



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS

**Efecto de la radiación ultravioleta B (UVB) y de los metales Cobre (II) y Zinc
(II) sobre el mecanismo de agregación de la cristalina beta B2 humana**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

MsC. Vanesa Margarita Ramírez Bello

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Carlos Daniel Amero Tello

CUERNAVACA, MORELOS

Julio, 2022



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS**

**Efecto de la radiación ultravioleta B (UVB) y de los metales Cobre (II) y Zinc (II)
sobre el mecanismo de agregación de la cristalina beta B2 humana**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

MsC. Vanesa Margarita Ramírez Bello

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Carlos Daniel Amero Tello

SINODALES

Dra. Carmen Nina Pastor Colón

Centro de Investigaciones Dinámica Celular -UAEM

Dr. Rodrigo Said Razo Hernández

Centro de Investigaciones Dinámica Celular -UAEM

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa

Centro de Investigación en Biotecnología - UAEM

Dr. Enrique Rudiño Piñera

Instituto de Biotecnología - UNAM

Dr. Alejandro Sosa Peinado

Facultad de Medicina - UNAM

Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís

Centro de Investigación en Biotecnología – UAEM

CUERNAVACA, MORELOS

Julio, 2022

**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 **Efecto de la radiación ultravioleta B (UVB) y de los metales Cobre (II) y Zinc (II) sobre el mecanismo de agregación de la cristalina beta B2 humana**, que presenta la alumna **Vanessa Margarita Ramírez Bello (10021255)** para obtener el título de **Doctor 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. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa CEIB-UAEM	APROBADO	
Dr. Enrique Rudiño Piñera IBT-UNAM	APROBADO	
Dr. Alejandro Sosa Peinado F. Medicina-UNAM	APROBADO	
Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís CEIB-UAEM	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

CARMEN NINA PASTOR COLON | Fecha:2022-05-23 13:43:03 | Firmante
pckA0nY1UELN4ztWnUvDV82H4M7mL8PEX0ED98fPcXBAUvKx2a3PguYOkN4Jy7AK0yGvD5VQ8B4bCZ3dtMood/4BxFkNyTP3HL1kpAT+yMSxlzuaC936YJk/ZzRJJPF9BD67WUosI03ic4eHZFI4++zoLTLQnAakc8/ugwa09j4Bw+lK3fQash1jh78hfF6DZQONkjmSlluDMYDAtyhAPV0e8I7aMfPogQTnO5HCiSP2gWw727cfJv/B17ibU+I3k4e3sEmmr6amKBdrisyuclRzIb+CYgqBaZiP9e4zBeoActpBa9JPSH+QvHut3eD18SIFLbcrDT72Bc6A==

CARLOS DANIEL AMERO TELLO | Fecha:2022-05-23 13:43:35 | Firmante
chHjjjMNYJajkDzhZLkEYgskq4gEc2wW6bPhNf8gV92A2814M84LSouIQEBKMnUWL+S/JhU9sWtoLkpdud44DGEaOt5DSWY6GWOapioJq7+6qWXxgD6KpocMvXiQGNqU8XB3JE75B09xLoDgg1urdr0lxOyFSaPaja7F2dSlw6Nq0outlgk4qVgOvUKatI3ZqGyL5vx5PBwL2W7wXbx+AFHFaVDRkLFqGltDIMYRbbRMyywad8UJXytraRipy51M5tC8YE/0j8mKUVGGNwqZu6ZeJ2JSlwaYCsGBrNRhnNVqptEnzXgKJETDAxA0M2V9byhhrF19UYQrcGNMXXCbA==

ALEJANDRO SOSA PEINADO | Fecha:2022-05-23 13:51:59 | Firmante
IJWMZpS2xnnfIZlkyOOp3jto+dgabxCXWmqg22f3C3rN1V78yPk9GAs4HL0dOMLmuDzy1ghB/UYKq4T5/rNm904Jr5X5X99p7XAw1xOjAGJP0llr1R2EuAtLQSFk9b3WPUK GU3Vre4nkjwU+klh7Ry+LNkF2b7gw1C+M86dqbKyhHaPCrVPkspjQqU1dyL4RWVcEhm8HZxvjV5KzYBR+FrYEkG/sqqNvatntUGMWWP3uEQXqBDHrnxCJLnndcG7jm9Xn6HIHcGXSeTsaqG7PH874cNvurj0Z39/2PV1JT2emfcMJPI4x2uRoUQR5camT36alCSzHTQ==

ALEXIS JOAVANY RODRIGUEZ SOLIS | Fecha:2022-05-23 14:11:00 | Firmante
AWcYsbi4gvQlUpGQCqNEJotmAmDhUgYSSLBm71NFHzIY1gQH0czMj5XQoL2C3w1k7QRiH6zJNiT4C2FqQXQOZeQVNODWrym6EvrEDdyvi7CxpA0xeCz3WllUzfvLQ44KHkL5pgyiyksU5+g1HMkiWKes6jPoILu7ZZ3d3DbetmD3lla49+b5qD4Ay/RBdlVQJKCQG9Bsqfr25EypJN2EXL3kwp8rdKRsz7lgjejvz7E2DUclrPD5m8tqG8n17Y7mx75wvld4FTIbD7a5d9CnPEroPUO2fLcDovNeljVOQGqyRq9pCZ4TliVzP4P1qqwF0GmhGrA1ty6T0w==

RODRIGO SAID RAZO HERNANDEZ | Fecha:2022-05-23 15:16:54 | Firmante
HwgoBNBqfwh5IXp5iNtBa918MRvEegCQr0MVquB0HJ2StUS5ObOz/GQB6f3/O+ps31RP+iv+edlezLFqMe2eOlygStZle/3mtL4EjApiwmlpckkGFJmPXI3fqbNeI8j2EKdUcxFJ/5Pm1o2Nw22YRKR6NjIUQOIAAhRb5xVCEHyyc5C0E5KogHVTL566/M1zS0+I7OyOytltoSw3Y7yyseC1aes9Qd18o6fKXR4b1J5opM3DQ9Ngb1FGzJjQvpeuDHHEWVW7lvAz+yMUclniyt0t14sbC5KGr7bSvkzMZxl/bTktJGyq0NFsswpqCjKjbAb46L3ydhH01Zhg==

ALEXANDRE TOSHIRRICO CARDOSO TAKETA | Fecha:2022-05-23 15:50:44 | Firmante
MkDOqE4PquJELjfeKvOr8JQC6u94y3tdCo9LTA7leU/5l3+jl8tqyOemOSVpNBpmbAY39VBh/EY9zuYwfjir3i4mB33dRjdsbUkkV97IAP1kG93ksixK8HWSKPrMBPCRTJkV4U68wcd09EVI/3Rm9CjMT/kH6LavlKu7gGK6N+Dpz/xllV6/V1Sdg/B8p2qFEJznosRlitGpxw6u4nzFyzIth0TK7idFzESMox+AOMyNjVc62oYD1/qDWMm8K9Qk5ktjLuy4XSUOKOY5W+K/HXDu7NXY125yMYgKe9brl4IWWHa6H7kqebGB44g2eyEBtsBPy+xzFAMyxK3nJSG==

ENRIQUE RUDIÑO PIÑERA | Fecha:2022-05-24 14:42:44 | Firmante
oow/xxW6EVGVPgpAvYxANjtoB51VdX9A+ySzBNiyzETg/B1BP41+hM8kTw8XLajVxbWb8KvbCyBRjPt2fOOYllVUwcv9YPRh9+wwOrTr5HclliU3RSNtXj9/7ITs69PZTbQ7wn+JU82mivD5UdntK2gz7RwP068BBjvxKLApfKOxHPsB/nfvjgim3QFDJW073VfxfoYeD5q8xhOsDr1NfzeI4S29L7p4T0PWSArqfPAWz7wvpjOQsuLJeks0cQXK8yafQ/GJiajNath6/wlkSnaay7gublaAT489M2UDBYHUMagrzUxwO6mGUZCCBeGDtxFpft0CdRwWg==

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



H0Rd1UFbw

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/EVz2tBXOy1BeUyax62XJnzBsWchVCWd2l>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023

RESUMEN

La irradiación ultravioleta tipo B (UVB) y los metales divalentes tales como el Zn(II) y el Cu(II) son factores de riesgo importantes en la formación de cataratas, la cual es la principal causa de ceguera en el mundo. La formación de cataratas se debe principalmente a la agregación de las $\beta\gamma$ -cristalinas.

La familia de las β y las γ cristalinas del lente de los vertebrados se caracterizan por estructuras terciarias conformadas fundamentalmente por hojas β que forman dos dominios, amino y carboxilo, y presentan varios residuos de aminoácidos conservados. Una de las principales diferencias entre las β y γ -cristalinas es su estado oligomérico. Las β -cristalinas son diméricas o multiméricas, mientras que las γ -cristalinas han sido descritas como exclusivamente monoméricas. La cristalina β B2 humana (H β B2) se encuentra en forma de dímero en solución y está presente en concentraciones elevadas en el lente.

Tomando en consideración que la formación de las cataratas es un proceso lento, cinético y acumulativo, en el cual los daños que sufren las proteínas se van acumulando poco a poco, en este trabajo decidimos estudiar el efecto de la dosis mínima de irradiación UVB y metales para desencadenar la agregación y el desplegamiento de la H β B2. Esto tiene el fin de comprender mejor el mecanismo de desplegamiento y agregación de la H β B2 inducida por estos factores de riesgos. Los experimentos se realizaron durante 12 horas empleando diferentes técnicas espectroscópicas, como la turbidimetría, dispersión dinámica de luz y la fluorescencia.

Los resultados obtenidos muestran que tiempos cortos de exposición a la irradiación UVB inducen la agregación de la H β B2. También observamos cambios en el ambiente químico de los triptófanos (Trp), posible oxidación de los Trp y exposición de residuos hidrofóbicos. Asimismo, el Zn(II) y el Cu(II), desestabilizan a la H β B2, afectan su plegamiento e inducen un cambio conformacional, lo que conduce a la formación de agregados de alto peso molecular que dispersan la luz. Interesantemente, observamos que el Zn(II) provoca más cambios en la proteína que el Cu(II). Estos resultados sugieren que la H β B2 tiende a desplegarse parcialmente, exponiendo residuos hidrofóbicos que conducen a la formación de grandes agregados de diferentes tamaños que provocan la turbidez de la solución, y su agregación.

Con la información proporcionada por las técnicas empleadas en este trabajo buscamos proponer modelos de agregación para entender la fisiopatología de las cataratas, así como para intentar buscar tratamientos preventivos a futuro.

ABSTRACT

Ultraviolet type B (UVB) irradiation and divalent metals such as Zn(II) and Cu(II) are important risk factors for cataract formation, which is the leading cause of blindness in the world. Cataract formation is mainly due to the aggregation of $\beta\gamma$ -crystallins.

The crystallin β and γ families of the vertebrate lens are characterized by their tertiary structures made up basically of β sheets that form two domains, amino and carboxyl, and present several conserved amino acid residues. One of the main differences between β - and γ -crystallins is their oligomeric state. β -crystallins are dimeric or multimeric, while γ -crystallins have been described as exclusively monomeric. Crystallin human β B2 (H β B2) is found as a dimer in solution and is present in high concentrations in the lens.

The formation of cataracts is a slow, kinetic and cumulative process, in which the damaging proteins accumulates little by little. In this work we decided to study the effect of UVB irradiation for short periods of time and the minimum dose of metal to trigger the aggregation and unfolding of H β B2. This in order to understand better the unfolding and aggregation mechanism of H β B2 induced by these risk factors. The experiments were carried out for 12 hours using different spectroscopic techniques, such as turbidimetry, dynamic light scattering and fluorescence.

The results obtained show that short times of exposure to UVB irradiation induce the aggregation of H β B2 and that these aggregates differ in size. We also observed changes in the chemical environment of tryptophans (Trps), possible oxidation of Trps, and exposure of hydrophobic residues. We observed that Zn(II) and Cu(II) destabilize H β B2, affecting its folding and inducing a conformational change, which leads to the formation of high molecular weight aggregates that scatter light. Interestingly, we observed that Zn(II) causes more changes in the protein than Cu(II). These results suggest that H β B2 tends to unfold partially, exposing hydrophobic residues that lead to the formation of large aggregates of different sizes that cause solution turbidity and aggregation.

With the information provided by the techniques used in this work, we propose aggregation models to understand the pathophysiology of cataracts, as well as to try to find preventive treatments in the future.

Índice general

Listado de figuras.....	11
Listado de tablas.....	15
Listado de abreviaturas.....	16
Prólogo.....	17
1. INTRODUCCIÓN.....	18
1.1. Estructura y función del lente.....	18
1.2. Familias de cristalinas.....	18
1.2.1. Cristalina β B2 humana.....	21
1.3. Agregación de las cristalinas.....	23
1.5. Factores de riesgo en las cataratas.....	27
1.5.1. Daño por estrés oxidativo y exposición a metales.....	27
1.5.2. Daño por radiación UV en proteínas.....	28
2. JUSTIFICACIÓN.....	32
3.0. HIPÓTESIS.....	33
4.0. OBJETIVOS.....	33
4.1. OBJETIVO GENERAL.....	33
4.2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	33
5. METODOLOGÍA.....	34
5.1. Expresión de H β B2 en <i>E.coli</i>	34
5.2. Purificación de H β B2.....	34
5.2.1. Cromatografía de afinidad a quelatos metálicos.....	34
5.2.2. Corte de la secuencia SUMO.....	35
5.2.3. Cromatografía de afinidad para separar la proteína SUMO y la proteasa de la cristalina H β B2.....	35
5.2.4. Cromatografía de intercambio aniónico.....	35
5.3. Determinación de la concentración de la proteína.....	36
5.4. Determinación de la solubilidad.....	36
5.5. Electroforesis SDS-PAGE.....	36
5.6. Ensayos de la H β B2 irradiada con UVB.....	37
5.7. Cinética de agregación de la cristalina H β B2 por turbidez.....	37
5.8. Cinética de agregación de la cristalina H β B2 por Dispersión Dinámica de Luz (DLS).....	38
5.9. Cinética de desplegamiento de la H β B2 por espectroscopía de fluorescencia.....	38

5.10. Cinética de desplegamiento de la H β B2 por espectroscopía de fluorescencia en presencia del ANS.....	39
5.11. Desplegamiento térmico de la H β B2 por espectroscopía de fluorescencia.....	39
5.12. Desplegamiento térmico de la H β B2 por espectroscopía de fluorescencia en presencia del ANS.....	40
5.13. Desplegamiento químico de la H β B2 en presencia de Urea.....	40
6. RESULTADOS: PARTE I.....	41
"Expresión y purificación de la Cristalina H β B2"	41
6.1. Expresión de H β B2 en <i>E.coli</i>	41
6.2. Purificación de H β B2.....	41
6.2.1. Cromatografía de afinidad a quelatos metálicos.....	41
6.2.2. Corte de la secuencia SUMO.....	42
6.2.3. Cromatografía de afinidad para separar la proteína SUMO y la proteasa.....	44
6.2.4. Cromatografía de intercambio aniónico.....	46
7. RESULTADOS: PARTE II.....	48
"Efecto de la radiación UVB en la agregación de la Cristalina H β B2"	48
7.1. <i>Efecto de la radiación UVB en la formación de agregados de la HβB2 por turbidez</i>	48
7.2. Efecto de la radiación UVB en la formación de agregados de la H β B2 por DLS.....	49
7.3. Efecto de la radiación UVB en el estado de plegamiento de la H β B2 por espectroscopía de fluorescencia.....	50
7.4. Cinética de agregación de la cristalina H β B2 por turbidez.....	51
7.5. Efecto de la radiación UVB en la solubilidad de la H β B2.....	58
7.6. Cinética de agregación de la cristalina H β B2 por Dispersión Dinámica de Luz (DLS).....	58
7.7. Cinética de desplegamiento de la H β B2 por espectroscopía de fluorescencia.....	62
7.8. Ensayos de espectroscopía de fluorescencia para evaluar el efecto de la radiación UVB en la oxidación de los triptófanos de la H β B2.....	65
7.9. Cinética de fluorescencia de productos derivados de la oxidación del triptófano de la H β B2 irradiada 2 hrs y no irradiada.....	67
7.10. Cinética de desplegamiento por fluorescencia de la cristalina H β B2 en presencia del ANS.....	68
7.11. Desplegamiento térmico de la H β B2 por espectroscopía de fluorescencia.....	70
7.12. Desplegamiento térmico de la H β B2 por espectroscopía de fluorescencia en presencia del ANS.....	75
7.13. Desplegamiento térmico de la H β B2 por DLS.....	75
7.14. Desplegamiento químico de la cristalina H β B2 nativa inducido por Urea.....	78

8.0 RESULTADOS: PARTE III.....	80
"Efecto de los metales Zn(II) y Cu(II) en la agregación de la cristalina H β B2".....	80
8.1. Cinética de agregación de la cristalina H β B2 por turbidez en presencia de Zn(II) y Cu(II).....	80
8.2. Cinética de agregación de la cristalina H β B2 por Dispersión Dinámica de Luz (DLS).....	84
8.3. Cinética de desplegamiento de la H β B2 por espectroscopía de fluorescencia.....	86
8.4. Cinética de exposición al solvente de los residuos hidrofóbicos de la H β B2 por espectroscopía de fluorescencia en presencia de ANS y de los iones de Cu(II) y Zn(II).....	89
8.5. Desplegamiento térmico de la H β B2 por espectroscopía de fluorescencia en presencia de Cu(II) y Zn(II).....	91
8.6. Desplegamiento térmico de la H β B2 por espectroscopía de fluorescencia en presencia del ANS y los metales Zn(II) y Cu(II).....	92
9. DISCUSIÓN.....	94
9.1. Radiación.....	94
9.2. Metales.....	97
10. CONCLUSIONES.....	101
11. RECOMENDACIONES.....	102
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103

Listado de figuras

Figura 1: Esquema que representa las principales partes del ojo humano.	18
Figura 2: Alineamiento de secuencia de las cristalinas β/γ	20
Figura 3: Estructura tridimensional del monómero con el N-terminal y el C-terminal de la H β B2 (1BD7).	21
Figura 4: Estructura tridimensional del dímero de la H β B2.....	23
Figura 5: Se representa el esquema de la separación del dímero y del desplegamiento térmico de la β B2 por temperatura.	23
Figura 6: Estructura tridimensional del dímero de la β B2.	25
Figura 7: Esquema de la ruta de formación de los derivados del triptófano por la vía de la quinurenina.	31
Figura 8: Gel de electroforesis SDS-PAGE al 14 % de la expresión de la H β B2.	41
Figura 9: Purificación de la H β B2 por cromatografía de afinidad a quelatos metálicos en una columna HisTrap™ Sepharose®-Niquel.....	42
Figura 10: Gel de electroforesis SDS-PAGE al 14 % de la cromatografía de afinidad a quelatos metálicos de la H β B2.	44
Figura 11: Gel de electroforesis SDS-PAGE al 14 %: corte de la secuencia SUMO.	44
Figura 12: Purificación de la H β B2 por cromatografía de afinidad a quelatos metálicos en una columna HisTrap™ Sepharose®-Niquel.	45
Figura 13: Gel de electroforesis SDS-PAGE al 14 % de la cromatografía de afinidad a quelatos metálicos de la H β B2 después de cortar la secuencia SUMO.....	46

Figura 14: Purificación de la H β B2 por cromatografía de intercambio aniónico en matriz Q-Sepharose.	46
Figura 15: Gel de electroforesis SDS-PAGE al 14 %	47
Figura 16: Ensayo de densidad óptica para evaluar la formación de agregados por efecto de la radiación UVB.	49
Figura 17: Ensayo de DLS para evaluar la formación de agregados por efecto de la radiación UVB...50	
Figura 18: Espectroscopía de fluorescencia para evaluar el desplegamiento de la H β B2 por efecto de la radiación UVB.	51
Figura 19: Cinética de la agregación por turbidez de la H β B2 irradiada 2 hrs y H β B2 no irradiada. ...52	
Figure 20: Solubilidad de la H β B2 irradiada 2 hrs y no irradiada.	54
Figura 21: Cinética de agregación por DLS de la H β B2 no irradiada (A), 2 hrs irradiada (B) y 3 hrs irradiada (C).	55
Figura 22: Radio hidrodinámico (Rh) de la H β B2 no irradiada.	56
Figura 23: Cinética del radio hidrodinámico (Rh) de la H β B2 irradiada 2 hrs.	56
Figura 24: Espectro de fluorescencia de la H β B2 no irradiada a 37 °C durante 12 horas.	59
Figura 25: Espectros de fluorescencia de la H β B2 2 hrs irradiada a 37 °C durante 12 horas.	60
Figura 26: Espectro de fluorescencia de la H β B2 3 hrs. irradiada a 37 °C durante 12 horas.	60
Figura 27: Relación de la I.F. (350/332 nm) con respecto al tiempo de la H β B2 irradiada 2 hrs y no irradiada a 37 °C durante 12 hrs.	61
Figura 28: Relación de la I.F. (350/332 nm) con respecto al tiempo de la H β B2 irradiada 3 hrs y no irradiada a 37 °C durante 12 hrs.	61
Figura 29: Espectros de fluorescencia de productos derivados de la oxidación del triptófano de la H β B2 irradiada 2 y 3 hrs y no irradiada a 37 °C. A: OH-kinurenina (OH-K). B: N-acetil-triptófano-amida (NATA).....	62

Figura 30: Cinética durante 12 hrs de fluorescencia de los productos derivados de la oxidación del triptófano de la H β B2 irradiada 2 hrs y no irradiada a 37 °C.	64
Figura 31: Espectro de fluorescencia extrínseca de la H β B2 usando ANS a 37 °C.	65
Figura 32: Cinética de fluorescencia extrínseca a 480 nm de la H β B2 usando ANS a 37 °C.	65
Figura 33: Desplegamiento térmico de la H β B2 por espectroscopía de fluorescencia.	66
Figura 34: Desplegamiento térmico de la H β B2 por espectroscopía de fluorescencia.	67
Figura 35: Desplegamiento térmico de la H β B2 irradiada 2 hrs y no irradiada por espectroscopía de fluorescencia en presencia de ANS.	68
Figura 36: Desplegamiento térmico por DLS de la H β B2.	69
Figura 37: Desplegamiento químico de la H β B2 inducido por urea (0 – 4.5 M).	71
Figura 38: Desplegamiento químico de la H β B2 inducido por urea (0 – 3.5 M) en presencia de ANS.	71
Figura 39: Cinética de la agregación por turbidez de la H β B2 expuesta al Zn(II) (A) y al Cu(II) (B) con diferentes equi (0.5, 1, 1.5 y 2).	73
Figura 40: Cinética de la agregación por turbidez de la H β B2 expuesta al Zinc.	74
Figura 41: Cinética de la agregación por turbidez de la H β B2 expuesta al Cu(II).	75
Figura 42: Cinética de la agregación por turbidez de la H β B2 expuesta al Zn(II) (A) y al Cu. (B).....	76
Figura 43: Cinética de agregación por DLS de la H β B2 expuesta al Zn(II), 1.5 equi. a 37 °C.	77
Figura 44: Cinética de agregación por DLS de la H β B2 expuesta al Cu(II), 1.5 equi. a 37 °C.....	77
Figura 45: Espectro de fluorescencia de la H β B2 en ausencia de metales a 37 °C durante 12 horas. . .	79
Figura 46: Espectro de fluorescencia de la H β B2 expuesta a 1.5 equi. de Zn(II) a 37 °C durante 12 horas.	79
Figura 47: Espectro de fluorescencia de la H β B2 expuesta a 1.5 equi. de Cu(II) a 37 °C durante 12 horas.	80

Figura 48: Relación de la I.F. (350/332 nm) con respecto al tiempo de la H β B2 en ausencia y en presencia de metales.	81
Figura 49: Efecto del Zn(II) y el Cu(II) en la exposición al disolvente de residuos hidrofóbicos de la H β B2.	82
Figura 50: Espectros de fluorescencia después de 3 horas de la cinética de la H β B2 con ANS.....	83
Figura 51: Desplegamiento térmico de la H β B2 por espectroscopía de fluorescencia.	84
Figura 52: Desplegamiento térmico de la H β B2 por espectroscopía de fluorescencia en presencia de ANS	85

Listado de tablas

Tabla 1: Resumen de algunas características de las diferentes cristalinas.	26
Tabla 2: Radio hidrodinámico de diferentes especies obtenidas por análisis de DLS en diferentes tiempos.	58
Tabla 3: Valores de Tm obtenidos para la HβB2 irradiada 2 hrs, 3 hrs y no irradiada.....	67
Tabla 4: Valores del Rh y de la intensidad de la señal de los agregados de la HβB2 no irradiada y 2 hrs irradiada a diferentes temperaturas del desplegamiento térmico por DLS.	70
Tabla 5: Solubilidad de la HβB2 y porcentaje de proteína recuperada con 30 equi. de EDTA después de las cinéticas con 0.5, 1, 1.5 y 2 equi. de Zn(II) y Cu(II).	73
Tabla 6: Mediciones del Rh de la HβB2 a 37 °C a diferentes tiempos.	78
Tabla 7: Valores de Tm obtenidos para la HβB2 en ausencia de metales y expuesta a Zn(II) y Cu(II).	84

Listado de abreviaturas

ANS	1-anilino-naftaleno-8-sulfonato
Cu (II)	Cobre
SAXS	Dispersión de rayos X de ángulo reducido
DLS	Dispersión dinámica de luz
D.O.	Densidad de óptica
EDTA	ácido etileno diamino tetraacético
equi.	Equivalentes
HβB2	Cristalina beta B2 humana
hrs	horas
HSP	Heat shock proteins
I.F.	Intensidad de fluorescencia
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
Kyn	quinurenina
NFK	N-formil-quinurenina
min.	minutos
OH-Kyn	hidroxi-quinurenina
OH-Trp	hidroxi-triptófano
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
SDS-PAGE	gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
Trp	Triptófano
UVA	Radiación ultravioleta tipo A
UVB	Radiación ultravioleta tipo B
UVC	Radiación ultravioleta tipo C
Zn (II)	Zinc

Prólogo.

Durante el periodo de mis estudios de doctorado he tenido la oportunidad de participar en otros proyectos de investigación que se listan a continuación.

1. Búsqueda de inhibidores en la agregación de la H β B2 y de la HyS irradiada (UVB). Proyecto del Dr. Carlos Amero Tello, Participantes: Lic. Kimberly Castañeda.
2. Búsqueda de inhibidores en la agregación de la H β B2 por Docking. Proyecto del Dr. Carlos Amero Tello.
3. Caracterización del efecto de iones metálicos y radiación UV en el desplegamiento y agregación de la β A4 cristalina humana. Proyecto del Dr. Carlos Amero Tello, Participantes: Lic. Javier Alejandro Martínez.
4. Caracterización del efecto de iones metálicos en el desplegamiento y agregación de γ S cristalina humana. Proyecto del Dr. Carlos Amero Tello, Participantes: M.sc. Reinier Cardenas.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Estructura y función del lente

El lente ocular es responsable de enfocar la luz en la retina y su transparencia es vital para la visión. Está recubierto con una sola capa de células epiteliales, superpuesta a la corteza y el núcleo del lente, ambos compuestos de células fibrilares (figura 1). Estas células son extremadamente largas, y para reducir la dispersión de la luz durante el desarrollo embrionario ocurren cambios intracelulares, incluyendo una alta expresión de proteínas solubles seguida de una degradación sincronizada de los organelos intracelulares (Bassnett., 2002, Cvekl y col., 2015). Debido a esto las células fibrilares carecen de la maquinaria de síntesis y de degradación de proteínas necesaria para eliminar y reemplazar las proteínas dañadas. En consecuencia, el lente contiene células y proteínas que deben mantener su estructura, organización molecular y estabilidad contra el estrés intracelular y ambiental durante toda la vida (Moreau y King., 2012).

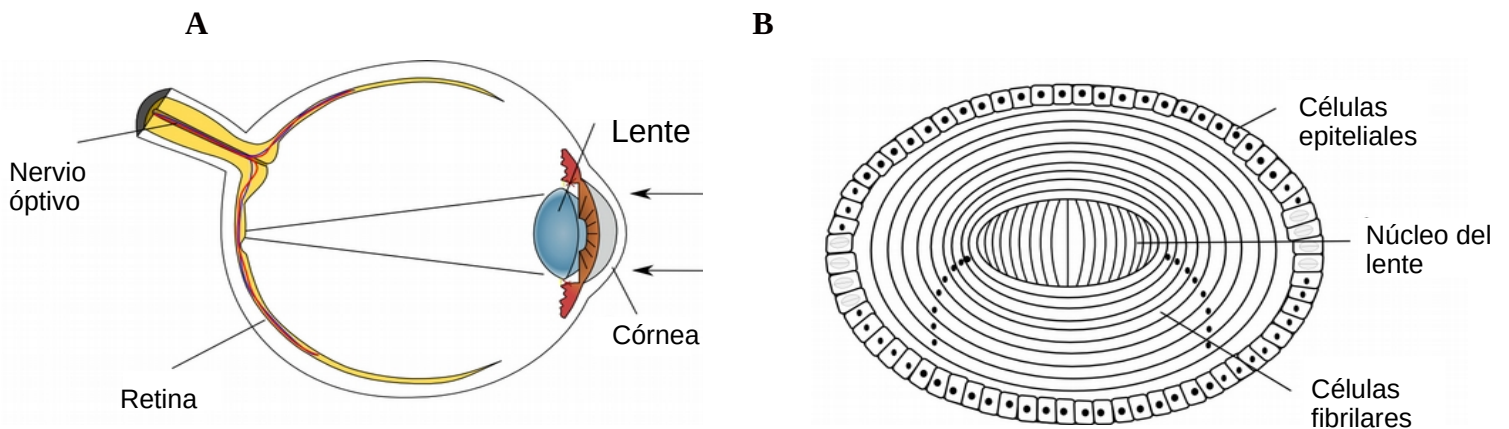


Figura 1: **A:** Esquema que representa las principales partes del ojo humano. **B:** Se muestra la sección transversal del lente humano en el cual se destaca la capa de las células epiteliales y las células fibrilares. (Imagen modificada de Rivillas-Acevedo y col., 2015).

1.2. Familias de cristalinas

Las cristalinas son las principales proteínas presentes en el lente (Andley, 2007) y se agrupan en dos familias: las α cristalinas y las β/γ cristalinas (Bloemendal y col., 2004). Las proteínas en el lente tienen concentraciones de 200 - 450 mg/ml, de las cuales aproximadamente un 35 % corresponde a las cristalinas α , un 40-45 % a las cristalinas β y \sim 25 % a las cristalinas γ (Bobrow., 2011; Keenan y col.,

2008). Las cristalinas α están formadas mayormente por hojas β (Sun y col, 1998) y tienden a formar complejos de elevado peso molecular, debido a asociaciones no covalentes de las dos subunidades homólogas, A y B (Graw, 2009). Forman parte de la familia de las proteínas de choque térmico (*Hsp* por sus siglas en inglés), las cuales funcionan como chaperonas moleculares para proteger a las proteínas citoplásmicas del desplegamiento y de la agregación en las células fibrilares del lente (Shiels y Hejtmancik., 2013). Las *Hsp* son chaperonas independientes de ATP que se unen a las proteínas dañadas o parcialmente desplegadas, secuestrándolas para evitar la agregación de estas (Bagneris y col., 2009).

Las β y las γ cristalinas son miembros de la superfamilia de las β/γ cristalinas y como ya se mencionó representan aproximadamente el 40, y el 25 % respectivamente de todas las proteínas del lente (Lampi y col., 1997). Sus estructuras terciarias están conformadas fundamentalmente por hojas β que forman dos dominios, amino y carboxilo, y presentan varios residuos de aminoácidos conservados (figura 2). Cada uno de estos dominios, están formados a su vez, por dos motivos con plegamiento del tipo llave griega (Fu y Liang, 2002; Bateman y col, 2003). Una de las principales diferencias entre las β y γ -cristalinas es su estado oligomérico. Las β -cristalinas son multiméricas y pueden contener de 2-8 subunidades, mientras que las γ -cristalinas han sido descritas como exclusivamente monoméricas (Moreau y King 2012). Tanto las β y las γ cristalinas son proteínas estructurales que predominan en el citosol de las células fibrilares del lente (Goulet y col, 2009).

