



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Instituto de
Investigación en
Ciencias
Básicas y
Aplicadas

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS



Control Escolar de Licenciatura

VOTOS DE APROBATORIOS

Secretaría Ejecutiva del Instituto de Investigación en Ciencias Básicas Aplicadas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

P r e s e n t e .

Por medio de la presente le informamos que después de revisar la versión escrita de la tesis que realizó la C. **MATA SALGADO MARIA FERNANDA** con número de matrícula **10002756** cuyo título es:

“Análisis Espectroscópico del efecto de iones metálicos en la agregación de una variante de la proteína $\lambda 6aJL2R24G$ ”.

Consideramos que **SI** reúne los méritos que son necesarios para continuar los trámites para obtener el título de **LICENCIADO EN CIENCIAS ÁREA TERMINAL EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

Cuernavaca, Mor a 05 de abril del 2022

Atentamente
Por una universidad culta

Se adiciona página con la e-firma UAEM de los siguientes:

Dra. Nina Pastor Colón	(Presidente).
Dra. Sonia Dávila Ramos	(Secretario).
Dra. Lina Andrea Rivillas Acevedo	(Vocal).
Dr. Rodrigo Said Razo Hernández	(Suplente).
Dr. Cesar Millán Pacheco	(Suplente).



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

CARMEN NINA PASTOR COLON | Fecha:2022-04-05 09:26:47 | Firmante

sdW0iRNnggJumoBIVqrazcy4tieey7Z11vvqvhUcfaG0WE+LGjQVbcd6lq0cFWGsNZD0tgvRWIn2578ymBpdZyJBTZr3mq4vni5Je9zEARC9TMnhruZXZvoBLG/efJzoYyU8fBUoYzLuRly6L4Zx5NBUZYxqiBBUdwiMaXpTNb3bt+smZLEI90F3Nh41SMz+YwQDlaQ+esV03lo/vJc7e3LyRII3bdgJROw/MnR/lpjxy9Valbh16QV93+hSwNFqjUsbrMLwKAKeHyLJOFPKbk+GQS/QPCWEWidG0PadCyBKJmTnpRzPhgFVMeCD+3uPWx3eRU5Vrt6FqFUvH9A==

LINA ANDREA RIVILLAS ACEVEDO | Fecha:2022-04-05 10:33:39 | Firmante

pfE3h8DGUYjAPE8ZihTXOKTpryTw5WnG284q76Al3vmIcUQxodImdbBKu5hgePjHN6JdhYNwBYhYnYReX5T5JYZTJcfUG6KAP4KEYOvJLf/3gCOmbZW/LXglqOaUF6dpZyVBndbt92b4ROUG3rXjURANBu/OELqmMlpNycF4MbWn3XwUWwjKhk15Cy6TDp5I7Le9mMwIDoETkJtXv1XzOem80sPX6wDG3YRU/vmCluf0KUYejk8cHSomHrv3HI0kBcejx9oZnm8lnGfy+HSAAG3R6GctKnn47uWICfOw4LCHWbV652TQx7OxDN6/PgKjiAJVcrYScxf+skWvQ4tw==

RODRIGO SAID RAZO HERNANDEZ | Fecha:2022-04-05 11:00:41 | Firmante

h4IdalV+yk8kF9UOocNXpXcwcSVQLEq1dxkXEACvGithn7VybNUbYN3zfzKnonuoRAE6mR3SxSbQG8VPAIPD87/S53JvqzB75NKdSYCjfG2i0byEZ0ACiR7YmVzZscpRq8nuru83FUthSQN5eKhGRH/nVJEAspSL+j9tmIvruNF704TFRWRjB06z6NkQnNn7phhISxBz2ZDghiiHGswcZccQiPoCcsQjxQIN/lzq44viVG2DkwJ6BZhsx4gDA2Y9MDqyKjWEGggEs6hcOoPpVzvwfqlAdbceC49592M2Kn+HEXqVsi6LJD7oDBY6shL++vQMc8XM54RL7iJbsR8jA==

CESAR MILLAN PACHECO | Fecha:2022-04-05 17:30:34 | Firmante

EjZlgFHEmg6NpBXOmERJ/EPDXPpbjuY2/JuyCos5x97Ha+LflLqre07H9XavbFgOPPEKPDj0E2CyFnP3f1I4uqL2vtEPI3tmhBIQ08xRyQMI/0Yzjcr0ECWGqkuqT8xpe7gfCAraUPfIY6nVo5eqhF0uaUA027+UNZKyDmEuDYK0wgR+bWvj1tg5aywmy1vH0UB2oUt0FtMhsOpHqgf/IE0+qjXmEoF2nI2d66bJk/PmUvV5on5zBh9qRhfFs6nqqngYloGxKEkXPvRTUPy/LgPNRFPcEbSaRRqI0E0QRiDEuQv7pNjI892D/JNuHDGQtdjDDUEU76Zci3elQbJ4w==

SONIA DAVILA RAMOS | Fecha:2022-04-06 11:41:08 | Firmante

U5oWVkh2R0sBLnMIPg339WWW1SBdJGuSfVUKV14VPocOX2jQ5/ITPhA3IruE9y0WCjZcR7kO67A6CU88bp9QxLTVdS3vFQKcymSdnpWwho3gB9TE2yP/GLS1pjvEJXwPzcXk3AOQYxvknMcpsU1YyPX8pqmm2iwV7nmE8pPQjyUJdQLsbSxtrgFjL1Tp+DOFkEuv3R/19G2KICG1M07gUokUu0zDYCsG1wQGcQHf2PM6BYD/KPQDZhBEM2KMg2EJvt6+ByuIOLCotaSti84Xp9IRBRKYqZgTMz3tJVVfRhfEV5YXCPQzQ4UT85kSVACGLZvUPwic3UN3ORcuTv0cg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



hY0jVbxAS

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/UF1IYWQuXzv48AwnbFShSF9xWKhnzWp>





Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas.
Centro de Investigación en Dinámica Celular.

“Análisis Espectroscópico del efecto de iones metálicos en la agregación de una variante de la proteína $\lambda 6aJL2R24G$.”

TESIS

Para obtener el grado de
**Licenciada en ciencias con área terminal en
Bioquímica y Biología Molecular**

PRESENTA:

María Fernanda Mata Salgado.

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Lina Andrea Rivillas Acevedo.

Centro de investigación en Dinámica Molecular.

Cuernavaca, Morelos

Febrero 2022

Agradecimientos:

A mi asesora de tesis, la Dra. Lina Andrea Rivillas Acevedo, por aceptarme en su grupo de investigación y por todos los conocimientos, la paciencia y las palabras de aliento que me brindó a lo largo del desarrollo de este proyecto.

A mi comité tutorial, Dra. Nina Pastor, Dra. Sonia Dávila, Dr. Cesar Millán, Dr. Rodrigo Razo y la Dra. Lina Rivillas, por todas las observaciones, correcciones e ideas aportadas a este proyecto.

A todos los profesores de la licenciatura en ciencias por sus conocimientos y su guía a lo largo de toda mi carrera.

A mis compañeros de laboratorio, Ángel, Diana, Alan, Grissell y Yissell, por su ayuda en los días difíciles y todos los momentos que compartimos.

A mis hermanas, Karla, Denisse y Paloma, y mi cuñado Eduardo, por siempre estar para mí, escucharme y guiarme. Ustedes son el mejor ejemplo a seguir que la vida me pudo dar.

A mis padres, Arturo y Maricela, por estar conmigo y ser mi motor. Les prometo que no se perdieron muchos tornillos en el desarrollo de este trabajo.

Abreviaturas:

AI	Antes de inducir
AL	Amiloidosis de cadena ligera
CDR	Regiones Determinantes de Complementariedad
D.O	Densidad óptica
DC	Dicroísmo circular
DI	Después de Inducir
DM-Cys	6aJL2-R24G/S26C/S57C
DM-His	6aJL2-R24G/H8S/dH99
DMSO	Dimetilsulfóxido
EPR	Resonancia Paramagnética Electrónica
eq	Equivalentes
FR	Regiones marco
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
LC	Cadenas ligeras
MTSL	S-(1-oxil-2,2,5,5-tetrametil-2,5-dihidro-1H-pirrol-3-il)metilmetanosulfonotioato
PA	Pellet de agua
PS	Pellet de sacarosa
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
SA	Sobrenadante de agua
SC	Sobrenadante del cultivo celular después de la primera centrifugación
SDSL-EPR	Técnica de EPR de etiquetas de spin sitio dirigido
SS	Sobrenadante de sacarosa
ThT	Tioflavina T
Tm	Temperatura de fusión
V_L	Dominio variable

Índice

Índice	4
Resumen:	6
1.- Introducción:.....	7
1.1 Enfermedades conformacionales.....	7
1.2 Amiloidosis.....	7
1.3 Inmunoglobulinas.....	8
1.4 Iones metálicos.....	9
2.- Antecedentes:	11
2.1 Amiloidosis de cadena ligera.....	11
2.2 Proteína 6aJL2-R24G.....	11
3.- Justificación.....	14
4.- Hipótesis.....	16
5.- Objetivos.....	16
5.1 Objetivo general:.....	16
5.2 Objetivos específicos:	16
6.- Metodología.....	17
6.1 Transformación y sobreexpresión.....	17
6.2 Lisado y purificación.....	17
6.3 Marcaje de la proteína DM-Cys.....	18
6.4 EPR del marcaje de la DM-Cys.....	18
6.5 Estabilidad térmica	18
6.6 Cinética de formación de fibras amiloides.....	18
6.7 Determinación de estructura secundaria.....	19
7.- Resultados.....	20
7.1 DM-Cys vs Cu(II).....	20
Sobreexpresión, lisis y purificación.....	20
Estructura secundaria de la proteína DM-Cys en ausencia y presencia de Cu(II).....	21
7.2 R24G vs Zn(II): DM-His vs Zn(II).....	23
Purificación de las proteínas R24G y DM-His.....	23
Efecto del Zn(II) en la estabilidad térmica de las proteínas R24G y DM-His.....	26
Estructura secundaria de las proteínas R24G y DM-His en ausencia y presencia de Zn(II).....	26

Cinética de formación de fibras amiloides de las proteínas R24G y DM-His en ausencia y presencia de Zn(II).....	28
8.- Discusión.....	30
8.1 DM-Cys vs Cu(II).	30
8.2 R24G y DM-His vs Zn(II).....	31
9.- Conclusiones.	33
10.- Perspectivas.....	33
11.- Referencias.	34

Resumen:

La amiloidosis incluye un grupo de enfermedades complejas que son causadas por el plegamiento incorrecto y la agregación de proteínas en fibras amiloides altamente ordenadas que se depositan en diversos tejidos, provocando pérdida de función celular y muerte. La Amiloidosis de cadena ligera es una de las formas más comunes de amiloidosis sistémica y se caracteriza por el depósito extracelular de fragmentos fibrilares, compuestos principalmente por cadenas ligeras de inmunoglobulinas. Se ha reportado que las cadenas ligeras λ están más sobreexpresadas en la enfermedad y un del 30% de los casos asociados a ésta corresponden a la línea germinal 6a. Dentro de este porcentaje, un 25% de los casos presentan una mutación donde la Arginina 24 es sustituida por una Glicina; esta mutación disminuye de la estabilidad de la proteína y la hace más propensa a formar fibras amiloides. A pesar de que no se conoce el mecanismo exacto por el que las cadenas ligeras forman las fibras amiloides, se ha propuesto la participación de un intermediario parcialmente desplegado, sin embargo, éste aún no ha sido caracterizado. Por otra parte, se ha reportado que los iones metálicos como el Zn(II) y el Cu(II) juegan un papel muy importante en la agregación de proteínas involucradas en otras amiloidosis.

Para estudiar los posibles intermediarios que llevan a la formación de fibras amiloides se construyó una doble mutante de la proteína 6aJL2-R24G, en la cual las serinas 26 y 57 fueron sustituidas por cisteínas. Posteriormente, estas cisteínas fueron marcadas con una etiqueta paramagnética para llevar a cabo estudios de EPR y determinar estos intermediarios. Antes de realizar estos experimentos se debe analizar si el marcaje y las sustituciones inducen cambios significativos en las características termodinámicas de la proteína. En este trabajo se sobreexpresó, purificó y marcó la doble mutante de cisteínas de la proteína y se evaluaron por dicroísmo circular los cambios en estructura secundaria en ausencia y presencia de Cu(II). Por otra parte, usando varias técnicas espectroscópicas, se estudió el efecto del Zn(II) en la agregación de las proteínas 6aJL2-R24G y el papel de las histidinas en la interacción con Zn(II).

