



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR

**“Caracterización de la interacción de Cu^{2+} con la proteína 6aJL2-R24G,
relacionada con la enfermedad de amiloidosis de cadena ligera”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. Ángel Enrique Peláez Aguilar

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Lina Andrea Rivillas Acevedo



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR (CIDC)

**“Caracterización de la interacción de Cu^{2+} con la proteína 6aJL2-R24G,
relacionada con la enfermedad de amiloidosis de cadena ligera”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. Ángel Enrique Peláez Aguilar

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Lina Andrea Rivillas Acevedo



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

PRESENTA:

M. en C. ÁNGEL ENRIQUE PELÁEZ AGUILAR

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. LINA ANDREA RIVILLAS ACEVEDO
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR, UAEM

JURADO REVISOR DE TESIS:

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

Dr. CARLOS DANIEL AMERO TELLO
CENTRO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS, UAEM

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

Dr. ALEXIS RODRIGUEZ SOLÍS
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA, UAEM

Dr. ENRIQUE RUDIÑO PIÑERA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

Dra. NINFA RAMÍREZ DURÁN
FACULTAD DE MEDICINA, UAEMex

Publicación

Site-Specific Interactions with Copper Promote Amyloid Fibril Formation for λ 6aJL2-R24G. Angel E. Pelaez-Aguilar, Gilberto Valdés-García, Leidys French-Pacheco, Nina Pastor, Carlos Amero, and Lina Rivillas-Acevedo. *ACS Omega* 2020, 5, 13, 7085–7095. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b03220>.

Resumen

La amiloidosis de cadena ligera es una de las amiloidosis sistémicas más comunes, caracterizada por la deposición de dominios variables de cadenas ligeras de inmunoglobulina como fibras amiloides insolubles en órganos vitales y tejidos, conduciendo a la muerte del paciente en pocos meses después de ser diagnosticado. La línea germinal λ VI está relacionada con esta enfermedad y ha sido reportado que el 25% de proteínas codificadas por esta línea germinal presenta una mutación en la posición 24 donde una Arginina es reemplazada por una Glicina (R24G). Estudios *in vitro* han demostrado que esta mutación reduce la estabilidad e incrementa la capacidad de formar fibras amiloides en la proteína de dicho subgrupo. En diferentes sistemas, como Alzheimer, Parkinson, Diabetes Mellitus II y Prión, el papel de los iones metálicos ha sido relevante, especialmente el Cu^{2+} . Por esta razón nosotros estudiamos, a través de diferentes técnicas espectroscópicas, el papel del ion metálico Cu^{2+} en la formación de fibras amiloides de la proteína recombinante 6aJL2-R24G. Encontramos por fluorescencia que la interacción de Cu^{2+} con la proteína acelera la formación de fibras amiloides, posiblemente disminuyendo su estabilidad térmica. A través de técnicas espectroscópicas y moleculares como absorción electrónica, dicroísmo circular, resonancia magnética nuclear y mutagénesis sitio dirigida, se establecieron posibles sitios de coordinación del cobre con la proteína en el estado nativo, lo cuales, involucran Histidinas en las posiciones 8 y 99; estas son comunes de encontrar entre las proteínas λ VI de pacientes. Además, por medio de calorimetría de titulación isotérmica obtuvimos los datos termodinámicos de la unión de Cu^{2+} a la proteína, con una afinidad en el rango de submicromolar. Este proyecto proporciona información importante en la caracterización molecular de las enfermedades amiloidogénicas

Abstract

Light chain amyloidosis is one of the most common systemic amyloidosis, characterized by the deposition of variable domains of immunoglobulin light chains as insoluble amyloid fibers in vital organs and tissues, leading to the death of the patient within a few months after being diagnosed. The germ line λ VI is related to this disease and it has been reported that 25% of the proteins encoded by this germ line present a mutation at position 24 where an Arginine is replaced by a Glycine (R24G). *In vitro* studies have shown that this mutation reduces stability and increases the ability to form amyloid fibers. In different systems, such as Alzheimer's, Parkinson's, Diabetes Mellitus II and Prion, the role of metal ions has been relevant, especially Cu^{2+} . For this reason we study through different spectroscopic techniques, the role of Cu^{2+} in amyloid fibers formation by recombinant protein 6aJL2-R24G. We found by fluorescence studies that the interaction of Cu^{2+} with the protein accelerates the formation of amyloid fibers, possibly by decreasing its thermal stability. Through spectroscopic and molecular techniques such as electronic absorption, circular dichroism, nuclear magnetic resonance and site-directed mutagenesis, possible coordination sites with the protein in the native state were established, involving Histidines at positions 8 and 99; these are common to find among the λ VI proteins of patients. Furthermore, by means of isothermal titration calorimetry we were able to obtain thermodynamic data of the binding of Cu^{2+} to the protein, presenting an affinity in the submicromolar range. This project provides important information on the molecular characterization of amyloidogenic diseases.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante mis estudios de doctorado (CVU 632962)

A mi asesora la Dra. Lina Rivillas por recibirme en su recién inaugurado grupo de investigación. ¡Gracias por los conocimientos transmitidos!

A la Dra. Nina Pastor por todos estos años compartiendo resultados, tutorales y sobre todo sus invaluable comentarios, correcciones e ideas aportadas a este proyecto. ¡Muchas gracias!

Al Dr. Carlos Amero que nos permitió trabajar en su laboratorio y ocupar todo lo necesario para realizar este proyecto. Gracias por tus sugerencias y grandes aportaciones.

Al Dr. Enrique Rudiño por poner a nuestra disposición equipos de su laboratorio, IBT, UNAM.

Al jurado revisor (Dr. Alejandro Fernández, Dr. Rodrigo Razo, Dr. Alexis Rodríguez, Dr. Enrique Rudiño y Dra. Ninfa Ramírez Duran) por las observaciones y correcciones que permitieron la mejora de esta tesis. ¡Muchas gracias!

A las instalaciones del Laboratorio Nacional de Estructuras de Macromoléculas (LANEM), donde se realizaron los experimentos de Resonancia Magnética Nuclear, al laboratorio de la Dra. Carolina Godoy, donde fueron tomadas los experimentos de DC y al laboratorio del Dr. Carlos Amero, donde se realizaron el resto de los experimentos. Ubicados en el Centro de Investigaciones Químicas (CIQ, UAEM) ¡Muchas Gracias!

A la Dra. Guadalupe Zavala de la unidad de microscopia IBt-UNAM, por el apoyo brindado durante el uso del microscopio electrónico EM-900 Zeiss

A cada una de las personas que han contribuido con la realización y culminación de esta tesis. Dr. Gilberto Valdés García y Dra. Leydis French Pacheco por sus aportes en la parte de dinámica molecular e ITC, respectivamente.

A mis compañero y amigos de laboratorio, gracias por los momentos compartidos.

ÍNDICE

I. Introducción.....	1
I.1 Fundamentos del plegamiento proteico.....	1
I.2 Plegamiento anómalo de las proteínas.....	3
I.3 Enfermedades de mal plegamiento de proteínas: Amiloidosis.....	5
I.4 Fibras amiloides.....	5
I.5 Formación de fibras amiloides.....	7
I.6 Factores que alteran la formación de fibras amiloides: Efecto de los iones metálicos.....	8
II. Antecedentes.....	11
II.1 Amiloidosis de cadena ligera.....	11
II.2 Línea germinal V λ 6a.....	13
II.3 Estructura de la proteína 6aJL2-R24G.....	14
II.4 Estructura de fibras amiloides formadas por cadenas ligeras de inmunoglobulina.....	16
II.5 Efecto de iones metálicos sobre cadenas ligeras de inmunoglobulina.....	18
II.6 Estudio espectroscópico de la interacción metal – proteína.....	19
III. Justificación.....	21
IV. Hipótesis.....	22
V. Objetivos.....	23
V.I. Objetivo general.....	23
V.II Objetivos particulares.....	23
VI. Materiales y métodos.....	24
VI.1 Mutagénesis.....	24
VI.2 Sobre-expresión y purificación.....	24
VI.3 Fibrillogénesis <i>in vitro</i>	25
VI.4 Microscopía electrónica de transmisión.....	25
VI.5 Estabilidad térmica.....	25

VI.6 Sitios de unión de Cu^{2+} seguidos por RMN.....	26
VI.7 Afinidad de la interacción Cu^{2+} -proteína.....	26
VI.8 Cambios en estructura secundaria inducidos por la unión con Cu^{2+}	26
VI.9 Estimación de sitios de unión.....	27
VI.10 Caracterización de la interacción Cu^{2+} -proteína.....	27
VII. Resultados.....	28
VII.1 Efecto del Cu^{2+} en la cinética de formación de fibras de 6aJL2-R24G.....	28
VII.2 Microscopía Electrónica de Transmisión (MET).....	29
VII.3 Efecto del Cu^{2+} en la estabilidad térmica de 6aJL2-R24G.....	30
VII.4 Predicción de sitios de unión de Cu^{2+} en 6aJL2-R24G.....	32
VII.5 Sitios de unión de Cu^{2+} a 6aJL2-R24G.....	34
VII.6 Caracterización termodinámica de la union de Cu^{2+} a 6aJL2-R24G.....	37
VII.7 Cambios en la estructura secundaria inducidos por la unión de Cu^{2+}	38
VII.8 Caracterización de la interacción Cu^{2+} -proteína.....	40
VII.9 Papel de las Histidinas en la unión a Cu^{2+}	41
VII.10 Sobreexpresión y purificación de las mutantes de histidinas.....	42
VII.11 Efecto de las variaciones de histidinas en la agregación y estabilidad de 6aJL2-R24G.....	43
VII.12 Efecto del Cu^{2+} en la agregación y estabilidad de las mutantes de histidinas.....	45
VII.13 Efecto del Cu^{2+} en la estructura secundaria de las mutantes de histidina.....	48
VII.14 Titulación de las mutantes de histidinas con Cu^{2+} , seguida por dicróismo circular y absorción electrónica.....	50
VIII. Discusión.....	52
IX. Conclusiones.....	62
X. Perspectivas.....	63
XI. Referencias.....	64
XII. Anexos.....	78