Las cristalinas γ están codificadas en siete genes diferentes γ A, γ B, γ C, γ D, γ E, γ F, y γ S, los cuales codifican para proteínas de aproximadamente 20 kDa (Andley, 2007). Las cristalinas β se pueden clasificar en dos grupos, las cristalinas básicas (β B1, β B2 y β B3), que además presentan extensiones N-terminales y C-terminales y las cristalinas ácidas (β A1, β A2, β A3 y β A4), que poseen únicamente extensiones de N-terminal. Cada monómero es de aproximadamente 20–30 kDa (Bloemendal y col., 2004). Estas cristalinas se encuentran mayoritariamente como dímeros estables en soluciones diluidas (Xi y col., 2017), pero pueden formar oligómeros entre ellas (Xu y col., 2012). En comparación con las cristalinas γ , todas las cristalinas β tienen una extensión N-terminal adicional con una longitud de 12 a 57 residuos de aminoácidos (Bloemendal y col., 2004).

```

βB1_ MSQAAKASASATVAVNPGPDTKGGKAPPAGTSPSPGTTLAPTTVPITSAKAAELPPGNYR 60
βB2_ -----MASDH-----QTQAGK---PQSLNPK 18
βB3_ -----MAEQHGAP-----EQAAAGKSHGDLGGSYK 25
βA1_ -----METQAEQQEL-----ETLPT-TKMAQTNPPTGSLGPWK 32
βA2_ -----MSSAPAPGPAPAS 13
βA4_ -----MTLQCTKSAGPWK 13
γC_ -----MGK 3
γD_ -----MGK 3
γS_ -----MSKTGTK 7

βB1_ LVVFELENFQGRRAEFSGECNSLADR-GFDRVRSIIVSAGPWVAFEQSNFRGEMFILLEKG 119
βB2_ IIIIFELENFQGHSHELNGPCPNLKET-GVEKAGSVLVQAGPWVGYEQANCKGEQFVFEKG 77
βB3_ VILYELLENFQGRCELSAECPSLTDS-LLEKVGSIQVESGPWLAFESRAFRRGEQFVLEKG 84
βA1_ ITIYDQENFQGRMEFTSSCPNVSER-SFDNVRSCLKVESGAWIGYEHSTFCGQQFILERG 91
βA2_ LTLWDEEDFQGRRCRLSDCANVCERGG LPRVRSVKVENGVWVAFEPDFQGGQFILLEKG 73
βA4_ MVVWDEEDFQGRRHEFTAECPSVLEL-GFETVRSCLKVLSGAWVGFHAGFQGGQYILERG 72
γC_ ITFYEDRAFQGRSYETTTDCPNLQPY--FSRCNSIRVESGCWMLYERPNYQGGQYLLRRG 61
γD_ ITLYEDRGFQGRHYECSSDHPNLQPY--LSRCNSARVDSGCWMLYEQPNYSGLQYFLRRG 61
γS_ ITFYEDKNFQGRRYDCDCADLFHTY--LSRCNSIKVEGGT WAVYERPINFAGYMYILPQG 65
: .: : * * * : . . . * * * * * : * * : : : *

βB1_ EYPRWNTWSS--SYRSDRLMSFRPIKMD-AQEHKISLFEKANFKGNTIEIQGDDAPSLWV 176
βB2_ EYPRWDSWTS--SRRTDLSLSLRPIKVD-SQEHKIILYENPNFTGKKMEIIDDDVPSFHA 134
βB3_ DYPRWDASN--SRDSDLLSLRPLNID-SPHKLHLFENPAFSGRKMIVDDDDVPSLWA 141
βA1_ EYPRWDASGSGSNAYHIERLMSFRPICSANHKESKMTIFEKENFIQRQWEISD-DYPSLQA 150
βA2_ DYPRWSAWSGSSSHNSNQLLSFRPVLCANHNDSRVTLFEGDNFQGCCKFDLVD-DYPSLPS 132
βA4_ EYPSWDAWGGNTAYPAERLTSFRPAACANHRDSRLTIFEQENFLGKKGLSD-DYPSLQA 131
γC_ EYPDYQQWVG----LSDSIRSCCL--IPQTVSHRLRLYEREDHKGLMMEELSE-DCPSIQD 114
γD_ DYADHQQWVG----LSDSVRSCL--IPHSGSHRIRLYEREDYRGMIEFTE-DCSCLQD 114
γS_ EYPEYQRWVG----LNDRLSSCRAVHLPSSGGYKIQIFEKGD FSGQMYETTE-DCPSIME 120
: * . * . : : * : : : * . * : * * : :

βB1_ YGF-SDRVGSVKVSSGTWVG YQYPGYRGYQYLLEP---GDFRHWNEWGAF--QPQMQL 229
βB2_ HGY-QEKVSSVRVQSGTWVG YQYPGYRGLQYLLEK---GDYKDSDFGAP--HPQVQSV 187
βB3_ HGF-QDRVASVRAINGTWVG YEFPGYRGRQYVFER---GEYRHWNEWDAS--QPQLQSV 194
βA1_ MGWFNNEVGS MKIQSGAWVCYQYPGYRGYQYILECDHGGDYKHWREWGSHAQTSIQSI 210
βA2_ MGWASKDVGSLKVSSGAWVAYQYPGYRGYQYVLERDRHSGEFCY GELGTQAHTGQLQSI 192
βA4_ MGWEGNEVGSFHVHSGAWVCSQFPGYRGFQYVLECDHHS GDYKHFREWGSHAPTFVQVSI 191
γC_ R-FHLSEIRSLHVLEGCWVLYELPNYRGRQYLLRP---QEYRRCQDWGAM--DAKAGSL 167
γD_ R-FRFNEIHS LNVLGEGSWVLYELSNYRGRQYLLMP---GDYRRYQDWGAT--NARVGS 167
γS_ Q-FHMREIHSCKVLEGVWIFYELPNYRGRQYLLDK---KEYRKPIDWGAA--SPAVQSF 173
: : * . * * : : . * * * * : : : : *

βB1_ RRLRDKQWHLEGSFPVLATEPPK 252
βB2_ RRIRDMQWHQRGAFHPSN----- 205
βB3_ RRIRDQKWHKRGRFPSS----- 211
βA1_ RRIQQ----- 215
βA2_ RRVQH----- 197
βA4_ RRIQQ----- 196
γC_ RRVVDLY----- 174
γD_ RRVIDFS----- 174
γS_ RRIVE----- 178
* * : .

```

Figura 2: Alineamiento de secuencia de las cristalinas β/γ. Se usaron las siguientes secuencias: βB1-crystallin (P53674), βB2-crystallin (P43320), βB3-crystallin (P26998), βA3/A1-crystallin (P05813), βA2-crystallin (P53672), βA4-crystallin (P53673), γC-crystallin (P07315), γD-crystallin (P07320), γS-crystallin (P22914). En colores se representan los aminoácidos que están conservados en las cristalinas β/γ.

1.2.1. Cristalina β B2 humana

La cristalina H β B2 es la proteína más abundante del lente humano, constituye del 14–20 % del total de proteínas del lente y es la principal β cristalina encontrada en los agregados de lentes con cataratas, con aproximadamente el 40 % (Robinson y col., 2006). Los 204 residuos que componen esta proteína se pliegan, como ya se mencionó, en dos dominios: un extremo amino y uno carboxilo con estructura hoja β plegada en cuatro motivos tipo llave griega muy similares (figura 3-A). La H β B2 contiene 5 triptófanos en su estructura en la posición 59, 81, 84, 151, y 194 (figura 3-B) (Bloemendal y col., 2004), los cuales son una herramienta importante para los estudios por espectroscopia de fluorescencia.

La H β B2 se encuentra como homodímero en solución, con un peso molecular de 22.3 kDa y cada protómero de la H β B2 incluye 16 hojas β , ocho en el dominio N-terminal y ocho en el dominio C-terminal (Fu y Liang., 2002).

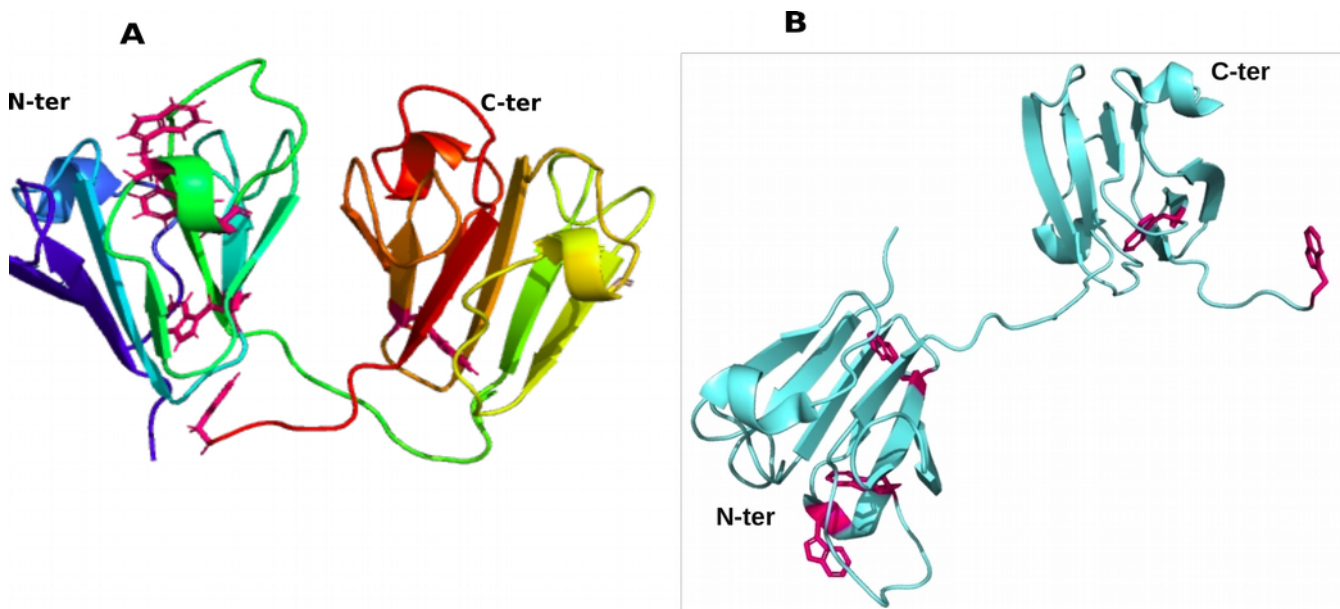


Figura 3: **A:** Estructura tridimensional del monómero con el N-terminal y el C-terminal de la H β B2 (1BD7). **B:** Estructura tridimensional del monómero de la H β B2 (1YTQ). En magenta se representan los 5 residuos de triptófanos.

La disposición de los dominios del dímero de la H β B2 se ha estudiado por cristalografía de rayos X, Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y Dispersión de rayos X de ángulo reducido (SAXS), donde se mostró que los dos dominios pueden utilizar diferentes arquitecturas de organización: intercambio de

dominios o cara a cara. Las estructuras obtenidas por cristalografía de rayos X de la H β B2 indican que se encuentra formando un dímero que se forma a través de interacciones intermoleculares entre el dominio N-terminal de un monómero y el C-terminal del otro “*domain-swapping*” (figura 4-A) (Ajaz y col, 1997, Slingsby y Wistow, 2014). Estudios más recientes en solución de RMN combinados con SAXS revelaron que la H β B2 forma un dímero “cara a cara” (figura 4-B) (Xi y col., 2017). La medición de la estabilidad del dímero de la H β B2 usando métodos computacionales reveló que la configuración óptima de la proteína era “cara a cara” y no la configuración de “domain swapping” (Velasco-Bolom y Domínguez., 2020).

En la H β B2 los dos dominios muestran una similitud en secuencia y estructura; sin embargo, difieren ampliamente en su estabilidad. Wieligmann y colaboradores realizaron el desplegamiento de la cristalina β B2 de rata, empleando diferentes concentraciones de urea y mostraron que el dominio C-terminal monomérico aislado es más estable que la estructura completa de la cristalina β B2. Con esto propusieron un modelo de tres estados para el desplegamiento de la cristalina β B2: N2 \leftrightarrow 2I \leftrightarrow 2U, donde (N) es la proteína nativa, (U) la proteína desplegada e (I) un intermediario (monómero) dependiente de la concentración (Wieligmann y col., 1999). Más adelante Evans y colaboradores realizaron el desplegamiento por temperatura (con una rampa de 20 - 80°C) y confirmaron que, en este modelo, los dos intermediarios (2I) monoméricos tenían el N-terminal desplegado y el C-terminal plegado, y en el tercer estado (2U) los dos dominios estaban completamente desplegados (figura 5) (Evans y col., 2008).

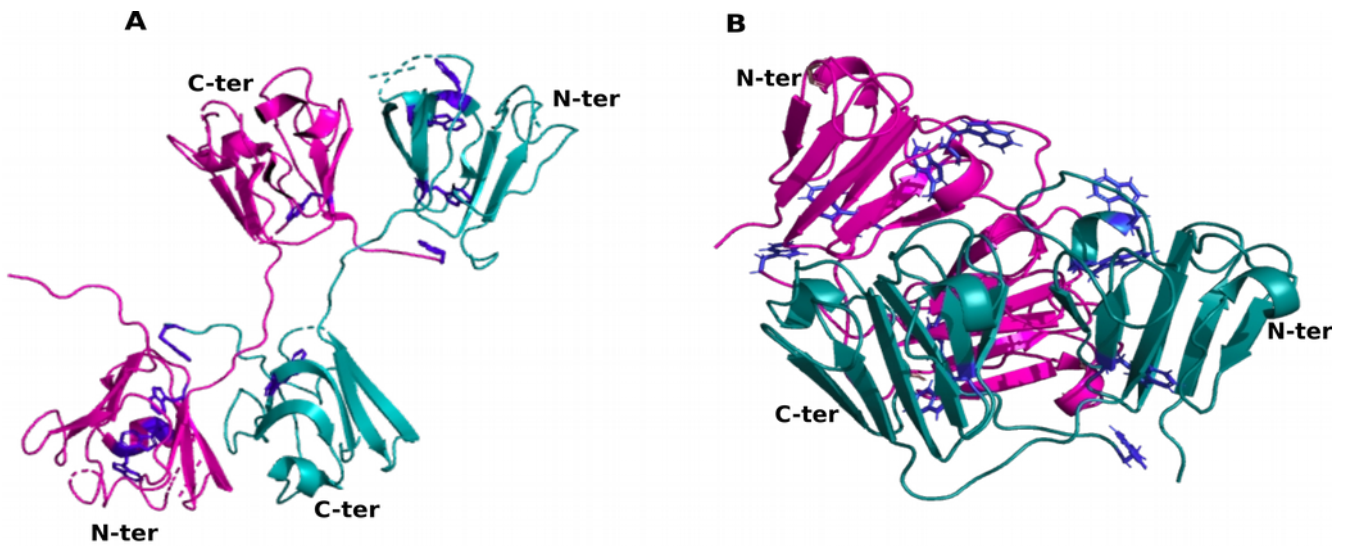


Figura 4: A: Estructura tridimensional del dímero de la HβB2 en forma de "domain-swapping" PDB (1blb). B: Estructura tridimensional del dímero de la HβB2 en forma de "cara a cara" PDB (1bd7).

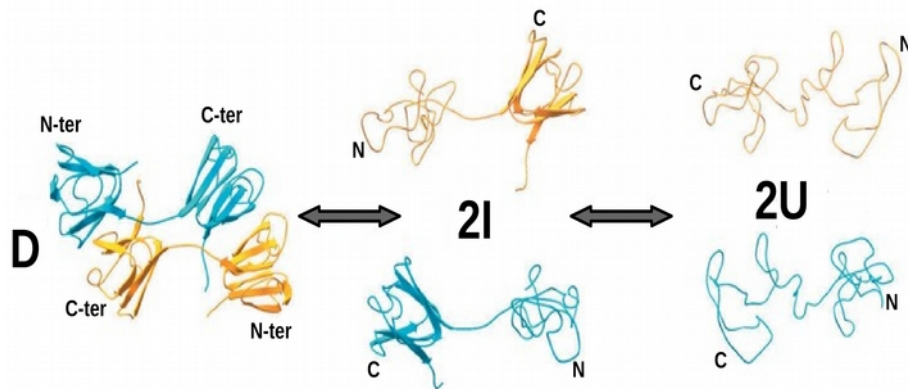


Figura 5: Se representa el esquema de la separación del dímero y del desplegamiento térmico de la βB2 por temperatura. D= dímero, I= Intermediario parcialmente desplegado, U= monómero desplegado. Se muestra el modelo de tres estados: Los dos intermediarios (2I) monoméricos con el N-terminal desplegado y el C-terminal plegado y en el tercer estado (2U) los dos dominios estaban completamente desplegados. Tomado y modificado de [Evans y col., 2008](#).

1.3. Agregación de las cristalinas.

A medida que los lentes envejecen, las cristalinas acumulan distintos daños debido a factores externos como pueden ser la radiación UV y el estrés oxidativo ([Rivillas-Acevedo y col, 2015](#)). Los metales también son un factor que puede desencadenar la agregación de las cristalinas y en consecuencia la

aparición de cataratas (Quintanar y col, 2015). Esta agregación de proteínas puede darse por asociación física entre moléculas sin que existan cambios en la estructura primaria o por formación de interacciones covalentes. Se ha planteado que la presencia de zonas hidrofóbicas cercanas en los intermediarios son las responsables del inicio en el proceso de agregación (Wang, 2005).

Por análisis proteómico se han identificado varias modificaciones covalentes que están asociadas con el daño del lente, incluidas la desamidación, la oxidación y el truncamiento (Hains y Truscott., 2007; Hains y Truscott., 2008; Lampi y col., 2006; Ma, y col.,1998; Zhang y col., 2003). La desamidación es uno de los daños más prevalentes en las cristalinas (Wilmarth y col., 2006); con la pérdida del amino de la cadena lateral de la glutamina, se obtiene glutamato con lo que se introduce una carga negativa en la proteína. La asparagina también es susceptible a la desamidación, y en conjunto con la glutamina se ha encontrado desaminada en los agregados de proteínas que están en los lentes con cataratas (Hains y Truscott., 2010). Varios investigadores han encontrado que la desamidación redujo la estabilidad de las cristalinas β B1, β A3, y β B2 y aumentó la agregación en comparación con las proteínas nativas (Kim y col., 2002; Lampi y col., 2006; Takata y col., 2008). Takata y colaboradores aislaron la H β B2 de lentes envejecidos con cataratas y encontraron la isomerización de los residuos de Asp4, Asp83, Asp92 y Asp192 (Takata y col., 2018). Esto puede indicar que la isomerización de estos residuos de Asp afecta la estructura, función y contribuye a la agregación de estas proteínas, y finalmente conducir a las cataratas (Fujii y col., 2012). En la figura 6 se representa la estructura de la cristalina β B2 y en ella se muestran la Gln70 y la Gln162, las cuales participan en las interacciones para formar el homodímero (PBD: 1YTQ), (Lampi y col., 2014).

La acumulación permanente de modificaciones y/o daños covalentes desestabilizan y pueden promover el desplegamiento parcial de las proteínas, lo que lleva a intermediarios que exponen residuos hidrofóbicos previamente escondidos en el “core” de la proteína; esto puede contribuir a la agregación de las mismas y finalmente conducir a las cataratas (Moreau y King., 2012).

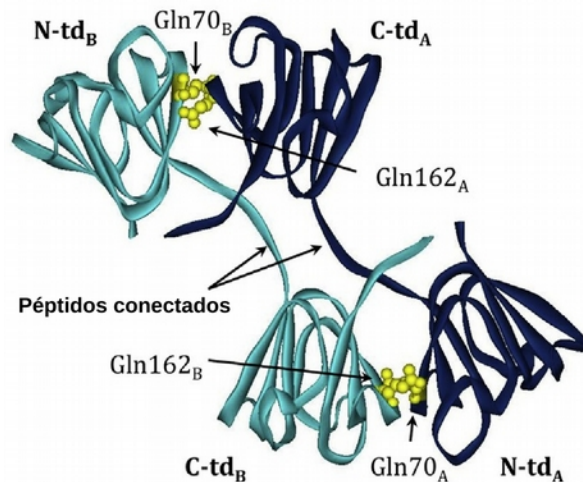


Figura 6: Estructura tridimensional del dímero de la βB2. Se muestran la Gln70 y la Gln162, las cuales participan en las interacciones para formar el homodímero (PBD: 1YTQ), tomada de Lampi y col., 2014.

1.4. Las cataratas

La transparencia y refractividad del lente humano depende de la solubilidad, estabilidad y organización de las tres familias de las cristalinas. Cualquier alteración en la estructura de estas proteínas, inducida por factores ambientales o internos del lente, puede provocar el desplegamiento parcial de estas proteínas, causado por daños covalentes acumulados, que conlleva a la formación de grandes agregados. Estos agregados forman las denominadas cataratas, y como consecuencia se bloquea la transmisión de la luz visible a la retina, resultando en cambios en el índice de refracción, dispersión de la luz y problemas de visión que ocasionarán eventualmente la ceguera. La caracterización de los lentes extraídos con cataratas revelan la presencia de múltiples tipos de cristalinas (tabla 1) en el lente (Moreau y King., 2012; Serebryany y King, 2014).

Se han descrito distintos tipos de cataratas, y estas incluyen las asociadas a la edad o a defectos genéticos. Las catarata relacionada a la edad pueden deberse a la acumulación de diferentes daños en las cristalinas durante toda la vida y normalmente ocurren en personas mayores de 50 años. Entre estos daños se pueden destacar, la oxidación, la desamidación, la glicosilación, racemización y truncamiento

Proteína	Peso molecular (Da)	Residuos	Gen	Distribución en el lente	Referencia
α A	19909	173	CRYAA	En todo el lente	Horwitz 2003
α B	20159	175	CRYAB	Células fibrilares	Horwitz 2003
β A1	23191	198	CRYBA1	En todo el lente	Ma y col. 2016
β A2	21964	196	CRYBA2	En todo el lente	Lampi et al. 1997
β A3	25150	215	CRYBA1	En todo el lente	Dolinska y col. 2009
β A4	22243	195	CRYBA4	En todo el lente	Zhou y col. 2010
β B1	27892	251	CRYBB1	En todo el lente	Van Montfort y col. 2003
β B2	23249	204	CRYBB2	En todo el lente	Xi y col. 2017
β B3	24230	211	CRYBB3	En todo el lente	Diemer y col. 2009
γ C	20747	173	CRYGC	Células fibrilares	Wang y col. 2010
γ D	20607	173	CRYGD	Células fibrilares	Wang y col. 2010
γ S	20875	177	CRYGS	Células fibrilares	Sun y col. 2005

Tabla 1: Resumen de algunas características de las diferentes cristalinas. Modificado de Moreau y col., 2012. la información d la localización de las cristalinas en el lente se tomó del "The human protein atlas": <https://www.proteinatlas.org/humanproteome/tissue/eye>.

(Moreau y King, 2012). Por su parte, las cataratas congénitas o de inicio temprano se han asociado a mutaciones en los genes de las cristalinas; principalmente están presentes en los genes de las cristalinas β y γ (Hejtmancik., 2008, Graw., 2009). Por ejemplo, las mutaciones I21N en la H β B2 (Wang y col., 2011) y G129C en la γ C encontradas en pacientes con catarata congénita (Xi y col., 2015) desestabilizan la estructura de estas cristalinas y promueven la agregación (Zhang y col., 2019).

Asimismo, se han identificado varios sitios de oxidación en las cristalinas aisladas de lentes con cataratas, específicamente en los residuos de metionina, cisteína y triptófano. Hasta el 50% de los residuos de metionina se oxidan en las proteínas de lentes con cataratas en etapa avanzada. Esto sugiere que la oxidación de la metionina puede promover la agregación y así, con el tiempo provocar la formación de cataratas. En parte, este daño covalente desestabiliza el estado nativo de las proteínas del lente, lo que lleva a la agregación (Truscott., 2005). También en las cristalinas β y γ se encontraron residuos de triptófano y de cisteína oxidados en lentes con cataratas (Hains y Truscott., 2007. Hains y Truscott., 2008). En el caso de las cristalinas γ , los cuatro triptófanos conservados están en el núcleo de

la proteína y estos se pueden oxidar a kinurenina (figura 7-A), la cual podría desestabilizar significativamente el estado nativo de la proteína (Hains y Truscott., 2007).

Se ha sugerido que, con el aumento de la edad, las α -cristalinas se van perdiendo de la fracción soluble de las proteínas del lente (Heys y col., 2007). Sin las α -cristalinas activas, las demás proteínas dañadas ya no pueden ser protegidas. Además, algunas modificaciones y mutaciones podrían alterar o reducir el reconocimiento de las cristalinas β y γ , por las α -cristalinas (Moreau y King., 2012). Las α -cristalinas también pueden sufrir daños estructurales durante la vida, por ejemplo, en las α A-cristalinas se han identificado isómeros-D en los residuos de aspartato: Asp-58, Asp-76 y Asp-84 en lentes con cataratas de personas ancianas.

1.5. Factores de riesgo en las cataratas

1.5.1. Daño por estrés oxidativo y exposición a metales.

El oxígeno, al igual que otras especies reactivas de oxígeno, pueden reaccionar y causar daño oxidativo a muchos blancos biológicos, incluidos al triptófano, tirosina, histidina y cisteína (Davies y Truscott., 2001). El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) induce cambios estructurales en las cristalinas γ C y γ D y la oxidación por H_2O_2 facilita la oligomerización de proteínas y la agregación térmica de estas cristalinas (Zhao y Bin Yan., 2018). Esto sugiere que el daño oxidativo podría jugar un papel importante en el inicio y/o la progresión de las cataratas. Por otro lado, altos niveles de glutatión protegen de la oxidación a las proteínas del lente, y se cree que la disminución significativa de esta molécula reductora con la edad contribuye al desarrollo y la progresión de las cataratas (Truscott, 2005).

Los iones metálicos son necesarios para la actividad biológica (González-Iglesias y col., 2017), sin embargo, se ha observado que las concentraciones de Cu(II) y Zn(II) en el lente aumentan significativamente durante la enfermedad de cataratas. Los lentes con cataratas tienen aproximadamente dos veces más zinc y diez veces más cobre que los lentes normales (Srivastava, y col., 1992). El lente sano contiene cobre, zinc y hierro en concentraciones que oscilan entre 0.4 y 30 μ g de metal/g de tejido de lente seco (Konz., y col., 2014, Eckhert., 1983. Srivastava y col., 1992).

Fernández-Silva y colaboradores evaluaron que tanto el Cu(II) como el Zn(II) favorecen la agregación de la cristalina γ D humana en función del tiempo. Además, se demostró que bajas concentraciones de ambos iones metálicos provocan la agregación de la cristalina HgD (Fernández-Silva., 2015).

Los niveles elevados de mercurio en la sangre han sido asociados con un mayor riesgo de cataratas relacionadas con la edad. Estas observaciones sugieren un papel potencial de los metales pesados en las cataratas (Lemire y col., 2010). Los iones de mercurio pueden inducir la agregación de las cristalinas H γ C y H γ S por diferentes mecanismos, incluyendo: pérdida de la estabilidad y desplegamiento de las proteínas, formación de puentes disulfuro y puentes a través del metal (Domínguez-Calva y col., 2018).

1.5.2. Daño por radiación UV en proteínas.

La formación de cataratas es un proceso multifactorial y el daño por radiación UV es un factor de riesgo relacionado con la edad (Liu, y col. 2017). La radiación UV en los rangos UVA (λ = 320–400 nm) y UVB (λ = 280–320 nm) puede causar daño directo a los tejidos vivos a través de reacciones fotoquímicas en los aminoácidos, así como daño indirecto generando especies reactivas de oxígeno y posteriormente daño oxidativo (Pattison y col., 2011). La energía emitida por la radiación UV-B que llega a la superficie de la tierra, durante un verano se estima en alrededor de 270 J/cm². Debido a que se sabe que las cristalinas del lente bloquea aproximadamente el 30% de la radiación UV-B, la energía absorbida por el lente durante un verano es de aproximadamente 80 J/cm² (Cai y col., 2013). El lente está protegido de los rayos UV por debajo de 295 nm por la córnea. Debido a la exposición constante del lente a la radiación UV y la falta de recambio de proteínas, el daño foto-oxidativo de las proteínas del lente se puede acumular durante toda la vida (Davies y Truscott., 2001).

Investigaciones previas han mostrado que la cristalina γ D forma agregados cuando es expuesta a radiación UV "in vitro" (Schafheimer y King., 2013). Por otro lado, las mutaciones W151C y W59C en la H β B2 que han sido identificadas en pacientes con cataratas congénitas dominantes, estos cambios afectan significativamente la estabilidad e inducen la agregación de la H β B2 al ser expuesta a radiación UV (Zhao y col., 2017).

Las β y γ cristalinas en su estructura tienen varios residuos aromáticos conservados. Los residuos de los triptófanos pueden llevar a cabo la absorción de la radiación UV y la formación de un sitio de apagamiento de fluorescencia (Kosinski-Collins y col., 2004, Chen y col., 2006, Xu y col., 2009). Se ha

observado la isomerización de los residuos de Asp en las cristalinas aisladas de lentes envejecidos. La formación de estos isómeros es debido a la UVB; sin embargo, el Asp no es un residuo fotosensible porque no hay un grupo aromático en su estructura química. En base a esto, Cai y colaboradores sintetizaron péptidos y colocaron residuos de triptófano y tirosina cercanos al Asp. Se encontró un incremento significativo de isómeros de Asp en los péptidos que tenían triptófanos cercanos y este proceso se incrementó cuando el triptófano estaba al lado de un residuo Asp en el lado C-terminal del péptido (Cai y col., 2013). En otra investigación se observó la isomerización del Asp-151 en la cristalina α A cuando se expuso a la radiación UVB y causó la opacidad de los lentes de ratas de 6 semanas (Fujii y col., 1997).

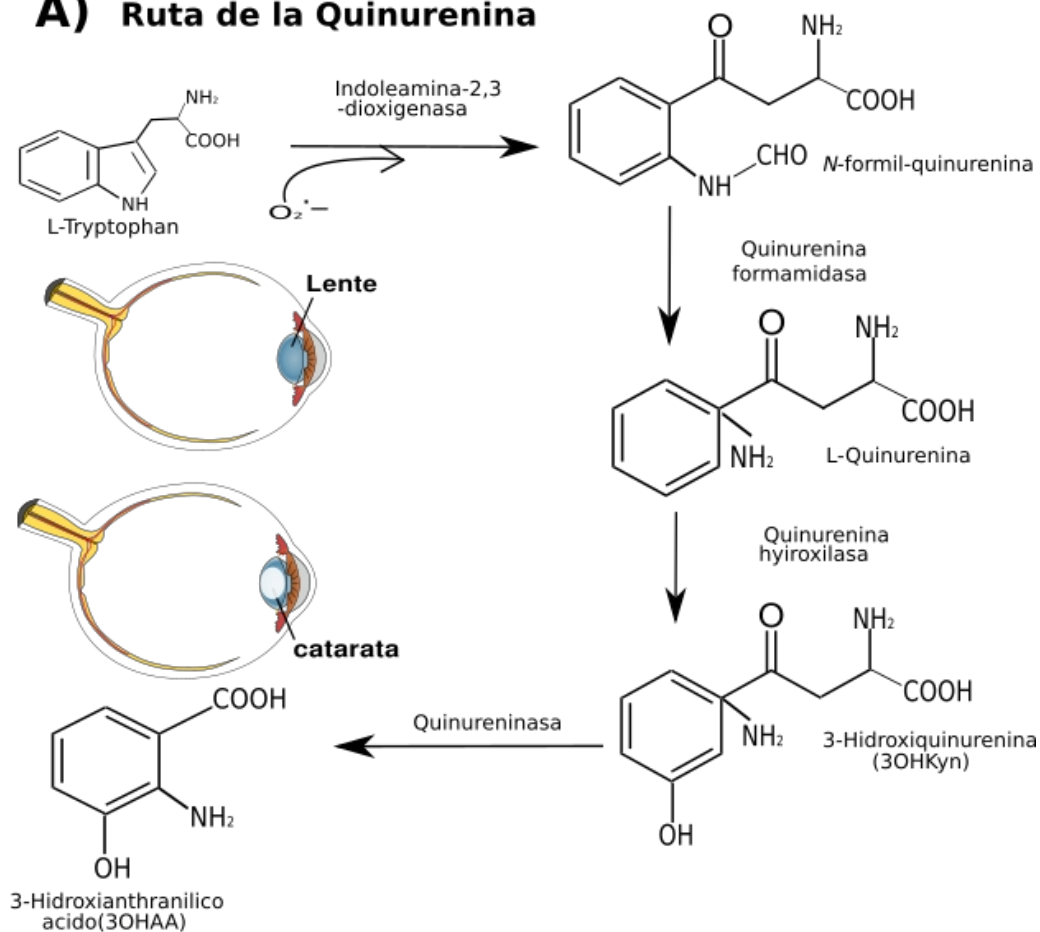
La radiación UVC induce la fotodegradación de los residuos de triptófano en la α -cristalina B y provoca pérdida de la estructura terciaria y de la actividad chaperona (Fujii y col., 2004). Adicionalmente se han observado cambios en la intensidad de fluorescencia (I.F.) del triptófano y de la N-formil-kinurenina (NFK). Se observó la disminución de la I.F. del triptófano y simultáneamente el incremento de la I.F. de la NFK a medida que aumentaba la dosis de radiación (Fujii y col., 2004).

La estimulación con radiación UV aumentan la concentración de la arginopirimidina (ArgP) derivado de la arginina y algunos de los productos de la oxidación del triptófano, como son el hidrox-triptófano (OH-Trp) y la NFK, productos que han sido aislado de lentes humanos con cataratas (Gakamsky y col., 2017). En esta misma investigación se aislaron varias cristalinas de lentes con cataratas, entre ellas la H β B2. Por la técnica de espectrometría de masas se encontraron modificaciones en los aminoácidos de la H β B2 (W59 \rightarrow OH-Kyn, W85 \rightarrow OH-Trp, W151 \rightarrow OH-Trp, R189 \rightarrow ArgP, R191 \rightarrow ArgP) (figura 7-B), estando en mayor porcentaje el OH-Trp. Estas modificaciones también se encontraron en la H β B2 de lentes porcinos irradiados con UV.

