



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR

**Caracterización del Efecto del Zn(II) en la Formación  
de Fibras Amiloides de la Proteína 6aJL2-R24G**

**T E S I S**

PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

*Lic. En C. Alan Morales Ortiz*

DIRECTOR DE TESIS:

*Dra. Lina Andrea Rivillas Acevedo.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyt) por la beca otorgada y al proyecto A1-S-22109.

A la Dra. Lina Andrea Rivillas Acevedo por su tiempo, paciencia, dedicación, por todos los conocimientos transmitidos y por los momentos compartidos.

A mi comité tutorial por sus comentarios y aportaciones de cada semestre.

Al jurado revisor de tesis por dedicar tiempo para leer mi proyecto, por sus comentarios y aportaciones a esta tesis.

Al Dr. Carlos Amero Tello por permitirme usar los equipos de su laboratorio, por sus comentarios y sugerencias.

A mis compañeras de laboratorio por su ayuda, comentarios, sugerencias, en especial a María Fernanda y por los momentos compartidos.

A mis padres, hermana y amigos que me apoyaron durante toda la maestría, que siempre creyeron en mí y me motivaron a seguir adelante.

# ÍNDICE

INTRODUCCIÓN .....	1
FUNDAMENTOS DE LAS PROTEÍNAS.....	1
AMILOIDOSIS .....	1
ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA 6aJL2-R24G.....	3
IONES METÁLICOS COMO FACTORES DE RIESGO .....	5
HIPÓTESIS.....	8
OBJETIVOS.....	8
GENERAL .....	8
ESPECÍFICOS .....	8
METODOLOGÍA.....	8
SOBREEXPRESIÓN DE PROTEÍNAS.....	8
PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS .....	9
EVALUACIÓN DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA .....	10
CINÉTICAS DE FORMACIÓN DE FIBRAS AMILOIDES .....	10
MORFOLOGÍA DE LAS FIBRAS AMILOIDES.....	10
AFINIDAD DE LAS PROTEÍNAS POR Zn(II).....	11
PREDICCIÓN DE SITIOS DE INTERACCIÓN CON Zn(II) .....	11
RESULTADOS.....	12
SOBREEXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN.....	12
ESTABILIDAD TÉRMICA .....	13
CAMBIOS EN ESTRUCTURA SECUNDARIA.....	14
CINÉTICAS DE FORMACIÓN DE FIBRAS AMILOIDES .....	17
MORFOLÓGÍA DE LAS FIBRAS AMILOIDES.....	19
AFINIDAD POR Zn(II) .....	19
ESTIMACIÓN DE SITIOS DE INTERACCIÓN .....	20
DISCUSIÓN.....	23
PERSPECTIVAS.....	25
REFERENCIAS.....	25
ANEXOS.....	30
ANEXO A: CINÉTICAS DE FORMACIÓN DE FIBRAS AMILOIDES .....	30
ANEXO B: AFINIDAD DEL Zn(II) POR LAS PROTEÍNAS R24G Y VARIANTES DE HISTIDINA.....	32

# INTRODUCCIÓN

## FUNDAMENTOS DE LAS PROTEÍNAS

Las proteínas son macromoléculas biológicas complejas compuestas por una secuencia de aminoácidos que es codificada por un gen. Estas macromoléculas son las más abundantes en las células y desempeñan diversas funciones en el organismo y dentro de cada célula, ya sea que participen en regular el metabolismo, mantener la estructura celular, regenerar tejidos, transportar otras moléculas, replicar, transcribir y traducir el DNA y reconocer agentes infecciosos, entre otros.

La función de las proteínas depende de su estructura tridimensional, la cual está dictada por su secuencia de aminoácidos. Esta secuencia varía tanto en diversidad como en longitud, habiendo proteínas de tan solo 76 aminoácidos como la ubiquitina, encargada de marcar otras proteínas para su degradación, hasta proteínas de 34,350 aminoácidos como la titina, encargada del buen funcionamiento de los músculos. Así, cada proteína tiene una estructura distinta y por ende una función distinta.

La complejidad estructural de las proteínas se divide en cuatro niveles<sup>1</sup>. La estructura primaria se refiere a todos los enlaces covalentes (principalmente enlaces peptídicos y puentes disulfuro) que unen a los aminoácidos formando una cadena polipeptídica; la estructura secundaria se refiere a arreglos locales de los átomos de cadena principal, formando patrones estructurales como  $\alpha$ -hélices y hojas- $\beta$ . La estructura terciaria se refiere a los contactos entre cadenas laterales de la proteína y la estructura cuaternaria, cuando el complejo proteico consta de más de una subunidad. A la conformación en la cual las proteínas son funcionales, independientemente del nivel de complejidad estructural, se le denomina conformación nativa.

La conformación nativa de las proteínas puede verse afectada por distintas razones, como el pH, la temperatura y mutaciones, las cuales pueden afectar el ambiente químico y las interacciones normales de la proteína, provocando desplegamiento parcial o total y pérdida de función.

## AMILOIDOSIS

La amiloidosis es un conjunto de enfermedades que ocurren cuando una proteína pierde su conformación nativa y se vuelve propensa a formar agregados insolubles que se depositan en órganos y tejidos hasta ocasionar su falla y eventualmente la muerte. Estas proteínas parcial o totalmente desplegadas pueden formar agregados de tipo no fibrilar o estructuras compactas y altamente ordenadas conocidas como fibras amiloides<sup>2</sup>.

La amiloidosis puede ser localizada o sistémica. En el caso de la amiloidosis localizada la proteína involucrada se acumula en órganos específicos como es el caso de las proteínas beta amiloide y tau en la enfermedad de Alzheimer. La proteína beta amiloide consta de entre 39 y 43 aminoácidos, y es el producto de la proteólisis de la proteína precursora amiloide (APP) que se deposita en el cerebro extracelularmente formando placas que impiden la comunicación neuronal o en los vasos sanguíneos cerebrales, afectando el flujo de nutrientes al cerebro. Por otro lado, la proteína tau se acumula en las neuronas de manera intracelular en forma de ovillos<sup>3</sup>.

En la amiloidosis sistémica, que puede ser adquirida o hereditaria, las proteínas viajan a través del torrente sanguíneo y se depositan en varios órganos a la vez, por ejemplo, las cadenas ligeras de inmunoglobulinas<sup>4</sup>. La amiloidosis hereditaria más común es la relacionada con la proteína transtirretina (TTR), involucrada frecuentemente en cardiomiopatías amiloides familiares, para la cual se conocen entre 80 y 120 mutaciones en el gen, capaces de volverla amiloidogénica<sup>4,5</sup>. Hasta la fecha se conocen 37 péptidos o proteínas involucradas en amiloidosis<sup>2</sup>.

Existen diferentes terapias para tratar algunas de las amiloidosis, sin embargo, es imprescindible saber cuál es la proteína involucrada antes de comenzar el tratamiento. La amiloidosis localizada sólo puede tratarse con cirugía, pero en el caso del Parkinson y el Alzheimer esto no es posible. En las amiloidosis sistémicas se intenta disminuir la cantidad de proteína precursora de amiloidosis mediante quimioterapia y es necesario un cuidado estricto, así como diálisis y en ocasiones trasplantes de órganos<sup>5</sup>. Se ha observado que disminuir la cantidad de proteína precursora puede revertir la disfuncionalidad en los órganos<sup>4</sup> por lo que se ha vuelto el objetivo de las terapias. Además, hacer trasplantes simultáneos de hígado y riñones prolonga considerablemente el tiempo de vida del paciente<sup>6</sup>.

La amiloidosis de cadena ligera (AL) es la amiloidosis sistémica más común<sup>7</sup>. Estudios realizados entre 1990 y 2015 en Estados Unidos de América y Europa mostraron una incidencia de 12 personas con AL al año por cada millón de personas<sup>4</sup>. Sin embargo, la incidencia varía dependiendo de la región donde se realicen los estudios; por ejemplo, en Buenos Aires, Argentina en el 2010 se registró una incidencia de 6.1 casos al año por cada millón de personas<sup>8</sup>. Por otra parte, en Suecia se registró una incidencia de 3 casos al año por cada millón de personas entre 2001 y 2018<sup>9</sup>. A pesar de que la incidencia es baja, la enfermedad es mortal en todos los casos.

Normalmente AL está asociada a un desorden llamado mieloma múltiple, caracterizado por la proliferación de las células plasmáticas, produciendo mayor número de cadenas ligeras de inmunoglobulinas que se depositan de forma extracelular acumulándose en órganos y tejidos hasta ocasionar su falla. Los principales órganos afectados son el corazón, el hígado y los

riñones, aunque también puede depositarse en médula ósea, sistema nervioso periférico y el tracto gastrointestinal<sup>4</sup>.

Se ha demostrado que algunas mutaciones disminuyen la estabilidad de las cadenas ligeras y aumentan su dinámica<sup>10-13</sup>. En ocasiones las mutaciones producen pérdida de interacciones, provocando que se expongan regiones hidrofóbicas y/o desplegamiento parcial, además de propensión a sufrir proteólisis, promoviendo la formación de agregados amiloides. Las cadenas ligeras mal plegadas pueden asociarse entre ellas y depositarse en forma de agregados no fibrilares (enfermedad de deposición de cadenas ligeras), o pueden depositarse en estructuras similares a las nativas (enfermedad de Berger), o en fibras amiloides (amiloidosis de cadena ligera)<sup>2</sup>.

Las fibras amiloides se caracterizan por ser compactas, con un núcleo de hebras beta que va de manera perpendicular al eje principal de la fibra, rígidas, no ramificadas, rectas, de longitud variada y con un diámetro de 6-15nm<sup>2,5,14,15</sup>. Tienen la propiedad de unir tioflavina T que fluoresce al interactuar con las fibras<sup>16</sup>, lo cual permite monitorear su formación en tiempo real. Además, se pueden teñir con rojo Congo, para ayudar en su diagnóstico y detección. Se ha observado que los depósitos de fibras amiloides contienen fragmentos de cadenas ligeras (debidos a proteólisis), cadenas de proteoglicanos y glicosaminoglicanos<sup>5</sup> que contribuyen a la estabilidad de las fibras. Además, en todos los depósitos de fibras amiloides se ha encontrado el componente P amiloide de suero<sup>17</sup> el cual representa hasta el 15% de la masa de las fibras<sup>5</sup> y es resistente a la digestión por proteasas, por tanto, previene la degradación de las fibras<sup>18</sup>, sin embargo, no es necesario para su formación.

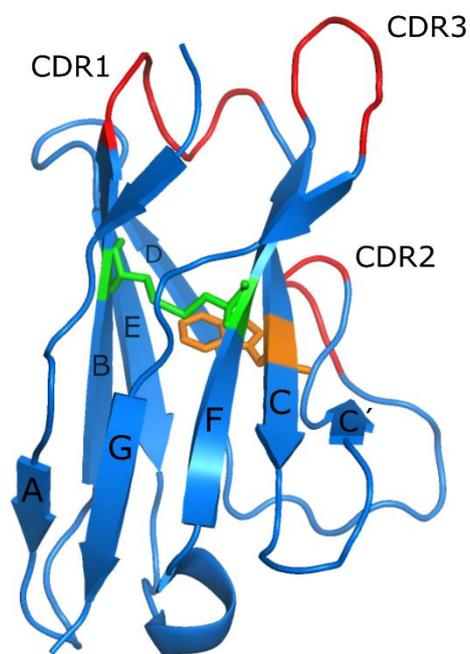
El proceso de formación de fibras amiloides se compone de dos etapas, la fase de nucleación, en donde las proteínas mal plegadas se aglomeran entre ellas hasta formar el núcleo de la fibra, y la fase de elongación, en donde los núcleos comienzan a crecer y forman protofilamentos. Posteriormente se adicionan intermediarios parcialmente desplegados en los extremos, forman protofibras y finalmente la interacción entre dos o tres protofibras da lugar a las fibras amiloides<sup>19,20</sup>.

## **ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA 6aJL2-R24G**

Existen dos tipos de cadenas ligeras, las Kappa ( $\kappa$ ) que a su vez se dividen en 6 subtipos y las lambda ( $\lambda$ ) que se dividen en 10 subtipos. En personas sanas las cadenas ligeras kappa se expresan más que las lambda, en una proporción 3:1. En pacientes con AL de tipo lambda aumenta la expresión de las cadenas ligeras lambda expresándose más que las kappa, en una proporción 2:1<sup>7</sup>. Particularmente, la proteína  $\lambda$ 6a, subtipo VI de las cadenas ligeras lambda, se expresa aproximadamente 2% en personas sanas, pero en pacientes con AL  $\lambda$  la expresión de esta proteína aumenta hasta 38%, de las cuales un 25% contiene una

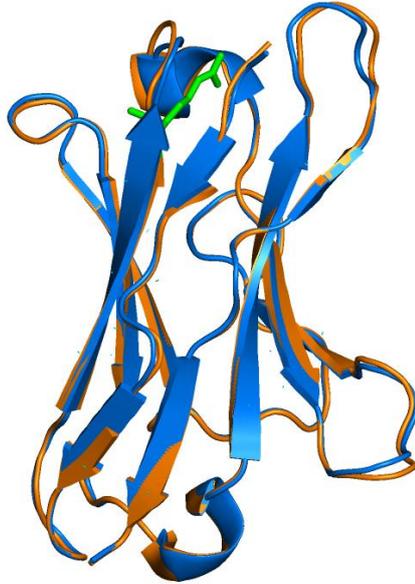
sustitución de una Arginina por una Glicina en la posición 24 (R24G)<sup>21</sup>.

La proteína 6a consta de 91 aminoácidos derivados del segmento de gen *IGVL57* junto con el fragmento de unión, JL2 de 20 aminoácidos derivado del segmento de gen *IGLJ2*. Esto resulta en el dominio variable de la cadena ligera 6aJL2 de 111 residuos de aminoácidos, conformada por 8 hebras beta dispuestas en dos hojas beta antiparalelas con una estructura conocida como beta sandwich<sup>22</sup>. En la Figura 1 se muestra la estructura terciaria de la proteína 6aJL2-R24G<sup>23</sup>. En rojo están marcadas las regiones determinantes de complementariedad (CDR por sus siglas en inglés) que son las encargadas del reconocimiento del antígeno, en verde está marcado el puente disulfuro entre la cisteína 22 y 91 que mantiene a la proteína plegada y en naranja un triptófano conservado en la posición 36.



