



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Caracterización espectroscópica del efecto de la temperatura
en el desplegamiento de la cadena ligera 6aJL2-R24G**

TESIS PROFESIONAL POR ETAPAS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

YOSELIN GONZALEZ ONOFRE

DIRECTOR DE TESIS:

DR. CARLOS AMERO TELLO

CODIRECTORA DE TESIS:

DRA. LEIDYS FRENCH PACHECO

CUERNAVACA, MORELOS

OCTUBRE, 2021



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
CENTRO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS

Esta tesis se realizó bajo la dirección del Dr. Carlos Amero Tello y la codirección de la Dra. Leidys French Pacheco, en el Laboratorio de Bioquímica y Resonancia Magnética Nuclear en el Centro de Investigaciones Químicas en la Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Forma parte del proyecto de Ciencia Básica de CONACYT A1-S-11842.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
CENTRO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS

La tesis **Caracterización espectroscópica del efecto de la temperatura en el desplegamiento de la cadena ligera 6aJL2-R24G** es presentada por Yoselin Gonzalez Onofre para obtener el grado académico de BIÓLOGO.

COMITÉ REVISOR DE TESIS

Presidente: BIOL. HUGO SUÁREZ CONTRERAS

Secretario: DR. ALEXANDRE TOSHIRRICO CARDOSO TAKETA

1° vocal: DR. CARLOS DANIEL AMERO TELLO

2° vocal: DRA. CARMEN NINA PASTOR COLÓN

3° vocal: DRA. LINA ANDREA RIVILLAS ACEVEDO

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por apoyarme y amarme incondicionalmente, a mis padres Alicia Onofre y Jose Luis González por ayudarme económicamente, por estar siempre para mí y ser mi empuje durante estos años, a mis hermanos Jose Luis González, Eric González por ser mis modelos a seguir y acompañarme en este viaje que es la vida.

A mi director de tesis Carlos Amero por sus consejos, explicaciones y ayudarme siempre que lo necesité . A mi codirectora de tesis Leidys French por su paciencia, guía, por siempre exigirme un poco más y siempre ayudarme a cumplir los objetivos.

A mis compañeros de laboratorio por el tiempo compartido y especialmente a Angel E. Peláez, Arline Fernández, Vanesa Ramírez y Reinier Cárdenas por sus consejos en la experimentación dada su amplia experiencia y manejo de la teoría.

A mis amigos de la carrera Lesly Salgado, Amairani Gutiérrez, Estefany García, Francisco Portugal, Alexis E. Florentino por el tiempo que pasamos juntos, los ratos de diversión y las pláticas durante las comidas. Especialmente a Martha E. Bahena por su amistad, apoyo, por escucharme y por acompañarme a todos mis seminarios de investigación.

A mis amigos Fernando G. Payan por estar siempre conmigo incondicionalmente, apoyarme y ser siempre sincero conmigo, a Adrien Linares por siempre escucharme, ayudarme, apoyarme y ensayar tantas veces conmigo mis presentaciones.

A mis sinodales, Lina Rivillas Acevedo, Alexandre Cardoso Taketa, Hugo Suárez Contreras, Nina Pastor Colón, Carlos Amero por escucharme, sus consejos, observaciones, recomendaciones en mi tesis y presentaciones de tema de tesis.

RESUMEN

En el Laboratorio de Bioquímica y Resonancia Magnética Nuclear (LABRMN) del Centro de Investigaciones Químicas (CIQ) se estudian las proteínas de la línea germinal de cadenas ligeras de anticuerpos lambda 6a (6aJL2) y una de sus mutantes (6aJL2-R24G) relacionadas a la enfermedad amiloidosis de cadena ligera (AL). Estas proteínas constituyen un modelo para el estudio de enfermedades conformacionales.

Mediante experimentos de RMN en tiempo real (a 37°C durante 12 h), realizados en el LABRMN, se detectó que ambas proteínas mostraban pérdida de la intensidad de las señales, aunque su comportamiento era distinto. El cambio en la señal de RMN se atribuyó a que quizás las proteínas se desplegaban y agregaban durante el tiempo de estudio. Estos resultados brindan una nueva aproximación en el entendimiento de estas enfermedades. Hasta la fecha el desplegamiento de las proteínas se ha caracterizado con cambios drásticos en la temperatura o con la utilización de agentes desnaturalizantes, mediante fluorescencia, dicroísmo circular, calorimetría de barrido, o métodos computacionales.

En este proyecto de tesis se analizó el desplegamiento y agregación de la proteína 6aJL2 y su mutante 6aJL2-R24G por dos técnicas biofísicas: fluorescencia y dispersión dinámica de luz, para entender los cambios observados por RMN. Se observó que ambas proteínas se desplegaron y son capaces de agregarse bajo condiciones de temperatura constante y largo tiempo de incubación. La proteína 6aJL2-R24G formó agregados más rápido y de mayor tamaño que la proteína 6aJL2. Los resultados encontrados sugieren que las vías de desplegamiento y agregación de las proteínas 6aJL2 dependen fuertemente de la concentración, la temperatura y el tiempo.

Indice

I. INTRODUCCIÓN.....	1
I.1 Algunas propiedades estructurales de las proteínas.....	1
I.2 Enfermedades asociadas al mal plegamiento de proteínas.....	2
I.2.1 Amiloidosis de cadena ligera (AL).....	3
I.2.1.1 Estructura y repertorio genético de las inmunoglobulinas.....	4
I.3 Proteínas 6aJL2 y 6aJL2-R24G asociadas a la enfermedad AL.....	6
I.4 Estudios de las proteínas 6aJL2 por RMN. Antecedentes directos.....	8
I.5 Técnicas biofísicas para el estudio de la agregación de proteínas.....	10
I.5.1 Aspectos generales de la espectroscopía de fluorescencia.....	11
I.5.2 Turbidimetría.....	12
I.5.3 Dispersión dinámica de luz (DLS).....	12
II. JUSTIFICACIÓN.....	14
III.1 HIPÓTESIS.....	15
III.2 OBJETIVOS.....	15
Objetivo general:.....	15
Objetivos particulares:.....	15
IV. METODOLOGÍA.....	16
IV.1 Expresión y purificación.....	16
IV.1.1 Expresión de las proteínas recombinantes 6aJL2 y 6aJL2-R24G.....	16
IV.1. 2 Purificación de las proteínas recombinantes 6aJL2 y 6aJL2-R24G.....	16
IV.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE).....	16
IV.3 Determinación de la concentración de proteína.....	17
IV.4 Caracterización de la agregación.....	17
IV.4.1 Ensayo de desplegamiento y replegamiento de las proteínas 6aJL2 mediante espectroscopía de fluorescencia.....	17
IV.4.2 Cinéticas de desplegamiento de las proteínas 6aJL2.....	18
IV.5 Caracterización de la agregación de las proteínas 6aJL2 mediante turbidimetría y DLS.....	18
IV.6 Ensayo de desplegamiento y replegamiento de la proteína 6aJL2 seguido por DLS.....	19

V. RESULTADOS y DISCUSIÓN.....	20
V.1 Expresión de proteínas 6aJL2 y 6aJL2-R24G en E. coli.....	20
V.2 Purificación de las proteínas recombinantes 6aJL2-R24G.....	21
V.3 Caracterización del desplegamiento de las proteínas 6aJL2 mediante espectroscopía de fluorescencia.....	22
V.3.1 Desplegamiento térmico con incremento de la temperatura.....	23
V.3.2 Desplegamiento térmico a temperatura constante.....	24
V.4 Caracterización de estado oligomérico y agregación de las proteínas.....	26
V.4.1 Estado oligomérico de las proteínas 6aJL2 y 6aJL2-R24G.....	28
V.4.2 Cinética de agregación de las proteínas 6aJL2 y 6aJL2-R24G seguidas por DLS.....	29
VI. CONCLUSIONES PARCIALES.....	32
VII. PERSPECTIVAS.....	33
VIII REFERENCIAS.....	34

Lista de siglas y abreviaturas

RMN	Resonancia magnética nuclear
UV	Ultravioleta
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
°C	Grados centígrados
mM	Milimolar
nM	Nanomolar
rpm	Revoluciones por minuto
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
DLS	Dynamic light scattering / dispersión dinámica de luz
Rh	Radio hidrodinámico
IF	Intensidad de fluorescencia
ThT	Tioflavina T
Tm	Temperatura media
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido

Lista de figuras

Figura 1: Paisajes de energía del plegamiento y agregación.....	2
Figura 2: Representación de la estructura de una inmunoglobulina.....	5
Figura 3: Estructuras tridimensionales de las proteínas.....	7
Figura 4: RMN en tiempo real.....	8
Figura 5: Desplegamiento y replegamiento de las proteínas 6ajL2.....	9
Figura 6: Electroforesis.....	20
Figura 7: Cromatograma e imágenes de geles.....	21
Figura 8: Espectros de fluorescencia.....	23
Figura 9: Desplegamiento térmico.....	24
Figura 10: Desplegamiento térmico a temperatura constante.....	25
Figura 11: Ensayo de turbidimetría de ambas proteínas.....	27
Figura 12: Curvas de correlación de las cinéticas de agregación seguidas por DLS.....	30

I. INTRODUCCIÓN.

I.1 Algunas propiedades estructurales de las proteínas.

Las proteínas pueden clasificarse de acuerdo a su conformación en dos grandes grupos: fibrosas y globulares. Las proteínas fibrosas muestran en su estructura la repetición de elementos de estructura secundaria como hélices α o hebras β (Mathews *et al.*, 2013). Normalmente son estructuras cilíndricas y alargadas, como por ejemplo la queratina y la elastina, que ayudan a darle estructura a los tejidos del cuerpo. Las proteínas globulares tienden a contener además de hélices α y hebras β , asas y giros que les ayudan a adoptar estructuras globulares compactas, como por ejemplo las inmunoglobulinas, las hormonas o las enzimas (Mathews *et al.*, 2013). Existe otro grupo de proteínas que no puede ser clasificadas en ninguno de los dos anteriores, las proteínas intrínsecamente desordenadas. Éstas carecen de una estructura tridimensional definida debido a que contienen pocos residuos hidrofóbicos, aromáticos y cisteínas, mientras contienen un alto porcentaje de aminoácidos polares y con carga.

La estructura tridimensional de una proteína involucra diferentes tipos de interacciones moleculares: Van der Waals, interacciones hidrofóbicas, interacciones electrostáticas, puentes de hidrógeno y puentes disulfuro. Estas interacciones llevan a la cadena lineal de aminoácidos a formar una estructura ordenada y funcional. El proceso por el cual las proteínas obtienen esta estructura terciaria se llama plegamiento y es indispensable para que las proteínas puedan realizar sus múltiples funciones biológicas (Nelson & Cox, 2009).

En algunos casos, los mecanismos de protección de la célula que evitan la agregación de proteínas fallan, y proteínas con alta propensión a desplegarse llegan a formar “agregados” dentro y fuera de la célula (Dobson, 2004). El plegamiento incorrecto puede producirá proteínas que no puedan llevar a cabo su función establecida, lo cual podría tener implicaciones biológicas importantes como el desarrollo de ciertas patologías conocidas como enfermedades conformacionales (Dobson, 2004).

I.2 Enfermedades asociadas al mal plegamiento de proteínas.

Los estados conformacionales de una proteína en función de la energía del sistema, se han representado en forma de embudo o cono energético (Eichner & Radford, 2011). El paisaje de energía de plegamiento incluye intermediarios plegados en la ruta hacia el estado nativo y otros conformeros parcialmente plegados que son accesibles desde el estado nativo (Figura 1). En general, se ha propuesto que especies no nativas son el vínculo estructural con el paisaje energético de agregación (Eichner & Radford, 2011).

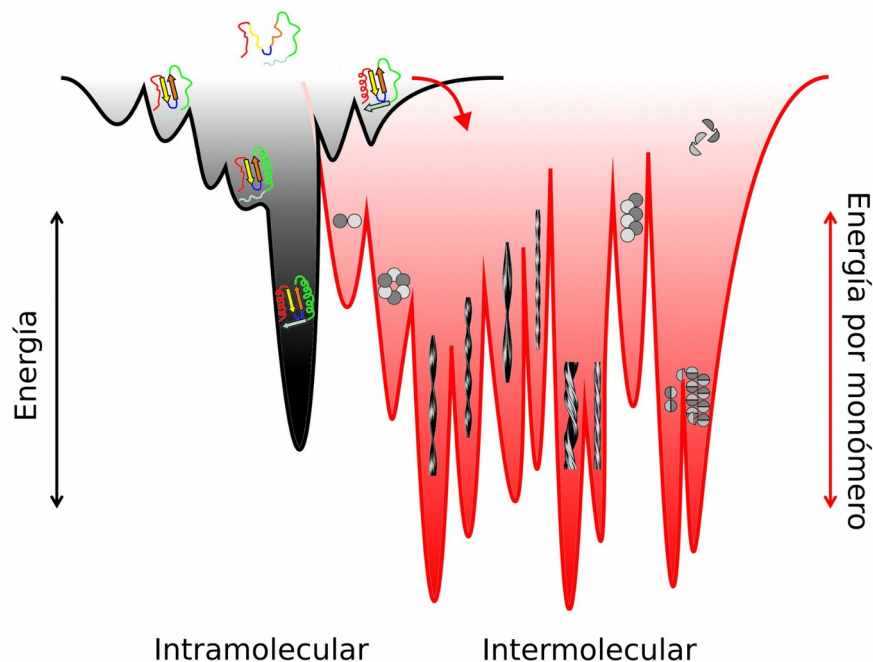


Figura 1: Paisajes de energía del plegamiento y agregación.