Otro producto de la oxidación del triptófano, es el N-acetil triptófanoamida (NATA) y se ha estudiado por espectroscopía de fluorescencia para identificar estados de proteínas parcialmente desplegadas, asociados con cambios sutiles en la estructura terciaria. El NATA es excitado a una longitud de onda de 317 nm y tiene un pico de emisión entre 303-450 nm, siendo el máximo a 340 ± 1.0 nm y 358.5 ± 1.0 nm (Nayar y col., 2002). Así mismo Kumar y colaboradores observaron que el NATA mostraba diferentes máximos de emisión, 340, 348 y 367 nm dependiendo del ambiente químico de la proteína (Kumar y col., 2005).

Las reacciones químicas en la formación de los derivados del triptófano también pueden promover el daño oxidativo, la agregación de las cristalinas y acelerar la formación de las cataratas. (Bova y col., 2001).

A) Ruta de la Quinurenina



B) Conversión de Arginina a Argipirimidina

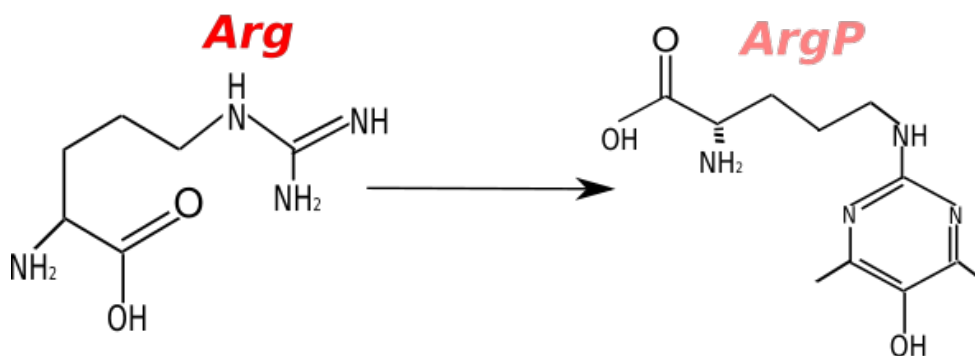


Figura 7: A: Esquema de la ruta de formación de los derivados del triptófano por la vía de la quinurenina. Al principio y al final de la ruta se ilustran los dibujos en el lente sano y el desarrollo de cataratas como resultado de la formación de los productos derivados del triptófano. Modificado de [Rocha y col., 2021](#). B: Conversión de Arginina a Argipirimidina ([Gakamsky y col., 2017](#)).

2. JUSTIFICACIÓN

La transparencia del lente es fundamental para la visión y las proteínas que lo constituyen están expuestas a varios factores de riesgo incluida la radiación UVB y los iones metálicos durante toda la vida. Estos factores pueden causar daños que dan como resultado la agregación de las proteínas y, finalmente, la formación de cataratas. La H β B2 es la cristalina más abundante del lente y no existen estudios completos que expliquen el mecanismo de desplegamiento y/o agregación por efecto de la radiación UVB y por los metales Cu(II) y Zn(II). La comprensión de los cambios estructurales por el efecto de la radiación UVB, el Cu(II) y el Zn(II) es de gran interés para comprender mejor el proceso de formación de cataratas.

3.0. HIPÓTESIS

El mecanismo de agregación de la H β B2 debido al daño por radiación UVB y metales, es el desplegamiento total de la H β B2.

4.0. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el efecto de la radiación UVB, el Zn(II) y el Cu(II) en la H β B2.

4.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Expresar y purificar la cristalina H β B2.
- 2) Evaluar la formación de los agregados de la cristalina H β B2 inducidas por radiación UVB y metales en función del tiempo por turbidimetría.
- 3) Realizar cinéticas de agregación de la cristalina H β B2 después de ser expuesta a la radiación UVB y metales por dispersión dinámica de luz.
- 4) Evaluar el efecto de la radiación UVB y metales en el desplegamiento de la cristalina H β B2 por espectroscopia de fluorescencia.
- 5) Evaluar el efecto de la radiación UVB y metales en la fluorescencia extrínseca de ANS en la cristalina H β B2.

5. METODOLOGÍA

5.1. Expresión de H β B2 en *E.coli*.

Se utilizó el plásmido pE-SUMO CRYBB2 que contiene la secuencia de la proteína unida a la proteína SUMO más una cola de histidinas en el extremo amino terminal (SUMO-Histidina), la cual facilita la purificación por una cromatografía de afinidad a quelatos metálicos. El plásmido se transformó en la cepa de *E. coli* BL21(RIL) por choque térmico. La célula es resistente a dos antibióticos el cloranfenicol y la ampicilina. El uso de estos dos antibióticos garantiza que las células que crezcan en el cultivo sean las deseadas. A partir de una colonia transformada se realizaron gliceroleros y se almacenaron a -80 °C.

En 1 litro de medio LB “*superbroth*” se adicionó 1 ml de los gliceroleros y se dejó crecer a 37 °C por 6 h con una agitación constante de 250 r.p.m. hasta una D.O. 600 nm = 2. Posteriormente se procedió a la inducción de la expresión de la proteína con 0.5 mM de IPTG (Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido) por 12 h a 20 °C con una agitación constante de 250 r.p.m. El cultivo fue centrifugado a 4,000 r.p.m. por 30 min. El “*pellet*” se resuspendió en 15 ml del tampón A (50 mM de Tris-HCl, 10 mM de imidazol pH 8.0). Para la lisis celular, se incubó con lisozima 30 min a 25 °C y luego se sonicó en hielo, 10 ciclos de 1 min con descansos de 1 min entre ciclos. El lisado fue centrifugado a 13000 r.p.m. por 45 min y el sobrenadante fue filtrado con membranas de 0.22 μ m.

5.2. Purificación de H β B2.

El protocolo de purificación utilizado consta de dos cromatografías de afinidad a quelatos metálicos seguida de una cromatografía de intercambio aniónico.

5.2.1. Cromatografía de afinidad a quelatos metálicos.

Se utilizó una columna de afinidad, HisTrap™ Excel de 5 ml y se equilibró con 15 ml del tampón A. El sobrenadante obtenido fue aplicado en la columna y se realizó un lavado con 15 mL del tampón A para eliminar las proteínas que no interactuaron con la matriz. Para la elución de la proteína unida al níquel se empleó un gradiente lineal de imidazol de 0-100 % empleando el tampón A y el tampón B (50 mM de Tris-HCl, 500 mM de imidazol pH 8.0) a un flujo de 1 ml/min. Las fracciones que contenían la proteína fueron reunidas para continuar con la purificación.

5.2.2. Corte de la secuencia SUMO.

La solución de la proteína fue dializada con el tampón C (50 mM de Tris-HCl, 100 mM de NaCl, pH 8.0) durante 2 hrs; se realizaron 4 cambios, cada 30 min con una membrana Spectrum (membrana de diálisis Spectra/Por™ 3 RC MWCO de 3500 daltons). Teniendo en cuenta la concentración de la proteína se utilizaron 100 unidades de la proteasa SUMO como indica el protocolo de la casa comercial (SIGMA: SAE0067). Después de haber adicionado la proteasa a la solución de la proteína, se incubó por 12 hrs a 25 °C, 80 r.p.m. Posteriormente para comprobar si ocurrió el corte, se realizó un gel de electroforesis SDS-PAGE al 14 %.

5.2.3. Cromatografía de afinidad para separar la proteína SUMO y la proteasa de la cristalina H β B2.

En este paso de purificación se esperaba que la H β B2 estuviera en las fracciones que no se unieron a la matriz, mientras que la secuencia SUMO interactuara con la matriz de la columna debido a la cola de histidina.

Se utilizó la misma columna HisTrap™ y se equilibró con 15 mL del tampón D (50 mM de Tris-HCl, pH 8.0). La solución de la proteína fue aplicada en la columna, se colectó en el "*flow through*" y se realizó un lavado con 15 mL del tampón D. Para la elución de la proteína SUMO se emplearon concentraciones crecientes de imidazol por pasos (Tris HCl 50 mM más 10, 100 y 200 mM) a un flujo de 1 ml/min. Las fracciones que contenían la proteína fueron reunidas y concentradas con un Amicon para continuar con la purificación.

5.2.4. Cromatografía de intercambio aniónico.

La solución de la proteína obtenida en el anterior paso fue aplicada en una columna Hi-Load 6/60 con matriz Q-sepharose, la cual fue equilibrada con 60 mL del tampón C previamente. Se realizó un lavado con un volumen de columna empleando el tampón C. Para la elución de las proteínas no fijadas a la matriz se empleó un gradiente de fuerza iónica de 0-100 % utilizando el tampón C y el tampón E (Tris-HCl 50 mM, NaCl 500 mM pH 8.0). Las fracciones que contenían la proteína fueron concentradas con un Amicon para el uso de los experimentos.

5.3. Determinación de la concentración de la proteína.

La concentración de proteína en la solución de H β B2 se determinó mediante la medición de la absorbancia a una longitud de onda de 280 nm en un espectrofotómetro Agilent. Para esto, se empleó su coeficiente de extinción molar teórico de 43035 cm⁻¹ M⁻¹ y se utilizó una cubeta de cuarzo con un paso óptico de 1 cm de longitud.

Para todos los ensayos de radiación se empleó 50 μ M de H β B2 disuelta en el tampón C. Para los ensayos con los metales se empleó la solución tampón Hepes 10 mM, NaCl 100 mM pH 8 (tampón F).

5.4. Determinación de la solubilidad.

La solubilidad de la proteína se determinó para la H β B2 irradiada y no irradiada al finalizar cada experimento. También se determinó para H β B2 en ausencia y presencia de 1.5 equivalentes (equi.) de CuSO₄ o ZnSO₄ y en presencia de 30 equi. del ácido etilen diamino tetraacético (EDTA). Las muestras se centrifugaron a 15000 rpm a 20 °C. La solubilidad se determinó mediante la concentración máxima de proteína (mg / ml) en las fracciones solubles. Los datos presentados se mostraron como promedio \pm desviación estándar calculado a partir de tres repeticiones independientes.

5.5. Electroforesis SDS-PAGE.

Las electroforesis se realizaron en geles de poliacrilamida al 14 % con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), según el método descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). Durante toda la corrida se utilizó un voltaje de 160 mV en una cámara Mini-Protean Tetrasystem (Bio-Rad). Las muestras se mezclaron con tampón de ruptura 3x (Tris 1 M pH 8, SDS, betamercaptoetanol, glicerol, bromofenol azul) y se calentaron durante 5 min. en un bloque térmico a 100 °C. Para la tinción de los geles se utilizó una solución de fijación (10 % isopropanol, 10 % ácido acético y 0.003 % de azul de Coomassie R-250) por 30 min. y posteriormente una solución de tinción (10 % ácido acético y 0.003 % de azul de Coomassie R-250) por 1 h. Para la decoloración se empleó una solución de ácido acético al 10 %. Se utilizó un patrón de peso molecular comercial “Spectra multicolor broad range protein ladder” (Thermo Scientific, EUA).

5.6. Ensayos de la H β B2 irradiada con UVB.

Se ha descrito que el empleo de altas dosis de radiación produce daño en las cristalinas ([Schafheimer y King., 2013](#)); sin embargo, es necesario optimizar la radiación en bajas dosis, de tal forma que se logre desestabilizar a la cristalina H β B2 lo suficiente para seguir el efecto de este daño en la agregación de la proteína en el tiempo. La H β B2 fue irradiada (UVB en una lampara UVP: 8 watt, 302 nm) a diferentes tiempos 30, 60, 90, 120 y 180 min. Seguidamente se evaluó la formación de agregados midiendo la densidad óptica (D.O: 405 nm) y se midió el radio hidrodinámico (Rh) de estos agregados por dispersión dinámica de luz (DLS). Finalmente, para investigar si esos agregados están constituidos por proteína plegada o desplegada, se tomaron espectros de fluorescencia teniendo en cuenta que la H β B2 presenta cinco triptófanos en su estructura.

5.7. Cinética de agregación de la cristalina H β B2 por turbidez.

Las cinéticas de agregación se realizaron siguiendo el aumento de la turbidez a 405 nm en un espectrofotómetro Agilent. La H β B2 fue irradiada con UVB durante 2 hrs previamente. Se colectaron los valores de absorción a cada 15 segundos durante 12 horas a una temperatura de 37 °C. Además, se realizaron cinéticas de la proteína nativa y en presencia de 1.5 equi. de CuSO₄ o ZnSO₄.

Se colocaron 2 ml de H β B2 a 50 μ M en una cubeta y se trataron con 1.5 equi. del Cu(II) y Zn(II) después de un período inicial de \sim 5 minutos.

Para evaluar si el efecto de los iones metálicos sobre la agregación de H β B2 es reversible, se adicionó EDTA a la solución para quelar los cationes disponibles. Los experimentos con EDTA se realizaron simultáneamente, justo cuando incrementaba la D.O. Se emplearon 10, 20 y 30 equi. de EDTA con respecto a la concentración de los metales. Adicionalmente, también se adicionó el EDTA al finalizar cada cinética.

En las mediciones de Zn(II), después de \sim 40 minutos, se adicionaron los equi. de EDTA a la solución para quelar los cationes disponibles. En las mediciones de Cu(II), después de \sim 95 minutos, se adicionaron los equi. de EDTA. Las mediciones se registraron cada 15 segundos durante 200 min. y los experimentos se realizaron por triplicado.

5.8. Cinética de agregación de la cristalina H β B2 por Dispersión Dinámica de Luz (DLS).

El tamaño de los agregados de la proteína se midió en un Zetaziser nano SP (Malvern Instruments). Se empleó un ángulo de 173° y se realizaron mediciones cada 1.8 min durante 12h a 37 °C. Para todos los experimentos se realizaron 3 mediciones con 10 corridas cada una. Para el caso de las cinéticas la H β B2 se irradió 2 hrs previamente. Todas las muestras fueron centrifugadas y filtradas con filtros de 0.2 μ m antes de realizar las mediciones. Además, se realizaron cinéticas de la proteína nativa y en presencia de 1.5 equi. de CuSO₄ o ZnSO₄. Con estos ensayos se caracterizó el cambio de tamaño de los agregados durante el tiempo. Se obtuvieron estimaciones del Rh mediante la medición de funciones de correlación y el ajuste a coeficientes de difusión. Los experimentos se realizaron por triplicado.

La técnica de DLS es sensible a la presencia de partículas grandes y el tamaño obtenido va a depender de las partículas detectadas por el láser en cada medición. En función de la presencia en la muestra de moléculas con diferentes radios hidrodinámicos, podemos definir curvas de correlación típicas de muestras monodispersas, caracterizadas por la presencia de una única pendiente en la curva de correlación y curvas de correlación de muestras polidispersas, cuya principal característica es la presencia de más de una pendiente en la curva. Además, el tiempo al cual comienza a disminuir la correlación y la presencia de una o más pendientes, que nos brindan información relacionada con el tamaño de las moléculas presentes en la muestra (Fernández-Silva., 2015).

5.9. Cinética de desplegamiento de la H β B2 por espectroscopía de fluorescencia.

El efecto de la radiación en el estado de plegamiento de la H β B2 se siguió por espectroscopía de fluorescencia. La H β B2 presenta 5 triptófanos en su monómero, los cuales están descritos que tienen un máximo de fluorescencia a 332 nm en su estado nativo, mientras que este máximo se corre a 350 nm cuando la proteína se encuentra en un estado desplegado (Fu y Liang, 2002). Esta característica permite emplear la espectroscopía de fluorescencia para estudiar el desplegamiento de la H β B2.

La H β B2 fue irradiada y posteriormente se estudió su estado de plegamiento en el tiempo midiendo la I.F. durante 12 h a 37 °C. Además, se realizaron cinéticas de la proteína nativa y en presencia de 1.5 equi. de CuSO₄ o ZnSO₄. Se utilizó 295 nm como longitud de onda de excitación y se tomaron los espectros de emisión de la proteína entre los 300 y 500 nm. Los experimentos se realizaron por

triplicado empleando un fluorómetro Cary-Eclipser (Agilent) y los espectros fueron tomados cada minuto durante 12 horas.

Paralelamente, se tomaron espectros de la I.F. de moléculas derivadas de la oxidación del triptófano, OH-kinurenina (OH-K) y NATA en la H β B2 irradiada y no irradiada.

Para la OH-Kin se utilizó 310 nm como longitud de onda de excitación, para la Kin se excitó a 350 nm y para el NATA 317 nm y se colectaron los datos de la I.F. de emisión a 440 nm, para la Kin, 370 nm para la OH-Kin y para el NATA 380 nm.

5.10. Cinética de desplegamiento de la H β B2 por espectroscopía de fluorescencia en presencia del ANS.

También se midió la fluorescencia extrínseca de la proteína usando ANS (1-anilinaftaleno-8-sulfonato) como indicador de la exposición de residuos hidrofóbicos a la superficie de la cristalina H β B2 en ausencia y presencia de 1.5 equi. de CuSO₄ o ZnSO₄. Además se evaluó en la H β B2 irradiada 2 hrs. Los espectros de fluorescencia se registraron en el espectrofotómetro Cary-Eclipser (Agilent).

Las muestras para los ensayos de fluorescencia del ANS se prepararon incubando las soluciones de proteína con una concentración de 3.75 mM de ANS (~8 veces mayor a la concentración de la proteína) durante 30 min en oscuridad a 25 °C. La fluorescencia de ANS extrínseca se excitó a 380 nm y los espectros de emisión se colectaron en rangos de longitud de onda de 400 a 600 nm. Todos los experimentos espectroscópicos se realizaron a 37 °C.

5.11. Desplegamiento térmico de la H β B2 por espectroscopía de fluorescencia.

La estabilidad térmica de la H β B2 se estudió por espectroscopía de fluorescencia. El rango de temperatura empleado fue de 37 a 90 °C con un incremento de 2°/min. Se utilizó una longitud de onda de excitación de 295 nm y se colectaron los espectros de emisión a una longitud de onda de 332 y 350 nm. Los experimentos fueron realizados por triplicado empleando un fluorómetro Cary-Eclipser (Agilent) y los datos se ajustaron a una sigmoide empleando la ecuación de Boltzmann.

5.12. Desplegamiento térmico de la H β B2 por espectroscopía de fluorescencia en presencia del ANS.

El rango de temperatura empleado fue de 37 a 90 °C con un incremento de 2°/min. Se utilizó una longitud de onda de excitación de 380 nm y se colectaron los espectros de emisión a una longitud de onda a 480 nm. Los experimentos fueron realizados por triplicado empleando un fluorómetro Cary-Eclipser (Agilent). En todos los experimentos la proteína fue incubada previamente con 3.75 mM de ANS durante 30 min a 25 °C en oscuridad.

5.13. Desplegamiento químico de la H β B2 en presencia de Urea.

El despliegamiento de la proteína inducida por urea se preparó la solución tampón F con urea de 0, 1.5, 2.5, 3.5 y 4.5 M. Se determinó el despliegamiento y se realizaron las mediciones de la fluorescencia intrínseca del triptófano y extrínseca usando ANS para evaluar los cambios estructurales.

6. RESULTADOS: PARTE I

"Expresión y purificación de la Cristalina H β B2"

6.1. Expresión de H β B2 en *E.coli*.

La figura 8 muestra la electroforesis SDS-PAGE al 14 % de la sobreexpresión de la H β B2. En los carriles se observan diferentes muestras de antes y después de la expresión de la proteína con 0.5 mM de IPTG. Se visualiza una banda entre 34 y 43 kDa que indica la expresión de la H β B2 unida a la secuencia SUMO (la proteína SUMO = 17 kDa y la H β B2 = 23.2 kDa), el cual tiene un peso molecular aproximado de 36 kDa. Estos resultados demuestran que el protocolo seguido para la inducción funciona correctamente y con esta concentración de IPTG se logra sobreexpresar en el cultivo la proteína de interés. El empleo del medio "superbroth" permitió aumentar las concentraciones de proteína a partir de un litro de cultivo obteniendo entre 25 y 35 mg por litro de cultivo.

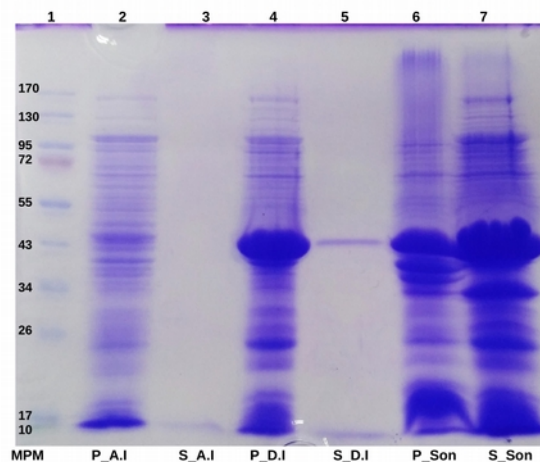


Figura 8: Gel de electroforesis SDS-PAGE al 14 % de la expresión de la H β B2. Línea 1: Marcador de peso molecular. Línea 2: Precipitado antes de inducir con IPTG. Línea 3: Sobrenadante antes de inducir. Línea 4: Precipitado después de inducir. Línea 5: Sobrenadante después de inducir. Línea 6: Precipitado sonicado. Línea 7: Sobrenadante sonicado.

6.2. Purificación de H β B2.

6.2.1. Cromatografía de afinidad a quelatos metálicos

El sobrenadante obtenido luego de la ruptura de las células y la centrifugación (25 mL) fue aplicado a la columna de la cromatografía de afinidad a níquel. En la figura 9 se muestra el cromatograma correspondiente al primer paso de purificación. La muestra fue inyectada una vez equilibrada la columna con 15 mL del tampón A (50 mM de Tris-HCl, 10 mM de imidazol pH 8.0). Para la elución de las proteínas unidas al níquel se empleó un gradiente lineal de imidazol de 0-100 % empleando el tampón A y el tampón B (50 mM de Tris-HCl, 500 mM de imidazol pH 8.0) a un flujo de 1 ml/min. En el cromatograma (figura 9) se puede observar la presencia de un pico mayoritario, el cual eluyó aproximadamente al 40 % de imidazol.

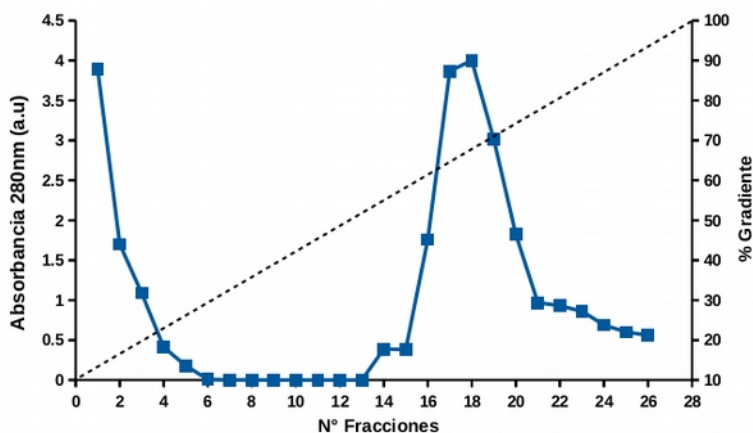


Figura 9: Purificación de la H β B2 por cromatografía de afinidad a quelatos metálicos en una columna HisTrap™ Sepharose®-Níquel. La matriz se equilibró previamente con tampón Tris-HCl 50 mM, 10 mM de imidazol pH 8 a un flujo de 1 ml/min. Posteriormente se aplicó la solución de la proteína y se lavó con la misma solución tampón. Se realizó un gradiente lineal de 0 a 100 % con Tris-HCl 50 mM, 500 mM de imidazol pH 8 para la elución de las proteínas fijadas a la matriz.

La presencia de la proteína se verificó por electroforesis SDS-PAGE (figura 10). En la imagen del gel se puede observar la presencia de una banda mayoritaria con el peso esperado de 36 kDa en las fracciones 16, 17, 18, 19, 20, 22 y 24 (figura 10-B). Asimismo, se observan otros contaminantes de menor peso molecular en la muestra.

6.2.2. Corte de la secuencia SUMO

En la figura 11 se puede observar la presencia de una banda entre 34 y 43 kDa (carril 2) correspondiente a la proteína antes de cortar con la proteasa mientras que en el carril 3 se observa una banda grande entre 17 y 26 kDa, la cual corresponde a la proteína sin la secuencia SUMO. En el mismo carril 3 se observa una banda de menor peso molecular que corresponde a la proteína SUMO, esta proteína tiene un peso molecular de 17 kDa y la H β B2 tiene un peso molecular de 23.2 kDa.

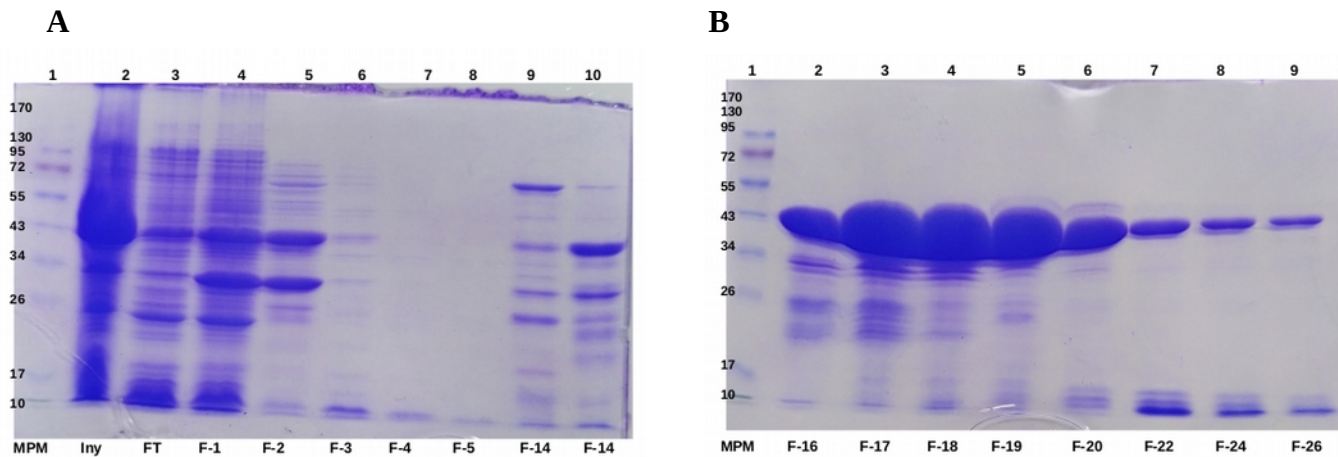


Figura 10: Gel de electroforesis SDS-PAGE al 14 % de la cromatografía de afinidad a quelatos metálicos de la HβB2. **A:** Línea 1: Marcador de peso. Línea 2: Sobrenadante inyectado. Línea 3: "flow through". Línea 4: Fracción 1. Línea 5: Fracción 2. Línea 6: Fracción 3. Línea 7: Fracción 4. Línea 8: Fracción 5. Línea 9: Fracción 14. Línea 10: Fracción 15. **B:** Línea 1: Marcador de peso. Línea 2: Fracción 16. Línea 3: Fracción 17. Línea 4: Fracción 18. Línea 5: Fracción 19. Línea 6: Fracción 20. Línea 7: Fracción 22. Línea 8: Fracción 24. Línea 9: Fracción 26.

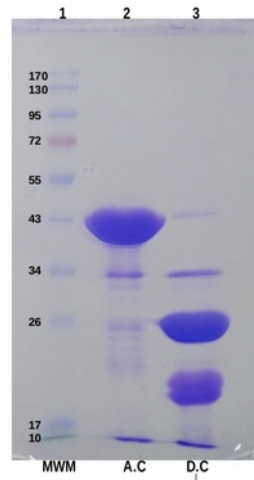


Figura 11: Gel de electroforesis SDS-PAGE al 14 %: corte de la secuencia SUMO. Línea 1: Marcador de peso molecular. Línea 2: HβB2 con la secuencia SUMO sin cortar, Línea 3: Después de cortar con la proteasa-SUMO.

6.2.3. Cromatografía de afinidad para separar la proteína SUMO y la proteasa.

En la figura 12 se muestra el cromatograma correspondiente al segundo paso de purificación. La muestra fue inyectada una vez equilibrada la columna con 15 mL del tampón D. En este paso de purificación la HβB2 no interactuó con el níquel de la matriz. Se recolectó en el "flow through", en el lavado y en la elución con 100 mM de imidazol mientras que la proteína SUMO eluyó con 200 mM de imidazol.

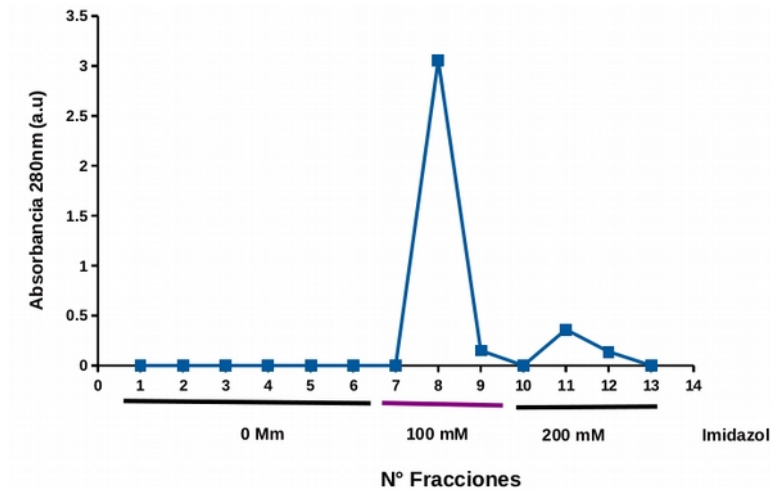


Figura 12: Purificación de la HβB2 por cromatografía de afinidad a quelatos metálicos en una columna HisTrap™ Sepharose®-Niquel. Después de cortar la secuencia SUMO, la matriz se equilibró previamente con tampón Tris-HCl 50 mM, 10 mM de imidazol, pH 8 a un flujo de 1 ml/min. Posteriormente se aplicó la solución de la proteína y se lavó con la misma solución tampón. Se realizó una elución con 0 mM, 100 mM y 200 mM de imidazol a un flujo de 1 ml/min.

En la figura 13 se observa la figura del gel de electroforesis SDS-PAGE al 14 % de las fracciones colectadas. En el carril 4 y 5 se observa una banda entre 17 y 26 kDa que corresponden a la HβB2 (aprox. 23 kD), y corresponden al "*flow through*" y a la elución con 100 mM de imidazol mostrada en el cromatograma de la figura 12.

En el carril 7 y 8 se observa una banda cercana a 17 kDa que corresponde a la secuencia SUMO que corresponden a las fracciones 11 y 12 (figura 12). Estos resultados indican que la HβB2 se separó de la secuencia SUMO.

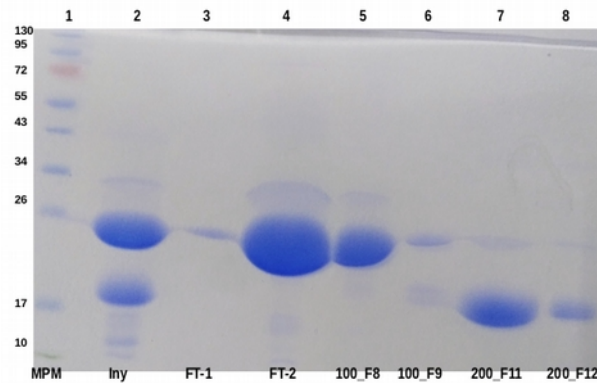


Figura 13: Gel de electroforesis SDS-PAGE al 14 % de la cromatografía de afinidad a quelatos metálicos de la H β B2 después de cortar la secuencia SUMO: Línea 1: Marcador de peso molecular. Línea 2: Solución de proteína inyectada. Línea 3: "flow through" -1. Línea 4: "flow through" -2. Línea 5: Fracción 8 eluída con 100 mM de imidazol. Línea 6: Fracción 9 eluída con 100 mM de imidazol. Línea 7: Fracción 11 eluída con 200 mM de imidazol. Línea 8: Fracción 12 eluída con 200 mM de imidazol.

6.2.4. Cromatografía de intercambio aniónico.

En la figura 14 se muestra el cromatograma correspondiente al último paso de purificación. En las fracciones colectadas, se observa claramente un pico mayoritario en los primeros 10 minutos de la corrida con máximo de absorbancia. Entre las fracciones 27 y 30 se observa un pico pequeño, el cual corresponde a otras proteínas.