**Figura 1. Estructura tridimensional de la proteína 6aJL2-R24G.** En rojo se encuentran marcadas las regiones CDR, en verde el puente disulfuro y en naranja el triptófano 36. Las 8 hebras beta se marcan con las letras A a G. (PDB ID: 2MKW).

La sustitución R24G no cambia drásticamente la estructura terciaria de la proteína como se observa en la Figura 2, sin embargo, disminuye su estabilidad 1.7kcal/mol<sup>11</sup>. La Arg24 se encuentra formando varias interacciones, entre las más importantes está una interacción de tipo  $\pi$ -catión con la Phe2 y un puente de hidrógeno con la Asn32. Al sustituir la Arg24 por Gly se pierden dichas interacciones aumentando la dinámica de la proteína, especialmente en las regiones CDR1 y el asa C'-C'', volviéndola menos estable y propensa a agregarse<sup>24</sup>.



**Figura 2. Estructura de las proteínas 6aJL2 y 6aJL2-R24G.** Comparación entre la estructura tridimensional de la proteína 6aJL2, PDB ID: 2W0K, (color naranja) y la proteína 6aJL2-R24G, PDB ID: 5JPJ, (color azul). En verde se marca a la Arg24 de la proteína 6aJL2.

## IONES METÁLICOS COMO FACTORES DE RIESGO

Existen factores de riesgo como estrés oxidativo (ROS)<sup>20,25</sup>, cambios de pH y la interacción con iones metálicos que pueden inducir la agregación de ciertas proteínas<sup>20,26</sup>. Los iones metálicos tienen un papel fundamental en el funcionamiento del organismo y alrededor del 50% de las enzimas los necesitan para realizar su función<sup>27</sup>. El Cu(II) es necesario para la función de enzimas antioxidantes, células del sistema inmune<sup>28</sup>, síntesis de neurotransmisores permitiendo un funcionamiento normal del cerebro, transporte de electrones en la producción de energía en las células, regeneración de tejidos, modificación de proteínas y algunas funciones más<sup>29</sup>. El Zn(II) es el segundo ion metálico de transición más abundante en el cuerpo<sup>29</sup>. Es utilizado como cofactor por al menos 3000 enzimas<sup>30</sup> involucradas en la síntesis de macromoléculas, en la metilación y reparación del DNA<sup>31</sup> y en muchos procesos más. Además, es esencial para el funcionamiento normal de la respuesta inmune innata y adaptativa, en la defensa contra el estrés oxidativo<sup>31</sup> y es crucial para la sinapsis neuronal y el funcionamiento del cerebro<sup>32</sup>. El Fe(II) es el ion metálico más abundante en el cuerpo<sup>33</sup>, es esencial para el transporte de oxígeno y dióxido de carbono, en la síntesis del ADN y en la producción de energía.

Estos iones metálicos se encuentran unidos a proteínas como la ceruloplasmina, encargada de transportar cerca del 95% del total de cobre en plasma<sup>32</sup>, o la hemoglobina, la cual tiene 2/3 partes del total de hierro<sup>31</sup>. Estas proteínas ayudan a mantener y regular las concentraciones de iones metálicos en el organismo, un proceso conocido como

homeostasis. La pérdida de homeostasis de estos iones, principalmente del Cu(II) y del Zn(II), está asociada con algunas enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson, enfermedad de Wilson, enfermedad de Menken, encefalopatía espongiiforme y diabetes mellitus tipo II, entre otras<sup>29,34</sup>. Estos iones metálicos juegan un papel importante en enfermedades relacionadas con la formación de agregados<sup>20,26</sup> y su efecto varía dependiendo de la proteína con la que interacciona. En el caso del Cu(II), se ha observado que es capaz de inhibir la formación de fibras amiloides de la amilina, proteína involucrada en diabetes mellitus II<sup>35-37</sup>, pero acelera la formación de fibras de la alfa sinucleína y la prion, involucradas en Parkinson<sup>26</sup> y encefalopatía espongiiforme respectivamente<sup>38</sup>. Por otra parte, en pacientes con Alzheimer se ha observado que, a altas concentraciones de Zn(II), éste se une a la proteína beta amiloide promoviendo la formación de fibras amiloides<sup>39</sup>. Otros reportes indican que a bajas concentraciones intracelulares de Zn(II) se desestabilizan los microtúbulos, lo que provoca una cascada de liberación de la proteína tau y su hiperfosforilación, generando la formación de marañas neurofibrilares<sup>29,30</sup>. En pacientes con Parkinson se han observado bajas concentraciones de Zn(II) respecto a sujetos sanos. Además, bajas concentraciones de Zn(II) afectan a algunas células del sistema inmune, interfiriendo con su activación y maduración, interrumpiendo su comunicación y debilitando el sistema inmune innato. Se ha observado que el Zn(II) es capaz de acelerar la formación de fibras amiloides de la amilina<sup>36</sup>, sin embargo, existe controversia en el efecto que tiene en proteínas como la prion, debido a que en algunos estudios se ha observado que acelera<sup>20,40</sup> mientras que en otros estudios se ha observado que inhibe la formación de fibras amiloides<sup>41</sup>.

Por otra parte, al evaluar la interacción de iones metálicos con la proteína beta 2 microglobulina, la cual es muy parecida estructuralmente a las cadenas ligeras de inmunoglobulina y está involucrada en amiloidosis relacionada a diálisis<sup>42,43</sup>, se observó que el Cu(II) y el Zn(II) aceleran la formación de agregados, mientras que el Ni(II) no induce ningún efecto<sup>42</sup>. La interacción con Cu(II) involucra a la His31, a los residuos Ile1, Gln2 del extremo amino terminal y al Asp59, lo que induce cambios conformacionales que desencadenan la formación de fibras amiloides<sup>44</sup>. Por otra parte, se ha propuesto que el Zn(II) se une a la His51 e induce la formación de agregados no amiloides, posiblemente por la formación de un puente entre las His51 de dos monómeros diferentes<sup>42</sup>.

Uno de los pocos estudios sobre el efecto de iones metálicos en la agregación de cadenas ligeras<sup>45</sup> reporta el efecto de Cu(II), Zn(II), Ni(II) y Fe(II) en la agregación de la proteína SMA, una cadena ligera de la familia kappa. En este trabajo se reportó que el Cu(II) se une a las histidinas 89 y 94 y que disminuye considerablemente el porcentaje de proteína soluble en una relación dependiente de la concentración de Cu(II), es decir, a mayor concentración del metal menor es el tiempo de agregación. Los demás iones metálicos que se probaron en el estudio no presentaron efecto en la agregación de la proteína.

En un estudio reciente de nuestro grupo de trabajo se encontró que la interacción de la proteína 6aJL2-R24G con Cu(II) acelera la formación de fibras amiloides<sup>46</sup>. Esta proteína presenta dos sitios de unión con una afinidad en el orden micro-molar, involucrando a la His8 y a la His99. La unión del Cu(II) a la His99 reduce interacciones entre el CDR3 y el CDR1 y hace más inestable el asa C", lo que conduce a desplegamiento y agregación. A partir de estos resultados se prepararon tres variantes de histidina para evaluar su papel en la coordinación del Cu(II). Las variantes son 6aJL2-R24G-H8S, 6aJL2-R24G-ΔH99 y 6aJL2-R24G-DM His. La His8 se sustituyó por serina debido a que ya se conoce el efecto de esta mutación en esta proteína, además, la serina es un aminoácido polar, de esta manera no se cambia drásticamente el ambiente químico de esa región. La His99 se eliminó debido a que se encuentra en el CDR3, una región de alta variabilidad por lo que es muy poco conservada. También se hizo la mutante doble para evaluar el efecto de ambas mutaciones en la proteína. Todos estos antecedentes demuestran la importancia de la bioinorgánica del proceso de agregación en diferentes patologías<sup>20,26,27,29,31,34,36,37,40,42</sup>. Si bien en la amiloidosis de cadena ligera no hay reportes sobre el papel de los iones metálicos en el desarrollo de la enfermedad, en enfermedades neurodegenerativas sí se ha reportado ampliamente que estos iones juegan un papel importante en su desarrollo. Las concentraciones de Cu(II) y Zn(II) en sangre están en el orden micro-molar y, aunque se encuentran quelados por diversas proteínas, podría haber pérdida de la homeostasis durante el desarrollo de la enfermedad, provocando que haya iones metálicos libres capaces de interactuar con proteínas que no son su blanco. Por todo lo anterior, en este trabajo se evaluó el efecto del Zn(II) en la agregación de la proteína 6aJL2-R24G y las variantes de histidinas, para ampliar el conocimiento sobre la bioinorgánica de la amiloidosis de cadena ligera.

## **HIPÓTESIS**

La interacción de la proteína 6aJL2-R24G con Zn(II) induce cambios conformacionales que aceleran la formación de fibras amiloides.

## **OBJETIVOS**

### **GENERAL**

Evaluar el efecto de la interacción de Zn(II) con las proteínas 6aJL2-R24G, 6aJL2-R24G-H8S y 6aJL2-R24G-DM His.

### **ESPECÍFICOS**

- Evaluar el efecto de la interacción con Zn(II) en la cinética de formación de fibras amiloides.
- Evaluar la estabilidad térmica de los complejos Zn(II)-proteína.
- Evaluar el efecto de la interacción con Zn(II) en la estructura secundaria.
- Evaluar la afinidad por Zn(II) de la proteína R24G y sus variantes de histidina .
- Evaluar los posibles sitios de interacción con Zn(II).

## **METODOLOGÍA.**

### **SOBREEXPRESIÓN DE PROTEÍNAS**

Se obtuvieron las proteínas recombinantes a partir de la cepa BL21-DE3 de la bacteria *E. coli*, transformándolas con el plásmido pET-27b, el cual contiene la secuencia de cada una de las proteínas 6aJL2-R24G (R24G), 6aJL2-R24G-H8S (H8S), 6aJL2-R24G-ΔH99 (ΔH99) y 6aJL2-R24G-H8S-ΔH99 (DM His). El plásmido de la R24G fue donado por la Dra. Isabel Velázquez López de la Facultad de Medicina de la UNAM. Los plásmidos de las variantes de histidina fueron diseñados y sintetizados por la Dra. Clarita Olvera del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Las células se transformaron por choque térmico, poniéndolas 90 segundos a 42°C e inmediatamente se pasaron a hielo durante 2 minutos; se les adicionó medio líquido y se dejaron recuperar a 37°C, 250rpm, durante una hora; luego se sembraron en una caja petri con agar LB y 60µg/mL de kanamicina y se incubaron a 37°C durante toda la noche. De las células transformadas se tomó una colonia y se inoculó 1L de medio de cultivo YT2X con 60 µg/mL kanamicina hasta una OD<sub>600</sub> de 0.8. El cultivo se indujo con 0.8 mM de IPTG y se incubó a temperatura ambiente (entre 17 y 22°C) a 150 rpm por no más de

14 horas.

## **PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS**

Se centrifugaron las células a 4000 rpm durante 30 minutos a 4°C. El botón se resuspendió gentilmente en 20 mL de 20% de sacarosa fría en un periodo de 20 minutos aproximadamente. Se dejó reposar por 15 minutos a 4°C y se centrifugó nuevamente a 4000 rpm durante 30 minutos a 4°C. El botón se resuspendió gentilmente en 20 mL de agua destilada fría y se dejó reposar por 20 minutos. Las células se centrifugaron a 14000 rpm durante 45 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante rico en proteínas y se filtró por una membrana de 0.22 µm. Se tomaron muestras de cada paso de la lisis y se corrió un SDS-PAGE al 14% para corroborar la presencia de la proteína en el sobrenadante filtrado. Después se concentró el extracto de proteína hasta un volumen de ~10 mL y se purificó por cromatografía. La proteína R24G se inyectó en una columna de exclusión molecular Superdex 200 y se eluyó con buffer MES 10 mM NaCl 75 mM pH 7.5. Las variantes de histidinas se purificaron en una columna de intercambio aniónico Q-sefarosa, equilibrando la columna con buffer MES 10mM NaCl 75mM y utilizando buffer MES 10 mM NaCl 1 M para eluir la proteína. Con ninguna proteína fue necesario hacer un segundo paso de purificación. Se midió absorbancia a 280 nm de las fracciones colectadas en un espectrofotómetro Genesis UV-Vis Biomate 160, en una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Se seleccionaron las fracciones con mayor absorbancia y se les corrió un SDS-PAGE al 14%. Las fracciones que contenían a la proteína pura se juntaron y se les retiró la sal pasando la muestra por un centricon con corte en 3MWCO y lavando con MES 10 mM NaCl 75 mM. La proteína desalada se cuantificó utilizando el coeficiente de extinción molar de 14565 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>. La proteína se congeló súbitamente en nitrógeno líquido y se guardó a -70°C hasta su uso.

## **EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD TÉRMICA**

Todas las proteínas utilizadas en este proyecto contienen un triptófano conservado en la posición 36. La emisión de fluorescencia de dicho triptófano se encuentra apagada por un puente disulfuro entre las Cys22 y Cys91. Cuando la proteína se despliega, el puente disulfuro se aleja del triptófano y se recupera la emisión de fluorescencia. Así, siguiendo la fluorescencia intrínseca del Trp36 se evaluó la estabilidad térmica de la proteína R24G y las variantes de histidina haciendo un barrido de temperatura desde 25°C hasta 60°C para el desplegamiento y de 60°C a 25°C para el replegamiento, con una tasa de calentamiento de 1°C/min. Se graficaron los datos usando el programa QtiPlot, se ajustaron a la función de Boltzmann  $[IF_{MAX} + (IF_{MIN} - IF_{MAX}) / (1 + \exp((T - T_m) / dT))]$ . Se utilizó un fluorómetro Cary Eclipse, 20 µM de cada proteína, una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico, en ausencia y presencia

de ZnSO<sub>4</sub> desde 0 hasta 4 equivalentes; se excitó a 295 nm y se midió emisión a 350 nm. Los experimentos se realizaron por triplicado.

## **EVALUACIÓN DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA**

Se evaluó si la interacción con Zn(II) induce cambios en la estructura secundaria de la proteína R24G y las variantes de histidina titulando las proteínas con ZnSO<sub>4</sub> hasta 4 equivalentes. La titulación se siguió en un espectropolarímetro JASCO 1500 desde 190 hasta 250 nm, en una celda de cuarzo de 0.1 cm de paso óptico a 25°C, usando una concentración de 20 μM para las proteínas R24G y H8S y a 100 μM para la DM His. Se usó un ancho de banda de 10 nm y una velocidad de scan de 100 nm/seg. Los datos se deconvolucionaron usando el servidor BeStSel<sup>47</sup>.