Paisajes de energía de plegamiento (negro) y agregación (rojo). Se ha propuesto que la formación de intermediarios plegados o desplegados (parcial o totalmente) sea crucial para el paso entre los paisajes energéticos de plegamiento y agregación (Tomado de Eichner & Radford, 2011).

El mal plegamiento involucra re-arreglos de las interacciones intra e intermoleculares presentes en la proteína que pueden llevar a que se generen distintos agregados con conformaciones más estables incluso que la proteína nativa (Figura 1) (Mas & García, 2012).

En el año 1854 el patólogo alemán Rudolf Virchow utilizó el término amiloide, para referirse a ciertos depósitos encontrados en órganos y tejidos de autopsias. Estos

depósitos reaccionaban al yodo, por lo que él dedujo que se trataban de sustancias de tipo almidón (Virchow, 1854). Actualmente, el término sigue haciendo referencia a las enfermedades amiloidogénicas, aunque se sabe que la naturaleza de estos agregados no es glucosídico sino proteico.

Las patologías clasificadas bajo el nombre general de amiloidosis están caracterizadas por la agregación de proteínas en forma de fibras amiloides altamente organizadas que se depositan en los tejidos, resultando en un progresivo daño de los órganos (Merlini & Bellotti, 2003). Las fibras amiloides son insolubles y muy estables, y se pueden depositar en el interior o exterior de la célula.

Las principales características de las fibras incluyen: una estructura formada por hojas β entrecruzadas a lo largo del eje de la fibra, con un patrón típico de difracción de rayos X con distancia entre cadenas y entre hojas de 4.7 Å y 10 Å, respectivamente; estructura fibrilar característica observada por microscopía electrónica (7.5 a 13 nm de diámetro) y por unir los colorantes tioflavina (ThT) y rojo Congo, lo que resulta en la birrefringencia verde bajo una luz de polarización cruzada (Merlini & Bellotti, 2003; Chiti & Dobson, 2006).

Se han descrito al menos 37 proteínas capaces de formar fibras amiloides. Algunas enfermedades donde se han encontrado estos depósitos son: Alzheimer, Parkinson, diabetes tipo II, encefalopatía espongiiforme bovina y amiloidosis de cadena ligera, entre otras (Chiti & Dobson, 2017). Específicamente, en la amiloidosis de cadena ligera están involucradas las inmunoglobulinas (Igs).

1.2.1 Amiloidosis de cadena ligera (AL).

La amiloidosis de cadena ligera (AL) es una enfermedad letal poco frecuente. Las células B son responsables de la síntesis y secreción de Igs, las cuales participan en la respuesta inmunológica. El evento patológico inicial de la amiloidosis AL es la proliferación anormal de un clon de células plasmáticas en la médula ósea que secreta un exceso de cadenas ligeras monoclonales (Blancas-Mejia et al., 2018; Merlini *et al.*, 2018). En esta enfermedad el exceso de cadenas ligeras se deposita

sobre órganos, en forma de agregados amiloidogénicos, afectando principalmente a los riñones, el corazón, la piel, el sistema nervioso periférico y el hígado (Blancas-Mejia *et al.*, 2018; Merlini *et al.*, 2018).

Los síntomas de la AL no se presentan hasta que la enfermedad está avanzada y dependerán del órgano afectado. Los síntomas que se pueden llegar a presentar son: inflamación en tobillos y piernas, fatiga, debilidad intensa, dolor en las muñecas, manos y pies, entumecimiento, hormigueo, diarrea posiblemente con sangre, estreñimiento, adelgazamiento involuntario de importancia, crecimiento de la lengua, palpitaciones irregulares del corazón, cambios en el tejido epitelial como engrosamiento, máculas que aparecen de manera sencilla, manchas purpúreas en el contorno de los ojos y dificultad para tragar (Gertz, 2018; Milani, Merlini & Palladini, 2018).

Hasta la fecha, la amiloidosis AL no tiene cura. Muchos medicamentos que se utilizan para tratar el mieloma múltiple también se utilizan para el tratamiento de la AL con el objetivo de detener el desarrollo de las células anormales. Otro tratamiento que se ha empleado es el trasplante autólogo de células madres sanguíneas, donde las células madre del cuerpo son retiradas del paciente, se le da tratamientos de quimioterapia al enfermo y después las células extraídas se regresan al paciente (Gertz, 2018; Milani, Merlini, & Palladini, 2018).

1.2.1.1 Estructura y repertorio genético de las inmunoglobulinas.

Todos los distintos tipos de inmunoglobulinas tienen una estructura común compuesta por cuatro cadenas polipeptídicas, nombradas como cadenas pesadas (2) y cadenas ligeras (2) (Figura 2) (Chothia *et al.*, 1998). Las cadenas ligeras están unidas a su respectiva cadena pesada mediante enlaces disulfuro e interacciones no covalentes entre los dominios variables y constantes presentes en cada cadena (V_H y V_L y C_H y C_L).

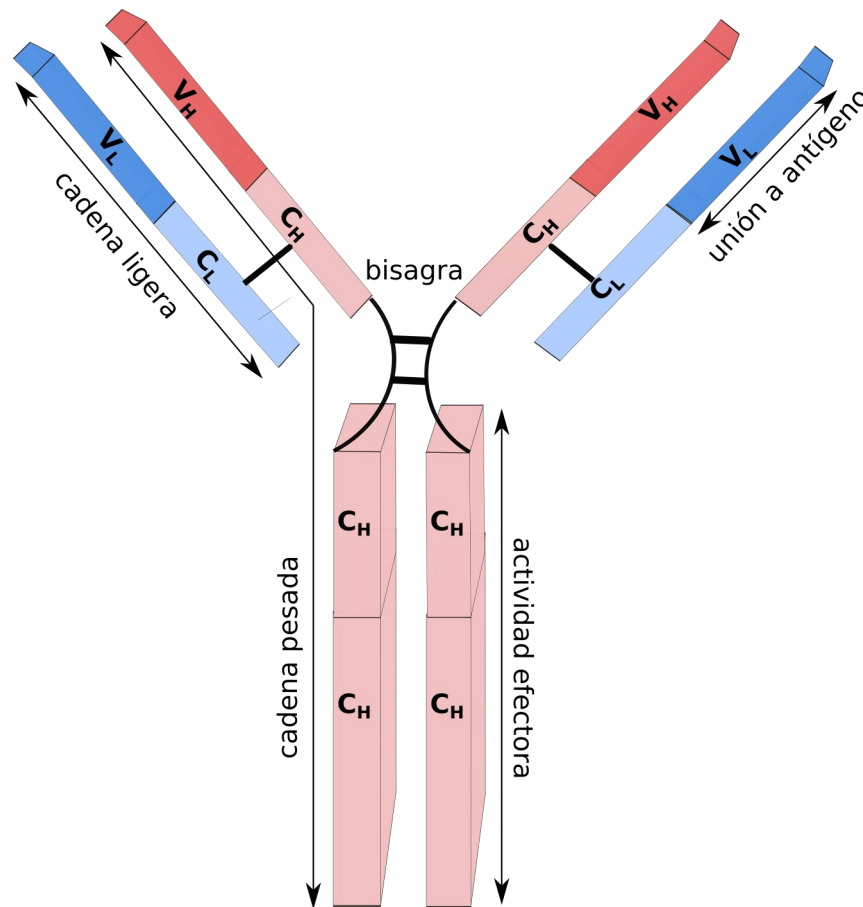


Figura 2: Representación de la estructura de una inmunoglobulina.

Representación de la estructura de una inmunoglobulina. Se identifican las regiones variables y constantes para las cadenas ligeras y pesadas (V_L y C_L ; V_H y C_H , respectivamente). La región variable participa en el reconocimiento de los antígenos, mientras que la constante está involucrada en la ejecución de la respuesta inmunológica).

Un gen de una cadena ligera consta de tres segmentos genéticos diferentes: el segmento variable (V), el de unión (junction, J) y el constante (C) (Blancas-Mejia et al., 2018). Los humanos tienen 73 genes V_L (40 kappa (κ) y 33 lambda (λ)), 9 genes J_L (5 J_κ y 4 J_λ) y 6 genes C_L (1 C_κ y 5 C_λ) (Blancas-Mejia et al., 2018). Aunque éste es el repertorio básico, el repertorio maduro de las Igs se forma por medio de la recombinación e hipermutaciones somáticas de los diferentes genes, generando así una gran diversidad (Abraham et al., 2004; Enqvist et al., 2007).

Se han descrito cinco genes de la región V como los más sobre-expresados en la amiloidosis AL: $V_{\kappa 1}$, $V_{\lambda 1}$, $V_{\lambda 2}$, $V_{\lambda 3}$, y $V_{\lambda 6}$. En general, las personas sanas tienen una relación kappa a lambda de dos a uno, mientras que los pacientes con AL tienen una relación kappa a lambda de uno a tres (Blancas-Mejia et al., 2018).

El gen V λ 6a codifica para las proteínas λ 6 (Ch'ang et al., 1994). Este gen se expresa normalmente en un 2 % en las células periféricas y de la médula ósea, sin embargo, pacientes con AL expresan el gen λ 6 en un 38 % (Comenzo et al., 2001). La mutación R24G de esta proteína se ha encontrado en muestras del 25 % de los pacientes con AL asociada a las proteínas λ 6, mientras que el fragmento de unión JL2 ha sido el más frecuentemente encontrado en las proteínas de pacientes con AL.

Utilizando técnicas de biología molecular, Del Pozo y colaboradores en 2008 obtuvieron un plásmido que contiene los segmentos de la línea germinal de las cadenas ligeras V λ y J λ 2, que codifican para la proteína V λ 6a unida al segmento JL2, lo que ha permitido la producción recombinante de la proteínas 6aJL2 y su mutante 6aJL2-R24G (Del Pozo Yauner et al., 2008).

I.3 Proteínas 6aJL2 y 6aJL2-R24G asociadas a la enfermedad AL.

La estructura de la proteína recombinante 6aJL2 consta de ocho hebras beta (A–C, C' y D – G) formando un sándwich β de 111 residuos (Figura 3). La estructura tiene un puente disulfuro entre las cisteínas 22 y 91 (Maya-Martinez et al., 2015a; Rudiño-Piñera et al., 2019). La proteína cuenta con un único triptófano (Trp) en la posición 36. Esta propiedad estructural facilita el estudio de la proteína mediante fluorescencia. La emisión de fluorescencia del Trp está apagada por la cercanía del puente disulfuro al residuo cuando la proteína está plegada (Figura 3C). Si la proteína comienza a desplegarse, entonces el incremento en la distancia entre el puente disulfuro y el Trp eliminará el efecto de apagamiento y la fluorescencia del Trp podrá ser detectada.

