

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS
CIQ-UAEM

Análisis del desplegamiento de la 6aJL2 a pH 2.0 y 37°C

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Lic. Yadira Rosa Meunier Carmenate

**DIRECTOR DE TESIS
*Dr. Carlos Daniel Amero Tello***

CUERNAVACA, MORELOS

NOVIEMBRE, 2021



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS
CIQ-UAEM

Análisis del desplegamiento de la 6aJL2 a pH 2.0 y 37°C

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS PRESENTA:

Lic. Yadira Rosa Meunier Carmenate

DIRECTOR DE TESIS
DR. CARLOS DANIEL AMERO TELLO
CENTRO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS, UAEM

JURADO REVISOR DE TESIS:

Dra. CARMEN NINA PASTOR COLÓN
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR, UAEM

Dr. RODRIGO SAID RAZO HERNÁNDEZ
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR, UAEM

Dr. DANIEL ALEJANDRO FERNÁNDEZ VELASCO
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

Dra. PALOMA COLUMBA GIL RODRÍGUEZ
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

**DR. JEAN MICHEL GRÉVY MACQUART
COORDINADOR DEL POSGRADO EN CIENCIAS
PRESENTE**

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la TESIS titulada: **Análisis del desplegamiento de la 6aJL2 a pH 2.0 y 37°C**, que presenta la alumna **Yadira Rosa Meunier Carmenate (10036243)** 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 Facultad de Medicina-UNAM	APROBADO	
Dra. Paloma Columba Gil Rodríguez IBT-UNAM	APROBADO	
Dr. Carlos Daniel Amero Tello CIQ-UAEM	APROBADO	



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

CARLOS DANIEL AMERO TELLO | Fecha:2021-11-04 11:00:44 | Firmante
 O7JRCSm+Ovms+KH8M+OQaDHE0Gh7YuzYtpsiG0G+oAoJQWBT72ywdri9p6rAEd1CLqrS4Ugv6vs78Nl4o6JQM5LMle9UQNeR3z0BC2Xp80kriaWXf9GgpmgmseVdG8A
 LTPvPWqj099hW8SzawoPbuoyUyDdvJ80DL+HysL+FHphEYsY8n26Yfthprdf0020julCGAzXSe+hu0FoygDRClvMSZAXraaydaSUBC2QZbrQw3lsdVvwVZQK3BwmpdyfPavh
 dQ2jdi+82gtsG30+43uIQ3VhXTESTmYmthoQOZBrBeQnoHAZQIObuCSCJzpOrJRbQHuNA==

PALOMA COLUMBA GIL RODRÍGUEZ | Fecha:2021-11-04 11:01:55 | Firmante
 sLBDyBmdmxSM4RXQD8FgNjZnzh05LwI+upTklLhprmsCH6oEWPzOKobO3R2d89cQk2y+sse+HISV78lxu/vxzDEr78IAHHAWINBdShalcr80BgpWjry52Thcjv1QQihD2ae1+Y
 S1SeJf0Y0u8lUUGDqCDSJrodYm2F8ryU7Dn3vQUkhJ29VrR2K23fZvEbFmsOeczFT+1fzQ5ltumCf5T355aGXA4D068rPbdsdoNITEe4s2LnGh9WfuhMokR3wJ1krt4XY08sNh
 QduwU0fH8HvFXWo2m5rN8eDhIGRQLxZYos2Ddt8r85NwUboNguRwIqjRWLzQ==

CARMEN NINA PASTOR COLON | Fecha:2021-11-04 11:23:00 | Firmante
 OrdM7Ldlq+evIQKnGcuJle4vUHEenb3ZskWMM188nXKA3ZwCmpKCKW0314Nmlix36q3bOXE6I6BDNurwNbWM2ZY08l92jRov8xpcjwHsznDUEesgHUTIFMpgAD35A07LL
 uc6Pw6GTg8ytlwIFeIFD02jyQjFes7KDK14S0cAgF1jO4n+CCRhJQw8uxHLzFibeBwFTurolmKF5darpq+IAw/5n3f8yzt0FdxZHzHpB3XKNXyApePcpdUvedoC/Z+Qg5HP
 9zVVoU+ZE/gH8OrFLZORn+1RDE7WVQWNIpXDBhg+RfifP21TznVoaKTXR/Wg==

DANIEL ALEJANDRO FERNÁNDEZ VELAZCO | Fecha:2021-11-04 13:18:40 | Firmante
 b+sq11f2KZF0mp4rQVQWkhTYA9yH4X0out/PuQv0v1QMcb6kLLKoCKHSho7ADJFdlVVKPpH+CCRBVx8Qy3qkIBBvGeU/9oKOO/Lwn6qObK51+qih6WSj6LJMUD5XmAnK7
 PBwQRvcv4C14J80Q7LjAGC(SEEeWpRleWRhPclepfG+ucJkZDxPdRBT8kmDeF1+Elg7gmi+1wzUR02qHZC1V2Bmx4bNqgXHYClq2RrGDloJ7yOdAnTj)eHXoy4TassSVTj
 u+XA3Gw0t2yVA75Xbv3Y9vzRbwMETH7geA4p09LaG0JmxTbUzn+76+PrJUs5+BCcyg==

RODRIGO SAID RAZO HERNANDEZ | Fecha:2021-11-04 14:23:08 | Firmante
 ob7wnCabFoUPcYAGSvBNjQfy+5PKeBDQx7WQpdpDxT1oiT26PKleFCerNjObafaRvDWIoW9KqrsaZgC/Lmywv1R+Cx-JQN88KEXSSaVks1VetaQYdZkastsTOqBxj3884
 RQRzRX7ZoEHRLLvudVfP+ptYlmmrCZ0o7BEIn8s06+IQXHo9m7NLUpm62QcZ7J8HyXaEFuISSMfuTXA+zY9VVKWo8Dw7f0FrdcvVE+eXadwrf1VjmnWKFVwwJnz5ZPH
 KY0uZB1Mlyqgo6z0+0507busw1/EbKsaChm6vZNXqkXgsdRe7QJyJQqESA1Tp8QHnQA==

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



xj3Ze6h8

<https://efirma.uaem.mx/hoRepublo/LI/8u8qSMNvpQ2wYBYZjD2uQg1HydX>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante mis estudios de maestría (CVU 1028396).

Al proyecto de Cadenas ligeras (A1S11842).

A mi comité tutorial por sus consejos y dedicación, al Dr. Ramón González por haberme permitido trabajar en su laboratorio y hacerme parte de su grupo, por su ayuda y sabiduría, gracias. A la Dra. Nina Pastor por ser una excelente persona y sus valiosos consejos. A la Dra. Lina Rivillas por su ayuda. Gracias a todos.

Al jurado evaluador de esta tesis los Drs Nina Pastor, Paloma Gil, Alejandro Fernández y Rodrigo Razo, muchas gracias por su tiempo y dedicación.

A mi tutor Carlos Amero, por haberme dado la oportunidad de realizar esta tesis en su laboratorio, por su confianza, sus infinitos consejos y por ser una excelente guía como investigador y más aún como ser humano. Un mejor tutor no hubiese podido tener, mil gracias, de corazón.

A mis compañeros de laboratorio, a los que ya no están y a los que siguen presentes. A ellos que son mis amigos también: Kim, Vanesa y Reinier, gracias por haber compartido montón de momentos lindos y juntos haber transitado en esta etapa de aprendizaje. A los de otros laboratorios que me extendieron su mano, gracias.

A mis amigos, por su apoyo en este país. Por haber compartido esta linda experiencia.

A mi familia que aunque este lejos es lo más grande que tengo y a pesar de la distancia siempre han estado ahí, dándome su apoyo.

A mis dos motores mi madre y Javier sin ellos no hubiese logrado nada, gracias por todo!!!

Índice

Acrónimos y Definiciones.....	8
Lista de figuras	9
Lista de tablas.....	10
Resumen	11
1 Introducción.....	12
1.1 Plegamiento proteico.....	12
1.2 Mecanismos de plegamiento	12
1.3 Condiciones que inducen desplegamiento	14
1.4 Vías de defensa y regulación de la célula para el desplegamiento proteico.....	15
1.5 Amiloidosis	16
1.6 Causas de amiloidosis.....	16
1.7 Amiloidosis de cadena ligera	17
1.8 6aJL2.....	18
1.9 Efectos del pH y otras condiciones en la formación de fibras en las cadenas ligeras.....	20
1.10 Métodos para el estudio	23
2. Justificación:.....	27
3. Hipótesis:	28
4. Objetivos:	29
4.1 Objetivo general:.....	29
4.2 Objetivos específicos:.....	29
5. Materiales y Métodos	30
5.1 Expresión y Purificación	30
5.2 Determinación de la concentración de proteína	30
5.3 Ensayo de desplegamiento de 6aJL2 mediante espectroscopía de fluorescencia 31	
5.4 Ensayo de desplegamiento de 6aJL2 mediante DLS	31
5.5 Análisis de espectros de RMN en tiempo real	32
6. Resultados y Discusión	33
6.1 Expresión y purificación de la proteína 6aJL2	33
6.2 Diferencias entre los ensayos de desplegamiento de 6aJL2 mediante	

espectroscopía de fluorescencia y DLS	34
6.3 Ensayo de desplegamiento de 6aJL2 mediante fluorescencia y DLS	40
6.4 Análisis de espectros de RMN en tiempo real	46
6.5 Proceso de desplegamiento de la proteína 6aJL2 a pH 2.0 y 7.4 en temperatura de 25 y 37°C	53
7. Conclusiones.....	55
8. Perspectivas.....	56
9. Bibliografía	57

Acrónimos y Definiciones

°C: Grados centígrados

2MMX: Clave acceso (Protein Data Bank) de la estructura de 6aJL2 resuelta por RMN

2W0K: Clave acceso (Protein Data Bank) de la estructura de 6aJL2 resuelta por cristalografía de rayos X.

2xYT: Medio de cultivo

6aJL2(R24G): proteína 6aJL2, mutada la Arg en la posición 24 por una Gly

6aJL2: Proteína que proviene de las líneas germinales λ 6a y el segmento de unión JL2

AL: Amiloidosis de cadenas ligeras

ANS: ácido 8-anilinaftaleno-1-sulfónico

CARA: Software de análisis de RMN; siglas del inglés: Computer Aided Resonance Assignment

CDR1, CDR2, CDR3: Región determinante de complementariedad 1, 2, 3

DLS: Dynamic light scattering / Dispersión dinámica de luz

***E. coli* BL21(DE3):** Cepa de *Escherichia coli* para expresar proteínas recombinantes

ExpPASy: Software para calcular el coeficiente de extinción molar de proteínas

HSQC: siglas del inglés: Heteronuclear Single Quantum Coherence

IF: Intensidad de fluorescencia

IPTG: Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido

mM: Milimolar

pET27-6aJL2: Vector de expresión. El gen de interés se encuentra bajo el promotor del fago T7 de la RNA polimerasa

ppm: Partes por millón

Rh: Radio hidrodinámico

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

rpm: Revoluciones por minuto

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio

ThT: Tioflavina T

Tm: Temperatura media

UV: Ultravioleta

VL: Dominio variable de las cadenas ligeras de las inmunoglobulinas

Lista de figuras

Figura 1: Modelo del embudo de plegamiento.

Figura 2: Estructura de la proteína 6aJL2.

Figura 3: Localización de los residuos aromáticos en la proteína 6aJL2.

Figura 4: Transformación del plásmido pET27b+-6aJL.

Figura 5: Purificación de 6aJL2.

Figura 6: Espectros de fluorescencia a 25°C iniciales.

Figura 7: Cinéticas de desplegamiento seguida por fluorescencia.

Figura 8: Cinéticas de la exposición de regiones hidrofóbicas.

Figura 9: Curvas de correlación del punto inicial de dos réplicas seguidas por DLS.

Figura 10: Espectros iniciales a 25°C para la réplica 6.

Figura 11: Cinética de desplegamiento a 37°C seguida por fluorescencia para la réplica 6.

Figura 12: Cinética de desplegamiento a 37°C seguida por fluorescencia del ANS y cubeta de la muestra para la réplica 6.

Figura 13: Curvas de correlación de las cinéticas de desplegamiento seguidas por DLS

Figura 14: Espectro HSQC de la proteína 6aJL2, pH 2.0 a distintas temperaturas

Figura 15: Cambios de posición de los residuos en el espectro HSQC por efecto de la temperatura a pH 2.0

Figura 16: Espectro HSQC de la proteína 6aJL2 a pH 2.0 y 37°C a distintos tiempos.

Figura 17: Cambios en la posición de los residuos en el espectro HSQC en el tiempo.

Figura 18: Representación en la estructura de la proteína 6aJL2 de los residuos que tuvieron un cambio en el desplazamiento químico.

Figura 19: Curvas de decaimiento de la intensidad de la señal a pH 2.0 y a 37°C.

Figura 20: Comparación entre espectros HSQC de la proteína 6aJL2 con factores desestabilizantes.

Figura 21: Comparación entre espectros HSQC de la proteína 6aJL2 a dos pH y 37°C.

Lista de tablas

Tabla 1: Métodos empleados para el estudio de desplegamiento y agregación proteica modificado de Dobson, 2004.

Tabla 2: Radios hidrodinámicos (Rh) de 6aJL2 obtenidos por el programa Zetasizer a pH 7.4 y 2.0.

Resumen

La amiloidosis de cadena ligera es una enfermedad mortal que consiste en la proliferación anormal de un clon de células plasmáticas monoclonales. Estas células secretan un exceso de cadenas ligeras de inmunoglobulinas al torrente sanguíneo, las cuales se depositan como fibras amiloides insolubles en órganos vitales y tejidos. La proteína 6aJL2 contiene los segmentos de la línea germinal $\lambda 6a$ y JL2, los cuales se han visto de manera frecuente presentes en proteínas de pacientes con amiloidosis de cadena ligera. Hay evidencia de que 6aJL2 *in vitro*, en un rango de pH (2.0 - 8.0) forma agregados fibrilares ordenados. Además, a pH 2.0 ocurren cambios conformacionales en la estructura terciaria. El objetivo de este estudio es caracterizar el proceso de desplegamiento de 6aJL2 a pH 2.0 y 37°C. Para ello se evaluó el efecto de estas condiciones en el desplegamiento por fluorescencia, DLS y RMN. La fluorescencia del triptófano arrojó una ligera variación en la intensidad con una posible agregación, mientras que el incremento en la del ANS indicó exposición de regiones hidrofóbicas. Según los resultados por DLS, la proteína inicialmente comienza como monómero y luego se encuentra como oligómero. En estos ensayos se encontró que el estado oligomérico inicial puede afectar la etapa que transite en el proceso de desplegamiento. Finalmente, en el análisis del desplegamiento de la proteína por RMN, se evidenciaron espectros correspondientes a fracciones plegadas y desplegadas.

1 Introducción

1.1 Plegamiento proteico

Las proteínas son la principal maquinaria de la célula, capaces de mediar múltiples procesos biológicos. Las distintas funciones que pueden ejercer estas biomoléculas están estrechamente relacionadas con su estructura tridimensional. Para lograr esta estructura, hay implicadas diversas interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno, interacciones de van der Waals y electrostáticas (Newberry & Raines, 2019). El proceso por el cual las proteínas alcanzan su estructura tridimensional es llamado el mecanismo de plegamiento.

1.2 Mecanismos de plegamiento

Se han propuestos distintos modelos para intentar explicar como ocurre el plegamiento de una proteína. Wetlaufer en 1973, propuso el modelo de nucleación-propagación, en donde un núcleo local de estructura secundaria es quien induce la formación de la estructura secundaria restante (Wetlaufer, 1973). Kim y Baldwin en 1982, abogan por un modelo de armazón o “framework” donde tras una primera nucleación, se forman los elementos de estructura secundaria, los cuales se asociarán para formar estructuras supersecundarias y a partir de ellas, la estructura terciaria (P. S. Kim & Baldwin, 1982). En 1976, Karplus y Weaver proponen el modelo de difusión-colisión donde se forman microdominios en la proteína con estructuras secundarias. Estos cuando chocan, forman la estructura nativa de la proteína. Esto permite la posibilidad de que se formen regiones con estructuras transitorias y finalmente se fusionen y formen la estructura final (Karplus & Weaver, 1976). Otro modelo de plegamiento es el del colapso hidrofóbico, en el cual ocurre un colapso inicial en la molécula conducido por un efecto hidrofóbico. Este proceso sucede antes de la formación de la estructura secundaria y de la terciaria totalmente plegada (Dill, 1985). Finalmente, en el modelo unitario (nucleación-condensación), primero se forma un núcleo de plegamiento relacionado con la previa disminución de su tamaño y posteriormente se condensa alrededor del núcleo la estructura restante. Este aumentará su estabilidad al tener un número de interacciones de estructura secundaria y terciarias correctas, lo que puede prevenir el plegamiento incorrecto en las etapas finales de plegado (Nölting & Agard, 2008).

A pesar de que todos estos modelos se favorecen por el plegamiento a través de interacciones atractivas, es cierto que no todas las interacciones posibles se establecen

debido a que la formación de una impide la formación de otras. Contrario a esta situación de frustración que se crea, en el estado de menor energía (donde hay un mínimo de frustración) es donde hay mayor cantidad de interacciones atractivas (Mas Monserrat, 2018).

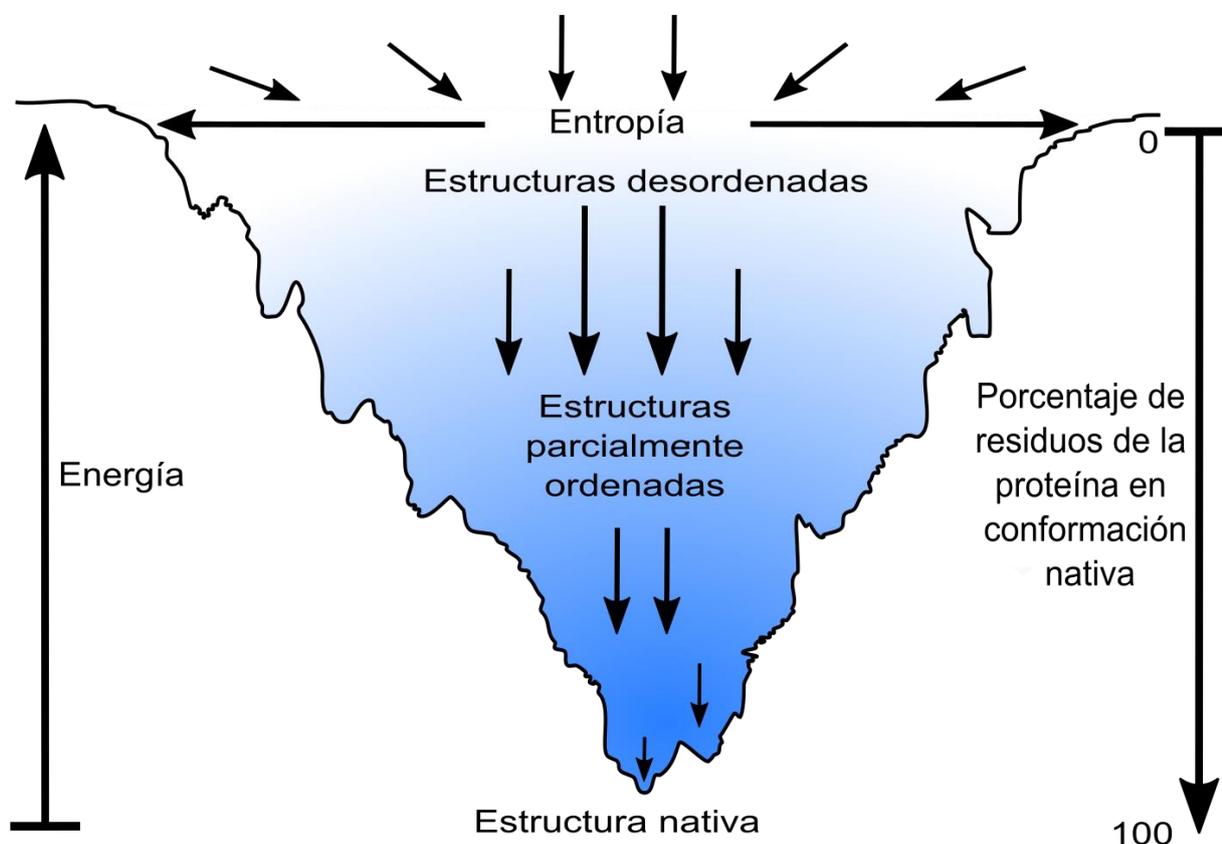


Figura 1: Modelo del embudo de plegamiento, representado por la altura (energía del sistema) y el ancho (entropía). Hay varios mínimos locales con grandes barreras energéticas que hacen poco probable la transición de una proteína parcialmente desplegada al estado nativo. Figura modificada de (Onuchic et al., 1997).