1.- Introducción:

1.1 Enfermedades conformacionales.

Todos los organismos vivos están formados por células, las cuales se construyen, entre otras cosas, a partir de elementos denominados macromoléculas (Alberts, et al., 2015). Una de las cuatro principales familias de macromoléculas son las proteínas, moléculas muy complejas que se caracterizan por estar involucradas en prácticamente todos los procesos de la vida de los organismos biológicos (Kessel & Ben-Tal, 2018). Algunas de estas moléculas tienen estructuras tridimensionales muy bien definidas que corresponden a las estructuras termodinámicamente más estables en condiciones fisiológicas. En estos casos, sólo las proteínas correctamente plegadas tienen estabilidad a largo plazo y son capaces de interactuar selectivamente con sus blancos biológicos (Dobson, 2003). Sin embargo, hay otro grupo de proteínas que son capaces de tener actividad biológica sin tener una estructura tridimensional definida en solución; a éstas se les conoce como proteínas intrínsecamente desordenadas. Los estados conformacionales en los que se pueden encontrar las proteínas involucran una serie de equilibrios termodinámicos y cinéticos que están regidos por las secuencias de aminoácidos y ciertas condiciones celulares. Sin embargo, aunque las secuencias de aminoácidos y los entornos biológicos en los que los péptidos y proteínas son biológicamente activos han coevolucionado para mantenerlos en sus estados solubles, en algunas circunstancias pueden convertirse en agregados de proteínas no funcionales y potencialmente dañinos (Chiti & Dobson, 2017).

Las enfermedades conformacionales surgen cuando péptidos o proteínas específicas experimentan un cambio en su estructura secundaria o terciaria, provocando que se agreguen y depositen en diversos tejidos o compartimentos celulares (Kopito & Ron, 2000). Estos agregados son tóxicos para las células, sin embargo, el mecanismo exacto que les confiere esta toxicidad aún no está del todo claro (Kessel & Ben-Tal, 2018). Las manifestaciones patológicas de este grupo de enfermedades son muy variadas y dependen de la proteína involucrada (Surguchev & Surguchov, 2010). Una gran cantidad de los depósitos asociados a enfermedades conformacionales consisten en fibras amiloides (Chiti & Dobson, 2017). También existen muchas enfermedades conformacionales donde se forman agregados no amiloides (REFERENCIA), incluso existen estas enfermedades en las cuales no se forman agregados de proteínas, por ejemplo la fibrosis quística (Bell, y otros, 2020).

1. 1 Amiloidosis.

El término amiloidosis se refiere a un grupo de enfermedades que se originan por la deposición, en la mayoría de casos, extracelular, de fibras amiloides, un material fibrilar insoluble y tóxico derivado de proteínas precursoras que se auto-ensamblan, en la mayoría de los casos reportados hasta la fecha, en forma de manojos de proteínas con conformación de hoja β altamente ordenada (Merlini, G., & Bellotti, V, 2003; Wechalekar, A. D., Gillmore, J. D., & Hawkins, P. N, 2016). Estos agregados se pueden localizar en tejidos específicos o pueden depositarse en múltiples tejidos del cuerpo, a este último caso se le conoce como amiloidosis sistémica (Merlini, et al., 2018).

Se han propuesto dos mecanismos de fibrilización dependiendo del tipo de proteína involucrada. Para el caso de las proteínas con estructuras tridimensionales bien definidas, se propone que la agregación requiere de la aplicación de alguna condición

desnaturalizante que favorezca la formación de intermediarios parcialmente desplegados, mientras que para las proteínas intrínsecamente desordenadas se plantea un primer paso de estabilización de la cadena peptídica donde se forme un intermediario parcialmente plegado que permita interacciones intermoleculares específicas que permitan la oligomerización y posterior fibrilización (Uversky, Fernández, & Fink, 2006).

Cada enfermedad amiloide involucra la agregación de una proteína específica y, a la fecha, se han identificado más de 30 proteínas amiloidogénicas entre las que se encuentran las proteínas A β , Tau, Prion, y las cadenas ligeras de inmunoglobulina, entre otras (Sipe, et al., 2016). Sin embargo, se ha demostrado que, in vivo, el proceso es mucho más complejo, ya que se incorporan otros componentes como carbohidratos, ligandos y otras proteínas (Dobson, 2003).

Aunque las proteínas que causan estas enfermedades son muy diferentes, tanto en función como en estructura primaria, sus agregados guardan ciertas características en común. Entre estas características se encuentra la morfología de los agregados, la cual es de fibras largas no ramificadas con diámetros que van de 7 a 13 nm. Se forman por la unión de 2 a 8 protofilamentos, cada uno con diámetros que van desde los 2 hasta los 7 nm, que se tuercen entre sí o se asocian de manera lateral (Chiti & Dobson, 2017). Además, estas fibras tienen la capacidad de unirse a moléculas como la Tioflavina T (ThT) y el Rojo Congo (Dobson, 2003; Sipe, et al., 2016; Wechalekar, Gillmore, & Hawkins, 2016). El ThT es un fluoróforo que se une con alta especificidad a las fibras amiloides e incrementa su intensidad de fluorescencia. Por lo tanto, este fluoróforo es una herramienta muy útil para estudiar la cinética de formación de fibras amiloides (Sulatsky, et al., 2020).

El núcleo o centro de las fibras parece estabilizarse principalmente por puentes de hidrógeno entre el grupo amino y el grupo carboxilo de la cadena principal del polipéptido. Como la cadena principal es igual en todos los polipéptidos, esto podría explicar porque la morfología antes mencionada es común en todos los agregados, a pesar de que las proteínas precursoras tengan estructuras primarias diferentes (Dobson, 2003; Merlini, G., & Bellotti, V, 2003).

El proceso de formación de las fibras amiloides parece seguir un patrón en todos los casos. Al inicio, la proteína en su estado nativo sufre un cambio conformacional que la lleva a un plegamiento no funcional o incorrecto, lo cual hace que asuma una conformación amiloidogénica parcialmente plegada. En este punto, las condiciones celulares no favorecen la formación de fibras amiloides, sin embargo, cuando la cantidad de proteína mal plegada llega a una concentración específica, se forma un núcleo fibrilar crítico, el cual cataliza la formación de agregados y favorece el desarrollo de las fibras amiloides (Merlini, et al., 2018).

1.3 Inmunoglobulinas.

Los anticuerpos son proteínas sintetizadas y secretadas únicamente por los linfocitos B y pertenecen a una gran familia de proteínas conocidas como inmunoglobulinas (Alberts, et al., 2015). Las inmunoglobulinas están formadas por dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras idénticas. Cada uno de estos componentes contiene una región variable en el N- terminal y una región constante en el C-terminal. Cada una de estas regiones está compuesta por 110–130 aminoácidos aproximadamente (Schroeder Jr & Cavacini, 2010), los cuales se pliegan independientemente y forman unidades compactas denominadas dominios de inmunoglobulina. La estructura tridimensional

de estos dominios consiste en un sándwich de dos láminas β unidas por un puente disulfuro (Alberts, et al., 2015).

Los vertebrados superiores tienen dos clases diferentes de cadenas ligeras (LC), las kappa (κ) y las lambda (λ) (Alberts, et al., 2015). Cualquiera de estas dos se forman por la unión de tres segmentos: el segmento variable (V), el segmento de unión (J) y el segmento constante (C). Se estima que hay 40 genes κ y 33 genes λ disponibles para formar el dominio variable de estas proteínas y, además, 5 genes de unión kappa y 4 genes de unión lambda (Ramirez-Alvarado, 2012). Sólo hay un exón que codifica para el segmento constante en las cadenas ligeras tipo kappa, mientras que para las lambda, hay 4 exones, los cuales se encuentran asociados a su propio segmento de unión (Schroeder Jr & Cavacini, 2010).

El segmento del gen variable contiene su propio promotor, un exón líder, un intrón, un exón que codifica para las tres regiones marco (FR1, FR2 y FR3 por sus siglas en inglés), las regiones determinantes de complementariedad 1 y 2 (CDR por sus siglas en inglés) completas y la sección N-terminal del CDR3, y una secuencia señal de recombinación. Por otra parte, cada segmento del gen de unión comienza con una señal de recombinación, seguida de la sección C-terminal del CDR3 y el FR4 completo (Schroeder Jr & Cavacini, 2010). Juntos, el producto del gen variable y el de unión, forman el dominio variable (V_L) de la proteína. Las tres regiones hipervariables o CDR son las encargadas del reconocimiento del antígeno, mientras que las regiones marco se encargan de mantener la integridad estructural de la molécula (Solomon & Weiss, 1995).

Se ha reportado que las inmunoglobulinas o sus subunidades se encuentran en todos los tipos de agregados proteicos, incluyendo los agregados de tipo amiloide (amiloidosis de cadena ligera), agregados no amiloides (enfermedad por depósito de cadena ligera) y agregados native-like (enfermedad de Berger) (Chiti & Dobson, 2017).

1.4 Iones metálicos.

Los iones metálicos como el Co(II), Zn(II), Fe(II), Mg(II), Cu(II), entre otros, constituyen elementos integrales en algunas proteínas. Estos iones se encuentran haciendo complejos con proteínas como la ceruloplasmina, albumina, transcupreína, entre otras (Pelaez-Aguilar, 2021) y son una pieza clave para su correcto funcionamiento. La concentración requerida de estos iones metálicos en el organismo es muy pequeña, sin embargo la falta de éstos lleva a diversas condiciones patológicas (Kessel & Ben-Tal, 2018). La forma en que encontramos a estos componentes en las células siempre es en forma iónica aunque el estado de oxidación de éstos puede variar. Normalmente encontramos a estos iones asociados a proteínas, ya sea que se unan directamente o que se encuentren como cofactores (Bertini, Gray, Lippard, & Valentine, 1994). Los átomos a los que normalmente se unen estos iones metálicos son oxígeno, nitrógeno o azufre; dentro de las proteínas estos donadores son provistos por amidas, el extremo amino y cadenas laterales de aminoácidos como las histidinas, el aspartato, glutamato, metioninas o cisteínas (Quintanar & Rivillas-Acevedo, 2013).

El Cu(II) está involucrado en diversos procesos biológicos como la defensa antioxidante, la respiración celular, la síntesis de melanina, procesos hormonales y de neurotransmisión, entre otros (Nordberg, Fowler, & Nordberg, 2015). El Zn(II), al igual que el cobre, está involucrado en diversos procesos celulares entre los que se encuentran la replicación del DNA y transcripción, estabilización de membranas

celulares, respuesta inmune, muerte celular programada, entre otras (Kessel & Ben-Tal, 2018).

A pesar de tener un papel muy importante en el funcionamiento proteínico, se ha reportado que en varias enfermedades conformacionales la agregación de las proteínas se ve afectada por la presencia de iones metálicos, incluyendo las enfermedades priónicas (Jobling, y otros, 2001), el Alzheimer (Miura, Suzuki, Kohata, & Takeuchi, 2000), el Parkinson (Uversky, Li, & Fink, 2001); (Binolfi, y otros, 2006) y la diabetes mellitus tipo II (Rivillas-Acevedo, Sánchez-López, Amero, & Quintanar, 2015).

2.- Antecedentes:

2. 1 Amiloidosis de cadena ligera.

La amiloidosis de cadena ligera (AL) es una de las formas más comunes de amiloidosis sistémica. Esta enfermedad se caracteriza por el depósito extracelular de fragmentos fibrilares compuestos principalmente por cadenas ligeras de inmunoglobulinas o, más comúnmente, por fragmentos del dominio variable de estas proteínas (Solomon & Weiss, 1995).

El evento patológico inicial que lleva al desarrollo de AL es la proliferación anormal de linfocitos B en la médula ósea. Estas células secretan a la sangre niveles elevados de LC monoclonales (Blancas-Mejia, et al., 2018), las cuales se pliegan de manera incorrecta y se depositan en forma de fibras amiloides, las cuales progresivamente llevan al daño de órganos y tejidos del cuerpo (Sharpley, et al., 2019).

Al ser un tipo de amiloidosis sistémica, las manifestaciones clínicas de la enfermedad son muy variadas, debido a que todos los órganos pueden verse afectados, con la única excepción del sistema nervioso central. Los daños renales son los más frecuentes, ya que se observan en dos tercios de los pacientes en el diagnóstico (Desport, et al., 2012)

Aunque hay muy pocos datos epidemiológicos de la enfermedad, se estima que tiene una incidencia de 1 caso por cada 100,000 personas en países occidentales (Merlini & Bellotti, 2003). De estos casos, se ha observado que la enfermedad es más común en hombres que en mujeres y que la edad media de los pacientes diagnosticados es de 65 años (Desport, et al., 2012).

Sólo una porción de las cadenas ligeras de inmunoglobulina es amiloidogénica en condiciones fisiológicas y hay ciertas características estructurales que están más relacionadas con la amiloidogenicidad (Merlini & Bellotti, 2003). La susceptibilidad que tienen los dominios variables de estas proteínas para formar fibras amiloides in vitro parece estar inversamente relacionada con su energía libre de desplegamiento. Esto sugiere que las interacciones, tanto estabilizantes como desestabilizantes, dentro del dominio pueden influir en la cinética de formación de fibras amiloides (Ramirez-Alvarado, 2012).

En la AL, se ha reportado que las cadenas ligeras λ están sobreexpresadas en comparación con las cadenas κ . Los individuos que padecen esta enfermedad tienen una relación λ : κ de 3:1, mientras que en los individuos sanos es de 1:2. Además de esto, se ha observado que ciertas líneas germinales están más sobreexpresadas en la enfermedad, una de ellas es la λ VI. Dentro de esta familia, el 30% de los casos de AL contienen a la línea germinal λ VI 6a (Ramirez-Alvarado, 2012).

