0,007	(4,17 ± 0,27)·10 <sup>-5</sup>	(4,38 ± 0,33)·10 <sup>3</sup>

Estudios realizados por otros autores han demostrado que la formación del complejo entre el Co(II) y la albúmina sérica humana es un proceso lento [Liang, 2001] y que tiene una constante de unión del orden de 10<sup>4</sup> M<sup>-1</sup>, a pH fisiológico [Sokolowska, 2009]. Este valor es menor que las constantes determinadas para el Cu(II) y el Ni(II) cuando interaccionan con la misma proteína, las cuales presentan un valor de 10<sup>11</sup> [Masouka, 1994] y 10<sup>7</sup> [Sokolowska, 2002] M<sup>-1</sup>, respectivamente. De acuerdo a estos resultados, se puede ver como la tendencia de los cationes metálicos para enlazarse al motivo ATCUN se mantiene tanto para la albúmina humana como para la NMC. Esta tendencia cumple, además, con la serie propuesta por Irving-Williams [Irving, 1948], la cual asegura que la estabilidad termodinámica de los complejos formados por cationes metálicos divalentes sigue la secuencia indicada a continuación:



En cuanto a la razón de que la estabilidad del complejo formado por el Co(II) y la NMC sea menor que en el caso del Cu(II) y el Ni(II) puede deberse a que el Co(II) tiene un menor carácter como ácido de Lewis que los otros dos cationes metálicos, ya que su radio iónico es mayor, por lo que la fortaleza del enlace que se establezca con los nitrógenos dadores del motivo ATCUN será menor. Esta misma propiedad podría ser la responsable, además, de que la cinética de formación del complejo entre la NMC y el Co(II) sea más lenta, ya que la capacidad para desplazar los protones de los nitrógenos del péptido por parte del catión metálico es menor que la de los otros dos cationes metálicos, pudiendo ser éste el paso limitante del proceso, ya que, comparando las constantes cinéticas directas del Ni(II) y el Co(II), las de éste último son dos órdenes de magnitud menores, a un mismo pH y temperatura.