A. Dinámica molecular del complejo Cu^{2+} -6aJL2-R24G.....	78
Anexo B: Conformaciones del grupo de tirosinas.....	82
Anexo C: Alineamiento de la línea germinal 6a de pacientes con AL.....	83
Anexo D: Efecto del Zn^{2+} en 6aJL2-R24G.....	84

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de embudo energético.....	3
Figura 2. Diagrama del embudo de plegamiento y desplegamiento.....	4
Figura 3. Estructura de las fibras amiloides.....	6
Figura 4. Formación de fibras amiloides.....	8
Figura 5. Esquema de producción de cadenas ligeras y órganos afectados por amiloidosis.....	12
Figura 6. Estructura de 6aJL2-R24G.....	15
Figura 7. Esquema general de transiciones electrónicas en un enlace metálico.....	20
Figura 8. Cinética de la fibrillogénesis <i>in vitro</i> de 6aJL2-R24G.....	28
Figura 9. Imágenes por MET de fibras amiloides.....	29
Figura 10. Desplegamiento térmico de 6aJL2-R24G.....	30
Figura 11. Desplegamiento y replegamiento de 6aJL2-R24G.....	31
Figura 12. Predicción de aminoácidos que interactúan con Cu ²⁺	32
Figura 13. Predicción de sitios potenciales de unión a Cu ²⁺	33
Figura 14. Espectros HSQC de 6aJL2-R24G titulada con Cu ²⁺	35
Figura 15. Espectro HSQC ¹ H- ¹⁵ N de 6aJL2-R24G en presencia de Cu ²⁺	36
Figura 16. Titulación isotérmica de 6aJL2-R24 con Cu ²⁺	38
Figura 17. Espectro de DC de 6aJL2-R24G en el UV lejano.....	39
Figura 18. Transiciones electrónicas del complejo Cu ²⁺ - 6aJL2-R24G.....	41
Figura 19. Geles SDS-PAGE de la sobreexpresión de mutantes de histidinas.....	42
Figura 20. SDS-PAGE de la purificación de las mutantes de histidinas.....	43
Figura 21. Formación de fibras de las mutantes de Histidinas.....	44
Figura 22. Desplegamiento térmico de mutantes de histidina.....	45
Figura 23. Cinéticas de agregación de 6aJL2-R24G y las mutantes H8S, dH99 y H8S/dH99 en presencia de Cu ²⁺	46
Figura 24. Cinéticas de desplegamiento de 6aJL2-R24G y las mutantes H8S, dH99 y H8S/dH99 en presencia de Cu ²⁺	47
Figura 25. Cambios en la estructura secundaria de H8S y H8S/dH99.....	49
Figura 26. Titulación de las mutantes de histidinas con Cu ²⁺ seguidas por absorción y DC en la región UV-Vis.....	51

Figura A27. Propiedades conformacionales globales de los sistemas simulados.....	79
Figura A28. Diferencias en la dinámica de la cadena principal por residuo.....	80
Figura A29 Valores de RMSF mapeados en la estructura 6aJL2-R24G.....	81
Figura B30. Conformaciones del grupo de tirosinas.....	82
Figura C31. Alineamiento de la línea germinal 6a presente en pacientes con amiloidosis de cadena ligera.....	83
Figura D32. Predicción de sitios de unión a Zn^{2+} en la proteína 6aJL2-R24G.....	85
Figura D33. Cinética de la fibrillogénesis in vitro de 6aJL2-R24G en presencia de Zn^{2+}	86
Figura D34. Desplegamiento térmico de 6aJL2-R24G con presencia de Zn^{2+}	87
Figura D35. Titulación de 6aJL2 con Zn^{2+} por DC.....	8

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Porcentajes de estructura secundaria del complejo Cu ²⁺ - 6aJL2-R24G.....	40
Tabla 2. Tiempos lag de formación de fibras amiloides.....	46
Tabla 3. Tm de las variantes de histidina en presencia de Cu ²⁺	48
Tabla 4. Porcentajes de estructura secundaria de la deconvolución de los espectros de mutantes de histidinas con Cu ²⁺ usando BestSel.....	49
Tabla 5. Energías de los espectros de DC de la titulación de 6aJL2-R24G con Cu ²⁺	50
Tabla 6. Porcentajes de estructura secundaria de la deconvolución de los espectros de 6aJL2 en presencia de Zn ²⁺	88

I. Introducción

I.1 Fundamentos del plegamiento proteico

A lo largo de cinco décadas, varios grupos de investigación han puesto su atención en el estudio de los mecanismos que determinan de qué modo una cadena polipeptídica recién sintetizada adquiere su adecuado estado plegado. El plegamiento de proteínas está definido como el proceso en el que dicha molécula asume su estructura tridimensional característica (conocido como estado nativo) que le permite cumplir adecuadamente su función específica. El plegamiento de una proteína inicia una vez que es sintetizada por el ribosoma (Cabrita, Dobson, & Christodoulou, 2010), que es el encargado de sintetizar la maquinaria proteínica indispensable para el funcionamiento celular, tales como: señalización, estructura, catálisis, transporte y defensa, entre otras (Alberts et al., 2002).

Es sabido que la función y actividad de una proteína está ligada a su estado nativo. El principio clásico que explica este plegamiento es que la información para alcanzar dicho estado es intrínseco a la secuencia de aminoácidos que posee. Esto fue iniciado en los años 60 por Christian Anfinsen, quien realizó experimentos que demostraban que una RNAsa desnaturalizada podía replegarse espontáneamente *in vitro* a su conformación funcional, es decir, que la estructura nativa de una proteína es termodinámicamente estable y representa un mínimo en la energía libre de Gibbs. Este proceso era reversible al menos para proteínas pequeñas (Anfinsen, 1972; Dobson & Karplus, 1999).

La hipótesis de control termodinámico de Anfinsen llevó a Levinthal a argüir que: una búsqueda al azar de todas las conformaciones posibles no podía darse, dado el enorme tiempo que requeriría, siendo que el proceso de plegamiento se daba en la escala de segundos a minutos. Era evidente que la evolución había hallado una solución efectiva a este problema, conocido como la paradoja de Levinthal (Levinthal, 1968). De ahí que el autor sugiera que las proteínas no realizan una búsqueda al azar, sino que siguen un camino concreto de plegamiento.

Gracias a diversos estudios cinéticos realizados para explicar la paradoja de Levinthal, en varios sistemas se ha demostrado la existencia de intermediarios de plegamiento; estos son especies que corresponden a mínimos locales de la energía libre de Gibbs (Bai, 1999; Bollen, Sánchez, & van Mierlo, 2004). Estos intermediarios los han clasificado como *off-pathway* y *on-pathway*. Los intermediarios *on-pathway* marcan la vía por la cual la proteína encuentra su conformación nativa, mientras que, los intermediarios *off-pathway* no llegan a su conformación correcta (Baldwin, 1996). Estos últimos intermediarios podrían proporcionar información acerca de los fenómenos de mal plegamiento y agregación (Gianni et al., 2010; Karamanos et al., 2019) .

A lo largo de los años se han postulado numerosos modelos tratando de explicar el mecanismo de plegamiento de las proteínas; sin embargo, uno de los modelos más utilizados es el de paisaje energético, que es una descripción estadística de la energía potencial efectiva y es representada por un embudo de plegamiento (**Figura 1**) (Bryngelson, Onuchic, Socci, & Wolynes, 1995) . En este modelo, la proteína desplegada posee alta energía libre y alta entropía (ancho del embudo). La alta entropía induce a que exista una gran cantidad de posibles estados conformacionales. La alta energía libre significa que la molécula es inestable y puede caer fácilmente en los diferentes estados conformacionales. A medida que la proteína inicia su plegamiento, la energía libre cae y los estados conformacionales disponibles disminuyen (ancho del embudo). La tasa de plegamiento se ralentiza por valles que corresponden a los mínimos locales de energía, donde se encuentran los intermediarios estables que pueden atrapar a la proteína durante algún tiempo. Acercándose al fondo del embudo de plegamiento, la energía libre es mínima y el número de conformaciones de la proteína disminuye como lo hace también la entropía. Al final del embudo solo hay un estado conformacional disponible para la proteína, es decir, el estado nativo (Dobson, 2003; F. Ulrich Hartl et al., 2009; Karplus, 2011) .

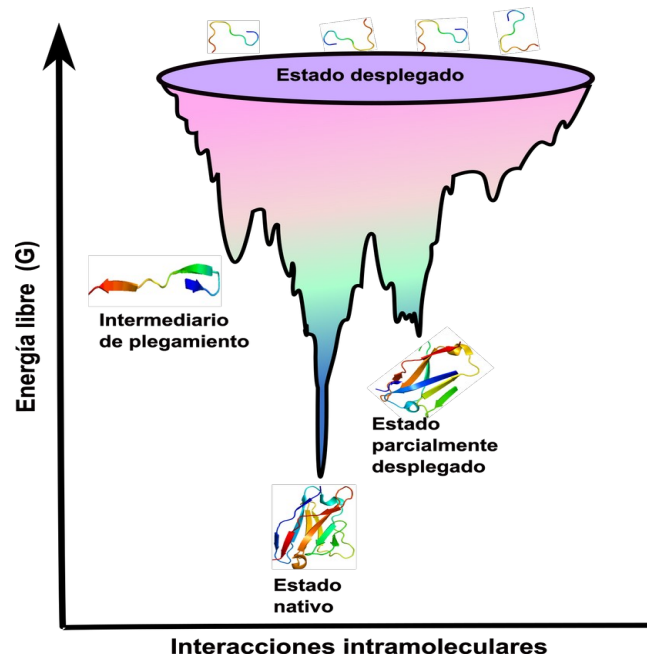


Figura 1. Esquema de embudo energético. Las proteínas se pliegan en su configuración correcta de energía mínima. Las proteínas se pliegan rápidamente siguiendo un paisaje de energía en forma de embudo.