## **CINÉTICAS DE FORMACIÓN DE FIBRAS AMILOIDES**

La tioflavina T (ThT) es un fluoróforo que emite a 480 nm cuando se une a las fibras amiloides. Por esta razón es ampliamente usado para evaluar cinéticas de formación de fibras. Se evaluaron los cambios en la cinética de formación de fibras de la proteína R24G y las variantes de histidina en ausencia y presencia de ZnSO<sub>4</sub>, desde 0 hasta 4 equivalentes. La fluorescencia del ThT se siguió en un fluorómetro Jenway 6285, excitando a 450 nm y colectando a 482 nm. La muestra se incubó con agitación constante a 37°C o a 25°C, dependiendo de la T<sub>m</sub> de cada proteína y tomando mediciones cada 10 minutos durante la fase de nucleación, cada 30 segundos durante la fase exponencial y nuevamente cada 10 minutos durante la fase estacionaria. Todas las proteínas se usaron a una concentración 100 μM. El tiempo lag se estimó ajustando una función lineal tanto a la fase lag como a la fase exponencial. El punto de cruce entre ambos ajustes es el tiempo lag reportado. Las cinéticas se realizaron al menos por triplicado a partir de tres purificaciones diferentes.

## **MORFOLOGÍA DE LAS FIBRAS AMILOIDES**

Por medio de microscopía electrónica de Transmisión (TEM por sus siglas en inglés), se analizó el punto final de las cinéticas de formación de fibras amiloides de la proteína R24G y las variante de histidina en ausencia y presencia de Zn(II). Una vez terminada la cinética las muestras se lavaron con agua destilada al menos tres veces para remover el exceso de ThT y se resuspendieron en 100 uL de agua. Las muestras se analizaron en un equipo ZEISS Libra 120 corriendo a 80 kV.

## **AFINIDAD DE LAS PROTEÍNAS POR Zn(II)**

Se evaluó la afinidad por Zn(II) de la proteína R24G y las variantes de histidina por calorimetría de titulación isotérmica (ITC por sus siglas en inglés) usando un equipo Malvern ITC200. Las titulaciones se hicieron a 25°C, con una concentración de proteína de 100 µM y un stock 2.1 mM de ZnSO<sub>4</sub>. Se usó un método de 38 inyecciones con un volumen de inyección de 1µL y 120 segundos de espera entre cada una. Los datos se analizaron usando los programas NITPIC, Sedphat-shortcut y GUSSEI<sup>48</sup>.

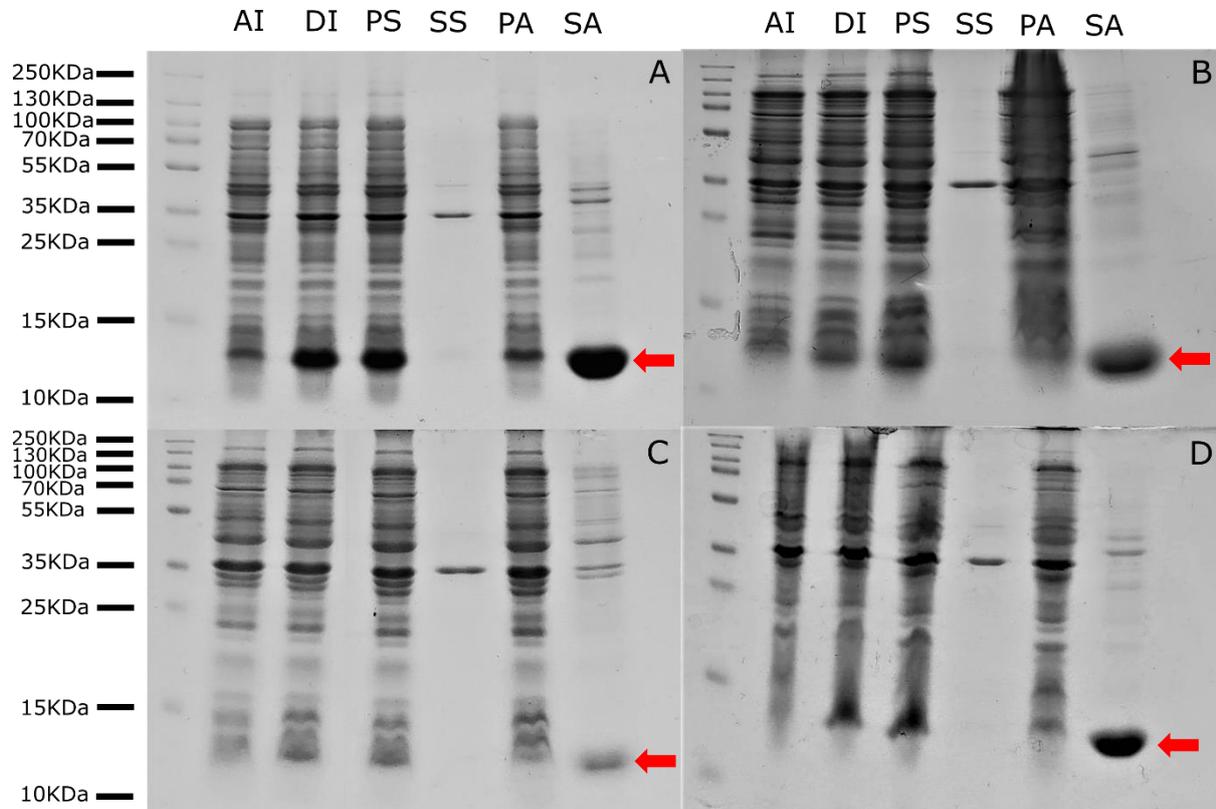
## **PREDICCIÓN DE SITIOS DE INTERACCIÓN CON Zn(II)**

Se utilizó el servidor MIB: Metal-Ion Binding Site Prediction and Docking Server<sup>49,50</sup> para predecir los sitios de unión más probables del Zn(II) con cada una de las mutantes. Este servidor utiliza el método de transformación de fragmento que combina información estructural y de secuencia contenida dentro de fragmentos locales. Ya que la estructura tridimensional y el tipo de residuos están comúnmente conservados, se pueden encontrar regiones de unión similares comparando el tipo de residuo y su localización con plantados de unión de metales contenidos en la base de datos del servidor. Los modelos que se usaron para meter al servidor partieron de la estructura cristalográfica de la proteína R24G depositada en el Protein Data Bank (PDB por sus siglas en inglés) con el código 5JPJ. Sin embargo, esta estructura es dimérica, así que para evitar que el servidor predijera sitios entre los monómeros, se removió uno de los monómeros usando el visualizador Pymol. Para las variantes de histidina no existe estructura depositada en el PDB así que a partir de la estructura 5JPJ monomérica se utilizó el servidor Swiss-Model<sup>51</sup> para modelar la estructura tridimensional de las variantes de histidina.

## RESULTADOS

### SOBREEXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN

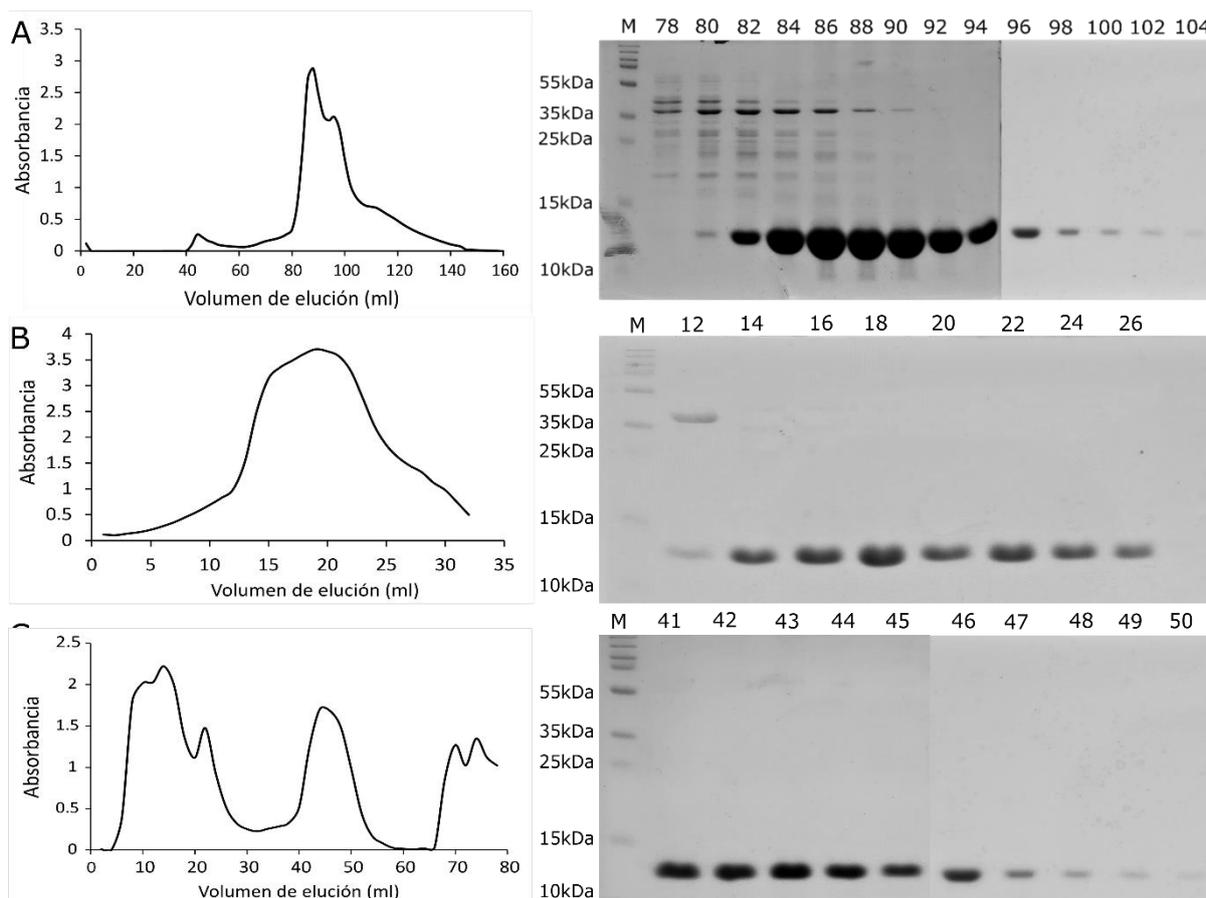
En la Figura 3 se observan los geles que indican la sobreexpresión exitosa de las proteínas.



**Figura 3. Geles desnaturalizantes para evaluar la sobreexpresión y extracción de las proteínas R24G (A), H8S (B),  $\Delta$ H99 (C) y DM His (D).** Los rótulos en la parte superior de la figura indican; AI: antes de inducir, DI: después de inducir, PS: botón después de resuspender, incubar y centrifugar en sacarosa, SS: sobrenadante de sacarosa, PA: botón después de resuspender, incubar y centrifugar en agua y SA: sobrenadante de agua. Las flechas rojas indican la banda de interés.

Tanto la proteína R24G como las variantes de histidina se expresaron exitosamente, excepto la variante  $\Delta$ H99, que mostró muy baja sobreexpresión (Figura 3C) y la cantidad proteína pura no permitió realizar ningún análisis. Se está trabajando en la estandarización de las condiciones óptimas de sobreexpresión, pero por razones de tiempo no se incluyen resultados de dicha proteína en este trabajo.

Una vez confirmada la sobreexpresión de las proteínas, los extractos se pasaron por una columna de exclusión molecular para la proteína R24G y por una columna de intercambio aniónico para las variantes de histidina. La figura 4 muestra los cromatogramas y los geles de las fracciones eluidas. Las fracciones más puras se juntaron y se guardaron para los experimentos posteriores.

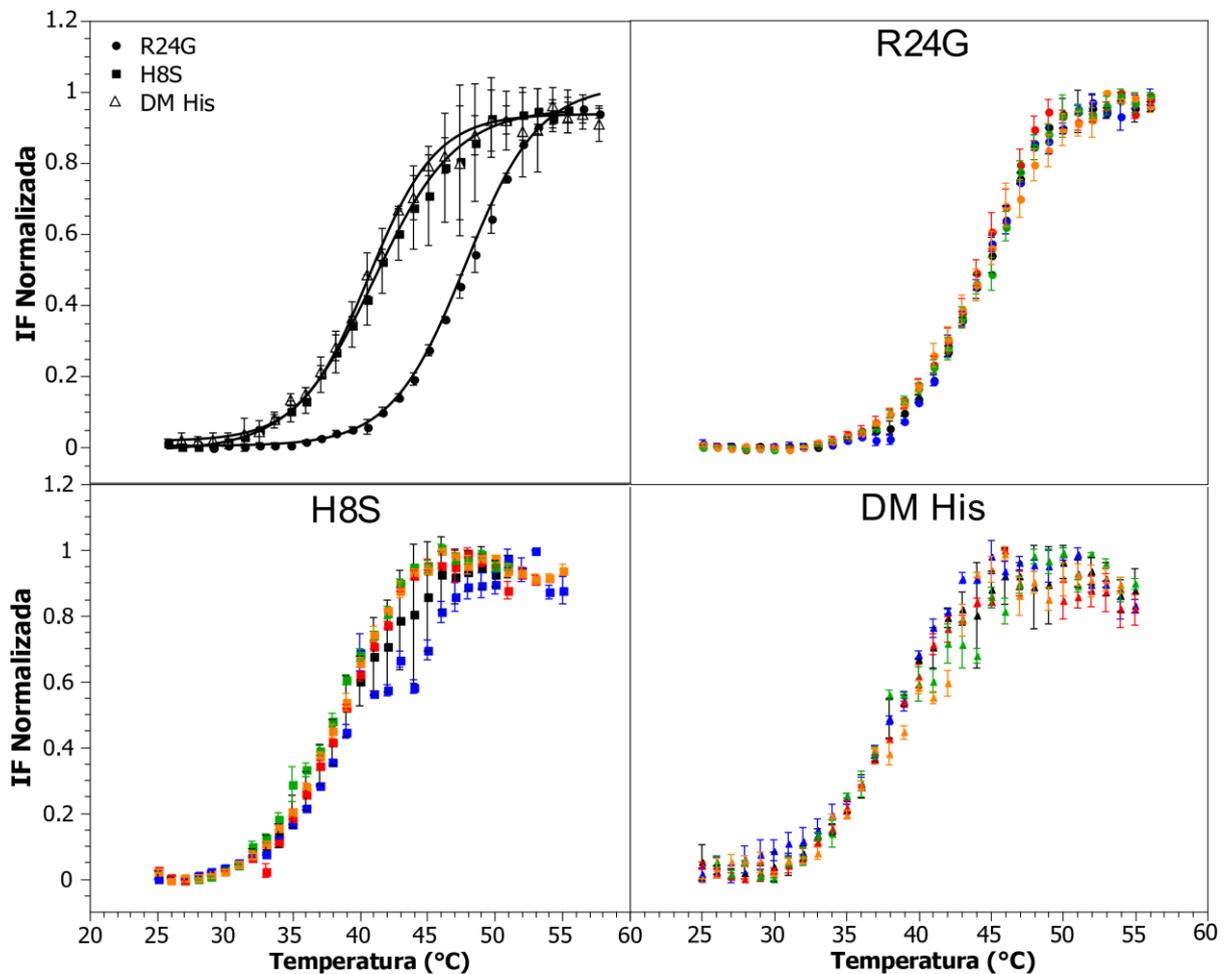


**Figura 4. Cromatogramas y geles de purificación de las proteínas R24G (A), H8S (B) y DM His (C).** Los rótulos en la parte superior de cada gel corresponden a las fracciones cargadas en cada pozo del gel. El primer carril es el marcador de peso molecular rotulado con la letra M. A la izquierda de cada gel se encuentran los pesos moleculares correspondientes a las bandas del marcador de peso molecular.