Levinthal planteó que si todos los estados intermedios que existen durante la formación de la estructura nativa tienen la misma probabilidad de formarse, entonces la superficie de potencial del plegamiento sería plana con un mínimo en el centro correspondiente al estado nativo. Por el contrario, si se asume que cada uno de ellos tiene distinta energía debido al estado de frustración que tiene cada intermediario, entonces la superficie de potencial del plegamiento sería rugosa. A este modelo se le conoce como el embudo donde se tiende al mínimo global de energía correspondiente al estado nativo y la rugosidad es debida a las diferentes conformaciones inestables que se

pueden formar durante el plegamiento. Este modelo explica el hecho de que algunas proteínas no se pliegan de forma correcta y terminan atrapadas en un estado parcialmente plegado lejos del estado nativo (Figura 1) (Levinthal, 1968).

En este modelo, en la zona superior del embudo coexisten diferentes estados desplegados de forma aleatoria debido a la cantidad de grados de libertad. Cuando estos descienden disminuyen los grados de libertad y se forman interacciones intramoleculares hasta llegar al estado nativo (mínimo energético) (Onuchic et al., 1997).

El plegamiento es importante para llevar a cabo funciones como el transporte, recepción y transmisión de señales, regulación de los niveles génicos y de RNA, adhesión celular, cambios en el citoesqueleto, reacciones metabólicas que involucran varias enzimas, entre otras funciones más (Zerovnik, 2002). Una adecuada conformación proteica es necesaria para un exitoso funcionamiento celular y aún más importante en el mantenimiento de nuestra salud (Dobson, 2015) (Kusum et al., 2019). Dicho proceso se logra la mayoría de las veces de forma eficaz, pero existen ocasiones en las que la proteína no adquiere su estructura funcional. En esos casos, las células tienen sistemas de control que permiten hacerle frente a tal situación.

1.3 Condiciones que inducen desplegamiento

Para el análisis de los mecanismos de desplegamiento global o a nivel residual, se necesita estudiar el proceso de transición desde el estado plegado al desplegado o viceversa. Dicho proceso puede inducirse mediante la variación de algunos factores como la temperatura, agentes desnaturizantes y variaciones en el pH.

Los agentes desnaturizantes pueden ser diversos, pero entre los más comunes se encuentra la urea y el cloruro de guanidinio debido a su capacidad de formar enlaces de hidrógeno y competir con el agua en la capa de solvatación. Compiten también con los enlaces de hidrógeno intramoleculares, lo que provoca la pérdida del empaquetamiento y de la estructura (De Simone et al., 2005) (Kupfer et al., 2009).

Las variaciones en el pH pueden provocar cambios en el patrón de enlaces de hidrógeno o en las interacciones iónicas, lo que conlleva a que cambie la estructura de la proteína. Esto es debido a la presencia de residuos ácidos y básicos y de grupos protonables/desprotonables que pueden formar interacciones claves en la estructura nativa. Así mismo, el pH puede desestabilizar a la proteína debido a la gran carga neta

que se acumula en ella cuando se encuentra lejos de su punto isoeléctrico (Yang & Honig, 1993). La carga de una proteína puede variar debido a que sus residuos pueden ser ionizables y están influenciados por variaciones en el medio, en especial, por el pH (Lošdorfer Božič & Podgornik, 2017).

Por tanto, los mecanismos de plegamiento y desplegamiento son muy sensibles al entorno y cualquier modificación química o mutaciones en algún residuo puede provocar alteraciones en el delicado balance que da una energía de plegamiento de una decena de kcal/mol. Dichas modificaciones pueden estabilizar el estado desnaturalizado de forma tal que se forme una barrera energética que desplace el equilibrio entre la forma nativa y la desnaturalizada (Malhotra & Udgaonkar, 2016) (Malhotra & Udgaonkar, 2015) (Wilson & Beckmann, 2011).

1.4 Vías de defensa y regulación de la célula para el desplegamiento proteico

Las defensas que tienen las células contra proteínas desplegadas y con un plegamiento incorrecto consisten en varios sistemas de protección como chaperonas, enzimas antioxidantes y componentes de ubiquitina-proteasoma. Estos previenen la agregación, repliegan la proteína mal plegada o la eliminan si no pueden evitarlo. Si la proporción del daño a las proteínas aumenta, cuando se exponen a altas temperaturas, radicales libres u alguna otra condición de estrés, o cuando ocurren mutaciones, estos pueden interrumpir la función celular normal y provocar apoptosis (Sherman & Goldberg, 2001). Un grupo de chaperonas que son inducidas como parte de la respuesta celular son las proteínas de choque térmico (Hsp), las cuales se unen a las proteínas parcialmente plegadas o desnaturalizadas (Badcoe et al., 1991). Entre ellas la Hsp70, Hsp104 y la Hsp40, pueden actuar en el desensamblaje intracelular de los agregados proteicos (Glover & Lindquist, 1998). Por otro lado, la degradación de las proteínas mediada por la ubiquitina-proteasoma, tiene una relevancia en el control de la calidad celular. Estos eliminan proteínas mutadas, desplegadas y con daños postraduccionales. Si la célula todavía presenta agregados de proteínas, se activan los programas de apoptosis (Alves-Rodrigues et al., 1998).

A pesar de ello, estos mecanismos pueden fallar y algunas proteínas pueden llegar a formar agregados. Se han encontrado un conjunto de enfermedades en las cuales proteínas mal plegadas y cambios conformacionales han estado relacionadas con la

aparición y progresión de dichas enfermedades. Entre ellas podemos encontrar: Alzheimer, Parkinson, Huntington, diabetes tipo II, la encefalitis espongiiforme, y la amiloidosis de cadena ligera, entre otras (Zerovnik, 2002).

1.5 Amiloidosis

El proceso que conlleva a una proteína soluble a formar fibras amiloides está estrechamente relacionado con más de 40 enfermedades (Chiti & Dobson, 2006) (Chiti & Dobson, 2009). Las fibras forman un material proteico insoluble que puede provocar un daño progresivo en los distintos órganos y tejidos en los cuales se acumula (Wechalekar et al., 2016).

Su detección data de 1639 tras el estudio de la autopsia de un paciente joven realizada por Fonteyn y en 1842, Rokitansky realizó la primera descripción morfológica en diversos órganos. El término amiloide (del griego amylo, almidón), fue acuñado en 1854 por Rudolf Virchow al observar que estos precipitados extracelulares se tornaban marrón luego de la incubación con yodo como ocurre con el almidón (Kyle, 2001) (Hazenberg, 2013).

1.6 Causas de amiloidosis

Las causas que conducen a que las proteínas solubles sean precursoras amiloidogénicas no son muy claras pero algunos mecanismos descritos son (Chiti & Dobson, 2006) (Álvarez-Ruiz et al., 2005) (Knowles et al., 2014):

- La tendencia natural de la proteína a presentar una conformación patogénica, la cual es más significativa con la edad.
- La elevada concentración de la proteína durante largo tiempo.
- La modificación de la estructura proteica debido a mutaciones.

La estructura de dichos depósitos amiloides consiste en una componente fibrilar (Hazenberg, 2013) (Álvarez-Ruiz et al., 2005), que está compuesta por polímeros insolubles provenientes de proteínas solubles. Estas adoptan frecuentemente una estructura de lámina β que se ensamblan en láminas β cruzadas y generan protofibras, fibras y por último fibras maduras. Este proceso de fibrilogénesis no ha sido aún dilucidado completamente para todas las proteínas, pero en general, en el mecanismo de

formación debe de existir alguna perturbación en la proteína que la desplace de su estado nativo hacia un estado que promueva la formación de fibras. Esto podría llevar a distintas especies las cuales se acumulan en la fase lag (fase de retardo). La cinética de crecimiento es una fase exponencial y termina cuando las protofibras se ensamblan en fibras amiloides maduras (Aggeli et al., 2001) (L. Almeida & M. M. Brito, 2020).

Algunas características de estas fibras son: un patrón típico de difracción de rayos X correspondiente a hojas β entrecruzadas con distancias entre cadenas de 4.7 Å y entre hojas de 10 Å, su insolubilidad, alta resistencia a la proteólisis y la capacidad de unión a la tinción con tioflavina (ThT) y Rojo Congo, la cual se observa de color verde al analizarse en el microscopio bajo la luz polarizada (Knowles et al., 2014). Mediante microscopía electrónica se observan como haces de fibrillas rectas y rígidas que varían en ancho de 60 a 130 Å y en longitud de 1000 a 16000 Å (Sipe & Cohen, 2000).

1.7 Amiloidosis de cadena ligera

La amiloidosis de cadena ligera (AL) es una enfermedad mortal que consiste en la proliferación anormal de un clon de células plasmáticas monoclonales. Estas secretan un exceso de cadenas ligeras de inmunoglobulinas al torrente sanguíneo (Dispenzieri et al., 2012). Estas proteínas se vuelven inestables y se depositan como fibras amiloides insolubles en órganos vitales y tejidos. El componente fibrilar de los depósitos amiloides en AL están formados principalmente por cadenas ligeras de las inmunoglobulinas o fragmentos de ellas (L. Almeida & M. M. Brito, 2020). La AL es la forma más común de amiloidosis sistémica (Bustamante & Zaidi, 2021) con una incidencia de aproximadamente de 1 por 100000 personas al año (Kyle et al., 1992).

Los genes funcionales de las cadenas ligeras consisten en 3 segmentos génicos: el variable (V), el de unión (J) y el constante (C). En los humanos hay 73 genes V (40 kappa (κ) y 33 lambda (λ)), 5 genes J κ , 4 genes J λ , un gen C κ y 5 genes C λ . El gen funcional surge de una recombinación de los diferentes genes VJC. El arreglo estructural consiste en hojas β , con una topología de llave griega (Blancas-Mejia et al., 2018). En la AL, se depositan cadenas ligeras lambda o kappa (75% y 25% de los casos respectivamente) producidas por un clon de células plasmáticas medulares, las cuales pueden aparecer en pacientes con mieloma múltiple o algunos linfomas. Puede afectar a los riñones, corazón, sistema nervioso periférico y autónomo, tejidos blandos, hígado y tracto gastrointestinal.

La media de supervivencia es de 6-12 meses luego del diagnóstico (Blancas-Mejia et al., 2018).

Dos factores que pueden influir en el mal plegamiento y la agregación de las cadenas ligeras son las mutaciones somáticas y los segmentos genéticos del dominio variable (VL). Las primeras pueden causar menor estabilidad en las proteínas amiloidogénicas con respecto a las no amiloidogénicas (Baden et al., 2009). Dichas mutaciones, las cuales son parte normal de la maduración de los anticuerpos, promueven la agregación por la disminución de la energía libre de la cadena ligera plegada (Hurle et al., 1994) (Baden et al., 2008). Los segundos se asocian con la formación de fibras amiloides como ocurre en la AL por los segmentos génicos VL lambda y kappa (Abraham et al., 2003) (Perfetti et al., 2002).

En el 70% de los casos de AL aparecen un conjunto de segmentos génicos VL [IGLV6-57(6a), IGLV1-44 (1c), IGLV2-14 (2a2), IGLV3-1 (3r) y IGKV1-33 (018)] (Bodi et al., 2009). De ellos, en pacientes con AL se ha encontrado una sobreexpresión de las proteínas derivadas de la línea germinal lambda 6. En condiciones normales esta se expresa en el 2% de las células plasmáticas policlonales de la médula ósea que expresan la cadena ligera λ . En esta línea germinal, el 25% de los casos de AL presenta una mutación puntual R24G, aunque también suele presentar otras más (del Pozo Yauner et al., 2008) (Hernández-Santoyo et al., 2010) (Maya-Martínez, 2015). La mutación R24G aumenta la probabilidad de formar fibras amiloides y disminuye la estabilidad (Yauner et al., 2006) (del Pozo Yauner et al., 2008) (Mishima et al., 2009). De forma general, en pacientes con AL las mutaciones que reduzcan la estabilidad termodinámica del estado nativo son más propensas a formar fibras amiloides (Ramirez-Alvarado, 2012). Las cadenas ligeras encontradas en pacientes con AL varían entre sí ya que las mismas provienen de inmutoglobulinas, las cuales presentan una amplia diversidad de secuencia debido al proceso de hipermutación somática al que están sometidas como parte de su maduración (Blancas-Mejia et al., 2018). Debido a ello, el estudio de las líneas germinales como punto de partida de la formación de las diversas proteínas de cadenas ligeras que eventualmente producen AL constituye un aspecto de interés.

1.8 6aJL2

Del Pozo y colaboradores diseñaron la proteína 6aJL2 que contiene los segmentos de la línea germinal λ 6a y JL2, los cuales se han visto de manera frecuente presentes en cadenas ligeras de pacientes con AL. Esta tiene 111 aminoácidos y está estructurada por

dos hojas betas formadas por 8 hebras. La hoja 1 presenta las hebras: A, B, D y E; mientras que en la hoja 2 se encuentran las hebras: C, C', F y G. Además, tiene 3 CDR (Regiones Determinantes de Complementariedad), un puente disulfuro formado por las cisteínas 22 y 91, cercano al W36 (del Pozo Yauner et al., 2008) (Figura 2). Estas CDR son responsables de la unión al antígeno y de la especificidad inmunológica. Además, acumulan una gran cantidad de hipermutaciones somáticas lo que le proporciona una elevada diversidad en la reactividad requerida por las inmunoglobulinas y con ello un aumento en la afinidad de unión al antígeno (Blancas-Mejía et al., 2018).

La estabilidad y la agregación están muy relacionadas con la región en la cual se encuentre la mutación de la proteína. Por ejemplo, en las mutaciones: R24G (localizada en el CDR1), P7S y F2X (ubicadas en el N-terminal) (Hernández-Santoyo et al., 2010) (del Pozo-Yauner et al., 2014) se aprecia una disminución de la estabilidad termodinámica y en el tiempo lag para la cinética de formación de fibras. Estudios de RMN han revelado que debido a que 6aJL2 y 6aJL2-R24G tienen una alta similitud estructural (con diferencias fundamentalmente en el asa que conecta las hebras B y C), es difícil explicar estructuralmente la diferencia drástica que existe en la formación de fibras amiloides entre ellas, que lleva a un tiempo lag de 14 h en 6aJL2 a 2 h en 6aJL2-R24G (Maya-Martínez, 2015). Adicionalmente, se observaron cambios de estabilidad de 1.4 kcal/mol (~ 30%) y en la Tm de 49.9°C a 44.2°C, de 6aJL2 a 6aJL2-R24G (Maya-Martínez, 2015)(del Pozo Yauner et al., 2008).

La mutación R24G promueve un incremento en la movilidad en el CDR1 y asas vecinas, mientras en 6aJL2 la estructura y estabilidad del CDR1 es potenciada por el apilamiento planar entre F2 y R24 (del Pozo Yauner et al., 2008). La ausencia de interacción entre R24-F2 resulta en un aumento de la entropía y un cambio en la cadena lateral del rotámero; la pérdida del enlace de H entre R24 y N32 conlleva a una rotación libre de la cadena lateral del N32. La entropía de la cadena lateral de F2 se incrementa por aminoácidos asociados a la pérdida de interacción del CDR1 con la Gly de la mutación. Debido a ello, en 6aJL2-R24G, el CDR1 es menos rígido y se sugiere que esto es importante en el desplegamiento (Valdés-García et al., 2017).

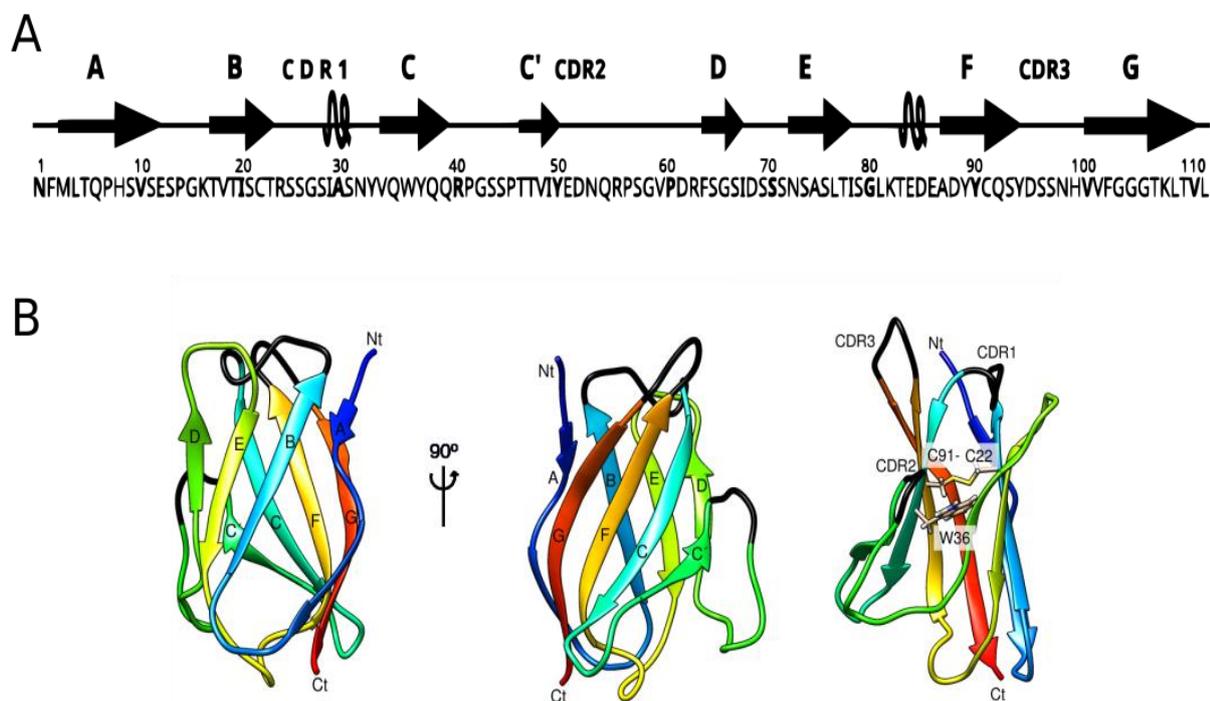


Figura 2: Estructura de la proteína 6aJL2. A: Estructura primaria con la representación de las estructuras secundarias. B: Estructura tridimensional con las dos hojas beta con sus respectivas hebras polipeptídicas [(A, B, D, E) y (C', C, F, G)], las tres Regiones Determinantes de Complementariedad (CDR1, 2 y 3), el único residuo de triptófano (W36) y el puente disulfuro formado por C22 y C91.