I.2 Plegamiento anómalo de las proteínas

Como ya se mencionó, en algunos casos, el proceso de plegamiento de una proteína comienza mientras la cadena polipeptídica todavía está unida a los ribosomas, mientras que otras proteínas son enviadas hacia el retículo endoplasmático durante de la traducción, para continuar su vía de plegamiento. Los organismos han desarrollado diversos sistemas para controlar el proceso de plegamiento de proteínas, como el uso de catalizadores de plegamiento y chaperonas (F. U. Hartl, 2002). El ambiente celular puede resultar un medio hostil para las proteínas. Factores como: estrés, mutaciones y envejecimiento, entre otras, conducen a las proteínas a perder su capacidad de plegamiento, eludiendo interacciones clave que mantienen su estado nativo y dando origen a proteínas mal plegadas. Estas especies exponen regiones que normalmente estarían ocultas en el estado nativo, haciéndolas propensas a interacciones no nativas que resultan en la agregación (Chaturvedi, Siddiqi, Alam, & Khan, 2016; F. Ulrich Hartl et al., 2009). Generalmente, las proteínas mal plegadas desencadenan respuestas biológicas que las dirigen en el replegamiento o en su

caso a la degradación (Goldberg, 2003). El fallo de este proceso es de particular importancia en la protección de las células, debido a que pueden aparecer condiciones severas y una variedad de enfermedades, por ejemplo: cáncer, fibrosis quística y amiloidosis, entre otras.

Los estados mal plegados o parcialmente plegados están gobernados por fuerzas hidrófobas, produciendo la formación de estructuras amorfas que carecen de orden. Alternativamente, los agregados pueden conducir a la formación de conjuntos fibrilares ordenados, llamados fibras amiloides. Estas estructuras termodinámicamente muy estables, son accesibles para algunas proteínas en condiciones desnaturalizantes, independientemente de su secuencia (Dobson, 2003).

En el diagrama de embudo de agregación, se ha incorporado un segundo embudo, que denota las variadas conformaciones que pueden adquirir las proteínas propensas a agregación y representa las interacciones de intermediarios parcialmente plegados en un estado nativo polimerizado de gran estabilidad (**figura 2**) (Clark, 2004).

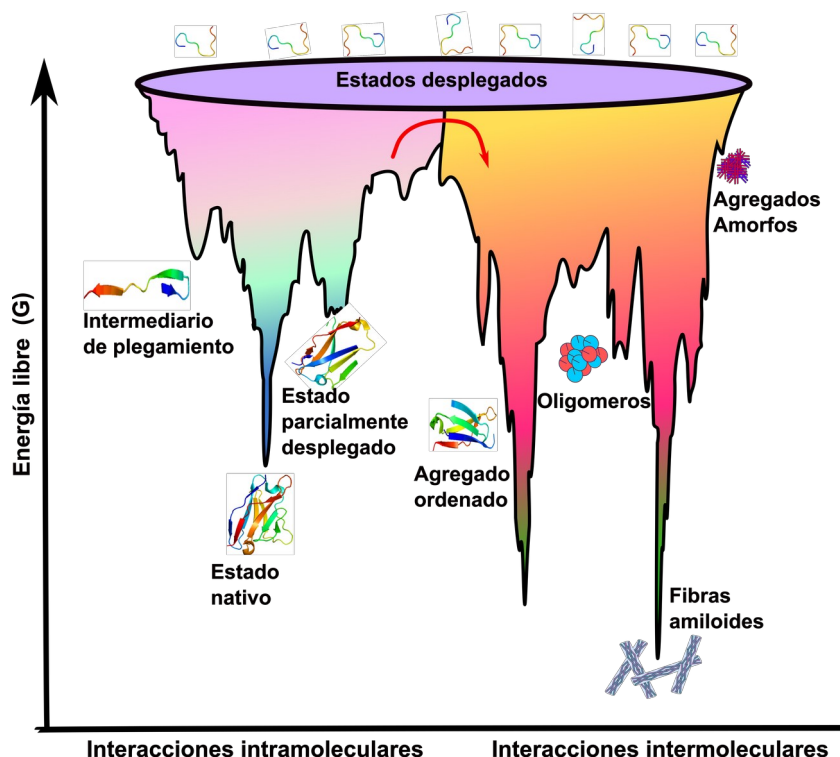


Figura 2. Diagrama del embudo de plegamiento y desplegamiento. Un intermediario del plegamiento puede pasar a la ruta de agregación.

I.3 Enfermedades de mal plegamiento de proteínas: Amiloidosis

Las amiloidosis no son un trastorno único, sino una serie de enfermedades desencadenadas por la deposición en el espacio extracelular y en algunos casos intracelular de proteínas mal plegadas en formada de fibras insolubles, las cuales alteran progresivamente la estructura y la función de órganos y tejidos. Así mismo, se ha documentado el daño citotóxico por intermediarios formados durante el desarrollo de las fibras amiloides (Blancas-Mejía & Ramirez-Alvarado, 2013; Eschenbacher, 2007).

Existen muchas formas de amiloidosis y dependen del tipo de proteína precursora. Entre las más conocidas se encuentran β amiloide y tau, relacionadas con el Alzheimer; α sinucleína involucrada en Parkinson; prión relacionada con encefalopatía espongiforme (enfermedad de las vacas locas); amilina presente en diabetes mellitus II y cadenas ligeras de inmunoglobulina, presentes en amiloidosis primaria, entre otras (Prasansuklab & Tencomnao, 2013; Wechalekar, Gillmore, & Hawkins, 2016).

Las amiloidosis se clasifican como amiloidosis sistémica y amiloidosis localizada. En la amiloidosis sistémica, las fibras amiloides se depositan en varios órganos del cuerpo, mientras que en la amiloidosis localizada, el depósito de fibras se limita a un determinado órgano o tejido (Yamada & Naiki, 2012).

I.4 Fibras amiloides

Se sabe que el estado nativo de una proteína está dictado por su secuencia de aminoácidos, sin embargo, las proteínas pueden adoptar una estructura alternativa muy similar entre ellas, independientemente de la secuencia de la cadena polipeptídica. Esta estructura se conoce como fibra amiloide (Chiti & Dobson, 2017; Eisenberg & Jucker, 2012; Knowles, Vendruscolo, & Dobson, 2014; Richardson & Richardson, 2002).

Con técnicas como: cristalografía de rayos X, resonancia magnética nuclear de estado solido y microscopia crio-electrónica, se han podido elucidar estructuras de fibras amiloides con alta resolución (Fitzpatrick et al., 2017; Qiang, Yau, Lu, Collinge, & Tycko, 2017; Rodriguez et al.,

2015; Swuec et al., 2019; Wiltzius et al., 2008). Las fibras presentan características distintivas, sean aisladas de pacientes u originadas *in vitro*. Las fibras amiloides son estructuras alargadas no ramificadas de 7 a 13 nm de diámetro y a menudo de micras de longitud, fácilmente identificadas usando microscopía electrónica. Por lo tanto, las fibras amiloides están compuestas de un arreglo altamente ordenado de miles de copias de péptidos o proteínas. Generalmente, cada fibra está formada por 2 a 8 protofilamentos, que se enlazan entre si o se asocian lateralmente como cintas planas, aunque también se han observado monofilamentos (Paravastu, Leapman, Yau, & Tycko, 2008; Wasmer et al., 2008). Estudios de difracción de rayos X de fibras arrojan un patrón de difracción denominado estructura β cruzada, caracterizado por reflexiones perpendiculares con reflexiones meridionales en 4.7 Å que corresponden al espaciamiento entre hebras β y una reflexión ecuatorial de 10 Å correspondiente a la distancia entre hojas β (**figura 3**) (Astbury, Dickinson, & Bailey, 1935; Greenwald & Riek, 2010; Sunde & Blake, 1997; Wiltzius et al., 2008; Zandomeneghi, Krebs, McCammon, & Fändrich, 2009).

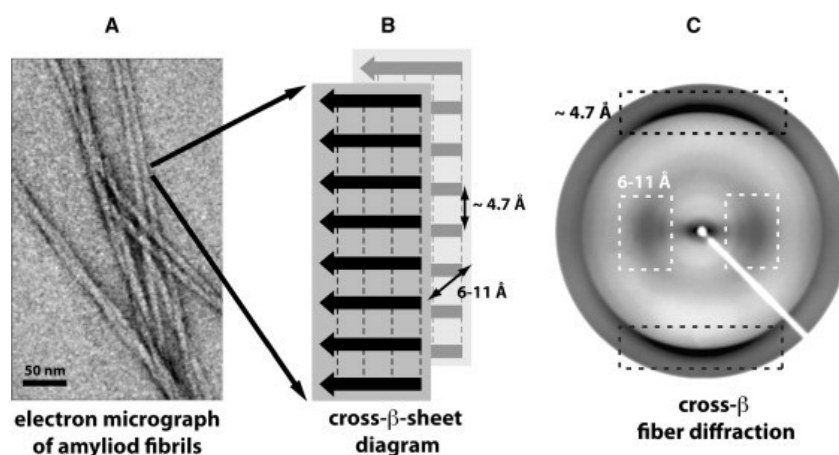


Figura 3. Estructura de las fibras amiloides. A) Fibras amiloides vistas a través de microscopía electrónica de transmisión que muestra largos filamentos no ramificados. B) Diagrama de hoja β cruzada. C) Patrón de difracción típico de una fibra con una reflexión meridional en $\sim 4,7$ Å (cuadro punteado negro) y una reflexión ecuatorial en $\sim 6-11$ Å (cuadro punteado blanco). Imagen tomada de (Greenwald & Riek, 2010)

Las características estructurales de estos agregados, permite que colorantes como la Tioflavina T (ThT) y rojo congo se intercalen a lo largo de las fibras, mostrando

características espectroscópicas únicas (Mathis, Mason, Lopresti, & Klunk, 2012; Nilsson, 2004). Dichas peculiaridades son universalmente aceptadas como sellos distintivos de las estructuras amiloides y cualquier agregado de proteína debe cumplir con todas para ser clasificada como tal (Chiti & Dobson, 2017) .