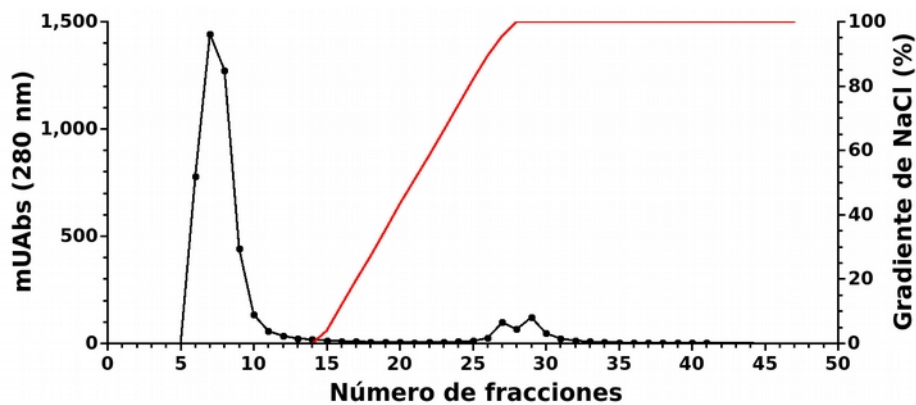


Figura 14: Purificación de la H β B2 por cromatografía de intercambio aniónico en matriz Q-Sepharose. La matriz se equilibró previamente con tampón Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, pH 8.0, posteriormente se inyectó la muestra. Para la elución de las proteínas fijadas al intercambiador, se empleó un gradiente de 0-100 % de tampón Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, pH 8.0 y Tris-HCl 10 mM, NaCl 500 mM, pH 8.0. Se empleó un flujo de 1 ml/min.

Para corroborar la presencia de la proteína en este pico se realizó una electroforesis SDS-PAGE al 14 % (figura 15). En la electroforesis se probaron algunas fracciones que corresponden a todo el pico máximo y las fracciones 27, 28, 29 y 30 se unieron (F27-30). La banda de aproximadamente 23 kDa correspondiente a la H β B2 se observó en las fracciones 6, 7, 8, 9, 10 y 12 y no se observan otros contaminantes, mientras que en las fracciones 27-30 se observa una banda pequeña por encima de 34 kDa.

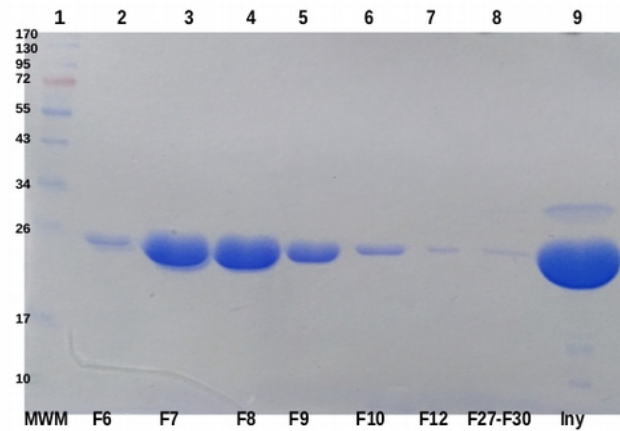


Figura 15: Gel de electroforesis SDS-PAGE al 14 %. Línea 1: Marcador de peso molecular. Línea 2: Fracción 6, Línea 3: Fracción 7, Línea 4: Fracción 8, Línea 5: Fracción 9, Línea 6: Fracción 10, Línea 7: Fracción 12, Línea 8: Fracción 27-30, Línea 9: Proteína inyectada.

7. RESULTADOS: PARTE II

"Efecto de la radiación UVB en la agregación de la Cristalina H β B2"

La H β B2 fue irradiada a diferentes tiempos (30, 60, 90, 120 y 180 min) para buscar el tiempo mínimo de radiación que provoca turbidez y/o cambios en el estado de plegamiento de la H β B2 en el tiempo.

Como primera aproximación, se midió puntualmente la D.O a 405 nm de la proteína no irradiada e irradiada en los diferentes tiempos inmediatamente después de irradiar y a las 12 horas.

A continuación se evaluó la cinética de la formación de agregados por turbidez y por DLS. Además, se empleó la espectroscopía de fluorescencia para evaluar los cambios en el ambiente químico de los triptófanos y el desplegamiento de la estructura de la H β B2 en los tiempos de irradiación seleccionados.

7.1. Efecto de la radiación UVB en la formación de agregados de la H β B2 por turbidez

En la figura 16 se muestra el efecto de la radiación UVB sobre la turbidez de la H β B2 durante 30, 60, 90, 120 y 180 min de irradiación. Se presentan los datos de D.O. inmediatamente (Inm: mostrado en la figura 16) después de ser irradiada, y después de 12 horas a 37 °C . Estos resultados indican un aumento en turbidez para todas las condiciones con el tiempo (12 hrs), incluyendo a la proteína no irradiada. La H β B2 no irradiada presentó una D.O. de 0.09 después de 12 horas, mientras que la proteína irradiada 90 min y luego de ser incubada durante 12 horas presentó una D.O de 0.16 (inserto, figura 16); el mayor efecto se observa con la proteína irradiada 2 hrs y 3 hrs. Estos resultados indican que estos tiempos de radiación producen la formación de agregados que provocan que la solución se vuelva opaca a la luz.

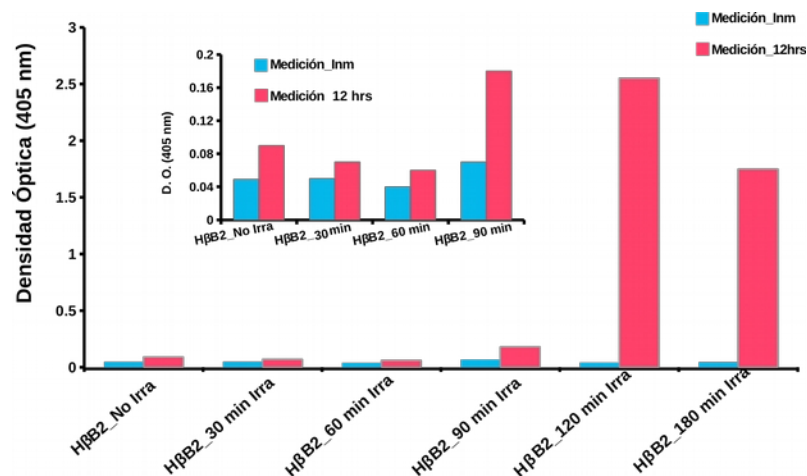


Figura 16: Ensayo de densidad óptica para evaluar la formación de agregados por efecto de la radiación UVB. Tiempos de irradiación 30, 60, 90, 120, y 180 min. Se determinó la D.O a 405 nm inmediatamente después de ser irradiada (barras azules) y 12 hrs después incubada a 37 °C (barra naranja). La concentración de la proteína fue 50 μM.

7.2. Efecto de la radiación UVB en la formación de agregados de la HβB2 por DLS.

También se evaluó la formación de agregados de la HβB2 irradiada durante 30, 60, 90, 120 y 180 min por DLS y estos resultados son mostrados en la figura 17-A y 17-B. Se muestran los estados de la proteína inmediatamente después de ser irradiada y 12 horas después incubada a 37 °C.

Interesantemente, estos resultados indican que inmediatamente después de irradiar a la proteína no se forman agregados en las exposiciones de 30, 60 y 90 min. Sin embargo, después de incubar a la proteína durante 12 horas se pueden observar agregados grandes en todos los tiempos de radiación incluyendo a la HβB2 no irradiada, siendo este efecto mayor a los 90 min de radiación e incubada 12 horas, (figura 17-A).

Por otro lado, se observa que la proteína irradiada 2 y 3 hrs forma algunos agregados grandes inmediatamente después de ser irradiada con respecto al control. Después de 12 horas de incubación, la proteína irradiada 2 y 3 hrs formó agregados de mucho mayor tamaño que el control, (figura 17-B).

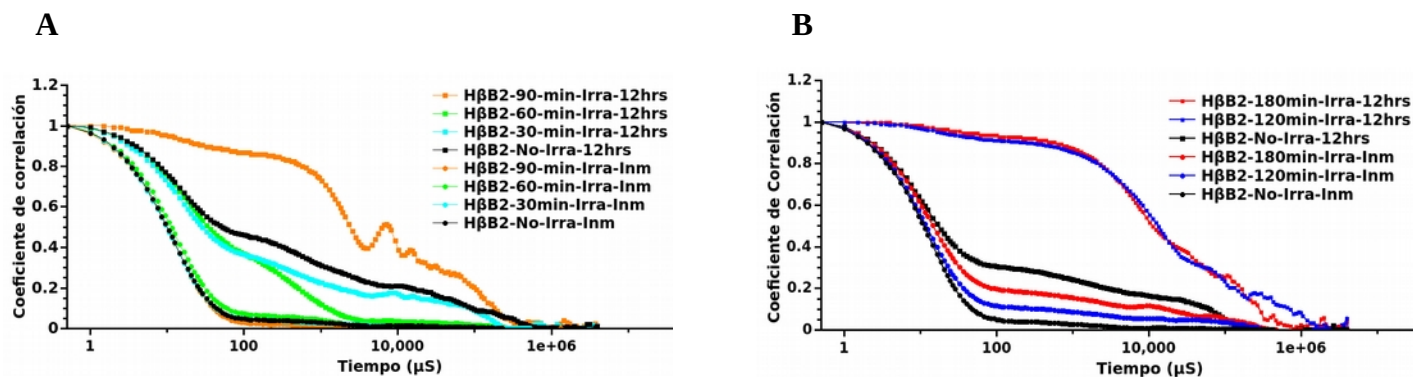


Figura 17: Ensayo de DLS para evaluar la formación de agregados por efecto de la radiación UVB: **A:** Tiempos de irradiación 30, 60 y 90 min. Se midió inmediatamente después de ser irradiada. Se incubó durante 12 horas a 37 °C y se volvieron a realizar las mediciones. **B:** Tiempos de irradiación 120 y 180 min. La concentración de la proteína fue 50 μM.

7.3. Efecto de la radiación UVB en el estado de plegamiento de la HβB2 por espectroscopía de fluorescencia

En la figura 18 se muestran los espectros de fluorescencia después de irradiar a la HβB2 durante 30, 60, 90 minutos (figura 18-A), y 120 y 180 min (figura 18- B). En la figura 18-A se observa que el máximo de emisión de la HβB2 no irradiada es de 332 nm y cuando la proteína se irradió 30, 60 y 90 min el máximo de emisión no cambia, mientras que para la HβB2 irradiada durante 2 y 3 hrs el máximo de emisión parece comenzar a desplazarse hacia la derecha (figura 18-B). Adicionalmente se observa que en todos los tiempos ocurre una disminución de la I.F. y este efecto parece ser dependiente del tiempo de radiación. Estos resultados indican que en todos los tiempos de radiación el máximo de emisión de la HβB2 se mantiene más o menos constante, sugiriendo que la radiación UVB no induce el desplegamiento inmediato de la proteína, pero provoca la disminución de la I.F. de la HβB2 en todos los tiempos de radiación.

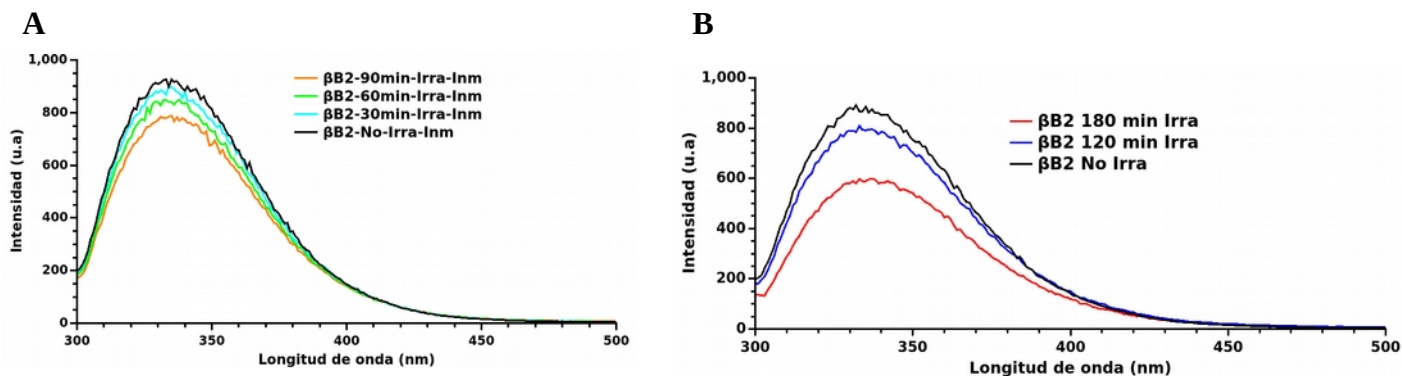


Figura 18: Espectroscopía de fluorescencia para evaluar el desplegamiento de la HβB2 por efecto de la radiación UVB. Tiempos de irradiación: 30, 60 y 90 min (A), 120 y 180 min (B). Mediciones inmediatamente después de irradiar a la proteína (50 μM). Se utilizó una longitud de onda de excitación de 295 nm y se recolectaron los espectros de emisión de 300 – 500 nm.

Con base en estos resultados se seleccionó 2 hrs de irradiación debido a que la solución de la proteína presentaba mínimos cambios de turbidez, DLS y fluorescencia inmediatamente después de irradiar. Después de 12 horas de incubación a 37 °C se observó la formación de agregados grandes por turbidez, DLS y se observaron cambios en los espectros de fluorescencia. También se realizaron experimentos con 3 hr de irradiación para observar los cambios más drásticos.

7.4. Cinética de agregación de la cristalina HβB2 por turbidez.

En la figura 19 se muestran las cinéticas de la HβB2 nativa e irradiada 2 y 3 hrs por turbidez a 37 °C durante 12 horas. En la cinética se observa que la D.O. de la solución de la HβB2 no irradiada va incrementando gradualmente hasta tener un máximo de 0.1 a 12 hrs.

En la HβB2 irradiada 2 hrs (figura 19-A) y 3 hrs (figura 19-B) ocurrió un incremento rápido de la D.O. en los primeros 240 minutos de la cinética, siendo el máximo de ~0.3. En la HβB2 irradiada 2 hrs la D.O se mantuvo en cero los primeros 18 min de la cinética mientras que en la HβB2 irradiada 3 hrs la D.O. inicia con un valor de 0.4. En la HβB2 irradiada 2 hrs, el incremento de la D.O. se mantuvo constante hasta los 290 minutos. Después de los 300 minutos del experimento la D.O disminuyó gradualmente en la HβB2 irradiada 2 hrs, mientras que en la HβB2 irradiada 3 hrs se mantuvo constante hasta los 360 minutos.. Esta disminución ha sido observada anteriormente y se cree que es debida a la formación de precipitados en la solución.

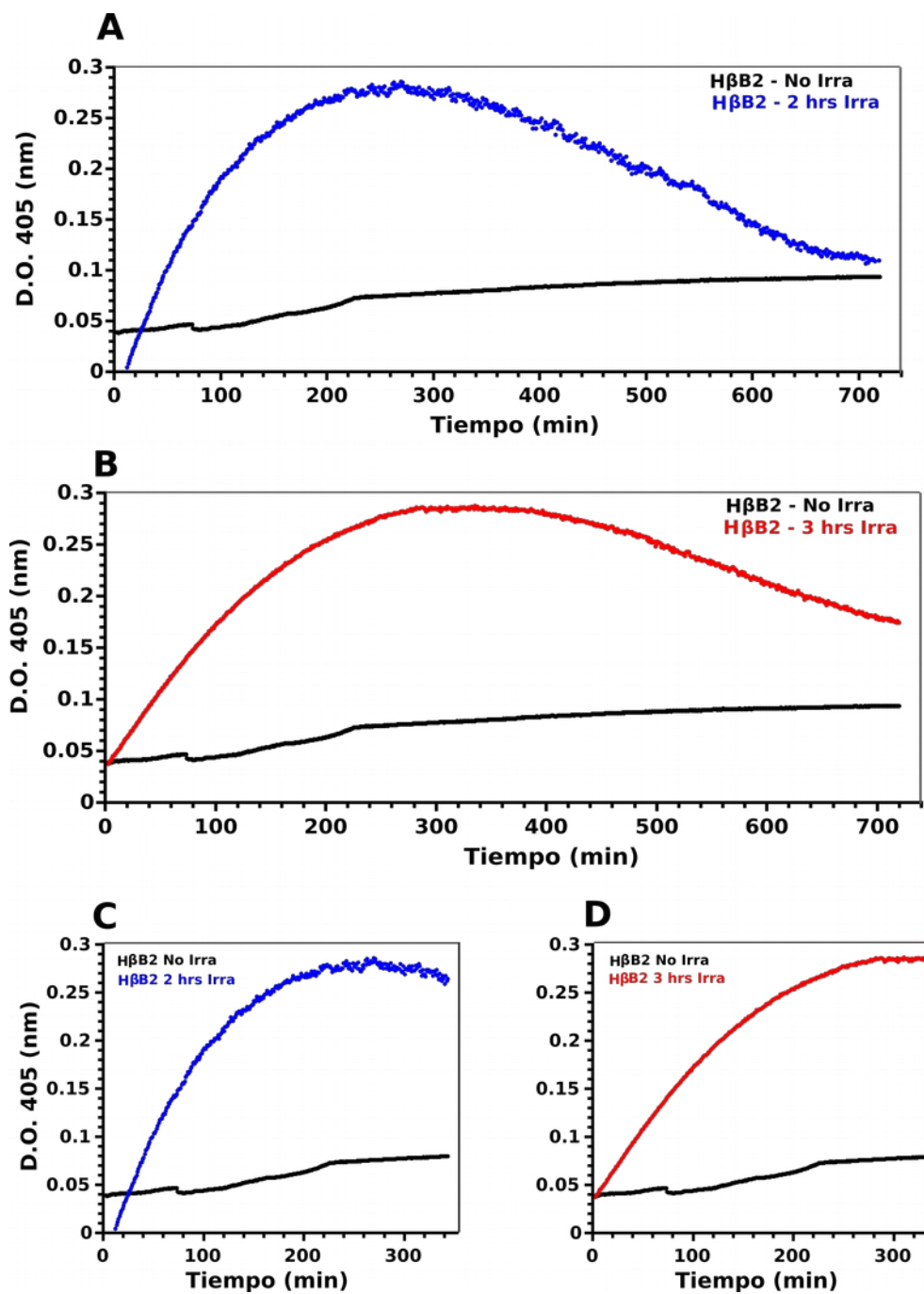


Figura 19: **A:** Cinética de la agregación por turbidez de la H β B2 irradiada 2 hrs y H β B2 no irradiada. **B:** Cinética de la agregación por turbidez de la H β B2 irradiada 3 hrs y H β B2 no irradiada. **C:** Cinética de la agregación por turbidez de la H β B2 irradiada 2 hrs y la H β B2 no irradiada durante los primeros 350 minutos. **D:** Cinética de la agregación por turbidez de la H β B2 irradiada 3 hrs y H β B2 no irradiada durante los primeros 350 minutos. El experimento se realizó a 37 °C durante 12 horas. La concentración de la proteína fue 50 μ M.

7.5. Efecto de la radiación UVB en la solubilidad de la H β B2.

Se evaluó la solubilidad de la H β B2 irradiada 2 hrs al final de cada experimento y de la H β B2 no irradiada. La proteína no irradiada al final de los experimentos sigue siendo alta, con un 95 a 98 % de la concentración inicial. Las 2 hrs de radiación indujeron pérdida (~50%) de la proteína soluble en solución (figura 20).

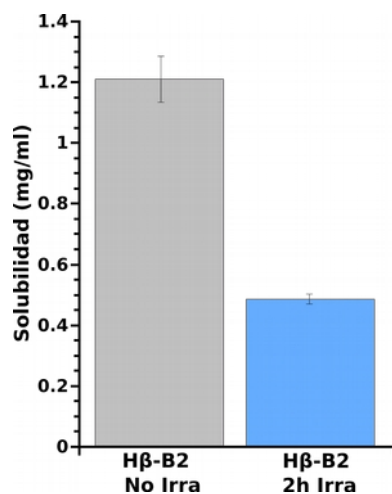


Figure 20: Solubilidad de la H β B2 irradiada 2 hrs y no irradiada. 2 mL de la H β B2 a 50 μ M in buffer C a 37 $^{\circ}$ C fue irradiada 2 hrs. Se determinó la solubilidad de la H β B2 irradiada y no irradiada. Las muestras fueron centrifugadas a 13.000 r.p.m a 20 $^{\circ}$ C. Los datos se representan como el promedio \pm DS de tres repeticiones independientes.

7.6. Cinética de agregación de la cristalina H β B2 por Dispersión Dinámica de Luz (DLS).

En las figuras 21-A se presentan el coeficiente de correlación de DLS con respecto al tiempo (10 horas) de la cinética de la H β B2 no irradiada. Se puede observar que se forman agregados pequeños de la H β B2 en la primera hora y después incrementan gradualmente con el tiempo. Durante toda la cinética ocurren cambios del tamaño de los agregados de la H β B2 no irradiada.

En la figura 21-B se muestran los datos del coeficiente de correlación de la cinética de la H β B2 irradiada 2 hrs. Se observa que la radiación a las 2 hrs induce la formación de agregados grandes con respecto a la H β B2 no irradiada. Interesantemente, se observa como inmediatamente después de irradiada (1.8 min) ya se observan moléculas de mayor tamaño que la proteína no nativa, aunque no se detecto un cambio en la turbidez.

Los resultados de esta figura muestran que la H β B2 forma agregados de manera más o menos gradual durante las primeras 4 horas del experimento y después se formaron agregados de mucho mayor tamaño. En la figura 21-C se muestran los datos del coeficiente de correlación de la cinética de la

H β B2 irradiada 3 hrs. Se observa que la radiación a las 3 hrs también induce la formación de agregados grandes con respecto a la H β B2 no irradiada.

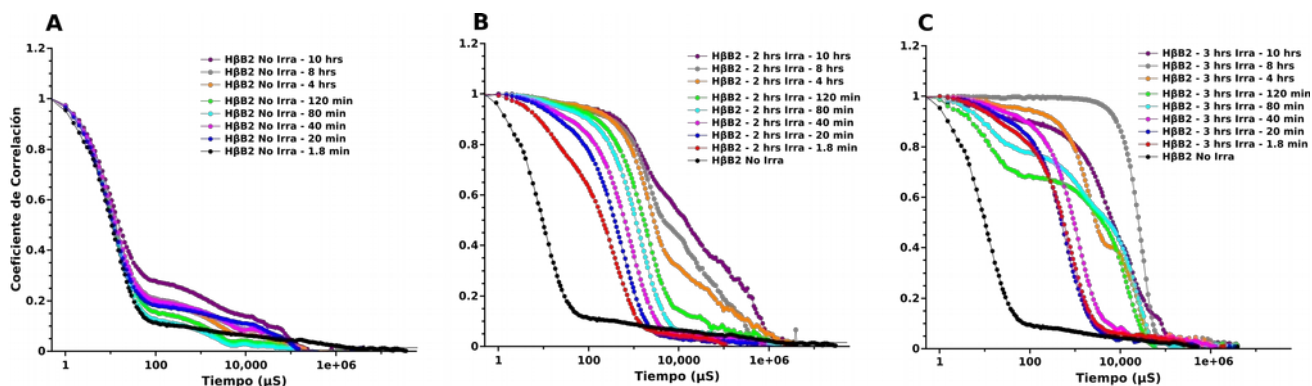


Figura 21: Cinética de agregación por DLS de la H β B2 no irradiada (A), 2 hrs irradiada (B) y 3 hrs irradiada (C). Coeficiente de correlación de la H β B2 de la cinética cada 20 minutos hasta las 2 horas, además se muestran las 4, 8 y 10 horas. La concentración de la proteína fue 50 μ M, la temperatura empleada fue de 37 $^{\circ}$ C grados.

Por la técnica de DLS se puede estimar el radio hidrodinámico (Rh) de partículas que se encuentran en solución, con lo cual se continuó a evaluar el tamaño aproximado de los agregados de la H β B2 que se formaron durante las 12 horas de la cinética.

En la figura 22 se representa el Rh (eje y_1) con respecto al tiempo de la H β B2 no irradiada y el porcentaje de intensidad de la señal detectada (eje y_2) durante todo el experimento. Estos resultados muestran que la H β B2 no irradiada presenta un Rh de \sim 3.5 nm durante todo el tiempo de la cinética y está representado entre el 70 y 80 % de la intensidad de la señal (figura 22-A). Asimismo, se determinó una segunda población la cual está representada entre un 20 y 30 % del porcentaje de la señal y correspondería a un oligómero de entre 8 y 15 nm, (figura 22-B).

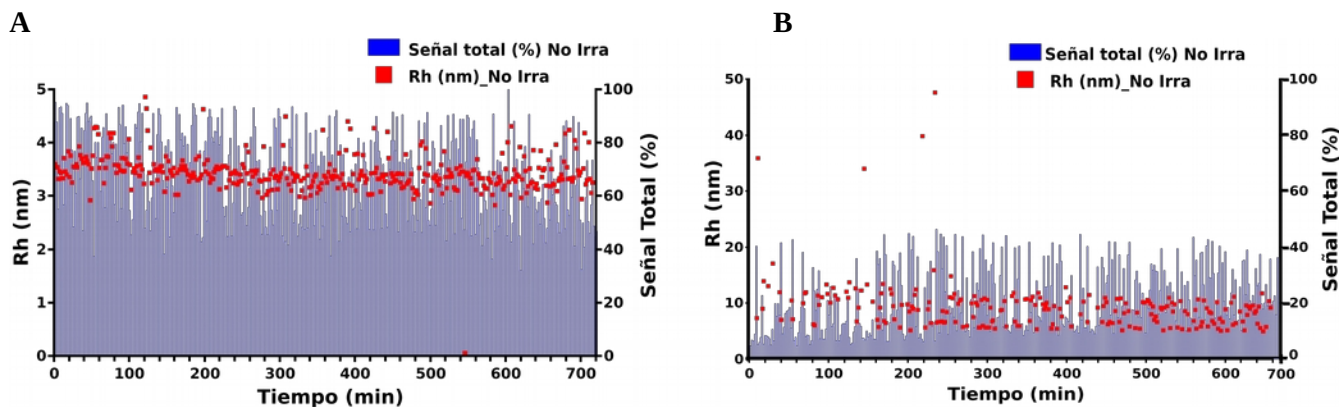


Figura 22: Radio hidrodinámico (Rh) de la H β B2 no irradiada. **A:** El Rh de la H β B2 teniendo en cuenta el 70 al 80 % de la intensidad de la señal durante 12 horas de la cinética. **B:** El Rh de la H β B2 teniendo en cuenta el 20 y 30 % de la intensidad de la señal durante 12 horas de la cinética.

También se evaluó el Rh y la población con respecto al tiempo de la H β B2 irradiada 2 hrs. En la figura 23-A se muestra que la H β B2 irradiada 2 hrs presenta un Rh aproximadamente de 130 nm al inicio de la cinética. El tamaño del Rh incrementó gradualmente durante los primeros 200 minutos del experimento, siendo el máximo tamaño de aproximadamente de 750 nm y está representado por el 100 % de la intensidad de la señal (población). Después de los 200 minutos de la cinética, la señal del Rh de los agregados empezó a disminuir gradualmente a un tamaño de aproximadamente de 200 nm y el porcentaje de la intensidad de la señal disminuyó hasta un 60 %. Además, se evaluó el Rh y la población de la H β B2 irradiada 3 hrs y se observó un comportamiento semejante.

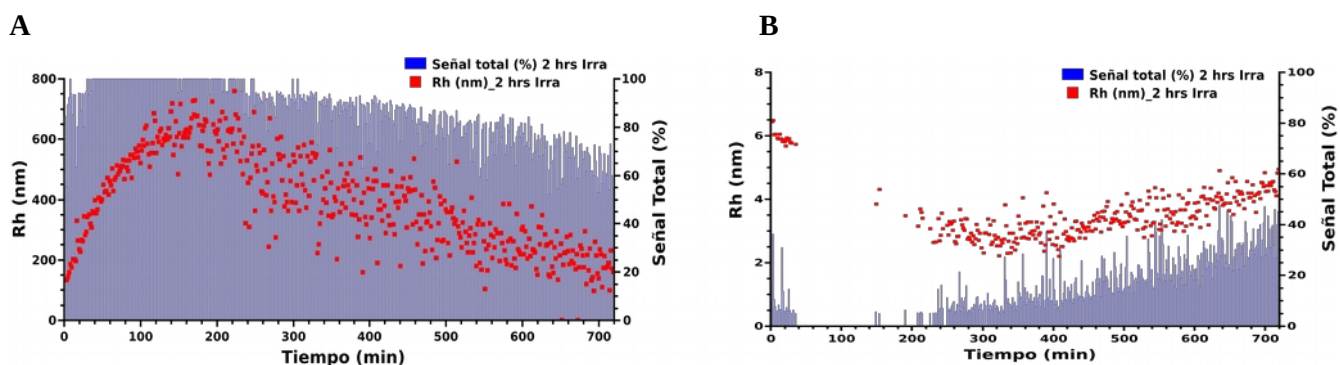


Figura 23: Cinética del radio hidrodinámico (Rh) de la H β B2 irradiada 2 hrs. **A:** El Rh de la H β B2 teniendo en cuenta el 70 al 80 % de la intensidad de la señal durante 12 horas de la cinética. **B:** El Rh de la H β B2 teniendo en cuenta el 20 y 30 % de la intensidad de la señal durante 12 horas de la cinética.

Para obtener información sobre los tamaños de los agregados de la H β B2 inducidos por la radiación en el tiempo, los datos se analizaron con el software SEDFIT. Como referencia, se calculó el coeficiente de difusión traslacional hidrodinámico predicho por el Software Hullrad (Fleming y Fleming., 2018) del monómero usando el PDB: 1YTQ y este arrojó que el Rh = 2.48 nm. Para el dímero de la H β B2 se reportó previamente por estudios experimentales que el Rh es de \sim 3.1 nm (Michiel y col., 2010).

En la tabla 2 se muestra el Rh calculado por SEDFIT de varios tiempos de las cinéticas por DLS de la H β B2 no irradiada, 2 y 3 hrs irradiada. A los 1.8 min de la cinética se encontró que el 94.7 % de la señal total corresponde a un Rh aparente de \sim 3.6 nm para la H β B2 no irradiada. A los 20 min. de la cinética se observa la especie más abundante representada por el 85.8 % de la señal total corresponde a un Rh aparente de \sim 3.8 nm.

En la medición a las 10 hrs de la cinética se observa una solución polidispersa, con al menos dos especies diferentes. El 75.8 % de la señal total corresponde a un Rh aparente de \sim 8.4 nm (tabla 2). La segunda población tiene un radio aparente de alrededor de 307 nm y corresponde al 25.2 % de la señal total (datos no mostrados).

En las mediciones del Rh de la H β B2 irradiada 2 hrs en todos los tiempos analizados, los valores indican que es una solución monodispersa, con una única especie, que está representada por el 100 % de la señal total. A los 1.8 min de la cinética se observa un Rh aparente de \sim 135.5 nm, a los 20 min presenta un Rh de \sim 209.6 nm y a las 2 horas de la cinética se observa un Rh de \sim 444.5 nm. A las 10 horas de la cinética el Rh aparente fue de alrededor de 812 nm y corresponde al 100 % de la señal total (tabla 2).

Las mediciones del Rh de la H β B2 irradiada 3 hrs en todos los tiempos analizados, los valores indican también una solución monodispersa, con una única especie, que está representada por el 100 % de la señal total. Se observó que a los 1.8 min de la cinética la H β B2 presenta un Rh de \sim 238 nm. A los 20 min de la cinética los agregados presentan un Rh de \sim 330.6 nm y a las 2 horas de la cinética se observa un Rh de \sim 1050 nm. A las 4 horas de la cinética el Rh aparente fue de alrededor de \sim 945 nm y corresponde al 100 % de la señal total y a las 10 horas el Rh calculado fué de \sim 1446 nm (tabla 2).

Tiempo de la cinética min/hrs	HβB2 – No Irradiada		HβB2 – 2 hrs Irradiada		HβB2 – 3 hrs Irradiada	
	Rh (nm)	Intensidad señal (%)	Rh (nm)	Intensidad señal (%)	Rh (nm)	Intensidad señal (%)
1.8 min	3.6	94.7	135.5	100	238	100
20 min	3.8	85.8	209.6	100	330.6	99
40 min	3.8	95	269	95	370	100
80 min	3.1	85	551	96	525	100
2 hrs	3.6	85.9	444.5	100	1050	100
4 hrs	3.5	92	787.7	100	945	100
10 hrs	8.4	75.8	812	100	1446	98

Tabla 2: Radio hidrodinámico de diferentes especies obtenidas por análisis de DLS en diferentes tiempos. Para calcular el Rh del dímero y de los agregados de la HβB2, se realizó un análisis de distribución de tamaño empleando el software SEDFIT.

7.7. Cinética de desplegamiento de la HβB2 por espectroscopía de fluorescencia.

En este trabajo también se midió la cinética de desplegamiento de la HβB2 no irradiada, 2 hrs y 3 hrs irradiada a 37 °C durante 12 horas por fluorescencia. En la figura 24 se muestran algunos espectros de fluorescencia (1, 100, 200, 300, 400, 500, 600 y 700 min) de la HβB2 no irradiada. Se muestran los espectros de la HβB2 no irradiada y se observa como el máximo de emisión se mantiene a 332 nm durante toda la cinética. Este resultado indica que la proteína se mantiene plegada. Además, se puede observar que la I.F. no disminuye durante el tiempo del experimento.