2. 2 Proteína 6aJL2-R24G.

Una de las proteínas estudiadas para entender mejor la AL es la cadena ligera λ 6aJL2. Esta proteína se compone de la secuencia codificada por la línea germinal 6a y el segmento de unión JL2. Se seleccionó este segmento de unión porque se ha reportado que es el más utilizado por las células plasmáticas en la AL, incluyendo las que secretan la cadena ligera λ 6 (del Pozo Yauner, et al., 2008). Además, se ha reportado que aproximadamente un 25% de los casos de AL asociados a proteínas λ 6 presentan una mutante donde la Arginina en la posición 24 es sustituida por una Glicina (R24G). Esta única mutación hace que la proteína sea termodinámicamente más inestable y que forme fibras amiloides in vitro más rápidamente que la 6aJL2 (del

Pozo Yauner, et al., 2008; González-Andrade, et al., 2013). Esto la hace un excelente modelo de estudio.

La estructura de la proteína 6aJL2-R24G se muestra en la Figura 1. La proteína contiene ocho hebras β , las cuales se empaquetan entre ellas y forman dos hojas β antiparalelas. Una de ellas se forma por las hebras A (aminoácidos 3 a 12), B (17 a 23), D (63 a 67) y E (72 a 78). La otra hoja está conformada por las hebras C (34 a 39), C' (46 a 50), F (87 a 94) y G (100 a 110). Éstas se unen entre sí por un puente disulfuro entre la cisteínas 22 y 91. Las tres CDR's contienen los residuos 24 a 34 en la CDR 1, 50 a 56 en la CDR 2 y 9 a 95 en la CDR3 (Rudiño-Piñera, Peláez-Aguilar, Amero, & Díaz-Vilchis, 2019; Maya-Martínez, Gil-Rodríguez, & Amero, 2015; Luna-Martínez, y otros, 2017).

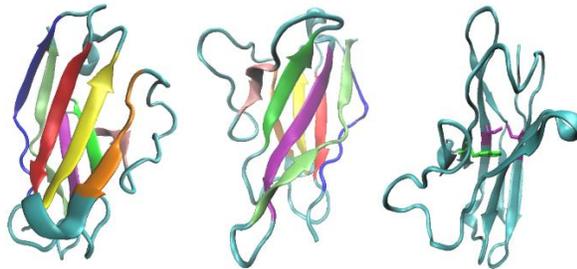


Figura 1 Estructura de la proteína 6aJL2-R24G (5JPJ). La proteína se forma por ocho hebras β que se empaquetan para formar dos hojas β antiparalelas. La primera se forma por la hebra A (azul), B (rojo), D (naranja) y la E (amarillo), mientras que la segunda se forma por las hebras C (verde), C' (rosa), F (morado) y G (lima). Estas dos hojas se unen entre sí mediante un puente disulfuro entre la cisteínas 22 y 91 (morado). Además la proteína tiene un triptófano en la posición 36 (verde).

Otra característica estructural de esta proteína es un triptófano conservado en la posición 36 (Rudiño-Piñera, Peláez-Aguilar, Amero, & Díaz-Vilchis, 2019), muy cerca del puente disulfuro. La cercanía del triptófano con el puente disulfuro apaga su fluorescencia intrínseca, por lo tanto, la proteína no presenta emisión de fluorescencia en su estado nativo (González-Andrade, et al., 2013).

Existen muy pocos reportes del efecto de iones metálicos en la amiloidosis de cadena ligera. Sin embargo, en el año 2001, Davis y colaboradores reportaron que la proteína SMA formaba agregados en presencia de Cu(II). La proteína SMA es una cadena ligera derivada de pacientes con AL y forma fibras amiloides in vitro, sin embargo, los agregados que forma en presencia del Cu(II) son granulares, presentan alta turbidez entre longitudes de onda de 305 a 600 nm y no se unen a ThT (Davis, et al., 2001).

Adicionalmente, se ha reportado la interacción de metales con la β 2-microglobulina (β 2m), una proteína involucrada en amiloidosis relacionada a diálisis. Esta proteína presenta una alta homología en estructura terciaria con las cadenas ligeras de inmunoglobulina. Se ha evaluado el efecto de diversos iones metálicos en su agregación y se ha observado que el Cu(II) induce la formación de fibras amiloides, el Zn(II) induce la formación de oligómeros no amiloides y el Ni(II) no induce agregación de la proteína (Borotto, Zhang, Dong, Burant, & Vachet, 2017) (Dong, y otros, 2014).

En un estudio reciente de mi grupo de trabajo se reportó que el Cu(II) también puede interactuar con la proteína 6aJL2-R24G y que su interacción acelera la formación de

fibras amiloides de la proteína y hace que ésta sea menos estable. Después de realizar experimentos de calorimetría y Resonancia Magnética Nuclear (RMN) para identificar los sitios de unión a cobre, se concluyó que la proteína tiene dos sitios de unión de moderada afinidad, alrededor de las histidinas 99 y 8 (Peláez-Aguilar, et al., 2020). Se propuso que la desestabilización de la proteína se debe a la pérdida de interacciones entre los dominios CDR3 y CDR1, cuando el Cu(II) se une a la histidina 99, haciendo que la proteína sea más propensa a formar fibras amiloides. (Peláez-Aguilar, et al., 2020).

3.- Justificación.

Se ha reportado que la proteína en estado nativo o completamente desplegado no forma agregados fibrilares. Es por eso que se sugiere la participación de intermediarios parcialmente desplegados para la formación de las fibras amiloides, sin embargo, los cambios conformacionales que conducen a estos intermediarios aún no han sido caracterizados (Valdés-García, G., Millan-Pacheco, & Pastor, 2017).

La espectroscopia es un campo que nos puede dar mucha información estructural sobre alguna proteína de interés. Entre los métodos disponibles se encuentra la Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR por sus siglas en inglés). En esta técnica, partículas subatómicas (electrones) con un spin magnético se someten a un campo magnético externo, y el spin de cada partícula se alinea paralela o antiparalelamente con respecto al campo. La partícula subatómica que se sigue por EPR son electrones desapareados, sin embargo, las proteínas normalmente no contienen electrones desapareados; es por eso que se deben etiquetar con alguna molécula que sí los tenga (Kessel & Ben-Tal, 2018). Se han desarrollado diversas etiquetas de nitróxido para su uso en aplicaciones bioquímicas. Este tipo de etiquetas se eligen ya que son estables en condiciones fisiológicas y no inducen mayores perturbaciones en los sistemas biológicos (Melanson, Sood, & Török, 2013).

En 1989 se estableció la técnica de EPR de etiquetas de spin sitio dirigido (SDSL por sus siglas en inglés), gracias a la cual se puede medir la distancia entre múltiples etiquetas de spin. Sin embargo, para poder desarrollar esta técnica en proteínas, los residuos donde se planea colocar estos marcadores deben ser reemplazados por cisteínas. La proteína 6aJL2-R24G contiene dos residuos de cisteínas, los cuales se encuentran haciendo el puente disulfuro que une a las dos hojas β y son muy importantes para mantener la estructura terciaria de la proteína (Rudiño-Piñera, Peláez-Aguilar, Amero, & Díaz-Vilchis, 2019). Por lo tanto, para estudiar los posibles intermediarios que participan en la formación de fibras de la proteína 6aJL2-R24G por SDSL-EPR, se construyó la mutante 6aJL2-R24G/S26C/S57C (DM-Cys) (Figura 2), en la cual las serinas en las posiciones 26 y 57 fueron sustituidas por cisteínas. Se eligieron estos aminoácidos porque ambos se encuentran en la superficie de la proteína y la distancia entre ellos es de aproximadamente 4 nm. Esta distancia está en el rango ideal de trabajo de la técnica de SDSL-EPR, el cual está entre 2 y 20 nm.

Antes de realizar estudios conformacionales, es deseable evaluar el efecto que tienen las sustituciones y el marcaje con MTSL en la estabilidad de la proteína. Es por eso que en este trabajo se estudiaron algunas características fisicoquímicas de la proteína DM-Cys marcada con MTSL, y además se evaluó el efecto de la interacción con Cu(II). Además de todo lo anterior, hasta la fecha se conoce muy poco del efecto de otros iones metálicos en la agregación de la proteína 6aJL2-R24G. Por lo tanto, se evaluó el efecto de Zn(II) en la agregación de la proteína 6aJL2-R24G. Como se explicó anteriormente, el Cu(II) se une a las Histidinas 99 y 8 de la proteína. El Zn(II) también tiene alta afinidad por este aminoácido, por lo tanto se decidió evaluar el efecto del Zn(II) en la proteína 6aJL2-R24G y en la variante 6aJL2-R24G/H8S/dH99 que por simplicidad la nombraremos DM-His. En esta mutante la Histidina 8 fue reemplazada por una Serina y la Histidina 99 fue eliminada ya que está muy poco conservada entre las cadenas ligeras 6aJL2 reportadas en ALBase.

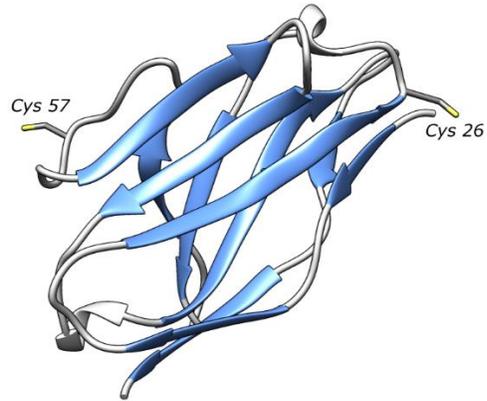


Figura 2. Estructura 3D de la proteína 6aJL2-R24G/S26C/S57C. En color amarillo se muestran las cisteínas 26 y 57. La proteína se obtuvo por modelado por homología usando el servidor SWISS-MODEL (Guex & Peitsch, 2003)

4.- Hipótesis.

Las mutaciones S26C y S57C en la proteína 6aJL2-R24G, además del marcaje con MTSL no afectan la estructura secundaria, ni en la capacidad de la proteína para formar fibras amiloides.

La unión de Zn(II) a la proteína 6aJL2-R24G induce cambios conformacionales que disminuyen su estabilidad y aumentan su amilodogenicidad.

5.- Objetivos.

5.1 Objetivo general:

Evaluar las consecuencias termodinámicas de marcar a la proteína DM-Cys con MTSL.

Evaluar el efecto del Zn(II) en la estabilidad térmica y en la agregación de las proteínas 6aJL2-R24G y DM-His.

5.2 Objetivos específicos:

- Sobreexpresar y purificar las proteínas 6aJL2-R24G, DM-Cys y DM-His
- Estudiar la estabilidad térmica de las proteínas 6aJL2-R24G y DM-His en presencia y ausencia de Zn(II)
- Estudiar la estabilidad térmica de la proteína DM-Cys
- Evaluar la cinética de formación de fibras amiloides de las proteínas 6aJL2-R24G y DM-His en presencia y ausencia de Zn(II)
- Evaluar la cinética de formación de fibras amiloides de la proteína DM-Cys en presencia y ausencia de Cu(II)
- Analizar el cambio en la estructura secundaria de las proteínas 6aJL2-R24G y DM-His inducido por la unión a Zn(II)
- Analizar el cambio en la estructura secundaria de la proteína DM-Cys inducido por la unión a Cu(II)

6.- Metodología.

6.1 Transformación y sobreexpresión.

Se transformó la cepa BL21-DE3 de *E. coli* con plásmidos pET-27b que contenían las proteínas 6aJL2-R24G, DM-Cys y la DM-His. La transformación se llevó a cabo por choque térmico colocando las células con el plásmido a 42°C por 90 segundos, e inmediatamente después se pasaron a hielo por 2 minutos. Transcurrido ese tiempo, se añadió 1 mL de medio YT2x y se incubaron a 37°C por 1 hora a 250 rpm.

Después, las muestras se centrifugaron a 1000 rpm durante un minuto para sedimentar las células, se descartó el sobrenadante y se tomaron 50 µL del botón. Se sembraron en una caja Petri con medio de cultivo LB adicionado con 60 µg/mL de kanamicina. Una vez sembradas, se incubaron a 37°C toda la noche, cuidando de no exceder las 16 horas.

Para la sobreexpresión, se seleccionó una colonia bacteriana transformada y se inoculó en medio de cultivo YT2x con 60 µg/mL de Kanamicina. Se dejó incubar a 37°C y 200 rpm hasta que se alcanzó una densidad óptica (D.O) de 0.8 a 600 nm. Se indujo la sobreexpresión de la proteína con 1mM de Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), se dejó incubar 14 horas para las proteínas 6aJL2-R24G y DM-His y 18 horas para la proteína DM-Cys a temperatura ambiente y agitación a 150 rpm.