I.5 Formación de fibras amiloides

Las fibras amiloides generalmente causan alguna patología devastadora, regularmente degenerando el tejido afectado. Hasta la fecha se han identificado más de 40 proteínas que forman fibras amiloides (Chiti & Dobson, 2017). La estrecha relación entre la enfermedad y estas estructuras llevó a catalogarlas como un proceso patológico. Sin embargo, se han descubierto varias funciones fisiológicas que dependen de estas estructuras, tales como: la pigmentación, el almacenamiento de hormonas peptídicas, la fertilización de los ovocitos por los espermatozoides, las respuestas antimicrobianas y las respuestas celulares al estrés (Audas et al., 2016; Fowler et al., 2005; Jang et al., 2011; Maji et al., 2009; Whelley et al., 2012). Esto se ha llevado a especular si, ¿Podrían existir circunstancias donde las células humanas podrían producir fibras amiloides funcionales sin sufrir ningún daño? (Jackson & Hewitt, 2017)

La formación de fibras amiloides a partir de su proteína precursora es dependiente de un proceso de nucleación; el polipéptido pasa por un proceso desfavorable que provoca cambios conformacionales, formando un núcleo, que es el estado energético más alto y por lo tanto el menos poblado (fase lag). Una vez que se alcanza este estado, inicia la fase de elongación, donde, los núcleos formados sirven como molde para la deposición de monómeros solubles y la formación de fibras maduras. Esta fase es energéticamente favorecida (**Figura 4**). Cabe mencionar que la fase lag puede eliminarse si se agregan núcleos preformados al inicio de la cinética, resultado de la ruptura de fibras amiloides (Kumar & Udgaonkar, 2010) .

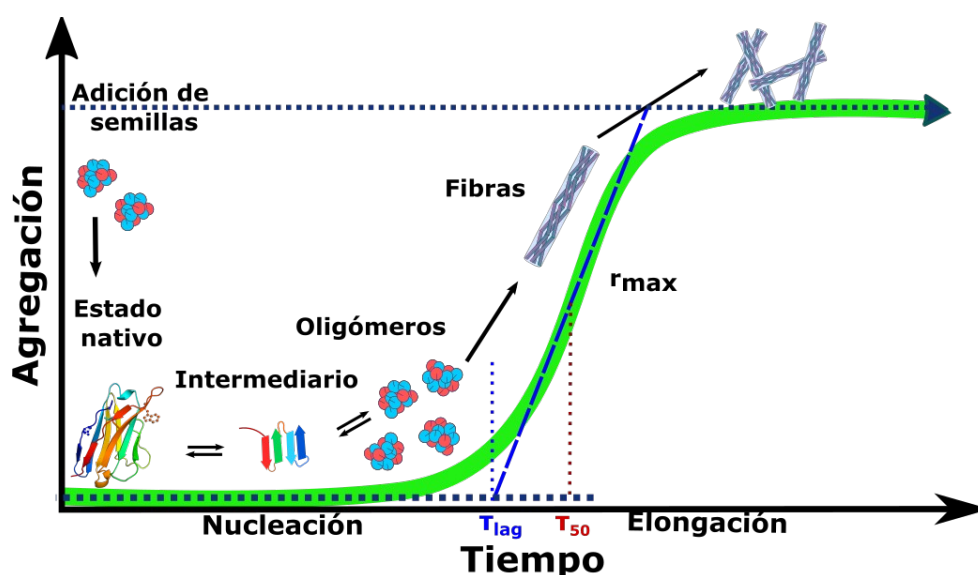


Figura 4. Formación de fibras amiloides. La formación de fibras amiloides consta de dos fases: I. fase de nucleación, donde los monómeros experimentan cambio conformacional, asociándose para formar núcleos oligoméricos. II. Fase de elongación, los núcleos crecen rápidamente para formar fibras amiloides maduras. La fase de nucleación puede eliminarse si se añaden núcleos preformados al inicio de la cinética.

I.6 Factores que alteran la formación de fibras amiloides: Efecto de los iones metálicos.

Los metales de transición son esenciales para la salud. Se requiere la ingesta de niveles traza de numerosos elementos inorgánicos para el desarrollo y mantenimiento del organismo, entre ellos cobalto (Co), cobre (Cu), cromo (Cr) hierro (Fe), manganeso (Mn), molibdeno (Mo), níquel (Ni), vanadio (V) y zinc (Zn). Estos metales se encuentran en estado iónico y son componentes clave de numerosas enzimas y proteínas que participan en el transporte de electrones. El rango de concentración normal para cada metal en los sistemas biológicos es estrecho, con deficiencias y excesos que causan cambios patológicos. Generalmente, los iones metálicos dentro de nuestro organismo se encuentran formando complejos organometálicos, lo que permite controlar y dirigir sus propiedades donde sea necesario, y se minimiza su propensión a promover la generación de especies reactivas de oxígeno (Kennelly & Rodwell, 2018; Raven, Le Brun, McMaster, Reedijk, & Robinson, 2013).

Varios estudios han reportado el efecto de los iones metálicos sobre proteínas relacionadas a enfermedades de mal plegamiento o conformacionales. Por ejemplo, en depósitos de fibras amiloides de β -amiloide, α -sinucleína y prión se han encontrado altas concentraciones de metales, principalmente cobre, lo cual indica que ciertos metales tienen efectos importantes sobre la agregación de las moléculas proteínicas y la estabilización de sus agregados neurotóxicos solubles (Rana & Sharma, 2019). Diversos estudios sugieren que las histidinas en la estructura de estos péptidos juegan un papel importante en la coordinación de Cu^{2+} (Borghesani, Alies, & Hureau, 2018; Millhauser, 2004).

La agregación de α -sinucleína está asociada a la neurodegeneración en la enfermedad de Parkinson. Las alteraciones en la homeostasis de iones metálicos tales como Cu^{2+} y Zn^{2+} desempeñan un papel fundamental en la agregación y ensamblaje a fibras amiloides de la proteína. (Carboni & Lingor, 2015; Davies, Mercer, Chen, & Double, 2016; Valiente-Gabioud et al., 2012) La unión del Cu^{2+} a la His50 de la proteína, como primer sitio de unión y un segundo sitio con menor afinidad en el carboxilo terminal, promueven la formación de fibras amiloides de la α -sinucleína, dando inicio a la enfermedad (Binolfi et al., 2006).

La amilina es una proteína secretada por las células β de los islotes pancreáticos, cuya función es complementaria a la insulina, regulando los niveles de glucosa en sangre. Se ha observado que su agregación se asocia con la diabetes mellitus tipo II, que se clasifica como una enfermedad amiloide. Recientemente, se descubrió que las interacciones entre la amilina e iones metálicos específicos, por ejemplo, Cu^{2+} , Zn^{2+} y Fe^{2+} , afectan su proceso de agregación (Alghrably, Czaban, Jaremko, & Jaremko, 2019; Brender et al., 2010; Rivillas-Acevedo, Sánchez-López, Amero, & Quintanar, 2015a; Rowińska-Zyrek, 2016). En este caso, la interacción de la amilina con Cu^{2+} inhibe la formación de fibras amiloides. El Cu^{2+} se une a la histidina y serinas en el estado monomérico de la proteína y esta unión compite con los cambios conformacionales que sufre la amilina para formar estructuras de lámina β , lo que retrasa la formación de fibras amiloides. (Rivillas-Acevedo et al., 2015a; Sánchez-López et al., 2016)

A diferencia de las proteínas antes mencionadas, la agregación amiloidogénica de β 2-microglobulina esta relacionada con la interacción con Cu^{2+} externo y no por un

desbalance homeostático. Un hallazgo respalda la evidencia clínica de que la incidencia de amiloidosis relacionada a diálisis es 50% menor entre los pacientes tratados con membranas de diálisis libre de Cu^{2+} , sugiriendo que factores externos como dicho ion metálico, podrían promover su agregación amiloidogénica (Morgan, Gelfand, Atreya, & Miranker, 2001). Eakin y colaboradores sugirieron que la unión de Cu^{2+} a $\beta 2$ -microglobulina es a través de la His31 cuando se encuentra en estado nativo, mientras que estados parcialmente desplegados unen Cu^{2+} en His-13, His-51 e His-84. esto llevó a la conclusión de que una mayor afinidad por el ión de cobre estabiliza los estados no nativos, conduciendo a la desestabilización de la proteína nativa (Eakin, Knight, Morgan, Gelfand, & Miranker, 2002) .

II. Antecedentes

II.1 Amiloidosis de cadena ligera.

Los anticuerpos son proteínas base del sistema inmune humoral y de suma importancia para la salud humana. Sin embargo, llegan a ser la base de enfermedades devastadoras debido a la deposición de cadenas ligeras en diferentes órganos y tejidos, ya sea como agregados no fibrilares o fibrilares. Una de ella es la amiloidosis de cadena ligera (Figura 5) (Yadav, Leung, Sanders, & Cockwell, 2015).