## ESTABILIDAD TÉRMICA

En la Figura 5 se observan los datos normalizados para la desnaturalización térmica de todas las proteínas evaluada mediante fluorescencia intrínseca. Todas las curvas muestran una tendencia sigmoide, que se ajustó a la ecuación de Boltzmann. Las  $T_m$  en ausencia y presencia de Zn(II) se estimaron para cada proteína y están listadas en la Tabla 1. Se observa una disminución de casi 7°C en la  $T_m$  de las variantes H8S y DM His.

Por otra parte, en presencia de Zn(II) ninguna proteína mostró variaciones significativas en las  $T_m$ , lo que indica que la interacción con Zn(II) no afecta la estabilidad térmica de ninguna de las proteínas.



**Figura 5. Despliegamiento térmico de la R24G y las variantes de histidina.** En el panel A se muestra el despliegamiento de todas las proteínas en ausencia de Zn(II). En el panel B, C y D se muestra el despliegamiento para la R24G, H8S y DM His respectivamente en presencia de 1 equivalente (azul), 2 equivalentes (rojo), 3 equivalentes (verde) y 4 equivalentes (naranja) de Zn(II).

**Tabla 1. Tm estimadas en ausencia y presencia de Zn(II).**

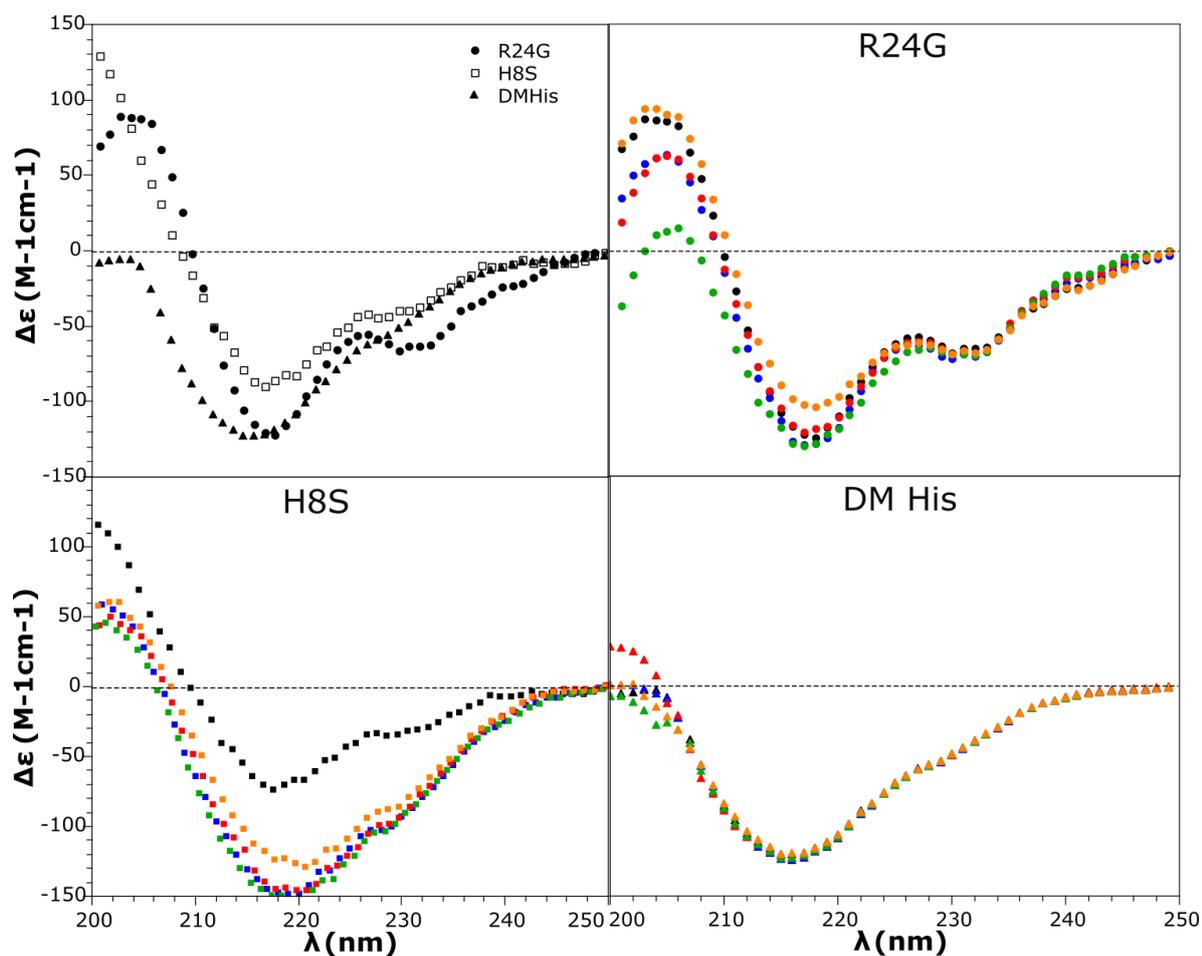
PROTEÍNA	0 eq Zn(II)	1 eq Zn(II)	2 eq Zn(II)	3 eq Zn(II)	4 eq Zn(II)
<b>R24G</b>	44.06 ± 0.33	44.09 ± 0.28	43.47 ± 0.41	44.17 ± 0.40	43.74 ± 0.44
<b>H8S</b>	38.78 ± 1.28*	39.44 ± 0.14	38.32 ± 0.09	37.81 ± 0.24	38.13 ± 0.19
<b>DM His</b>	37.59 ± 0.41*	37.74 ± 0.09	36.86 ± 0.17	38.19 ± 0.61	38.51 ± 0.42

\* Cambio significativo con respecto al Tm de R24G en ausencia de Zn(II) ( $p < 0.05$ ).

## CAMBIOS EN ESTRUCTURA SECUNDARIA.

En la Figura 6 se muestran los espectros de dicroísmo circular de todas las proteínas estudiadas en este trabajo. En el panel A se puede observar que las variantes de histidina presentan espectros diferentes a los de la R24G, sin embargo es posible observar las bandas una señal positiva alrededor de 205 nm, una señal negativa a 220 nm, característica de

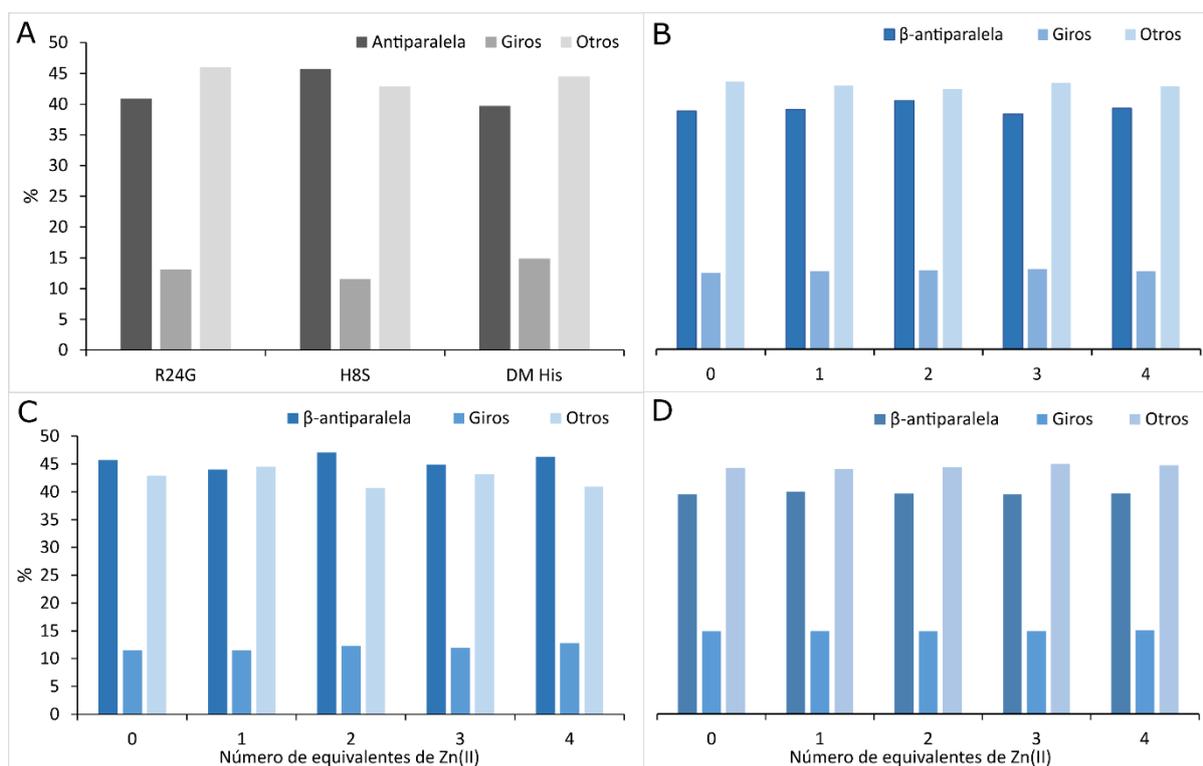
estructuras ricas en hebras beta, y una señal negativa a 230 nm asociada a los residuos aromáticos de la proteína<sup>52,53</sup>. Los demás paneles muestran los espectros de cada proteína titulada con Zn(II). La deconvolución de los datos (Tabla 2 y Figura 7), muestran que el porcentaje de estructura secundaria no cambia significativamente al añadir Zn(II). Los valores de deconvolución de la R24G tienen desviación estándar porque son el promedio de tres experimentos diferentes realizados en el grupo de investigación<sup>54,55</sup>. Estos valores comparados con los valores reportados para las estructuras cristalográficas (48% hoja beta, 17% giros, 35% otros) indican que BestSel es un buen predictor de estructura secundaria para este sistema.



**Figura 6. Espectros de estructura secundaria.** En el panel A se muestra el espectro de estructura secundaria de todas las proteínas en ausencia de Zn(II). En B, C y D se muestran los espectros de la R24G, H8S y DM His respectivamente, en presencia de 1 equivalente (azul), 2 equivalentes (rojo), 3 equivalentes (verde) y 4 equivalentes (naranja) de Zn(II).

**Tabla 2.** Porcentajes de estructura secundaria estimados por BestSel.

Proteína	# eq Zn(II)	% Beta	% Giros	% Otros
<b>R24G</b>	0	46.3 ± 2.5	15.4 ± 4.1	38.3 ± 4.0
	1	45.6 ± 1.7	15.3 ± 4.2	40.2 ± 3.8
	2	45.9 ± 2.4	15.6 ± 4.1	38.5 ± 2.0
	3	46.1 ± 3.3	15.3 ± 4.0	38.5 ± 4.0
	4	46.3	12.8	40.9
<b>H8S</b>	0	191.2	261.7	339.57
	1	94.16	64.9	158.6
	2	127.6	124.1	178.2
	3	102.5	116.4	121.95
	4	120.2	106	130.75
<b>DM His</b>	0	532.13	310.04	411.51
	1	538.7	391.52	256.51
	2	255.12	235.87	267.99
	3	703.83	269.57	271.44
	4	537.7	320.18	285.15