6.2 Lisado y purificación.

El lisado se llevó a cabo por choque osmótico. Primero las células se centrifugaron a 4200 rpm y 4°C por 20 min. Se eliminó el sobrenadante y el botón se resuspendió gentilmente con una solución de sacarosa al 20%, 100 mM de Tris pH 8.0 y 1mM de EDTA y se dejó incubar a 4°C por 20 minutos. Se centrifugó a 8000 rpm y 4°C por 20 minutos, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el botón suavemente en agua fría y se dejó incubar a 4°C por 20 minutos. Por último se centrifugó a 12,000 rpm, 4°C por 40 min. La proteína se encontrará en el sobrenadante de este último paso, por lo que se filtró en una membrana con poro de 0.22 µm. Después de todo el proceso de lisis, el extracto de proteínas se concentró en un amicón con corte de 3kDa centrifugando a 3500 rpm y 4°C por el tiempo que sea necesario hasta que se alcance un volumen final de 10 mL.

Los extractos de las proteínas 6aJL2-R24G y DM-His se cargaron en una columna de intercambio aniónico, Q-sefaraosa, con buffer MES 10mM, NaCl 75mM pH 7.4 y se eluyeron con un gradiente lineal que pasó de 0 a 100% de buffer MES 10mM NaCl 1M pH 7.4. Se siguió la absorbancia de cada fracción a 280nm. Para confirmar la presencia de la proteína se realizó una electroforesis SDS-PAGE con gel de poliacrilamida al 14%.

Se juntaron todas las fracciones que contenían a la proteína y se pasaron por una columna de exclusión molecular Superdex 200 con buffer MES 10mM NaCl 75mM pH 7.4 y se siguió la absorbancia de cada fracción a 280 nm para determinar en cual se encuentra la proteína. Se comprobó la pureza de la proteína con electroforesis SDS-PAGE usando geles de poliacrilamida al 14%. Por último, se determinó la concentración de la proteína usando el coeficiente de extinción molar a 280 nm ($\epsilon = 14565 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

La proteína DM-Cys sólo se purificó por la columna de exclusión molecular con las mismas condiciones descritas arriba. Las fracciones que contenían la proteína se pasaron por un centrífugo con corte en 30kDa, centrifugando a 3500 rpm y 4°C por el tiempo que sea necesario hasta que el volumen del concentrado llegara a 1 mL. Este paso se añadió para obtener la proteína en estado monomérico lo más pura posible. Posteriormente se corrió una electroforesis SDS-PAGE usando geles de poliacrilamida al 14% para confirmar la presencia de la proteína y se determinó la concentración de la proteína usando el coeficiente de extinción molar a 280 nm ($\epsilon = 14565 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

6.3 Marcaje de la proteína DM-Cys.

El marcaje de la proteína se realizó con 3 equivalentes del reactivo MTSL disuelto en DMSO. La mezcla se incubó a 4°C con agitación orbital suave por 4 horas. Posteriormente, se lava la proteína por un amicon con corte de 3kDa para remover el exceso de MTSL.

6.4 EPR del marcaje de la DM-Cys.

Para evaluar el marcaje de la proteína, se corrió un espectro de EPR a temperatura ambiente de 2769 a 4269 Gauss, con una ganancia de 1×10^4 , frecuencia de modulación de 100,000 kHz y una amplitud de modulación de 2 Gauss.

6.5 Estabilidad térmica.

Como se mencionó anteriormente, las tres proteínas tienen en su estructura un triptófano conservado en la posición 36. La fluorescencia intrínseca de este aminoácido se encuentra apagada cuando la proteína se encuentra en su estado plegado debido a su cercanía con el puente disulfuro que se forma entre las Cys 22 y 91. En el momento en que la proteína se va desplegando, este triptófano se separa del puente disulfuro y aumenta su intensidad de fluorescencia. Es por eso que podemos determinar la estabilidad térmica de estas proteínas siguiendo la fluorescencia intrínseca del Trp 36.

La estabilidad térmica de las proteínas 6aJL2-R24G y la DM-His en presencia y ausencia de Zn(II) se evaluó en un equipo CaryEclipse siguiendo la emisión de fluorescencia a 350 nm con una excitación de 295 nm mientras la proteína se sometió a un barrido de temperatura desde 25° C hasta 60° C aumentando 1°C cada minuto. La concentración usada para cada proteína fue de 10 μM y se midió en presencia y ausencia de Zn(II) en relaciones molares de 0 a 5 eq. Los datos se ajustaron a una sigmoide usando la ecuación de Boltzmann y a partir de este ajuste se determinó la T_m de cada proteína. Este experimento se realizó por duplicado para la 6aJL2-R24G y DM-His.

6.6 Cinética de formación de fibras amiloides.

Para evaluar la cinética de formación de fibras en las proteínas 6aJL2-R24G y DM-His en presencia y ausencia de Zn(II) se siguió la fluorescencia de ThT a 480 nm, excitando a 450 nm, con agitación magnética, a 37°C para la R24G o 27°C para la DM-His. Las mediciones se tomaron cada 5 min y posteriormente cada minuto cuando la medición llegaba a un valor de 7 unidades de fluorescencia, todas las mediciones se realizaron en un fluorímetro JENWAY modelo 6285. Las proteínas se utilizaron a una

concentración de 100 μM en ausencia y presencia de 1.0, 2.0, 3.0 y 4.0 equivalentes de Zn(II) . El tiempo lag se obtuvo determinando el punto de intersección del ajuste a regresiones lineales de las fases de nucleación y elongación de la cinética. Se realizaron dos réplicas para cada proteína.

6.7 Determinación de estructura secundaria.

Para determinar si la estructura secundaria de las proteínas 6aJL2-R24G, DM-His y DM-Cys se veía afectada por la unión a los iones metálicos se corrieron experimentos de dicroísmo circular en el UV lejano. La concentración final de las tres proteínas fue 10 μM . Para el caso de la DM-Cys se realizó una titulación en ausencia y presencia de 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0 eq de Cu(II) . Para la 6aJL2-R24G y DM-His la titulación se realizó en ausencia y presencia de 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0 eq de Zn(II) . Para todos los casos se usó una celda de cuarzo de paso óptico de 0.1 cm y se midieron en un espectropolarímetro Jasco 1500. Los espectros se deconvolucionaron en el programa BestSel para obtener un valor cuantitativo de las estructuras secundarias presentes.

7.- Resultados.

7.1 DM-Cys vs Cu(II).

Sobreexpresión, lisis y purificación.

La DM-Cys se transformó, sobreexpresó y lisó siguiendo el protocolo mencionado en la metodología. En la Fig. 3a se muestra el gel de poliacrilamida del proceso de sobreexpresión y lisis celular. La proteína tiene un peso de 11,855 Da, por lo que en los carriles de después de inducir (DI), pellet sacarosa (PS) y sobrenadante de agua (SA) se espera encontrar una banda más intensa entre los 10 y 15 kDa comparada con la muestra antes de inducir (AI). En este caso se puede observar que la proteína se encuentra en esos carriles, sin embargo, también podemos observar un poco en la muestra de pellet de agua (PA), lo que nos indica que la eficiencia de la lisis no es del 100% y se perdió un poco de proteína en ese paso. Posteriormente, el sobrenadante de agua se filtró en una membrana con poro de 0.22 μm y se concentró hasta alcanzar un volumen de 10mL. El proceso de purificación se realizó como lo marca la metodología. En la Fig. 3b se muestra el cromatograma del proceso de purificación por exclusión molecular. Se tomaron todas las muestras que tenían absorbancias mayores a 0.1 y posteriormente se corrió un gel de poliacrilamida al 14% para determinar cuáles contenían a la proteína. En la Fig. 3c se observa que la proteína de interés se encontraba en las fracciones 46 a 55. Como la proteína no salía completamente pura, se decidió añadir un paso extra de purificación. Se juntaron todas las fracciones y se pasaron por un centrifón con corte en 30 kDa. En la Fig. 3d se muestra el gel de poliacrilamida al 14% de este paso. Se puede observar que una parte de la proteína no pasó por el poro del centrifón y se concentró en la parte de arriba (C30kDa), sin embargo se logró obtener una pequeña fracción de proteína pura.

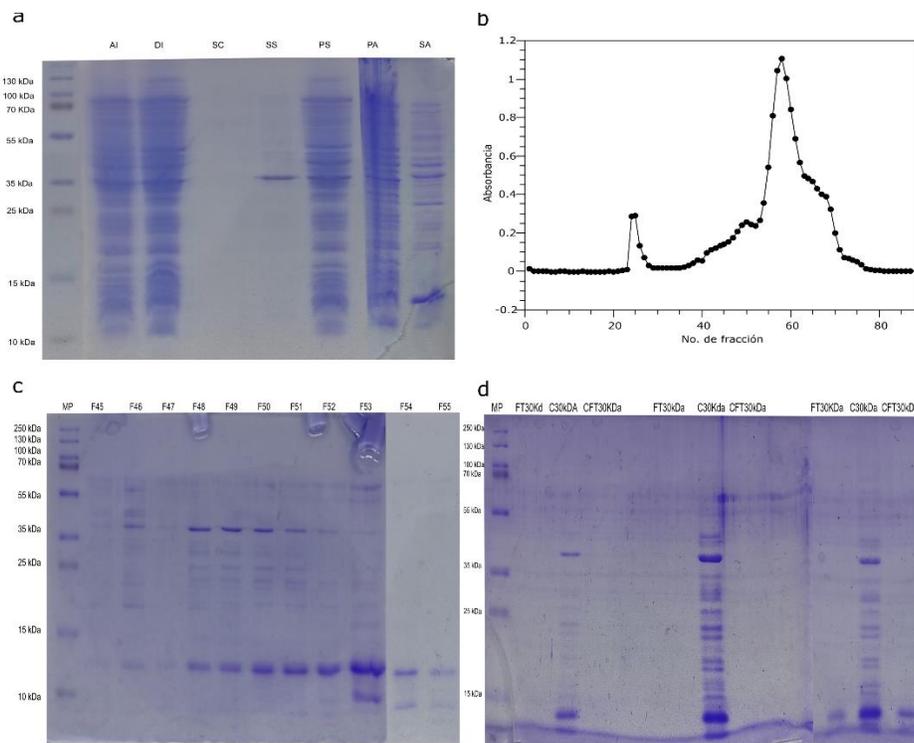


Figura 3. Sobreexpresión y purificación DM-Cys. En (a) se muestra un gel de poliacrilamida al 14% del proceso de sobreexpresión y lisis celular. En cada carril se marca la muestra que se cargó. Los rótulos indican: AI: Antes de inducir, DI: Después de inducir, SC: sobrenadante del cultivo celular después de la primera centrifugación, SS: sobrenadante de sacarosa, PS: pellet de sacarosa, PA: pellet de agua, SA: sobrenadante de agua. En (b) se muestra el cromatograma del proceso de purificación por una columna de exclusión molecular Sephadex 200. En (c) se muestra el gel del proceso de purificación de las fracciones 45 a 55. En (d) se muestra el gel de poliacrilamida del paso de la muestra por el centrífón de 30kDa. Los rótulos indican lo siguiente: MP: marcador de peso molecular, FT30kDa: Flow-through centrífón 30kDa, C30kDa: El concentrado del centrífón de 30kDa que es lo que no pasó por el poro, CFT30kDa: Concentrado del FT30kDa después de pasarlo por un centrífón con corte en 3 kDa.

Marcaje DM-Cys con MTSL.

Para el marcaje de la proteína con MTSL se seleccionaron las muestras en estado monomérico más puras y se procedió a hacer el marcaje como lo indica la metodología. Para comprobar que la proteína se haya marcado correctamente se corrió un espectro de EPR a temperatura ambiente de 2769 a 4269 Gauss. En la Fig. 4 se muestra el espectro de EPR de la proteína después de realizar el marcaje y los lavados posteriores. Se puede observar que el tercer pico es más ancho que los demás, lo que indica que el MTSL se unió a una molécula más grande. Por lo tanto, podemos concluir que la proteína se marcó de manera adecuada.

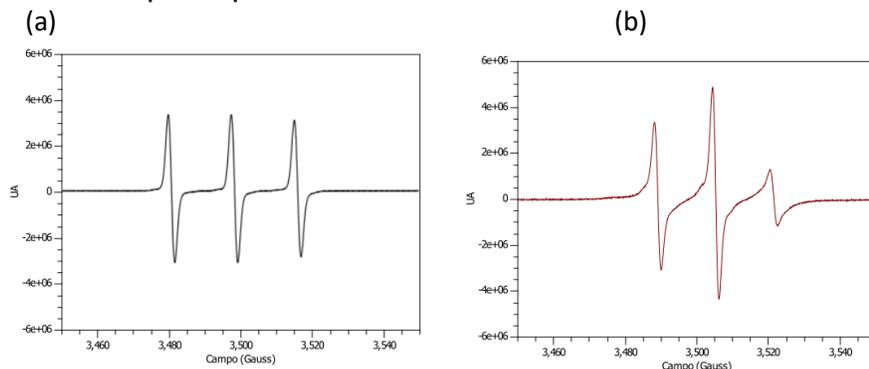


Figura 4. Espectro de EPR de la proteína marcada con MTSL. En (a) se muestra el espectro de EPR de la molécula MTSL en solución (Imagen tomada y modificada de (Klug & Feix, 2008)). En (b) se muestra el espectro de EPR obtenido de la proteína después de realizar el proceso de marcaje.