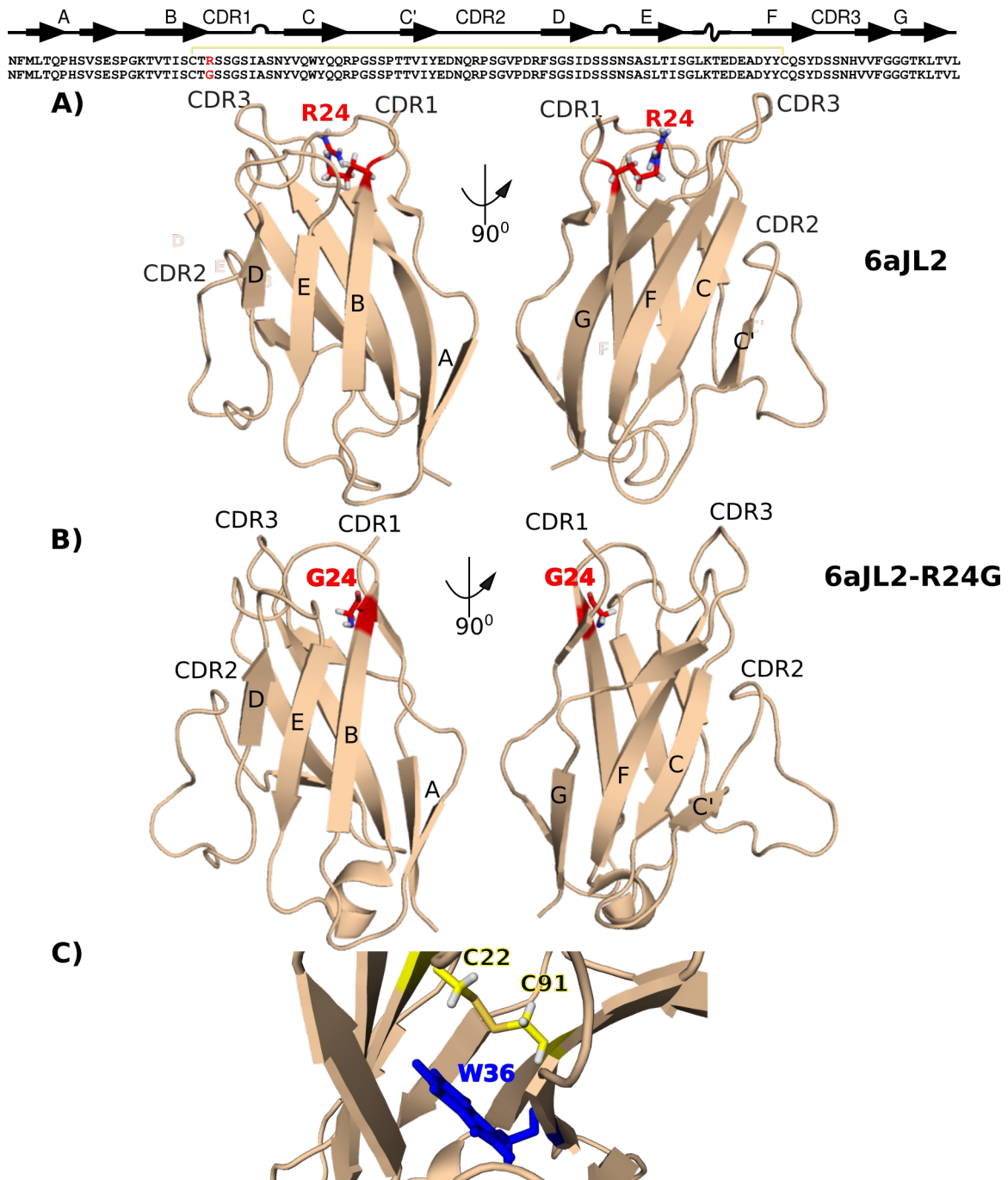


Figura 3: Estructuras tridimensionales de las proteínas.

Estructuras tridimensionales de las proteínas 6aJL2 (A) y 6aJL2-R24G (B) resueltas por RMN. En el borde superior se muestran la estructura primaria y secundaria de ambas proteínas. En el panel C se identifica el puente disulfuro formado entre los residuos C22 y C91 cercano al W36. (PDB id: 2MMX y 2MKW).

I.4 Estudios de las proteínas 6aJL2 por RMN. Antecedentes directos.

Las proteínas recombinantes 6aJL2 y 6aJL2-R24G han sido previamente estudiadas en el Laboratorio de Bioquímica y RMN de Proteínas (CIQ, UAEM). Se dispone de la asignación del espectro 2D ^1H - ^{15}N HSQC de ambas proteínas, es decir, se tiene identificado que residuo corresponde a cada señal de RMN (Maya-Martínez, et al., 2015a). En este tipo de experimento cada señal resulta de la correlación de un protón unido a un nitrógeno, lo que permite contar con información para cada aminoácido de la proteína.

Durante la caracterización de las proteínas por RMN se adquirieron de forma secuencial cada 30 minutos experimentos 2D ^{15}N -HSQC durante 12 h a 37 °C (RMN en tiempo real). En estos experimentos se analizaron los cambios de los desplazamientos químicos de los átomos de las proteínas y en la intensidad de la señal (Maya-Martínez, 2015b) (datos de tesis doctoral no publicados). Así mismo, se adquirieron datos en función del aumento y disminución de la temperatura (de 25 °C a 60 °C y de 60 °C a 25 °C) tomando espectros cada 3 minutos.

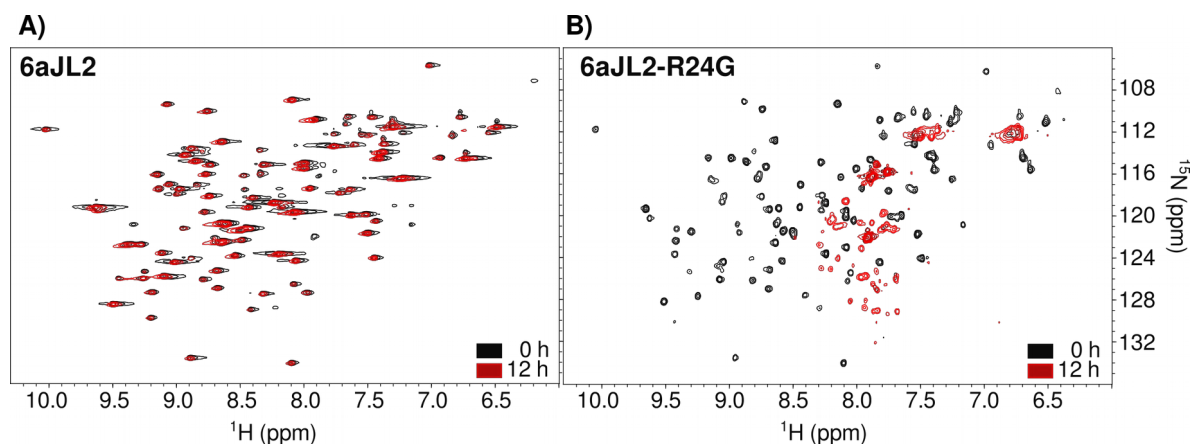


Figura 4: RMN en tiempo real.

Se muestran los espectros de 2D ^1H - ^{15}N HSQC de las proteínas 6aJL2 (A) y 6aJL2-R24G (B) adquiridos durante la incubación de las proteínas a 37 °C a las 0 h (negro) y 12 h (rojo).

Respecto a los experimentos de RMN en tiempo real a 37 °C se observó que la intensidad de señales correspondientes a cada proteína disminuyó a lo largo del tiempo (Figura 4). Para ambas proteínas todos los residuos tuvieron una tendencia similar, es decir, todos mostraron curvas de caída de intensidad en función del

tiempo, ajustables con funciones exponenciales decayentes muy parecidas. La pérdida de intensidad fue significativamente mayor para la proteína 6aJL2-R24G respecto a la 6aJL2. El espectro de la proteína 6aJL2 a las 12 h sigue conteniendo la mayoría de las señales, pero de menor intensidad, mientras que en el de la 6aJL2-R24G permanecen pocas señales. La menor intensidad de las señales se atribuyó a un posible proceso de agregación.

Por otra parte, los experimentos de desplegamiento y replegamiento de las proteínas mediante RMN como función de la temperatura, resultaron en una pérdida de la mayoría de las señales cuando la temperatura alcanzó los 57 °C (Figura 5A y C). Se propuso que también ocurre algún proceso de agregación, puesto que no se observan todas las señales de la proteína en la región correspondiente a una proteína desplegada. Sin embargo, cuando la temperatura se disminuyó a 25 °C (replegamiento) la mayoría de las señales se recuperaron, lo cual indica que el proceso fue reversible (Figura 5 B y D).

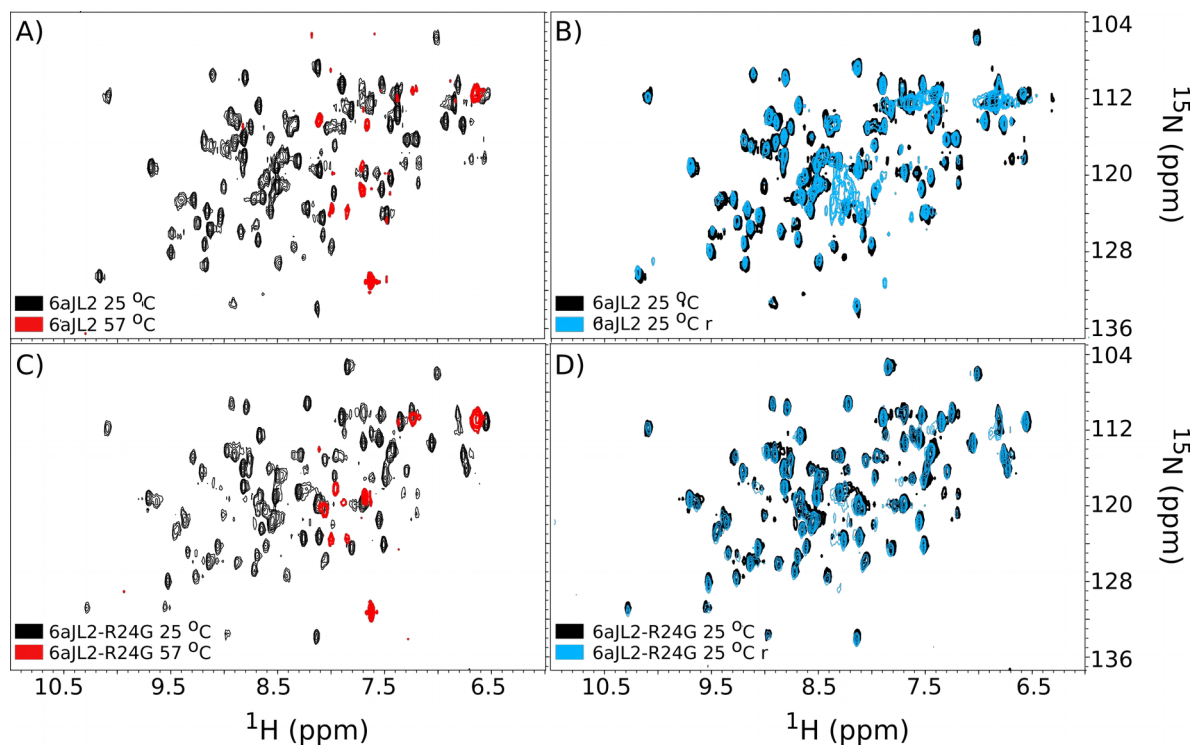


Figura 5: Desplegamiento y replegamiento de las proteínas 6aJL2.

Se muestran los espectros de 2D ^1H - ^{15}N HSQC de las proteínas 6aJL2 (A y B) y 6aJL2-R24G (C y D) adquiridos a distintas temperaturas. Durante el experimento la temperatura se incrementó de 25 °C (espectros en negro) a 57 °C (espectros en rojo) y luego se disminuyó a la temperatura ambiente (espectros en azul).

Cabe destacar que los espectros obtenidos en los experimentos en tiempo real después de 12 h a 37 °C son distintos a los espectros obtenidos a 57 °C para las dos proteínas, lo que sugiere que pueden existir distintas rutas de desplegamiento.

En estudios realizados por del Pozo *et al* 2008 y Blancas *et al* 2009 se caracterizó la estabilidad estructural de las proteínas $\lambda 6$ bajo distintas condiciones (temperatura, cloruro de guanidinio y urea) utilizando las técnicas de fluorescencia y dicroísmo circular principalmente (Del Pozo Yauner et al., 2008; Blancas-Mejia et al., 2009). En éstos se comprobó que el cambio de un solo aminoácido fue suficiente para que la proteína 6aJL2-R24G sea más termodinámicamente inestable que la 6aJL2. En ambos trabajos el proceso de desplegamiento-replegamiento fue reversible, independientemente de la condición experimental utilizada (Blancas-Mejia et al., 2009; Del Pozo Yauner et al., 2008).

De acuerdo con los experimentos de RMN, el desplegamiento y agregación de la proteína pueden transcurrir por mecanismos distintos si se trabaja a una temperatura constante por largo tiempo, o si se aumenta y disminuye la temperatura. En el presente trabajo, proponemos realizar experimentos equivalentes a los descritos por RMN, utilizando las metodologías de dispersión dinámica de luz y fluorescencia, para así lograr tener una mejor comprensión de los proceso de desplegamiento y agregación.

I.5 Técnicas biofísicas para el estudio de la agregación de proteínas.

El término “agregados proteicos”, se refiere a todo tipo de especies multiméricas formadas por enlaces covalentes o interacciones no covalentes (Mahler et al., 2008). El proceso de agregación en general puede conducir a agregados solubles y/o insolubles que pueden precipitar. La morfología de estos agregados insolubles puede ser amorfa o fibrilar, lo que depende de la proteína y su ambiente. Los agregados pueden estar formados por interacciones no covalentes (interacciones de Van der Waals, hidrofóbicas, electrostáticas o enlaces de hidrógeno), mientras que los agregados covalentes pueden, por ejemplo, formarse a través de enlaces disulfuro o a través de reacciones de entrecruzamiento entre grupos no tioles como la formación de ditirosina (Mahler et al., 2008). La agregación puede ser reversible o

irreversible, donde los agregados irreversibles podrían ser eliminados por una técnica de separación como filtración. La formación de los agregados reversibles a menudo se relaciona al autoensamblaje de moléculas de proteínas (Mahler et al., 2008).