Por el contrario, en la HβB2 irradiada 2 hrs (figura 25) se puede observar una disminución en la I.F. inmediatamente después de irradiar (1 min, figura 25-A). A partir del minuto 100, la I.F. fue incrementando gradualmente hasta los 700 minutos, siendo este espectro similar al espectro de la HβB2 no irradiada (figura 25-B y 25-C). Adicionalmente, se midió la cinética de desplegamiento de la HβB2 3 hrs irradiada a 37 °C durante 12 horas. En la figura 26 se muestran algunos espectros de fluorescencia (1, 100, 200, 300, 400, 500, 600 y 700 min) de la HβB2 irradiada 3 hrs. Se puede observar una disminución en la I.F. inmediatamente después de irradiar (1 min.). A partir del minuto 100, la I.F. se incrementó y se mantuvo hasta los 700 minutos. Estos resultados muestran como la radiación provoca un apagamiento de la fluorescencia de los triptófanos.

Además, en los espectros de la H β B2 irradiada 2 y 3 hrs se observa que a lo largo de todo el experimento el máximo de fluorescencia no se corre a 350 nm lo que sugiere que la proteína no se despliega completamente. El corrimiento del máximo es a 340 nm, esto pudiera indicar que existe algún cambio en el ambiente químico de los triptófanos, que puede traducirse en la existencia de alguna población de proteína desplegada o en un desplegamiento parcial.

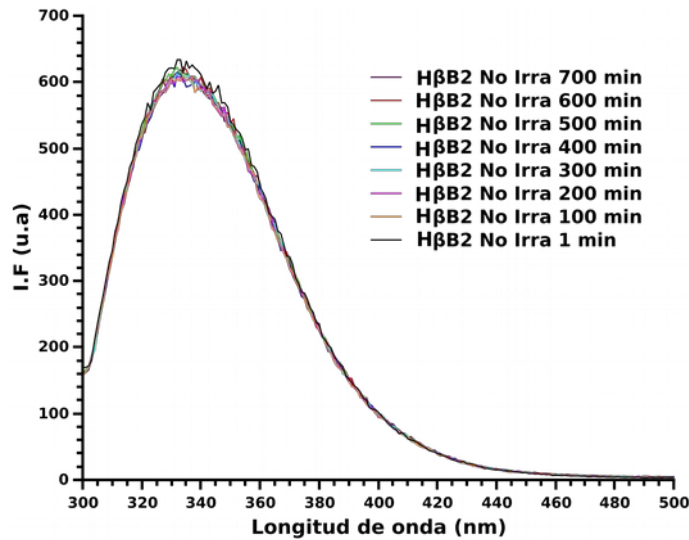


Figura 24: Espectro de fluorescencia de la H β B2 no irradiada a 37 °C durante 12 horas. Se representan los espectros correspondientes a los minutos 1, 100, 200, 300, 400, 500 600 y 700. La concentración de la H β B2 fue 50 μ M.

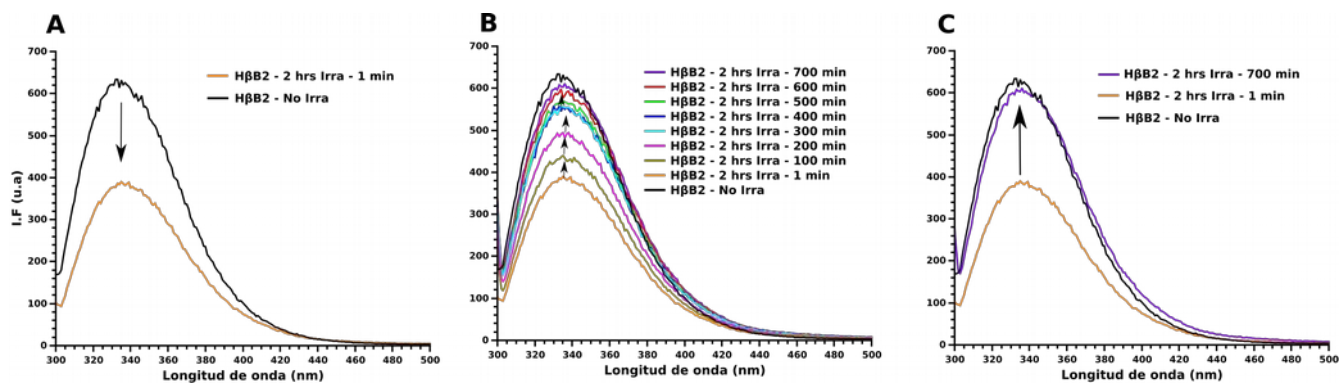


Figura 25: Espectros de fluorescencia de la HβB2 2 hrs irradiada a 37 °C durante 12 horas. Se representan los espectros correspondientes a los minutos 1, 100, 200, 300, 400, 500 600 y 700. La concentración de la HβB2 fue 50 μM.

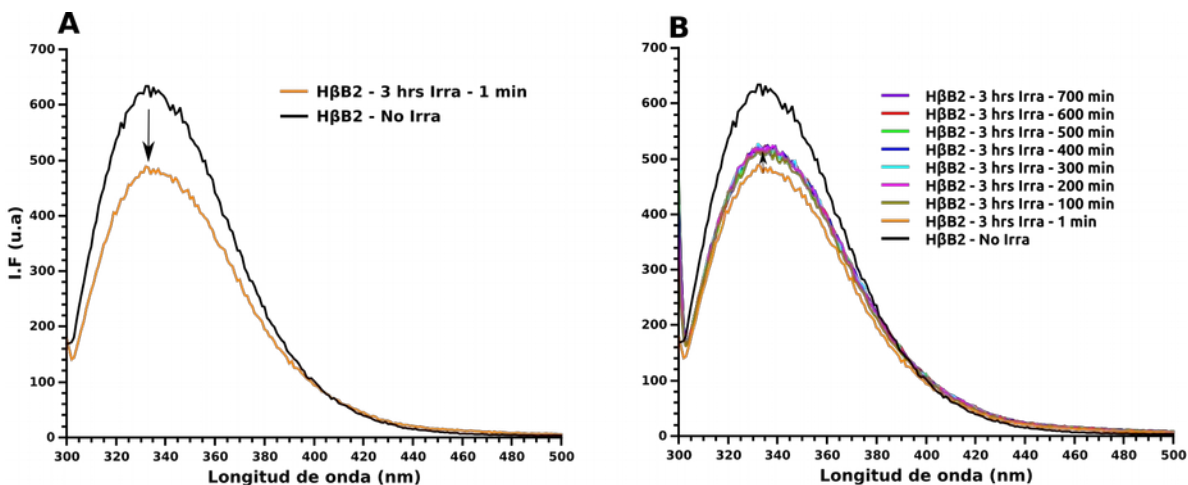


Figura 26: Espectro de fluorescencia de la HβB2 3 hrs. irradiada a 37 °C durante 12 horas. Se representan los espectros correspondientes a los minutos 1, 100, 200, 300, 400, 500 600 y 700. La concentración de la HβB2 fue 50 μM.

El porcentaje de desplegamiento es más fácil observado al representar la relación de I.F. (350/332 nm) con respecto al tiempo para la HβB2. La relación de la I.F. entre proteína desplegada (350 nm) y plegada (332 nm) en el tiempo permite determinar también que la proteína se mantiene plegada a lo largo de todo el experimento.

El valor de la relación de la I.F. de la HβB2 no irradiada estuvo entre 0.85 – 0.88. Mientras que en la HβB2 irradiada 2 hrs (figura 27) y 3 hrs (figura 28) se observa un aumento de la relación entre 0.9 y 0.94, lo que apunta hacia el hecho de que pudiera existir alguna población de proteína desplegada.

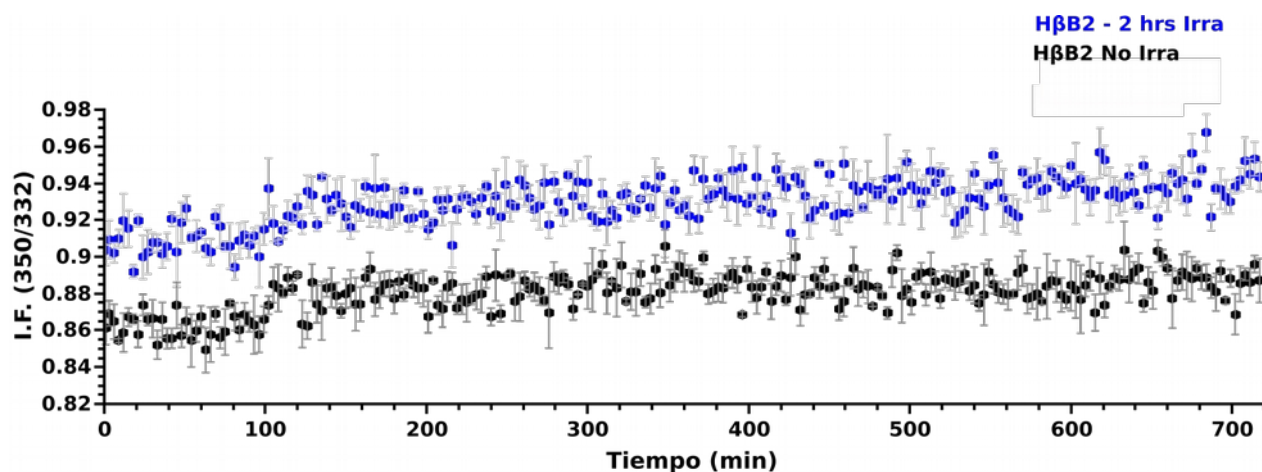


Figura 27: Relación de la I.F. (350/332 nm) con respecto al tiempo de la HβB2 irradiada 2 hrs y no irradiada a 37 °C durante 12 hrs. La longitud de onda de excitación fue de 295 nm, se colectaron los valores de longitud de onda de emisión a 332 y 350 nm y se calculó posteriormente la relación de I.F. (350/332).

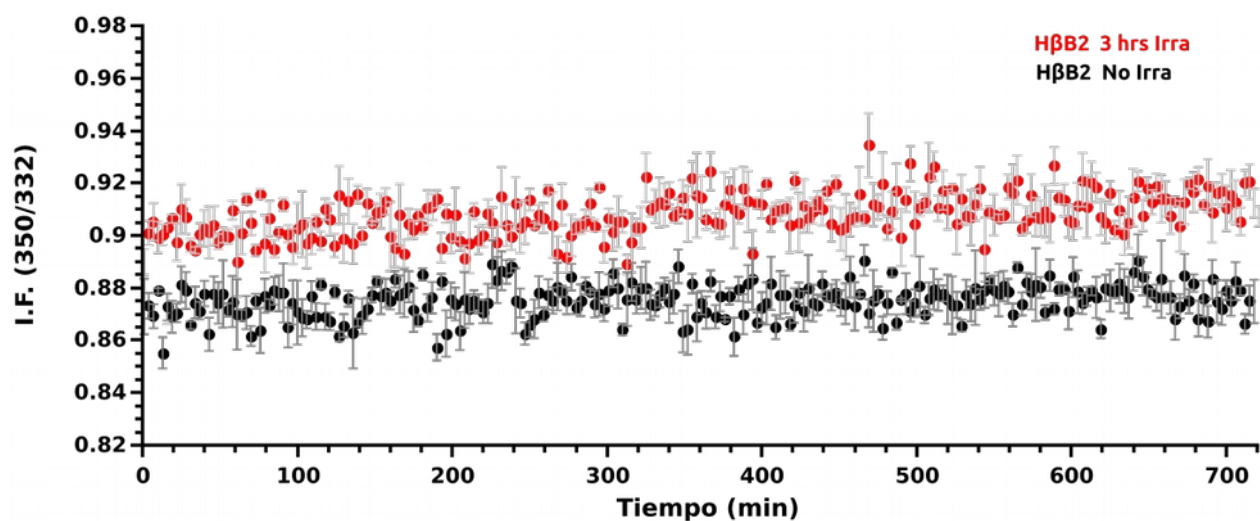


Figura 28: Relación de la I.F. (350/332 nm) con respecto al tiempo de la HβB2 irradiada 3 hrs y no irradiada a 37 °C durante 12 hrs. La longitud de onda de excitación fue de 295 nm, se colectaron los valores de longitud de onda de emisión a 332 y 350 nm y se calculó posteriormente la relación de I.F. (350/332).

7.8. Ensayos de espectroscopía de fluorescencia para evaluar el efecto de la radiación UVB en la oxidación de los triptófanos de la HβB2.

Paralelamente, se tomaron espectros de la I.F. de moléculas derivadas de la oxidación del triptófano, OH-kinurenina (OH-K) y N-acetil-triptófano-amida (NATA). Para la OH-K se utilizó 310 nm como

longitud de onda de excitación y para el NATA 317 nm. Se tomaron los espectros de emisión de la proteína entre los 335 y 500 nm para ambas moléculas.

Se evaluó el efecto de la radiación en la formación de OH-K y del NATA en la H β B2 no irradiada y de la H β B2 irradiada 2 y 3 hrs. En las figuras 29-A y 29-B se muestran los espectros de la I.F. de la OH-K y el NATA, respectivamente. La OH-K y el NATA tienen un máximo de emisión a 370 y 380 nm, respectivamente. En ambos espectros de emisión se observa que la radiación UVB provoca un incremento de la I.F. de la OH-K y del NATA en la H β B2 a 2 y 3 hrs de radiación con respecto a la proteína no irradiada. El efecto de la radiación es mayor en la formación de la OH-K, indicando que la radiación induce la formación de OH-K y de NATA, moléculas derivadas de la oxidación del triptófano.

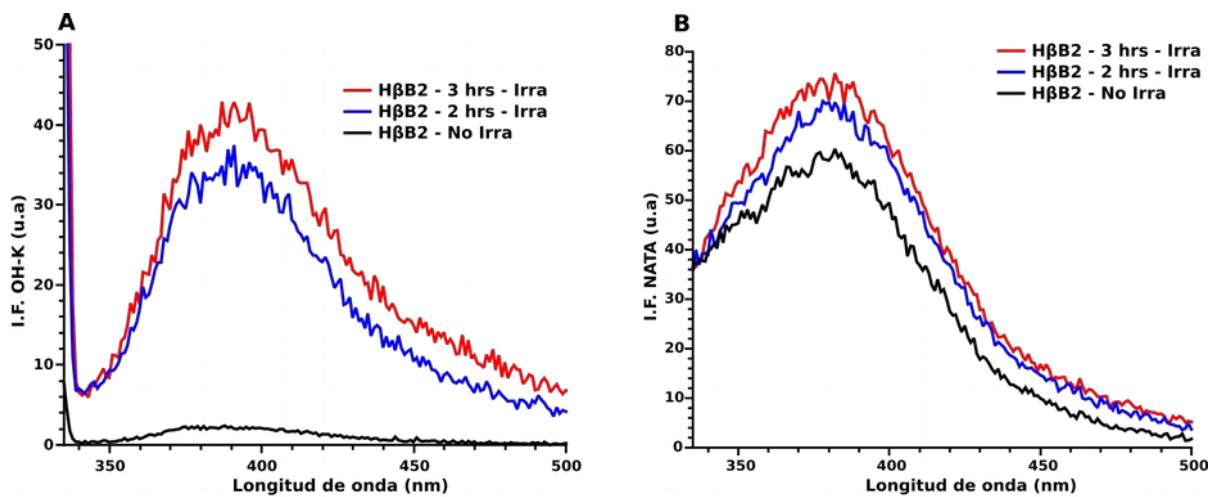


Figura 29: Espectros de fluorescencia de productos derivados de la oxidación del triptófano de la H β B2 irradiada 2 y 3 hrs y no irradiada a 37 °C. **A:** OH-kinurenina (OH-K). **B:** N-acetil-triptófano-amida (NATA). Se representan los espectros correspondientes a la H β B2 inmediatamente después de irradiar. Para la OH-K se utilizó 310 nm como longitud de onda de excitación y para el NATA 317 nm. Se tomaron los espectros de emisión de la proteína entre los 335 y 500 nm para ambas moléculas.

En los resultados anteriores se mostró que la radiación a 2 y 3 hrs, provoca la disminución de la I.F. del triptófano inmediatamente después de irradiar. Asimismo, se observa el incremento de la I.F. de la OH-K y del NATA las cuales son moléculas derivadas de la oxidación del triptófano. Estos resultados pueden indicar que la radiación estaría provocando la oxidación de los triptófanos en la H β B2.

7.9. Cinética de fluorescencia de productos derivados de la oxidación del triptófano de la H β B2 irradiada 2 hrs y no irradiada.

Se realizaron simultáneamente cinéticas de la fluorescencia del triptófano y moléculas derivadas de la oxidación del triptófano: Kyn, OH-Kyn, y NATA durante 12 hrs de la H β B2 irradiada 2 hrs y no irradiada. Para evaluar la fluorescencia del triptófano se excitó a una longitud de onda de 295 nm y se tomaron los datos de la I.F. a 332 nm. Para la Kyn se excitó a 350 nm y se recolectaron los datos de la I.F. a 440 nm. Para la OH-Kyn se utilizó 310 nm como longitud de onda de excitación y se tomaron los datos de la I.F. de la emisión a 370 nm y para el NATA se utilizó 317 nm como longitud de onda de excitación y se tomaron los datos de la I.F. de la emisión a 380 nm.

En la figura 30-A se representa la I.F. del triptófano a 332 nm irradiada 2 hrs y no irradiada. Se observa que la proteína no irradiada se mantiene constante durante el tiempo de cinética, mientras que la I.F. de la H β B2 irradiada 2 hrs disminuyó, lo que sugiere el hecho de que la radiación provoca la disminución de proteína plegada o los residuos de triptófanos se estarían oxidando (figura 30-A).

En las figuras 30-B, 30-C y 30-D se muestran las cinéticas del NATA, de Kyn y OH-Kyn, respectivamente. Durante toda la cinética se observa que la H β B2 irradiada 2 hrs presenta un incremento de NATA, Kyn y OH-Kyn con respecto a la H β B2 no irradiada. Estos resultados sugieren que la radiación induce la formación de NATA, Kyn y OH-Kyn las cuales son moléculas derivadas de la oxidación del triptófano.

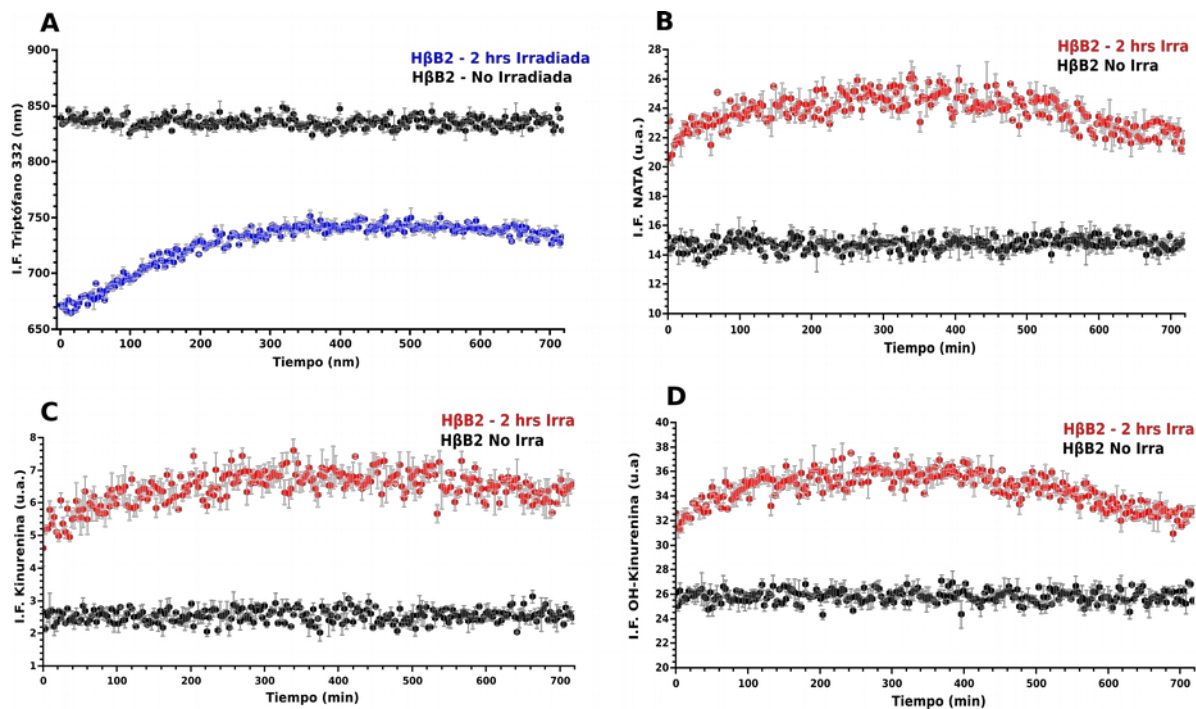


Figura 30: Cinética durante 12 hrs de fluorescencia de los productos derivados de la oxidación del triptófano de la HβB2 irradiada 2 hrs y no irradiada a 37 °C. **A:** I.F. de proteína plegada (332 nm), **B:** NATA, **C:** Kinurenina. **D:** OH-kinurenina. La concentración de la HβB2 fue de 50 μM.

7.10. Cinética de desplegamiento por fluorescencia de la cristalina HβB2 en presencia del ANS.

Evaluamos la I.F. del ANS en la HβB2 no irradiada, 2 hrs y 3 hrs irradiada para evaluar la exposición de residuos hidrofóbicos o cambios estructurales. El ANS se une a los residuos hidrofóbicos expuestos en la proteína indicando un cambio estructural y tiene un máximo de emisión a los 480 nm.

En la figura 31 se representa el espectro de emisión y se observa que la radiación provoca un incremento de la I.F. del ANS a las 2 y 3 hrs de radiación con respecto a la proteína no irradiada, siendo mayor a los 3 hrs de radiación. Estos resultados sugieren que la radiación provoca el incremento de la I.F. del ANS inmediatamente después de irradiar a la HβB2. Este resultado adicionalmente indica que la radiación a 2 y 3 hrs puede provocar cambios estructurales que estarían acarreado a la exposición de los residuos hidrofóbicos en la superficie de la HβB2.

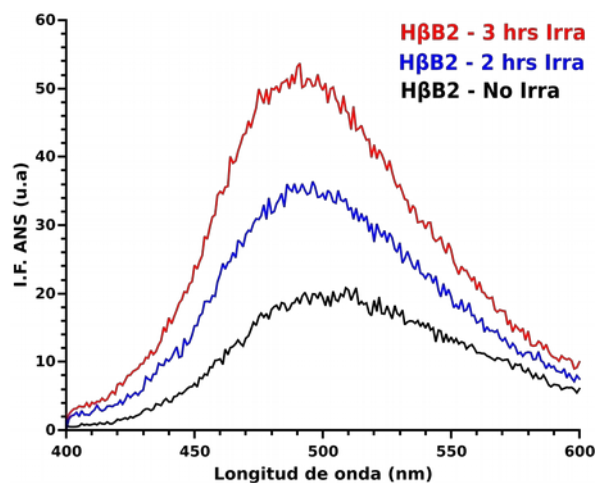


Figura 31: Espectro de fluorescencia extrínseca de la HβB2 usando ANS a 37 °C. Se representan los espectros correspondientes a la HβB2 inmediatamente después de irradiar 2 hrs, 3 hrs y de la HβB2 no irradiada. La longitud de onda de excitación del ANS que se utilizó fue 380 nm y se tomó el espectro de emisión de la proteína entre los 400 y 600 nm. Se utilizó 3.75 mM del ANS y 50 μM de la proteína y se almacenó durante 30 minutos en la oscuridad, previo a la medición.

Adicionalmente, se realizaron cinéticas de fluorescencia del ANS a 480 nm para la HβB2 irradiada 2 hrs y no irradiada con respecto al tiempo (figura 32). Todos los experimentos de las cinéticas se realizaron a 37 °C durante 12 hrs.

Estos resultados muestran que la radiación a las 2 hrs provoca un incremento de la I.F. del ANS con respecto a la proteína no irradiada. Al inicio de la cinética la HβB2 irradiada 2 hrs tiene una I.F. del ANS tres veces más alta que la HβB2 no irradiada. La I.F. del ANS en la HβB2 irradiada 2 hrs incrementa gradualmente con respecto al tiempo siendo mayor a los 200 min de la cinética. Después de este tiempo la I.F. empieza a disminuir y esto puede deberse a la precipitación de los agregados grandes que provoca la radiación. La I.F. del ANS en la HβB2 no irradiada también muestra un incremento gradual con respecto al tiempo siendo mayor a los 420 min de la cinética.

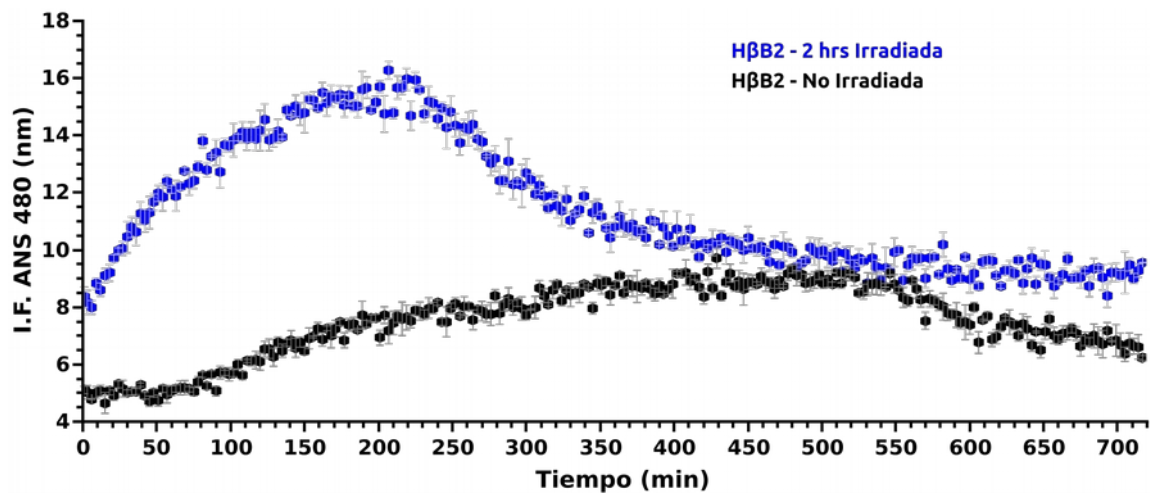


Figura 32: Cinética de fluorescencia extrínseca a 480 nm de la HβB2 usando ANS a 37 °C. Se representan la I.F. correspondientes a la HβB2 irradiada 2 hrs y de la HβB2 no irradiada. La longitud de onda de excitación del ANS que se utilizó fue 380 nm y se recolectó el espectro de emisión de la proteína a 480 nm. Se utilizó 3.75 mM del ANS y 50 μM de la proteína y se almacenó durante 30 minutos en la oscuridad, previo a la medición.

7.11. Despliegamiento térmico de la HβB2 por espectroscopía de fluorescencia.

El despliegamiento térmico por fluorescencia es un parámetro que se utiliza para determinar la temperatura a la cual la mitad de las moléculas de proteína se encuentran plegadas. Primero se realizó el despliegamiento térmico y se determinó la T_m de la HβB2 no irradiada. En la figura 33 se relaciona la I.F. (350/332) con respecto a la temperatura. En los primeros experimentos la temperatura fue aumentada en el rango de 25 a 90 °C y se puede observar claramente que la proteína se mantiene plegada durante un amplio rango de temperatura de 25 a 60 °C (figura 33).

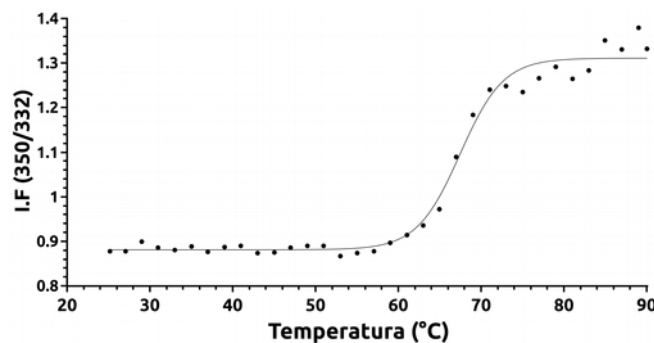


Figura 33: Despliegamiento térmico de la HβB2 por espectroscopía de fluorescencia. Se empleó una longitud de onda de excitación de 295 nm, se colectaron los valores de longitud de onda de emisión a 332 y 350 nm y se calculó posteriormente la relación de I.F. (350/332). Se aumentó la temperatura 2 °C/min, de 25 a 90 °C. Para el cálculo de la T_m se ajustaron los datos a una sigmoide. La concentración de la HβB2 fue 50 μM.

Posteriormente, se realizó otro desplegamiento térmico y se determinó la T_m de la H β B2 irradiada 2 hrs, y 3 hrs. En la figura 34-A se relacionan la I.F. (350/332) con respecto a la temperatura y se puede observar que la proteína irradiada 2hr se mantiene plegada durante un amplio rango de temperatura (37-58 °C), mientras que la H β B2 irradiada 3 hr se mantuvo plegada hasta ~52 °C (figura 34-B).

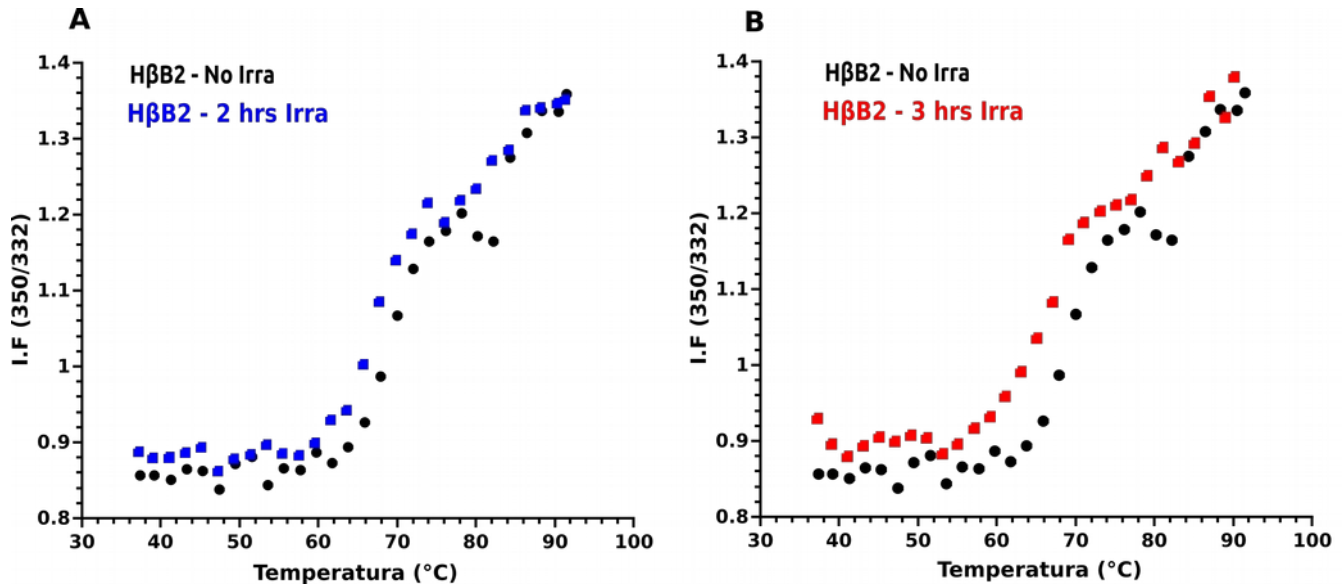


Figura 34: Desplegamiento térmico de la H β B2 por espectroscopía de fluorescencia. **A:** La H β B2 no irradiada y 2 hrs irradiada. **B:** La H β B2 no irradiada y 3 hrs irradiada. Se empleó una longitud de onda de excitación de 295 nm, se colectaron los valores de longitud de onda de emisión a 332 y 350 nm y se calculó posteriormente la relación de I.F. (350/332). Se aumentó la temperatura 2 °C/min, de 37 a 90 °C. Para el cálculo de la T_m se ajustaron los datos a una sigmoide. La concentración de la H β B2 fue 50 μ M.

Además, se calculó la T_m entre dos rangos de temperatura: desde 37 °C – 75 °C y desde 75 °C – 90 °C (tabla 3), debido a que esta proteína tiene dos dominios y ha sido reportado (Evans y col., 2008) que primero se despliega el dominio N (rango 30-70 °C) y después el dominio C (rango 70-90 °C). Los datos fueron ajustados a una sigmoide empleando la ecuación de Boltzmann. En la tabla 3 se muestran los valores de la T_m obtenidos para la H β B2 no irradiada, 2 hrs y 3 hrs irradiada. Se observa que en los dos rangos de temperatura la radiación a las 2 hrs provocó la disminución de la T_m de 2 °C con respecto a la proteína no irradiada. Para el caso de la H β B2 irradiada 3 hrs sólo se logró ajustar los datos y determinar la T_m de 37 °C – 75 °C y se encontró que la radiación en este tiempo provoca una disminución de la T_m de ~ 2.4 °C con respecto a la H β B2 no irradiada.