Estructura secundaria de la proteína DM-Cys en ausencia y presencia de Cu(II).

Para determinar si la unión del MTSL y la unión del Cu(II) a la DM-Cys afecta su estructura secundaria, se colectaron espectros de dicroísmo circular en ausencia y presencia de Cu(II). En la Fig. 5a se muestra el espectro de la proteína en ausencia (negro) y presencia de 1 eq (azul), 2 eq (rojo), 3 eq (naranja), 4 eq (verde) y 5 eq (magenta) de Cu(II). Se puede observar que en todos los casos la proteína presenta un máximo positivo alrededor de los 200 nm y un pico negativo a los 220 nm. Posteriormente, los datos se deconvolucionaron en el servidor web BeStSel (Micsonai, y otros, 2018). Los resultados se muestran en la Fig. 5b y en la Tabla 1; estos porcentajes de estructura secundaria concuerdan bien con los reportados de la estructura cristalina (Rudiño-Piñera, Peláez-Aguilar, Amero, & Díaz-Vilchis, 2019). En el espectro se puede observar una disminución en la intensidad de la señal en 200 nm, sin embargo, los porcentajes obtenidos en la deconvolución indican que la estructura secundaria de la proteína no se ve afectada por la unión del MTSL ni por su interacción con Cu(II).

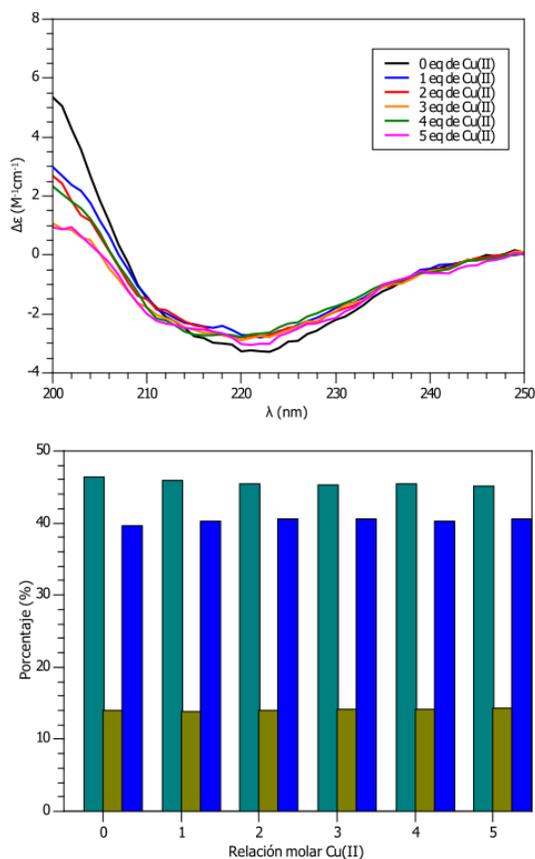


Figura 5. Determinación de estructura secundaria de la DM-Cys por DC. En (a) se muestra el espectro de DC de la DM-Cys en ausencia (línea negra) y presencia de 1 (línea azul), 2 (línea roja), 3 (línea naranja), 4 (línea verde) y 5 (línea magenta) eq de Cu(II). En (b) se muestra el porcentaje de las estructuras secundarias presentes en la proteína DM-Cys en ausencia y presencia de los diferentes equivalentes de Cu(II). En gris se presenta el porcentaje de hebras β antiparalelas, en verde el de giros y en azul otros.

Tabla 1. Porcentajes de estructura secundaria de la proteína DM-Cys obtenidos por el servidor BeStSel.

Eq. de Cu(II)	% Hebras β antiparalelas	% Giros	% Otros
0 eq	46.4	14	39.6
1 eq	45.9	13.8	40.3
2 eq	45.4	14	40.6
3 eq	45.3	14.2	40.5
4 eq	45.6	14.1	40.3
5 eq	45.1	14.3	40.6

7.2 R24G vs Zn(II): DM-His vs Zn(II).

Purificación de las proteínas R24G y DM-His

Las proteínas R24G y DM-His se transformaron, sobreexpresaron y lisaron siguiendo el protocolo mencionado en la metodología. En la Fig. 6a y 7a se muestran los geles de poliacrilamida del proceso de sobreexpresión y lisis celular de las proteínas R24G y DM-His respectivamente. Estas proteínas tienen un peso molecular de 11,853 Da (para el caso de la R24G) y de 11,885 (para la DM-His), es por eso que, al igual que para el caso de la DM-Cys, esperamos encontrar una banda más intensa entre los 10 y 15 kDa en los carriles de después de inducir (DI), pellet sacarosa (PS) y sobrenadante de agua (SA). Esto se cumplió, sin embargo, al igual que en el caso anterior, se puede observar una pequeña banda entre estos pesos moleculares en la muestra de pellet de agua (PA), lo que indica que la eficiencia de la lisis no es del 100% y se pierde un poco de proteína en ese paso, sin embargo se obtiene una muy buena concentración de proteína (Tabla 2).

El sobrenadante de agua se filtró en una membrana con poro de 0.22 μm y se concentró hasta alcanzar un volumen de 10 mL. El proceso de purificación se realizó en dos pasos. El primero fue por cromatografía de intercambio aniónico usando una columna Q-sefarosa. En las Fig 6b y 7b se muestran los cromatogramas de este paso. Se tomaron todas las muestras que presentaron absorbancias mayores a 0.5 y posteriormente se corrieron geles de poliacrilamida al 14% para determinar en cuales se encontraba la proteína (Fig 6c y 7c). Para el caso de la R24G, la proteína se encontró en las fracciones 20-24, mientras que para la DM-His se encontró en las fracciones 36-40. Se juntaron todas estas fracciones y se volvieron a purificar pero ahora por exclusión molecular en una columna Sephadex 200. En las Figuras 6d y 7d se muestran los cromatogramas del paso mencionado. En este paso solo se observó un pico intenso para ambas proteínas, se tomaron todas las muestras que formaban parte de este pico y se corrieron geles de poliacrilamida al 14% para comprobar que la proteína se encontrara en estado puro (Fig. 6e y 7e). Para el caso de la proteína R24G la proteína se encontraba en las fracciones 39-47, sin embargo, en las fracciones 39-42 se encontraba en poca concentración y había contaminantes, por lo que se decidió tomar de las fracciones 43 a 47 para los experimentos y para la DM-His la proteína se encontró en las fracciones 45-55.

Tabla 2. Concentración de proteínas 6aJL2R24G y DM-His obtenidas al término del proceso de purificación.

Proteína	Concentración (μM)	Volumen (mL)	Cantidad de medio utilizado (L)
6aJL2-R24G	81.36	15	1
DM-His	44.7	17	1

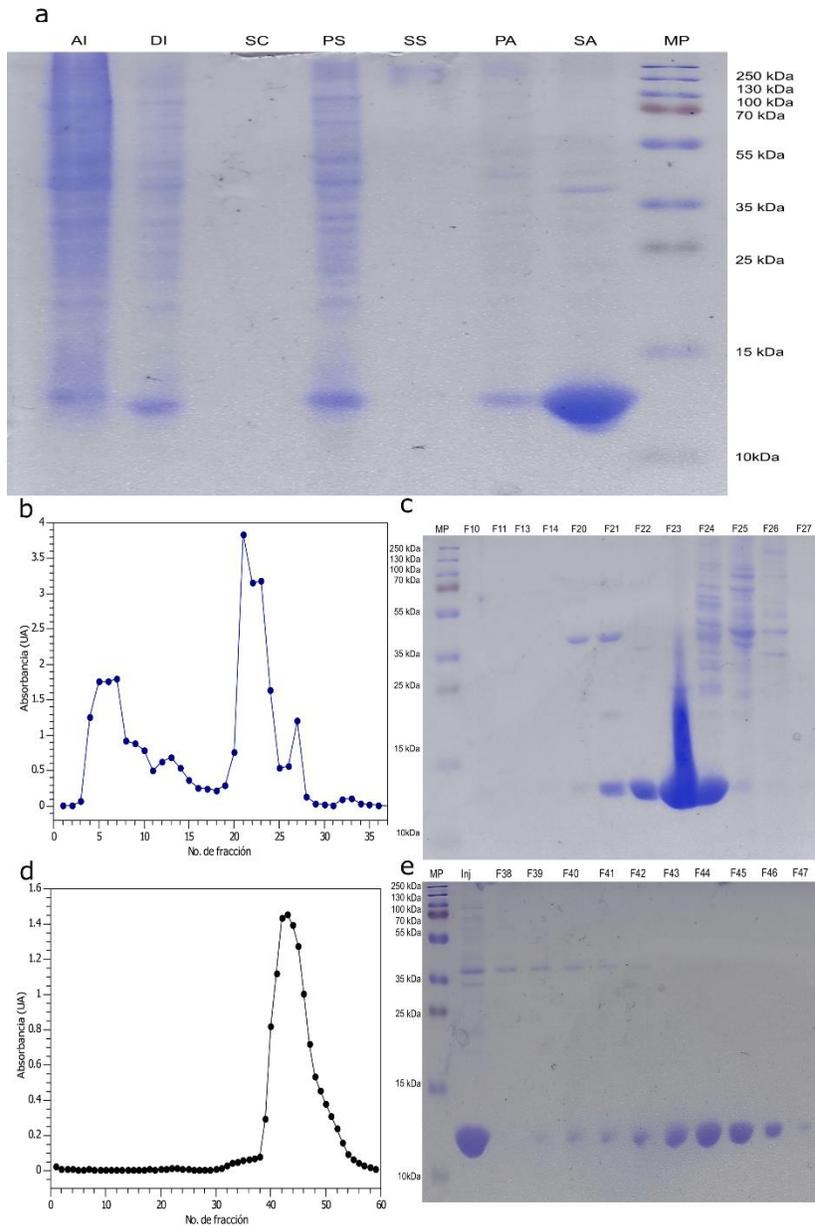


Figura 6. Sobreexpresión y purificación R24G. En (a) se muestra un gel de poliacrilamida al 14% del proceso de sobreexpresión y lisis celular. En cada carril se marca la muestra que se cargó. Los rótulos indican lo siguiente: AI: muestra antes de inducir, DI: Después de inducir, SC: sobrenadante del cultivo celular después de la primera centrifugación, PS: pellet de sacarosa, SS: sobrenadante de sacarosa, PA: pellet de agua, SA: sobrenadante de agua, MP: Marcador de peso molecular. En (b) se muestra el cromatograma del proceso de purificación por intercambio aniónico. En (c) se muestra el gel del proceso de purificación de las fracciones 10 a 14 y 20 a 27. En (d) se muestra el cromatograma del proceso de purificación por exclusión molecular. En (e) se muestra el gel del segundo proceso de purificación de las fracciones 38 a 47 y de la muestra que se inyectó al equipo (inj).

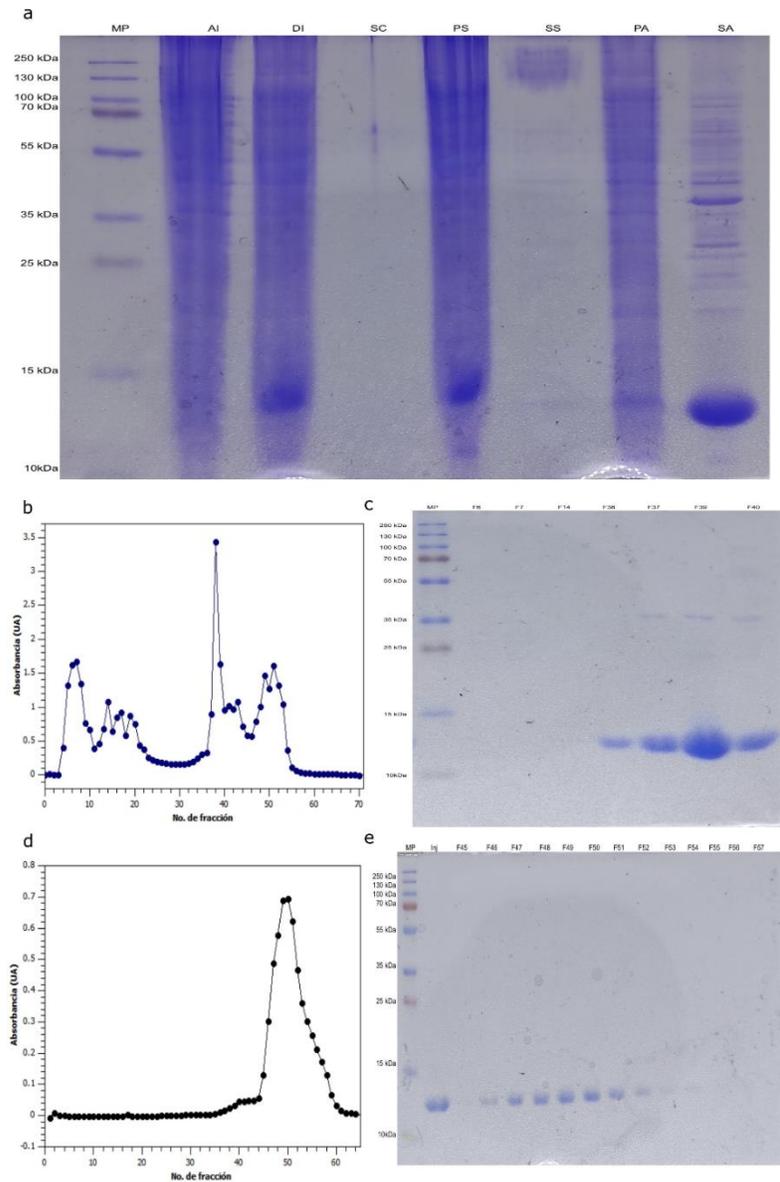


Figura 7. Sobreexpresión y purificación DM-His. En (a) se muestra un gel de poliacrilamida al 14% del proceso de sobreexpresión y lisis celular. En cada carril se marca la muestra que se cargó. Los rótulos indican lo siguiente: MP: Marcador de peso molecular, AI: muestra antes de inducir, DI: Después de inducir, SC: sobrenadante del cultivo celular después de la primera centrifugación, PS: pellet de sacarosa, SS: sobrenadante de sacarosa, PA: pellet de agua, SA: sobrenadante de agua. En (b) se muestra el cromatograma del proceso de purificación por intercambio aniónico. En (c) se muestra el gel del proceso de purificación de las fracciones 6, 7, 14, 36 a 40. En (d) se muestra el cromatograma del proceso de purificación por exclusión molecular. En (e) se muestra el gel del segundo proceso de purificación de las fracciones 45 a 57 y de la muestra que se inyectó al equipo (inj).