I.5.1 Aspectos generales de la espectroscopía de fluorescencia.

La espectroscopia de fluorescencia permite estudiar muestras que contengan fluoróforos. Los fluoróforos intrínsecos de las proteínas son los residuos aromáticos, principalmente el triptófano (Trp) (Pain, 2004). La técnica se basa en excitar los electrones de las moléculas a una longitud de onda (~ 290 nm para Trp) y detectar la luz emitida en forma de fluorescencia. El máximo de intensidad de fluorescencia para el Trp aparecerá a una menor energía, es decir, a una longitud de onda mayor (Pain, 2004).

El estudio de la fluorescencia de las proteínas proporciona información valiosa sobre la estructura de la molécula, su ambiente químico, o los cambios conformacionales asociados a la unión de un ligando, el incremento de la temperatura o el cambio de solvente (Calleja, 1996).

Como ya se mencionó anteriormente, la proteína 6aJL2 tiene un residuo de triptófano en la posición 36. En la estructura tridimensional el W36 está muy cerca del puente disulfuro formado entre las C22 y C91. Esta cercanía ocasiona que el espectro de fluorescencia de la proteína 6aJL2 plegada sea de muy baja intensidad por un efecto de apagamiento de la fluorescencia. Sin embargo, si la proteína comienza a desplegarse el W36 se alejará del enlace disulfuro y aumentará su intensidad de fluorescencia. Este cambio de intensidad de fluorescencia es útil para determinar el estado de plegamiento de la proteína.

En las cinéticas de desplegamiento se determina la intensidad de fluorescencia a la longitud de onda del máximo de emisión de fluorescencia en el tiempo. En estudios previos con las proteínas 6aJL2 se ha reportado que el desplegamiento de la proteína debe ocurrir como un paso previo a la su agregación.

1.5.2 Turbidimetría

Las soluciones de proteínas tienen una propiedad óptica, llamada opalescencia o turbidez. La “opalescencia” se describe como una apariencia translúcida turbia y blanca, mientras que la turbidez se refiere a la turbidez de los fluidos causada por las partículas individuales presentes de varios tamaños. Esta propiedad óptica está en función de la capacidad para dispersar y absorber luz de las partículas presentes en la solución (Mahler et al., 2008).

Las proteínas son coloides naturales y la turbidez de las formulaciones acuosas depende de la concentración de proteínas, la presencia de partículas no disueltas, el tamaño de partícula y el número de partículas por unidad de volumen (Mahler et al., 2008).

Existen varios modelos de turbidímetros que dependen de la disposición (geometría) del haz de fuente de luz y el detector. El ensayo *in-vitro* más común para determinar la agregación de proteínas es la determinación de la turbidez. Dos características de los agregados de proteínas han hecho que este método sea ampliamente utilizado son: los agregados dispersan la luz en la región visible del espectro de absorción, ya que su tamaño varía de nanómetros a micrómetros y las proteínas no absorben en esta región (Mahler et al., 2009; Stoppini and Bellotti, 2015).

1.5.3 Dispersión dinámica de luz (DLS)

La técnica de dispersión dinámica de luz se ha utilizado para la determinación del tamaño de macromoléculas disueltas en un líquido, desde 1 nm a 10 μm de diámetro (Stetefeld, McKenna & Patel, 2016). El principio de la técnica se basa en que la muestra es iluminada por un rayo láser y las fluctuaciones de la luz dispersada son detectadas por un detector de fotones a un ángulo θ de dispersión conocido. La intensidad de la luz dispersada fluctúa a una velocidad que depende del tamaño de las partículas.

Desde el punto de vista microscópico las partículas dispersan la luz en función de su movimiento. Experimentalmente, este proceso se caracteriza a través del cálculo de la función de correlación de la intensidad ($G(\tau)$), cuyo análisis proporciona el

coeficiente de difusión de las partículas (D). Al conocer el coeficiente de difusión (D), es posible predecir el radio hidrodinámico, utilizando la ecuación de Stokes-Einstein:

$$R_h = \frac{T \cdot K_B}{6 \pi \eta D}$$

donde: K_B es la constante de Boltzmann, T es la temperatura, R_h es el radio hidrodinámico, D es el coeficiente de difusión y η es la viscosidad del medio.

El radio hidrodinámico calculado corresponde al radio de una esfera que posee el mismo coeficiente de difusión traslacional que el de la partícula que se mide (normalmente se incluye una capa de hidratación que rodea a la molécula).

II. JUSTIFICACIÓN

La proteína 6aJL2 está relacionada con la formación de fibras amiloides en la enfermedad de AL. Se ha propuesto que para que ocurra la formación de fibras estas proteínas tienen que desplegarse, con lo cual el estudio del desplegamiento ha sido utilizado como una herramienta para entender el proceso de formación de fibras amiloides. A la fecha, la mayoría de los estudios de desplegamiento se han realizado con el aumento de la temperatura o con la adición de agentes químicos. Estas metodologías son una primera aproximación para entender lo que pudiera ocurrir en el cuerpo humano.

Sin embargo, en estudios realizados por RMN se observó que el desplegamiento a 37 °C por 12 h de la proteína 6aJL2 y su mutante es distinto a otros procesos de desplegamiento. Por lo tanto, proponemos que existen rutas distintas para los procesos de desplegamiento, en función de la condición experimental utilizada.

III.1 HIPÓTESIS

El desplegamiento de las proteínas 6aJL2 y 6aJL2-R24G en el tiempo a 37 °C, sin variaciones en la temperatura, es distinto al desplegamiento con cambios en la temperatura.

III.2 OBJETIVOS

Objetivo general:

Caracterizar el desplegamiento de las proteínas 6aJL2 y 6aJL2-R24G como función del tiempo a una temperatura constante (37 °C) y su posible correlación con la formación de fibras amiloides.

Objetivos particulares:

1. Expresar y purificar las proteínas recombinantes 6aJL2 y 6aJL2-R24G en *Escherichia coli*.
2. Caracterizar la formación de agregados por dispersión dinámica de luz, como función del tiempo a temperatura constante y como función de la temperatura (de 25 a 65 °C).
3. Caracterizar el desplegamiento de las proteínas por fluorescencia como función del tiempo a temperatura constante y como función de la temperatura (de 25 a 65 °C).

IV. METODOLOGÍA

IV.1 Expresión y purificación.

IV.1.1 Expresión de las proteínas recombinantes 6aJL2 y 6aJL2-R24G.

Las proteínas 6aJL2 y 6aJL2-R24G se expresaron en la bacteria *E. coli* DE3. Se seleccionó una colonia de una placa con bacterias transformadas con el plásmido pET27b+-6aJL2-R24G y se adicionaron a un matraz con 500 mL de medio LB y kanamicina (60µg/mL). El cultivo se incubó a 37 °C y a 200 rpm hasta que el crecimiento bacteriano alcanzó una densidad óptica de 0.8 a 600 nm. Posteriormente, se adicionaron 400 µL de IPTG 0.8 mM al cultivo celular, el cual se incubó a 37 °C, con una agitación constante de 150 rpm por 12 horas.

IV.1. 2 Purificación de las proteínas recombinantes 6aJL2 y 6aJL2-R24G.

El cultivo bacteriano se centrifugó a 4000 rpm, a 4 °C por 30 minutos. Después se resuspendió la pastilla celular en 40 mL de sacarosa al 20 % y se incubó durante 20 minutos a 4 °C. Luego se centrifugó a 4000 rpm, a 4 °C por 30 minutos. Al terminar la pastilla se resuspendió en 30 mL de agua estéril fría y se incubó durante 20 minutos a 4 °C. Se volvió a centrifugar a 10000 rpm, a 4 °C durante 40 minutos. El sobrenadante colectado se filtró con una membrana de tamaño de poro de 0.22 µm para la purificación.

La muestra (5 mL) se inyectó en una columna (Superdex 200), previamente equilibrada con 2 volúmenes de amortiguador fosfato de sodio 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7.4. Se utilizaron 150 mL para la elución de las proteínas con el empleo de un flujo de 1 mL/min. La proteína durante la cromatografía fue monitoreada con la determinación de la absorción a 280 nm.

IV.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE).

Las fracciones colectadas en la purificación se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 16 % con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), según el método descrito por Laemmli y colaboradores (Laemmli, 1970). Durante toda la corrida se utilizó un voltaje de 160 mV en una cámara electroforética. Las muestras

se mezclaron con tampón de ruptura 3x (Tris 1M, pH 8, SDS, betamercaptoetanol, glicerol, azul de bromofenol) y se calentaron durante 5 min, en un bloque térmico a 100 °C. Para desteñir 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. Posteriormente, se utilizó una solución de tinción (10 % ácido acético y 0.003 % de azul de Coomassie R-250) por 1 hora. Para desteñir se utilizó una solución de ácido acético al 10 %. La electroforesis se utilizó como criterio de pureza.

IV.3 Determinación de la concentración de proteína.

La concentración de proteína de las muestras purificadas se determinó mediante la medición de la absorbancia a una longitud de onda de 280 nm en un espectrofotómetro Agilent. Se utilizó una cubeta de cuarzo con un paso óptico de 1 cm de longitud. Se empleó el coeficiente de extinción molar teórico de $14440 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ predicho para la 6aJL2 y $14565 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ para la 6aJL2-R24G. El tampón utilizado en todos los ensayos fue el reportado para los experimentos de RMN (fosfato de sodio 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7.4).

IV.4 Caracterización de la agregación.

IV.4.1 Ensayo de desplegamiento y replegamiento de las proteínas 6aJL2 mediante espectroscopía de fluorescencia.

La concentración de proteínas utilizada fue de 100 μM (fosfato de sodio 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7.4). Se colocaron 2 mL de proteína filtrada en una cubeta de fluorescencia. Se colectaron los espectros de fluorescencia a 25 °C y 37 °C antes de cada experimento. El desplegamiento y replegamiento de la proteína se estudió mediante un barrido de temperatura de 25 a 60 °C y de 60 °C a 25 °C. Se utilizó una longitud de onda de excitación de 295 nm y una longitud de onda de emisión de 350 nm. Después se calculó la temperatura media de desplegamiento (T_m) de cada proteína ajustando los datos obtenidos a una sigmoide. La T_m es la temperatura a la cual el 50 % de las proteínas se encuentran plegadas y el otro 50 % desplegadas. Los experimentos se realizaron en un espectrofluorómetro Cary-Eclipser (Agilent).

IV.4.2 Cinéticas de desplegamiento de las proteínas 6aJL2.

Se colocaron 2 mL de solución de proteína (6aJL2 y 6aJL2-R24G) filtrada a una concentración de 1 mM (fosfato de sodio 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7.4) en una cubeta de fluorescencia. Para la cinética de desplegamiento se midió la intensidad de fluorescencia a 350 nm de las muestras proteicas a 37 °C por 12 horas cada 10 minutos. Los experimentos se realizaron en un espectrofluorómetro Cary-Eclipser (Agilent).

IV.5 Caracterización de la agregación de las proteínas 6aJL2 mediante turbidimetría y DLS.

La cinética de agregación de ambas proteínas seguida mediante ensayos de turbidimetría se realizó en un espectrofotómetro. Se utilizaron muestras a 1 mM (fosfato de sodio 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7.4) de concentración de proteínas. Se midió la absorción de la proteína a 405 nm cada 5 minutos durante 12 h a 37 °C.

Por su parte, las cinéticas de agregación seguida por DLS se realizaron en un equipo Malvern Zetasizer Nano ZSP. Se colocaron 200 µL de proteína filtrada (6aJL2 y 6aJL2-R24G) a una concentración de 1 mM en una cubeta de cuarzo. Se realizaron mediciones puntuales a 25 °C antes de cada experimento para conocer el estado inicial de las proteínas. Se siguió el cambio en el coeficiente de correlación durante 12 h a 37 °C. Cada 1 minuto se tomaron tres lecturas (promedio de 11 lecturas que duran 10 segundos).

El estudio del estado oligomérico de las proteínas 6aJL2 y 6aJL2-R24G se realizó mediante la determinación del radio hidrodinámico (Rh) utilizando un equipo de Zetasizer, con un ángulo de dispersión de 173 °. A partir de las curvas de pérdida de intensidad de la señal en el tiempo se obtuvieron los coeficientes de difusión traslacionales (Stetefeld, McKenna y Patel, 2016). Los Rh se obtuvieron de los coeficientes de difusión, D, a través de la ecuación de Einstein-Stokes. Se utilizó una viscosidad de 0.8872 cP y una temperatura de 25 °C. Cada muestra se analizó por triplicado, tomando en cada una 5 corridas de 11 mediciones de 10 s. Los datos se analizaron mediante los métodos cumulant y de distribución implementado en el software SEDFIT. El método cumulant supone una población de partículas única. El

primer "acumulativo" corresponde a un coeficiente de difusión promedio, mientras que el segundo corresponde a la varianza. El método de distribución genera una distribución de moléculas con diferentes propiedades hidrodinámicas que pueden describirse mediante parámetros individuales.