La amiloidosis de cadena ligera es causada por la proliferación anormal de células plasmáticas clonales (células B completamente diferenciadas). Dichas células secretan en exceso al torrente sanguíneo inestables cadenas ligeras monoclonales (sintetiza exclusivamente una secuencia) y estas cadenas ligeras se depositan como fibras amiloides en órganos y tejidos (Dorshkind & Rawlings, 2018; Merlini & Stone, 2006). Todos los órganos, pueden ser afectados por estas estructuras y en muy raros casos el sistema nervioso central, causando disfunción orgánica irreversible y eventualmente la muerte si no se diagnostica o se trata de manera eficaz (Benson, Witt, Bonnin, Matthews, & Abonour, 2011; Merlini, 2017).

En la **Figura 5** se muestra un esquema de lo descrito arriba. El promedio de vida después del diagnóstico para pacientes con amiloidosis de cadena ligera es de 3 años, en pacientes con daño cardíaco se reduce a un año (Abraham et al., 2003). Debido a que la amiloidosis de cadena ligera es una enfermedad sistémica, las manifestaciones clínicas dependerán del órgano afectado, rara vez son específicas. Aunque se han definido síntomas en común observados en pacientes, ayudando a su fácil diagnóstico, éstos incluyen: macroglosia, área periórbital purpura, inflamación de la glándula submandibular, hematomas en la piel, cambios en la presión sanguínea, exceso de cadenas ligeras en orina y sangre (Kyle & Gertz, 1995; Wechalekar et al., 2016).

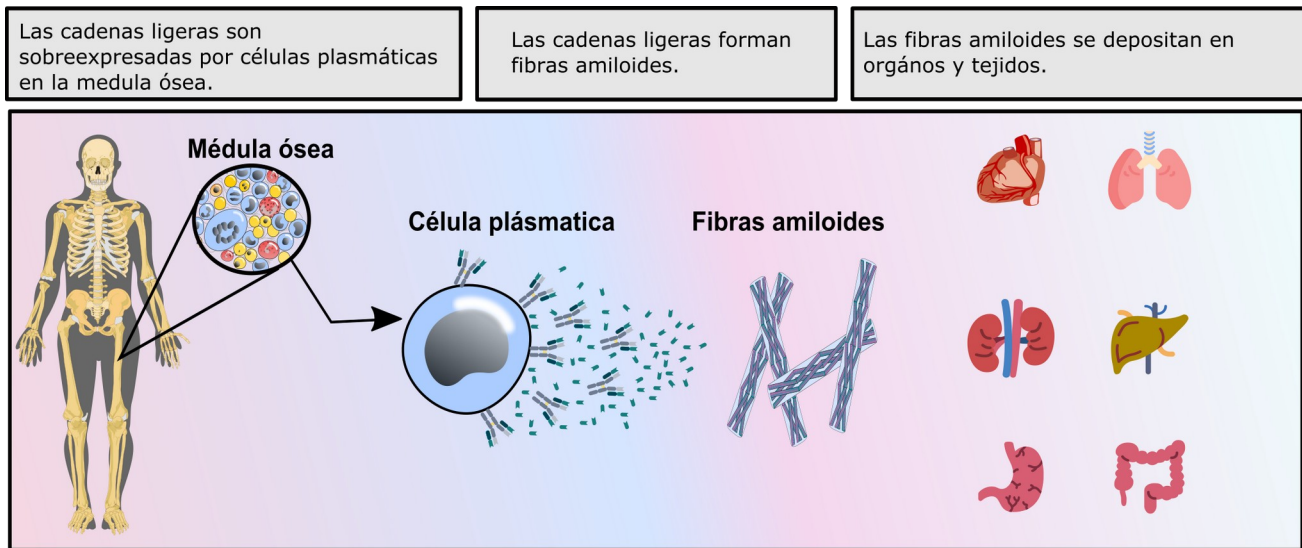


Figura 5. Esquema de producción de cadenas ligeras y órganos afectados por amiloidosis. En la amiloidosis de cadena ligera, un grupo de células plasmáticas sobreexpresan cadenas ligeras, que se pliegan incorrectamente, agregándose como fibras amiloides. Las fibras se depositan en órganos, provocando daño y posteriormente la muerte.

Debido a que la carga de células plasmáticas malignas en la médula ósea es inferior al 10%, la amiloidosis de cadena ligera no es considerada un tipo de cáncer, sin embargo, su tratamiento incluye quimioterapias enfocadas a detener la secreción de proteínas (Blancas-Mejia et al., 2018a; Mahmood, Palladini, Sancharawala, & Wechalekar, 2014). Otros tratamientos se basan en trasplante de células autólogas, inhibidores del proteosoma, y fármacos inmunomoduladores, entre otros (Ryšavá, 2019).

La amiloidosis de cadena ligera es la más común de las amiloidosis sistémicas. En Estados Unidos se diagnostican 4500 casos nuevos cada año, afectando usualmente a personas de 50 a 80 años de edad, aunque hay algunos casos de personas diagnosticadas a los 20 años. Al rededor del 65% de los pacientes son hombres (<https://amyloidosis.org/facts/al/>). En México no existen datos detallados sobre la incidencia y prevalencia de la enfermedad, sin embargo, un estudio reporta 23 casos en un periodo de 30 años en una institución. Esto podría indicar que la enfermedad no es diagnosticada correctamente (Hernández Reyes, Galo-Hooker, Ruiz-Delgado, & Ruiz-Argüelles, 2012).

En biopsias de pacientes con amiloidosis primaria, como también se le conoce, se han encontrado depósitos fibrilares, principalmente constituidos del dominio variable de la cadena ligera de inmunoglobulina y en muy poca proporción la cadena ligera completa (V Perfetti, Vignarelli, Casarini, Ascari, & Merlini, 2001). Por lo tanto, los estudios biofísicos se han centrado principalmente en los dominios variables, que se denominaron de manera imprecisa como “cadenas ligeras” (Klimtchuk et al., 2010; Oberti et al., 2017).

En esta enfermedad, cada paciente tiene una secuencia de proteína única, como resultado de la selección de un gen de línea germinal y la incorporación de mutaciones somáticas. A menudo, los dominios variables encontrados en las muestras fibrilares pertenecen a proteínas codificadas por la línea germinal IGLV6-57 (V λ 6a), único gen que codifica proteínas del subgrupo λ 6 (Klimtchuk et al., 2010; Melmed, 2009; Ramirez-Alvarado et al., 2017; Swuec et al., 2019).

II.2 Línea germinal V λ 6a

Las cadenas ligeras de inmunoglobulina son organizadas en dos grupos; kappa (κ) o lambda (λ), según el gen por el cual sean codificadas y su localización en los cromosomas (2 y 22, respectivamente). A su vez, se han identificado 6 familias para κ y 10 familias para el grupo λ (Dorshkind & Rawlings, 2018). En individuos sanos son relativamente más abundantes las cadenas ligeras de tipo κ respecto a la clase λ , en proporción 2:1. En cambio, en la enfermedad de amiloidosis de cadena ligera las células plasmáticas expresan con mayor frecuencia el isotipo λ en relación 3:1 comparado con κ . Esto ha sugerido que las cadenas ligeras del grupo λ , son más amiloidogénicas que las κ (Vittorio Perfetti et al., 2002).

Diversos estudios han evidenciado la estrecha relación entre la enfermedad de amiloidosis de cadena ligera y las proteínas de la familia λ VI (6a). La prevalencia de las proteínas de la familia 6a podría alcanzar hasta un 30% en la enfermedad, mientras que, en individuos sanos es expresada un 2% por células plasmáticas (Ozaki, Abe, Wolfenbarger, Weiss, & Solomon, 1994; Vittorio Perfetti et al., 2002; Solomon, Frangione, & Franklin, 1982).

Dada la relevancia de dicho subgrupo de proteínas en la patogénesis de la enfermedad, se han llevado a cabo varios estudios con el fin de conocer su estructura, estabilidad, propensión a la agregación y formación de fibras amiloides. Entre ellas, se pueden mencionar las proteínas procedentes de los pacientes Will y Jto que difieren en 10 y 11 residuos respecto a la línea germinal, respectivamente (Wall et al., 1999), así como proteínas recombinantes con diversas mutaciones, producidas para explicar el fenómeno de agregación.

6aJL2 es una proteína recombinante que contiene la secuencia codificada por la línea germinal 6a y el segmento de unión JL2 (frecuentemente expresado en el repertorio normal de anticuerpos policlonales), creada para entender las bases moleculares y estructurales que hacen más propensas a la formación de fibras amiloides a las proteínas de la familia λ VI.

Del pozo Yauner y colaboradores en 2008, demostraron que la proteína de línea germinal 6aJL2 era más estable que las proteínas de la familia λ VI maduras conocidas, postulando que las mutaciones presentes en la línea germinal dan como resultado proteínas inestables y amiloidogénicas (Luis Del Pozo Yauner et al., 2008). Tal es el caso de una variante alélica de dicha línea germinal, la cual presenta una mutación en la posición 24 donde una Arginina es sustituida por una Glicina (R24G). La mutación R24G es encontrada en el 25% de proteínas de la familia λ VI y es termodinámicamente más inestable y más eficiente para formar fibras amiloides. Debido a lo anterior, centraremos la investigación a dicha proteína (Ch'ang, Yen, Best, Schell, & Solomon, 1994; Luis Del Pozo Yauner et al., 2008; González-Andrade et al., 2013a).

II.3 Estructura de la proteína 6aJL2-R24G

A la fecha, existen 3 estructuras reportadas en la plataforma Protein Data Bank (PDB; <https://www.rcsb.org/>) de la proteína 6aJL2-R24G, 2 de ellas determinadas por cristalografía (ID: 5C9K y 5JPJ) y 1 por resonancia magnética nuclear (ID: 2MKW), mostrando estructuras globales casi idénticas (González-Andrade et al., 2013a; Maya-Martinez, Gil-Rodriguez, & Amero, 2015; Rudiño-Piñera, Peláez-Aguilar, Amero, & Díaz-Vilchis, 2019).