Proteína / Rango Temperatura	HβB2 – No Irra	HβB2 – 2hrs Irra	HβB2 – 3hrs Irra
	T _m	T _m	T _m
37 °C – 75 °C	68.1 ± 1 °C	66 ± 2 °C	65.7 ± 1 °C
75 °C - 90 °C	82.9 ± 1 °C	80.9 ± 2 °C	-----

Tabla 3: Valores de T_m obtenidos para la HβB2 irradiada 2 hrs, 3 hrs y no irradiada.

7.12. Despliegamiento térmico de la HβB2 por espectroscopía de fluorescencia en presencia del ANS.

Se realizó el despliegamiento térmico (37 - 90 °C) de la HβB2 irradiada 2 hrs y no irradiada (figura 35) en presencia del ANS. La temperatura se fue incrementando 2 °C / min.

En la figura 35 se relacionan la I.F. del ANS (480 nm) con respecto a la temperatura y se puede observar claramente que la I.F. del ANS se mantiene constante (~ 8 u.a) durante un amplio rango de temperatura (37- 60 °C) para la HβB2 irradiada no irradiada. Para el caso de la HβB2 irradiada 2 hrs la I.F. del ANS se mantiene constante (~ 11 u.a) hasta los 56 °C. Después de esta temperatura, se observa que la I.F. del ANS incrementó levemente y a los 70 °C alcanzó su máximo, similar a la proteína no irradiada.

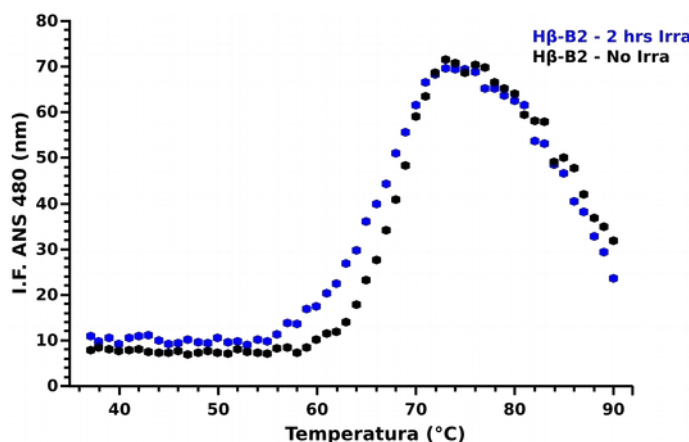


Figura 35: Despliegamiento térmico de la HβB2 irradiada 2 hrs y no irradiada por espectroscopía de fluorescencia en presencia de ANS (3.75 mM). La concentración de la HβB2 fue 50 μM. Se empleó una longitud de onda de excitación de 380 nm, se colectaron los valores de longitud de onda de emisión a 480 nm.

7.13. Despliegamiento térmico de la H β B2 por DLS.

En la figura 36-A y 36-B se muestran los correlogramas del despliegamiento térmico de la H β B2 por DLS de la H β B2 no irradiada y 2 hrs irradiada, respectivamente. En estos experimentos el rango de temperatura fue de 37 a 76 °C.

En la figura 36-A se puede observar que la proteína no irradiada mantiene el mismo tamaño entre los 37 °C hasta los 46 °C. Después de 49 °C la proteína empieza a formar agregados grandes de manera gradual hasta los 76 °C y esto lo hace un proceso no reversible. Para el caso de la H β B2 irradiada 2 hrs a 37 °C forma agregados grandes a una temperatura mas baja (40 °C) con respecto a la proteína no irradiada (figura 36-B). Después de los 37 °C se incrementa el tamaño de los agregados de la H β B2 hasta los 76 °C, siendo de manera gradual hasta los 58 °C.

Inesperadamente, los resultados del despliegamiento por espectroscopía de fluorescencia y por DLS no muestran los mismos resultados, indicado la formación de moléculas grandes a temperaturas más bajas por DLS y se observan diferencias con la proteína irradiada.

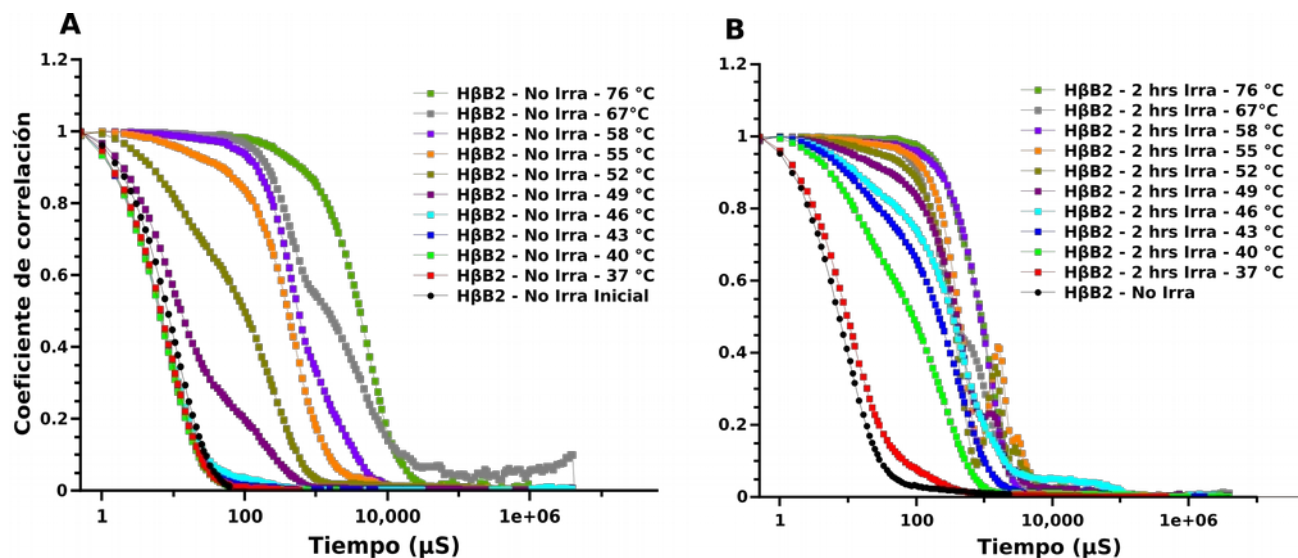


Figura 36: Despliegamiento térmico por DLS de la H β B2. **A:** Se representa el correlograma de la H β B2 no irradiada. **B:** Se representa el correlograma de la H β B2 irradiada 2 hrs. Se aumentó la temperatura 3 °C/min y la concentración de la H β B2 fue 50 μM.

Además, se calculó la temperatura media de agregación (T_a) desde 37 °C hasta los 64 °C para la H β B2 no irradiada y 2 hrs irradiada. La T_a de la H β B2 no irradiada fue de 54.2 °C, mientras que la T_a de la H β B2 irradiada 2 hrs fue de 51.9 °C. Se observa que en este rango de temperatura la radiación a las 2 hrs provocó la disminución de la T_a de 2.3 °C con respecto a la proteína no irradiada.

En la tabla 4 se muestran los valores del Rh calculados con SEDFIT de los agregados de la H β B2 no irradiada y 2 hrs irradiada a diferentes temperaturas del desplegamiento térmico por DLS. En todos los análisis se observaron espectros que indican una solución monodispersa, con una única especie, que representa 100 % de la señal total. En la H β B2 no irradiada a los 37 °C se observó que el 94.7 % de la señal total corresponde a un Rh aparente de ~3.65 nm. Desde 49 °C hasta 55 °C el tamaño del Rh en la H β B2 no irradiada fue incrementando hasta llegar a 378 nm a los 55 °C. En la H β B2 irradiada 2 hrs a los 37 °C se observó un Rh de 35.6 nm, y a los 40 °C el valor del Rh incrementó a 83.9 nm. Después, el Rh incrementó rápidamente y se observó un Rh de 357.4 nm y 519 nm para 49 °C y 52 °C, respectivamente (tabla 4).

Temperatura (°C)	H β B2 – No Irradiada		H β B2 – 2 hrs Irradiada	
	Rh (nm)	Intensidad señal (%)	Rh (nm)	Intensidad señal (%)
37	3.65	92,1	35.6	100
40	3.73	92	83.9	100
49	44.1	100	357.4	100
52	95.7	100	519	100
55	378	100	605	100

Tabla 4: Valores del Rh y de la intensidad de la señal de los agregados de la H β B2 no irradiada y 2 hrs irradiada a diferentes temperaturas del desplegamiento térmico por DLS. Para calcular el Rh del dímero y de los agregados de la H β B2, se realizó un análisis de distribución de tamaño empleando el software SEDFIT.

7.14. Desplegamiento químico de la cristalina H β B2 nativa inducido por Urea.

Para determinar la estabilidad química de la H β B2 se utilizó urea, aumentando la concentración de 0 a 4.5 Molar. En la figura 37-A se muestran los espectros de fluorescencia del triptófano después del desplegamiento químico por urea (0, 1.5, 2.5, 3.5 y 4.5 M) y se observa que la urea en todas las concentraciones empleadas provoca la disminución de la I.F. del triptófano, y no es dependiente de la concentración de este agente caotrópico. Sin embargo, la urea a 2.5 M provoca un desplazamiento del máximo de la longitud a 340 nm y a 3.5 M de urea el desplazamiento del máximo de la longitud es a 354 nm. Después de 3.5 M de urea la proteína parecería estar completamente desplegada y esto lo podemos observar porque a 4.5 M de urea se mantiene el valor del máximo a 353 nm.

Los datos de los espectros de la fluorescencia de cada uno de las concentraciones de urea fueron normalizados y se representan en la figura 37-B. En estos espectros de fluorescencia del triptófano se observa claramente que la urea a 2.5 M provoca un desplazamiento de 332 nm a 340 nm lo cual indican que la H β B2 podría estar parcialmente desplegada. A 3.5 M de urea también se observa que el máximo se desplaza a 353 nm lo cual es un indicativo que la proteína está desplegada completamente.

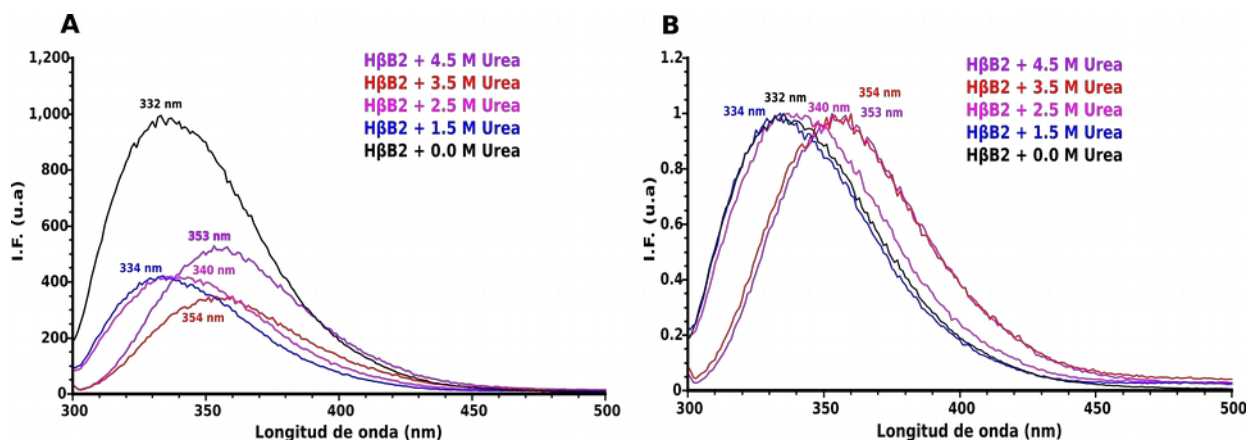


Figura 37: Despliegamiento químico de la H β B2 inducido por urea (0 – 4.5 M). Se evaluó la I.F. del triptófano por espectroscopía de fluorescencia. La concentración de la H β B2 fue 50 μ M. Se empleó una longitud de onda de excitación de 295 nm, se colectaron los valores de los espectros de 300 – 500 nm. **A:** Datos de la I.F. del triptófano. **B:** datos de la I.F. del triptófano normalizados.

En la figura 38 se muestran las curvas de despliegamiento químico por urea (0, 1.5 y 3.5 M) en presencia de ANS y se observa que el incremento de la I.F. del ANS es dependiente de la concentración de la urea. A mayor concentración de urea mayor es la I.F. del ANS siendo su máximo a 480 nm. Estos resultados indican que la urea provoca cambios conformacionales en la proteína acarreado a la exposición de los residuos hidrofóbicos en la superficie de la proteína.

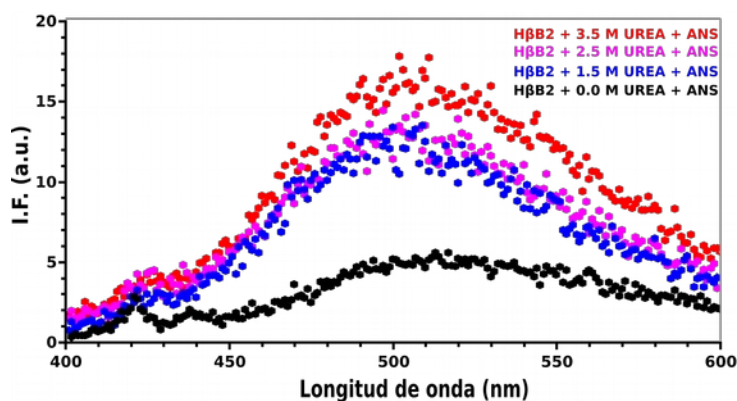


Figura 38: Despliegamiento químico de la H β B2 inducido por urea (0 – 3.5 M) en presencia de ANS. Inmediatamente se incubó la H β B2 50 μ M con 3.75 mM de ANS. Se evaluó la I.F. del ANS por espectroscopía de fluorescencia. Se empleó una longitud de onda de excitación de 380 nm, se colectaron los valores de los espectros de 400 – 600 nm.

8.0 RESULTADOS: PARTE III

"Efecto de los metales Zn(II) y Cu(II) en la agregación de la cristalina H β B2"

8.1. Cinética de agregación de la cristalina H β B2 por turbidez en presencia de Zn(II) y Cu(II).

Se evaluó el efecto de los metales Zn(II) y Cu(II) sobre la agregación de la H β B2 a diferentes concentraciones (0.5, 1, 1.5 y 2 equi.) para buscar la concentración mínima que provoque turbidez y/o cambios en el estado de plegamiento de la H β B2 en el tiempo. En la figura 39-A y 39-B se muestran las cinéticas por turbidez de la H β B2 nativa y expuesta al Zn(II) y al Cu(II) a 37 °C durante 2.5 horas.

En la figura 39-A se observa que la D.O. de la solución de la H β B2 expuesta a 2 equi. de Zn(II) incrementa rápidamente en los primeros 20 minutos hasta tener un máximo de D.O. de \sim 2.8. Después de los 30 minutos del experimento la D.O. disminuyó gradualmente. La H β B2 expuesta a 1.5 equi. de Zn(II) también incrementa rápidamente en los primeros 20 minutos hasta tener un máximo de \sim 3 y se mantiene constante hasta \sim 60 min. Después de los 60 minutos del experimento la D.O. disminuyó gradualmente. Para el caso de la H β B2 expuesta a 1 equi. de Zn(II) se observó un incremento lento de la D.O. y esta alcanzó un máximo de \sim 2.3 a los 55 minutos de la cinética. Después de este tiempo la D.O. disminuyó gradualmente, similar a la H β B2 expuesta a 1.5 equi. de Zn(II). Esta disminución ha sido observada anteriormente y se cree que es debida a la formación de precipitados en la solución.

En la H β B2 expuesta a 0.5 equi. de Zn(II) se observó un incremento lento de la D.O. y esta alcanzó un máximo de \sim 0.8 a los 36 minutos y después se mantuvo constante durante todo el tiempo de la cinética (figura 39-A).

La D.O. de la solución de la H β B2 expuesta a 2 equi. de Cu(II) incrementa gradualmente en los primeros 58 minutos hasta tener un máximo de D.O. de \sim 3.5. Después de los 55 minutos de la cinética se observaron fluctuaciones en los valores de la D.O. Después de los 100 minutos del experimento la D.O. disminuyó gradualmente. La H β B2 expuesta a 1.5 equi. de Cu(II) también incrementa gradualmente en los primeros 20 minutos hasta tener un máximo de \sim 1.8 y se mantiene constante hasta el final de la cinética. Para la H β B2 expuesta a 1 y 0.5 equi. de Cu(II) se observó un incremento lento de la D.O. y esta alcanzó un máximo de \sim 0.3 a los 30 minutos de la cinética y se mantuvo constante durante todo el tiempo del experimento (figura 39-B).

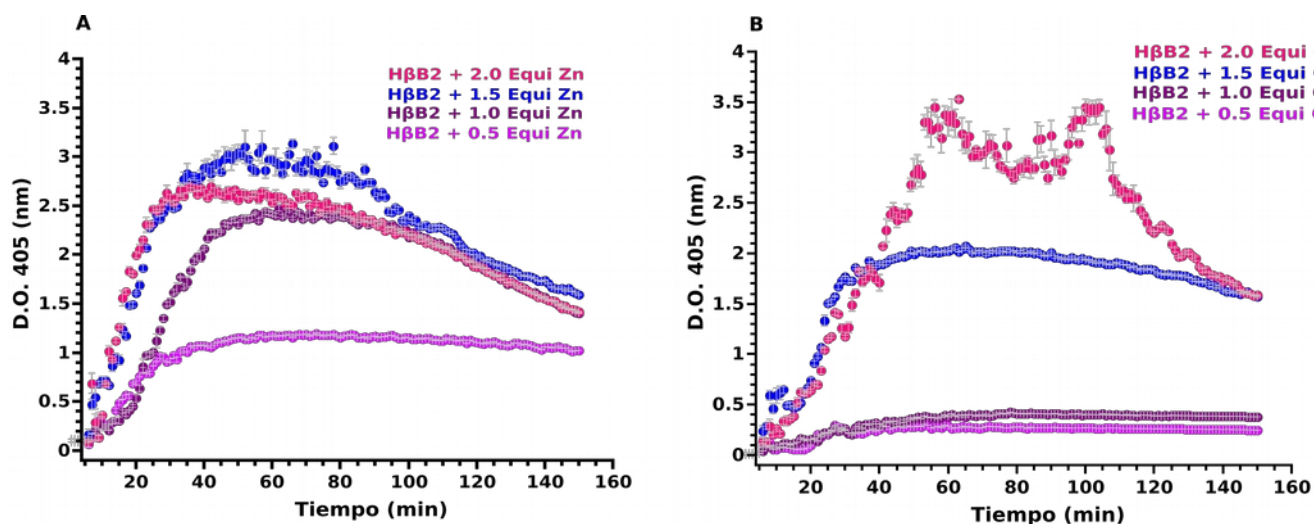


Figura 39: Cinética de la agregación por turbidez de la HβB2 expuesta al Zn(II) (A) y al Cu(II) (B) con diferentes equi (0.5, 1, 1.5 y 2). El experimento se realizó a 37 °C durante 150 minutos. La concentración de la proteína fue 50 μM.

Para evaluar si la formación de agregados es por la interacción de puentes de iones metálicos, utilizamos EDTA el cual es un quelante de metales. En la tabla 5 se muestra el porcentaje de la proteína soluble recuperada después de adicionar EDTA.

HβB2 / [Metales]	No EDTA		EDTA - 30 equi.		HβB2 recuperada con EDTA
	μM	mg/ml	μM	mg/ml	%
No metal	50	1.2	50	1.2	%
Zn 0.5 Equi	28	0.65	26.81	0.62	51.66
Zn 1.0 Equi	18.5	0.42	19.74	0.46	38
Zn 1.5 Equi	4.87	0.11	10.48	0.24	20
Zn 2.0 Equi	0.00	0.00	0.00	0.00	0.0
Cu 0.5 Equi	38.99	0.9	43.86	1.02	85
Cu 1.0 Equi	37.77	0.87	36.55	0.85	70.8
Cu 1.5 Equi	9.02	0.20	18.28	0.42	35
Cu 2.0 Equi	5.12	0.11	12.18	0.28	23

Tabla 5: Solubilidad de la HβB2 y porcentaje de proteína recuperada con 30 equi. de EDTA después de las cinéticas con 0.5, 1, 1.5 y 2 equi. de Zn(II) y Cu(II). El EDTA promueve la recuperación de proteína.

Con base en estos resultados se seleccionó 1.5 equi. de Cu(II) y Zn(II) debido a que la solución de la proteína presentaba turbidez inmediatamente después de adicionar los metales y después de 12 horas de

incubación a 37 °C. Además, se observó la formación de agregados grandes por DLS y se observaron cambios en los espectros de fluorescencia de la H β B2.

En la figura 40-A se muestran las cinéticas por turbidez de la H β B2 nativa y expuesta al Zn(II) a 37 °C durante 12 horas (gráfica insertada) y 5 horas, respectivamente. La solución de la proteína nativa alcanzó una D.O. máxima de ~ 0.07 . En la cinética se observa que la D.O. de la solución de la H β B2 expuesta al Zn(II) incrementa rápidamente en los primeros 10 minutos hasta tener un máximo de ~ 3.4 . Después de los 30 minutos del experimento la D.O. disminuyó gradualmente en la H β B2 expuesta al Zn(II). Esta disminución se cree que es debida a la formación de precipitados en la solución (figura 40-C). La figura 40-B representa los datos de los primeros 15 minutos de la cinética y la línea negra indica el ajuste de los datos a una ecuación exponencial.

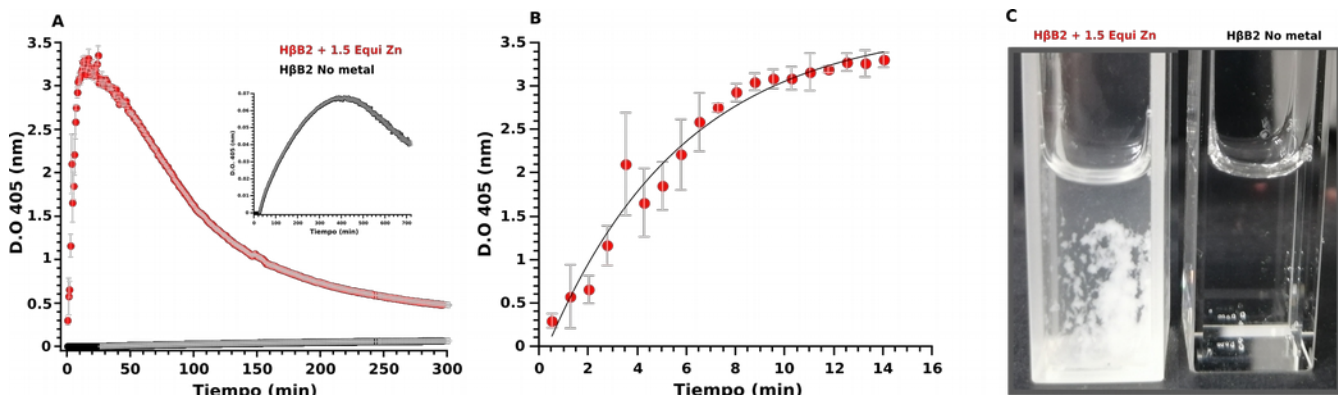


Figura 40: Cinética de la agregación por turbidez de la H β B2 expuesta al Zinc. **A:** El experimento se realizó durante 5 horas para la H β B2 expuesta al Zn(II) y para la H β B2 nativa (inserto) se realizó durante 12 hrs. **B:** Se representan los datos de los primeros 15 minutos de la cinética y la línea negra indica el ajuste de los datos a una ecuación exponencial. La concentración de la proteína fue 50 μ M y 1.5 equi. de Zn(II) a 37 °C. **C:** Fotografía de la solución de la proteína al finalizar la cinética de turbidez. En la proteína en presencia de 1.5 equi. de Zn(II) se observan grandes agregados que precipitaron.

En la figura 41-A se muestran las cinéticas por turbidez de la H β B2 nativa y expuesta al Cu(II) a 37 °C durante 12 horas (gráfica insertada) y 5 horas, respectivamente. En la cinética se observa que la D.O. de la solución de la H β B2 expuesta al Cu(II) incrementa rápidamente en los primeros 25 minutos hasta tener un máximo de ~ 2.1 . Después de los 25 minutos del experimento la D.O. de la H β B2 expuesta al Cu(II) se mantuvo constante hasta ~ 50 minutos y después disminuyó gradualmente hasta el final de la cinética. Esta disminución se cree que es debida a la formación de precipitados en la solución (figura 41-C). La figura 41-B representa los datos de los primeros 40 minutos de la cinética y la línea negra indica el ajuste de los datos a una ecuación sigmoidea.

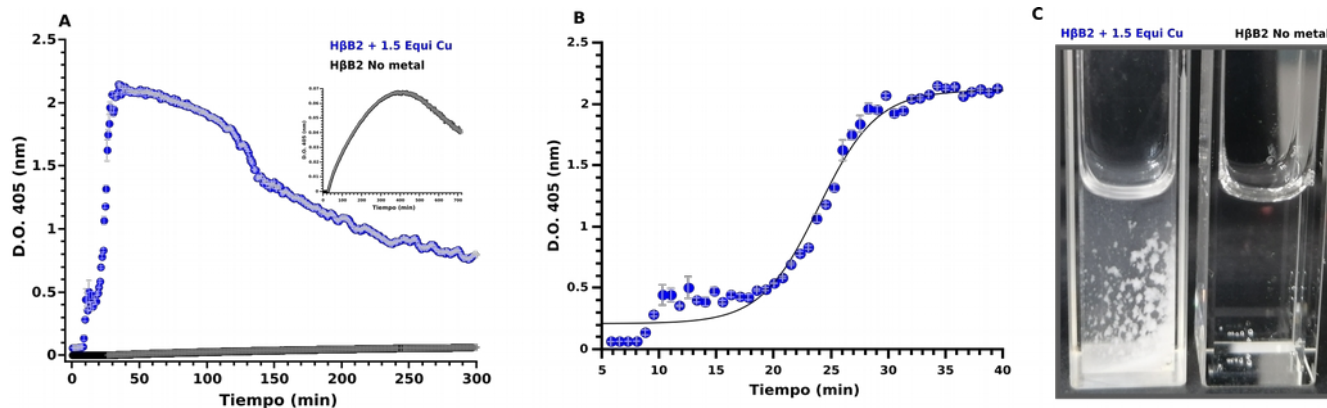


Figura 41: Cinética de la agregación por turbidez de la HβB2 expuesta al Cu(II). **(A):** El experimento se realizó durante 5 horas para la HβB2 expuesta al Cu y para la HβB2 nativa (inserto) se realizó durante 12 hrs. **(B):** Se representan los datos de los primeros 15 minutos de la cinética y la línea negra indica el ajuste de los datos a una ecuación sigmoide. La concentración de la proteína fue 50 μM y 1.5 equi. de Cu a 37 °C. **C:** Fotografía de la solución de la proteína al finalizar la cinética de turbidez. En la proteína en presencia de 1.5 equi. de Cu(II) se observan grandes agregados que precipitaron.

También se evaluó el efecto del EDTA en la formación de agregados y en la intensidad de dispersión de la luz de la HβB2 expuesta al Zn(II) y al Cu(II) (1.5 equi.). Se aplicaron 30 equi. de EDTA en los primeros minutos de la cinética de turbidez y se observó que la D.O disminuyó y la solución de la proteína se volvió menos turbia a la luz (figura 42).

Al momento de adicionar los 30 equi. de EDTA se observa que la D.O disminuye con mayor rapidez en la proteína expuesta al Zn(II) (figura 42-A) que en la proteína expuesta al Cu(II) (figura 42-B). Cuando se midió la concentración proteica se observó que con el EDTA se recupera un alto porcentaje de proteína (figura 42-C).

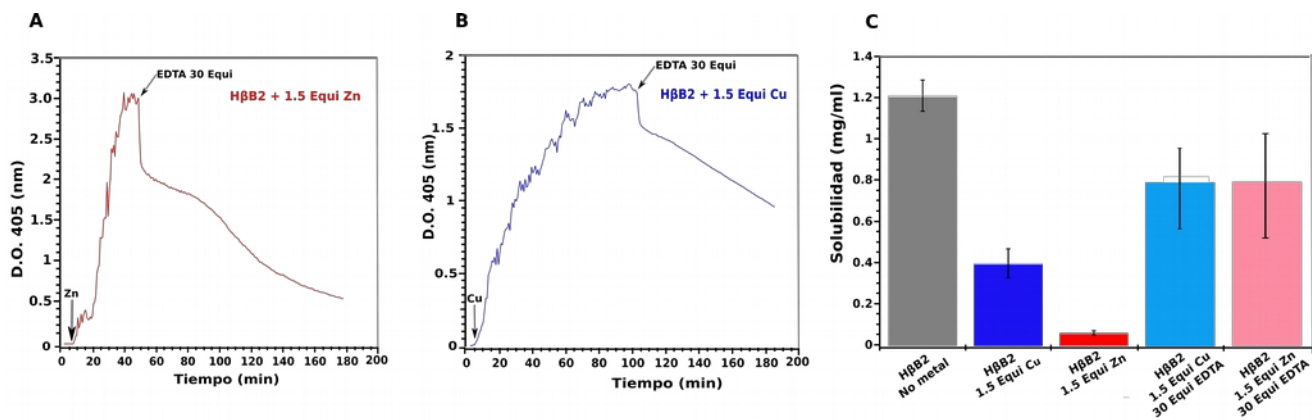


Figura 42: Cinética de la agregación por turbidez de la HβB2 expuesta al Zn(II) (A) y al Cu. (B). El experimento se realizó durante 3 horas. La concentración de la proteína fue 50 μM y 1.5 equi. de Cu(II) y Zn(II) a 37 $^{\circ}\text{C}$ y se adicionaron 30 equi. de EDTA. Al finalizar las cinéticas, la solución de la proteína se centrifugó y se determinó la concentración de la proteína. (C): Solubilidad de la HβB2 expuesta al Zn(II) y al Cu(II) y a 30 equi. de EDTA.

8.2. Cinética de agregación de la cristalina HβB2 por Dispersión Dinámica de Luz (DLS).

En las figuras 43-A y 43-B se muestran los datos del coeficiente de correlación de la cinética de la HβB2 expuesta al Zn(II) en los primeros 20 y 40 minutos, respectivamente. Se observa que el Zn(II) induce la formación de agregados grandes con respecto a la HβB2 nativa. En los datos de la primera medición (1.6 min) se observa como, inmediatamente después de aplicar el metal ya se han formado moléculas de mayor tamaño que la proteína nativa. Los resultados de esta figura muestran que la HβB2 forma agregados grandes en menos de 1.6 min y después estos siguen aumentando de forma gradual durante los siguientes 40 minutos.

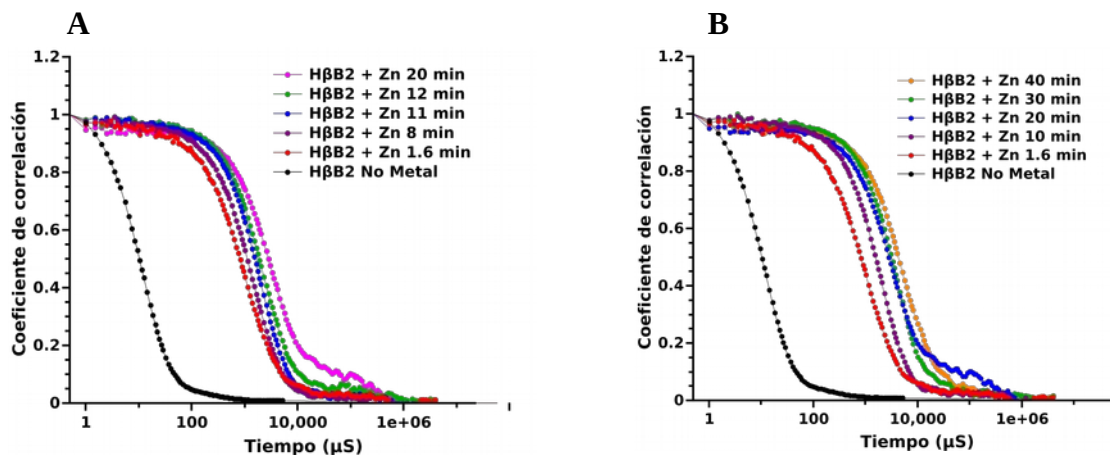


Figura 43: Cinética de agregación por DLS de la HβB2 expuesta al Zn(II), 1.5 equi. a 37 $^{\circ}\text{C}$. A: Coeficiente de correlación de la HβB2 durante los primeros 20 minutos de la cinética. B: Coeficiente de correlación de la HβB2 durante los primeros 40 minutos de la cinética. La concentración de la proteína fue 50 μM .