IV.6 Ensayo de desplegamiento y replegamiento de la proteína 6aJL2 seguido por DLS.

Se colocaron 200 μL de proteína filtrada (6aJL2 y 6aJL2-R24G) a 100 μM en una cubeta de cuarzo. Se realizó una medición puntual a 25 °C antes de cada experimento. Se determinó el radio hidrodinámico de cada proteína al variar la temperatura de 25 a 60 °C y de 60 a 25 °C. Cada 1 °C se tomaron tres lecturas (promedio de 11 lecturas que duran 10 segundos). Se utilizó un equipo Malvern Zetasizer Nano ZSP.

V. RESULTADOS y DISCUSIÓN

V.1 Expresión de proteínas 6aJL2 y 6aJL2-R24G en *E. coli*.

El primer paso para obtener las proteínas recombinantes fue realizar la expresión heteróloga de las proteínas en la bacteria *E. coli*. En la figura 6 se muestran imágenes de geles SDS-PAGE de muestras tomadas durante el proceso de expresión de las proteínas.

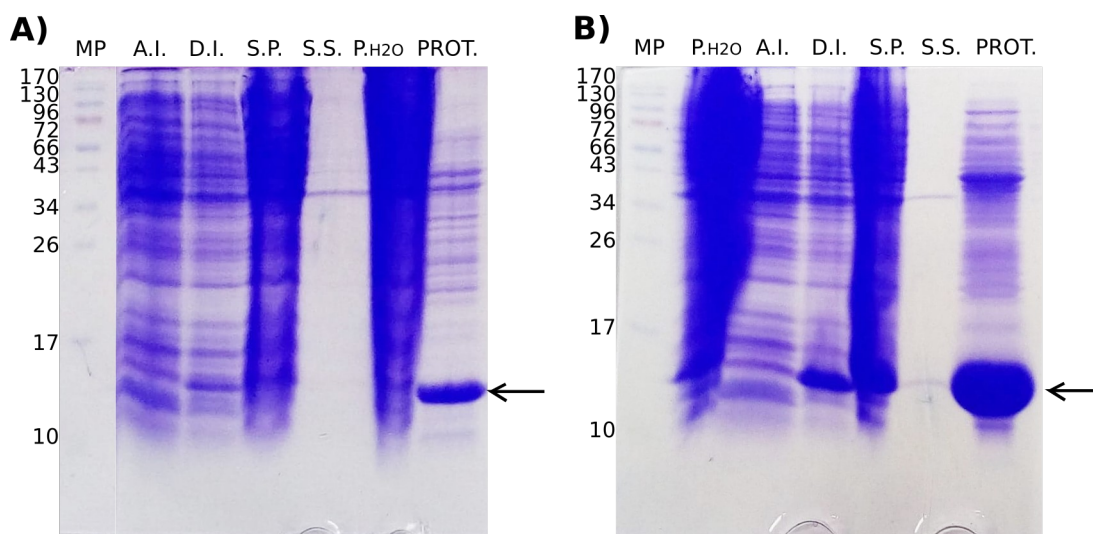


Figura 6: Electroforesis.

Imágenes de geles de electroforesis SDS-PAGE 16 %, del proceso de expresión de las proteínas 6aJL2 (A) y 6aJL2-R24G (B). Cada carril corresponde con las siguientes muestras: (1) Marcador de peso molecular (MP), (2) muestra antes de inducir (A.I.), (3) muestra después de inducir (D.I.), (4) sedimento del tratamiento con sacarosa (S.P.), (5) sobrenadante del tratamiento con sacarosa (S.S.), (6) sedimento de tratamiento con agua (p.H2O), y (7) sobrenadante de tratamiento con agua (PROT.).

En la figura 6 se observa claramente una banda entre los 10-17 kDa, que se corresponde con el peso molecular reportado (12 kDa) para las proteínas 6aJL2 y 6aJL2-R24G, la cual aparece en los carriles después de la inducción. Estos resultados demuestran que el protocolo establecido permite la expresión de las proteínas de interés. La diferencia en la intensidad de las bandas de cada proteína se debió a que no se cargaron la misma cantidad de proteína.

V.2 Purificación de las proteínas recombinantes 6aJL2-R24G.

El extracto de proteínas totales obtenido luego de la ruptura de las células y los pasos de clarificación fue concentrado hasta 5 mL y aplicado en una columna de exclusión molecular (Superdex 200). En las figuras 7A y 7C se muestran los cromatogramas correspondientes a la purificación de las proteínas 6aJL2 y 6aJL2-R24G, respectivamente. En cada cromatograma se puede observar un pico mayoritario que contiene las fracciones con mayor absorción a 280 nm. Las fracciones del pico se analizaron mediante electroforesis en geles SDS-PAGE (figura 7B y 7D). El cromatograma mostrado para la 6aJL2-R24G tiene un pico de menor intensidad, quizás debido a una menor expresión de la proteína en esta corrida de purificación.

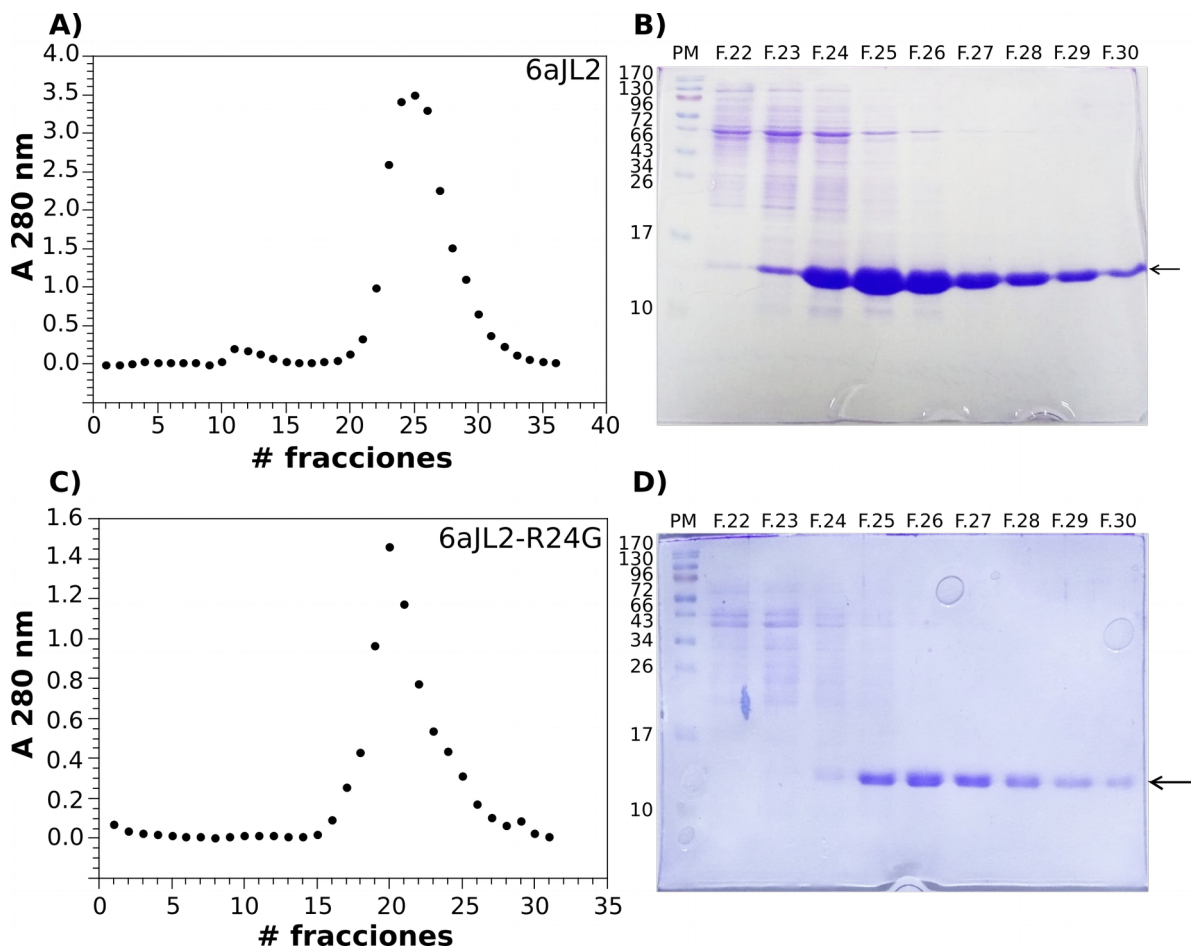


Figura 7: Cromatograma e imágenes de geles. Purificación de las proteínas 6aJL2 (A y B) y 6aJL2-R24G (C y D). A la izquierda se muestran los cromatogramas y a la derecha imágenes de los geles de electroforesis SDS-PAGE al 16

% de cada purificación. La flecha señala las bandas alrededor del peso molecular de 12kDa, correspondientes a las proteínas 6aJL2.

De acuerdo con los resultados de la purificación se obtuvo una muestra con un peso molecular alrededor de 12 kDa, lo que se corresponde con el peso molecular esperado para estas proteínas. Aún cuando se observan algunas bandas contaminantes, la banda mayoritaria observada para ambas proteínas evidencia que las muestras proteicas tienen un alto nivel de pureza (más del 95 %), suficiente para los experimentos de caracterización molecular.

V.3 Caracterización del desplegamiento de las proteínas 6aJL2 mediante espectroscopía de fluorescencia.

Las muestras purificadas se emplearon en los estudios de caracterización de la agregación de las proteínas 6aJL2. Antes de cada experimento se tomaron los espectros de fluorescencia de cada proteína para conocer el estado inicial de su conformación (Figura 8). En la figura 8 se observa, que en las condiciones utilizadas, las proteínas tienen un máximo de fluorescencia a 350 nm, resultado que se corresponde a los valores reportados anteriormente por Del Pozo et al 2008. El aumento de la temperatura de 25 a 37 °C no afectó los espectros de fluorescencia.

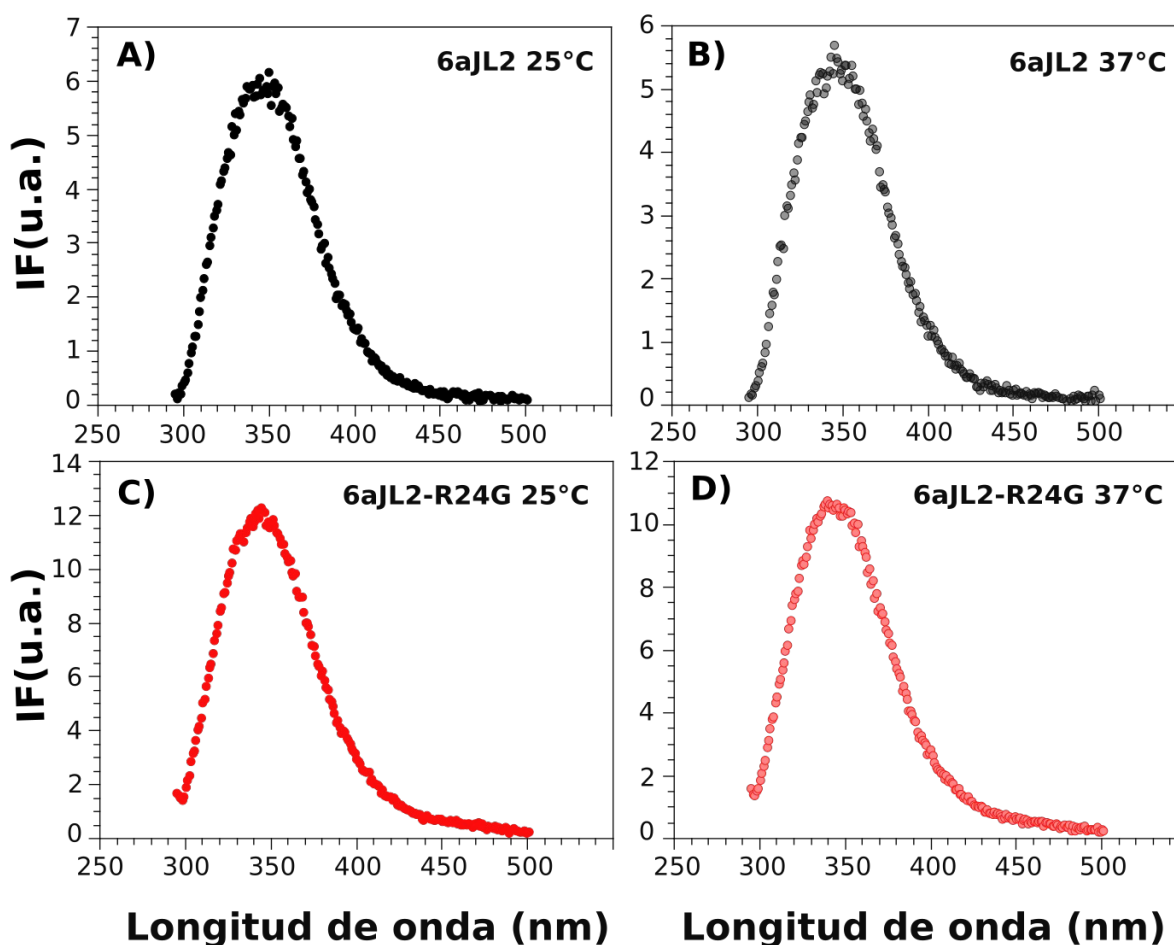


Figura 8: Espectros de fluorescencia.
Espectros de fluorescencia de las proteínas 6aJL2 (A y B) y 6aJL2-R24G (C y D) a 1 mM, tomados a 25 °C (izquierda) y 37 °C (derecha), respectivamente.