La mutación R24G, la cual está presente en un lado del sándwich β , tiene un efecto que pasa por el CDR1 y llega hasta el otro lado de la molécula. Esto provoca que haya un debilitamiento de la red de contactos y el CDR1 se contraiga en forma de acordeón, lo que propicia que cambie su interacción en la molécula. Un ejemplo es como en 6aJL2, la I29 de la horquilla DE que está en contacto con el CDR1 interactúa con I67, D68, S69, N72 y S73 y en la R24G, la A30 es quien tiene la interacción con dichos residuos (Valdés-García et al., 2017).

1.9 Efectos del pH y otras condiciones en la formación de fibras en las cadenas ligeras

El efecto del pH ácido en los precursores de AL tiene importancia fisiológica ya que las cadenas ligeras se introducen en células cardiacas y renales y luego entran en el ambiente ácido del lisosoma hasta que son excretadas como precursores fibrilares (Zhang

et al., 2017). En algunas regiones del riñón, como los túbulos distales, las condiciones de pH son aproximadamente de 6.5, 50 mM fosfato, 0.1-0.4 M NaCl, y 0.4 M urea, y en los túbulos proximales el pH es de 4.5 y 0.25 M NaCl (Souillac et al., 2003).

Las variaciones en las condiciones de solvente tales como la concentración de desnaturalizantes y el pH, en la región variable de las cadenas ligeras $\kappa 4$ de SMA y LEN, inducen cambios conformacionales que aumentan la formación de fibras amiloides (Khurana et al., 2001) (Souillac et al., 2002). En las cadenas ligeras de ambas líneas germinales y en la $\kappa 1$ (O18-O8), un bajo pH provoca la formación de fibras y el pH básico (pH 10) tiende a inhibir el proceso, probablemente por ionización de residuos de tirosinas. En este subgrupo parece ser que el pH tiene un efecto en la formación de fibras que depende de la secuencia (DiCostanzo et al., 2012). En la $\lambda 6a$ se reportaron conformaciones totalmente desplegadas en condiciones ácidas sin sal (Mishima et al., 2009).

6aJL2 *in vitro*, en un rango de pH (2.0-8.0) forma agregados fibrilares ordenados y a pH < 3.0 se ve reducido el tiempo lag y el proceso de fibrilación se acelera (Velázquez-López et al., 2018). Datos espectroscópicos sugieren que la desestabilización provoca un cambio conformacional que afecta la estructura tridimensional y se exponen regiones hidrofóbicas (según resultados de ensayos con ANS). El pH provoca una disminución en la temperatura de máxima estabilidad y en la estabilidad a dicha temperatura (Velázquez-López et al., 2018) y esta puede ser afectada por mutaciones (Rees & Robertson, 2001). También se ha demostrado que las proteínas a bajo pH presentan una estabilidad dependiente de la fuerza iónica (Marin-Argany et al., 2015) (Sule et al., 2011). A través de simulaciones de Dinámica Molecular se ha detectado una exposición del asa que conecta las hebras E y F. Esto puede ser causa de un aumento de cargas positivas en un polo de la proteína debido a la protonación de los aminoácidos en el asa EF y cercanos a él (el asa AB y el C-terminal). Con esto están asociados los cambios conformacionales que desestabilizan a 6aJL2 a bajo pH que promueven además la formación de fibras. Dichos cambios se han evidenciado por diferentes ensayos espectroscópicos (Velázquez-López et al., 2018).

Los espectros de HSQC de RMN en dos dimensiones, en el rango de pH (2.0-7.4) a 25°C resultaron en proteína plegada, mientras que a pH 2.0 y 37°C se reportaron poblaciones de proteína desplegada (Velázquez-López et al., 2018). La diferencia de la posición de la señal entre los espectros en un pH específico indica aquellos residuos cuyo ambiente local fue afectado por su estado protonación o por cambios estructurales en la

proteína. Velázquez y colaboradores en 2018, encontraron que en 6aJL2 a 25°C los mayores cambios fueron obtenidos a pH 2.0 y 3.0 y la mayoría de los aminoácidos afectados fueron aquellos que estaban cercanos a un cambio en el estado de protonación. Entre ellos están: S13 (próximo a E12 y al C-terminal), V34 (adyacente a E51 y D52) y Y89 (cercano al mayor sitio de cambio conformacional el asa EF). El desplazamiento químico del carbono no mostró cambios significativos por lo que se sugiere que el plegamiento no está afectado por el ambiente ácido (Velázquez-López et al., 2018).

Se han descrito diferentes estados de plegamiento para las proteínas que forman fibras amiloides. Por ejemplo, la cadena ligera de una kappa murina a bajo pH se encontró en una estructura alternativa plegada con características remanentes del estado nativo, similares a las reportadas por Velázquez y colaboradores en 2018 (Buchner et al., 1991). También se propuso un modelo para los dominios de las inmunoglobulinas parcialmente desnaturizados que podían formar fibras (Brumshtein et al., 2014). En dicho modelo se reportan dímeros con intercambio de dominios (“domain-swapped”) que intercambian el C-terminal de sus hojas β de la hebra G; a pesar de esto, su estructura cristalográfica es más parecida a un dímero o un tetrámero, lo cual no favorece la formación de fibras, pero sugiere como la desnaturización local puede llevar a la asociación (Brumshtein et al., 2014). Se ha sugerido que en las cadenas kappa tiende a ser más importante un equilibrio entre el dímero y el monómero que para las lambdas, ya que mutaciones que previenen la formación del dímero y favorecen el estado monomérico de las kappa aumentan el intercambio entre los dominios. Análisis de RMN a pH 2.0 y 6.5 para la proteína LEN, una cadena ligera kappa 4, han mostrado que a pesar de que a bajo pH predomina el dímero, la formación de fibras se favorece gracias a la flexibilidad en su interfaz (Mukherjee et al., 2011).

A pesar de todas estas evidencias experimentales, hay algunos aspectos que quedan en interrogantes, como el hecho de que los espectros de RMN de 6aJL2 a 25°C son distintos que a 37°C, con lo cual profundizar en los detalles estructurales que le ocurren a la proteína a esta temperatura sería interesante. Además, el proceso de desplegamiento y formación de fibras son procesos fuera del equilibrio, a lo largo del tiempo, y la mayoría de los ensayos hasta el momento han sido realizados asumiendo procesos en equilibrio. El estudio del proceso en el tiempo nos puede dar información de los estados por los que transita la proteína, y así comprender mejor los pasos en la formación de fibras amiloides.

1.10 Métodos para el estudio

Para el estudio del mecanismo de desplegamiento y agregación de una proteína, así como también la existencia o no de intermediarios de plegamiento se han utilizado diferentes técnicas (Tabla 1) (Dobson, 2004).

Tabla 1: Métodos empleados para el estudio de desplegamiento y agregación proteica. Modificado de Dobson, 2004.

Propiedad	Técnica	Medición	Referencia
Empaquetamiento de la cadena principal	Fluorescencia intrínseca	El ambiente del triptófano	(Ghisaidoobe & Chung, 2014)
	Absorbancia UV	El ambiente de residuos aromáticos	(Biter et al., 2019)
	Fluorescencia extrínseca (ANS)	La exposición de parches hidrofóbicos	(Engelhard & Evans, 1996)
	Apagamiento de la fluorescencia	El aislamiento de los triptófanos de apagadores hidrofílicos	(Eftink, 2002)
Dimensión molecular	Anisotropía de la fluorescencia	La movilidad del triptófano/ Las dimensiones moleculares	(Ghisaidoobe & Chung, 2014)
	Transferencia de energía de fluorescencia	La distancia escalar entre el triptófano y un fluoróforo unido covalentemente (o entre dos fluoróforos unidos)	(Ghisaidoobe & Chung, 2014)
	Dispersión dinámica de la luz (DLS)	El radio hidrodinámico	(Yu et al., 2013)
	Dispersión de rayos x de ángulo pequeño (SAXS)	El volumen / forma de la envoltente	(Vasudeva et al., 2021)
	Medidas de difusión de RMN	El radio hidrodinámico	(Danielsson et al., 2002)
Estructura secundaria y enlaces de hidrógeno	Dicroísmo circular en UV lejano	La conformación del esqueleto carbonado debido al enlace peptídico	(Rogers et al., 2019)
	Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier	La conformación del esqueleto carbonado/ Las propiedades del enlace de hidrógeno	(Reppert & Tokmakoff, 2016) (Y. S. Kim & Hochstrasser, 2009)

	Espectrometría de masas	La formación y el cooperativismo de enlaces de hidrógeno en los intermediarios	(Englander et al., 2016)
Estructura nativa y contactos terciarios	Actividad biológica	La formación de la estructura nativa en el sitio activo	(Feltrup et al., 2018)
	Dicroísmo circular en UV cercano	La formación de enlaces disulfuros y residuos aromáticos en la estructura terciaria	(Rogers et al., 2019)
	RMN	Conformaciones e interacciones	(Rajeshwar T & Krishnan, 2017)
	Calorimetría de titulación isotérmica (ITC)	El calor de la formación de distintas conformaciones	(Kidokoro & Nakamura, 2016)
Estructura del agregado	Fluorescencia con Rojo Congo o Tioflavina T (THT)	La estructura amiloide bien definida/ La existencia de hoja beta regular	(Knowles et al., 2014)
	Difracción de rayos X de la fibra	Los espaciamentos de elementos regulares de estructura como por ejemplo hojas betas	(Sipe & Cohen, 2000)
	Microscopía electrónica/ Microscopía de fuerza atómica	Las dimensiones y la morfología de agregados	(Bode et al., 2019)
	RMN en estado sólido	La conformación molecular y el empaquetamiento intermolecular	(Loquet et al., 2018)

Por su utilidad, a continuación, se abordarán algunas de ellas:

La Dispersión Dinámica de la Luz (DLS, por sus siglas en inglés) es una técnica conveniente para determinar el coeficiente de difusión de las moléculas y entre ellas las proteínas. DLS analiza las fluctuaciones temporales de la intensidad de dispersión de la luz causadas por los movimientos hidrodinámicos en solución (Yu et al., 2013). A partir de experimentos de DLS se pueden obtener radios hidrodinámicos de macromoléculas en solución. Las medidas de DLS permiten monitorear la disociación de una proteína oligomérica y desplegada de monómeros simultáneamente con el uso de agentes caotrópicos. Algunas ventajas que presenta la DLS sobre otras técnicas hidrodinámicas es que es rápida, no invasiva y los estudios pueden hacerse bajo una amplia variedad de condiciones de solvente (Yu et al., 2013).

La Espectroscopía de Fluorescencia es una técnica con la que se pueden determinar cambios en la intensidad de fluorescencia debido a perturbaciones en el entorno del fluoróforo. En las proteínas los residuos aromáticos (Trp, Tyr y Phe) son fluoróforos intrínsecos, los cuales absorben luz en la región del UV cercano a una longitud de onda de 280, 274 y 257 nm y emiten a 348, 303 y 282 nm, respectivamente. De ellos, el Trp es el que posee mayor rendimiento cuántico (0.2, mientras que para Tyr y Phe es 0.14 y 0.04 respectivamente) (Ghisaidoobe & Chung, 2014). A pesar de que el rendimiento cuántico de la Tyr y el Trp, son bastantes cercanos, en proteínas nativas la Tyr es apagada por la interacción con la cadena peptídica o por la transferencia de energía hacia el Trp (Lakowicz, 2006). En el caso de la proteína 6aJL2, el número de estos residuos es: 1, 6 y 3, para Trp, Tyr y Phe en cada caso (Figura 3). Para este sistema se ha reportado que los cambios en la estructura de la proteína reflejan cambios de intensidad de fluorescencia del Trp (Mishima et al., 2009) (Velázquez-López et al., 2018).

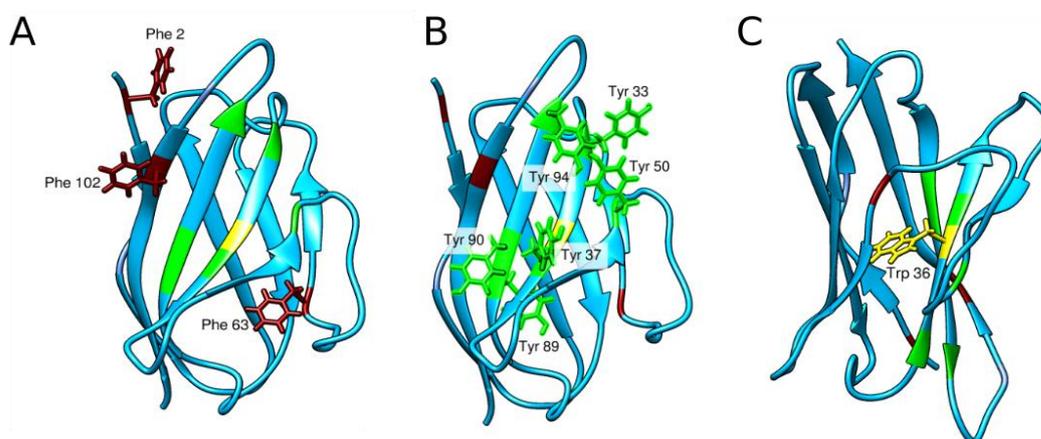


Figura 3: Localización de los residuos aromáticos en la proteína 6aJL2. A: tres fenilalaninas en rojo (Phe 2, 63 y 102). B: seis tirosinas en verde (Tyr 33, 37, 50, 89, 90 y 94). C: un triptófano en amarillo (Trp 36).

Los cambios en la intensidad de fluorescencia pueden deberse a alguna de las siguientes causas: la exposición al solvente (que atenúa la fluorescencia debido a los choques de las partículas con el fluoróforo) o al distanciamiento de un atenuante. En el primero disminuye la fluorescencia mientras que en el segundo hay un aumento (Serrano et al., 2012). Frecuentemente los residuos de Trp se encuentran en el núcleo hidrofóbico

en las proteínas, alejados de las moléculas de agua. Cuando las mismas se despliegan, la cadena lateral del Trp se encuentra en contacto con el agua, donde parte de la energía absorbida por este residuo es transferida a las moléculas de agua y como resultado el espectro se corre hacia el rojo, a mayores longitudes de onda (340-350 nm) (Córsico et al., 2013). El efecto contrario se observa durante el plegamiento de la proteína.

La Resonancia Magnética Nuclear (RMN) permite estudiar las variaciones en el entorno de cada residuo en función de las diferentes condiciones experimentales, mediante el seguimiento de las señales de los núcleos como ^1H , ^{13}C , y ^{15}N . Se puede analizar el proceso de desplegamiento proteico a nivel residual y los espectros que se pueden adquirir para ello, pueden ser monodimensionales, bi-, tri- o tetradimensionales. El proceso de desplegamiento/plegamiento de la proteína puede ser evaluado por indicadores como el desplazamiento químico y la velocidad de intercambio H/D (Krishna Mohan & Hosur, 2009). La RMN permite, además, calcular parámetros termodinámicos globales y locales, obtener indicadores estructurales de los estados nativos y desnaturalizados y, en el caso de ser estables, calcular la estructura de los estados parcialmente plegados. Esta técnica puede emplearse sola o en complementación con otras técnicas las cuales darán un indicio del proceso de desplegamiento proteico (Carlos Amero Tello, 2014).

La Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC, por sus siglas en inglés) es una técnica que permite una caracterización termodinámica de interacciones no covalentes en equilibrio. Además, se ha empleado para estudios termodinámicos y cinéticos del plegamiento/desplegamiento de proteínas y mal plegamiento proteico (Liang et al., 2001) (Liang, 2006). Con la misma se pueden determinar la constante de unión, estequiometría y perfil termodinámico de la reacción, lo cual incluye la entalpía calorimétrica, la entropía, la capacidad calorífica de unión y la diferencia de energía libre (Mj & Je, 2003). La calorimetría de titulación ácida isotérmica (IATC, por sus siglas en inglés) es un método para la evaluación de la entalpía de la proteína en dependencia del pH (Nakamura & Kidokoro, 2005) (Kidokoro & Nakamura, 2016). Esta ha sido utilizada para evaluar el cambio entálpico que acompaña la transición reversible inducida por ácido del estado nativo al glóbulo fundido del citocromo C bovino (Nakamura & Kidokoro, 2005). También se ha reportado para el estudio termodinámico de la formación de fibras amiloides (Liang, 2006).

2. Justificación:

La formación de fibras amiloides es un proceso que tiene lugar en varias enfermedades, entre ellas en la amiloidosis de cadenas ligeras (AL). La misma ocurre por un cambio conformacional en las cadenas ligeras que conllevan a su agregación insoluble en órganos y tejidos y finalmente al fallo de estos, lo cual propicia la muerte del individuo. 6aJL2, es una de las líneas germinales más frecuentes en la AL, y por ende es un buen modelo de estudio. Un análisis del desplegamiento de 6aJL2 en condiciones ácidas y a 37°C permitirá un acercamiento a cómo ocurre este proceso en el organismo. Además, conocer si existen diferencias en el estado de plegamiento de la proteína a 25°C con respecto a 37°C, pudiera ayudar a caracterizar los cambios conformacionales que ocurren al aumentar la temperatura. A su vez, emplear metodologías a lo largo del tiempo (cinéticas) y lograr una comparación con lo que sucede a pH 7.4, permitirá profundizar en aspectos claves que intentarán explicar como ocurre el desplegamiento en las condiciones de interés.

3. Hipótesis:

La proteína 6aJL2 a pH 2.0 y 37°C se va desplegando con el tiempo, formando estructuras con distintos estados de oligoméricos con tendencia a la agregación.

4. Objetivos:

4.1 Objetivo general:

Caracterizar el proceso de desplegamiento de 6aJL2 a pH 2.0 y 37°C

4.2 Objetivos específicos:

1. Evaluar el efecto del pH 2.0 y 37°C en el desplegamiento por fluorescencia.
2. Determinar el tamaño de la proteína a pH 2.0 y 37°C por DLS durante el proceso de desplegamiento.
3. Analizar el proceso de desplegamiento de la proteína a pH 2.0 y 37°C por RMN.
4. Analizar las diferencias en el proceso de desplegamiento de la proteína a pH 2.0 y pH 7.4 así como a 25°C y 37°C.

5. Materiales y Métodos

5.1 Expresión y Purificación

La proteína 6aJL2 se expresó en células de *E. coli* BL21(DE3) con el plásmido pET27b+-6aJL2. Dichas células se cultivaron en 500 mL de medio 2xYT suplementado con kanamicina (60 µg/mL) a 37°C y 200 rpm. Cuando las células alcanzaron una DO₆₀₀ de 0.7 se indujo la expresión con IPTG 0.8 mM, durante 12h, 150 rpm a 25°C.