El Cu(II) también induce la formación de agregados grandes con respecto a la H β B2 nativa (figura 44). Se muestran los datos del coeficiente de correlación de la cinética de la H β B2 expuesta al Cu(II) en los primeros 60 minutos. En los datos de la primera medición (1.6 min) se observa como, inmediatamente después de aplicar el metal ya se han formado moléculas de mayor tamaño que la proteína nativa. Los resultados de esta figura muestran que la H β B2 forma agregados grandes en menos de 1.6 min y después estos siguen aumentando de forma gradual durante los siguientes 60 minutos. Después de los 60 minutos se pierde la correlación debido a la formación de agregados grandes.

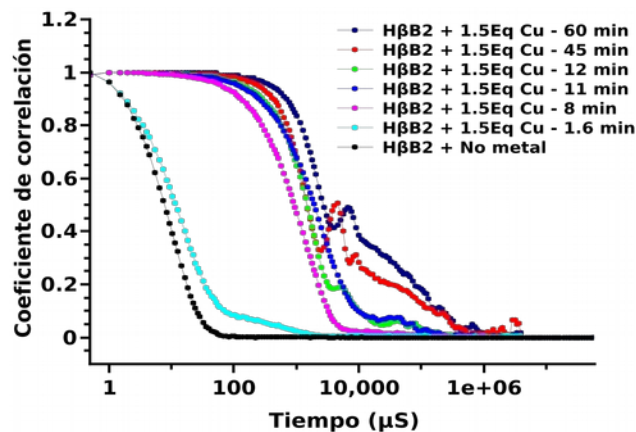


Figura 44: Cinética de agregación por DLS de la HβB2 expuesta al Cu(II), 1.5 equi. a 37 °C. Coeficiente de correlación de la HβB2 durante los primeros 60 minutos de la cinética. La concentración de la proteína fue 50 μM.

Para obtener mayor información sobre los tamaños de los agregados de HβB2 inducidos por el Zn(II) y el Cu(II) en el tiempo, los datos se analizaron con el software SEDFIT.

En la tabla 6 se muestran mediciones puntuales de DLS de la HβB2 sin metal, con Zn(II) y con Cu(II). En la HβB2 nativa se encontró que ~82.1 % de la intensidad de la señal corresponde a un Rh aparente de ~3.6 nm en la primera medición (1.6 min). Los resultados sugieren que, en estas condiciones, la HβB2 consiste principalmente en proteína dimerica. Después de la incubación de la HβB2 sin metal a 37 °C durante los primeros 20 minutos, se mantiene el porcentaje de la señal total ~86 % para el dímico. El tamaño del Rh del dímico de la proteína nativa (3.6 min) se mantuvo en los primeros 60 minutos del experimento con el porcentaje de la señal entre el 82 y el 87 %. A los 120 minutos de la cinética de la HβB2 sin metal, el % de la intensidad de la señal corresponde disminuyó a ~70.3 % (tabla 6).

Después de adicionar 1.5 equi. Zn(II) a la HβB2, se observó un aumento del tamaño del Rh debido a la oligomerización inducida por la unión del metal al inicio del experimento y los datos muestran un incremento gradual durante los primeros 120 min de la cinética. El Rh calculado a lo largo del tiempo aumentó hasta ~ 1200 nm con un 100 % de la intensidad de la señal en los 120 min de la cinética (tabla 6).

Cuando se adicionó 1.5 equi. de Cu (II) el Rh incrementó desde el inicio del experimento. Los datos del Rh muestran una especie oligomérica que aumentó a lo largo del tiempo hasta ~ 1530 nm en los primeros 120 min de la cinética con un ~99.8 % de la intensidad de la señal (tabla 6).

Tiempo de la Cinética (min)	HβB2 No Metal		HβB2 + 1.5 Zn(II)		HβB2 + 1.5 Cu(II)	
	Rh (nm)	Intensidad Señal (%)	Rh (nm)	Intensidad Señal (%)	Rh (nm)	Intensidad Señal (%)
1.6	3.6	82.1	75	63	108	92.6
8	3.55	87.8	124	93	858	80.2
10	3.76	87	243	96	915.8	82
12	3.7	88	304	98	840	80
20	3.8	85.8	679	100	930	92
45	2.6	95	741	100	732	90
60	3.2	85	809	100	592	95
120	3.9	70.3	1200	100	1530	99.8

Tabla 6: Mediciones del Rh de la HβB2 a 37 °C a diferentes tiempos. Se realizaron las mediciones de la HβB2 sin metal y expuesta a 1.5 equi. de Zn(II) y Cu(II).

8.3. Cinética de desplegamiento de la HβB2 por espectroscopía de fluorescencia.

Se midió la cinética de desplegamiento de la HβB2 en presencia de 1.5 equi. de Zn(II) y Cu(II) durante 12 horas a 37 °C. En la figura 45-A se muestran los espectros de fluorescencia de la HβB2 en ausencia de metales a 1, 100, 200, 300, 400, 500, 600 y 720 min. En la figura 45-B se muestran los espectros de fluorescencia de la HβB2 cada 20 minutos de las primeras 2 horas.

Para los espectros de la HβB2 en ausencia de metales, se observa como el máximo de emisión se mantiene a 332 nm durante toda la cinética. Este resultado indica que la proteína se mantiene plegada. Además se puede observar que la I.F. no disminuye durante el tiempo del experimento.

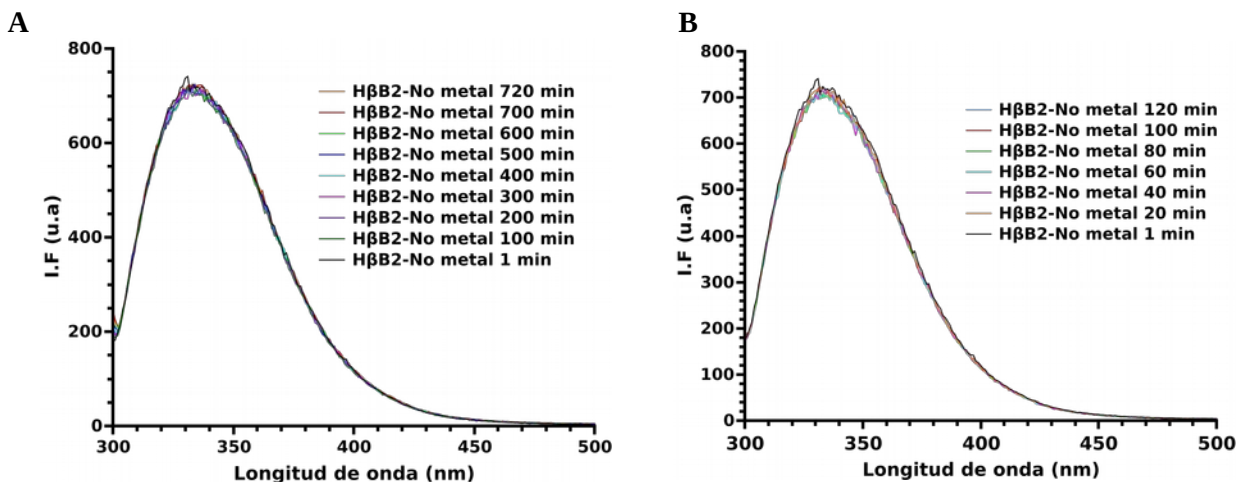


Figura 45: Espectro de fluorescencia de la HβB2 en ausencia de metales a 37 °C durante 12 horas. **A:** Se representan los espectros de la I.F. a los minutos 1, 100, 200, 300, 400, 500 600 y 700. **B:** Se muestran los datos la I.F. de la HβB2 en ausencia de metales de los primeros 120 min del experimento cada 20 min. La concentración de la HβB2 fue 50 μM.

Por el contrario, en la HβB2 en presencia de 1.5 equi. de Zn(II) se puede observar una disminución en la I.F. inmediatamente después de adicionar el ión metálico. Además, el máximo de fluorescencia se corre a 345 nm. (figura 46-A y 46-B).

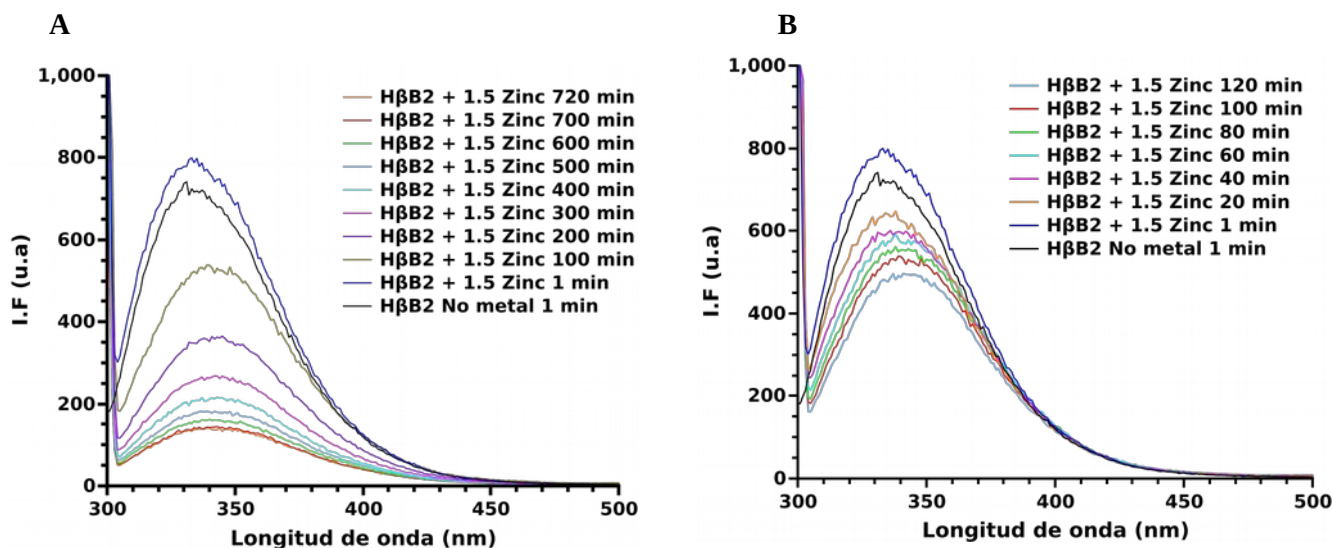


Figura 46: Espectro de fluorescencia de la HβB2 expuesta a 1.5 equi. de Zn(II) a 37 °C durante 12 horas. **A:** Se representan los espectros de la I.F. en los minutos 1, 100, 200, 300, 400, 500 600 y 700. **B:** espectros de la I.F. de la HβB2 de los primeros 120 min del experimento cada 20 min. La concentración de la HβB2 fue 50 μM.

En las cinéticas con 1.5 equi. de Cu(II) se puede observar que desde los primeros 100 minutos del experimento el máximo de fluorescencia se corre a 345 nm y la I.F. disminuye hasta que terminó el experimento (figura 47-A y 47-B).

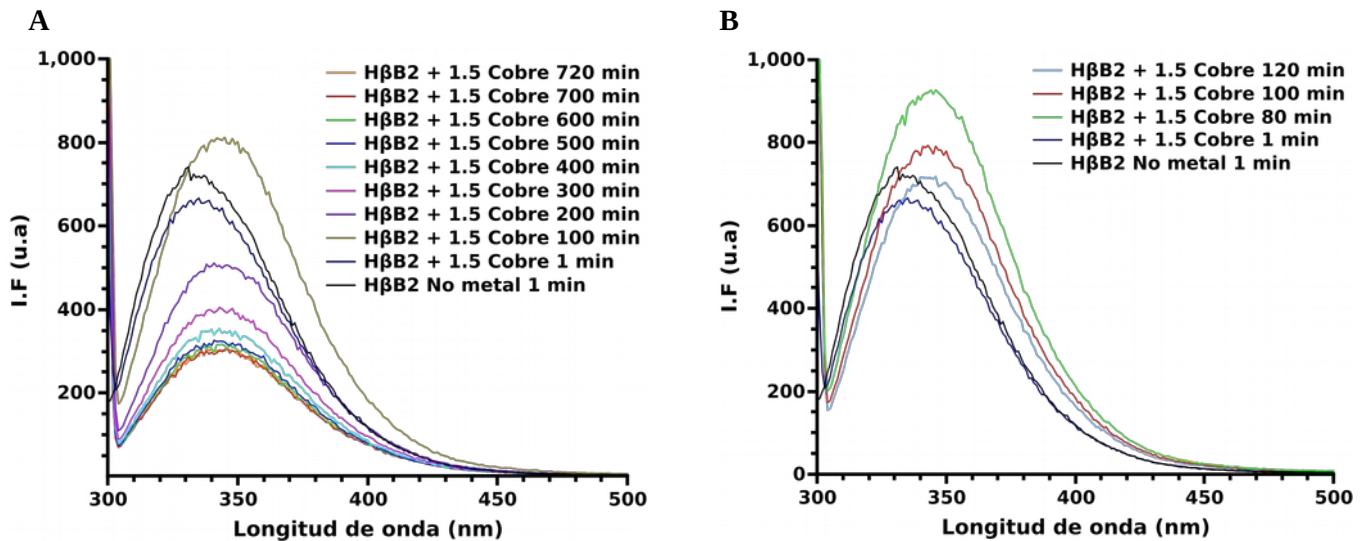


Figura 47: Espectro de fluorescencia de la HβB2 expuesta a 1.5 equi. de Cu(II) a 37 °C durante 12 horas. **A:** Se representan los espectros de la I.F. en los minutos 1, 100, 200, 300, 400, 500 600 y 700. **B:** espectros de la I.F. de la HβB2 de los primeros 120 min del experimento. La concentración de la HβB2 fue 50 μM.

En síntesis, la HβB2 nativa desde el inicio tiene un máximo de fluorescencia de 332 nm y al final de la cinética se mantuvo. La HβB2 expuesta al Zn(II) tiene un máximo de fluorescencia de 334 nm al inicio de la cinética y este máximo se corre a 349 nm a las 12 horas de la cinética, mientras que la HβB2 expuesta al Cu(II) tiene un máximo de fluorescencia de 333 nm al inicio de la cinética y este máximo se corre a 347 nm a las 12 horas de la cinética. Adicionalmente, los metales provocaron la disminución de la I.F. de la HβB2 a las 12 hrs de la cinética, siendo mayor el efecto en la HβB2 expuesta al Zn(II).

Otro parámetro importante es representar la relación de I.F. (350/332 nm) con respecto al tiempo para la HβB2. La relación de la I.F. entre proteína desplegada (350 nm) y plegada (332 nm) en el tiempo permite determinar también que la proteína se mantiene plegada a lo largo de todo el experimento. El valor de la relación de la I.F. de la HβB2 en ausencia de metales estuvo entre 0.85 – 0.88. Mientras que en la HβB2 expuesta al Zn(II) (figura 48-A) y al Cu(II) (figura 48-B) se observa un aumento de la relación hasta ~ 1.08, lo que apunta hacia el hecho de que pudiera existir alguna población de proteína desplegada.

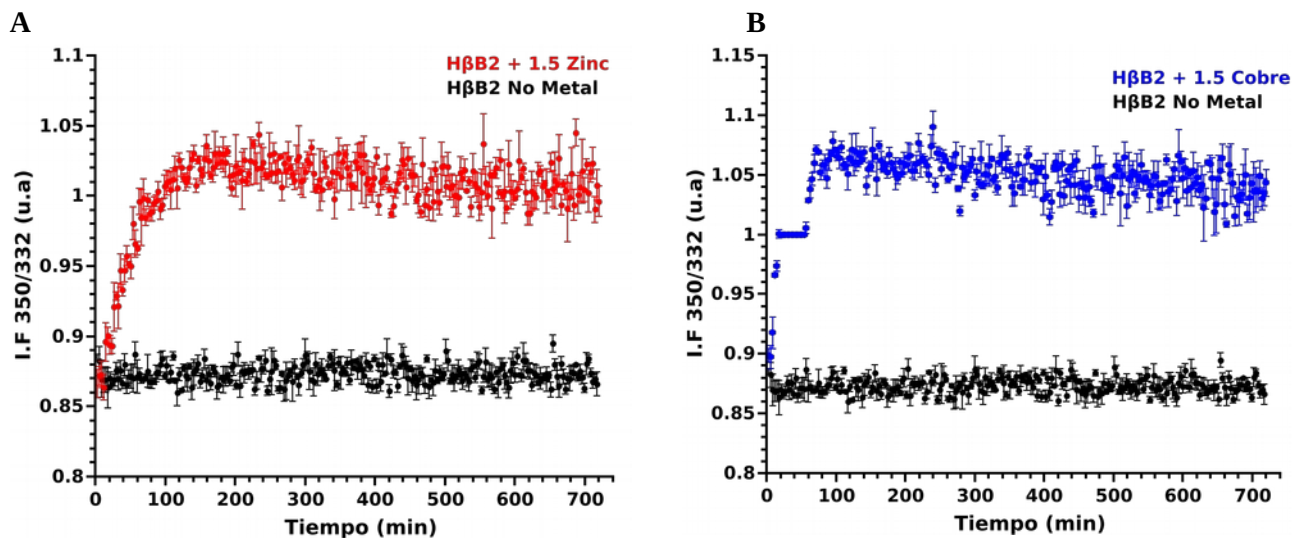


Figura 48: Relación de la I.F. (350/332 nm) con respecto al tiempo de la HβB2 en ausencia y en presencia de metales. La concentración de la HβB2 fue 50 μM. **A:** Cinética de la HβB2 en presencia de 1.5 equi. de Zn(II). **B:** Cinética de la HβB2 en presencia de 1.5 equi. de Cu(II). La cinética se realizó a 37 °C durante 12 hrs. La longitud de onda de excitación fue de 295 nm y se recolectaron los espectros de emisión de 300-500 nm.

8.4. Cinética de exposición al solvente de los residuos hidrofóbicos de la HβB2 por espectroscopía de fluorescencia en presencia de ANS y de los iones de Cu(II) y Zn(II).

Para la HβB2 nativa, la cual tiene pocos sitios hidrofóbicos expuestos con capacidad de unión a moléculas de ANS, la I.F. permanece sin cambios. La I.F. del ANS en presencia del Zn(II) es aproximadamente ~ 12 veces mayor que en la proteína nativa en los primeros 40 minutos del experimento, después de este tiempo la I.F. del ANS disminuye y permanece constante después de ~ 60 minutos hasta el final del experimento (figura 49).

Por el contrario, la HβB2 en presencia de Cu(II) presenta un incremento lento. La intensidad de fluorescencia de ANS es aproximadamente ~ 2 veces mayor que en la proteína nativa en los primeros ~ 40 minutos del experimento, después de este tiempo la intensidad de fluorescencia del ANS disminuye y permanece constante después de ~ 100 minutos hasta el final del experimento (figura 49).

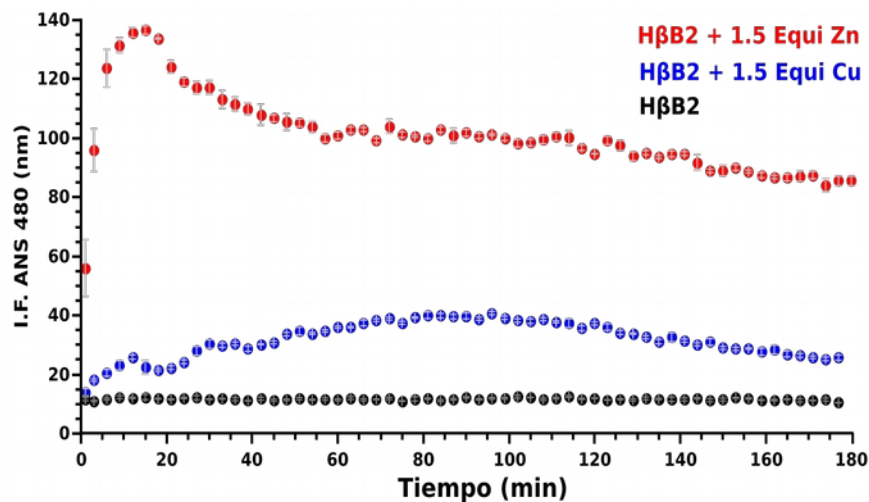


Figura 49: Efecto del Zn(II) y el Cu(II) en la exposición al disolvente de residuos hidrofóbicos de la HβB2. Se empleó 50 μM de la HβB2 a 37 °C durante 3 horas con ANS (3.75 mM) en presencia de iones metálicos (1.5 equi.). Los espectros de fluorescencia ANS se adquirieron de 400 a 600 nm y los resultados se muestran como la I.F. a 480 nm.

También se evaluó el ambiente químico de los triptófanos al final del experimento. La máxima longitud de onda de emisión para la fluorescencia intrínseca de la HβB2 nativa es de 334 nm, mientras que en presencia del Zn(II) y del Cu(II), este máximo se desplaza a 342 y 340 nm, respectivamente (figura 50).

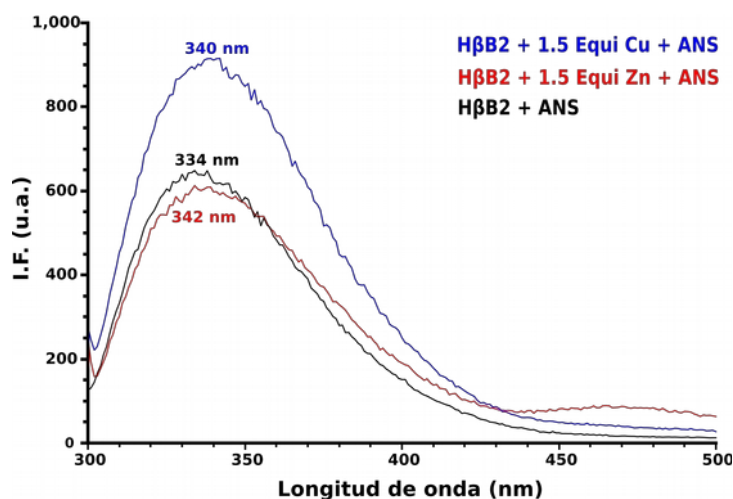


Figura 50: Espectros de fluorescencia después de 3 horas de la cinética de la HβB2 con ANS. La HβB2 en ausencia de iones metálicos (negro), la HβB2 en presencia de Zn(II) (rojo) y la HβB2 en presencia de Cu(II) (azul). El espectro de emisión se recolectó en el rango de 300 y 500 nm utilizando una longitud de onda de excitación de 295 nm a 37 °C.

8.5. Despliegamiento térmico de la HβB2 por espectroscopía de fluorescencia en presencia de Cu(II) y Zn(II).

Se realizó el despliegamiento térmico y se determinó la T_m de la HβB2 sin exponer a los metales y expuesta a 1.5 equi. de Zn(II) y Cu(II) (figura 51-A y 51-B, respectivamente). En estas figuras se relaciona la I.F. (350/332) con respecto a la temperatura. En la tabla 7 se muestran los valores de la T_m obtenidos para la HβB2 en ausencia y en presencia de metales. Para el caso de la HβB2 expuesta al Zinc, la T_m obtenida fue de 62.4 °C en el rango de 37 °C – 73 °C. Para la HβB2 expuesta al Cu(II) la T_m fue de 61.6 °C en el rango de 40 °C – 73 °C. Se observa que el Zn(II) induce una disminución de la T_m de 6.5 °C en el rango de 37 °C – 73 °C, mientras que el Cu(II) provocó la disminución de la T_m de 7.3 °C en el rango de 40 °C – 73 °C.

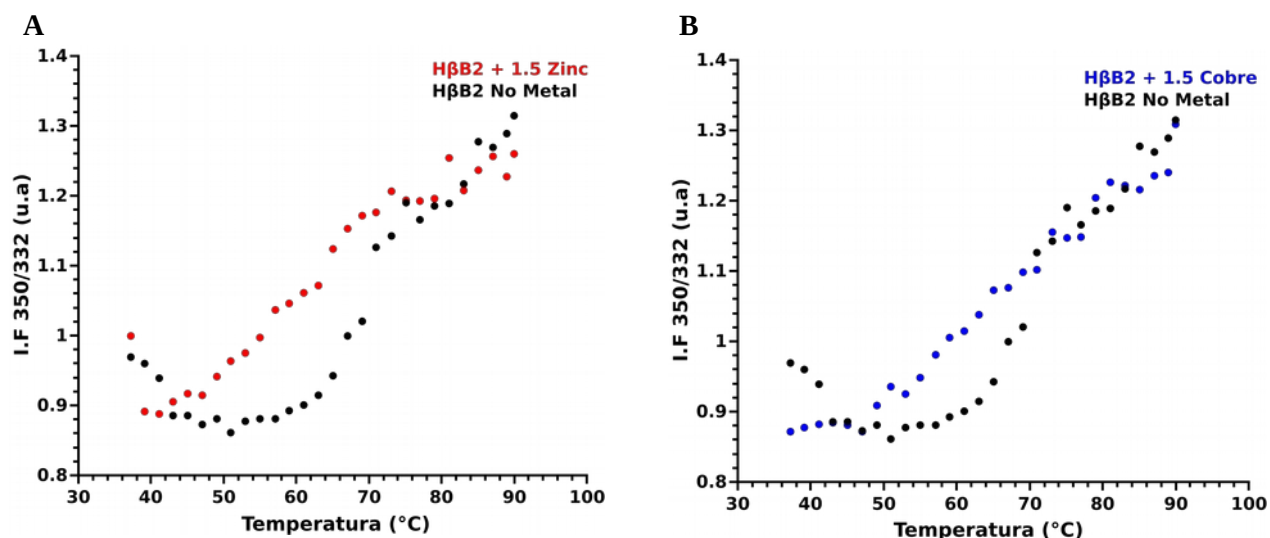


Figura 51: Despliegamiento térmico de la HβB2 por espectroscopía de fluorescencia. **A:** HβB2 + 1.5 Equi. de Zn(II). **B:** HβB2 + 1.5 Equi. de Cu(II). Se aumentó la temperatura 2 °C/min, de 37 a 90 °C. Se empleó una longitud de onda de excitación de 295 nm, se colectaron los valores de longitud de onda de emisión a 332 y 350 nm y se calculó posteriormente la relación de I.F. (350/325). Para el cálculo de la T_m se ajustaron los datos a una sigmoide. La concentración de la HβB2 fue 50 μM.

Proteína / Rango Temperatura	HβB2 – No Irra	HβB2 + 1.5 Equi Cu(II)	HβB2 + 1.5 Equi Zn(II)
	T _m	T _m	T _m
37 °C – 73 °C	68.9 ± 1 °C	61.6 ± 2 °C	62.4 ± 1 °C
75 °C - 90 °C	83.7 ± 2 °C	-----	-----

Tabla 7: Valores de T_m obtenidos para la HβB2 en ausencia de metales y expuesta a Zn(II) y Cu(II).

8.6. Despliegamiento térmico de la HβB2 por espectroscopía de fluorescencia en presencia del ANS y los metales Zn(II) y Cu(II).

Se realizó el despliegamiento térmico de la HβB2 nativa, expuesta al Zn(II) y al Cu(II) en presencia del ANS. La temperatura se fue incrementando 2 °C / min desde 37 a 90 °C.

En la figura 52 se relacionan la I.F. del ANS (480 nm) con respecto a la temperatura y se puede observar claramente que la I.F. del ANS se mantiene constante (~ 8 u.a) durante un amplio rango de temperatura (37- 60 °C), lo que indicaría que la HβB2 es una proteína que se puede calentar hasta 60

°C sin observar efecto alguno en tiempos cortos. Para el caso de la H β B2 expuesta al Cu(II), la I.F. del ANS incrementa ~ 2 veces con respecto a la proteína nativa y se mantiene hasta los 52 °C. Después de esta temperatura, se observa que la I.F. del ANS incrementó levemente y a los 68 °C alcanzó su máximo. En la H β B2 expuesta al Zn(II), la I.F. del ANS incrementa ~ 6 veces con respecto a la proteína nativa y se mantiene hasta los 52 °C. Después de esta temperatura, se observa que la I.F. del ANS incrementó rápidamente y a los 62 °C alcanzó su máximo. En las tres condiciones se observa una disminución de la I.F. del ANS, lo cual puede ser un indicativo de la precipitación de los agregados grandes que se forman por efecto de los metales y de la temperatura.

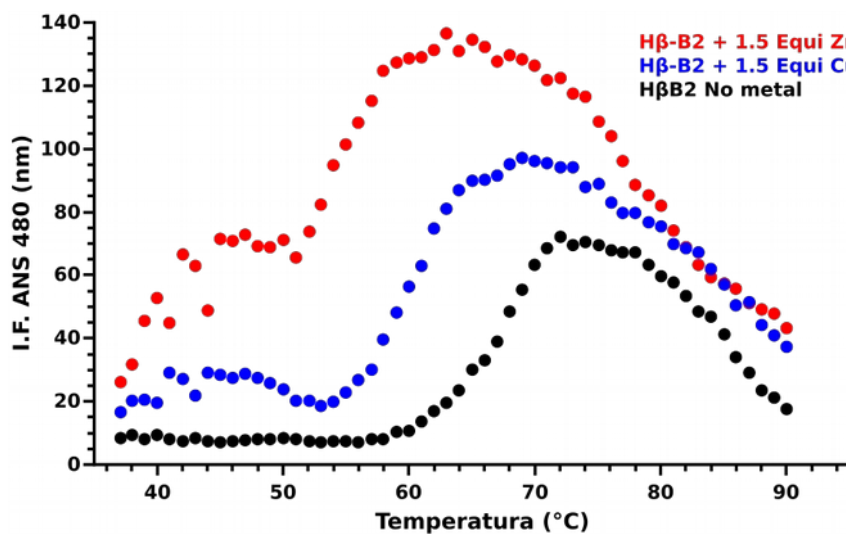


Figura 52: Despliegamiento térmico de la H β B2 por espectroscopía de fluorescencia en presencia de ANS (0.4 mM). La concentración de la H β B2 fue 50 μ M. Se empleó H β B2 + 1.5 equi. de Zn(II) y H β B2 + 1.5 equi. de Cu(II). Se aumentó la temperatura 2 °C/min, de 37 a 90 °C. Se empleó una longitud de onda de excitación de 380 nm, se colectaron los valores de longitud de onda de emisión a 480 nm.

9. DISCUSIÓN

La formación de cataratas es un proceso multifactorial, acumulativo y lento. Varios factores de riesgo pueden influir en la formación de cataratas, entre ellos: trastornos metabólicos, mutaciones hereditarias, la irradiación UV y algunos metales (Robman y Taylor., 2005, Liu y col., 2017).

En este estudio, evaluamos el efecto de la irradiación UVB (302 nm) y de los iones Cu(II) y Zn(II) sobre la estabilidad, la solubilidad y de la agregación de la H β B2 en función del tiempo. Además, investigamos el posible mecanismo de desplegamiento y cambios estructurales de la H β B2.

9.1. Radiación

Se evaluaron diferentes tiempos de radiación, 15, 30, 60, 90, 120, y 180 minutos, realizando mediciones puntuales de la D.O., DLS y fluorescencia, inmediatamente después de irradiar y por 12 hrs a 37 °C. En todos estos tiempos de radiación se observa que se forman agregados que provocan que la solución se vuelva opaca a la luz.

Para realizar los estudios de las cinéticas y detectar cambios en la estructura de la H β B2 durante el tiempo se seleccionó 2 hrs de radiación.

Para la H β B2 sin irradiar se observó un Rh de ~3.6 nm, el cual estuvo representado por el 70 y 80 % de la intensidad de la señal durante 12 hr. Interesantemente, se determinó una segunda población la cual está representada entre un 20 y 30 % del porcentaje de la señal y correspondería a oligómeros mayores a 15 nm de Rh. No se conocen las razones por las cuales la proteína forma oligómeros durante el tiempo de incubación. Sin embargo, se ha propuesto que estas proteínas son propensas a formar oligómeros como mecanismo para controlar el contenido de agua en diferentes regiones del lente debido a los efectos de la presión osmótica (Bloemendal y col., 2004; Véréttout y Tardieu., 1989). Además, estos oligómeros pueden promover mayor estabilidad en las proteínas del lente y esto sería consistente con lo descrito previamente de que las cristalinas β forman dímeros, tetrámeros y oligómeros grandes los cuales se han encontrado en los lentes envejecidos con cataratas (Ma y col., 1998; Ajaz y col., 1997). Adicionalmente, estas proteínas en el ámbito fisiológico del lente se encuentran en concentraciones elevadas (~ 200 - 450 mg/ml), y aproximadamente un 40-45 % corresponde a las cristalinas β (Bobrow., 2011; Keenan y col., 2008). Estas concentraciones elevadas de

las cristalinas β y particularmente de la H β B2, llevó a sugerir que estas proteínas se acomodan de cierta manera para que el lente continúe siendo transparente. (Takemoto y Sorensen., 2008).

En los resultados obtenidos de la proteína irradiada, se observó que la radiación provocó un incremento rápido del Rh en los primeros 200 min de la cinética, así mismo se observa que la turbidez incrementa en este tiempo y se mantiene constante durante un tiempo y después ocurre la disminución de la señal del Rh y de la D.O. Estos resultados indican que la radiación provoca un efecto gradual y durante las primeras horas de la cinética ocurren cambios conformacionales en la estructura de la proteína que son suficientes para la formación de agregados. La disminución de la D.O. y de la señal del tamaño del Rh en tiempos largos se puede deber a la precipitación de los agregados grandes que se formaron.