Efecto del Zn(II) en la estabilidad térmica de las proteínas R24G y DM-His.

Se evaluó la estabilidad térmica de las proteínas R24G y DM-His en ausencia y presencia de Zn(II). En todas las condiciones, los datos siguen una tendencia sigmoide, es por eso que se lograron ajustar los datos a la ecuación de Boltzmann para determinar la T_m de la proteína. La T_m estimada de la proteína R24G fue de $45.3 \pm 0.13^\circ\text{C}$, 45.19 ± 0.46 , 44.57 ± 0.51 , 45.05 ± 0.06 , $44.10 \pm 1.89^\circ\text{C}$ en ausencia y presencia de 1, 2, 3 y 4 eq de Zn(II), respectivamente (Fig.8a). Para el caso de la DM-His, las T_m estimadas para 0, 1, 2, 3 y 4 eq de Zn(II) fueron de $38.54 \pm 0.29^\circ\text{C}$, $38.68 \pm 0.17^\circ\text{C}$, $38.20 \pm 0.89^\circ\text{C}$, $38.51 \pm 0.19^\circ\text{C}$, $39.56 \pm 1.02^\circ\text{C}$ (Fig 8b).

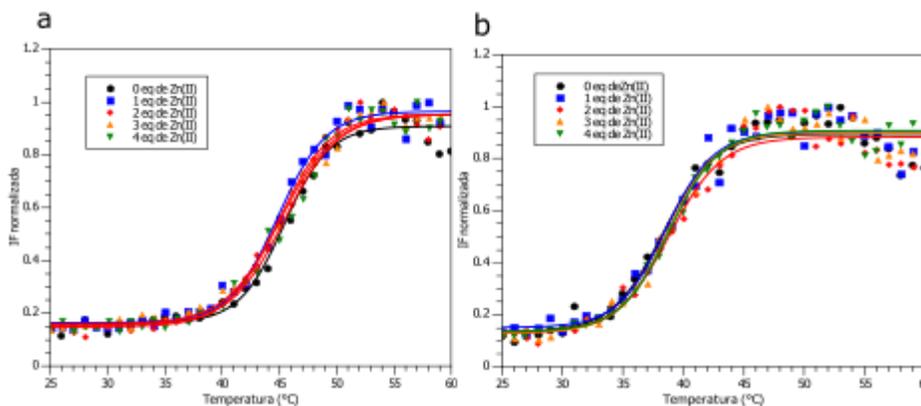


Figura 8. Despliegamiento térmico de la proteína R24G y DM-His. En (a) se muestra el despliegamiento térmico de la proteína 6aJL2-R24G en ausencia (negro) y presencia de 1 (azul), 2 (rojo), 3 (naranja) y 4 (verde) eq de Zn(II). En (b) se muestra el despliegamiento térmico de la proteína DM-Cys en ausencia (negro) y presencia de 1 (azul), 2 (rojo), 3 (naranja) y 4 (verde) eq de Zn(II).

Estructura secundaria de las proteínas R24G y DM-His en ausencia y presencia de Zn(II).

Para determinar si la unión del Zn(II) a las proteínas R24G y DM-His afecta la estructura secundaria de éstas, se realizó una titulación de las proteínas con Zn(II) y se siguió por Dicroísmo Circular (DC) en el UV-lejano. En la Fig. 9a y 9b se muestra el espectro de las proteínas en ausencia (negro) y presencia de 1 eq (azul), 2 eq (rojo), 3 eq (naranja), 4 eq (verde) y 5 eq (magenta) de Zn(II). Se puede observar que en todos los casos la proteína presenta un máximo positivo alrededor de los 208 nm y un pico negativo a los 218 nm. Además de esto, podemos observar en ambas un mínimo a los 230 nm. Este mínimo se asocia a los residuos aromáticos presentes en la proteína y está presente en ambos casos pero se aprecia con más claridad para la proteína R24G. Posteriormente, los datos se deconvolucionaron en el servidor BeStSel, los resultados se muestran en la Fig 9c, 9d y en la Tabla 3.

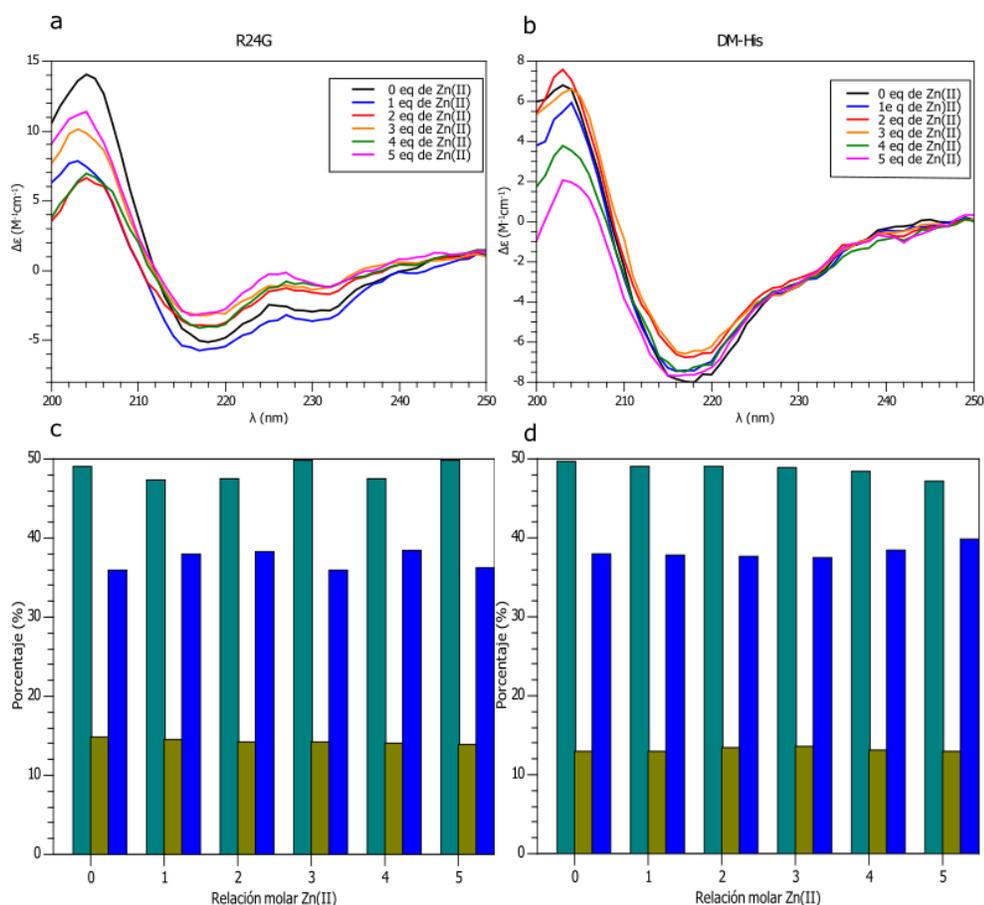


Figura 9. Determinación de estructura secundaria de las proteínas R24G y DM-His por DC. En (a) y (b) se muestran los espectros de DC de las proteínas R24G y DM-His respectivamente en ausencia (línea negra) y presencia de 1 (línea azul), 2 (línea roja), 3 (línea naranja), 4 (línea verde) y 5 (línea magenta) eq de Zn(II). En (c) y (d) se muestran los porcentajes de las estructuras secundarias presentes en las proteínas R24G y DM-His respectivamente en ausencia y presencia de los diferentes equivalentes de Zn(II). Gris hoja beta antiparalela, verde giros y azul otros.

Tabla 3. Porcentajes de estructura secundaria obtenidos por el servidor BeStSel.

Eq de Zn(II)	% Hebras β antiparalelas		% Giros		% Otros	
	R24G	DM-His	R24G	DM-His	R24G	DM-His
0 eq	49.1	49.7	14.9	12.9	36	37.9
1 eq	47.4	49.1	14.6	13	38	37.8
2 eq	47.5	49	14.2	13.4	38.3	37.6
3 eq	49.9	48.9	14.2	13.6	36	37.5
4 eq	47.5	48.4	14	13.1	38.5	38.5
5 eq	49.8	47.2	13.9	12.9	36.3	39.9

Cinética de formación de fibras amiloides de las proteínas R24G y DM-His en ausencia y presencia de Zn(II). R24G

La cinética de formación de fibras amiloides se evaluó siguiendo la fluorescencia del ThT como se indica en la metodología. En la Fig. 10 se muestran las dos réplicas de la proteína R24G. El tiempo lag calculado fue de 265.0381 ± 26.6422 min para la proteína sin Zn(II) y de 225.5431 ± 119.195 min, 215.9931 ± 122.6489 min, 157.4723 ± 12.8160 min, 132.6197 ± 0.2124 min para la proteína con 1, 2, 3 y 4 eq de Zn(II) respectivamente. Esto podría indicar que el Zn(II) acelera la formación de fibras amiloides en esta proteína a partir de 3 eq de Zn(II), sin embargo, es indispensable realizar más réplicas para poder llegar a esa conclusión.

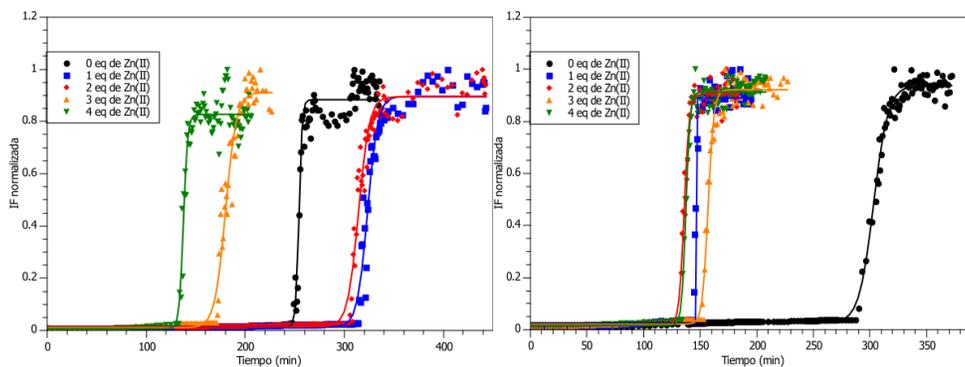


Figura 10 Cinética de formación de fibras amiloides de la proteína 6aJL2-R24G. La cinética se realizó siguiendo la intensidad de fluorescencia del ThT en ausencia (negro) y presencia de 1 (azul), 2 (rojo) y 3 (naranja) equivalentes de Zn(II).

DM-His.

La cinética de formación de fibras amiloides se evaluó siguiendo la fluorescencia del ThT como se indica en la metodología. En la Fig. 11 se muestra la cinética de la proteína DM-His. El tiempo lag calculado fue de 185.006 ± 14.77 min para la proteína sin Zn(II) y de 283.301 ± 50.47 min, 265.202 ± 59.66 min, 259.0094 ± 10.054 min para la proteína con 1, 2 y 3 eq de Zn(II) respectivamente. Estos resultados indican que el Zn(II) retrasa ligeramente la formación de fibras amiloides.