A partir de los espectros de fluorescencia se seleccionó 350 nm, como longitud de onda para monitorear los cambios estructurales alrededor del W36.

V.3.1 Despliegamiento térmico con incremento de la temperatura.

La inestabilidad estructural de las proteínas 6aJL2 y su mutante ha sido caracterizada a partir de la determinación de la propiedad termodinámica T_m . Para comprobar que las proteínas purificadas reproducen las propiedades estructurales antes mencionadas se realizaron experimentos de despliegamiento térmico de ambas proteínas (Figura 9).

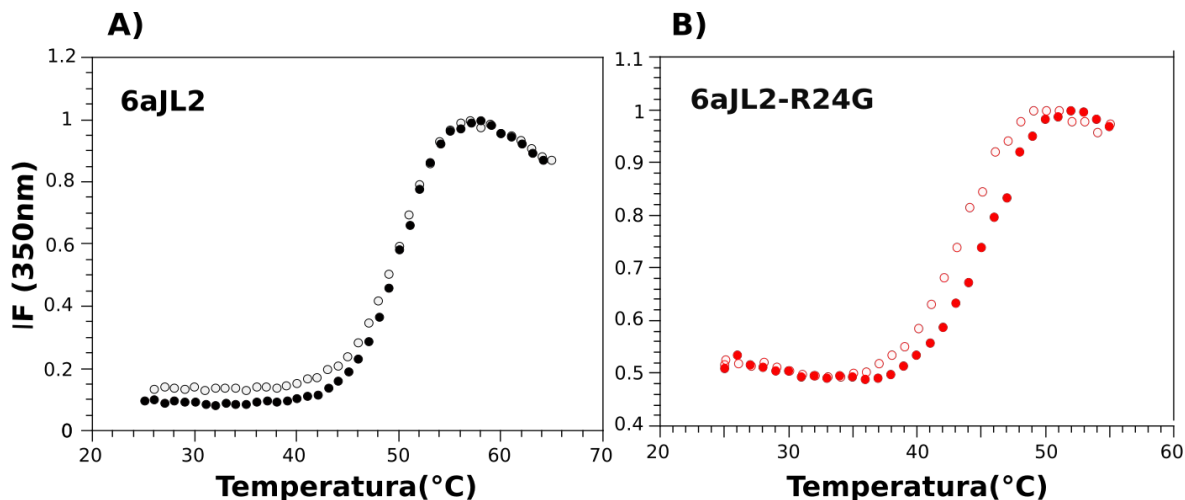


Figura 9: Desplegamiento térmico.

Desplegamiento térmico de 6aJL2 (A) y 6aJL2-R24G (B) seguido por espectroscopía de fluorescencia. Se muestra el proceso de despliegamiento (círculos llenos) y repliegamiento (círculos vacíos) de ambas proteínas, respectivamente.

Las dos proteínas fueron desplegadas y repliegadas con el aumento y disminución de la temperatura, respectivamente. Las curvas de las proteínas 6aJL2 y 6aJL2-R24G muestran una ruta común para el despliegamiento y repliegamiento (Figuras 9A y 9B). Aún cuando los experimentos de Del Pozo et al., 2008 se realizaron a 4 μM mientras que en los nuestros utilizamos 100 μM , se obtuvieron resultados similares.

Los valores de T_m de despliegamiento obtenidos fueron 48.96 ± 0.15 °C para la 6aJL2 y 45.13 ± 0.13 °C para la 6aJL2-R24G. Ambas proteínas reproducen los valores de T_m de despliegamiento antes reportados por Del Pozo et al., 2008 (6aJL2 (49.9 °C) y 6aJL2-R24G (44.2 °C) y por Blancas-Mejias et al., 2009 (6aJL2 (323.2 ± 1.0 K).

V.3.2 Desplegamiento térmico a temperatura constante.

Como parte de la caracterización de la agregación de la proteína se realizaron cinéticas de despliegamiento de las proteínas seguidas por espectroscopía de fluorescencia. Se registró el cambio en la intensidad de la fluorescencia (IF) a 350 nm durante 12 h a 37 °C. En la figura 10 se muestra el cambio de IF.

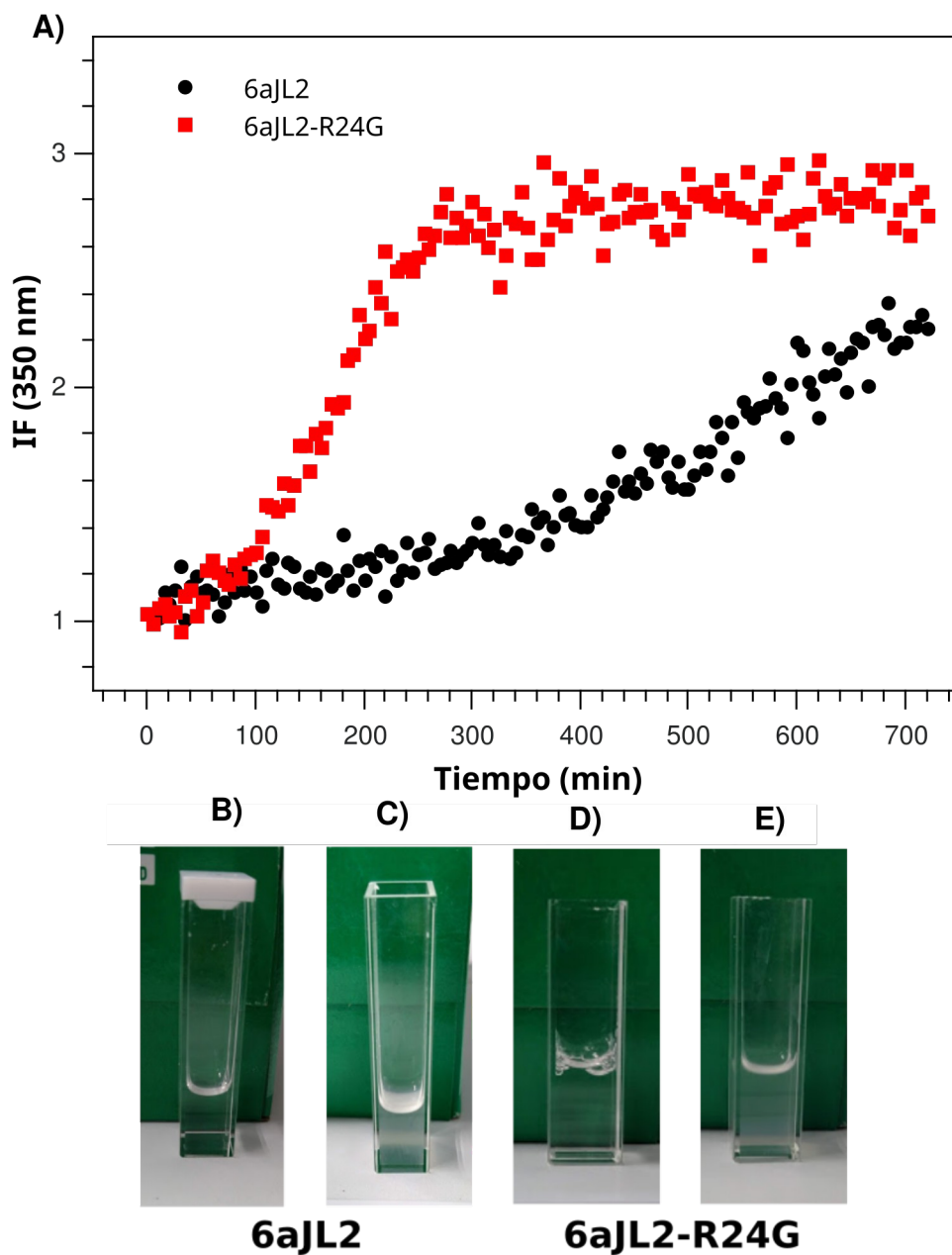


Figura 10: Despliegamiento térmico a temperatura constante. Cinética de despliegamiento de las proteínas. A) IF a 350nm en el tiempo de las proteínas 6aJL2 (negro) y 6aJL2-R24G (rojo) de muestras incubadas a 37 °C durante 12 h. B, C) Imágenes de ambas muestras proteicas en las cubetas de fluorescencia antes y D, E) después del experimento.

En la figura 10A y 10B se observa que ambas proteínas aumentan su IF en la medida que transcurre el tiempo, lo cual indica que mantenerlas a 37 °C por largos períodos induce su desplegamiento. Mientras que la proteína 6aJL2 no alcanza una meseta a las 12 h, la 6aJL2-R24G alcanza su máximo alrededor de los 200 minutos (~4 h). Estos resultados indican que la proteína mutante se despliega más rápido que la variante no mutada, lo que está en concordancia con que la proteína 6aJL2-R24G es cinética y termodinámicamente más inestable que la 6aJL2.

Las muestras en las cubetas de fluorescencia donde se realizaron los experimentos terminaron opacas, lo que evidencia la formación de agregados (Figura 10B, 10C, 10D y 10E). Esto ocurrió con ambas proteínas. Al terminar el experimento la muestra se centrifugó y se cuantificó la concentración de proteína soluble. Alrededor del 80 % de ambas proteínas se mantuvo soluble. El desplegamiento inducido por la exposición por largo tiempo a altas temperaturas, está relacionado con la agregación observada.

Para entender la naturaleza de los agregados formados, se realizó su caracterización mediante las técnicas de turbimetría y dispersión dinámica de luz.

V.4 Caracterización de estado oligomérico y agregación de las proteínas.

La agregación de proteínas puede ser inducida por una amplia variedad de condiciones, incluyendo temperatura, congelación y/o descongelación, agitación, cambios de pH, concentración de proteínas, entre otras. La agregación normalmente se caracteriza por un marcado aumento en la turbidez. Mediante ensayos de turbidimetría se determinó la capacidad de agregación de las proteínas 6aJL2 y 6aJL2-R24G, incubadas a 37 °C por 12 h (Figura 11).

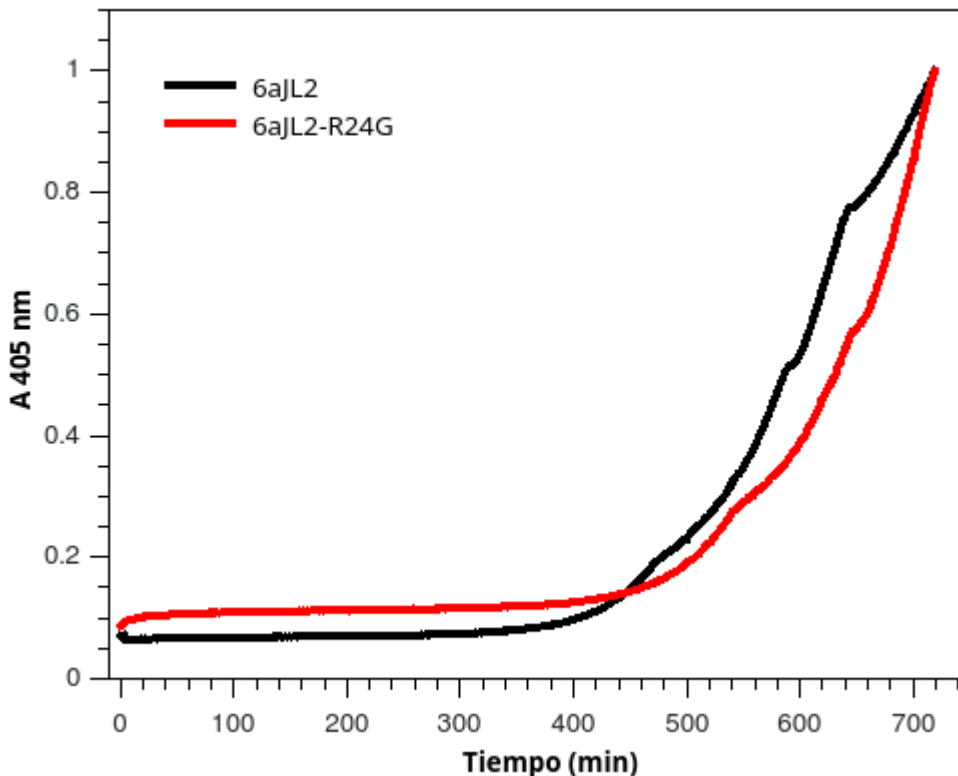


Figura 11: Ensayo de turbidimetría de ambas proteínas. Cinética de agregación de las proteínas 6aJL2 (A) y 6aJL2-R24G (B) seguida por turbidimetría, a 37 °C durante 12h. Se muestra la variación de la absorbancia a 405 nm en el tiempo.