Por otro lado, la espectroscopia de fluorescencia del triptófano se usa ampliamente para estudiar la estructura, dinámica y función de las proteínas (Lakowicz., 1999). En este estudio los espectros de fluorescencia de la H β B2 no irradiada se mantienen igual durante el tiempo de la cinética y el máximo de emisión se mantuvo en 332 nm, mientras que en los espectros de fluorescencia de la H β B2 irradiada 2 hrs se observó la disminución de la I.F. en el tiempo y el máximo se desplazó de 332 a 340 nm al final de la cinética.

Estos cambios en el máximo de emisión sugieren un desplegamiento parcial o total de cada monómero de la H β B2, el cual pudiera ser un intermediario. Este intermediario de los monómeros separados y el N-terminal parcialmente desplegado fue propuesto por Evans y colaboradores después de exponer a la proteína en una rampa de temperatura (40 – 100 °C) y se observó que a los 64 °C el máximo de emisión se desplazó a 340 nm a los 64 °C y a los 78 °C el máximo se desplazó a 350 nm, infiriendo el desplegamiento total de los dos dominios de la proteína (Evans y col., 2008). Así mismo, en otro estudio reportaron el desplazamiento del máximo de emisión a 340 nm y 350 nm de la proteína con 2.2 y 3.4 M de urea, respectivamente (Wieligmann y col., 1999).

Además, en este trabajo realizamos el desplegamiento químico con urea (0 – 4.5 M) y corroboramos que la proteína con 2.5 M de urea presenta un máximo de emisión de 340 y con 3.5 M el máximo se desplaza hasta 350 nm. Con 4.5 M de urea el máximo se mantiene en 350 nm lo cual podría estar indicando el desplegamiento de los dos dominios (N y C-terminal) de la H β B2.

Paralelamente a la medición de los espectros de fluorescencia a 332 y a 350 nm, se midieron los espectros de moléculas derivadas de la oxidación del triptófano, Kin, OH-Kin y NATA. La radiación

provoca la disminución de la I.F. del triptófano a 332 nm (H β B2 plegada) y simultáneamente el incremento de la I.F. de la Kin, OH-Kin y del NATA. Estos resultados pueden indicar que la radiación estaría provocando la oxidación de los triptófanos en la H β B2.

Se han identificado varios sitios de oxidación en las cristalinas, específicamente en los residuos de metionina, cisteína y triptófano. En parte, estos daños covalentes podrían desestabilizar el estado nativo de las proteínas del lente, lo que llevaría a la agregación y así, con el tiempo provocar las cataratas (Truscott., 2005). Hains y Truscott encontraron que la oxidación del triptófano aumentó en lentes con cataratas (Hains y Truscott., 2007).

La foto-oxidación del triptófano puede formar quinurenina debido a la escisión del anillo pirrol del triptófano (Xia y col., 2013). En el caso de la γ D, los cuatro triptófanos conservados están en el núcleo de la proteína y estos se oxidan a quinurenina, la cual podría desestabilizar significativamente el estado nativo de la proteína (Serebryany y King., 2015).

Gakamsky y colaboradores encontraron otros derivados del triptófano, el hidroxitriptófano (OH-Trp) y N-formil-quinurenina (NFK), fluorescen en las cristalinas aisladas de lentes humanos con cataratas y la radiación UV aumentan la concentración de estos productos. En esta misma investigación se aislaron varias cristalinas de lentes con cataratas, entre ellas la H β B2. Por la técnica de espectrometría de masas se encontraron modificaciones en algunos aminoácidos de la H β B2 incluido el Trp a OH-Kyn y OH-Trp, estando en mayor porcentaje el OH-Trp. Estas modificaciones también se encontraron en la cristalina β B2 de lentes porcinos irradiados con UV (Gakamsky y col., 2017).

Adicionalmente, el NATA tiene un pico de emisión entre 340 y 348 nm, dependiendo del ambiente químico de la proteína (Kumar y col., 2005) y el NATA se ha estudiado por fluorescencia para identificar estados de proteínas parcialmente desplegadas, asociados con cambios sutiles en la estructura terciaria (Nayar y col., 2002. Kumar y col., 2005).

Para tener un panorama mas detallado del efecto de la radiación en los cambios conformacionales de la H β B2, se realizaron experimentos para evaluar la fluorescencia extrínseca con ANS. El ANS se une a los residuos hidrofóbicos expuestos en la proteína indicando un cambio estructural. Se obtuvieron los espectros inmediatamente después de irradiar a la proteína y además, se recolectaron los espectros del ANS a 480 nm durante las cinéticas de la H β B2 irradiada. En la H β B2 irradiada 2 hrs se observa un incremento significativo de la I.F. del ANS con respecto a la la H β B2 no irradiada. El incremento de la

I.F. del ANS ocurrió gradualmente en los primeros 200 min de la cinética. La I.F. del ANS en la H β B2 irradiada es ~ 2 veces mas alto que la H β B2 no irradiada al inicio de la cinética y a los 200 min, tiempo en el que se observa un pico máximo de la I.F. del ANS. Estos resultados nos indican que la radiación podría estar provocando cambios conformacionales que acarrear la exposición de residuos hidrofóbicos de la proteína al solvente.

Adicionalmente, en este trabajo se evaluó la estabilidad térmica de la H β B2 irradiada y no irradiada. Los experimentos de desnaturalización térmica indican que la radiación provoca perdida de la estabilidad térmica. En el desplegamiento térmico de la fluorescencia intrínseca y extrínseca se observaron curvas con tres estados.

Estos resultados nos permiten sugerir un modelo de desplegamiento y agregación de la H β B2 inducido por la radiación a las 2 hrs.

La radiación puede provocar la oxidación de los triptófanos a sus derivados (OH-Kin, Kin, NATA) y puede provocar cambios estructurales que estarían acarreado a la exposición de los residuos hidrofóbicos en la superficie de la H β B2, provocando que gran parte de la población de la H β B2 este desplegada parcial o totalmente. Todos estos cambios estructurales provocan que la H β B2 se agregue y estos agregados presentan diferentes tamaños del Rh. Estos agregados provocan que la solución de la proteína se vuelva opaca a la luz. Sin embargo, para confirmar y describir este proceso con mayor resolución se sugiere emplear otras técnicas como la resonancia magnética nuclear que podría brindar información a profundidad.

9.2. Metales

En este estudio, también evaluamos el efecto de los iones Cu(II) y Zn(II) sobre la agregación de la H β B2 en función del tiempo por turbidez y DLS. Evaluamos la estabilidad, la solubilidad y el posible mecanismo de desplegamiento y cambios estructurales de la H β B2.

En primer lugar, evaluamos diferentes concentraciones de los metales (0.5, 1, 1.5 y 2 equi.) sobre la agregación de la proteína por turbidez. Encontramos que el incremento de la D.O. es dependiente de la concentración de los metales. Con 2 y 1.5 equi. de los metales se observó que la D.O incrementa en los primeros 20 min de la cinética. Para realizar los estudios de las cinéticas y detectar cambios en la estructura de la H β B2 durante el tiempo se seleccionó 1.5 equi. de cada uno de los metales.

Al momento de evaluar el efecto de los metales en la solubilidad de la H β B2 se observó que la solubilidad de la proteína en solución es dependiente de la concentración de los metales. Sin embargo, se encontró que el tratamiento con el EDTA permite recuperar un gran porcentaje de proteína en solución (51, 38 y 20 % para 0.5, 1 y 1.5 equi de Zn(II), respectivamente y (85, 70, 35 y 23 % para 0.5, 1, 1.5 y 2 equi. de Cu(II) , respectivamente) . Este porcentaje de proteína recuperada es dependiente del numero de equi. del Zn(II). Estos resultados nos permiten sugerir que la formación de los agregados puede ocurrir parcialmente por la formación de puentes mediados por los metales.

Cuando se analizó el Rh de la proteína expuesta al Zn(II) se observó un incremento rápido del Rh en los primeros 20 min de la cinética y estuvo representado por el 100 % de la intensidad de la señal. Estos resultados indican que el Zn(II) tiene un efecto rápido en la agregación de la H β B2 y los oligómeros formados son mayores a 600 nm. Por el contrario, el efecto del Cu(II) en el incremento de los oligómeros es más lento. En los primeros 50 min el Cu(II) induce la formación de oligómeros grandes en varias fases., y después de este tiempo continúa un incremento gradual del Rh y de la intensidad de la señal (~ 60 al 100 %).

La relación 350/332 de la proteína sin metal se mantuvo en 0.85 durante toda la cinética lo cual es un indicativo de que la proteína nativa se mantiene plegada. El Cu(II) y el Zn(II) provocan un incremento rápido de la relación 350/332 de la H β B2 en los primeros 60 min de la cinética, alcanzando un valor de 1.05. después de los 100 min y este valor se mantuvo constante.

Estos resultados nos permiten sugerir que los metales provocan el desplegamiento parcial de la H β B2 y con los espectros de fluorescencia al final de la cinética corroboramos que el máximo de emisión se desplaza a 347 nm y 349 nm para la H β B2 expuesta al Cu(II) y al Zn(II), respectivamente.

Los resultados con las tres técnicas permiten comprobar de que los metales provocan la formación de agregados grandes que aumentan la turbidez de la muestra y precipitan. Estos agregados podrían estar conformados por proteína parcialmente desplegada. Estudios previos han reportado que el Cu(II) y el Zn(II) inducen la formación de agregados de las γ y cristalinas y estos metales interactúan con más de un sitio de unión para cada uno de los iones metálicos ([Quintanar y col., 2016](#); [Ramkumar y col., 2018](#); [Rocha y col., 2021](#)). Otro estudio con la cristalina γ S reportaron que el Cu(II) y el Zn(II) inducen la agregación de la proteína y encontraron que con el EDTA se recupera el monómero de los agregados.

Así mismo encontraron que el Cu(II) oxida las Cisteínas y el Zn(II) interactúa con las Histidinas (Roskamp y col., 2019).

Recientemente, Fernandez-Silva y colaboradores en el 2020, demostraron que tanto el Cu(II) y el Zn(II) se unen al menos en dos sitios e inducen la agregación de la γ D por diferentes vías. El Zn(II) produce un reordenamiento conformacional pequeño y se agregan a través de la formación de puentes metálicos sin intermediarios desplegados, mientras que la agregación inducida por el Cu(II) incluye que el dominio N-terminal se despliega parcialmente mientras que el dominio C-terminal y partes del dominio N-terminal permanecen en una conformación similar a la nativa (Fernández-Silva y col., 2020).

Se realizaron cinéticas por espectroscopía de fluorescencia en presencia de ANS y de los iones de Cu(II) y Zn(II) para evaluar la exposición al solvente de los residuos hidrofóbicos de la H β B2. En la H β B2 expuesta al Zn(II) se observa un incremento significativo de la I.F. del ANS con respecto a la H β B2 nativa. La I.F. del ANS es ~ 12 veces mayor que en la proteína nativa en los primeros ~ 20 minutos del experimento. Por el contrario, la I.F. del ANS para la H β B2 expuesta al Cu(II) es aproximadamente ~ 2 veces mayor que en la proteína nativa en los primeros ~ 60 minutos del experimento. Después se observó la disminución de la I.F. lo cual puede ser un indicativo de la precipitación de los agregados grandes que se forman por el efecto de los metales. Estos resultados sugieren que los metales provocan cambios conformacionales en la estructura de la H β B2 que conllevan a la exposición al solvente de los residuos hidrofóbicos de la proteína, siendo mayor el efecto del Zn(II).

Los experimentos de desnaturalización térmica midiendo la fluorescencia intrínseca del triptófano y la fluorescencia extrínseca del ANS indican una disminución la estabilidad térmica. Observamos un aumento drástico de la I.F. del ANS en el desplegamiento de la H β B2 en presencia del Zn(II), lo que sugiere un efecto mayor que el efecto del Cu(II). Estos resultados muestran que la agregación de la H β B2 inducida por Zn(II) y Cu(II) implican diferentes cambios conformacionales, y nos permiten sugerir un modelo de desplegamiento y agregación de la H β B2 inducido por los metales.

Los metales provocan que gran parte de la población de la H β B2 esté desplegada parcialmente, y que simultáneamente ocurran cambios conformacionales que estarían acarreado a la exposición de los residuos hidrofóbicos en la superficie de la H β B2. Todos estos cambios estructurales provocan que la

H β B2 se agregue y estos agregados presentan diferentes tamaños del Rh. Estos agregados provocan que la solución de la proteína se vuelva opaca a la luz. Además, provocan la pérdida de la solubilidad de la proteína la cual es recuperada cuando se adiciona EDTA .

10. CONCLUSIONES

En este estudio, evaluamos el efecto de tiempos cortos de la irradiación UVB y de los iones Cu(II) y Zn(II) sobre la estabilidad, la solubilidad y la agregación de la H β B2 en función del tiempo. Además, investigamos los posibles cambios estructurales de la H β B2. El estudio se siguió por 12 horas a 37 °C. El análisis de los resultados obtenidos nos permitió llegar a las siguientes conclusiones.

1. Todos los tiempos de irradiación evaluados inducen la formación de agregados.
2. Un porcentaje alto de la intensidad de la señal por DLS muestra a la H β B2 nativa en forma de dímero durante las 12 hrs de la cinética.
3. Dos horas de radiación UVB provoca la formación de oligómeros de alto peso molecular en los primeros 200 min de la cinética.
4. Dos horas de radiación UVB podría provocar la oxidación de los triptófanos en la H β B2 a sus derivados: OH-Kin, Kin y NATA.
5. Dos horas de radiación UVB podría estar provocando cambios conformacionales que acarrearán la exposición de residuos hidrofóbicos de la proteína al solvente.
6. Bajas concentraciones de Zn(II) y de Cu(II), desestabilizan a la H β B2, afectan su plegamiento e inducen un cambio conformacional, lo que conduce a la formación de agregados de alto peso molecular que dispersan la luz. Interesantemente, observamos que el Zn(II) provoca más cambios en la proteína que el Cu(II).

Estos resultados sugieren que la H β B2 tiende a desplegarse parcialmente, exponiendo residuos hidrofóbicos que conducen a la formación de grandes agregados de diferentes tamaños que provocan la turbidez de la solución, y su agregación.

Con la información proporcionada por las técnicas empleadas en este trabajo proponemos modelos de agregación para entender la fisiopatología de las cataratas, así como para intentar buscar tratamientos preventivos a futuro.

11. RECOMENDACIONES

Emplear técnicas como RMN para continuar la caracterización del efecto de la radiación UV y de los metales Zn(II) y Cu(II) en el desplegamiento y agregación de la H β B2 cristalina.

|

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andley UP. (2007). Crystallins in the eye: Function and pathology. *Prog Retin Eye Res.* 26:78–98.
- Ajaz, M.S, Ma, Z., Smith, D.L., and Smith, J.B. (1997). Size of human lens β -crystallin aggregates are distinguished by N-terminal truncation of bB1. *J. Biol. Chem.* 272: 11250–11255.
- Bagneris C, Bateman OA, Naylor CE, Cronin N, Boelens WC, Keep NH, Slingsby C. (2009). Crystal structures of alpha-crystallin domain dimers of alphaB-crystallin and Hsp20. *J. Mol. Biol.* 392: 1242–1252.
- Bassnett, S. (2002). Lens organelle degradation. *Exp. Eye Res.* 74: 1–6.
- Bateman, O., Sarra, R., van Genesen, S. ., Kappé, G., Lubsen, N., & Slingsby, C. (2003). The stability of human acidic β -crystallin oligomers and hetero-oligomers. *Experimental Eye Research*, 77(4): 409–422.
- Bloemendal, H, Jong, W. Jaenicke, R. Lubsen, N.H, Slingsby, C, Tardieu, A. (2004). Ageing and vision: structure, stability and function of lens crystallins, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 86: 407e485.
- Bova, L.H., Sweeney, M. H., Jamie, J. F., y Truscott, R. J. (2001). Major changes in human ocular UV protection with age. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* 2001, 42, 200–205.
- Bobrow, J. (2011). Lens and cataract. *Clin. Sci. American Academy of Ophthalmology.*
- Cai, S., Fujii, N., Saito, T., Fujii, N. (2013). Simultaneous Ultraviolet B-induced Photo-Oxidation of Tryptophan/Tyrosine and Racemization of Neighboring Aspartyl Residues in Peptides. *Free Radic Biol Med*, 65:1037-1046.
- Chen J, Flaugh S.L, Callis P.R, King J. (2006). Mechanism of the highly efficient quenching of tryptophan fluorescence in human gD-crystallin, *Biochemistry* 45: 11552-11563.
- Cvekl, A, McGreal, R. Liu, W. . (2015). Lens development and crystallin gene expression, *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 134: 129-167.
- Davies M. J, Truscott R. J. (2001). Photo-oxidation of proteins and its role in cataractogenesis. *J. Photochem. Photobiol., B.* 63: 114–125.
- Diemer H, Atmanene C, Sanglier S, et al (2009) Detection and structural features of the β B2-B3-crystallin heterodimer by radical probe mass spectrometry (RP-MS). *Journal of Mass Spectrometry* 44:803–812.

- Domínguez-Calva JA, Pérez-Vázquez ML, Serebryany E, King JA, Quintanar L. (2018). Mercury-induced aggregation of human lens γ -crystallins reveals a potential role in cataract disease. *J Biol Inorg Chem*. 23(7):1105-1118.
- Evans, P., Slingsby, C., Wallace, B. A.(2008). Association of partially folded lens β B2-crystallins with the α -crystallin molecular chaperone. *Biochem. J*. 409, 691–699.
- Fernández-Silva, Arline. (2015). Caracterización del desplegamiento de la HgD cristalina humana en presencia de Cu(II) y Zn(II). Tesis de maestría en ciencias. Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas. Centro de Investigaciones Químicas. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Fernández-Silva, A., French-Pacheco, L., Rivillas-Acevedo, L., and Amero, C. (2020) Aggregation pathways of human γ D crystallin induced by metal ions revealed by time dependent methods. *PeerJ* 2020, 1–22.
- Fleming, P.J. y Fleming K.G. 2018. "HullRad: Fast Calculations of Folded and Disordered Protein and Nucleic Acid Hydrodynamic Properties". *Biophysical Journal*, 114:856-869.
- Fu, L., & Liang, J. J.-N. (2002). Unfolding of human lens recombinant betaB2- and gammaC-crystallins. *Journal of Structural Biology*, 139: 191–198.
- Fujii N, Sakaue H, Sasaki H, Fujii N. (2012). A rapid, comprehensive liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS)-based survey of the Asp isomers in crystallins from human cataract lenses. *J. Biol. Chem*. 287:39992–40002.
- Fujii, N., Hiroki, U., Takeshi, S. (2004). The damaging effect of UV-C irradiation on lens α -crystallin. *Molecular Vision*, 10:814-20.
- Fujii, N., Momose, Y., Ishibashi, Y., Uemura, T., Takita, M., Takehana, M. (1997). Specific racemization and isomerization of the aspartyl residue of alpha A-crystallin due to UV-B irradiation. *Exp. Eye Res*. 65:99–104.
- Gakamsky A, Duncan R.R, Howarth N.M, Dhillon B, Buttenschön K.K, Daly D.J, Gakamsky D. (2017).Tryptophan and Non-Tryptophan Fluorescence of the Eye Lens Proteins Provides Diagnostics of Cataract at the Molecular Level. *Scientific Reports*. 7:40375.
- González-Iglesias, H. P., Petrash, C., Rodríguez-Menéndez, S., M., Álvarez, L., Fernández-Vega Cueto, L., Fernández, B., García, Pereiro, R., Sanz-Medel, A., and Coca-Prados, M. (2017). Quantitative distribution of Zn, Fe and Cu in the human lens and study of the Zn–metallothionein redox system in cultured lens epithelial cells by elemental MS. *J. Anal. At. Spectrom*. 32, 1746–1756.
- Goulet, D. R., Knee, K. M., & King, J. A. (2009). Inhibition of unfolding and aggregation of lens protein human gamma D crystallin by sodium citrate, *93(2011): 371–381*.

- Graw J. Genetics of crystallins: cataract and beyond. (2009). *Exp Eye Res.* 88(2): 173-89.
- Hains PG, Truscott RJ. (2007). Post-translational modifications in the nuclear region of young, aged, and cataract human lenses. *J. Proteome Res.* 6: 3935–3943.
- Hains, P.G. and Truscott, R.J. (2008). Proteomic analysis of the oxidation of cysteine residues in human age-related nuclear cataract lenses. *Biochim. Biophys. Acta* 1784: 1959–1964.
- Hains, P.G. and Truscott, R.J. (2010). Age-dependent deamidation of lifelong proteins in the human lens. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51: 3107–3114.
- Heys KR, Friedrich MG, Truscott RJ. (2007). Presbyopia and heat: changes associated with aging of the human lens suggest a functional role for the small heat shock protein, alpha-crystallin, in maintaining lens flexibility. *Aging Cell* 6: 807–815.
- Hejtmancik, J. F. (2008). Congenital cataracts and their molecular genetics. *Semin. Cell Dev. Biol.* 19: 134–149.
- Horwitz J (2003) Alpha-crystallin. *Experimental Eye Research* 76:145–153.
- Keenan J., Orr D.F., Pierscionek, B.K. (2008). Patterns of crystallin distribution in porcine eye lenses. *Mol Vis.* 14:1245-53.
- Kim YH, Kapfer DM, Boekhorst J, Lubsen NH, Bächinger HP, Shearer TR, David LL, Feix JB, Lampi KJ. (2002). Deamidation, but not truncation, decreases the urea stability of a lens structural protein, betaB1-crystallin. *Biochemistry* 41: 14076–14084.
- Konz, I., Fernández, B., Fernández, M. L., Pereiro, R., González-Iglesias, H., Coca-Prados, M., and Sanz-Medel, A. (2014). Quantitative bioimaging of trace elements in the human lens by LA-ICP-MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 406, 2343–2348.
- Kosinski-Collins, M.S. Flaugh, S.L. King, J. (2004). Probing folding and fluorescence quenching in human gamma D crystallin Greek key domains using triple tryptophan mutant proteins, *Protein Sci.* 13: 2223-2235.
- Kumar, V., Sharma, V.K., Kalonia, D.S. (2005). Second derivative tryptophan fluorescence spectroscopy as a tool to characterize partially unfolded intermediates of proteins. *International Journal of Pharmaceutics* 294: 193–199.
- Lakowicz, J. R. In *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York, 1999; p 698.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of

bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.

- Lampi, K. J., Ma, Z., Shih, M., Shearer, T. R., Smith, J. B., Smith, D. L. and David, L. L. (1997). Sequence analysis of β A3, β B3, and β A4 crystallins completes the identification of the major proteins in young human lens. *J. Biol. Chem.* 272: 2268–2275.
- Lampi KJ, Amyx KK, Ahmann P, Steel EA. (2006). Deamidation in human lens betaB2-crystallin destabilizes the dimer. *Biochemistry* 45: 3146–3153.
- Lampi, K.J., Wilmarth, P.A., Murray, M.R., and Larry L. David, L.L. (2014). Lens β -crystallins: The role of deamidation and related modifications in aging and cataract. *Prog Biophys Mol Biol.* 2014 115(1): 21–31.
- Lemire M, Fillion M, Frenette B, Mayer A, Philibert A, Sousa Passos CJ, Davee Guimaraes JR, Barbosa F, Mergler D. (2010). *Environ Health Perspect* 118:1584–1589.
- Liu Y.C, Wilkins M, Kim T, Malyugin B, Mehta, J.S. Cataracts. (2017). *Lancet* 390: 600-612.
- Nayar, S., Brahma, A., Mukherjee, C., Bhattacharyya, D. (2002). Second Derivative Fluorescence Spectra of Indole Compounds. *J Biochem*, 31(3):427-35.
- Ma, Z. Y col., (1998) Age-related changes in human lens crystallins identified by HPLC and mass spectrometry. *Exp. Eye Res.* 67, 21–30.
- Ma Z, Yao W, Chan C-C, et al (2016) Human β A3/A1-crystallin splicing mutation causes cataracts by activating the unfolded protein response and inducing apoptosis in differentiating lens fiber cells. *Biochim Biophys Acta* 1862:1214–1227.
- Michiel M, Duprat E, Skouri-Panet F, Lampi J.A, Tardieu A, Lampi k.j, Finet S. 2010. Aggregation of deamidated human betaB2-crystallin and incomplete rescue by alpha-crystallin chaperone. *Experimental Eye Research*, 90(6):688-98.
- Moreau, KL., King JA. (2012). Protein misfolding and aggregation in cataract disease and prospects for prevention. *Trends Mol Med* 18:273–282.
- Pattison D. I, Rahmanto A. S.; Davies M. J. (2011). Photo-oxidation of proteins. *Photochem. Photobiol. Sci.* 11: 38.
- Quintanar, L., Serebryany, E., Domínguez-Calva, J. A., Haase-Pettingell, C., & King, J. A. (2015). Copper and Zinc Binding Specifically Induce the Aggregation of Human γ -D Crystallin. *Biophysical Journal*, 108(2): 502a.
- Quintanar, L., Domínguez-Calva, J. A., Serebryany, E., Rivillas-Acevedo, L., Haase-Pettingell, C., Amero, C., King, J. A., Dom, J. A. (2016). Copper and Zinc Ions Specifically Promote Nonamyloid Aggregation of the Highly Stable Human γ -D Crystallin. *ACS Chem. Biol.* 11, 263–272, doi: 10.1021/acscchembio.5b00919.

- Ramkumar, S., Fan, X., Wang, B., Yang, S., and Monnier, V. M. (2018). Reactive cysteine residues in the oxidative dimerization and Cu²⁺ induced aggregation of human γ D-crystallin: Implications for age-related cataract. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1864, 3595–3604.
- Rivillas-Acevedo, L., Fernández-Silva, A., , Amero, C. (2015). Function, Structure and Stability of Human Gamma D Crystallins: A Review. *Physical Biology of Proteins and Peptides.* Springer pp 81–98.
- Rocha, M. A., Sprague-Piercy, M. A., Kwok, A. O., Roskamp, K. W., and Martin, R. W. (2021). Chemical Properties Determine Solubility and Stability in $\beta\gamma$ -Crystallins of the Eye Lens. *ChemBioChem* 22, 1329–1346.
- Robman L, Taylor H. (2005). External factors in the development of cataract, *Eye (Lond.)* 19 1074–1082.
- Robinson, N. E., Lampi, K. J., Speir, J. P., Kruppa, G., Easterling, M. and Robinson, A. B. (2006). Quantitative measurement of young human eye lens crystallins by direct injection Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Mol. Vis.* 12: 704–711.
- Roskamp K, Kozlyuk N, Sengupta S, Bierma J.C, y Martin RW (2019). Divalent cations and the divergence of $\beta\gamma$ -crystallin function. *Biochemistry.* 12; 58(45): 4505–4518.
- Schafheimer N, King J. (2013). Tryptophan cluster protects human γ D-crystallin from ultraviolet radiation-induced photoaggregation in vitro. *Photochem Photobiol.* 89(5):1106-15.
- Serebryany E, King JA. (2014). The $\beta\gamma$ -crystallins: native state stability and pathways to aggregation. *Prog Biophys Mol Biol.* 115(1): 32-41.
- Serebryany E, King JA. (2015). Wild-type human γ D-crystallin promotes aggregation of its oxidation-mimicking, misfolding-prone W42Q mutant. *J. Biol. Chem.*;290(18):11491-503.
- Srivastava, V. K., Varshney, N., and Pandey, D. C. (1992) Role of trace elements in senile cataract. *Acta Ophthalmol.* 70, 839–841.
- Shiels, A, Hejtmancik, J.F. (2013). Genetics of human cataract, *Clin. Genet.* 84: 120-127.
- Slingsby, C., and Wistow, G.J. (2014). Functions of crystallins in and out of lens: roles in elongated and post-mitotic cells. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 115: 52–67.
- Sun, T. X., & Liang, J. J. N. (1998). Intermolecular exchange and stabilization of recombinant human ??A- and ??B-crystallin. *Journal of Biological Chemistry*, 273(1), 286–290.
- Sun H, Ma Z, Li Y, et al. (2005) Gamma-S crystallin gene (CRYGS) mutation causes dominant

progressive cortical cataract in humans. 42:706–710.

- Takata T, Oxford JT, Demeler B, Lampi KJ. (2008) Deamidation destabilizes and triggers aggregation of a lens protein, betaA3-crystallin. *Protein Sci.* 17: 1565–1575.
- Takata, T., Murakami, K., Toyama, A., Fujii, N. (2018). Identification of Isomeric Aspartate Residues in β B2-crystallin From Aged Human Lens. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*, 866(7):767-774.
- Takemoto L, Sorensen CM. (2008). Protein–protein interactions and lens transparency. *Exp. Eye Res.* 87(6):496-501.
- Truscott, R.J. (2005). Age-related nuclear cataract-oxidation is the key. *Exp. Eye Res.* 80, 709–725.
- Van Montfort RLM, Bateman O a, Lubsen NH, Slingsby C (2003) Crystal structure of truncated human betaB1-crystallin. *Protein science : a publication of the Protein Society* 12:2606–2612.
- Velasco-Bolom, J. L., and Domínguez, L. (2020). Exploring the folding process of human β b2-crystallin using multiscale molecular dynamics and the Markov state model. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 22, 26753–26763.
- Véré tout F, Tardieu A. (1989). The protein concentration gradient within eye lens might originate from constant osmotic pressure coupled to differential interactive properties of crystallins. *Eur. Biophys. J.* 17(2):61-8.
- Wang, W. (2005). Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics. *International Journal of Pharmaceutics*, 289(1-2): 1–30.
- Wang, Y. y King, J.A. (2010) Cataract as a protein-aggregation disease. In *Protein Misfolding Diseases: Current and Emerging Principles and Therapies* (Ramirez-Alvarado, M. et al., eds), pp. 487–515, John Wiley & Sons, Inc.
- Wang K. J, Wang B. B, Zhang F, Zhao Y, Ma X, Zhu S. Q. (2011). Novel β -crystallin gene mutations in Chinese families with nuclear cataracts. *Arch. Ophthalmol.* 129: 337– 343.
- Wieligmann, K., Mayr, E.M., Jaenicke, R., 1999. Folding and self-assembly of the domains of b B2-crystallin from rat eye lens. *J. Mol. Biol.* 286, 989e994.
- Wilmarth PA, Tanner S, Dasari S, Nagalla SR, Riviere MA, Bafna V, Pevzner PA, David LL. (2006). Age-related changes in human crystallins determined from comparative analysis of post-translational modifications in young and aged lens: does deamidation contribute to crystallin insolubility? *J. Proteome Res.* 5: 2554–2566.
- Xi Z, Whitley, M.J, Gronenborn, A.M. (2017). Human betaB2-crystallin forms a face-face dimer in solution: an integrated NMR and SAXS study. *Structure* 25: 496-505.

- Xi Y. B, Chen X. J, Zhao W. J, Yan Y. B. (2015) .Congenital cataract-causing mutation G129C in γ C-crystallin promotes the accumulation of two distinct unfolding intermediates that form highly toxic aggregates. *J. Mol. Biol.* 427: 2765– 2781.
- Xia Z, Yang Z, Huynh T, King JA, Zhou R. (2013). UV-radiation induced disruption of dry-cavities in human γ D-crystallin results in decreased stability and faster unfolding. *Sci. Rep.*;3(1):1560-8.
- Xu J, Chen J, Toptygin D, Tcherkasskaya O, Callis P, King J, Brand L, Knutson J.R. (2009). Femtosecond fluorescence spectra of tryptophan in human gamma-crystallin mutants: site-dependent ultrafast quenching, *J. Am. Chem. Soc.* 131: 16751-16757.
- Xu, J., Wang, S., Zhao, W.J., Xi, Y.B., Yan, Y.B., Yao, K. (2012). The congenital cataract-linked A2V mutation impairs tetramer formation and promotes aggregation of β B2-crystallin, *PLoS One* 7: e51200.
- Zhang Z, Smith DL, Smith JB. (2003). Human beta-crystallins modified by backbone cleavage, deamidation and oxidation are prone to associate. *Exp. Eye Res.* 77, 259–272.
- Zhang K, Zhao WJ, Yao K, Yan YB. (2019). Dissimilarity in the Contributions of the N-Terminal Domain Hydrophobic Core to the Structural Stability of Lens β/γ -Crystallins. *Biochemistry.* 58(20): 2499-2508.
- Zhao W.J, Xu J, Chen X.J, Liu H.H, Yao K, Yan Y.B. (2017). Effects of cataract-causing mutations W59C and W151C on betaB2-crystallin structure, stability and folding, *Int. J. Biol. Macromol.* 103: 764-770.
- Zhao WJ1, Yan YB. (2018). Increasing susceptibility to oxidative stress by cataract-causing crystallin mutations. *Int J Biol Macromol.* 108:665-673.
- Zhou G, Zhou N, Hu S, et al (2010) A missense mutation in CRYBA4 associated with congenital cataract and microcornea. *Mol Vis* 16:1019–1024.