6aJL2-R24G adopta un motivo tipo llave griega, típica de los dominios variables de inmunoglobulina. Posee 111 aminoácidos dispuestos en 2 hojas β formadas por 8 cadenas β . La hoja 1 contiene las cadenas: A: 3-12, B: 17-23, D: 63-67 y E: 72-78. La hoja 2 contiene a las cadenas C: 34-39, C': 46- 50 F: 87-94 y G: 100-110 (**Figura 6 A y B**). Los dominios variables de inmunoglobulina contienen 3 regiones de alta variabilidad de una inmunoglobulina a otra, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR's; por su siglas en inglés) que, por el plegamiento espacial del dominio variable, son proyectadas hacia el exterior, formando la superficie de interacción con el antígeno. El CDR1 está formado por los residuos: 25–31, el CDR 2, 51–54 y CDR3, 95-99 (**Figura 6C**) (Maya-Martinez et al., 2015).

Entre otras características propias de los dominios variables, se encuentra un triptófano conservado en la posición 36 cuya emisión de fluorescencia es apagada por un puente disulfuro formado entre las cisteínas 22 y 91, que une (**Figura 6C**) y estabiliza las hojas beta; se despliega de forma lenta en condiciones fisiológicas y desnaturalizantes (Blancas-Mejia et al., 2009; Goto & Hamaguchi, 1979).

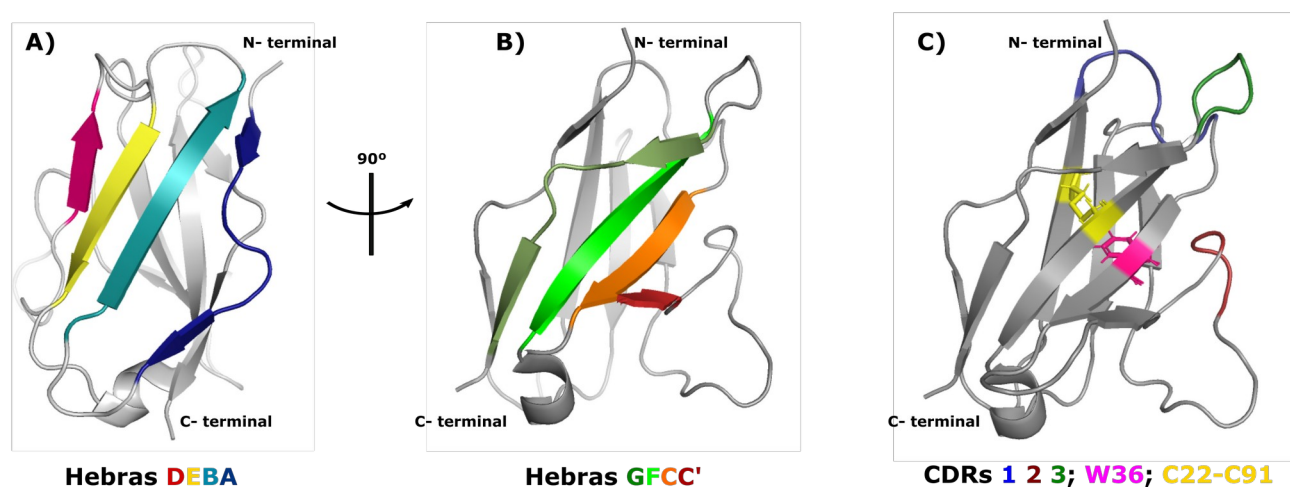


Figura 6. Estructura de 6aJL2-R24G. La proteína adopta una estructura tipo llave griega, dispuesta en dos hojas β ; hoja 1 formadas por las hebras **DEBA** (A) y hoja 2 compuesta por las hebras **GFCC'** (B), así mismo, se muestran los CDRs **1, 2 y 3** y la ubicación del **Trp** y puente **disulfuro** en la estructura terciaria (C).

Los dominios variables presentan un alto porcentaje de cadenas beta que hacen a estas proteínas capaces de convertirse fácilmente a fibras amiloides. Se han descrito mecanismos con los cuales se evita la agregación. Básicamente, estos mecanismos “antiagregación” incluyen el bloqueo de bordes de las hojas beta, a través de la colocación estratégica de prolinas, un asa que conecta la cadena C y D que bloquea una hebra del sandwich, una protuberancia beta sobre el carboxilo terminal de la hebra G y un giro en el amino terminal de la hebra A, para proteger a otra hebra del sandwich. Por medio de estas características estructurales se evitan los contactos intramoleculares que llevarían a la proteína a la agregación (Richardson & Richardson, 2002). Mutaciones en estas regiones pueden afectar la dinámica de la proteína, así como redes de contactos entre hebras, haciéndolas más inestables y aumentando la propensión a la agregación (Del Pozo-Yauner et al., 2014; Maya-Martinez, French-Pacheco, Valdés-García, Pastor, & Amero, 2019; Pokkuluri, Solomon, Weiss, & Stevens, 1999; Valdés-García, Millán-Pacheco, & Pastor, 2017) .

II.4 Estructura de fibras amiloides formadas por cadenas ligeras de inmunoglobulina.

A la fecha de realización de esta tesis se han obtenido dos estructuras de fibras amiloides formadas por cadenas ligeras de inmunoglobulina, una perteneciente al subgrupo $\lambda 6$ y otra al subgrupo $\lambda 1$, ambas estructuras determinadas por criomicroscopía electrónica y aisladas de pacientes con fallo cardíaco.

Swuec y colaboradores determinaron la estructura de una fibra amiloide perteneciente al subgrupo $\lambda 6$ codificado por la línea germina IGLV6-57. La estructura fibrilar fue resuelta a una resolución de 4.0 Å, en la cual claramente se observa una estructura β cruzada compuesta a su vez por 9 hebras β (Swuec et al., 2019).

El núcleo de la fibra es dividido en dos segmentos: una estructura en forma de “caparazón de caracol” el cual es formado de la hebra $\beta 1$ a la $\beta 5$ que incluyen el N-terminal al residuo Tyr37. Una estructura en forma de “c” que rodea a la primera, formado por las hebras $\beta 6$ - $\beta 9$ que incluyen los residuos Ser66 a Gly105 (Swuec et al., 2019).

En particular, las hebras $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 5$ y $\beta 6$ se encuentran cara a cara empaquetándose por medio de sus cadenas laterales, mientras que $\beta 4$, $\beta 7$ y $\beta 9$ forman una segunda región de

contacto para la siguiente capa de la fibra. El modelo de fibra presentado sugiere que el CDR1 (Thr23-Gln35) y CDR3 (Gln92-Val101) contribuyen a la formación del núcleo de la fibra (Swuec et al., 2019).

Mas tarde Radamaker y colaboradores lograron determinar la estructura de una fibra amiloide derivada de la linea germinal IGLV1-44 representativa del subgrupo $\lambda 1$. La estructura de la fibra se obtuvo a una resolución de 3.3 Å y consiste de un único protofilamento (Radamaker et al., 2019).

Globalmente, los primeros y últimos 12 aminoácidos del N-terminal y C-terminal son estructuras desordenadas y se encuentran yuxtapuestos formando un “tallo” que sobresale de la estructura. La parte restante de la proteína describe la forma de una “cabeza de carnero”, ambos lados separados por un puente disulfuro entre Cys22-Cys89 (Radamaker et al., 2019).

El núcleo de la fibra consta de un segmento de 90 aminoácidos (Gly15-Thr105) formando 12 cadenas β ($\beta 1$ - $\beta 12$) que varían de 2 a 8 residuos de longitud. La estructura fibrilar posee 3 cavidades; 2 hidrofílicas (A y B localizadas en la cabeza) y una hidrofóbica (C, localizada en el tallo). Las regiones determinantes de complementariedad están localizados sobre la superficie de la fibra y contienen 10 mutaciones con respecto a la línea germinal, algunas de ellas contribuyen con la estabilidad de la fibra. Las mutaciones Ser31Arg, Asn35Lys, Asn53Asp aportan carga a la superficie, Ser25Arg inserta un residuo básico en la cavidad B, lo cual ayuda a compensar las cargas de Glu84 y Asp86 para interdigitar dos capas moleculares de la fibra. La mutación Gly98Ala se encuentra en el segmento altamente propenso a la agregación en los residuos Asn97-Phe10. En dicho reporte, las mutaciones Thr33Leu, Leu40Phe, Ile76Val y Ser95Thr no tienen un efecto estructural obvio sobre la fibra (Radamaker et al., 2019).

Ambas estructuras revelaron que las fibras amiloides son profundamente diferentes a la estructura de un dominio variable de inmunoglobulina en su estado plegado, lo que sugiere la perdida de contactos nativos en la estructura tridimensional de la proteína nativa durante la amiloidogénesis. En ambas estructuras se encontró un alto contenido de hojas β , sin

embargo, existen diferencias en el número y la posición de las cadenas β dentro de la secuencia.

La amiloidosis sistémica es una enfermedad extraordinariamente variable. La variabilidad secuencial en diferentes subtipos de cadenas ligeras resulta en diferentes arreglos estructurales en la formación de fibras amiloides.

II.5 Efectos de iones metálicos sobre cadenas ligeras de inmunoglobulina

Aunque no hay evidencia del efecto de iones metálicos en el desarrollo de amiloidosis de cadena ligera, estudios han demostrado la capacidad de unión de las inmunoglobulinas a cobre, tanto *in vivo* como *in vitro* (Al-Mashikhi, Li-Chan, & Nakai, 1988; Bauer et al., 1997; Hultquist & Grant, 1978) .