Para la purificación, las células se centrifugaron a 4000 rpm por 30 minutos a 4°C. Se lisaron por shock osmótico con 40 mL de sacarosa al 20% y se incubaron 20 minutos a 4°C. Luego se centrifugaron a 4000 rpm, a 4°C por 30 minutos. Al terminar la pastilla se resuspendió en 30 mL de agua estéril fría y se incubó durante 20 minutos a 4°C. Se volvió a centrifugar a 10000 rpm, a 4°C durante 40 minutos. El sobrenadante colectado se filtró con una membrana de tamaño de poro de 0.22 µm. La muestra (5 mL) se inyectó en una columna (Superdex 200), previamente equilibrada con 2 volúmenes de amortiguador fosfato de sodio 50 mM, NaCl 75 mM, pH 7.4. Se utilizaron 150 mL para la elución de las proteínas con el empleo de un flujo de 1 mL/min. La proteína durante la cromatografía fue monitoreada con la determinación de la absorción a 280 nm.

Las fracciones colectadas en la purificación se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 14% con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), a 160 mV. Las muestras se mezclaron con tampón de ruptura 3x (Tris 1M, pH 8, SDS, betamercaptoetanol, glicerol, azul de bromofenol) y se calentaron durante 10 min, a 100°C. La electroforesis se utilizó como criterio de pureza.

5.2 Determinación de la concentración de proteína

Se determinó la concentración de proteína mediante la absorbancia a $\lambda = 280$ nm en un espectrofotómetro Agilent con una cubeta de cuarzo con un paso óptico de 1 cm de longitud. El coeficiente de extinción molar teórico calculado (a partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína, con el servidor de ExPASy protparam: <http://web.expasy.org/protparam/>) fue de 14565 cm⁻¹M⁻¹.

5.3 Ensayo de desplegamiento de 6aJL2 mediante espectroscopía de fluorescencia

La concentración de la proteína utilizada fue de 200 μM (fosfato de sodio 50 mM, NaCl 75 mM, pH 7.4 y pH 2.0). Se colocaron 2 mL de proteína filtrada en una cubeta de fluorescencia. Se colectaron los espectros de fluorescencia a 37°C durante 24 horas cada minuto. Para la fluorescencia intrínseca se utilizó una longitud de onda de excitación de 295 nm y se recogieron espectros en un rango de longitud de onda de 300-500 nm. Se midió la fluorescencia del ácido 8-anilinaftaleno-1-sulfónico (ANS) (2 mM) como medida de unión a las regiones hidrofóbicas de la proteína. Se incubó por 30 min en la oscuridad y luego se excitó a 380 nm y se recolectó a 480 nm. Los experimentos se realizaron en un espectrofluorómetro Cary-Eclipse (Agilent). Las curvas fueron graficadas por el LabPlot (*LabPlot – Scientific Plotting and Data Analysis*, s. f.).

5.4 Ensayo de desplegamiento de 6aJL2 mediante DLS

Para este ensayo se utilizaron 2 mL de proteína filtrada, a una concentración de 200 μM (fosfato de sodio 50 mM, NaCl 75 mM, pH 7.4 y pH 2.0). Se colectaron las curvas de DLS a 37 °C durante 24 horas a cada pH y de la proteína incubada con ANS a tiempo 0 y 24 h, de las cuales se siguió el cambio en el coeficiente de correlación. Cada minuto se tomaron tres lecturas (promedio de 11 lecturas que duran 10 segundos). Los experimentos se realizaron en un equipo Malvern Zetasizer Nano ZSP con un ángulo de dispersión de 173°. El estudio del estado oligomérico se realizó mediante la determinación del radio hidrodinámico (Rh). A partir de las curvas de pérdida de intensidad de la señal en el tiempo se obtuvieron los coeficientes de difusión traslacionales (Stetefeld et al., 2016) y con ello los Rh a través de la ecuación de Einstein-Stokes. Se utilizó una viscosidad de 0.8872 cP y una temperatura de 37°C. Cada muestra se analizó por triplicado, tomando en cada una 5 corridas de 11 mediciones de 10 s. Los datos se analizaron mediante los métodos cumulant y de distribución implementado en el software SEDFIT (Sawicki, 2012). El método cumulant supone una población de partículas única. El primer "acumulativo" corresponde a un coeficiente de difusión promedio, mientras que el segundo corresponde a la varianza. El método de distribución genera una distribución de moléculas con diferentes propiedades hidrodinámicas que pueden describirse mediante parámetros individuales.

5.5 Análisis de espectros de RMN en tiempo real

Para conocer el efecto del pH 2.0 y la temperatura de 37°C sobre 6aJL2 en el tiempo, se analizaron espectros previamente adquiridos en el laboratorio por el Dr. Maya y el Dr. Amero. Los mismos consistían en experimentos de dos dimensiones tipo HSQC (tiempo de colección de cada espectro fue de 7.58 minutos), obtenidos de manera secuencial durante 25 horas con proteína a 1 mM. Todos los espectros fueron procesados con el *software* NMRPipe (Delaglio et al., 1995) y analizados con CARI (Keller, 2004). Finalmente, las constantes de decaimiento de cada uno de los residuos fueron graficadas. Dichos espectros fueron obtenidos en un espectrómetro Varian de 700 MHz del Laboratorio Nacional de Estructura de Macromoléculas (LANEM- UAEM).

6. Resultados y Discusión

6.1 Expresión y purificación de la proteína 6aJL2

La expresión se llevó a cabo según el acápite 5.1 de Materiales y Métodos. En la transformación se obtuvieron 55 y 125 colonias a partir de 20 y 180 μ L de células (Figura 4).

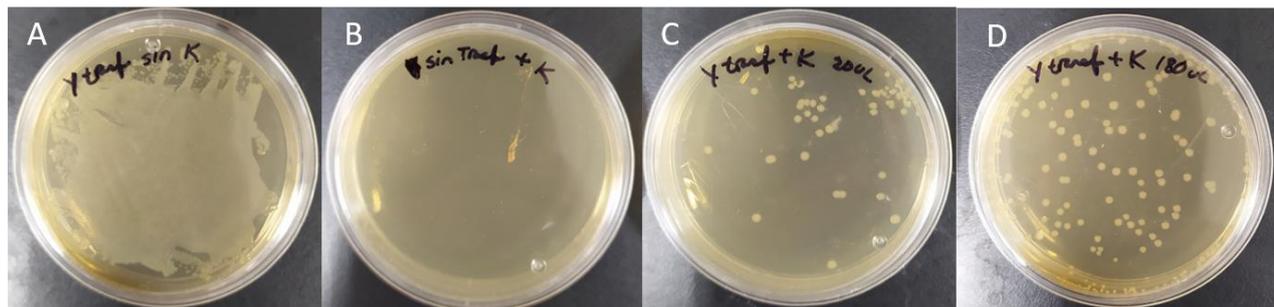


Figura 4: Transformación del plásmido pET27b+-6aJL, realizada en células BL21(DE3) con kanamicina 60 μ g/mL. A: Control +, B: Control -, C y D: células transformadas con 55 y 125 colonias respectivamente.

Luego se expresó y purificó la proteína (Figura 5). En el gel de electroforesis se observa una banda de aproximadamente 12 kDa, correspondiente con el peso molecular de la proteína de 11952 Da. Se observa una banda mayoritaria en las fracciones 19, 20, 21 y 22 (Figura 5A), con absorbancias a 280 nm de 2.79, 3.00, 3.42 y 1.00 respectivamente (Figura 5B). Debido a que hay presencia de otras bandas contaminantes en las fracciones 19-21, se utilizó la fracción 22 para realizar los experimentos ya que es donde existe una mayor pureza.

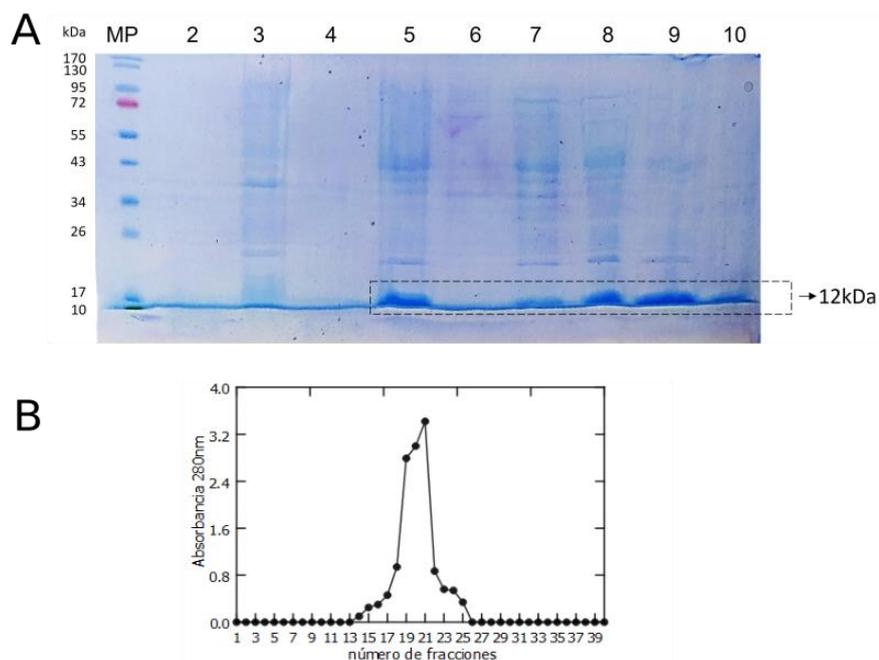


Figura 5: Purificación de 6aJL2. A: Electroforesis SDS-PAGE al 14% acrilamida. 1: Marcador de peso molecular (MP), 2: Sobrenadante antes de inducir, 3: pellet antes de inducir, 4: sobrenadante después de inducir, 5: proteína inyectada a la cromatografía, 6-10: fracciones (F18-F22). B: Cromatograma de exclusión molecular correspondiente.

6.2 Diferencias entre los ensayos de desplegamiento de 6aJL2 mediante espectroscopía de fluorescencia y DLS

Se adquirieron espectros de fluorescencia a pH 7.4 y 2.0 (Figura 6) para conocer que efecto tiene el pH 2.0 y una temperatura de 37°C en el proceso de desplegamiento de 6aJL2. Para ello se siguió el cambio en la intensidad de fluorescencia intrínseca de la proteína como medida de un cambio en su estructura tridimensional en el tiempo. Normalmente, en el estado nativo esta intensidad de fluorescencia es apagada debido a la cercanía del W36 con el puente disulfuro. Además para tener mayor conocimiento de qué sucede en la estructura de la proteína se midió la intensidad de fluorescencia del ANS como medida de la exposición de regiones hidrofóbicas.

En todas la réplicas realizadas, el valor máximo de intensidad de fluorescencia en ambos pH es a 350 nm, pero se puede observar que este valor en la mayoría de las réplicas (excepto para la réplica 1 (Figura 6A) en donde ambos máximos parecieran similares) tiene una relación contraria a lo descrito en la literatura para los dos pH, donde

se había descrito mayor intensidad de fluorescencia para pH 2.0 (Velázquez-López et al., 2018).

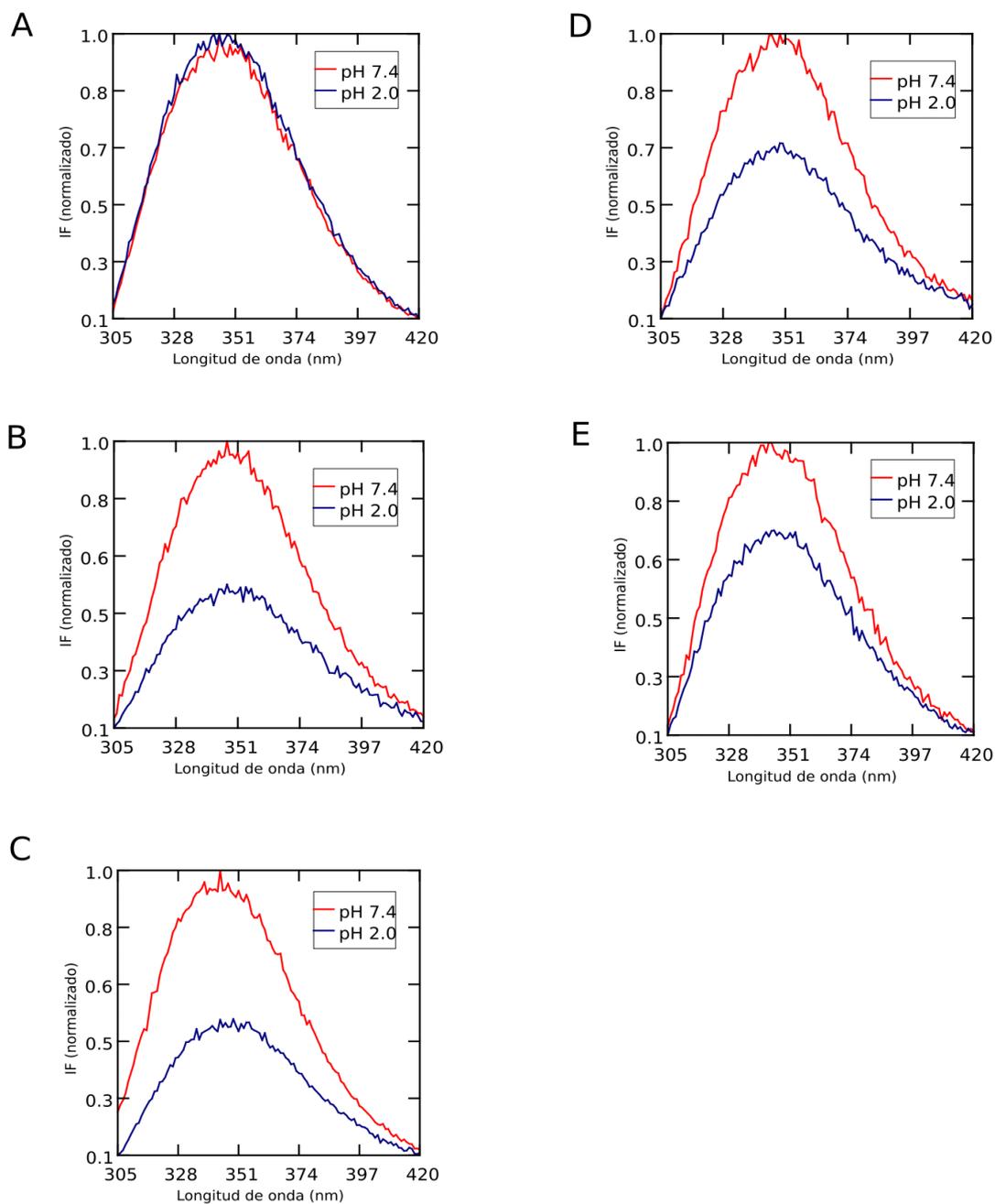


Figura 6: Espectros de fluorescencia a 25°C iniciales. A pH 7.4 y 2.0 en rojo y azul respectivamente de cinco réplicas (A-E).

Interesantemente, al analizar el comportamiento del ambiente químico del Trp en el tiempo se aprecia que no siguió el mismo patrón en las distintas ocasiones (Figura 7).

Este hecho se pudiese atribuir a que no siempre se iniciaron los ensayos con la proteína en el mismo estado conformacional a pesar de que el espectro de fluorescencia inicial pareciera semejante.

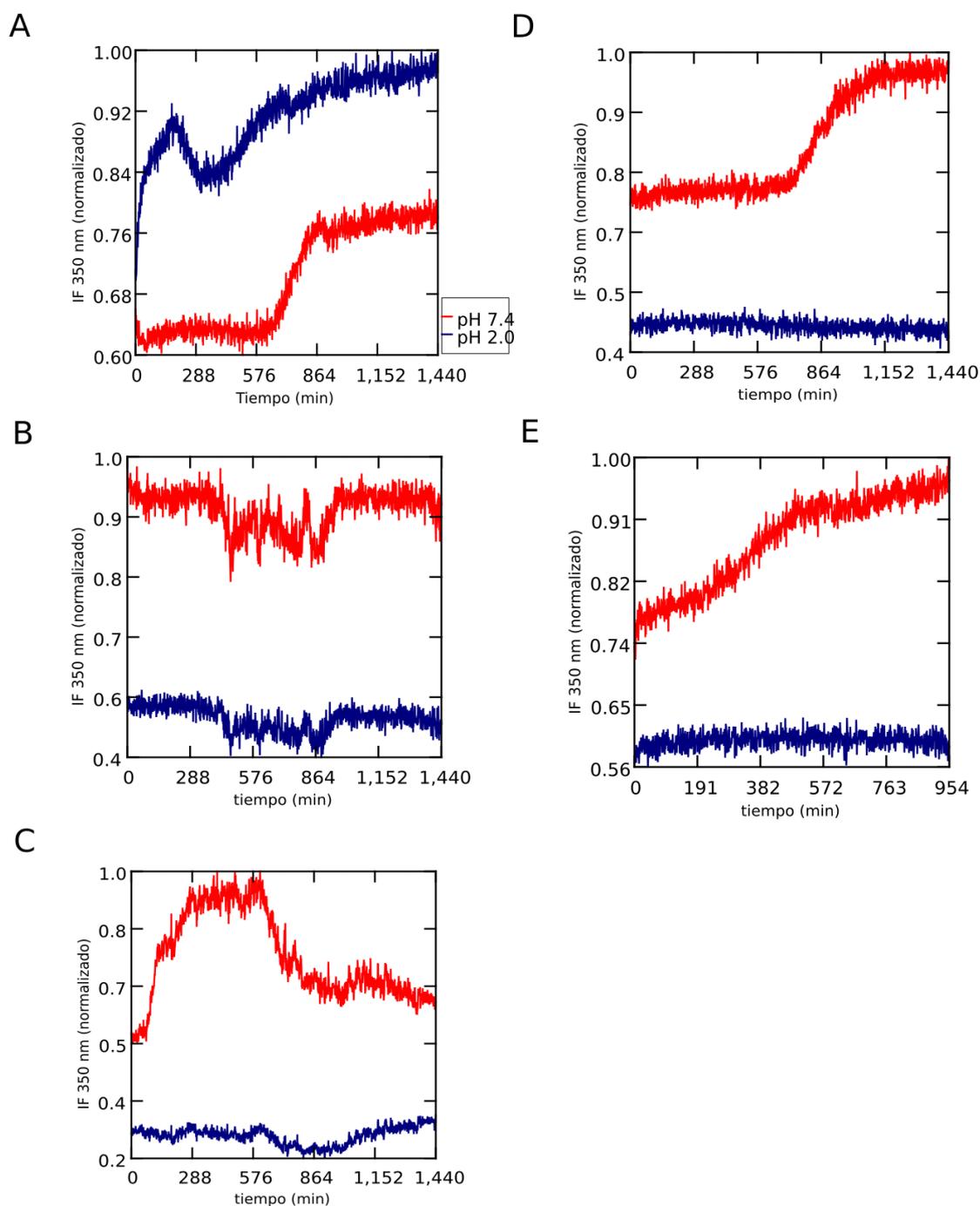


Figura 7: Cinéticas de desplegamiento seguida por fluorescencia. A la temperatura de 37°C y los pH 7.4 y 2.0 en color rojo y azul respectivamente de cinco réplicas (A-E).