En la figura 11 se observa que ambas proteínas aumentan su turbidez, transcurridas las 12 h a 37 °C. El tiempo necesario para que incremente la turbidez es muy similar para ambas proteínas (~ 500 min), siendo ligeramente mayor para la 6aJL2-R24G. Resulta interesante que de acuerdo con los datos de las cinéticas de desplegamiento seguidas por fluorescencia, transcurridos 200 min, la proteína 6aJL2-R24G está totalmente desplegada, pero pareciera que no se ha agregado significativamente según su turbidez. Esta técnica es más sensible a agregados de grandes tamaños (orden micrometros). Por el contrario, la proteína 6aJL2, no se encuentra totalmente desplegada a este tiempo y tampoco ha empezado a agregarse. Sin embargo, ambas proteínas son capaces de agregar bajo las condiciones utilizadas. De acuerdo con estos datos podemos sugerir que el desplegamiento pudiera ser una condición necesaria pero no suficiente para que ocurra la agregación de estas proteínas. El desplegamiento parcial o total de estas

proteínas ha sido sugerido como un paso necesario para la obtención de un intermediario, que conlleve a la formación de fibras amiloides (Merlini *et al.*, 2018). También se ha planteado que es necesario que se pierdan los mecanismos de protección antiagregación (Valdés-García *et al.*, 2017).

V.4.1 Estado oligomérico de las proteínas 6aJL2 y 6aJL2-R24G.

La técnica DLS es muy útil para caracterizar el estado oligomérico de proteínas. De acuerdo a los estudios previos por RMN, el desplegamiento y la agregación inducida por la temperatura depende de si el ensayo se realiza a temperatura constante o variable, así como del tiempo de incubación. Para caracterizar el estado oligoméricos de las proteínas 6aJL2, se realizaron diversos ensayos por DLS bajo condiciones similares a las utilizadas en RMN. Cada una de las muestras analizadas por fluorescencia también fueron estudiadas por DLS.

A diferencia de la técnica de turbidimetría, por DLS se pueden describir el tamaño de las poblaciones presentes en la muestra y se pueden determinar oligómeros de menor tamaño. A partir de la curva de correlación se obtuvo el coeficiente de difusión. Para la determinación de los Rh se utilizó un método no lineal que ajusta los datos a múltiples exponenciales decayentes. La señal de DLS es muy sensible a la presencia de moléculas grandes debido al hecho de que la luz dispersada es proporcional a la sexta potencia del diámetro.

Los datos de las curvas obtenidas para ambas proteínas son polidispersos, lo que sugiere que estas existen en distintas poblaciones. El mejor ajuste de las curvas de correlación se logró cuando varias poblaciones fueron utilizadas. Además, se calculó el Rh para la estructura del monómero (por RMN, PDBID 2MMX y 2MKW) y del dímero (por Rayos X, PDBID 5jpp) utilizando el programa HYDROPRO. Este *software* permite la predicción de los coeficientes de difusión rotacional y traslacional anisotrópicos y parámetros de relajación de RMN de proteínas. En la tabla 1 se resumen los valores de Rh obtenidos para cada proteína.

Tabla 1: Rh (nm) de las proteínas 6aJL2 y 6aJL2-R24G a 1 mM.

DLS		HYDROPRO monómero		HYDROPRO dímero
6aJL2	6aJL2-R24G	6aJL2 PDBID 2MMX	6aJL2-R24G PDBID 2MKW	6aJL2-R24G PDBID 5jpp
1.14 / 2.3 / 6.1	2.4 / 18.1	1.96	1.96	2.48

Al comparar los Rh obtenidos con los calculados con el programa HYDROPRO se observa que poblaciones de monómero y dímero pueden detectarse, a altas concentraciones. Sin embargo, se detectaron otras poblaciones. El equilibrio entre los estados oligoméricos pudiera estar relacionado a la propensión de estas proteínas a la agregación bajo ciertas condiciones experimentales.

V.4.2 Cinética de agregación de las proteínas 6aJL2 y 6aJL2-R24G seguidas por DLS.

Los resultados de los ensayos de fluorescencia evidencian que ambas proteínas se despliegan, aunque la proteína 6aJL2-R24G lo hace más rápido. Las muestras incubadas a 37 °C por 12 h mostraron un incremento de la turbidez en el tiempo, lo que indica que se agregaron. El desplegamiento y agregación de la proteína 6aJL2-R24G pudieran justificar la pérdida de intensidad de las señales de RMN en los experimentos en tiempo real. Las cinéticas de agregación seguidas por DLS permitieron determinar el cambio del Rh en función del tiempo. Se utilizaron las mismas condiciones que en los estudios previos, 1 mM de concentración, una temperatura de 37 °C y 12 h de incubación.

En la figura 12 se observan algunas curvas de correlación obtenidas durante las cinéticas de agregación. Se seleccionaron los datos colectados a las 0, 4 y 12 h para complementar los resultados por fluorescencia. Las curvas de correlación de la proteína 6aJL2 a tiempo 0 h y trascurridas 4 h no mostraron una variación significativa entre ellas (Figura 12A), mientras que en este rango de tiempo en las curvas correspondientes a la proteína 6aJL2-R24G sí se observan diferencias (Figura 12B). Al final de la cinética se puede observar que no hubo un corrimiento en las curvas de la proteína mutante, lo que indica que el Rh alcanzó su máximo valor a

las 4h. Este resultado concuerda con los encontrados por fluorescencia donde a las 4h se alcanzó el máximo de IF para la proteína 6aJL2-R24G. En contraste, la proteína 6aJL2 a las 12h tuvo un incremento en su Rh, lo que indica que tras 12h la proteína continúa agregándose. Los resultados de DLS no difieren de los de turbidimetría, pues aún cuando por esta última no se observa un incremento de la absorbancia a las 4h para ninguna de las dos proteínas, por DLS se pudo detectar un incremento en poblaciones de mayor tamaño, pero en el rango de nm, las que son más difíciles de detectar por turbidimetría.

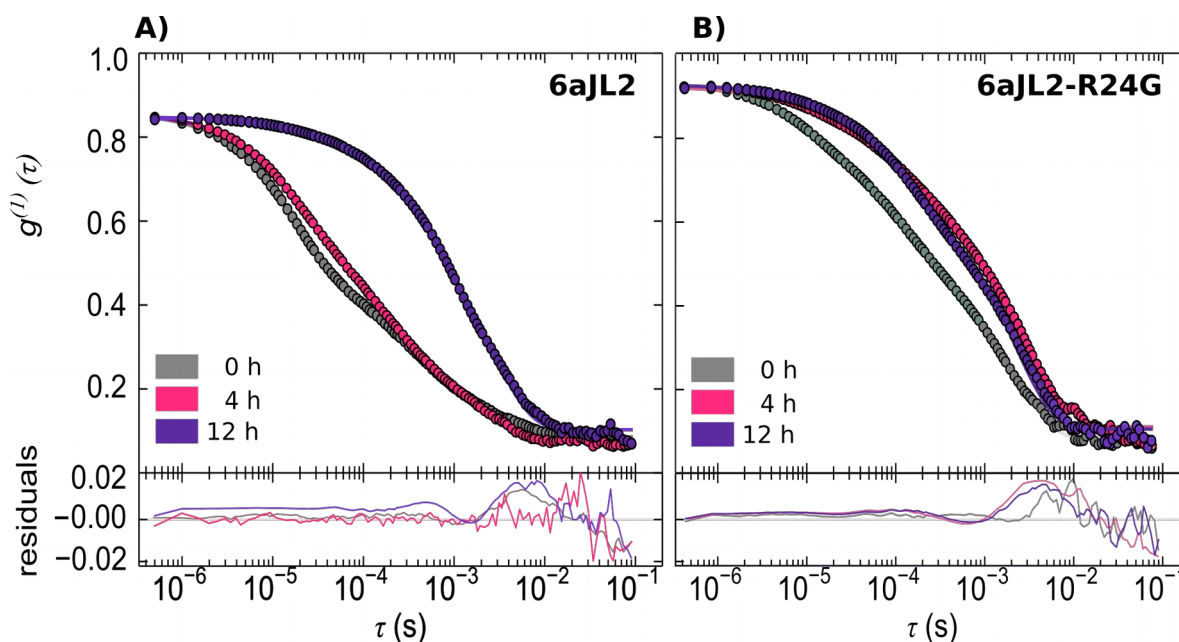


Figura 12: Curvas de correlación de las cinéticas de agregación seguidas por DLS. Función de correlación de las proteínas 6aJL2 (A) y 6aJL2-R24G (B) colectadas durante la cinética de agregación a 37 °C y 12 h. Se muestran los datos a 0, 4 y 12 h en los colores gris, rosado y púrpura, respectivamente. Los datos se utilizaron para obtener coeficientes de difusión traslacional por la metodología de distribución. Las mediciones en el transcurso del tiempo produjeron un desplazamiento hacia la derecha, lo que indica un aumento de tamaño debido a la incubación de las proteínas a 37 °C por largo tiempo.

En la tabla 2 se resumen los datos obtenidos del análisis de las curvas de correlación de ambas proteínas.

Tabla 2: Rh de las proteínas 6aJL2 y 6aJL2-R24G obtenidos durante la cinética de agregación por DLS.

Tiempo (horas)	6aJL2		6aJL2-R24G	
	Rh (nm)	Población (%)	Población (%)	Rh (nm)
0	4.21	47.53%	12.09%	2.64
	47.04	22.61%	23.35%	18.62
	392.2	27.44%	60.79%	343.7
4	3.66	14.32%	3.37%	3.07
	30.92	22.99%	13.04%	32.59
	586.8	58.25%	80.84%	585.7
12	2.89	1.73%	3.1%	2.69
	21.32	8.53%	31.62%	37.49
	117.91	46.39%	64.8%	588.3
	782.2	40.42%		

Si analizamos todos estos resultados, podemos sugerir que ambas proteínas pueden agregarse sin que sean sometidas a otras condiciones como la agitación, cambio de pH o el uso de agentes químicos. De acuerdo a los valores de los Rh, al final de las cinéticas hay una mezcla de poblaciones que incluyen proteína monomérica plegada y parcialmente desplegada, así como agregados de gran tamaño. De acuerdo a resultados preliminares los agregados no son fibrilares, ya que no hubo incremento en la fluorescencia del ThT, en los ensayos de formación de fibras. Este hecho era el esperado, puesto que para formar fibras *en vitro* se ha reportado la necesidad de tener agitación constante en la muestra.

VI. CONCLUSIONES PARCIALES

1. El análisis de los resultados muestra que ambas proteínas pueden agregarse cuando son incubadas a 37 °C por 12 h, sin necesidad de que sean sometidas a otras condiciones como incremento en la temperatura, cambio de pH o el uso de agentes químicos.
2. Los resultados de los ensayos de fluorescencia evidencian que ambas proteínas se despliegan parcialmente, aunque la proteína 6aJL2-R24G lo hace más rápido. De acuerdo a los datos de DLS, al final de las cinéticas hay una mezcla de poblaciones que incluyen proteína parcialmente desplegada, así como agregados de gran tamaño.
3. El proceso de desplegamiento y agregación no termina para la proteína 6aJL2 después de 12 h, mientras que la 6aJL2-R24G alcanza su máximo alrededor de la ~ 4 h. Este resultado concuerda entre lo encontrado por fluorescencia y DLS donde a las 4h se alcanzó el máximo cambio para la proteína 6aJL2-R24G.
4. Sin embargo, el tiempo necesario para que incremente la turbidez es muy similar para ambas proteínas (~ 500 min), lo que sugiere que esta técnica es solo sensible a agregados de gran tamaño (orden micrómetros).
5. El comportamiento de estas proteínas (desplegamiento y agregación más o menos simultánea) pueden justificar la pérdida de intensidad de las señales de RMN en los experimentos en tiempo real.
6. El proceso de desplegamiento y la agregación inducida dependen del proceso al que las proteínas son sometidas.

VII. PERSPECTIVAS

- 1) Analizar cuantitativamente datos de DLS.
- 2) Realizar ensayos de turbidimetría y DLS a distintas temperaturas.
- 3) Realizar ensayos con ThT y microscopía electrónica, para determinar si los agregados son o contienen fibrilas amiloides.