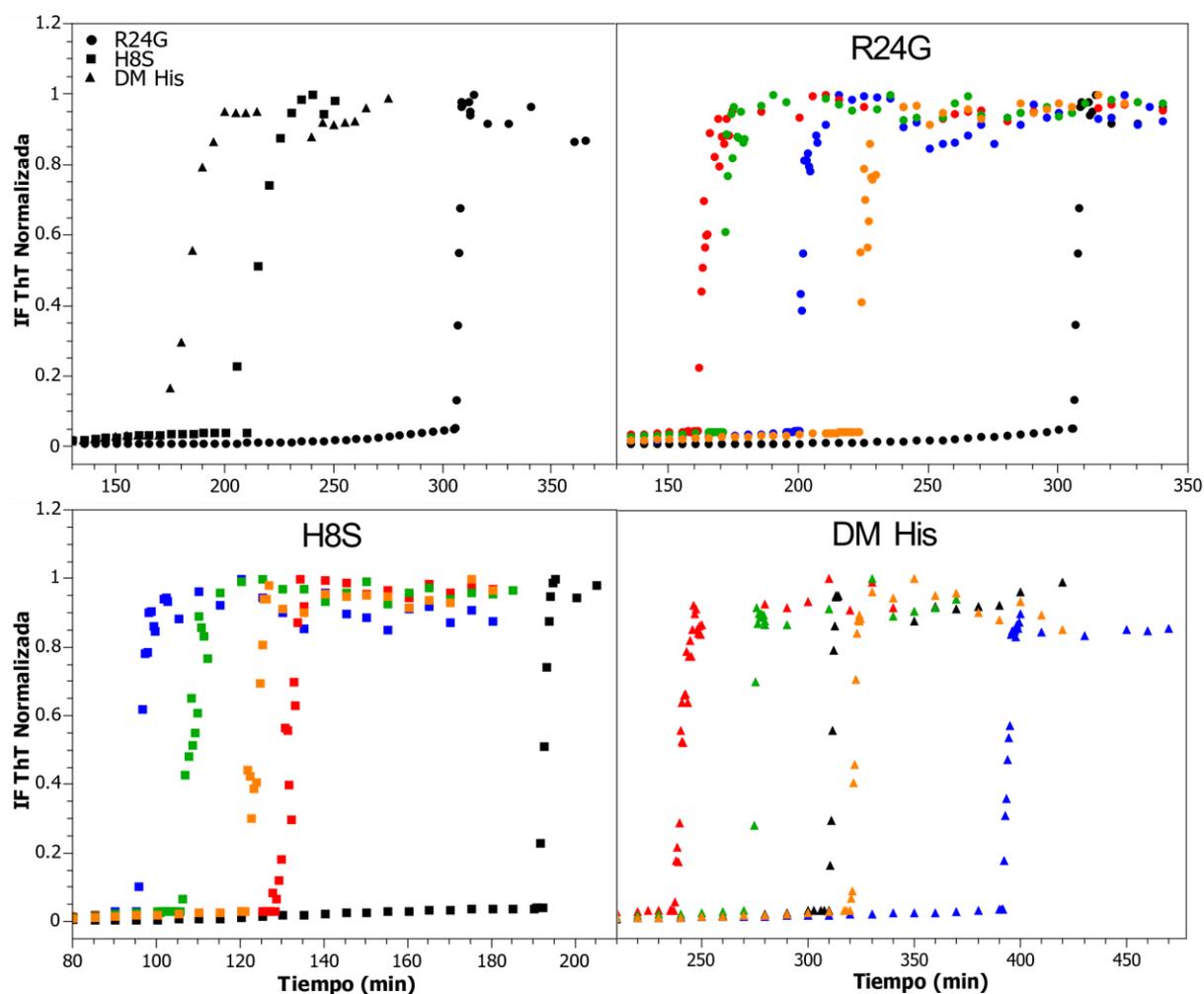


**Figura 7. Porcentaje de estructura secundaria** de todas las proteínas en ausencia de Zn(II) (A) y en presencia de 1 a 4 equivalentes de Zn(II) de la proteína R24G (B), H8S (C) y DM His (D).

## CINÉTICAS DE FORMACIÓN DE FIBRAS AMILOIDES

La amiloidogenicidad de las proteínas y el efecto de la interacción con Zn(II) se evaluó siguiendo la fluorescencia de ThT. En todas las proteínas y condiciones analizadas se observó formación de fibras amiloides como se muestra en la Figura 9. Los tiempos lag de todas las réplicas de cada condición se promediaron y se calculó la desviación estándar (Tabla 3). En el panel A de la Figura 8 se comparan las cinéticas de la proteína R24G y sus variantes de histidina. Se puede observar que la sustitución H8S hace que la proteína tenga tiempos lag más cortos, por lo tanto, la sustitución de histidina por serina en la posición 8 hace a la proteína más amiloidogénica. Por el contrario, la DM His presenta tiempos lag muy parecidos a la R24G, pero las desviaciones estándar son muy grandes lo cual dificulta el análisis de los datos. El análisis t-Student indica que solamente la mutante H8S tiene un  $t_{lag}$  significativamente diferente respecto al  $t_{lag}$  de la R24G.

Por otra parte, las cinéticas de formación de fibras amiloides de las proteínas en presencia de Zn(II) presentan tiempos lag más cortos (Figura 8, Tabla 3), excepto la DM His que presenta tiempos lag muy cercanos a la condición en ausencia de Zn(II). El análisis t-Student indica que sólo la condición con 2eq de Zn(II) presenta diferencias significativas comparadas con las cinéticas de la proteína en ausencia del ion metálico. Todo lo anterior indica que la interacción con Zn(II) acelera la formación de fibras amiloides, pero no se observa una relación entre el número de equivalentes y la disminución en el tiempo lag.



**Figura 8. Cinéticas de formación de fibras amiloides.** En el panel A se muestran las cinéticas de las proteínas en ausencia de Zn(II). En B, C y D se muestran las cinéticas de las proteínas R24G, H8S y DM His respectivamente. En todos los casos, 0 equivalentes (negro), 1 equivalente (azul), 2 equivalentes (rojo), 3 equivalentes (verde) y 4 equivalentes (naranja) de Zn(II).

**Tabla 3.** Tiempos lag de las cinéticas de agregación de las proteínas en ausencia y presencia de Zn(II).

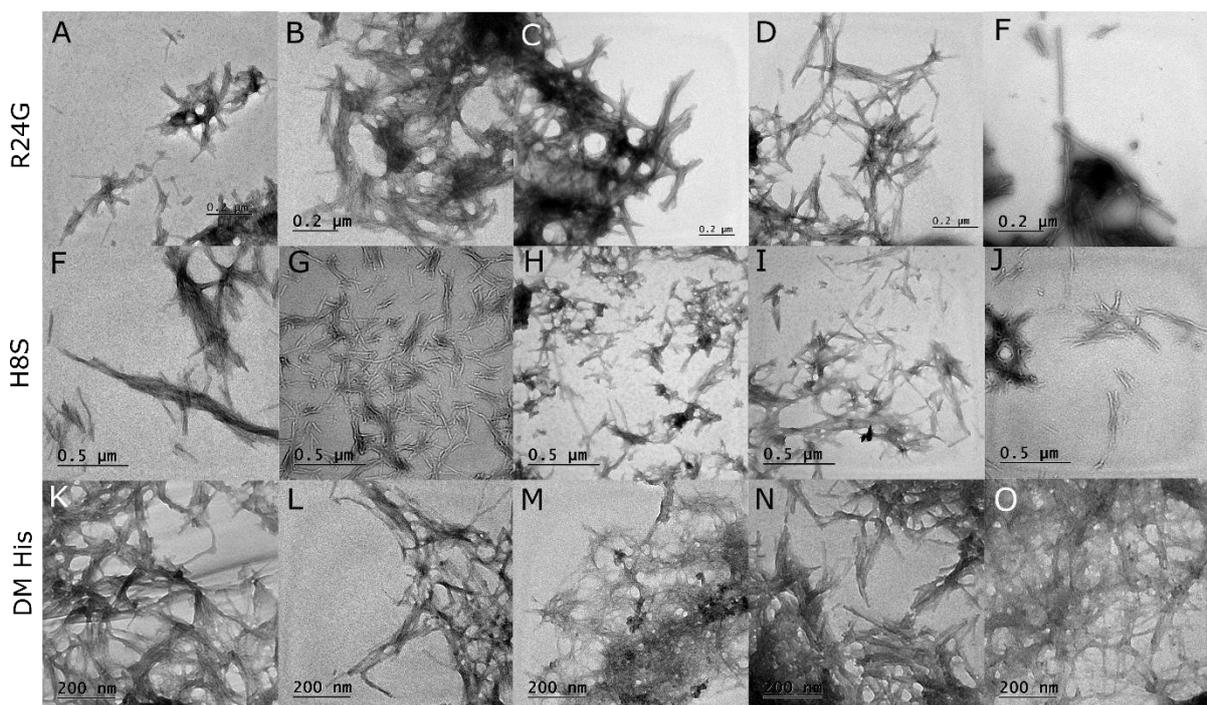
Proteína	$t_{lag}$ (min)				
	0 eq Zn(II)	1 eq Zn(II)	2 eq Zn(II)	3 eq. Zn(II)	4 eq. Zn(II)
<b>R24G</b>	430.27 ± 108.55	284.07 ± 147.88	154.38 ± 37.14*	256.49 ± 121.18	227.8 ± 68.70
<b>H8S</b>	264.16 ± 74.22	105.89 ± 47.94*	143.3 ± 30.27* <sup>a</sup>	113.62 ± 10.02* <sup>a</sup>	118.98 ± 12.42* <sup>a</sup>
<b>DM His</b>	417.89 ± 111.18	395.58 ± 141.14	252.99 ± 16.17*	414.95 ± 250.18	381.01 ± 136.82

\* cambio significativo con respecto al  $t_{lag}$  de cada proteína en ausencia de Zn(II) ( $p < 0.05$ )

<sup>a</sup> Cambio no significativo con respecto al  $t_{lag}$  de la proteína H8S con 1eq de Zn(II) ( $p > 0.05$ )

## MORFOLOGÍA DE LAS FIBRAS AMILOIDES

Para saber si el Zn(II) induce un cambio en la morfología de las fibras se analizaron los puntos finales de las cinéticas de formación de fibras por microscopía electrónica de transmisión (TEM). En la figura 7 se puede observar que en todas las condiciones se encontraron fibras amiloides, confirmándose que las variantes de histidina forman fibras amiloides con la misma morfología que la proteína R24G (paneles A, F y K). Al comparar las fibras de cada proteína en presencia de diferentes equivalentes de Zn(II) se observa que, en ningún caso, la interacción con Zn(II) afecta la morfología de las fibras.



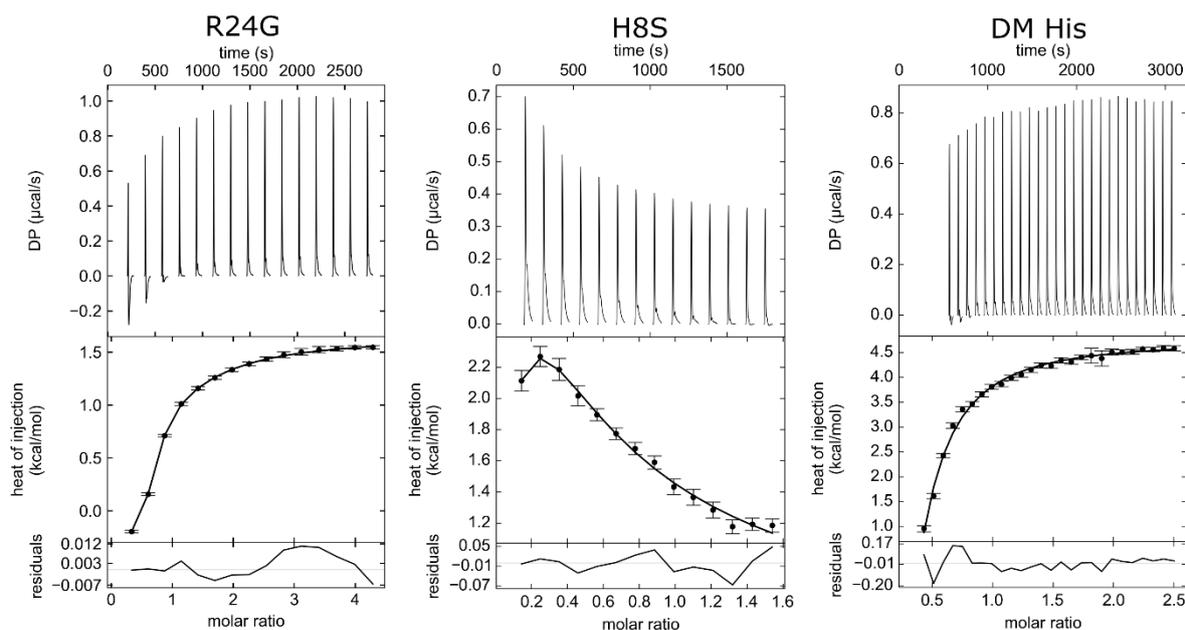
**Figura 9. Morfología de las fibras amiloides.** Micrografía del punto final de las cinéticas de agregación de las proteínas R24G, H8S y DM His en ausencia (A, F, K), con 1 equivalente (B, G, L), 2 equivalentes (C, H, M), 3 equivalentes (D, I, N) y 4 equivalentes (E, J, O) de Zn(II) respectivamente.

## AFINIDAD POR Zn(II)

Los resultados de ITC se analizaron con diferentes modelos de unión y en la Figura 10 se muestran los mejores ajustes. La titulación de la proteína R24G se ajustó a un modelo de dos sitios no simétricos y mostró constantes de disociación de 3.53 μM y 4.86 μM. La isoterma de la variante H8S presentó al menos dos eventos diferentes, uno debido a la interacción del Zn(II) con la proteína y el segundo, probablemente debido a la agregación de la proteína (Figura B4, Anexo B). Por lo tanto, se realizó el ajuste sólo del primer evento (Figura 10B), la

constante de disociación estimada es de 1.24  $\mu\text{M}$ . En el caso de la variante DM His, la isoterma se ajustó a un modelo de dos sitios no simétricos y presentó constantes de disociación de 13.3  $\mu\text{M}$  y 13.6  $\mu\text{M}$ .

De los ajustes se observa que la unión del Zn(II) a la proteína R24G está favorecida entálpica y entrópicamente; la unión a H8S está desfavorecida entálpicamente y desfavorecida entrópicamente; la DM His está favorecida entálpica y desfavorecida entrópicamente (Tabla 4).



**Figura 10. Isothermas de la interacción con Zn(II).** En todos los casos se presenta la isoterma, los datos integrados y ajustados a un modelo y el residual del ajuste.