A pesar de que se intentó comenzar con proteína monomérica mayoritariamente, estos valores variaron entre experimentos (Tabla 2), lo que pudo propiciar que la proteína

se encontrara en distintas etapas del proceso de desplegamiento. Otra posible razón puede ser que en cada réplica la proteína se encuentre en un estado conformacional distinto que conlleve a que el ambiente químico del Trp sea diferente. Velázquez-López y colaboradores evidenciaron que a pH 7.4 se favorecía la movilidad del asa C'-C'' (Velázquez-López et al., 2018) lo que puede explicar que debido a tal movimiento existan las diferencias en el entorno del Trp. Se debe resaltar que los valores que se alcanzan de intensidad de fluorescencia en 350 nm a pH 2.0 y 7.4 solo difieren entre ellos en aproximadamente dos unidades. De forma similar se evidencia en los resultados de Velázquez-López y colaboradores donde se aprecia ligera diferencia entre estos pH al compararlo con los valores con urea 6 M (Velázquez-López et al., 2018).

En todos los casos la tendencia de la intensidad de fluorescencia del Trp a pH 2.0 fue mantenerse constante en el tiempo (Figura 7), excepto para la réplica 1 (Figura 7A), donde inicialmente aumenta hasta los 180 min, luego disminuye hasta los 313 min para después aumentar de forma casi constante durante el resto del ensayo. Además, en este caso la intensidad a lo largo del tiempo fue mayor a pH 2.0 que a 7.4. De igual forma en casi todas las repeticiones para pH 7.4 la tendencia fue de comenzar constante y luego aumentar hasta una zona de meseta. Con excepción de la réplica 2 (Figura 7B), donde siempre se mantiene constante (con un patrón similar a ambos pH, lo que se sospecha de problemas técnicos del fluorómetro) y para la 3 (Figura 7C), donde decae después de la meseta. Con esto se pudiera sugerir que a pH 2.0, generalmente la proteína se encuentra en una conformación que se mantiene en el tiempo donde el Trp no cambia su ambiente químico como se apreció en las cinéticas (constantes). Por otro lado, a pH 7.4 la proteína transita por un proceso donde cambia dicho ambiente como evidenciaron las variaciones durante la cinética.

A su vez, las mediciones obtenidas a pH 2.0 de la intensidad de fluorescencia del ANS mostraron ser mayores que a pH 7.4, lo que coincide con todas las réplicas y con lo reportado en la literatura (Figura 8). La proteína a pH 7.4, no tuvo fluorescencia del ANS (excepto en la réplica 1 (Figura 8A)), lo que pudiese sugerir que no se exponen regiones hidrofóbicas en la proteína a ese pH.

La réplica 1 en cada medición pareciera ser una excepción. Para los dos pH, la proteína presenta similares valores de intensidad de fluorescencia tanto del Trp como del ANS y además patrones casi semejantes en el tiempo. Se desconoce la posible causa de

este comportamiento, aunque pudiese ser que la proteína está parcialmente desnaturizada.

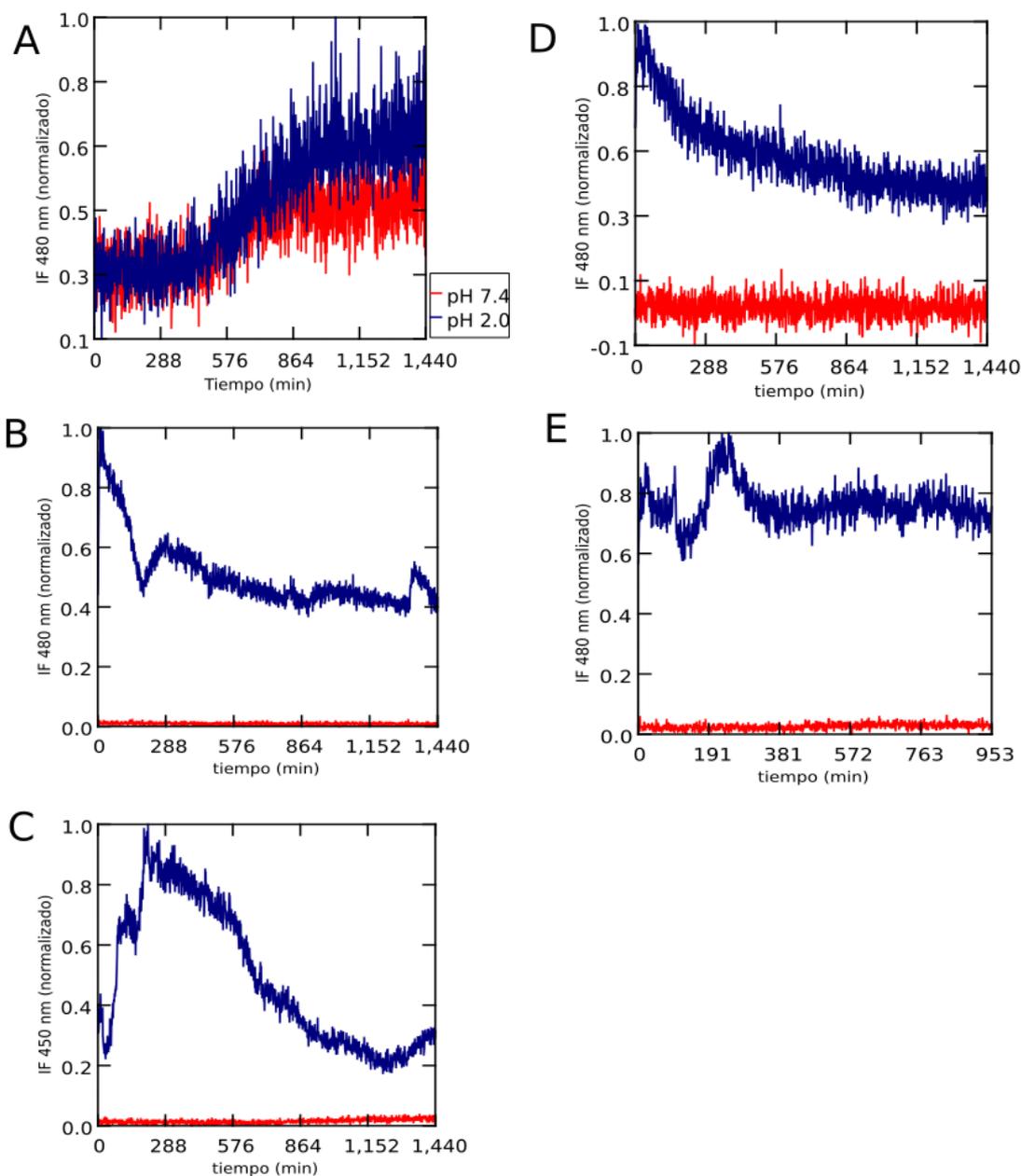


Figura 8: Cinéticas de la exposición de regiones hidrofóbicas. A la temperatura de 37°C y los pH 7.4 y 2.0 en color rojo y azul respectivamente de cinco réplicas (A-E).

Según estos resultados y a las condiciones empleadas (200 μ M de concentración y 37°C) en la proteína a pH 2.0 el ambiente del Trp no cambia, pero sí se exponen regiones hidrofóbicas. Esto puede indicar que la proteína puede experimentar un desplegamiento parcial de su estructura en donde no están involucrados los residuos cercanos al Trp pero sí la formación de parches hidrofóbicos. Una posible región que se despliega es el asa EF,

la cual fue reportada por Velázquez-López y colaboradores a este pH (Velázquez-López et al., 2018). Así mismo enfatizan su unión con el ANS mediante interacciones electrostáticas e hidrofóbicas. A pH 7.4, se puede considerar también un desplegamiento parcial en donde el ambiente del Trp sí cambia, pero no se exponen regiones hidrofóbicas capaces de interactuar con el ANS. Tal como describieron este grupo de investigadores, una posible causa de este fenómeno sea la movilidad del asa C'-C'' que favorece un ambiente químico distinto en el Trp y además reduce la unión con el ANS debido a que se encuentra esa región negativamente cargada (Velázquez-López et al., 2018).

Debido a tales diferencias entre las réplicas es importante caracterizar el estado oligomérico inicial de la proteína. Para ello se analizaron mediciones de DLS de las réplicas 1 y 2 procedentes del ensayo de fluorescencia debido a que presentaron espectros de fluorescencia del Trp distintos entre sí (la 1 tiene un espectro inicial diferente y la 2 uno semejante al resto). Esto fue para conocer el tamaño de la proteína al inicio del experimento de fluorescencia a los pH 2.0 y 7.4. Esta técnica es muy sensible a la presencia de moléculas grandes debido a que la luz dispersada es proporcional a la sexta potencia del diámetro.

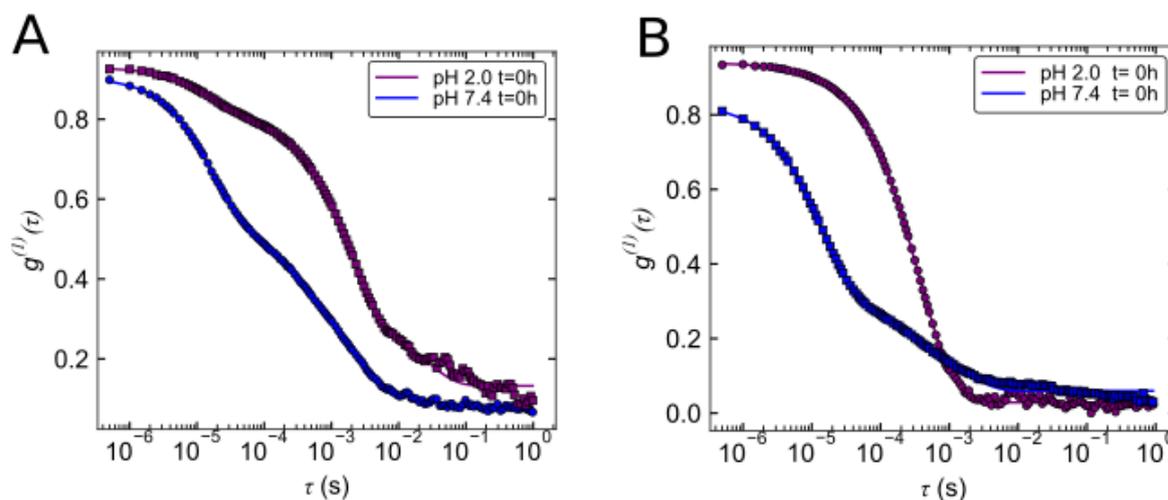


Figura 9: Curvas de correlación del punto inicial de dos réplicas seguidas por DLS. Se muestran curvas procedentes de las réplicas 1 (A) y 2 (B) correspondientes a los ensayos de fluorescencia intrínseca a 25°C, pH 7.4 y 2.0 en azul y morado, respectivamente.

Como se aprecia en la Figura 9, las curvas de ambas réplicas difieren entre sí, pero coinciden en que a pH 7.4 contienen moléculas de menor tamaño. Dicho aspecto se puede ver reflejado en la primera caída de la curva. Si se comparan estos resultados con los de los espectros iniciales de fluorescencia, se observa que en la 1, a pesar de que los espectros de fluorescencia parecieran iguales, los de DLS son distintos, ya que las curvas no presentan la misma forma y por ende la proteína no se encuentra en el mismo estado. De igual manera sucede en cada pH para la réplica 2.

Según estos resultados es importante resaltar varios aspectos. El primero es que el estado monomérico u oligomérico en el que comience la proteína va a influir en las mediciones obtenidas. Segundo, dicho estado es dependiente del tiempo, del mismo se puede sugerir que en la medida que transcurre el tiempo disminuye el porcentaje de población monomérica (como se aprecia en la Tabla 2 para las cinéticas en el tiempo a ambos pH). Tercero, como consecuencia los resultados que se obtuvieron son totalmente distintos y aunque no se conocen referencias en la literatura que relacionen al estado inicial de la proteína como una posible causa a variaciones en el experimento, este pudiera ser un factor muy importante a tener en cuenta y no siempre se encuentra reportado dicho valor. Aunque un ejemplo de la repercusión de iniciar los experimentos con proteínas en distintos estados oligoméricos lo constituyen los ensayos de formación de fibras con fibras preformadas (semillas) donde se reduce el tiempo lag de la reacción (Hernández-Santoyo et al., 2010). Como se pudo apreciar, dicho estado no se puede inferir mediante fluorescencia sino con técnicas como DLS u otras similares.

6.3 Ensayo de desplegamiento de 6aJL2 mediante fluorescencia y DLS

A continuación, se muestran los resultados para una de las réplicas (réplica 6), donde se comenzó con la proteína en un estado mayoritariamente monomérico (Figura 10B). Al analizarla por fluorescencia se encontró que para cada condición el valor máximo de intensidad obtenido a pH 7.4 y pH 2.0 fue de 347 y 350 nm respectivamente (Figura 10A). Para tener un mayor conocimiento de lo que ocurría durante todo el proceso la intensidad de fluorescencia a 350 nm se analizó durante 1370 min (Figura 11) para ambos pH. En este tiempo, la intensidad de fluorescencia a pH 2.0, se mantuvo casi constante, mientras que la intensidad obtenida a pH 7.0 disminuyó.

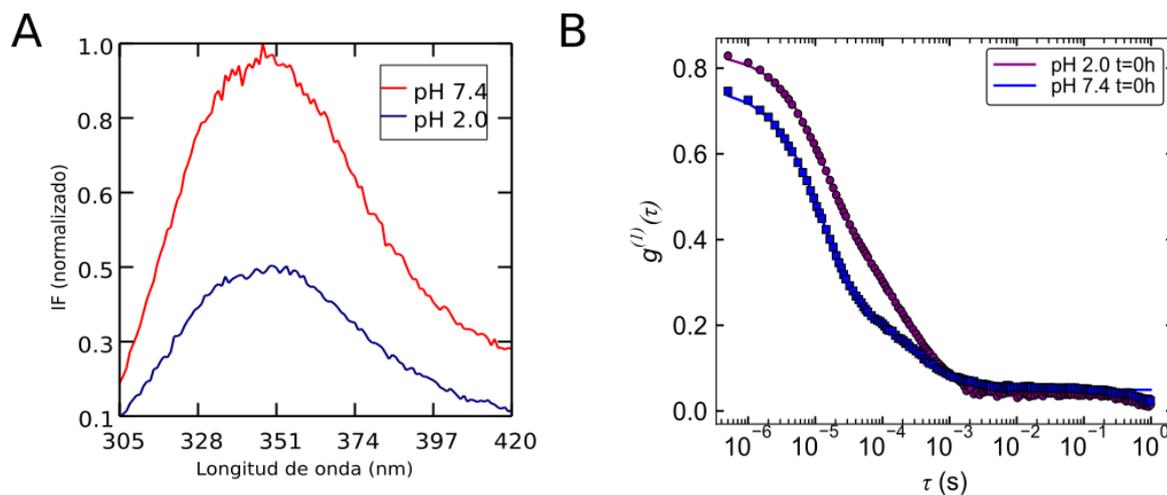


Figura 10: Espectros iniciales a 25°C para la réplica 6. Espectro obtenidos por fluorescencia (A) y DLS (B) a pH 2.0 y 7.4.

Como se muestra en la mayoría de las réplicas y en la Figura 11, la intensidad de fluorescencia a pH 2.0, es menor comparada con la obtenida a pH 7.4. Esto no coincide con lo reportado por Velázquez y col, pues ellos detectan que luego de haber incubado por 5 min la proteína a la temperatura de 37°C la intensidad de fluorescencia tiene un ligero aumento a pH ácidos comparado a otros pH (Velázquez-López et al., 2018). Se esperaba que, a menor pH, la proteína aumentara la fluorescencia del Trp producto del alejamiento de este residuo del puente disulfuro. Mishima y colaboradores reportaron resultados similares al del presente trabajo, donde argumentan que la causa de que la intensidad de fluorescencia del Trp sea menor a pH 2.0 que 7.5, podría ser que la proteína forma agregados fibrilares (Mishima et al., 2009).

El resultado que se obtuvo en el presente proyecto, a pH 2.0 a la temperatura de 37°C, implicaría que, si la proteína se despliega parcialmente durante las 24 h de incubación, la conformación el Trp parece no cambiar de ambiente químico o que se despliega durante el tiempo muerto del experimento. Por otro lado, a pH 7.4 transita por un proceso en el cual si existe un cambio de conformación en el ambiente del Trp.

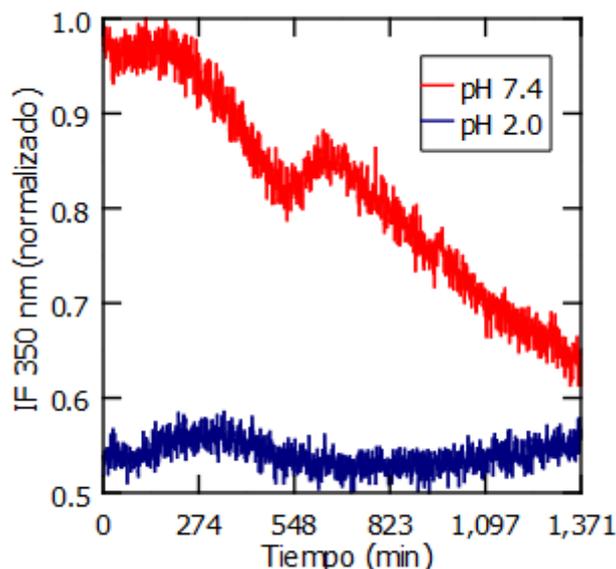


Figura 11: Cinética de desplegamiento a 37°C seguida por fluorescencia para la réplica 6. Intensidad de fluorescencia a 350 nm para pH 7.4 y 2.0, en negro y azul respectivamente.

A su vez, las mediciones obtenidas a pH 2.0 de la intensidad de fluorescencia del ANS mostraron ser mayores que a pH 7.4 (Figura 12A), lo que coincide con todas las réplicas y con lo reportado previamente. Se ha encontrado en la literatura que en las proteínas desplegadas los residuos hidrofóbicos están esparcidos en la estructura lo que dificulta la unión con el ANS. Un efecto similar sucede en las proteínas plegadas pero la causa es la inaccesibilidad de estos residuos en el interior de la estructura (Engelhard & Evans, 1996). Sin embargo, existen proteínas que en condiciones nativas pueden unir ANS siempre que en su conformación existan residuos hidrofóbicos expuestos (Pedersen et al., 2006). Por otro lado, en las proteínas parcialmente desplegadas se favorece la unión y por ende el incremento de la fluorescencia del ANS. Esto ocurre porque los grupos hidrofóbicos pueden estar agrupados y lo suficientemente expuestos o con la apropiada flexibilidad para la unión con el ANS (Engelhard & Evans, 1996).

Los resultados obtenidos muestran que a pH 2.0 en el inicio de la medición hay un aumento de la intensidad de fluorescencia hasta los 15 min, un decremento hasta los 214 min (3 h y 30 min) que pudiese ser causado por la formación de agregados y luego se mantiene constante debido posiblemente a que ya no hay más sitios de unión con el ANS. A pH 7.4, por el contrario, la tendencia de la fluorescencia del ANS fue de aumentar ligeramente (Figura 12A).