## 5. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en este trabajo, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- La presencia del Trp<sup>4</sup> cercano al motivo ATCUN ha permitido utilizar la espectroscopia de fluorescencia para determinar las constantes de unión del complejo formado entre la NMC y los cationes metálicos Cu(II), Ni(II) y Co(II).
- El estado de protonación de la His<sup>3</sup> presente en la NMC modifica la intensidad de fluorescencia emitida por el Trp<sup>4</sup> y determina la formación de complejos entre la NMC y los cationes metálicos.
- Los cationes estudiados en este trabajo interaccionan con la NMC formando un compuesto de coordinación, cuya estabilidad cumple además el orden propuesto por Irving-Williams. Por otro lado, se ha comprobado que la formación del complejo entre la NMC y los cationes Ni(II) y Co(II) es un proceso cinéticamente lento, mientras que con el Cu(II) tiene lugar de forma inmediata.
- Mediante la utilización de la espectroscopia de fluorescencia e ITC se ha podido comprobar que la estequiometría del complejo formado es aproximadamente 1:1, tal y como habían indicado otros autores anteriormente.
- La temperatura afecta a la estabilidad de los complejos formados entre la NMC y los cationes metálicos, observando un incremento del valor de las constantes de unión a medida que este factor aumenta.
- El proceso de formación del complejo entre la NMC y los cationes metálicos es espontáneo. Teniendo en cuenta que el proceso es endotérmico, está dirigido por un aumento de entropía.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- [Adrover, 2015] M. Adrover, P. Sanchis, B. Vilanova, K. Pauwels, G. Martorell, J. J. Pérez. Conformational Ensembles of Neuromedin C Reveal a Progressive Coil-Helix Transition within a Binding-Induced Folding Mechanism. *RSC Advances*, 5, 83074-88, (2015).
- [Appleton, 1971] D. W. Appleton, B. Sakar. The Absence of Specific Copper(II)-Binding Site in Dog Albumin. *J. Biol. Chem.*, 246, 5040-46, (1971).
- [Bal, 2013] W. Bal, M. Sokolowska, E. Kurowska, P. Faller. Binding of Transition Metal Ions to Albumin: Sites, Affinities and Rates. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1830, 5444-55, (2013).
- [Barshop, 1983] B. A. Barshop, R. F. Wrenn, C. Frieden. Analysis of Numerical Methods for Computer Simulation of Kinetic Processes: Development of KINSIM-A Flexible, Portable System. *Analytical Biochemistry*, 130, 134-45, (1983).
- [Cornelio, 2007] D. B. Cornelio, R. Roesler, G. Schwartzmann. Gastrin-Releasing Peptide Receptor as a Molecular Target in Experimental Anticancer Therapy. *Annals of Oncology*, 18, 1457-66, (2007).
- [Czarnek, 2015] K. Czarnek, S. Terpilowska, A. K. Siwicki. Selected Aspects of the Action of Co Ions in the Human Body; *Centr. Eur. J. Immunol.*, 40, 236-42, (2015).
- [Dixon, 1974] J. W. Dixon, B. Sarkar. Isolation, Amino Acid Sequence and copper(II)-Binding Properties of Peptide (1-24) of Dog Serum Albumin. *Journal of Biological Chemistry*, 249, 5872-77, (1974).
- [Edelhoch, 1967] H. Edelhoch. Spectroscopic Determination of Tryptophan and Tyrosine in Proteins. *Biochemistry*, 6, 1948-54, (1967).
- [Folk, 2010] D. S. Folk, K. J. Franz. A Prochelator Activated by Beta-Secretase Inhibits Abeta Aggregation and Suppresses Copper-Induced Reactive Oxygen Species Formation; *J. Am. Chem. Soc.*, 132, 4994-95, (2010).
- [Fraiji, 1992] L. K. Fraiji, D. M. Hayes, T. C. Werner. Static and Dynamic Fluorescence Quenching Experiments for the Physical Chemistry Laboratory. *Journal of Chemical Education*, 69, 424-8, (1992).
- [Gasmi, 1997] G. Gasmi, A. Singer, J. Forman-Kay et al. NMR Structure of Neuromedin C, a Neurotransmitter with an Amino Terminal Cull-, Nill-Binding (ATCUN) Motif. *The Journal of Peptide Research*, 49, 500-509, (1997).
- [Gokhale, 2008] N. H. Gokhale, S. Bradford, J. A. Cowan. Catalytic Inactivation of Human Carbonic Anhydrase I by a Metallopeptide-Sulfonamide Conjugate Is Mediated by Oxidation of Active Site Residues. *Journal of the American Chemical Society*, 130, 2388-89, (2008).
- [Guglietta, 1985] A. Guglietta, C. L. Strunk, B. J. Irons, L. H. Lazarus. Central Neuromodulation of Gastric Acid Secretion by Bombesin-like Peptides. *Peptides*. 6(suppl. 3), 75-81, (1985).
- [Gusman, 2001] H. Gusman, U. Lendenmann, J. Grogan et al. Is Salivary Histatin 5 a Metallopeptide?. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1545, 86-95, (2001).