**Tabla 4.** Parámetros termodinámicos de los ajustes de los datos de ITC.

Proteína	$K_{d1}$ ( $\mu\text{M}$ )	$K_{d2}$ ( $\mu\text{M}$ )	$\Delta H_1$ kcal/mol	$\Delta H_2$ kcal/mol	$\Delta S_1$ cal/mol*K	$\Delta S_2$ cal/mol*K	$\Delta G_1$ kcal/mol	$\Delta G_2$ kcal/mol
<b>R24G</b>	3.53	4.86	-1.32	-2.88	20.536	20.536	-7.44	-7.25
<b>H8S</b>	1.24	-	2.07	-	34.81	-	-8.31	
<b>DM His</b>	13.28	13.64	-102.12	-101.08	-320.18	-320.18	-6.65	-6.64

## ESTIMACIÓN DE SITIOS DE INTERACCIÓN

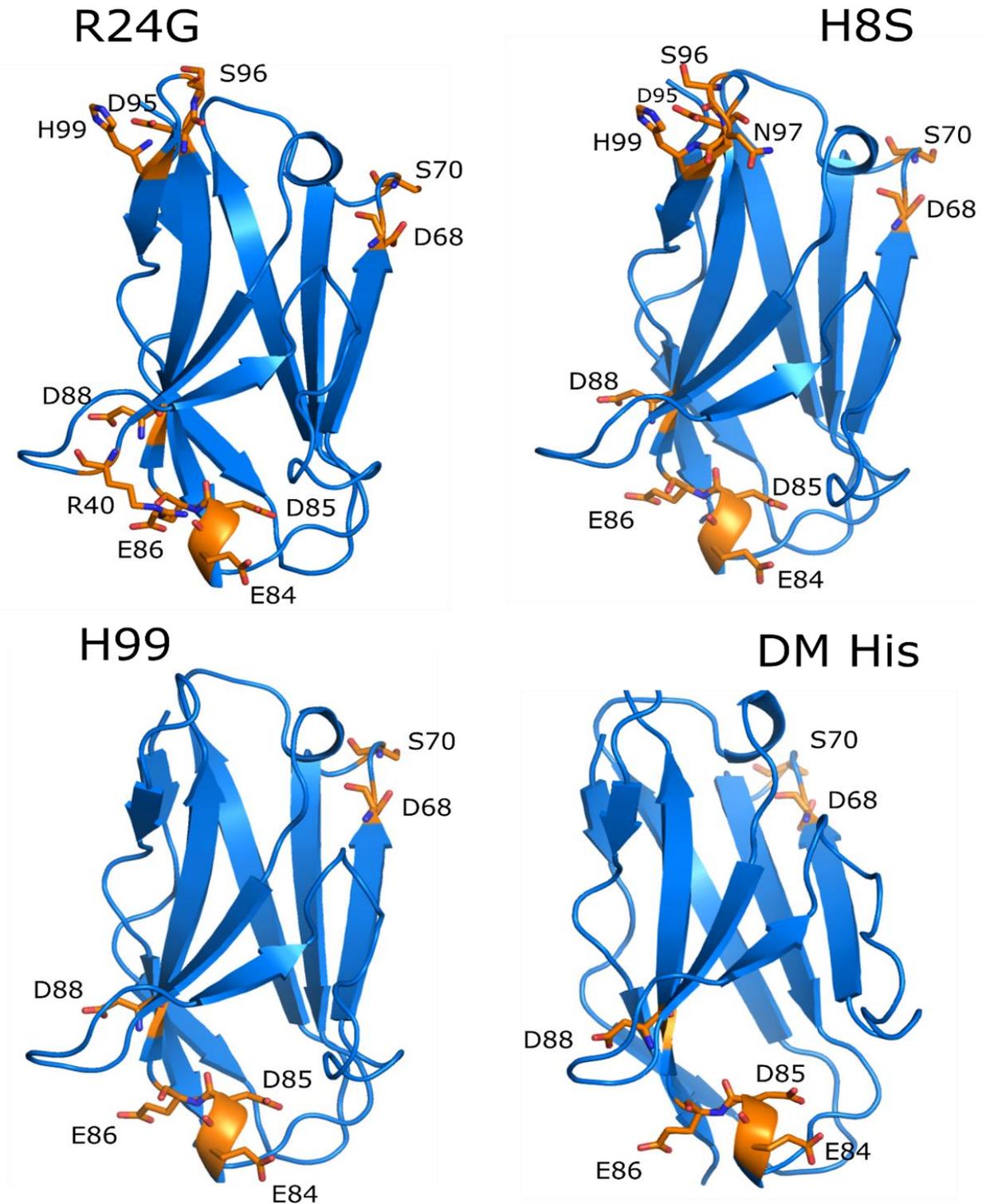
Los sitios de interacción del Zn(II) con la proteína se predijeron en el servidor MIB<sup>49</sup>. Si bien las predicciones pueden tener muchos errores, con este servidor en particular al predecir los sitios de unión a Cu(II) se encontró muy buena correlación con los resultados de RMN<sup>46</sup>. En la Tabla 5 y en la Figura 11 se muestran los sitios de unión de Zn(II) predichos por el servidor<sup>49</sup>. Para todas las proteínas se predicen varios sitios de unión, cada uno con un

puntaje que indica su probabilidad. El sitio de unión de mayor puntaje en la proteína R24G está formado por R40,E86, sin embargo este sitio no es predicho en ninguna de las variantes de histidina. Los demás sitios predichos, que aparecen en todas las proteínas son, en orden de mayor a menor puntaje, D95,H99; E84,D85; E86,D88 y D68,S70. El sitio D95,H99 no es predicho en las proteínas que no tienen la His99 ( $\Delta$ H99 y DM-His).

**Tabla 5.** Sitios de unión de Zn(II) a las proteínas predichos por el servidor MIB<sup>49</sup>.

<b>Proteína</b>	<b>Residuos de unión de Zn(II)</b>	<b>Score</b>
<b>R24G</b>	R40, E86*	3.788
	D95, H99	3.216
	E86, D88	2.596
	E84, D85	2.438
	D68, S70	1.909
<b>H8S</b>	D95, H99	3.921
	E84, D85	2.968
	E86, D88	2.816
	D95, S97, N98, H99	2.528
	D68, S70	1.995
<b><math>\Delta</math>H99</b>	E84, D85	3.858
	E86, D88	3.552
	D68, S70*	2.693
<b>DM His</b>	E84, D85	3.964
	E86, D88	3.656
	D68, S70	2.744

\* Indica el sitio que no se tomó en cuenta.



**Figura 11. Predicción de sitios de unión.** Posibles sitios de unión del Zn(II) en las proteínas R24G (A), H8S (B),  $\Delta$ H99 y DM His (D). En color naranja se muestran los aminoácidos del sitio de unión de Zn(II) predichos por el servidor.

## DISCUSIÓN

La mutación R24G se encuentra en el 25% de los casos de amiloidosis de cadena ligera del tipo lambda, específicamente del subtipo VI. Esta mutación hace a la proteína menos estable térmicamente y más propensa a la formación de fibras amiloides debido a que se pierden varias interacciones. La Arg24 forma una interacción de tipo  $\pi$ -catión con la Phe2, al cambiar la arginina por una glicina se pierde dicha interacción, provocando que la región N-terminal se vuelva más flexible<sup>11</sup>. Además, se pierden varios puentes de hidrógeno entre la Arg24 y el CDR1, haciendo que éste se vuelva más dinámico y que a su vez pierda interacciones con el asa C'-C''<sup>24</sup>.

En estudios anteriores se observó que la proteína R24G contiene al menos dos sitios de unión a Cu(II), la His8 y la His99<sup>46</sup>, por esta razón se construyeron 3 variantes de histidina; en una de ellas se sustituyó a la His8 por Ser (H8S), en otra se eliminó la His99 ( $\Delta$ H99) y en una tercera se hicieron ambas mutaciones (DM His).

Los análisis de estructura secundaria indican que las mutaciones no afectan significativamente la estructura de las proteínas. Al evaluar la estabilidad térmica de todas las mutantes se observó que las variantes de histidina tienen una  $T_m$  muy similar entre sí y ambas son aproximadamente 7°C menores que la  $T_m$  de la R24G. Dado que ninguna de estas mutantes tiene la His8, es posible que esta sustitución sea la responsable de la disminución en la estabilidad térmica, tal vez debido a que la His8 se encuentra en la región N-terminal, la cual es importante en la estabilidad de la proteína y está reportada como una región protectora de amiloidogenicidad<sup>56</sup>. Sin embargo, esto está en contradicción con lo reportado para la proteína 6aJL2 y la variante 6aJL2-H8S, que presentan  $T_m$ s de 49.9 °C y 49.5°C, respectivamente<sup>10,11</sup>, indicando que la sustitución H8S no induce cambios en la estabilidad térmica de la proteína, pero sí en la amiloidogenicidad. Por otra parte, las cinéticas de formación de fibras y las micrografías de TEM indican que las mutaciones no afectan la formación de fibras amiloides, pues el análisis estadístico de los  $t_{lag}$  de la R24G contra los  $t_{lag}$  de las variantes de histidina muestra que no hay diferencias significativas (Tabla 3). Es importante resaltar que los  $t_{lag}$  presentan una desviación estándar grande. Esto puede deberse a que la formación de fibras amiloides es un proceso que varía dependiendo de la población con la que se inicia la cinética y aunque se trataron las muestras siempre de la misma manera, es posible que en cada réplica se partiera de una familia de conformaciones diferentes, por lo tanto, se alcanza la fase de elongación de manera muy variable.

Por otra parte, al evaluar los complejos de Zn(II) con las proteínas, los datos de desplegamiento térmico y dicroísmo circular muestran que la interacción del ion metálico con las proteínas no induce cambios en la estabilidad térmica ni en la estructura secundaria. Sin

embargo, sí induce cambios en las cinéticas de formación de fibras. Esto puede deberse a que la interacción del Zn(II) con las proteínas induce pérdida de interacciones locales que no alteran la estructura secundaria ni inducen conformaciones que alteran la distancia entre el Trp36 y el puente disulfuro, pero conducen a conformaciones más amiloidogénicas.

Los resultados de ITC muestran que la proteína R24G tiene dos sitios de unión a Zn(II) con afinidades en el rango micro molar (3.5 y 4.9  $\mu\text{M}$ ), y las cinéticas de formación de fibras indican que sólo 2 equivalentes de Zn(II) tienen un efecto significativo en la cinética de formación de fibras. Por su parte, la mutante H8S presenta sólo un sitio de unión a Zn(II) con una afinidad en el mismo rango que la observada para R24G (1.24  $\mu\text{M}$ ) y la cinética de formación de fibras se ve afectada sólo con 1 equivalente de Zn(II). Estos resultados parecen indicar que el primer sitio de unión a Zn(II) es la His8, pero esta unión no conduce a una conformación más amiloidogénica. El segundo sitio de unión parece ser la His99, pues en la proteína H8S con 1 equivalente de Zn(II) se observa el mismo efecto que en la proteína R24G con 2 equivalentes. El efecto observado es la aceleración de la cinética de formación de fibras, debido a que la interacción del Zn(II) con His99 podría conducir a pérdida de interacciones cruciales entre el CDR3 con el CDR1 y el asa C", aumentando la flexibilidad y dinámica de estas regiones promoviendo la agregación de la proteína como se reportó en estudios anteriores para el Cu(II)<sup>46</sup>.

Todo lo anterior es congruente con lo observado en la DM His, la cual presenta dos sitios de unión con afinidades cerca de un orden de magnitud menores (13.3 y 13.6  $\mu\text{M}$ ) que las observadas para la R24G, sugiriendo que en ausencia de histidinas el Zn(II) se une en sitios de menor afinidad. Las cinéticas de formación de fibras de esta variante muestran cambios significativos sólo para 2 equivalentes de Zn(II). Tomando en cuenta los sitios predichos por el servidor MIB<sup>49</sup> se podría proponer que el primer equivalente de Zn(II) se une en el sitio E86,D88 y estabiliza la conformación del asa E-F y por esta razón no se observan cambios significativos en los  $t_{\text{lag}}$ . Sin embargo, al adicionar 2 equivalentes de Zn(II) se llenaría el sitio E84,D85 y ambos sitios ocupados desestabilizarían el asa E-F, conduciendo a pérdida de interacciones de esa región que se ha reportado como región protectora de amiloidogenicidad<sup>57</sup>. El sitio R40,E86, a pesar de tener el puntaje más alto en la predicción, no se considera como uno de los sitios de unión a Zn(II) porque sólo se predice para la R24G y los datos experimentales apuntan a que los dos sitios de unión de esta proteína son la His8 y la His99. Si bien en este sitio el Zn(II) podría estar interactuando con cadena principal, o tener interacciones de tipo catión- $\pi$  con el grupo guanidino, la carga positiva de la arginina a pH fisiológico podría limitar la interacción por repulsión electrostática.

De todos los resultados anteriores se puede concluir que el Zn(II) afecta la cinética de formación de fibras amiloides de la proteína R24G de manera dependiente de la concentración del ion metálico. El cuerpo humano tiene cantidades muy pequeñas de Zn(II),

alrededor de 2-3 g en una persona de 70 kg<sup>30,33</sup>. Los iones metálicos viajan unidos a proteínas, sin embargo, en varias enfermedades conformacionales se ha observado pérdida de la homeostasis, aumentando la concentración de iones metálicos no quelados que pueden unirse a proteínas como las cadenas ligeras y afectar su estabilidad o promover su agregación. Por lo tanto, es importante continuar con el estudio de la bioinorgánica de AL para comprender todos los posibles factores de riesgo en el mecanismo de agregación.

## PERSPECTIVAS

1. Evaluar el efecto del Zn(II) en la variante ΔH99.
2. Evaluar los sitios de unión de Zn(II) por RMN.
3. Evaluar los cambios conformacionales inducidos por la unión a Zn(II) por RMN en tiempo real.
4. Evaluar cambios conformacionales por EPR-DEER.