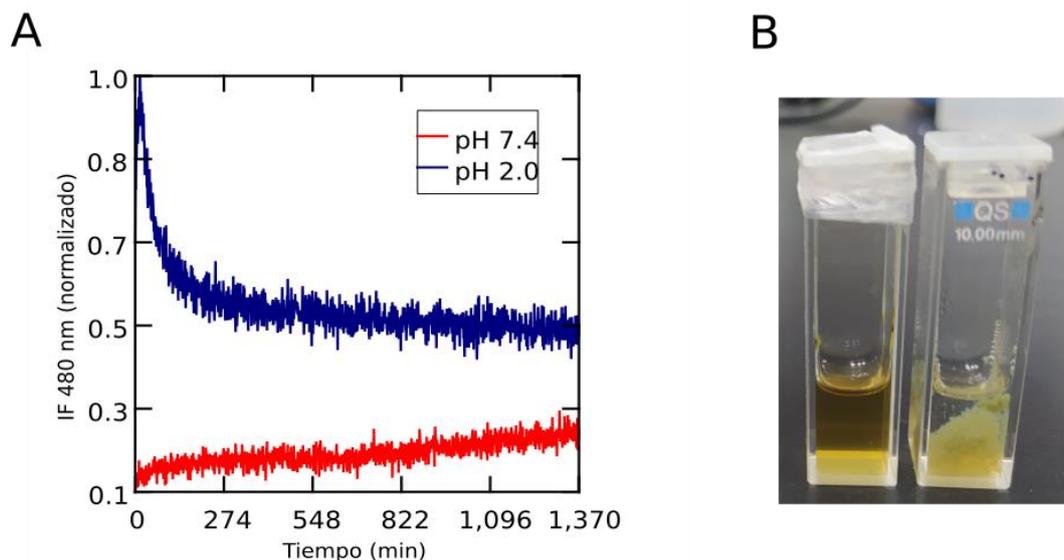


Figura 12: Cinética de desplegamiento a 37°C seguida por fluorescencia del ANS y cubeta de la muestra para la réplica 6. A: cinética para pH 7.4 y 2.0, en rojo y azul respectivamente. B: cubeta a pH 7.4 (izquierda) y pH 2.0 (derecha) incubada con ANS en condiciones de 37°C durante 24 h.

Similar a lo que ocurre en otros estudios (Velázquez-López et al., 2018), donde se ha visto que a pH por debajo de 3.0 la intensidad de fluorescencia del ANS aumenta significativamente, en este ensayo se observa una diferencia entre ambos pH. Este resultado sugiere que en la proteína se exponen regiones hidrofóbicas sólo a pH 2.0, lo que pudiese indicar que se encuentra parcialmente desplegada y a pH 7.4 plegada. O puede ser que en la proteína la unión con el ANS se vea favorecida a pH 2.0, con respecto a pH 7.4, debido a causas como pueden ser interacciones electrostáticas entre esta molécula y aminoácidos que se encuentren diferencialmente cargados a ambos pH (Velázquez-López et al., 2018). No obstante, de manera general debido a la carga negativa del ANS, la unión a esta proteína se va a favorecer a pH 2.0 ya que la misma presenta carga neta positiva con carga de 9.9 (pI: 5.10) y por el contrario a pH 7.4 presenta carga de -3.77 (calculadas por el programa Prot pi) (*Prot Pi | Bioinformatics Calculator*, s. f.). Las cubetas en las cuales se realizaron los experimentos resultaron diferentes a cada pH. A pH 2.0 se puede observar agregación de la proteína mientras que a pH 7.4 la muestra se encuentra homogénea al final del ensayo (Figura 12B).

Para continuar el análisis se realizaron las cinéticas de desplegamiento correspondientes durante 24 h monitoreadas por DLS. En este análisis se obtuvo que a pH 7.4 a medida que pasa el tiempo de incubación a 37°C, aumenta el radio

hidrodinámico de las moléculas. Esto se ve reflejado en que las curvas decaen mucho más lento en el tiempo al compararlas con el punto inicial ($t=0$ h). Este comportamiento se mantiene hasta las 18 h donde ya no se observan diferencias significativas con respecto a las 24 h (Figura 13A).

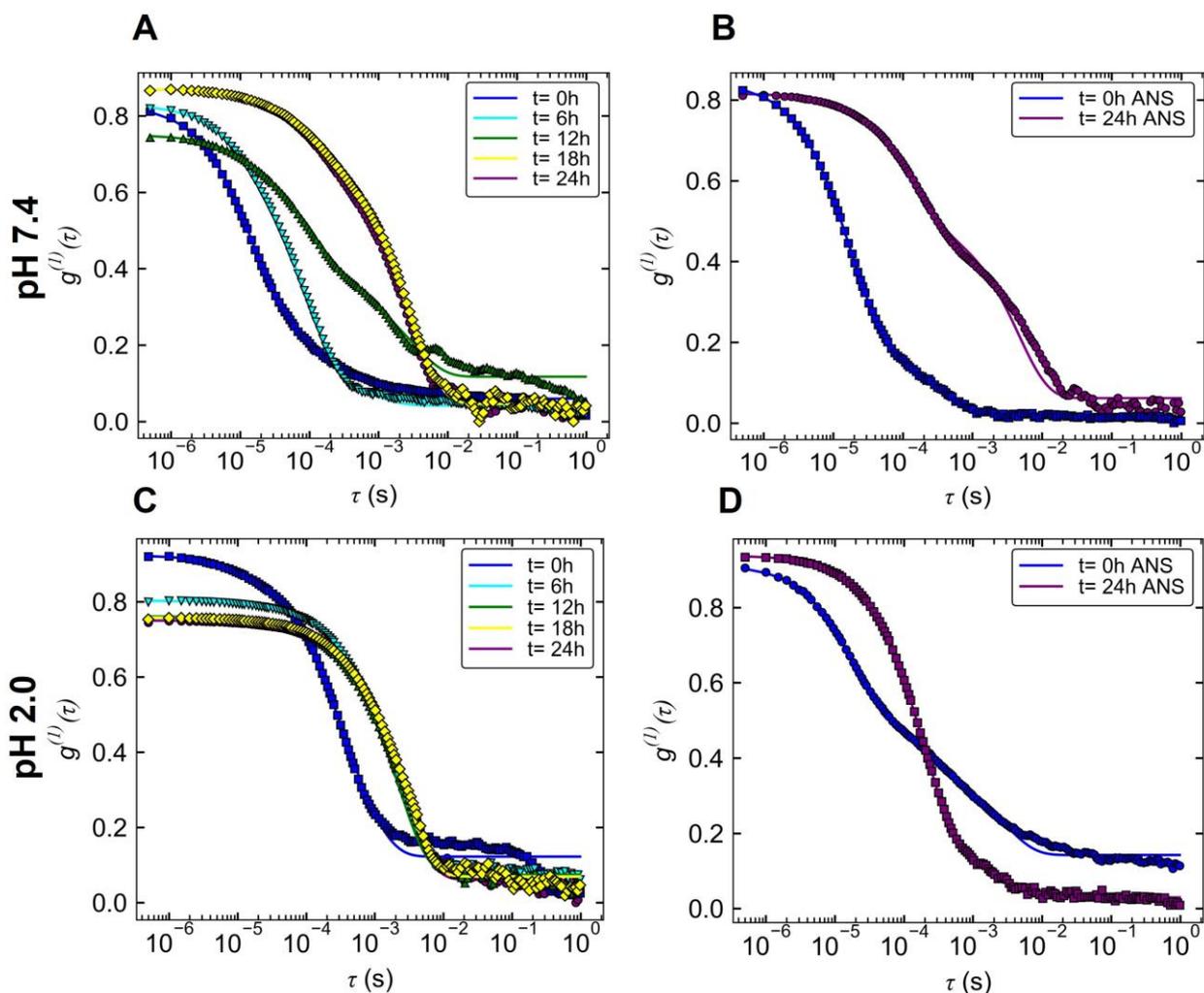


Figura 13: Curvas de correlación de las cinéticas de desplegamiento seguidas por DLS. Funciones de correlación de la proteína 6aJL2 colectadas durante la cinética de desplegamiento a 37 °C, pH 7.4 (A y B) y 2.0 (C y D). A y C: se muestran los datos a 0, 6, 12, 18 y 24 h en los colores azul, cian, verde, amarillo y morado respectivamente. B y D: se muestran los datos a 0 y 24 h, luego de incubadas con ANS en azul y morado respectivamente pertenecientes a la réplica 1.

En la tabla 2 se observa que el porcentaje de la intensidad de la señal de la proteína que se corresponde al monómero Rh: 2.0 nm (a $t=0$ h y pH 2.0) y al dímero Rh: 2.3 - 2.8

nm (a pH 7.4), disminuye a medida que transcurre el tiempo, mientras que complejos de Rh más grandes aumentan. La formación de oligómeros de mayor tamaño se ve reflejada con la incubación a 37°C en ambos pH. A pH 2.0, este aumento se aprecia más rápido que a pH 7.4, ya que a partir de las 6 h ya no se observan diferencias entre las curvas, las cuales se demoran más tiempo en perder su correlación (Figura 12C).

Tabla 2: Radios hidrodinámicos (Rh) de 6aJL2 obtenidos por el programa Zetasizer a pH 7.4 y 2.0.

pH 7.4	Tiempo	Radios hidrodinámicos (nm)		
		25°C		
Réplica 1	t= 0h	2.3 (33%)	51 (19%)	382 (34%)
Réplica 2	t= 0h	2.4 (65%)	11 (10%)	117 (25%)
Réplica 6	t= 0h	2.5 (63.4%)	17 (9.5%)	99 (21.8%)
		37°C		
Cinética de DLS	t= 0h	2.8 (56%)	12.6 (28%)	101 (14.9%)
	t= 6h	2.7 (17%)	25 (81.2%)	316 (1.6%)
	t= 12h	2.6 (9.3%)	21.35 (49%)	292 (41%)
	t= 18h		37.5 (16.6%)	746 (83%)
	t= 24h		40 (18%)	678 (81%)
Réplica 1	t= 0h (ANS)	3 (71.4%)	15 (11.8%)	127 (17%)
	t= 24h (ANS)	13.5 (9%)	36 (42%)	1221 (42%)
pH 2.0	Tiempo	Radios hidrodinámicos (nm)		
		25°C		
Réplica 1	t= 0h	2.2 (12.2%)	345 (75.4%)	0.065 (%)
Réplica 2	t= 0h		21 (15.4%)	82 (84.6%)
Réplica 6	t= 0h	2.1 (43%)	17 (34%)	89 (23%)
		37°C		
Cinética de DLS	t= 0h	2.0 (5.7%)	91.5 (94%)	
	t= 6h		114 (12%)	598 (88%)
	t= 12h		132 (17.6%)	707 (82%)
	t= 18h		152 (14%)	680 (86%)
	t= 24h		109 (9%)	625 (91%)
Réplica 1	t= 0h (ANS)	2.25 (34%)	5.5 (21.6%)	259 (26%)
	t= 24h (ANS)		38 (86%)	1092 (14%)

De manera similar ocurrió cuando la proteína se incubó con ANS a 37°C para ambos valores de pH, donde se observa que, a las 24 h, la curva decae más lento que a 0 h (Figura 13B y D). Además, con ANS a las 24 h, la población de mayor porcentaje de intensidad de la señal está formada por moléculas de menor tamaño en comparación con las que no tienen ANS a esa misma hora. Para pH 2.0, 24 h con ANS el Rh es de 38

nm constituido por el 86% de la señal y para ese pH sin ANS la población de mayor porcentaje es de Rh 625 nm. A pH 7.4 y 24 h, las poblaciones de mayor porcentaje con ANS son de 36 y 1221 nm, mientras que sin ANS es de 678 nm. Este resultado puede indicar que las regiones hidrofóbicas que se exponen en la proteína hacen que los oligómeros y los agregados que se formen sean de mucho menor tamaño que los correspondientes sin la unión del ANS (Tabla 2). Tal vez esto suceda porque el ANS impida la formación de agrupaciones entre las proteínas al interferir con su unión o con la formación del intermediario que se finalmente agrega.

El mejor ajuste de las curvas de correlación se logró con el empleo de varias poblaciones. El radio hidrodinámico teórico para la estructura de la proteína se calculó mediante el programa HYDROPRO, para la forma monomérica (por RMN, # pdb 2MMX) fue de 1.96 nm y para el dímero (por cristalografía de rayos X, # pdb 2W0K) de 2.42 nm mediante el programa HullRad (Fleming & Fleming, 2018). Estos programas permiten predecir los coeficientes de difusión rotacional y traslacional anisotrópicos. Se obtuvieron los Rh de 6aJL2 a distintos tiempos de incubación a 37°C y a pH 2.0 y 7.4. Todos corresponden con oligómeros con varias poblaciones.

6.4 Análisis de espectros de RMN en tiempo real

Los cambios en la posición de las señales en un espectro HSQC pueden ser utilizados para evaluar los efectos de agentes externos sobre las biomoléculas. En este caso, se analizaron los cambios en el desplazamiento químico que se presentaron por el efecto de la temperatura cuando la proteína pasa de 25 a 37°C a pH 2.0 (Figura 14). Se evidencia una diferencia entre los espectros, principalmente desde el inicio de la medición a 37°C se ve un espectro con un mayor número de señales en la zona de desplegados (presente en aproximadamente a 8 ppm en la frecuencia del ^1H) en comparación con el espectro a 25°C pH 2.0 que se ha reportado como plegada. Este resultado indica la presencia simultánea, esto es, un equilibrio entre una conformación desplegada o parcialmente desplegada, además de la plegada que se evidencia a 25°C.

Se ha observado que a pH 7.4, el solo cambio de temperatura de 25 a 37°C tiene un ligero efecto en el CS de la mayoría de los residuos de la proteína, el cual resulta mayor a pH 2.0 que a pH 7.4 (Maya-Martínez, 2015). Los residuos que más variaron a pH 2.0 fueron: Q6, R40, S96 y L111 (Figura 15).

En simulaciones de dinámica molecular se ha visto que un bajo pH lleva a la pérdida de enlaces de hidrógeno. La R24 se encuentra en el asa BC (o CDR1), V34 y Y37 en la hebra C, E51 en CDR2 y I78 en la hebra E.

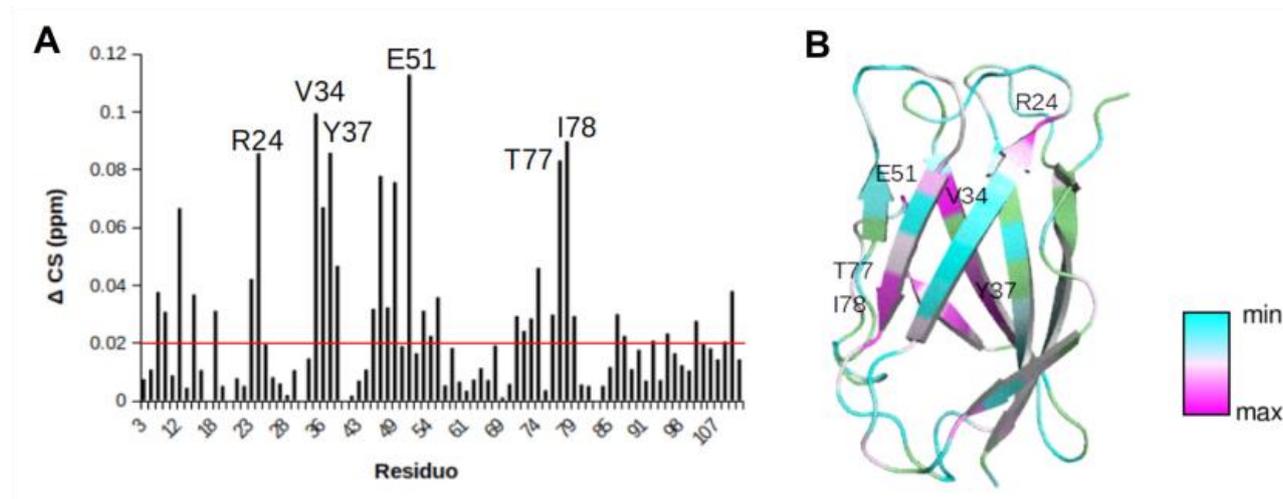


Figura 17: Cambios en la posición de los residuos en el espectro HSQC en el tiempo (24 h). A: Gráfico que muestra el grado de cambio de posición por residuo. B: Cambios de posición llevados a la estructura de 6aJL2 (por RMN, # pdb 2MMX). En un gradiente de azul -rosado (menor a mayor cambio) se muestran a todos los residuos, en verde los que no están asignados.

De manera general a 37°C las variaciones en el desplazamiento químico a lo largo del tiempo resultaron de menor magnitud con respecto a las encontradas al cambiar de temperatura. Con esto se podría sugerir que, a este pH, la resolución temporal de la medición no permite la detección de cambios conformacionales con el paso del tiempo, mientras que el cambio en la temperatura provoca un cambio conformacional detectable en la proteína. Durante las primeras 12 h no se observaron grandes cambios en el desplazamiento de los residuos, sólo a partir de las 18 h se vieron ligeros corrimientos (Figura 18). Contrario a lo esperado, no se lograron observar diferencias en el asa que conecta las hebras E y F, el cual se había identificado por simulaciones de dinámica molecular, como región expuesta debido a los cambios conformacionales inducidos por el pH ácido (Velázquez-López et al., 2018). Esto se podría deber a que los cambios son demasiado rápidos para detectarlos y no se forma un intermediario de plegamiento con el tiempo y la población suficiente para ser detectado mediante esta técnica.

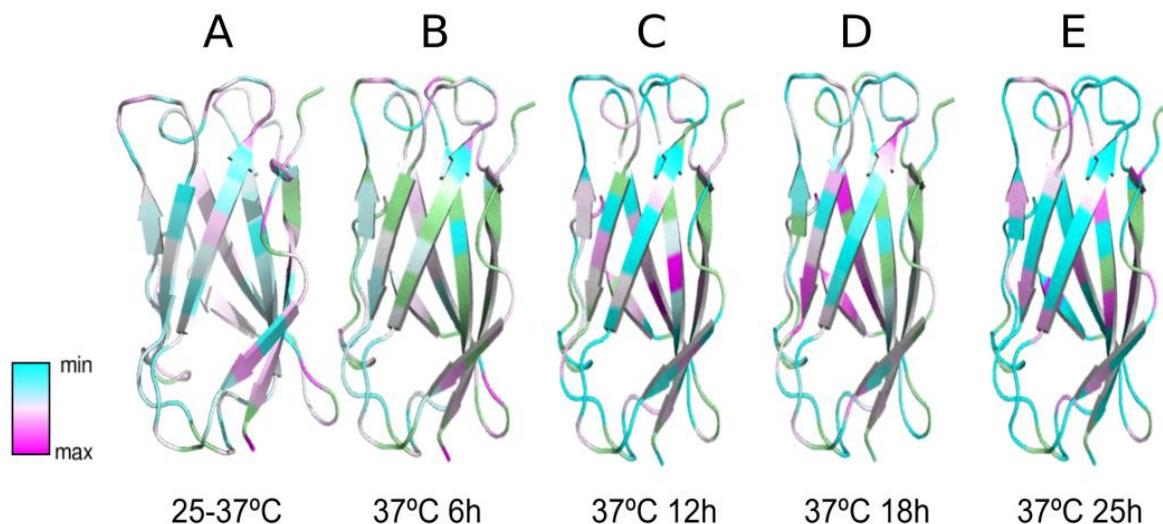


Figura 18: Representación en la estructura de la proteína 6aJL2, de los residuos que tuvieron un cambio en el desplazamiento químico. A: al cambiar de temperatura de 25 a 37°C, B-E: variaciones debido al cambio en un tiempo a las 6, 12, 18 y 25 h a 37°C. En un gradiente de azul - rosado (menor a mayor cambio) se muestran a todos los residuos, en verde los que no están asignados, estructura por RMN, # pdb 2MMX.