- [Harford, 1995]** C. Harford, B. Sarkar. Neuromedin C binds Cu(II) and Ni(II) via the ATCUN motif: implications for the CNS and cancer growth. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 209, 877-882, (1995).
- [Harford, 1997]** C. Harford, B. Sarkar. Amino Terminal Cu(II)- and Ni(II)-Binding (ATCUN) Motif of Proteins and Peptides: Metal Binding, DNA Cleavage, and Other Properties. *Accounts of Chemical Research*, 30, 123-30, (1997).
- [Helm, 2005]** L. Helm, A. E. Merbach. Inorganic and Bioinorganic Solvent Exchange Mechanisms. *Chemical Reviews*, 105, 1923-59, (2005).
- [Huang, 2016]** Y. Huang, A. A. Keller. Isothermal Titration Microcalorimetry to Determine the Thermodynamics of Metal Ion Removal by Magnetic Nanoparticle Sorbents. *Environmental Science: Nano*, 3, 1206-14, (2016).
- [Irving, 1948]** H. Irving and R. J. P. Williams. Order of Stability of Metal Complexes. *Nature*, 162, 746-47, (1948).
- [Jensen, 2008]** R. Jensen, J. Battey, E. Spindel et al. Mammalian Bombesin Receptors: Nomenclature, Distribution, Pharmacology, Signaling, and Functions in Normal and Disease States. *Pharmacol. Rev.* 60, 1-42, (2008).
- [Kozlowski, 1999]** H Kozlowski, W. Bal, M. Dyba et al. Specific-Structure Stability Relations in Metallopeptides; *Coord. Chem. Rev.*, 184, 319-346, (1999).
- [Kulprachakran, 2016]** K. Kulprachakarn, Y. Chen, X. Kong et. al. Copper(II) Binding Properties of Hecpidin. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 21, 329-38, (2016).
- [Kuzmic, 1996]** P. Kuzmic. Program DYNAFIT for the Analysis of Enzyme Kinetic Data: Application to HIV Proteinase. *Analytical Biochem.*, 237, 260-73, (1996).
- [Lakowicz, 2006]** J. Lakowicz. Principles of Fluorescence Spectroscopy. Ed. Springer, (2006).
- [Laussac, 1984]** J. P. Laussac, B. Sarkar. Characterization of the copper(II)- and nickel(II)-Transport Site of Human Serum Albumin. Studies of copper(II) and nickel(II) Binding to Peptide 1-24 of Human Serum Albumin by <sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H NMR Spectroscopy. *Biochemistry*, 23, 2832-38, (1984).
- [Lemaire, 1991]** I. Lemaire. Bombesin-Related Peptides Modulate Interleukin-1 Production by Alveolar Macrophages. *Neuropeptides* 20, 217-23, (1991).
- [Liang, 2001]** H. Liang, J. Huang, C. Tu et al. The Subsequent Effect of Interaction between Co<sup>2+</sup> and Human Serum Albumin or Bovine Serum Albumin. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 85, 167-71, (2001).
- [Libardo, 2015]** M. D. J. Libardo, T. Paul, R. Prabhakar et. al. Hybrid Peptide ATCUN-Sh-Buforin: Influence of the ATCUN Charge and Stereochemistry on Antimicrobial Activity. *Biochimie*, 113, 143-55, (2015).
- [Ma, 2009]** Z. Ma, F. E. Jacobsen, D. P. Giedroc. Coordination Chemistry of Bacterial Metal Transport. *Chemical Reviews*, 109, 4644-81, (2009).
- [Makowska, 2016]** J. Makowska, K. Zamojc, D. Wyrzykowski et al. Binding of Cu(II) Ions to Peptides Studied by Fluorescence Spectroscopy and Isothermal Titration Calorimetry. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 153, 451-56, (2016).

- [Marsouvanidis, 2013]** P. J. Marsouvanidis, T. Maina, W. Sallegger et al. 99mTc Radiotracers Based on Human GRP(18-27): Synthesis and Comparative Evaluation. *Journal of Nuclear Medicine*, 54, 1797-1803, (2013).
- [Masouka, 1994]** J. Masouka, P. Saltman. Zinc(II) and copper(II) Binding to Serum Albumin. A Comparative Study of Dog, Bovine, and Human Albumin. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 25557-61, (1994).
- [Minamino, 1984]** N. Minamino, K. Kangawa, H. Matsuo. Neuromedin C: a bombesin-like peptide identified in porcine spinal cord. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 119, 14-20, (1984).
- [Miyamoto, 2013]** T. Miyamoto, S. Kamino, A. Odani et. al. Basicity of N-Terminal Amine in ATCUN Peptide Regulates Stability Constant of Albumin-like Cu<sup>2+</sup> Complex. *Chemistry Letters*, 42, 1099-1101, (2013).
- [Nelson, 1999]** N. Nelson. Metal Ion Transporters and Homeostasis. *Embo J.*, 18, 4361-71, (1999).
- [Plotnikova, 2016]** O. A. Plotnikova, A. G. Mel'nikov, G. V. Mel'nikov, T. I. Gubina. Quenching of Tryptophan Fluorescence of Bovine Serum Albumin under the Effect of Ions of Heavy Metals. *Optics and Spectroscopy*, 120, 65-69, (2016).
- [Predki, 1992]** P. F. Predki, C. Harford, P. Brar et al. Further Characterization of the N-Terminal copper(II)- and nickel(II)-Binding Motif of Proteins. Studies of Metal Binding to Chicken Serum Albumin and the Native Sequence Peptide. *The Biochemical Journal*, 287, 211-15, (1992).
- [Reynolds, 1997]** T. Reynolds, R. D. Pinnock. NMC Decreases Potassium Conductance and Increases a Non-Specific Conductance in Rat Suprachiasmatic Neurones in Brain Slices in Vitro. *Brain Research*. 750, 67-80, (1997).
- [Sankararamakrishnan, 2005]** R. Sankararamakrishnan, S. Verma, S. Kumar. ATCUN-like Metal-Binding Motifs in Proteins: Identification and Characterization by Crystal Structure and Sequence Analysis. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 58, 211-21, (2004).
- [Schwartzmann, 2006]** G. Schwartzmann, L. DiLeone, M. Horowitz et al. A Phase I Trial of the Bombesin/gastrin-Releasing Peptide (BN/GRP) Antagonist RC3095 in Patients with Advanced Solid Malignancies. *Investigational New Drugs*, 24, 403-12, (2006).
- [Sokolowska, 2002]** M. Sokołowska, M. Wszelaka-Rylik, J. Poznanski et al. Spectroscopic and Thermodynamic Determination of Three Distinct Binding Sites for Co(II) Ions in Human Serum Albumin; *J. Inorg. Biochem.*, 103, 1005-13, (2009).
- [Tachibana, 2010]** T. Tachibana, K. Matsuda, H. Sawa, A. Mikami, H. Ueda, M. A. Cline. Differential Thresholds of Neuromedins B-, C-, and Bombesin-Induced Anorexia and Crop-Emptying Rate in Chicks. *General and Comparative Endocrinology*, 169, 144-50, (2010).
- [Thurlkill, 2006]** R. L. Thurlkill, G. R. Grimsley, J. M. Scholtz et. al. pK Values of the Ionizable Groups of Proteins. *Protein Sci*, 15, 1214-18, (2006).
- [Trapaidze, 2012]** A. Trapaidze, C. Hureau, W. Bal et al. Thermodynamic Study of Cu<sup>2+</sup> Binding to the DAHK and GHK Peptides by Isothermal Titration Calorimetry (ITC)