## REFERENCIAS

1. Nelson DL, Cox MM. Aminoacids, peptides and proteins. In: *Lehninger Principles of Biochemistry*. Seventh. ; 2018:3171.
2. Chiti F, Dobson C. Amyloid Formation, Protein Homeostasis, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade. *Annu Rev Biochem*. 2017;86(1):1-42.
3. Barragán Martínez D, García Soldevilla MA, Parra Santiago A, Tejeiro Martínez J. Alzheimer's disease. *Med*. 2019;12(74):4338-4346. doi:10.1016/j.med.2019.03.012
4. Merlini G, Dispenzieri A, Santhorawala V, et al. Primer Amiloidosis. doi:10.1038/s41572-018-0034-3
5. Pepys MB. Amyloidosis. *Annu Rev Med*. 2006;57:223-241. doi:10.1146/annurev.med.57.121304.131243
6. Gillmore JD, Booth DR, Rela1 M, et al. *Original Papers QJM Curative Hepatorenal Transplantation in Systemic Amyloidosis Caused by the Glu526Val Fibrinogen A-Chain Variant in an English Family*. Vol 93.; 2000. <https://academic.oup.com/qjmed/article/93/5/269/1515207>
7. Dispenzieri A, Gertz MA, Buadi F. What do I need to know about immunoglobulin light chain (AL) amyloidosis? *Blood Rev*. Published online 2012. doi:10.1016/j.blre.2012.03.001
8. Aguirre MA, Boietti BR, Nucifora E, et al. Incidence rate of amyloidosis in patients from a medical care program in Buenos Aires, Argentina: a prospective cohort. *Amyloid*. 2016;23(3):184-187. doi:10.1080/13506129.2016.1207626

9. Hemminki K, Li X, Försti A, Sundquist J, Sundquist K. Incidence and survival in non-hereditary amyloidosis in Sweden. *BMC Public Health*. 2012;12:1. doi:10.1186/1471-2458-12-974
10. Hernández-Santoyo A, del Pozo Yauner L, Fuentes-Silva D, et al. A single mutation at the sheet switch region results in conformational changes favoring  $\lambda$ 6 light-chain fibrillogenesis. *J Mol Biol*. 2010;396(2):280-292. doi:10.1016/j.jmb.2009.11.038
11. Del Pozo Yauner L, Ortiz E, Sánchez R, et al. Influence of the germline sequence on the thermodynamic stability and fibrillogenicity of human lambda 6 light chains. *Proteins Struct Funct Genet*. 2008;72(2):684-692. doi:10.1002/prot.21934
12. Hurler MR, Helms LR, Li LIN, Chan W, Wetzel R. A role for destabilizing amino acid replacements. 1994;91(June):5446-5450.
13. Wall J, Schell M, Murphy C, Hrcic R, Stevens FJ, Solomon A. Thermodynamic Instability of Human  $\lambda$  6 Light Chains : Correlation with. Published online 1999:14101-14108.
14. Shirahama T, Cohen AS. HIGH-RESOLUTION ELECTRON MICROSCOPIC ANALYSIS OF THE AMYLOID FIBRIL.
15. Swuec P, Lavatelli F, Tasaki M, et al. patient. *Nat Commun*. (2019):1-9. doi:10.1038/s41467-019-09133-w
16. Gade Malmos K, Blancas-Mejia LM, Weber B, et al. ThT 101: a primer on the use of thioflavin T to investigate amyloid formation. *Amyloid*. 2017;24(1):1-16. doi:10.1080/13506129.2017.1304905
17. Pepys MB, Dyck RF, de Beer FC, Skinner M, Cohen AS. Binding of serum amyloid P-component (SAP) by amyloid fibrils. *Clin Exp Immunol*. 1979;38(2):284-293. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/118839><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1537850>
18. Tennent GA, Lovat LB, Pepys MB. Serum amyloid P component prevents proteolysis of the amyloid fibrils of Alzheimer disease and systemic amyloidosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(10):4299-4303. doi:10.1073/pnas.92.10.4299
19. Khurana R, Khurana R, Ionescu-Zanetti C, et al. A general model for amyloid fibril assembly based on morphological studies using atomic force microscopy. *Biophys J*. 2003;85(2):1135-1144. doi:10.1016/S0006-3495(03)74550-0
20. Kozlowski H, Luczkowski M, Remelli M, Valensin D. Copper, zinc and iron in neurodegenerative diseases (Alzheimer's, Parkinson's and prion diseases). *Coord Chem Rev*. 2012;256(19-20):2129-2141. doi:10.1016/j.ccr.2012.03.013
21. Yauner LP, Ortiz E, Becerril B. The CDR1 of the Human  $\lambda$  VI Light Chains Adopts a New Canonical Structure. 2006;129(2001):122-129. doi:10.1002/prot.20779
22. Maya-Martinez R, Gil-Rodriguez P, Amero C. Solution structure of 6aJL2 and 6aJL2-

- R24G amyloidogenesis light chain proteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;456(2):695-699. doi:10.1016/j.bbrc.2014.12.044
23. Rudiño-Piñera E, Peláez-Aguilar ÁE, Amero C, Díaz-Vilchis A. Crystal structure of 6aJL2-R24G light chain variable domain: Does crystal packing explain amyloid fibril formation? *Biochem Biophys Reports.* 2019;20(August):100682. doi:10.1016/j.bbrep.2019.100682
  24. Vald G. Convergent mechanisms favor fast amyloid formation in two lambda 6a Ig light chain mutants. 2017;(March). doi:10.1002/bip.23027
  25. Rotilio G, Carr'i MT, Rossi L, Ciriolo MR. Copper-dependent oxidative stress and neurodegeneration. *IUBMB Life.* 2000;50(4-5):309-314. doi:10.1080/15216540051081074
  26. Miller Y, Ma B, Nussinov R. Metal binding sites in amyloid oligomers: Complexes and mechanisms. *Coord Chem Rev.* 2012;256(19-20):2245-2252. doi:10.1016/j.ccr.2011.12.022
  27. Maret W. The metals in the biological periodic system of the elements: Concepts and conjectures. *Int J Mol Sci.* 2016;17(1):1-8. doi:10.3390/ijms17010066
  28. Percival SS. Copper and immunity. *Am J Clin Nutr.* 1998;67(5 SUPPL.):1064-1068. doi:10.1093/ajcn/67.5.1064S
  29. Mezzaroba L, Alfieri DF, Colado Simão AN, Vissoci Reiche EM. The role of zinc, copper, manganese and iron in neurodegenerative diseases. *Neurotoxicology.* 2019;74(March):230-241. doi:10.1016/j.neuro.2019.07.007
  30. Maret W. Zinc and human disease. *Met Ions Life Sci.* 2013;13:389-414. doi:10.1007/978-94-007-7500-8\_12
  31. Das N, Raymick J, Sarkar S. Role of metals in Alzheimer's disease. *Metab Brain Dis.* 2021;36(7):1627-1639. doi:10.1007/s11011-021-00765-w
  32. Hellman NE, Gitlin JD. Etabolism and. 2002;1948(39). doi:10.1146/annurev.nutr.22.012502.114457
  33. Zoroddu MA, Aaseth J, Crisponi G, Medici S, Peana M, Nurchi VM. The essential metals for humans: a brief overview. *J Inorg Biochem.* 2019;195:120-129. doi:10.1016/j.jinorgbio.2019.03.013
  34. Miller Y, Ma B, Nussinov R. Zinc ions promote alzheimer a $\beta$  aggregation via population shift of polymorphic states. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(21):9490-9495. doi:10.1073/pnas.0913114107
  35. Yu YP, Lei P, Hu J, Wu WH, Zhao YF, Li YM. Copper-induced cytotoxicity: Reactive oxygen species or islet amyloid polypeptide oligomer formation. *Chem Commun.* 2010;46(37):6909-6911. doi:10.1039/c0cc02141e
  36. Ward B, Walker K, Exley C. Copper(II) inhibits the formation of amylin amyloid in vitro.

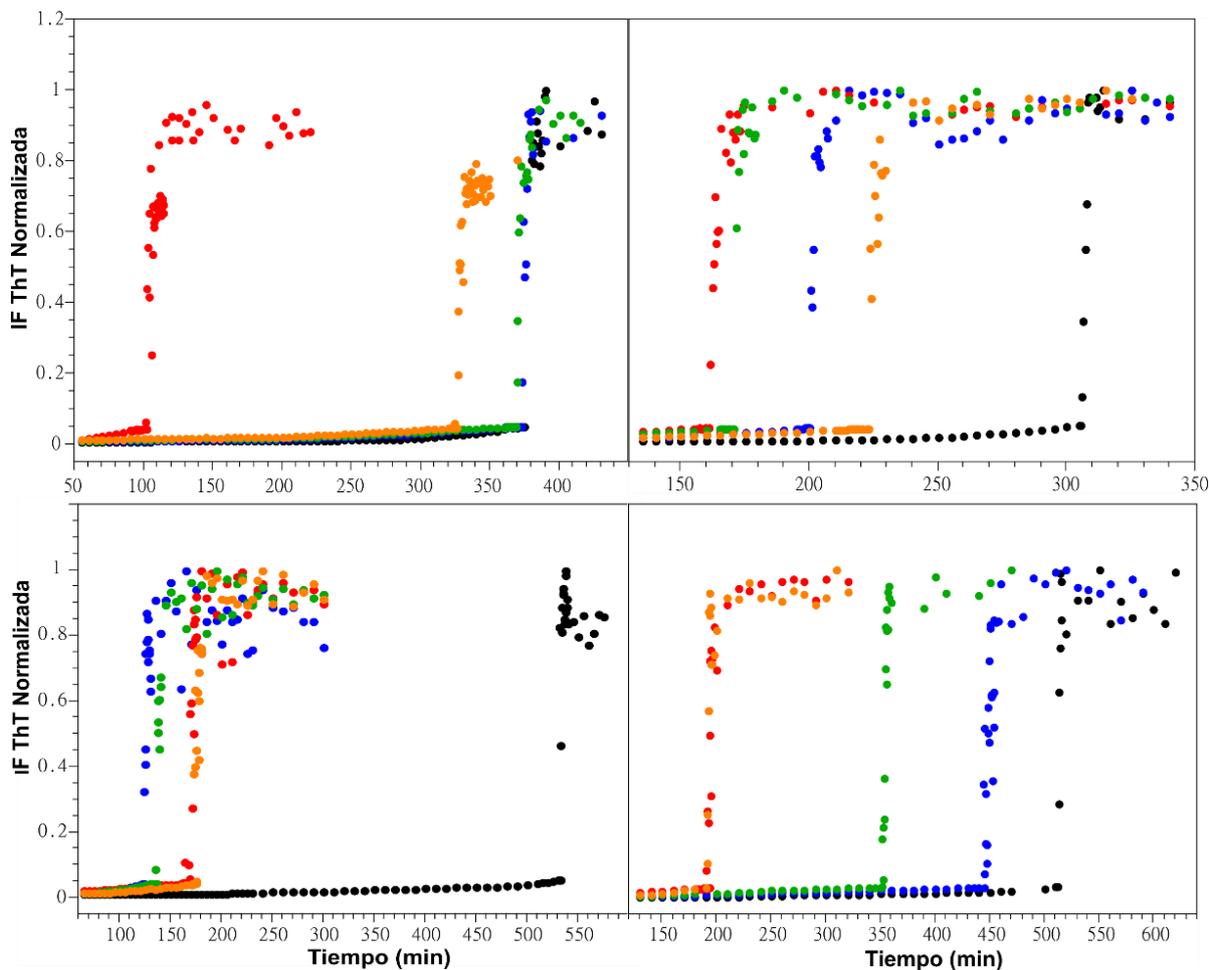
- J Inorg Biochem.* 2008;102(2):371-375. doi:10.1016/j.jinorgbio.2007.09.010
37. Rivillas-Acevedo L, Sánchez-López C, Amero C, Quintanar L. Structural Basis for the Inhibition of Truncated Islet Amyloid Polypeptide Aggregation by Cu(II): Insights into the Bioinorganic Chemistry of Type II Diabetes. *Inorg Chem.* 2015;54(8):3788-3796. doi:10.1021/ic502945k
  38. Calabrese MF, Miranker AD. Metal binding sheds light on mechanisms of amyloid assembly. *Prion.* 2009;3(1):1-4. doi:10.4161/pri.3.1.8601
  39. Yoshiike Y, Tanemura K, Murayama O, et al. New Insights on How Metals Disrupt Amyloid  $\beta$ -Aggregation and Their Effects on Amyloid- $\beta$  Cytotoxicity\*. *J Biol Chem.* 2001;276(34):32293-32299. doi:10.1074/jbc.M010706200
  40. Bocharova O V., Breydo L, Salnikov V V., Baskakov I V. Copper(II) inhibits in vitro conversion of prion protein into amyloid fibrils. *Biochemistry.* 2005;44(18):6776-6787. doi:10.1021/BI050251Q
  41. Wadsworth JDF, Hill AF, Joiner S, Jackson GS, Clarke AR, Collinge J. Strain-specific prion-protein conformation determined by metal ions. *Nat Cell Biol.* 1999;1(1):55-59. doi:10.1038/9030
  42. Dong J, Joseph CA, Borotto NB, Gill VL, Maroney MJ, Vachet RW. Unique effect of Cu(II) in the metal-induced amyloid formation of  $\beta$ -2-microglobulin. *Biochemistry.* 2014;53(8):1263-1274. doi:10.1021/bi4016583
  43. Borotto NB, Zhang Z, Dong J, Burant B, Vachet RW. Increased  $\beta$ -Sheet Dynamics and D-E Loop Repositioning Are Necessary for Cu(II)-Induced Amyloid Formation by  $\beta$ -2-Microglobulin. *Biochemistry.* 2017;56(8):1095-1104. doi:10.1021/acs.biochem.6b01198
  44. Srikanth R, Mendoza VL, Bridgewater JD, Zhang G, Vachet RW. Copper binding to  $\beta$ -2-microglobulin and its pre-amyloid oligomers. *Biochemistry.* 2009;48(41):9871-9881. doi:10.1021/bi901172y
  45. Davis DP, Gallo G, Vogen SM, et al. Both the environment and somatic mutations govern the aggregation pathway of pathogenic immunoglobulin light chain. *J Mol Biol.* 2001;313(5):1021-1034. doi:10.1006/jmbi.2001.5092
  46. Pelaez-Aguilar AE, Valdés-García G, French-Pacheco L, Pastor N, Amero C, Rivillas-Acevedo L. Site-Specific Interactions with Copper Promote Amyloid Fibril Formation for  $\lambda$ 6aJL2-R24G. *ACS Omega.* 2020;5(13):7085-7095. doi:10.1021/acsomega.9b03220
  47. Wien F, Boros E, Vad H, et al. BeStSel: webserver for secondary structure and fold. *Andras Molnar.* 2022;50(May):90-98.
  48. Beccaria et al., Bracaglia. 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiol Behav.* 2017;176(5):139-148. doi:10.1038/nprot.2016.044.Integration

49. Lin YF, Cheng CW, Shih CS, Hwang JK, Yu CS, Lu CH. MIB: Metal Ion-Binding Site Prediction and Docking Server. *J Chem Inf Model.* 2016;56(12):2287-2291. doi:10.1021/acs.jcim.6b00407
50. Lu CH, Lin YF, Lin JJ, Yu CS. Prediction of metal ion-binding sites in proteins using the fragment transformation method. *PLoS One.* 2012;7(6):1-12. doi:10.1371/journal.pone.0039252
51. Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, et al. SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(W1):W296-W303. doi:10.1093/nar/gky427
52. DiCostanzo AC, Thompson JR, Peterson FC, Volkman BF, Ramirez-Alvarado M. Tyrosine residues mediate fibril formation in a dynamic light chain dimer interface. *J Biol Chem.* 2012;287(33):27997-28006. doi:10.1074/jbc.M112.362921
53. Albinsson B, Nordén B. Excited-state properties of the indole chromophore. Electronic transition moment directions from linear dichroism measurements: Effect of methyl and methoxy substituents. *J Phys Chem.* 1992;96(15):6204-6212. doi:10.1021/j100194a023
54. Pelaez-Aguilar, Caracterización de la interacción de Cu(II) con la proteína 6aJL2-R24G relacionada con la enfermedad de amiloidosis de cadena ligera Angel E. Caracterización de la interacción de Cu(II) con la proteína 6aJL2-R24G, relacionada con la enfermedad de amiloidosis de cadena ligera. Published online 2021. <http://riaa.uaem.mx/handle/20.500.12055/1392>
55. Salgado Mata MF. Análisis espectroscópico del efecto de iones metálicos en la agregación de una variante de la proteína  $\lambda$ 6aJL2R24G. Published online 2022. <http://riaa.uaem.mx/handle/20.500.12055/2940>
56. Del Pozo-Yauner L, Wall JS, González Andrade M, et al. The N-terminal strand modulates immunoglobulin light chain fibrillogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;443(2):495-499. doi:10.1016/j.bbrc.2013.11.123
57. Velázquez-López I, Valdés-García G, Romero Romero S, et al. Localized conformational changes trigger the pH-induced fibrillogenesis of an amyloidogenic  $\lambda$  light chain protein. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj.* 2018;1862(7):1656-1666. doi:10.1016/j.bbagen.2018.04.014