SMA es una cadena ligera de inmunoglobulina, derivada de pacientes con amiloidosis de cadena ligera, perteneciente al grupo kIV. Davis y colaboradores demostraron que la exposición de SMA a concentraciones fisiológicas de Cu^{2+} induce la formación de agregados granulares *in vitro* y dentro de células, similares a los encontrados en la enfermedad por depósitos de cadenas ligeras. Al contrario de las fibras formadas por SMA, estos agregados granulares mostraban alta turbidez y baja sensibilidad a la fluorescencia de ThT. SMA posee 8 mutaciones respecto a la línea germinal, las cuales incluyen: H89Q e H94T. Las histidinas y residuos cercanos junto a Q96; permite un reordenamiento del CDR3, crean el sitio de coordinación a cobre, provocando la reducción de la constante de dimerización de SMA y proporcionando superficies hidrófobas expuestas, diferentes a las observadas en la interfaz del dímero. La disponibilidad de estas superficies, favorece la formación de agregados granulares, mientras que una sola superficie conduce al acoplamiento que requiere la formación de fibras (Davis et al., 2001).

Diomedea y colaboradores estudiaron el daño citotóxico de las cadenas ligeras en cardiomiocitos, demostrando que la presencia de iones metálicos, principalmente cobre, impulsan la producción de especies reactivas de oxígeno por interacción con cadenas ligeras cardiotóxicas, resultando en estrés oxidativo para células faríngeas de *caenorhabditis*

elegans. Además, el daño fue evitado por agentes quelantes. Se investigaron interacciones directas del Cu^{2+} por técnicas espectroscópicas, sin embargo, no se observaron cambios que indicaran unión directa, concluyendo que la interacción del Cu^{2+} con las cadenas ligeras estudiadas es transitoria, local y relativamente débil (Diomedee et al., 2017).

II.6 Estudio espectroscópico de la interacción metal – proteína

La coordinación del metal a una proteína requiere que el sitio de unión adopte geometrías específicas e induce restricciones locales de movilidad de proteínas que, a su vez, pueden producir efectos conformacionales de largo alcance, favoreciendo u obstaculizando la forma tridimensional correcta de la proteína. Dicha interacción metal-soluto es ampliamente estudiada, debido a que ocurren en un número restringido de sitios de unión y a menudo da lugar a interacciones muy fuertes y específicas, como en las metaloproteínas. Por lo tanto, un metal unido a proteínas puede convertirse en una sonda conformacional, en relación con sus propiedades espectroscópicas. Tales interacciones tienen implicaciones estructurales, funcionales y fisiológicas (Rotilio, 1980).

La teoría de campo-ligando describe la estructura electrónica de coordinación de complejos metálicos. Consiste en un átomo metálico central rodeado por un grupo de átomos o moléculas ricas en electrones, llamados ligandos. En el átomo metálico aislado, los orbitales *d* poseen el mismo estado de energía y tienen la misma probabilidad de estar ocupados por electrones, pero cuando la interacción entre orbitales moleculares del ligando y los orbitales *d* del metal toma lugar, los orbitales adquieren diferente energía. La magnitud y características de este efecto dependerán de la disposición geométrica del ligando con respecto a los orbitales y de la fuerza de la interacción (Cotton, 1964; Neese, 2013; Quintanar & Rvillas-Acevedo, 2015).

Los orbitales del ligando que participan en la interacción con el metal quedan estabilizados por dicha unión. El cambio de estado de energía en los orbitales *d* del metal va acompañado de una redistribución de electrones. Los orbitales promovidos a un estado de energía más alto pueden quedar desocupados y aquellos en estados de menor energía pueden llenarse completamente por pares de electrones con *spin* opuesto. Cuando los orbitales *d* del metal

no se llenan completamente (menos de 10 electrones) es posible detectar mediante espectroscopia de absorción electrónica las transiciones campo-ligando y las de transferencia de carga que involucran los orbitales de la proteína y los orbitales *d* del metal (**figura 7**) (Quintanar & Rvillas-Acevedo, 2015).

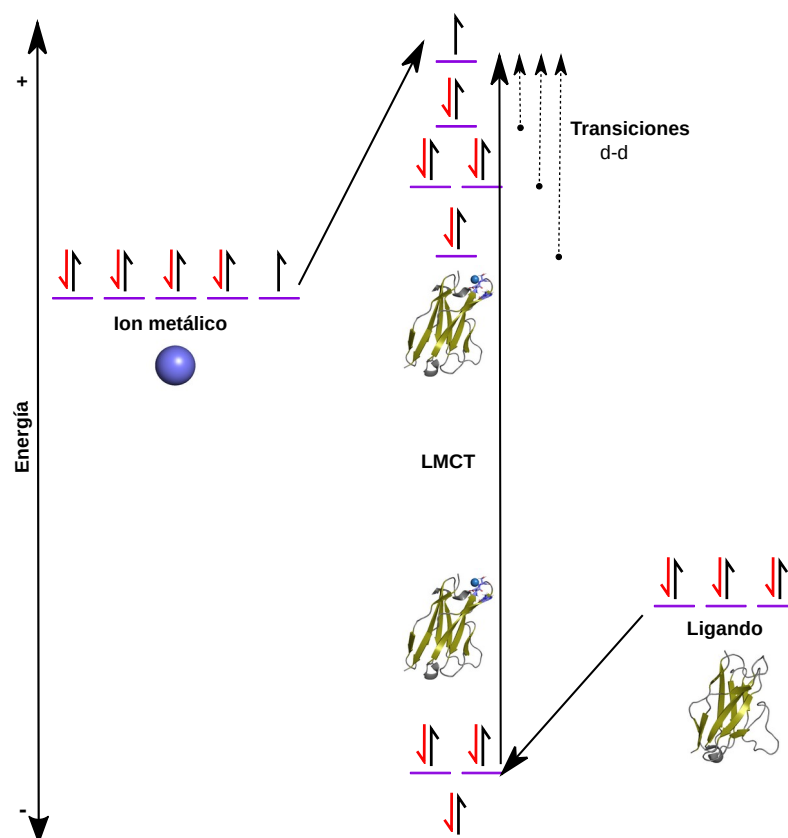


Figura 7. Esquema general de transiciones electrónicas en un enlace metálico. Después de la interacción proteína-ligando, los orbitales *d* del metal se desestabilizan y pierden degeneración al igual que los orbitales moleculares del ligando en la proteína. Las transiciones *d-d* (campo-ligando) se representan por líneas punteadas, mientras que las transiciones LMCT (Ligand to Metal Charge Transfer) son representadas por una flecha continua (imagen tomada y modificada de (Quintanar & Rvillas-Acevedo, 2015).

Ambas transiciones pueden estudiarse mediante espectroscopía de absorción electrónica y dicroísmo circular, siempre y cuando el metal de interés sea paramagnético (que posea 1 más electrones desapareados) arrojando información sobre la interacción (Quintanar & Rvillas-Acevedo, 2015)

III. Justificación

Diversos grupos de investigación se han centrado en la interacción de iones metálicos con proteínas precursoras de enfermedades conformacionales, tales como: β -amiloide, β 2-microglobulina, amilina, α -sinucleína, tau, prion, etc. El interés implica que la coordinación específica de iones metálicos a dichas moléculas podrían provocar cambios conformacionales y como consecuencia, acelerar o inhibir la formación de fibras amiloides.

El Cu^{2+} es un metal traza de gran importancia en sistemas biológicos, sin embargo, se ha observado que alteraciones en la homeostasis en órganos y tejidos, podrían promover la interacción metal-proteína y en algunos casos conducir a un proceso patológico. Lo anterior, se ha demostrado en estudios donde han encontrado altas concentraciones de iones metálicos en depósitos de placas amiloides, principalmente en: amilina, precursora de diabetes mellitus II; β -amiloide, relacionada a Alzheimer; prion, enfermedad de las vacas locas; e incluso en agregados patológicos no amiloidogénicos como en las cataratas, cuyas proteínas precursoras son en su mayoría cristalinas.

Los estudios registrados del efecto del Cu^{2+} sobre cadenas ligeras de inmunoglobulina están centrados en cadenas de tipo κ , específicamente del subgrupo IV y un estudio enfocado a la producción de especies reactivas de oxígeno debido a la interacción de Cu^{2+} con cadenas ligeras de tipo λ . Hasta la fecha, no existen registros en cadenas ligeras de la familia V λ 6a ni trabajos enfocados al desarrollo de la enfermedad originada por la interacción de iones metálicos.

Las proteínas V λ 6a están estrechamente relacionadas con la amiloidosis de cadena ligera, su prevalencia en esta patología es del 30%. El estudio de la interacción de esta familia de proteínas con Cu^{2+} aportará más elementos a la investigación de la interacción de proteínas amiloidogénicas con iones metálicos. Nuestra investigación proveerá información importante en la caracterización molecular de la amiloidosis de cadena ligera.

IV. Hipótesis

El ion metálico Cu^{2+} es capaz de unirse a la proteína 6aJL2-R24G a través de sitios específicos, afectando su estructura, estabilidad y formación de fibras amiloides.

V. Objetivos

V.I. Objetivo general

Caracterizar la unión del Cu^{2+} con la proteína 6aJL2-R24G.

V.II Objetivos particulares

- Evaluar el efecto del Cu^{2+} en la cinética de formación de fibras amiloides de 6aJL2-R24G, por fluorescencia de ThT.
- Estudiar la estabilidad térmica de los complejos de 6aJL2-R24G con Cu^{2+} por fluorescencia.
- Caracterizar termodinámicamente la unión de 6aJL2-R24G a Cu^{2+} por calorimetría de titulación isotérmica (ITC).
- Estudiar el cambio en estructura secundaria de 6aJL2-R24G inducido por la unión a Cu^{2+} .
- Estudiar el complejo 6aJL2-R24G- Cu^{2+} por absorción electrónica en la región UV-Vis, utilizando dicroísmo circular
- Determinar los posibles sitios de unión de Cu^{2+} por resonancia magnética nuclear (RMN).