with the Weaker Competitor Glycine. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 17, 37-47, (2012).

- [Wang, 2008]** N. Wang, L. Ye, F. Yan et al. Spectroscopic Studies on the Interaction of Azelnidipine with Bovine Serum Albumin. *International Journal of Pharmaceutics*, 351, 55-60, (2008).
- [Wang, 2010]** L. Wang, R. Liu, Z. Chi et al. Spectroscopic Investigation on the Toxic Interactions of Ni<sup>2+</sup> with Bovine Hemoglobin. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 76, 155-60, (2010).
- [Williams, 2013]** M. A. Williams, T. Daviter. Protein-Ligand Interactions. Methods and Applications. Ed. Humana Press. 2<sup>a</sup> Edición. (2013).
- [Yong, 2010]** L. Yong and others. Vaccination with a Potent DNA Vaccine Targeting B-Cell Epitopes of hGRP Induces Prophylactic and Therapeutic Antitumor Activity in Vivo. *Gene Therapy*, 17, 459-68, (2010).
- [Yorita, 2008]** H. Yorita, K. Otomo, H. Hiramatsu et al. Evidence for the Cation- $\pi$  Interaction between Cu<sup>2+</sup> and Tryptophan. *Journal of the American Chemical Society*, 130, 15266-67, (2008).
- [Zhang, 2000]** Y. Zhang, S. Akilesh, D. E. Wilcox. Isothermal Titration Calorimetry Measurements of Ni(II) and Cu(II) Binding to His, GlyGlyHis, HisGlyHis, and Bovine Serum Albumin: A Critical Evaluation. *Inorg. Chem.*, 39, 3057-64, (2000).
- [Zhang, 2002]** Y. Zhang, D. E. Wilcox. Thermodynamic and Spectroscopic Study of Cu(II) and Ni(II) Binding to Bovine Serum Albumin. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 7, 327-37, (2002).
- [Zhao, 2012]** H. Zhao, S. Matsuda, S. ThanThan, S. Yannaing, H. Kuwayama. Bombesin-like Peptides Stimulate Growth Hormone Secretion Mediated by the Gastrin-Releasing Peptide Receptor in Cattle. *Peptides*, 37, 194-99, (2012).
- [Zhao, 2016]** H. Q. Zhao, G. Yao, S. Yannaing, S. ThanThan, H. Kuwayama. Insulinotropic Action of Bombesin-like Peptides Mediated by Gastrin-Releasing Peptide Receptors in Steers. *J. Anim. Sci.* 94, 58-64, (2016).
- [Zimmerle, 1989]** C. T. Zimmerle, C. Frieden. Analysis of Progress Curves by Simulations Generated by Numerical Integration; *Biochem. J.*, 258, 381-87, (1989).