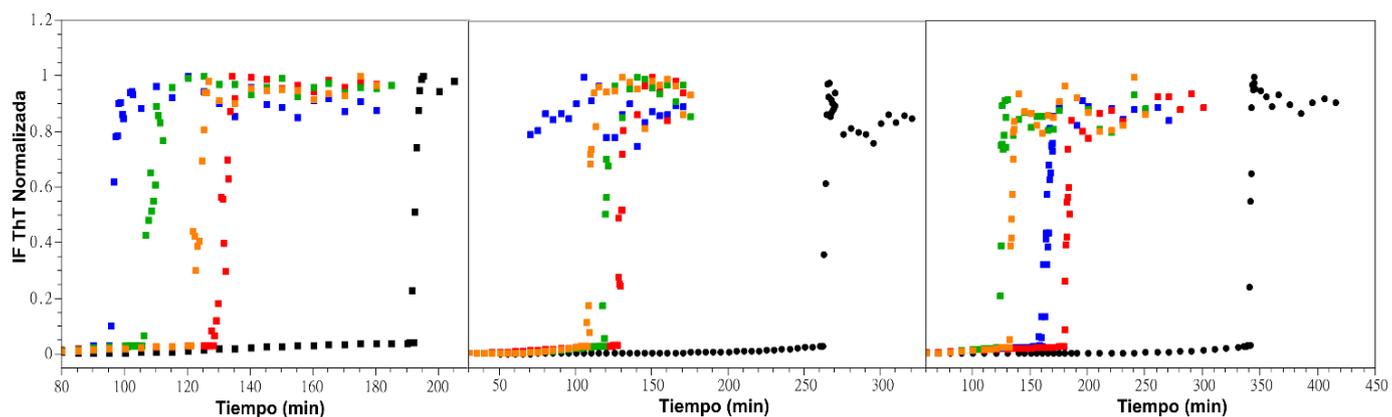
## ANEXOS

### ANEXO A: CINÉTICAS DE FORMACIÓN DE FIBRAS AMILOIDES

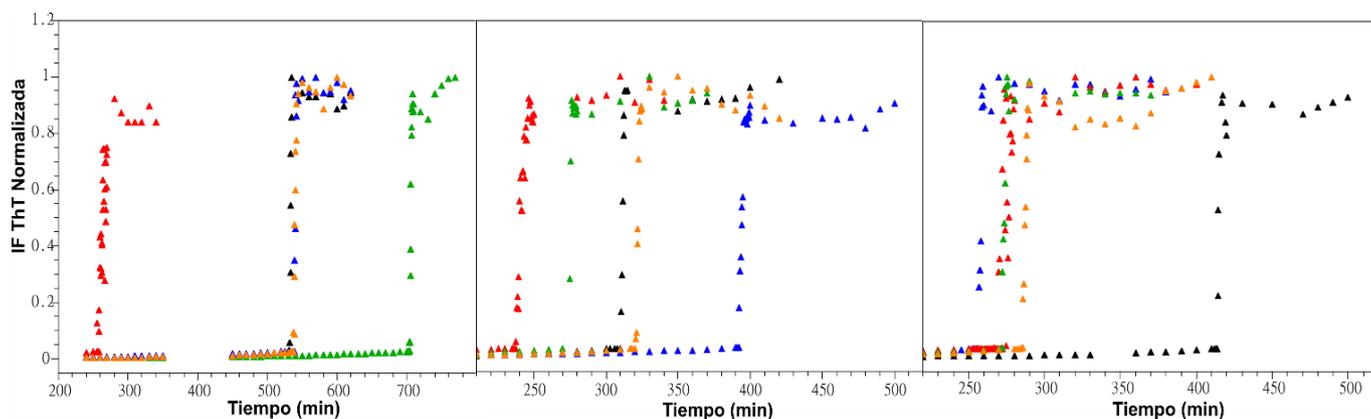
En las figuras A1, A2 y A3 se muestran todas las cinéticas de formación de fibras de las proteínas R24G, H8S y DM His respectivamente. Estas cinéticas fueron con las cuales se calculó el promedio y la desviación estándar reportadas en la Tabla 3.



**Figura A1. Cinéticas de formación de fibras de la proteína R24G.** En todos los casos 0 equivalentes (negro), 1 equivalente (azul), 2 equivalentes (rojo), 3 equivalentes (verde) y 4 equivalentes (naranja).



**Figura A2. Cinéticas de formación de fibras de la proteína H8S.** En todos los casos 0 equivalentes (negro), 1 equivalente (azul), 2 equivalentes (rojo), 3 equivalentes (verde) y 4 equivalentes (naranja).



**Figura A3. Cinéticas de formación de fibras de la proteína DM His.** En todos los casos 0 equivalentes (negro), 1 equivalente (azul), 2 equivalentes (rojo), 3 equivalentes (verde) y 4 equivalentes (anaranjado).

**Tabla A1.** Tiempos lag de las cinéticas de cada proteína.

Proteína	t <sub>lag</sub> (min)				
	# eq Zn(II)	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 4
R24G	0	375	304.7	530	511.38
	1	371	200	123	442.29
	2	159	102	167.5	189.02
	3	370	170	135	350.97
	4	326	223	173	189.20
H8S	0	191.2	261.7	339.57	-
	1	94.16	64.9	158.6	-
	2	127.6	124.1	178.2	-
	3	102.5	116.4	121.95	-
	4	120.2	106	130.75	-
DM His	0	532.13	310.04	411.51	-
	1	538.7	391.52	256.51	-
	2	255.12	235.87	267.99	-
	3	703.83	269.57	271.44	-
	4	537.7	320.18	285.15	-

## **ANEXO B: AFINIDAD DEL Zn(II) POR LAS PROTEÍNAS R24G Y VARIANTES DE HISTIDINA.**

Al titular la proteína H8S con Zn(II) se observaron al menos dos eventos como se muestra en la Figura B4. Ya que no fue posible ajustar el isoterma completo a un modelo, se eligió el primer evento para hacer el ajuste, debido a que el segundo evento probablemente se deba a la agregación de la proteína.

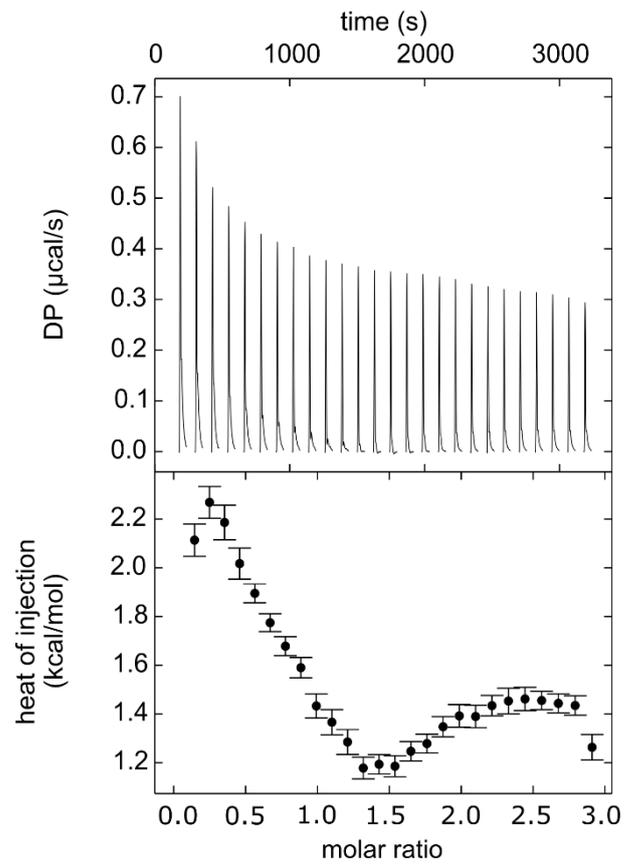


Figura B4. Isotherma completo de la proteína H8S.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



**DRA. LINA ANDREA RIVILLAS ACEVEDO**  
**COORDINADORA DEL POSGRADO EN CIENCIAS**  
**PRESENTE**

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la TESIS titulada: **Caracterización del Efecto del Zn(II) en la Formación de Fibras Amiloides de la Proteína 6aJL2-R24G**, que presenta el alumno **Alan Morales Ortiz (10046080)** para obtener el título de **Maestro en Ciencias**.

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN	FIRMA
Dra. Carmen Nina Pastor Colón CIDC-UAEM	APROBADO	
Dr. Rodrigo Said Razo Hernández CIDC-UAEM	APROBADO	
Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco FM-UNAM	APROBADO	
Dr. Enrique Rudiño Piñera IBT-UNAM	APROBADO	
Dra. Lina Andrea Rivillas Acevedo CIDC-UAEM	APROBADO	



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

**LINA ANDREA RIVILLAS ACEVEDO | Fecha:2023-05-23 17:40:39 | Firmante**

UXXxR0hIGKB0QE4D59mtwpFX9QxicAdTXFzWk0G5y8C19A/W3MKwTuyuiTcqF8aHx3imGJfcJAlcriEDpAdTjWAEUwWjOhurz4lOq4zL2/Dg+wZmZOTx8MnfoEmI7z7LGf0HYza  
dUaq2/ea3qk2RyGcdlhJbq2llneW70Vj0QCzEwUmH4ZQFaaKtVPWPmzLdQzNi0QrxXp1BmQCz6CY3MAktsZllii7gXNews2Ct0yKnQEaZwTGM7xW2EOHUGEiWWh6FwHVZaL  
bOKfk0BVpGijLoeGyhMQU+8z8AhZbW2ifShMdDsg8XILspbNOC+4F/LJZj1w2SWwYouNJuEZcS7sw==

**RODRIGO SAID RAZO HERNANDEZ | Fecha:2023-05-23 19:14:53 | Firmante**

W06v2aEF5tMLuZGVUVbi0F7szvlfITG1LuvRSomuhzXw5hnXSB4q4kFndUHFj3e+1qtk/sn1WhiDxzVMSvoXYQqvRolUajyYh+SYS5zAy+J2fm+ZZ/egt9s4RzkVCDVZu9Y7OLygb/  
RLaptmwsjWQtByTdkND+Vq+yVbdi0GBrknjyBlr9905L4zxXavsZSdb42nNuZa5qT0oA4RPHQkgkagFMiu+MwiqROJtTW27tro2rO2ZZIU9MWPpNojGPGRC/PSRvHJNHNHhifV  
VYqkGh9SsSfS+RYTksnSzFKQ0VyDkFcV8OApp8yzjHlyyhF4yUvc4GpL07/pOT3yRAw==

**DANIEL ALEJANDRO FERNÁNDEZ VELASCO | Fecha:2023-05-24 08:05:28 | Firmante**

xDUYeNGggyDFkyVADiIV29Op+I0tH3PcPUfoBPo/ZPw0/pvmuQlwn5VyFy8g5LYZZMmtlgSeYfciO1olnolYJ2TdqM2v6ytogeYa1d3i2f++DD6XG7wByXI068N+oeKpLKhpydp2NL  
hM6r1qT6d5MxJQDZeIMp/puluLNPMSbGA93am4Sc2LigBdEtAnodSxWqGiETvPLtSnxplC08LaxTTPFJON16QDNVcz4D1WLkZLmZZUI/XUvd7PeVctJYcmXpkVbMdnPLwZ  
NEZLsslP/2w51Rtt77Z7U4S5K7ZUf2glbHNOsfzQ5hsxocS9kanEx9lkPimlQLqVUwtQvg==

**CARMEN NINA PASTOR COLON | Fecha:2023-05-24 08:18:36 | Firmante**

vZ3xlEwg+0uCLCLY/Ya5C5fjy3+bQBmh4pwK+InOxTu1i08CzQL48PhBNA46DjAdkDstnoC5o7jJmtj5Ra4IxUSJkEWb7OyAd1qOC02OFel+tkQJMITR5WCbg5l1yDF9lJs1CRwl3Jr  
y7E82nQ5gOJGcbEjoqE2eVCQjwlg/Xd1gFNzdrOTiH4BMWakviX2cxQE7zt+PTjp7NmKwUz0hauS/PNe0ewlWh5/HFJ/YOuLYtw2A+bYtrMkCBGpl7sx4ylFTdSa4s4FCnf0AJw  
ElrQZPBKrnPZuY/WNGb7T5y/WqlfCAZF4v7oi3Ym+DSKbFteV1ta0qxQ2nhmu3A==

**ENRIQUE RUDIÑO PIÑERA | Fecha:2023-05-24 10:49:33 | Firmante**

E8UwboLFdlu/bS8uE6lfa3/lwb1S/gaGyd0kv2l9vLY3J+TKtnh8cSAv5Kn4ftqRTzi+f0S+eO+79zEbEvdQishAMY2d1JdkmYQUFgyATBzwlLnL4R47mb499BE0aSijPavBFTOQW5  
9ZGvtZK5hp55uXdrn0ggCRGIPhOtLakuINOliORNOGAzEM6m8ifNCq3aZWIAokjKZ2TeQJDYZTFDCImXH1/A5yrcmwtg6QcKLihgNji3F8fvzTtg1R97HZYI6SFLZDOFXlvyD  
OmePW7U9EDmYXcbFs7hlyEoNfDx+eJs3jFe0ldKi+6Ptj7+A2V9+mFF9yKQlexDFSsw==

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



rD5dRgkMh

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/qRy0ZupNRbkukC0D5XyEQP21ljHXYFa5>