Para tener una medida del posible motivo del cambio de las dos poblaciones a pH 2.0 y 37°C, se analizó el decaimiento de la intensidad de cada población por separado durante 25 h. En las dos, la señal decayó de forma simultánea entre los residuos y similar entre las poblaciones (Figura 19). En la Figura 19 se muestran cinco residuos de cada una de las poblaciones (el resto de los aminoácidos tuvieron un comportamiento similar). La tendencia de decaimiento al ser igual para todos los aminoácidos sugiere la existencia de un proceso cooperativo. En ambas curvas, la señal decae en una sola fase hasta los 1200 min aproximadamente.

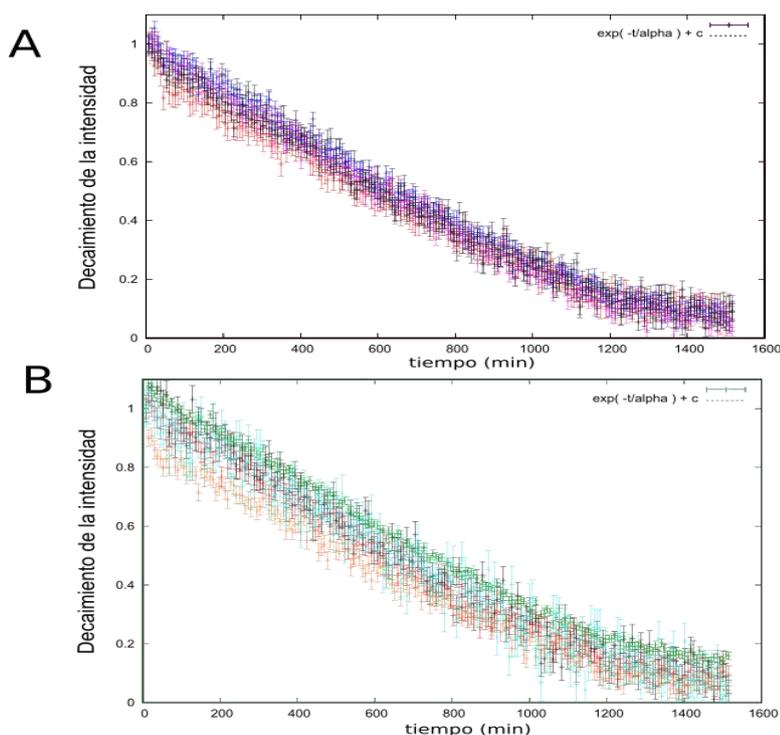


Figura 19: Curvas de decaimiento de la intensidad de la señal a pH 2.0 y a 37°C. A: decaimiento de la señal para cinco residuos plegados y B: para cinco residuos desplegados, tomados de forma aleatoria.

Las curvas en esta condición (pH 2.0 y 37°C), son más similares a la obtenida por Maya-Martínez, 2015 para la proteína 6aJL2-R24G a 37°C y pH 7.4, que para 6aJL2. Estos resultados sustentaron la inestabilidad de 6aJL2-R24G (Maya-Martínez, 2015). La población desplegada presenta una constante de decaimiento similar a la población plegada (decaen con la misma tendencia). Lo anterior sugiere que pasa del estado desplegado a otro estado con dos veces la velocidad con que se repuebla ya que para que ambas curvas decaigan igual, y como se conoce que se pasa del estado plegado al desplegado y luego a otro que se pierde la señal, entonces la velocidad con que pasa a este estado debe ser del doble de la velocidad con que llega al desplegado. Este otro estado pueden ser oligómeros, los cuales no se logran observar en el espectro de RMN.

Con el objetivo de lograr un posible acercamiento al grado de desplegamiento de la proteína, se comparó el espectro a las 24 h con un espectro de la proteína con 2 M de urea incubada por 24 h (previamente adquirido en el laboratorio) y otro espectro cuando tenía una mutación (L76G) que desestabiliza a 6aJL2 (Rennella et al., 2019) (Figura 20).

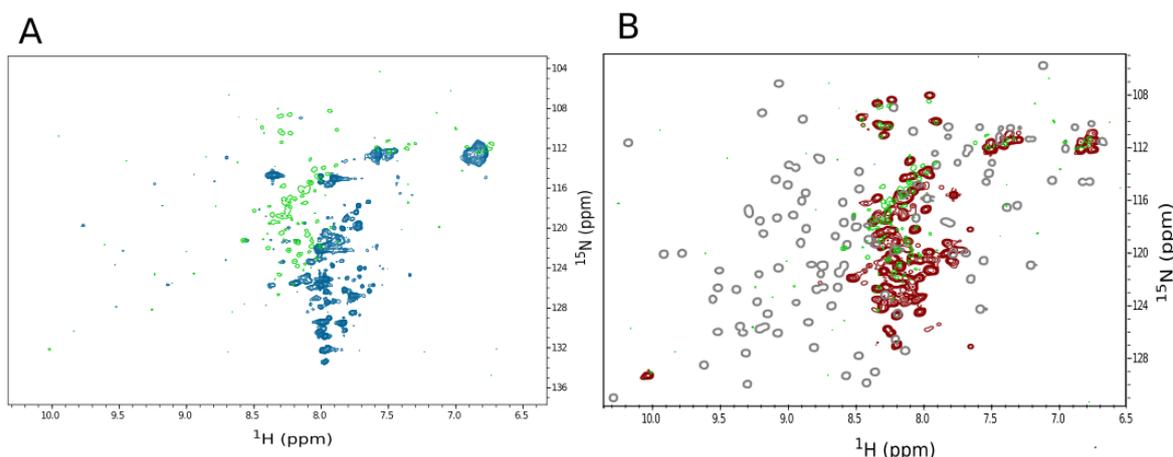


Figura 20: Comparación entre espectros HSQC de la proteína 6aJL2 con factores desestabilizantes. A: Se presenta el espectro con urea 2 M (azul) y a pH 2.0, 37°C, 24 h (verde) y B: espectro de la proteína a pH 6 (gris), con la mutación L76G (rojo) y a pH 2.0, 37°C, 24 h (verde). Espectros adquiridos A: en el laboratorio y B: por (Rennella et al., 2019)

Al comparar el espectro de la proteína a pH 2.0 con el obtenido en presencia de 2 M de urea (Figura 20A) se esperaba que ambos tuvieran gran similitud entre ellos y a pesar de que en los dos casos se observan espectros desplegados, no se corresponden entre sí, quizás debido a que el grado de desplegamiento no es el mismo. Los espectros de la proteína a pH 2.0 y con la mutación (Figura 20B) sí presentan una mayor coincidencia entre sus señales. Dicha mutación provoca un desplegamiento en la proteína, lo que brinda un característico espectro desplegado (Rennella et al., 2019). Con esto se puede sugerir que la proteína a las 24 h de incubada a pH 2.0, 37°C y con una concentración de 1 mM, presenta al menos una población parcialmente desplegada y el resto, se debe de encontrar como parte de una estructura mucho más grande como son los oligómeros.

Por el contrario, se observa como un pH más básico (6.5) como el empleado para la obtención del espectro gris (Figura 19B) y a la misma temperatura de 37°C resulta de un espectro plegado, perfectamente disperso. Un cambio en el pH de 7.4 a 2.0, hace que el espectro resultante cambie en la mayoría de sus señales (Figura 21).

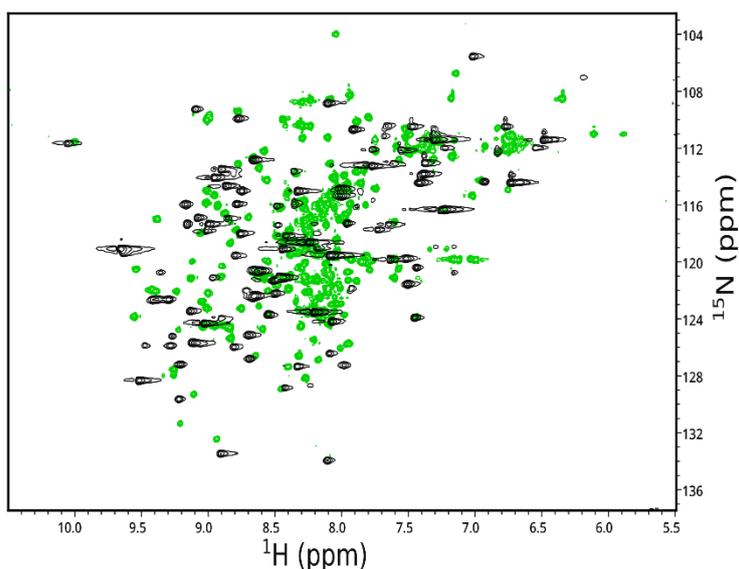


Figura 21: Comparación entre espectros HSQC de la proteína 6aJL2 a dos pH y 37°C. Espectros iniciales de la proteína a pH 7.4 (negro) y a pH 2.0 (verde). Espectro negro adquirido en el laboratorio.

Tanto la variación de temperatura (de 25 a 37°C) como de pH (de 7.4 a 2.0) hace que la proteína tenga un cambio conformacional en diferentes partes de su estructura. Con la primera, coinciden la mayor parte de las señales de la región plegada y surgen otras en la región de desplegados; con la segunda, las señales de los residuos plegados no se corresponden entre sí y además aparecen las señales de desplegados. Por tanto, se puede sugerir que un cambio de pH tiene mayor implicación estructural que un cambio de temperatura, al menos en las condiciones empleadas.

6.5 Proceso de desplegamiento de la proteína 6aJL2 a pH 2.0 y 7.4 en temperatura de 25 y 37°C

Con la información que nos brinda cada una de las técnicas empleadas en este proyecto se puede sugerir que cuando la proteína se incubaba a pH 2.0 y 37°C, experimenta un desplegamiento parcial en su estructura en donde no están involucrados los residuos cercanos al Trp pero sí la formación de parches hidrofóbicos. Este cambio se logra distinguir mejor al pasar de una condición a otra como mostraron los espectros de RMN, pero a lo largo del tiempo se aprecia menos. Una vez que sucede, al pasar las horas lo que se aprecia es un ligero rearrreglo estructural que se mantiene casi constante (como se observó mediante el desplazamiento químico por RMN y los espectros de

fluorescencia). Los residuos implicados están localizados en la estructura de la proteína en el asa BC (R24), la hebra C (V34 y Y37), en CDR2 (E51) y en la hebra E (T77 e I78). De ellos la V34 y Y37, se encuentran cercanos al W36, con lo cual se hubiese esperado observar por fluorescencia un cambio en el espectro de la proteína a las 18 h cuando se logran detectar tales corrimientos en las señales. Quizás al ser la variación en el desplazamiento químico tan pequeña (< 0.12 ppm) estos cambios no se ven reflejados en el espectro de fluorescencia. A pH 2.0 la proteína resulta cargada positivamente (9.9) lo que puede favorecer la unión con el ANS como se apreció anteriormente. Ya a las 24 h, presenta al menos una población completamente desplegada y el resto, se debe encontrar como parte de una estructura mucho más grande como son los agregados que no se logran observar en el espectro. Estas poblaciones se pueden detectar por DLS, donde inicialmente se evidencia la del monómero (plegado o parcialmente desplegado, aspecto que no se puede discernir mediante esta técnica) con un porcentaje de intensidad de la señal de 5.7% a 37°C. Además, se encuentra otra de oligómero con 94%, aproximadamente. La de monómero, rápidamente desaparece (o al estar en muy baja proporción con respecto a la de oligómeros, no se va a poder detectar por el equipo, pero sí es visible por RMN) y solo quedan oligómeros durante el ensayo, los cuales pueden corresponder con la señal que se pierde por RMN. Mishima y colaboradores sugieren que esta proteína a pH 2.0 tiene estructura residual en un estado altamente desplegado, estabilizada por interacciones hidrofóbicas y el enlace disulfuro (Mishima et al., 2009).

A pH 7.4 y 37°C, se puede considerar también un desplegamiento parcial en donde el ambiente del Trp sí cambia, pero no se exponen regiones hidrofóbicas capaces de interactuar con el ANS. El espectro de RMN consiste en proteína plegada, la cual pareciera que tiene una estructura diferente a la plegada encontrada a pH 2.0. Esta población disminuye en el tiempo hasta las 12 h, a la par del aumento de otra población con R_h más grande.

7. Conclusiones

En estos ensayos se encontró que el estado oligomérico inicial en donde empieza la proteína es un factor importante durante la realización de los experimentos. Este frecuentemente no es considerado en la literatura y mediante ensayos de fluorescencia no es posible detectarlo. Con lo cual, para la realización de los ensayos de fluorescencia y DLS, a pH 2.0 y 37°C se debe considerar que inicialmente existen dos poblaciones: una plegada y otra desplegada (total o parcial) para 6aJL2.

La técnica de RMN con las condiciones que se emplearon no permitió detectar la presencia de posibles intermediarios de plegamiento, pero sí la aparición de una población desplegada debido al cambio de temperatura de 25 a 37°C a pH 2.0. A lo largo del tiempo la población de proteína plegada se convierte en desplegada y esta a otra de mayor tamaño. A pH 7.4, también transita por un proceso de desplegamiento, pero parece ser mediante un mecanismo distinto que a pH 2.0.

Fisiológicamente, un pH ácido puede provocar la agregación de una proteína inicialmente estable, lo que puede resultar perjudicial en el organismo como sucede en la amiloidosis de cadenas ligeras.

8. Perspectivas

1. Elaborar un protocolo que permita la obtención de proteína monomérica para su empleo en los demás experimentos.
2. Analizar los agregados que se forman mediante la fluorescencia de ThT y microscopía electrónica, para verificar si son fibrilares.
3. Realizar ensayos bajo estas condiciones (pH 2.0 y 37°C) en otras líneas germinales frecuentes en AL con el propósito de analizar la influencia de estos parámetros y comparar entre las mismas.

9. Bibliografía

- Abraham, R. S., Geyer, S. M., Price-Troska, T. L., Allmer, C., Kyle, R. A., Gertz, M. A., & Fonseca, R. (2003). Immunoglobulin light chain variable (V) region genes influence clinical presentation and outcome in light chain-associated amyloidosis (AL). *Blood*, *101*(10), 3801-3808. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-09-2707>
- Aggeli, A., Nyrkova, I. A., Bell, M., Harding, R., Carrick, L., McLeish, T. C. B., Semenov, A. N., & Boden, N. (2001). Hierarchical self-assembly of chiral rod-like molecules as a model for peptide β -sheet tapes, ribbons, fibrils, and fibers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(21), 11857-11862. <https://doi.org/10.1073/pnas.191250198>
- Álvarez-Ruiz, S. B., García-Río, I., & Daudén, E. (2005). Amiloidosis sistémicas. *Actas Dermo-Sifiliográficas*, *96*(2), 69-82. [https://doi.org/10.1016/S0001-7310\(05\)73042-8](https://doi.org/10.1016/S0001-7310(05)73042-8)
- Alves-Rodrigues, A., Gregori, L., & Figueiredo-Pereira, M. E. (1998). Ubiquitin, cellular inclusions and their role in neurodegeneration. *Trends in Neurosciences*, *21*(12), 516-520. [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(98\)01276-4](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(98)01276-4)
- Badcoe, I. G., Smith, C. J., Wood, S., Halsall, D. J., Holbrook, J. J., Lund, P., & Clarke, A. R. (1991). Binding of a chaperonin to the folding intermediates of lactate dehydrogenase. *Biochemistry*, *30*(38), 9195-9200. <https://doi.org/10.1021/bi00102a010>
- Baden, E. M., Randles, E. G., Aboagye, A. K., Thompson, J. R., & Ramirez-Alvarado, M. (2008). Structural insights into the role of mutations in amyloidogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, *283*(45), 30950-30956. <https://doi.org/10.1074/jbc.M804822200>
- Baden, E. M., Sikkink, L. A., & Ramirez-Alvarado, M. (2009). Light chain amyloidosis—Current findings and future prospects. *Current Protein & Peptide Science*, *10*(5), 500-508. <https://doi.org/10.2174/138920309789351949>

- Biter, A. B., Pollet, J., Chen, W.-H., Strych, U., Hotez, P. J., & Bottazzi, M. E. (2019). A method to probe protein structure from UV absorbance spectra. *Analytical Biochemistry*, *587*, 113450. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2019.113450>
- Blancas-Mejia, L. M., Misra, P., Dick, C. J., Cooper, S. A., Redhage, K. R., Bergman, M. R., Jordan, T. L., Maar, K., & Ramirez-Alvarado, M. (2018). Immunoglobulin light chain amyloid aggregation. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, *54*(76), 10664-10674. <https://doi.org/10.1039/c8cc04396e>
- Bode, D. C., Freeley, M., Nield, J., Palma, M., & Viles, J. H. (2019). Amyloid- β oligomers have a profound detergent-like effect on lipid membrane bilayers, imaged by atomic force and electron microscopy. *Journal of Biological Chemistry*, *294*(19), 7566-7572. <https://doi.org/10.1074/jbc.AC118.007195>
- Bodi, K., Prokaeva, T., Spencer, B., Eberhard, M., Connors, L. H., & Seldin, D. C. (2009). AL-Base: A visual platform analysis tool for the study of amyloidogenic immunoglobulin light chain sequences. *Amyloid: The International Journal of Experimental and Clinical Investigation: The Official Journal of the International Society of Amyloidosis*, *16*(1), 1-8. <https://doi.org/10.1080/13506120802676781>
- Brumshtein, B., Esswein, S. R., Landau, M., Ryan, C. M., Whitelegge, J. P., Phillips, M. L., Cascio, D., Sawaya, M. R., & Eisenberg, D. S. (2014). Formation of amyloid fibers by monomeric light chain variable domains. *The Journal of Biological Chemistry*, *289*(40), 27513-27525. <https://doi.org/10.1074/jbc.m114.585638>
- Buchner, J., Renner, M., Lilie, H., Hinz, H. J., Jaenicke, R., Kiefhabel, T., & Rudolph, R. (1991). Alternatively folded states of an immunoglobulin. *Biochemistry*, *30*(28), 6922-6929. <https://doi.org/10.1021/bi00242a016>
- Bustamante, J. G., & Zaidi, S. R. H. (2021). Amyloidosis. En *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470285/>
- Carlos Amero Tello. (2014). *Introducción a la Resonancia Magnética Nuclear de Proteínas*. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

- Chiti, F., & Dobson, C. M. (2006). Protein Misfolding, Functional Amyloid, and Human Disease. *Annual Review of Biochemistry*, 75(1), 333-366. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.101304.123901>
- Chiti, F., & Dobson, C. M. (2009). Amyloid formation by globular proteins under native conditions. *Nature Chemical Biology*, 5(1), 15-22. <https://doi.org/10.1038/nchembio.131>
- Córsico, B., Falomir Lockhart, L. J., Franchini, G. R., & Scaglia, N. (2013). *Análisis estructural y funcional de macromoléculas*. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP). <https://doi.org/10.35537/10915/37269>
- Danielsson, J., Jarvet, J., Damberg, P., & Gräslund, A. (2002). Translational diffusion measured by PFG-NMR on full length and fragments of the Alzheimer A β (1–40) peptide. Determination of hydrodynamic radii of random coil peptides of varying length. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 40(13), S89-S97. <https://doi.org/10.1002/mrc.1132>
- De Simone, A., Dodson, G. G., Verma, C. S., Zagari, A., & Fraternali, F. (2005). Prion and water: Tight and dynamical hydration sites have a key role in structural stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(21), 7535-7540. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501748102>
- del Pozo Yauner, L., Ortiz, E., Sánchez, R., Sánchez-López, R., Güereca, L., Murphy, C. L., Allen, A., Wall, J. S., Fernández-Velasco, D. A., Solomon, A., & Becerril, B. (2008). Influence of the germline sequence on the thermodynamic stability and fibrillogenicity of human lambda 6 light chains. *Proteins*, 72(2), 684-692. <https://doi.org/10.1002/prot.21934>
- del Pozo-Yauner, L., Wall, J. S., González Andrade, M., Sánchez-López, R., Rodríguez-Ambriz, S. L., Pérez Carreón, J. I., Ochoa-Leyva, A., & Fernández-Velasco, D. A. (2014). The N-terminal strand modulates immunoglobulin light chain fibrillogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 443(2), 495-499. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.11.123>

- Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G. W., Zhu, G., Pfeifer, J., & Bax, A. (1995). NMRPipe: A multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *Journal of Biomolecular NMR*, 6(3), 277-293. <https://doi.org/10.1007/BF00197809>
- DiCostanzo, A. C., Thompson, J. R., Peterson, F. C., Volkman, B. F., & Ramirez-Alvarado, M. (2012). Tyrosine residues mediate fibril formation in a dynamic light chain dimer interface. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(33), 27997-28006. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.362921>
- Dill, K. A. (1985). Theory for the folding and stability of globular proteins. *Biochemistry*, 24(6), 1501-1509. <https://doi.org/10.1021/bi00327a032>
- Dispenzieri, A., Gertz, M. A., & Buadi, F. (2012). What do I need to know about immunoglobulin light chain (AL) amyloidosis? *Blood Reviews*, 26(4), 137-154. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2012.03.001>
- Dobson, C. M. (2004). Experimental investigation of protein folding and misfolding. *Methods*, 34(1), 4-14. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2004.03.002>
- Dobson, C. M. (2015). Alzheimer's disease: Addressing a twenty-first century plague. *Rendiconti Lincei*, 26(3), 251-262. <https://doi.org/10.1007/s12210-015-0453-y>
- Eftink, M. R. (2002). Fluorescence Quenching: Theory and Applications. En J. R. Lakowicz (Ed.), *Topics in Fluorescence Spectroscopy: Principles* (pp. 53-126). Springer US. https://doi.org/10.1007/0-306-47058-6_2
- Engelhard, M., & Evans, P. A. (1996). Experimental investigation of sidechain interactions in early folding intermediates. *Folding and Design*, 1(2), R31-R37. [https://doi.org/10.1016/S1359-0278\(96\)00016-8](https://doi.org/10.1016/S1359-0278(96)00016-8)
- Englander, S. W., Mayne, L., Kan, Z.-Y., & Hu, W. (2016). Protein Folding—How and Why: By Hydrogen Exchange, Fragment Separation, and Mass Spectrometry. *Annual review of biophysics*, 45, 135-152. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-062215-011121>
- Feltrup, T. M., Patel, K., Kumar, R., Cai, S., & Singh, B. R. (2018). A novel role of C-terminus in introducing a functionally flexible structure critical for the biological

- activity of botulinum neurotoxin. *Scientific Reports*, 8(1), 8884. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26764-z>
- Fleming, P. J., & Fleming, K. G. (2018). HullRad: Fast Calculations of Folded and Disordered Protein and Nucleic Acid Hydrodynamic Properties. *Biophysical Journal*, 114(4), 856-869. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.01.002>
- Ghisaidoobe, A. B. T., & Chung, S. J. (2014). Intrinsic Tryptophan Fluorescence in the Detection and Analysis of Proteins: A Focus on Förster Resonance Energy Transfer Techniques. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(12), 22518-22538. <https://doi.org/10.3390/ijms151222518>
- Glover, J. R., & Lindquist, S. (1998). Hsp104, Hsp70, and Hsp40: A novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell*, 94(1), 73-82. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81223-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81223-4)
- Gonzalez-Onofre. (2020). *Caracterización espectroscópica del efecto de la temperatura en el desplegamiento de la cadena ligera 6aJL2-R24G*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México.
- Hazenberg, B. P. C. (2013). Amyloidosis: A clinical overview. *Rheumatic Diseases Clinics of North America*, 39(2), 323-345. <https://doi.org/10.1016/j.rdc.2013.02.012>
- Hernández-Santoyo, A., del Pozo Yauner, L., Fuentes-Silva, D., Ortiz, E., Rudiño-Piñera, E., Sánchez-López, R., Horjales, E., Becerril, B., & Rodríguez-Romero, A. (2010). A Single Mutation at the Sheet Switch Region Results in Conformational Changes Favoring λ 6 Light-Chain Fibrillogenesis. *Journal of Molecular Biology*, 396(2), 280-292. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.11.038>
- Hurle, M. R., Helms, L. R., Li, L., Chan, W., & Wetzel, R. (1994). A role for destabilizing amino acid replacements in light-chain amyloidosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(12), 5446-5450.
- Karplus, M., & Weaver, D. L. (1976). Protein-folding dynamics. *Nature*, 260(5550), 404-406. <https://doi.org/10.1038/260404a0>
- Keller, R. (2004). *The Computer Aided Resonance Assignment Tutorial*. CANTINA Verlag. <http://www.cara.nmr-software.org/downloads/3-85600-112-3.pdf>

- Khurana, R., Gillespie, J. R., Talapatra, A., Minert, L. J., Ionescu-Zanetti, C., Millett, I., & Fink, A. L. (2001). Partially folded intermediates as critical precursors of light chain amyloid fibrils and amorphous aggregates. *Biochemistry*, *40*(12), 3525-3535. <https://doi.org/10.1021/bi001782b>
- Kidokoro, S., & Nakamura, S. (2016). Chapter Fifteen—IATC, DSC, and PPC Analysis of Reversible and Multistate Structural Transition of Cytochrome c. In A. L. Feig (Ed.), *Methods in Enzymology* (Vol. 567, pp. 391-412). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2015.08.002>
- Kim, P. S., & Baldwin, R. L. (1982). Specific Intermediates in the Folding Reactions of Small Proteins and the Mechanism of Protein Folding. *Annual Review of Biochemistry*, *51*(1), 459-489. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.51.070182.002331>
- Kim, Y. S., & Hochstrasser, R. M. (2009). Applications of 2D IR spectroscopy to peptides, proteins, and hydrogen-bond dynamics. *The journal of physical chemistry. B*, *113*(24), 8231-8251. <https://doi.org/10.1021/jp8113978>
- Knowles, T. P. J., Vendruscolo, M., & Dobson, C. M. (2014). The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *15*(6), 384-396. <https://doi.org/10.1038/nrm3810>
- Krishna Mohan, P. M., & Hosur, R. V. (2009). Structure-function-folding relationships and native energy landscape of dynein light chain protein: Nuclear magnetic resonance insights. *Journal of Biosciences*, *34*(3), 465-479. <https://doi.org/10.1007/s12038-009-0052-0>
- Kupfer, L., Hinrichs, W., & Groschup, M. H. (2009). Prion protein misfolding. *Current Molecular Medicine*, *9*(7), 826-835. <https://doi.org/10.2174/156652409789105543>
- Kusum, Y., Anurag, Y., Priyanka, V., Veda, P. P., & Upendra, N. D. (2019). Protein Misfolding Diseases and Therapeutic Approaches. *Current Protein & Peptide Science*, *20*(12), 1226-1245.
- Kyle, R. A. (2001). Amyloidosis: A convoluted story. *British Journal of Haematology*, *114*(3), 529-538. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2001.02999.x>

- Kyle, R. A., Linos, A., Beard, C. M., Linke, R. P., Gertz, M. A., O'Fallon, W. M., & Kurland, L. T. (1992). Incidence and natural history of primary systemic amyloidosis in Olmsted County, Minnesota, 1950 through 1989. *Blood*, 79(7), 1817-1822.
- L. Almeida, Z., & M. M. Brito, R. (2020). Structure and Aggregation Mechanisms in Amyloids. *Molecules*, 25(5). <https://doi.org/10.3390/molecules25051195>
- LabPlot – Scientific plotting and data analysis*. (s. f.). Recuperado 24 de septiembre de 2021, de <https://labplot.kde.org/>
- Lakowicz, J. R. (Ed.). (2006). Protein Fluorescence. En *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (pp. 529-575). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4_16
- Levinthal, C. (1968). Are there pathways for protein folding? *Journal de Chimie Physique*, 65, 44-45. <https://doi.org/10.1051/jcp/1968650044>
- Liang, Y. (2006). Applications of isothermal titration calorimetry in protein folding and molecular recognition. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 3(3), 209-219. <https://doi.org/10.1007/BF03247210>
- Liang, Y., Li, J., Chen, J., & Wang, C. C. (2001). Thermodynamics of the folding of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase assisted by protein disulfide isomerase studied by microcalorimetry. *European Journal of Biochemistry*, 268(15), 4183-4189. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2001.02330.x>
- Loquet, A., El Mammeri, N., Stanek, J., Berbon, M., Bardiaux, B., Pintacuda, G., & Habenstein, B. (2018). 3D structure determination of amyloid fibrils using solid-state NMR spectroscopy. *Methods*, 138-139, 26-38. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2018.03.014>
- Lošdorfer Božič, A., & Podgornik, R. (2017). PH Dependence of Charge Multipole Moments in Proteins. *Biophysical Journal*, 113(7), 1454-1465. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.08.017>
- Malhotra, P., & Udgaonkar, J. B. (2015). Tuning Cooperativity on the Free Energy Landscape of Protein Folding. *Biochemistry*, 54(22), 3431-3441. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00247>

- Malhotra, P., & Udgaonkar, J. B. (2016). How cooperative are protein folding and unfolding transitions? *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 25(11), 1924-1941. <https://doi.org/10.1002/pro.3015>
- Marin-Argany, M., Güell-Bosch, J., Blancas-Mejía, L. M., Villegas, S., & Ramirez-Alvarado, M. (2015). Mutations can cause light chains to be too stable or too unstable to form amyloid fibrils. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 24(11), 1829-1840. <https://doi.org/10.1002/pro.2790>
- Mas Monserrat, J. (2018). *Aplicación de la RMN al estudio a nivel residual de la termodinámica de desplegamiento y plegamiento del dominio H2H3 de la proteína priónica*. <http://dspace.uib.es/xmlui/handle/11201/146430>
- Maya-Martínez. (2015). *Estudios estructurales y dinámicos del estado nativo de las proteínas de la línea germinal λ6a*. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS.
- Mishima, T., Ohkuri, T., Monji, A., Kanemaru, T., Abe, Y., & Ueda, T. (2009). Residual Structures in the Acid-Unfolded States of Vλ6 Proteins Affect Amyloid Fibrillation. *Journal of Molecular Biology*, 392(4), 1033-1043. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.07.078>
- Mj, C., & Je, L. (2003). A survey of the year 2002 literature on applications of isothermal titration calorimetry. *Journal of Molecular Recognition: JMR*, 16(6), 383-391. <https://doi.org/10.1002/jmr.648>
- Mukherjee, S., Pondaven, S. P., & Jaroniec, C. P. (2011). Conformational flexibility of a human immunoglobulin light chain variable domain by relaxation dispersion nuclear magnetic resonance spectroscopy: Implications for protein misfolding and amyloid assembly. *Biochemistry*, 50(26), 5845-5857. <https://doi.org/10.1021/bi200410c>
- Nakamura, S., & Kidokoro, S. (2005). Direct observation of the enthalpy change accompanying the native to molten-globule transition of cytochrome c by using isothermal acid-titration calorimetry. *Biophysical Chemistry*, 113(2), 161-168. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2004.09.002>

- Newberry, R. W., & Raines, R. T. (2019). Secondary Forces in Protein Folding. *ACS Chemical Biology*, 14(8), 1677-1686. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.9b00339>
- Nölting, B., & Agard, D. A. (2008). How general is the nucleation–condensation mechanism? *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 73(3), 754-764. <https://doi.org/10.1002/prot.22099>
- Onuchic, J. N., Luthey-Schulten, Z., & Wolynes, P. G. (1997). Theory of protein folding: The energy landscape perspective. *Annual Review of Physical Chemistry*, 48, 545-600. <https://doi.org/10.1146/annurev.physchem.48.1.545>
- Pedersen, S., Nesgaard, L., Baptista, R. P., Melo, E. P., Kristensen, S. R., & Otzen, D. E. (2006). PH-dependent aggregation of cutinase is efficiently suppressed by 1,8-ANS. *Biopolymers*, 83(6), 619-629. <https://doi.org/10.1002/bip.20598>
- Perfetti, V., Casarini, S., Palladini, G., Vignarelli, M. C., Klersy, C., Diegoli, M., Ascari, E., & Merlini, G. (2002). Analysis of V(λ)-J(λ) expression in plasma cells from primary (AL) amyloidosis and normal bone marrow identifies 3r (λ dall) as a new amyloid-associated germline gene segment. *Blood*, 100(3), 948-953. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-01-0114>
- Prot pi | Bioinformatics Calculator*. (s. f.). Recuperado 9 de noviembre de 2021, de <https://www.protpi.ch/>
- Rajeshwar T, R., & Krishnan, M. (2017). Direct Determination of Site-Specific Noncovalent Interaction Strengths of Proteins from NMR-Derived Fast Side Chain Motional Parameters. *The Journal of Physical Chemistry B*, 121(20), 5174-5186. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b01402>
- Ramirez-Alvarado, M. (2012). Amyloid formation in light chain amyloidosis. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 12(22), 2523-2533. <https://doi.org/10.2174/1568026611212220007>
- Rees, D. C., & Robertson, A. D. (2001). Some thermodynamic implications for the thermostability of proteins. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 10(6), 1187-1194.

- Rennella, E., Morgan, G. J., Kelly, J. W., & Kay, L. E. (2019). Role of domain interactions in the aggregation of full-length immunoglobulin light chains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(3), 854-863. <https://doi.org/10.1073/pnas.1817538116>
- Reppert, M., & Tokmakoff, A. (2016). Computational Amide I 2D IR Spectroscopy as a Probe of Protein Structure and Dynamics. *Annual Review of Physical Chemistry*, 67(1), 359-386. <https://doi.org/10.1146/annurev-physchem-040215-112055>
- Richardson, J. S., & Richardson, D. C. (2002). Natural β -sheet proteins use negative design to avoid edge-to-edge aggregation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(5), 2754-2759. <https://doi.org/10.1073/pnas.052706099>
- Rogers, D. M., Jasim, S. B., Dyer, N. T., Auvray, F., Réfrégiers, M., & Hirst, J. D. (2019). Electronic Circular Dichroism Spectroscopy of Proteins. *Chem*, 5(11), 2751-2774. <https://doi.org/10.1016/j.chempr.2019.07.008>
- Sawicki, M. (2012). SEDfit: Software for Spectral Energy Distribution Fitting of Photometric Data. *Publications of the Astronomical Society of the Pacific*, 124(921), 1208-1218. <https://doi.org/10.1086/668636>
- Serrano, A. L., Waagele, M. M., & Gai, F. (2012). Spectroscopic studies of protein folding: Linear and nonlinear methods. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 21(2), 157-170. <https://doi.org/10.1002/pro.2006>
- Sherman, M. Y., & Goldberg, A. L. (2001). Cellular defenses against unfolded proteins: A cell biologist thinks about neurodegenerative diseases. *Neuron*, 29(1), 15-32. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(01\)00177-5](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(01)00177-5)
- Sipe, J. D., & Cohen, A. S. (2000). Review: History of the amyloid fibril. *Journal of Structural Biology*, 130(2-3), 88-98. <https://doi.org/10.1006/jsbi.2000.4221>
- Souillac, P. O., Uversky, V. N., & Fink, A. L. (2003). Structural Transformations of Oligomeric Intermediates in the Fibrillation of the Immunoglobulin Light Chain LEN. *Biochemistry*, 42(26), 8094-8104. <https://doi.org/10.1021/bi034652m>
- Souillac, P. O., Uversky, V. N., Millett, I. S., Khurana, R., Doniach, S., & Fink, A. L. (2002). Elucidation of the Molecular Mechanism during the Early Events in Immunoglobulin

- Light Chain Amyloid Fibrillation: EVIDENCE FOR AN OFF-PATHWAY OLIGOMER AT ACIDIC pH *. *Journal of Biological Chemistry*, 277(15), 12666-12679. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109229200>
- Stetefeld, J., McKenna, S. A., & Patel, T. R. (2016). Dynamic light scattering: A practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophysical Reviews*, 8(4), 409-427. <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0218-6>
- Sule, S. V., Sukumar, M., Weiss, W. F., Marcelino-Cruz, A. M., Sample, T., & Tessier, P. M. (2011). High-throughput analysis of concentration-dependent antibody self-association. *Biophysical Journal*, 101(7), 1749-1757. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.08.036>
- Valdés-García, G., Millán-Pacheco, C., & Pastor, N. (2017). Convergent mechanisms favor fast amyloid formation in two lambda 6a Ig light chain mutants. *Biopolymers*, 107(8), e23027. <https://doi.org/10.1002/bip.23027>
- Vasudeva, G., Sidhu, C., Kalidas, N., Ashish, & Pinnaka, A. K. (2021). Shape-function of a novel metapyrocatechase, RW4-MPC: Metagenomics to SAXS data based insight into deciphering regulators of function. *International Journal of Biological Macromolecules*, 188, 1012-1024. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.08.031>
- Velázquez-López, I., Valdés-García, G., Romero Romero, S., Maya Martínez, R., Leal-Cervantes, A. I., Costas, M., Sánchez-López, R., Amero, C., Pastor, N., & Fernández Velasco, D. A. (2018). Localized conformational changes trigger the pH-induced fibrillogenesis of an amyloidogenic λ light chain protein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1862(7), 1656-1666. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.04.014>
- Wechalekar, A. D., Gillmore, J. D., & Hawkins, P. N. (2016). Systemic amyloidosis. *Lancet (London, England)*, 387(10038), 2641-2654. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)01274-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01274-X)
- Wetlaufer, D. B. (1973). Nucleation, rapid folding, and globular intrachain regions in proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70(3), 697-701. <https://doi.org/10.1073/pnas.70.3.697>

- Wilson, D. N., & Beckmann, R. (2011). The ribosomal tunnel as a functional environment for nascent polypeptide folding and translational stalling. *Current Opinion in Structural Biology*, 21(2), 274-282. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2011.01.007>
- Yang, A. S., & Honig, B. (1993). On the pH dependence of protein stability. *Journal of Molecular Biology*, 231(2), 459-474. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1993.1294>
- Yauner, L. del P., Ortiz, E., & Becerril, B. (2006). The CDR1 of the human λ VI light chains adopts a new canonical structure. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 62(1), 122-129. <https://doi.org/10.1002/prot.20779>
- Yu, Z., Reid, J. C., & Yang, Y.-P. (2013). Utilizing Dynamic Light Scattering as a Process Analytical Technology for Protein Folding and Aggregation Monitoring in Vaccine Manufacturing. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 102(12), 4284-4290. <https://doi.org/10.1002/jps.23746>
- Zerovnik, E. (2002). Amyloid-fibril formation. Proposed mechanisms and relevance to conformational disease. *European Journal of Biochemistry*, 269(14), 3362-3371. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.03024.x>
- Zhang, C., Huang, X., & Li, J. (2017). Light chain amyloidosis: Where are the light chains from and how they play their pathogenic role? *Blood Reviews*, 31(4), 261-270. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2017.03.002>