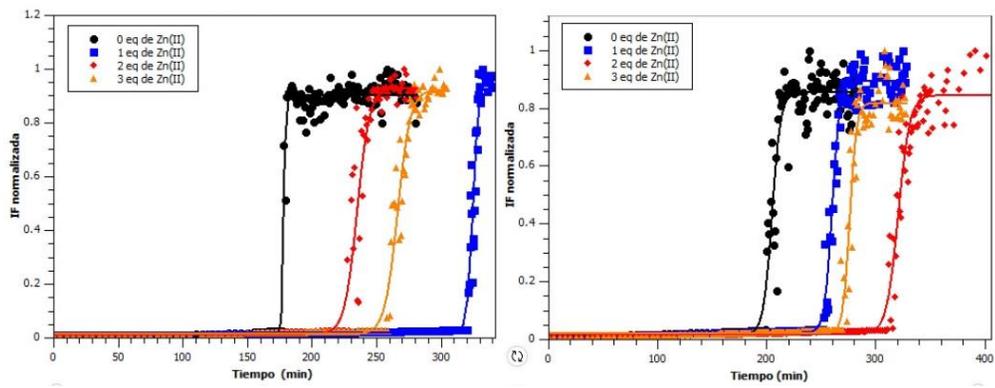


Fig. 11 Cinética de formación de fibras amiloides de la proteína DM-His. La cinética se realizó siguiendo la intensidad de fluorescencia del ThT en ausencia (negro) y presencia de 1 (azul), 2 (rojo) y 3 (naranja) equivalentes de Zn(II).

8.- Discusión.

8.1 DM-Cys vs Cu(II).

El marcador MTSL es una etiqueta de nitróxido que contiene un electrón desapareado en el orbital del átomo de nitrógeno (Klug & Feix, 2008). Como se mencionó anteriormente, en los experimentos de EPR, las partículas que se siguen son los electrones desapareados con propiedades paramagnéticas. Es por ello que para las moléculas que no contienen electrones desapareados dentro de su estructura, como el caso de las proteínas, el marcaje con este tipo de moléculas es una herramienta muy poderosa. Sin embargo, dentro de una proteína, este marcador únicamente se puede unir covalentemente a residuos de cisteínas, ya que estos son los únicos que contienen un grupo sulfhidrilo libre que es capaz de reaccionar con el grupo metanotiosulfonato presente en el MTSL. Por ello, las proteínas que se quieran seguir por este método deben tener los residuos de cisteína justo en los lugares donde se quiera colocar el marcador y por ello en algunos casos es necesario hacer ciertas mutaciones puntuales.

En este trabajo se sobreexpresó y purificó la proteína DM-Cys, en la cual se sustituyeron las serinas 26 y 57 por cisteínas. Estas únicas mutaciones comprometieron significativamente la sobreexpresión de la proteína con respecto a la proteína R24G (Fig. 3a y 6a respectivamente), pues no sólo fue mucho más complicado la sobreexpresión, sino que también el rendimiento disminuyó significativamente. Este comportamiento se ha observado en otros sistemas, sin embargo se ha reportado que no siempre se relaciona con una pérdida de función de la proteína (Perozo, Kloda, Cortes, & Martinac, 2001). Una vez se obtuvo proteína, se marcó con MTSL y se comprobó la reacción con un espectro de EPR a temperatura ambiente. En etiquetas de nitróxido, como el MTSL, el electrón desapareado interactúa con el núcleo del nitrógeno y forma así un acoplamiento hiperfino; este acoplamiento hace que se observen tres señales en el espectro de EPR (Fig. 4). En el espectro se observa un ensachamiento de las señales comparadas con las señales del MTSL libre (Fig (3) REVISAR, y esto se debe a que la unión del MTSL a la proteína restringe el movimiento de la etiqueta (Klug & Feix, 2008).

Con la proteína marcada se realizaron estudios de estructura secundaria por dicroísmo circular sin y con diferentes equivalentes de Cu(II). En todos los casos se observó un máximo aproximadamente a los 200 nm y un mínimo en 220 nm; estas dos señales son características de las hebras β . Al comparar los espectros obtenidos de la proteína marcada y la R24G (Fig. 5a y 9a respectivamente) se pueden observar algunos cambios entre ellas. Uno de esos cambios es la pérdida de señal de los 230 nm en la proteína marcada con respecto a la R24G. Esta señal se atribuye a los residuos aromáticos dentro de la proteína como las tirosinas. Dentro de la proteína R24G hay una agrupación de tirosinas (Y94, Y33, Y50, Y37, Y90) (Peláez-Aguilar, et al., 2020) y este cambio en la señal se puede atribuir a un cambio en el microambiente que rodea a estos aminoácidos y nos puede indicar que hay un cambio en la orientación de los anillos de las tirosinas o un ligero cambio en la estructura tridimensional de la proteína. Según el modelado obtenido por SWISS-MODEL la

distancia que hay entre la C57 y la Y50 es de aproximadamente 7Å sin contar el tamaño del MTSL. Es por eso que este cambio en la señal se le puede atribuir a una reorganización en esta agrupación debida a la introducción de la C57 junto con el marcador. A pesar de estas diferencias, los resultados de la deconvolución indican que no hay diferencias significativas en la estructura secundaria de la proteína (Fig. 5b y 9c). Al evaluar el efecto de la interacción con Cu(II) se observó que hay una pequeña disminución de la estructura de hebras β antiparalelas y un aumento de estructuras aleatorias cuando se aumenta la cantidad de Cu(II) en el sistema, presentando una disminución de 1.3% de hebras β antiparalelas y un aumento del 1% en estructuras aleatorias cuando se comparan los resultados de la deconvolución de 0 y 5 eq de Cu(II). Sin embargo, estos cambios no son significativos, por lo tanto, se puede concluir que la interacción con Cu(II) de la proteína DM-Cys marcada con MTSL no causa cambios significativos en la estructura secundaria de la proteína, esto está en concordancia para la proteína R24G donde se observó que el Cu(II) no induce cambios en la estructura secundaria de la proteína (Peláez-Aguilar, et al., 2020).

Es importante realizar cinéticas de formación de fibras y curvas de desplegamiento térmico de esta variante en ausencia y presencia de Cu(II). Desafortunadamente la concentración de proteína fue muy baja y no fue posible realizar estos experimentos.

8.2 R24G y DM-His vs Zn(II).

Se ha reportado que los iones metálicos juegan un papel importante en el desarrollo de algunas enfermedades conformacionales como el Alzheimer (Miura, Suzuki, Kohata, & Takeuchi, 2000), el Parkinson (Uversky, Li, & Fink, 2001), y la diabetes mellitus tipo II (Rivillas-Acevedo, Sánchez-López, Amero, & Quintanar, 2015); sin embargo el rol de estos dentro de la amiloidosis de cadena ligera aún no está del todo explorado. Recientemente se reportó que el Cu(II) acelera la formación de fibras amiloides y reduce la estabilidad térmica de la cadena ligera 6aJL2-R24G y se propuso que las Histidinas 99 y 8 son claves para este comportamiento (Peláez-Aguilar, et al., 2020). Sin embargo, hasta la fecha no se han tenido más reportes del efecto de otros iones metálicos en la agregación de esta proteína. Es por eso que en este trabajo se evaluó el efecto del Zn(II) en la agregación de la proteína 6aJL2-R24G. Además, se evaluó el papel de las Histidinas en la interacción con Zn(II) con la proteína DM-His. Para la estabilidad térmica se siguió la fluorescencia intrínseca del triptófano 36 cuando la proteína se sometía a un barrido de temperatura que fue de los 25 a los 60°C (Fig 8). Los valores de las T_m no variaron significativamente entre las proteínas sin y con los diferentes equivalentes de Zn(II), lo que significa que este ion metálico, a diferencia de los datos reportados para el Cu(II), no reduce la estabilidad térmica de la proteína R24G ni de la DM-His. Sin embargo, se puede observar que las T_m de ambas proteínas sin Zn(II) varían con respecto a la otra, obteniendo valores de $45.3 \pm 0.13^\circ\text{C}$ para la R24G y $38.54 \pm 0.29^\circ\text{C}$ para la DM-His. Por estudios previos, se sabe que la delección de la His99 hace que la proteína sea más inestable termodinámicamente (Pelaez-Aguilar, 2021)

El análisis de estructura secundaria de la proteína R24G y DM-His indica que la sustitución y delección de las histidinas no afecta la estructura secundaria de la proteína (Figura 9), pero es posible observar que la señal de 230nm, característica de residuos aromáticos, no está presente en la proteína DM-His (Fig. 9a y 9b), lo que indica un ligero cambio en estructura terciaria de la proteína y que podría correlacionarse con

la pérdida de estabilidad térmica. De igual manera, la interacción con Zn(II) de ambas proteínas no induce cambios en estructura secundaria y la señal de 230nm no cambia para ninguna de las dos proteínas a lo largo de la titulación. La deconvolución para la proteína R24G (Fig. 9c y tabla 3) mostró que los datos fluctuaron entre 49 y 47% para hebras β antiparalelas, de la misma manera, para la DM-His (Fig. 9d y tabla 3), se observó que a medida que aumenta la concentración del ion metálico, el porcentaje de hebra β antiparalela disminuye 2.5%, mientras que el de las estructuras aleatorias aumenta 2%, pero estos cambios no son significativos. Todo esto indica que la interacción con Zn(II) no afecta la estructura secundaria de las proteínas.

Finalmente, las cinéticas de agregación de la proteína R24G en ausencia y presencia de 0 a 4 eq de Zn(II) (Fig. 10) muestran tiempos lag de 265.0381 ± 26.6422 min, 225.5431 ± 119.195 min, 215.9931 ± 122.6489 min, 157.4723 ± 12.8160 min, 132.6197 ± 0.2124 min. Se puede observar que los datos de 1 y 2 eq de Zn(II) presentan desviaciones estándar muy grandes, esto es debido a que las cinéticas variaron mucho entre réplicas, por lo que no es posible decir si la interacción con Zn(II) tiene efecto o no en la formación de fibras amiloides de la proteína R24G. Por otro lado, los tiempos lag en presencia de 3 eq y 4 eq de Zn(II) presentan buena reproducibilidad y es posible concluir que 3 y 4 eq de Zn(II) aceleran la formación de fibras.

Para probar el efecto de las Histidinas en la agregación, también se realizaron cinéticas de agregación de la DM-His (Fig. 11). Tomando en cuenta los datos obtenidos en el desplegamiento térmico, se decidió correr estas cinéticas a una temperatura de 27°C para estar completamente seguros que cualquier efecto observado en las cinéticas fuera debido a la interacción con Zn(II). Los tiempos lag calculados desde 0 hasta 3 eq. de Zn(II) fueron 185.006 ± 14.77 min y de 283.301 ± 50.47 min, 265.202 ± 59.66 min, 259.0094 ± 10.054 min para la proteína con 1, 2 y 3 eq de Zn(II) respectivamente. El tiempo lag de la proteína sin Zn(II) es menor que el de la proteína R24G, lo cual es debido a la pérdida de estabilidad térmica inducida por la sustitución y la delección de las histidinas (Pelaez-Aguilar, 2021). En todos los casos se obtuvo buena reproducibilidad entre réplicas y se puede observar que el Zn(II) retrasa la formación de fibras amiloides. Todo lo anterior, y tomando en cuenta que para la proteína R24G el comportamiento de las cinéticas de agregación en presencia de Zn(II) fue el contrario, se puede decir que las histidinas 8 y 99 son importantes para la interacción con Zn(II). Sin embargo, se necesitan más estudios para postular una interpretación de estos resultados. Por ejemplo, son necesarios estudios de afinidad de las proteínas por Zn(II) y de RMN para determinar la cantidad y los posibles sitios de unión. Posteriormente, es ideal realizar estudios de dinámica molecular para explicar el efecto.

9.- Conclusiones.

1. Las mutaciones S26C y S57C hacen que la sobreexpresión de la proteína 6aJL2-R24G/S26C/S57C en la cepa de *E. coli* BL21-DE3 sea menos eficiente.
2. El protocolo utilizado fue el adecuado para llevar a cabo el marcaje de la proteína DM-Cys.
3. La proteína DM-Cys marcada con MTL5 no presenta cambios significativos en su estructura secundaria comparada con la proteína R24G.
4. La interacción con Cu(II) de la DM-Cys marcada con MTL5 no induce cambios en la estructura secundaria de la proteína.
5. Las mutaciones H8S y dH99 hacen que la proteína sea termodinámicamente más inestable.
6. La interacción con Zn(II) no afecta la estabilidad térmica de las proteínas R24G y DM-His.
7. La unión del Zn(II) a las proteínas R24G y DM-His no induce cambios significativos en su estructura secundaria.
8. El Zn(II) acelera la formación de fibras amiloides in vitro de R24G, a partir de 3eq.
9. Las histidinas 8 y 99 parecen ser importantes para la agregación de la proteína inducida por Zn(II).

10.- Perspectivas.

1. Realizar cinéticas de agregación de fibras amiloides de la DM-Cys marcada en presencia y ausencia de Cu(II)
2. Realizar curvas de estabilidad térmica de la DM-Cys marcada con MTL5 en presencia y ausencia de Cu(II)
3. Evaluar la afinidad de la DM-Cys marcada por el Cu(II)
4. Realizar más réplicas de las cinéticas de formación de fibras en presencia y ausencia de Zn(II)
5. Evaluar la afinidad de las proteínas R24G y DM-His al Zn(II)
6. Realizar estudios de RMN para conocer los sitios de unión del Zn(II) en la R24G

11.- Referencias.