VIII REFERENCIAS

- Abraham RS, Geyer SM, Ramirez-alvarado M, Library PM. 2004. Analysis of Somatic Hypermutation and Antigenic Selection in the Clonal B Cell in immunoglobulin light chain amyloidosis (AL). *Journal of Clinical Immunology* 24:340–353. DOI: 10.1023/B:JOCI.0000029113.68758.9f
- Blancas-Mejia, Misra P, Dick C, Cooper S, Redhage K, Bergman M, Jordan T, Maar K, Ramirez- Alvarado M. 2018. Immunoglobulin light chain amyloid aggregation. *Chemical Communications* 20:10664–10674. DOI: 10.1039/c8cc04396e.
- Blancas-Mejia LM, Tellez LA, del Pozo-Yauner L, Becerril B, Sanchez-Ruiz JM, Fernandez-Velasco DA. 2009. Thermodynamic and Kinetic Characterization of a Germ Line Human λ 6 Light-Chain Protein: The Relation between Unfolding and Fibrillogenesis. *Journal of Molecular Biology* 386:1153–1166. DOI: 10.1016/j.jmb.2008.12.069.
- Calleja G. 1996. *Técnicas instrumentales de análisis en bioquímica*. España, Madrid: Síntesis.
- Ch'ang L, Yen C, Besl L, Schell M, Solomon A. 1994. Identification and characterization of a functional human Ig V_{λVI} germine gene. *Molecular Immunology* 31:531–536. DOI: 10.1016/0161-5890(94)90040-X
- Chiti F, Dobson CM. 2006. Protein Misfolding, Functional Amyloid, and Human Disease. *Annual Review of Biochemistry* 75:333–366. DOI: 10.1146/annurev.biochem.75.101304.123901.
- Chiti F, Dobson CM. 2017. Protein Misfolding, Amyloid Formation, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade. *Annual Review of Biochemistry* 86:27–68. DOI: 10.1146/annurev-biochem-061516-045115.
- Chothia C, Gelfand I, Kister A. 1998. Structural determinants in the sequences of immunoglobulin variable domain. *Journal of Molecular Biology* 278:457–479. DOI: 10.1006/jmbi.1998.1653.
- Comenzo RL, Zhang Y, Martinez C, Osman K, Herrera GA. 2001. The tropism of organ involvement in primary systemic amyloidosis: Contributions of Ig VLgerm line gene use and clonal plasma cell burden. *Blood* 98:714–720. DOI: 10.1182/blood.V98.3.714.
- Del Pozo Yauner L, Ortiz E, Sánchez R, Sánchez-López R, Güereca L, Murphy CL, Allen A, Wall JS, Fernández-Velasco DA, Solomon A, Becerril B. 2008. Influence of the germline sequence on the thermodynamic stability and fibrillogenicity of

- human lambda 6 light chains. *Proteins: Structure, Function and Genetics* 72:684–692. DOI: 10.1002/prot.21934.
- Dobson CM. 2004. Principles of protein folding, misfolding and aggregation. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 15:3–16. DOI: 10.1016/j.semcd.2003.12.008.
- Eichner T, Radford SE. 2011. A Diversity of Assembly Mechanisms of a Generic Amyloid Fold. *Molecular Cell* 43:8–18. DOI: 10.1016/j.molcel.2011.05.012.
- Enqvist S, Sletten K, Stevens FJ, Hellman U, Westermark P. 2007. Germ line origin and somatic mutations determine the target tissues in systemic AL-amyloidosis. *PLoS ONE* 2:10-981. DOI: 10.1371/journal.pone.0000981.
- Gertz MA. 2018. Immunoglobulin light chain amyloidosis: 2018 Update on diagnosis, prognosis, and treatment. *American Journal of Hematology* 93:1169–1180. DOI: 10.1002/ajh.25149.
- Hernández-Santoyo A, del Pozo Yauner L, Fuentes-Silva D, Ortiz E, Rudiño-Piñera E, Sánchez-López R, Horjales E, Becerril B, Rodríguez-Romero A. 2010. A single mutation at the sheet switch region results in conformational changes favoring λ 6 light-chain fibrillogenesis. *Journal of Molecular Biology* 396:280–292. DOI: 10.1016/j.jmb.2009.11.038.
- Laemelli UK. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685. DOI: 10.1038/227680a0
- Mahler, H., Friess, W., Grauschopf, U., Kiese, S. Protein aggregation: pathways, induction factors and analysis, *J. Pharm. Sci.* 98 (2009) 2909e2934. DOI: 10.1002/jps.21566
- Mas J, García G. 2012. *El concepto de enfermedad asociado a la conformación de proteínas*. Ciudad de México: El Manual Moderno.
- Mathews CK, Van Holde KE, Ahern KG. 2013. *Bioquímica*. 4ta ed. México, D.F.: Pearson Educación.
- Maya-Martínez R. 2015b. Estudios estructurales y dinámicos del estado nativo de las proteínas de la línea germinal λ 6a. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Maya-Martínez R, Gil-Rodríguez P, Amero C. 2015a. Solution structure of 6aJL2 and 6aJL2-R24G amyloidogenic light chain proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 456:695–699. DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.12.044.
- Merlini G, Bellotti V. 2003. Mechanisms of Disease By Amyloid. *The New England Journal of Medicine*. 349:583–596. DOI: 10.1056/NEJMra023144

- Merlini G, Dispenzieri A, Santhorawala V, Sch SO, Palladini G, Hawkins PN, Gertz MA. 2018. Systemic immunoglobulin light chain amyloidosis. *Nature Reviews Disease Primers*. 25:38. DOI: 10.1038/s41572-018-0034-3.
- Milani P, Merlini G, Palladini G. 2018. iMediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases Light Chain Amyloidosis. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*. 10:1–14. DOI: 10.4084/MJHID.2018.022.
- Nelson L, Cox MM. 2015. Lehninger Principios de Bioquímica. 6ta ed. España, Barcelona. Ediciones Omega.
- Pain RH. 2004. Determining The Fluorescence Spectrum Of A Protein. In: *Handbook of Food Analytical Chemistry*. 245–265. DOI: 10.1002/0471709085.ch4.
- Rudiño-Piñera E, Peláez-Aguilar ÁE, Amero C, Díaz-Vilchis A. 2019. Crystal structure of 6aJL2-R24G light chain variable domain: Does crystal packing explain amyloid fibril formation? *Biochemistry and Biophysics Reports* 20:100682. DOI: 10.1016/j.bbrep.2019.100682.
- Stetefeld J, McKenna SA, Patel TR. 2016. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophysical Reviews* 8:409–427. DOI: 10.1007/s12551-016-0218-6.
- Stoppini, M. and Bellotti, V. 2015. Systemic amyloidosis: lessons from β 2-microglobulin. *Journal of Biological Chemistry*, 290: 9951-8.
- Valdés-García G, Millán-Pacheco C, Pastor N. Convergent mechanisms favor fast amyloid formation in two lambda 6a Ig light chain mutants. *Biopolymers*. 2017 Aug;107(8). doi: 10.1002/bip.23027. PMID: 28509352.
- Virchow R. 1854. Virchows Arch. Pathol. Anat. Physiol. *Zur cellulosefrage*. 6:416–426.

Cuernavaca, Morelos a 6 de septiembre de 2021

DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE
DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES
P R E S E N T E.

Por este conducto, los catedráticos suscritos comunicamos a Usted, que hemos revisado el documento que presenta la Pasante de Biólogo: **Yoselin González Onofre**, con el título del trabajo: **Caracterización espectroscópica del efecto de la temperatura en el desplegamiento de la cadena ligera 6aJL2-R24G**

En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para optar por la Modalidad de Titulación de **Trabajo de Desarrollo Profesional por Etapas**, como lo marca el artículo 33° del Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

A T E N T A M E N T E
Por una humanidad culta

JURADO REVISOR

FIRMA

PRESIDENTE: BIOL. HUGO SUÁREZ CONTRERAS

SECRETARIO: DR. ALEXANDRE TOSHIRRICO CARDOSO TAKETA

VOCAL: DR. CARLOS DANIEL AMERO TELLO

SUPLENTE: DRA. CARMEN NINA PASTOR COLÓN

SUPLENTE: DRA. LINA ANDREA RIVILLAS ACEVEDO



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

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

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

Sello electrónico

CARMEN NINA PASTOR COLON | Fecha:2021-09-06 15:30:08 | Firmante

u/Q+u9aROhdryGw4QclPzxEwe0AoERN40HaAr3n/3iGL87Z8GWRB9YkrwZj5ZRbdr3GTWONGF9WHJFW2dr0FAJuQ/cAkmmKdnw3uCLd3auBuPgkm9m25jInyeNi+nphWlq7EjJnNzfonyftK6yZYQ4tflGAZllvoRuy+j1iWmMjjdmDg4vPBb6Q3ipM/FsItNj9GgSRR9w6BCPrIcZs42+fr38sV9gTXLnpyzsy7kKh3G1SeeRE1vOHVbrweyvMUF53AK0sy/kyFWDfGZw23FTUPzo6F4/RJ5+B1zCtF9YkMG2YjU/UytxDNBhloWaoXl6Ymy0zuJ4Dtx9qR/zl5Q==

CARLOS DANIEL AMERO TELLO | Fecha:2021-09-07 10:51:36 | Firmante

H1WQewSA5Af4DgHGMzU9TBZDBnkLvx9hPZP2Sp8R7V1OI0z+Nlioyosd55j/ABZRlFFB0BgLkoVjTge/kWbCMOW2pqVKhYqzMIJQLUSezGwaJASQc/6Kjgfk9wwi2B1LaCUhZAI7my0lpCZdhmwWjS3Utza+Vtjy0+m4g3PDV01SIE+C3Bxgd+aJtvelMIXRW7h5uD6pa4RhwpmHMAks8Tkt3uMxLEU+CVdH8Qth5jz7vutVtU2i0wvc8Z+IPlhghnKH30tIRI+EXzF/J/+ZRQDUGJvSfG2FQ9hYRmXapng6NVklytyS0iBftjPkeg6gPaKen9EY3530aAZTJEKvW==

LINA ANDREA RIVILLAS ACEVEDO | Fecha:2021-09-07 19:56:08 | Firmante

EmG8uGm60XFDxg4/SksQEQRhReN/4SYbCTymPPEF6ieVbQw+G2X4PuAP/hPUkgaev5eG3quS8SAL3WfIQD8hF0VVVofZ+4nBw3k/9TNLMVPIE/QgQAVeS79ntmB4HcyzLqV K+UIHF2vpNklzcXJrhuk+repdcuiiVqwikFz5mgwNy1MesA2FKfu2QOF+pB+F9BjT6yaO9OMaJRL7DoltbFT9Vb/3ABxHfGRHNUzSn7Zxhddi2mJ+pkWVdC5x1/zuqwdWk06/eTeFBn1P8UKBMfjtASsIAF27J2EmNj0v5+Jby6m2WcvAZX+eJgEtTO7viXa7SgBFNQmeWYVhtOKGIWZA==

ALEXANDRE TOSHIRRICO CARDOSO TAKETA | Fecha:2021-09-10 23:06:22 | Firmante

KsawE6lywFb/TtQ65wdBiQhXQvTzPgEK4uLumrX4Vc3Rw826H4SEGytLAMIDP6g1hrwXnhiJc/7+A/UnE8l2Dr6y3NtUOZ1fG9t8O6dfxgUvIKYfwdhgvJ69zQbYrqQZbHYZBQUul bGh5nr4sm9HnfPzJwxjPwi5E3LhBHFElidrep16u42brU9msVXSZ2dP6TbvWyorJgWWsQFkbv5OsKHqqU9qD/tGJAKvI4RmUp+dQ5qKjZZPdpMlabYIBK1N5TZnl+dOz+zbICFjAt4 YtepivS8C/eONSOTiPKJtw2agSFR35jWlqCpTOpBbJqrqGE43iwWRt5O/sLZttyW6g==

HUGO SUAREZ CONTRERAS | Fecha:2021-09-19 20:32:29 | Firmante

R3Eors86JumjKjTdexec/q8a0BtY1qM7U58dbZC5WptxwfaD3aTs2AK3D5M9vVJnaGIHAHQ8HfqcDjDMDb3N9wo7S2+zChBm1GaWJTzrasQs0X+p8OKWEQCQMp7QTsJB nPUcs5rly/buxp+/VvcGbsGFkuHGc+4/hJNax3b9VJOW2zrnV1wb69yogKkP0KurcgmK3JaDVorTyKjJGRZCly9/+JL8VAXm2F4hvm9Li+gpAimwrls35DenOEmY2mflPaUyBjO 9xhRdWG3/5Jcvx4Pfd/GOVXjP6U6hWHEiVym2J0BjGBRn36MwpGJcV5A7SLv2FA7tSIRjg==

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



0hevcQ

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/v31ySCg0i7pl92jwOSkxOCV1PFjv7bMI>