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., . . . Hunt, T. (2015). *Biología molecular de la célula* (Sexta ed.). OMEGA.
- Bell, S. C., Mall, M. A., Gutierrez, H., Macek, M. M., Davies, J. C., ..., & Ratjen, F. (2020). The future of cystic fibrosis care: a global perspective. *The Lancet Respiratory Medicine*, *8*(1), 65-124. doi:[https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(19\)30337-6](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(19)30337-6)
- Bertini, I., Gray, H. B., Lippard, S. J., & Valentine, J. S. (1994). *Bioinorganic chemistry*. University science books.
- Binolfi, A., Rasia, R. M., Bertoncini, C. W., Ceolin, M., Zweckstetter, M., Griesinger, C., . . . Fernández, C. O. (2006). Interaction of α -synuclein with divalent metal ions reveals key differences: A link between structure, binding specificity and fibrillation enhancement. *Journal of the American Chemical Society*, *128*(30), 9893-9901.
- Blancas-Mejia, L. M., Misra, P., Dick, C. J., Cooper, S. A., Redhage, K. R., Bergman, M. R., . . . Ramirez-Alvarado, M. (2018). Immunoglobulin light chain amyloid aggregation. *Chemical communications*, *54*(76), 10664-10674. doi:<https://doi.org/10.1039/C8CC04396E>
- Borotto, N. B., Zhang, Z., Dong, J., Burant, B., & Vachet, R. W. (2017). Increased β -Sheet Dynamics and D-E Loop Repositioning Are Necessary for Cu(II)-Induced Amyloid Formation by β -2-Microglobulin. *Borotto, N. B.; Zhang, Z.; Dong, J.; Burant, B.; Vachet, R. W. Increased β -Sheet Dynamics and D-E Loop Biochemistry*, *56*, 1095-1104.
- Brody, T. (1999). Inorganic nutrients. In *Nutritional Biochemistry, 2nd ed.* (pp. 693-852). Academic Press.
- Carrell, R. W., & Lomas, D. A. (1997). Conformational disease. *The Lancet*, *350* (9071), 134-138. doi:[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)02073-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)02073-4)
- Chiti, F., & Dobson, C. (2017). Protein misfolding, amyloid formation, and human disease: a summary of progress over the last decade. . *Annual review of biochemistry*, *86*, 27-68.
- Davis, D. P., Gallo, G., Vogen, S. M., Dul, J. L., Sciarretta, K. L., Kumar, A., . . . Argon, Y. (2001). Both the environment and somatic mutations govern the aggregation pathway of pathogenic immunoglobulin light chain. *Journal of molecular biology*, *313*(5), 1021-1034. doi:<https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5092>
- del Pozo Yauner, L., Ortiz, E., Sánchez, R., Sánchez-López, R., Güereca, L., Murphy, C. L., . . . Becerril, B. (2008). Influence of the germline sequence on the thermodynamic stability and fibrillogenicity of human lambda 6 light chains. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, *72*(2), 684-692. doi: <https://doi.org/10.1002/prot.21934>
- Desport, E., Bridoux, F., Sirac, C., Delbes, S., Bender, S., Fernandez, B., & ... Jaccard, A. (2012). AL amyloidosis. *Orphanet journal of rare diseases*, *7*(1), 1-13. doi:<https://doi.org/10.1186/1750-1172-7-54>

- Dobson, C. M. (2003). Protein folding and misfolding. *Nature*, 426 (6968), 884-890. doi:<https://doi.org/10.1038/nature02261>
- Dong, J., Joseph, C. A., Borotto, N. B., Gill, V. L., Maroney, M., & Vachet, R. W. (2014). Unique effect of Cu(II) in the metal-induced amyloid formation of β -2-microglobulin. *Biochemistry*, 53, 1263-1274.
- González-Andrade, M., Becerril-Luján, B., Sánchez-López, R., Ceceña-Álvarez, H., Pérez-Carreón, J. I., Ortiz, E., . . . del Pozo-Yauner, L. (2013). Mutational and genetic determinants of λ 6 light chain amyloidogenesis. *The FEBS journal*, 280(23), 6173-6183. doi:<https://doi.org/10.1111/febs.12538>
- Guex, N., & Peitsch, M. C. (2003). SWISS-MODEL: an automated protein SWISS-MODEL: an automated protein. *Nucleic Acids Res*, 3381-3385.
- Jobling, M. F., Huang, X., Stewart, L. R., Barnham, K. J., Curtain, C., Volitakis, I., . . . Cappai, R. (2001). Copper and zinc binding modulates the aggregation and neurotoxic properties of the prion peptide PrP106-126. *Biochemistry*, 40, 8073-8084.
- Kessel, A., & Ben-Tal, N. (2018). *Introduction to proteins: Structure, function, and motion* (Second ed.). CRC Press.
- Klug, C. S., & Feix, J. B. (2008). Methods and applications of site-directed spin labeling EPR spectroscopy. In *Methods in cell biology* (Vol. 84, pp. 617-658). doi:[https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(07\)84020-9](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(07)84020-9)
- Kopito, R. R., & Ron, D. (2000). Conformational disease. *Nature cell biology*, 2(11), E207-E209. doi:<https://doi.org/10.1038/35041139>
- Linder, M. C., & Hazegh-Azam, M. (1996). Copper biochemistry and molecular biology. *The American journal of clinical nutrition*, 63(5), 797S-811S. doi:<https://doi.org/10.1093/ajcn/63.5.797>
- Luna-Martínez, O. D., Hernández-Santoyo, A., Villalba-Velázquez, M. I., Sánchez-Alcalá, R., Fernández-Velasco, D. A., & Becerril, B. (2017). Stabilizing an amyloidogenic λ 6 light chain variable domain. *The FEBS Journal*, 284(21), 3702-3717. doi: <https://doi.org/10.1111/febs.14265>
- Maya-Martinez, R., Gil-Rodriguez, P., & Amero, C. (2015). Solution structure of 6aJL2 and 6aJL2-R24G amyloidogenesis light chain proteins. *Biochemical and biophysical research communications*, 456(2), 695-699. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.12.044>
- Melanson, M., Sood, A., & Török, F. (2013). Introduction to spin label electron paramagnetic resonance spectroscopy of proteins. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 41(3), 156-162. doi: <https://doi.org/10.1002/bmb.20677>
- Merlini, G., & Bellotti, V. (2003). Molecular mechanisms of amyloidosis. *New England Journal of Medicine*, 349(6), 583-596. doi:10.1056/NEJMra023144
- Merlini, G., Dispenzieri, A., Santhorawala, V., Schönland, S. O., Palladini, G., Hawkins, P. N., & Gertz, M. A. (2018). Systemic immunoglobulin light chain amyloidosis. *Nature reviews Disease primers*, 4(1), 1-19. doi:<https://doi.org/10.1038/s41572-018-0034-3>

- Micsonai, A., Wien, F., Bulyáki, É., Kun, J., Moussong, É., Lee, Y. H., . . . Kardos, J. (2018). BeStSel: a web server for accurate protein secondary structure prediction and fold recognition from the circular dichroism spectra. *Nucleic acids research*, *46*(W1), W315-W322. doi:<https://doi.org/10.1093/nar/gky497>
- Miura, T., Suzuki, K., Kohata, N., & Takeuchi, H. (2000). Metal binding modes of Alzheimer's amyloid β -peptide in insoluble aggregates and soluble complexes. *Biochemistry*, *39*(23), 7024-7031. doi:<https://doi.org/10.1021/bi0002479>
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2018). *Lehninger: principles of biochemistry* (seventh ed.). Macmillan Higher Education.
- Nordberg, G. F., Fowler, B. A., & Nordberg, M. (. (2015). In D. G. Ellingsen, L. Birk Moller, J. C. Aaseth, G. Nodberg, B. A. Fowler, & M. Nordberg (Eds.), *Handbook on the Toxicology of Metals* (pp. 765-786). Academic press.
- Onuchic, J. N., & Wolynes, P. G. (2004). Theory of protein folding. *Current opinion in structural biology*, *14*(1), 70-75. doi:<https://doi.org/10.1016/j.sbi.2004.01.009>
- Pelaez-Aguilar, A. E. (2021). Caracterización de la interacción de Cu²⁺ con la proteína 6aJL2-R24G,. Cuernavaca, Morelos, México. Retrieved from <http://riaa.uaem.mx/handle/20.500.12055/1392>
- Peláez-Aguilar, A. E., Valdés-García, G., French-Pacheco, L., Pastor, N., Amero, C., & Rivillas-Acevedo, L. (2020). Site-Specific Interactions with Copper Promote Amyloid Fibril Formation for λ 6aJL2-R24G. *ACS omega*, *5*(13), 7085-7095. doi:<https://doi.org/10.1021/acsomega.9b03220>
- Perozo, E., Kloda, A., Cortes, D. M., & Martinac, B. (2001). ite-directed spin-labeling analysis of reconstituted Mscl in the closed state. *The Journal of general physiology*, *118*(2), 193-206. doi:<https://doi.org/10.1085/jgp.118.2.193>
- Quintanar, L., & Rivillas-Acevedo, L. (2013). Studying metal ion–protein interactions: electronic absorption, circular dichroism, and electron paramagnetic resonance. In *Protein-Ligand Interactions* (pp. 267-297). Humana Press. doi:https://doi.org/10.1007/978-1-62703-398-5_10
- Ramirez-Alvarado, M. (2012). Amyloid formation in light chain amyloidosis. *Current topics in medicinal chemistry*, *12*(22), 2523-2533. doi:<https://doi.org/10.2174/1568026611212220007>
- Rivillas-Acevedo, L., Sánchez-López, C., Amero, C., & Quintanar, L. (2015). Structural basis for the inhibition of truncated islet amyloid polypeptide aggregation by Cu (II): insights into the bioinorganic chemistry of type II diabetes. *Inorganic chemistry*, *54*(8), 3788-3796. doi:<https://doi.org/10.1021/ic502945k>
- Rudiño-Piñera, E., Peláez-Aguilar, Á. E., Amero, C., & Díaz-Vilchis, A. (2019). Crystal structure of 6aJL2-R24G light chain variable domain: Does crystal packing explain amyloid fibril formation? *Biochemistry and biophysics reports*, *20*, 100682. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2019.100682>

- Schroeder Jr, H. W., & Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *125*(2), S41-S52. doi:https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.046
- Sharpley, F. A., Manwani, R., Mahmood, S., Sachchithanatham, S., Lachmann, H. J., Gillmore, J. D., . . . Wechalekar, A. D. (2019). A novel mass spectrometry method to identify the serum monoclonal light chain component in systemic light chain amyloidosis. *Blood cancer journal*, *9*(2), 1-4. doi:https://doi.org/10.1038/s41408-019-0180-1
- Sipe, J. D., Benson, M. D., Buxbaum, J. N., Ikeda, S. I., Merlini, G., Saraiva, M. J., & Westermark, P. (2016). Amyloid fibril proteins and amyloidosis: chemical identification and clinical classification International Society of Amyloidosis 2016 Nomenclature Guidelines. *Amyloid*, *23*(4), 209-213. doi:https://doi.org/10.1080/13506129.2016.1257986
- Skolnick, J., & Gao, M. (2021). The role of local versus nonlocal physicochemical restraints in determining protein native structure. *Current Opinion in Structural Biology*, *68*, 1-8. doi:https://doi.org/10.1016/j.sbi.2020.10.008
- Solomon, A., & Weiss, D. T. (1995). Protein and host factors implicated in the pathogenesis of light chain amyloidosis (AL amyloidosis). *Amyloid*, *2*(4), 269-279. doi:https://doi.org/10.3109/13506129508999010
- Sulatsky, M. I., Sulatskaya, A. I., Povarova, O. I., Antifeeva, I. A., Kuznetsova, I. M., & Turoverov, K. K. (2020). Effect of the fluorescent probes ThT and ANS on the mature amyloid fibrils. *Prion*, *14*(1), 67-75. doi:https://doi.org/10.1080/19336896.2020.1720487
- Surguchev, A., & Surguchov, A. (2010). Conformational diseases: looking into the eyes. *Brain research bulletin*, *81*(1), 12-24. doi:https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2009.09.015
- Uversky, V. N., Fernández, A., & Fink, A. L. (2006). Structural and Conformational Prerequisites of Amyloidogenesis. In *Protein Misfolding, Aggregation, and Conformational Diseases* (pp. 1-20).
- Uversky, V. N., Li, J., & Fink, A. L. (2001). Metal-triggered Structural Transformations, Aggregation, and Fibrillation of Human α -Synuclein: A Possible Molecular Link between Parkinson's Disease and Heavy Metal Exposure. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(47), 44284-44296. doi:https://doi.org/10.1074/jbc.M105343200
- Valdés-García, G., Millan-Pacheco, C., & Pastor, N. (2017). Convergent mechanisms favor fast amyloid formation. *Biopolymers*, *107*(8), e23027. doi:https://doi.org/10.1002/bip.23027
- Wechalekar, A. D., Gillmore, J. D., & Hawkins, P. N. (2016). Systemic amyloidosis. *The Lancet*, *387*(10038), 2641-2654. doi:https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01274-X