VI. Materiales y métodos

VI.1 Mutagénesis

En el laboratorio contábamos con el plásmido de la proteína 6aJL2-R24G (donado por la Dra. Isabel Velázquez López, Facultad de Medicina UNAM) y a partir de éste se prepararon mutantes sitio dirigidas a los posibles sitios de interacción con Cu^{2+} . Se prepararon las mutantes 6aJL2-R24G-H8S, 6aJL2-R24G-dH99 (en la que se realizó una delección en el residuo H99 y 6aJL2-R24G-H8S-dH99. Esta mutagénesis se realizó en colaboración con la Dra. Clarita Olvera del Instituto de Biotecnología, UNAM.

VI.2 Sobre-expresión y purificación

Las proteínas recombinantes 6aJL2-R24G, 6aJL2-R24G-H8S 6aJL2-R24G-dH99y 6aJL2-R24G-H8S-dH99 fueron expresadas en *Escherichia coli* (DE3), previamente transformadas por choque térmico con el plásmido pET27b(+) que contenía la secuencia de nucleótidos para cada una de las proteínas. Las bacterias fueron incubadas en medio 2xYT con 60 ug/ml de kanamicina, agitando a 200 rpm y 37 °C hasta alcanzar una D.O_{600} de 0.9. Después, fueron inducidas con IPTG e incubadas a 150 rpm y 25 °C toda la noche. Posteriormente, las células fueron centrifugadas a 4000 rpm a 4 °C durante 30 min. El botón bacteriano fue lisado por choque osmótico, añadiendo a las células una solución de 20% (p/v) de sacarosa, Tris 100 mM, pH 8.0 y EDTA 1 mM, agitando suavemente durante 20 min. Las células fueron sometidas a otro ciclo de centrifugación; en seguida, el botón bacteriano fue re-suspendido suavemente en agua fría y se incubó a 4°C durante 20 min. Luego fueron centrifugadas a 12000 rpm por 40 min a 4 °C. El sobrenadante que contenía la proteína de interés fue filtrado a través de un poro de 0.22 μm , concentrado en un microcón por centrifugación y cargado a una columna de exclusión molecular sephadex 200 en un cromatógrafo ÄKTApurifier. La proteína fue eluida en un tampón MES 10 mM, pH 8 y NaCl 75 mM (todos los experimentos aquí descritos fueron realizados bajo estas condiciones). La pureza de la proteína fue confirmada por SDS-PAGE. Finalmente, se determinó la concentración usando su coeficiente de extinción molar de 14565 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ a 280 nm (ProtParam)(Wilkins et al., 1999) .

VI.3 Fibrillogénesis *in vitro*

Las cinéticas de formación de fibras amiloides se estudiaron por fluorescencia de la Tioflavina T (ThT), siguiendo su máximo de emisión a 485 nm, excitando a 450nm. Las mediciones fueron tomadas cada 5 min en un fluorímetro Cary Eclipse equipado con un peltier y agitador magnético. Para las cinéticas de fibras amiloides, la proteína fue utilizada a una concentración final de 100 μ M en ausencia y presencia de cantidades apropiadas de CuCl_2 para tener 1.0, 2.0, 3.0 y 4.0 equivalentes. El tiempo Lag fue obtenido ajustando una regresión lineal en las fases de nucleación y elongación de la cinética; la intersección de las dos líneas rectas corresponde al tiempo lag de la cinética. Se realizaron tres réplicas de diferentes purificaciones.

VI.4 Microscopía electrónica de transmisión

El punto final de la cinética de formación de fibras fue decantado toda la noche, y el botón resultante fue lavado con agua destilada para remover el exceso de ThT; el lavado se repitió por varios ciclos. 10 μ L de la solución fibrilar de la proteína sola y con diferentes concentraciones de Cu^{2+} se cargaron en una rejilla de cobre cubierta con formvar por 1 min, después se lavó con 5 μ L de agua destilada y se tiñó con solución de acetato de uranilo al 2%. Las muestras fueron visualizadas en un microscopio electrónico CARL ZEISS libra 120, corriendo a 100kV y acoplado a una cámara gatan Ultrascan 1000 CCD (2000x2000 pixeles) para tomar las imágenes, tomadas en el Instituto de Biotecnología de la UNAM (IBt).

VI.5 Estabilidad térmica

El desplegamiento térmico se evaluó siguiendo la fluorescencia del triptófano (excitación a. 290nm, emisión 350 nm) en un equipo Cary Eclipse. El desplegamiento fue inducido por aumento de la temperatura 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ desde 25 hasta 60 $^{\circ}\text{C}$. Las proteínas fueron utilizadas a una concentración 10 μ M en ausencia y presencia de cobre en relaciones molares de 0 a 4. Las curvas fueron ajustadas a una sigmoide con la ecuación de Boltzmann, $A_2 + (A_1 - A_2) / (1 + \exp((x - x_0)/dx))$ donde x_0 corresponde a la T_m de cada proteína. Se realizaron tres réplicas de diferentes purificaciones.

VI.6 Sitios de unión de Cu²⁺ seguidos por RMN

La proteína 6aJL2-R24G se marcó con ¹⁵N y se purificó como se describió antes. Dado que el espectro HSQC (*Heteronuclear single quantum coherence spectroscopy*) de la proteína ya está asignado, se usaron esos datos para realizar una titulación de la proteína con concentraciones crecientes de Cu²⁺. Los espectros fueron tomados a 25 °C a una concentración 100 µM de proteína y 0.2, 0.5 y 0.8 equivalentes de Cu²⁺ en buffer MES 10 mM pH 8, NaCl 75 mM y 15% de D₂O. Los espectros fueron procesados con NMRPipe (Delaglio et al., 1995) y analizados usando el software CARA (R. Keller, n.d.).

VI.7 Afinidad de la interacción Cu²⁺-proteína

Para determinar la afinidad de la interacción entre el Cu²⁺ y la proteína se hicieron titulaciones con la técnica de calorimetría de titulación isotérmica (ITC por sus siglas en inglés). En cada experimento, en la celda se colocó la proteína a una concentración 100 µM y se tituló con CuCl₂ 2.1 mM. Los volúmenes de inyección fueron de 1.5 µM y agitación de 750 rpm a 25 °C. El tiempo entre inyecciones fue de 180 s para permitir un equilibrio completo. La titulación blanco consistió en titular el buffer con CuCl₂. Los experimentos fueron realizados en un equipo Malvern ITC200. El termograma fue integrado con el software NIPTIC (S. Keller et al., 2012). Los datos fueron ajustados a un modelo de dos sitios de unión no interactivos por SEDPHAT (Zhao, Piszczek, & Schuck, 2015). Se realizaron tres réplicas con diferentes lotes de proteína.

VI.8 Cambios en estructura secundaria inducidos por la unión con Cu²⁺

Para determinar si la coordinación de Cu²⁺ a 6aJL2-R24G afecta la estructura secundaria, se hizo una titulación de la proteína con el ion metálico, y se siguió por dicroísmo circular (DC) en el UV lejano. La proteína se usó a una concentración 100 µM, se usó una celda de cuarzo de paso óptico 0.1cm y se colectó el espectro a un ancho de banda de 10 nm a una velocidad de 100 nm/min. Los espectros se deconvolucionaron en el programa BestSel (Micsonai et al., 2018, 2015)

VI.9 Estimación de sitios de unión

Se utilizó el servidor de acoplamiento y sitio de unión a iones metálicos (MIB, por sus siglas en inglés) para analizar los sitios potenciales de unión a Cu^{2+} a 6aJL2-R24G. Esta herramienta (<http://bioinfo.cmu.edu.tw/MIB/>) aprovecha el método de transformación de fragmentos para la comparación estructural entre la proteína de consulta y templados en base de datos, seleccionando y recopilando residuos de unión a iones metálicos en la estructura tridimensional de consulta dentro de 3.5 Å del ión metálico. Se utilizó el código PDB: 5JPJ como estructura de consulta.

VI.10 Caracterización espectroscópica de la interacción Cu^{2+} -proteína

Se realizaron titulaciones a temperatura ambiente de la proteína a una concentración de 100 μM e incrementando las concentraciones de Cu^{2+} de 0.5 en 0.5 eq, siguiendo los cambios por absorción electrónica en la región UV-Visible con un espectrofotómetro Agilent 8453 y por dicroísmo circular (DC) con ayuda de un espectropolarímetro Jasco J-815. Para seguir los cambios en las señales d-d y LMCT se utilizó una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico, mientras que, para determinar los cambios en la estructura secundaria, se utilizó una celda de 0.1 cm de paso óptico.

VII. Resultados

VII.1 Efecto del Cu^{2+} en la cinética de formación de fibras de 6aJL2-R24G

La cinética de formación de fibras amiloides se determinó siguiendo la fluorescencia de la ThT; dicho fluoróforo al unirse a estructuras de láminas β , produce un cambio en su espectro de emisión, mostrando un máximo a 480 nm cuando es excitado a 450 nm. La cinética de formación de fibras en presencia de ThT, origina una curva sigmoidea, que refleja la fase lag, la fase de elongación y una fase de equilibrio.

En la **Figura 8** se muestran las cinéticas de formación de fibras de 6aJL2-R24G. Los tiempos lag estimados de estas cinéticas fueron de 328.6 ± 49.9 min, 257.0 ± 24.6 min, 130.0 ± 31.6 , 183.6 ± 26.8 min y 132.3 ± 18.7 min en presencia de 0, 1, 2, 3 y 4 equivalentes de Cu^{2+} , respectivamente. Estos resultados indican que la interacción de la proteína con el ion metálico Cu^{2+} acelera la formación de fibras, obteniéndose fibras maduras en menor tiempo.

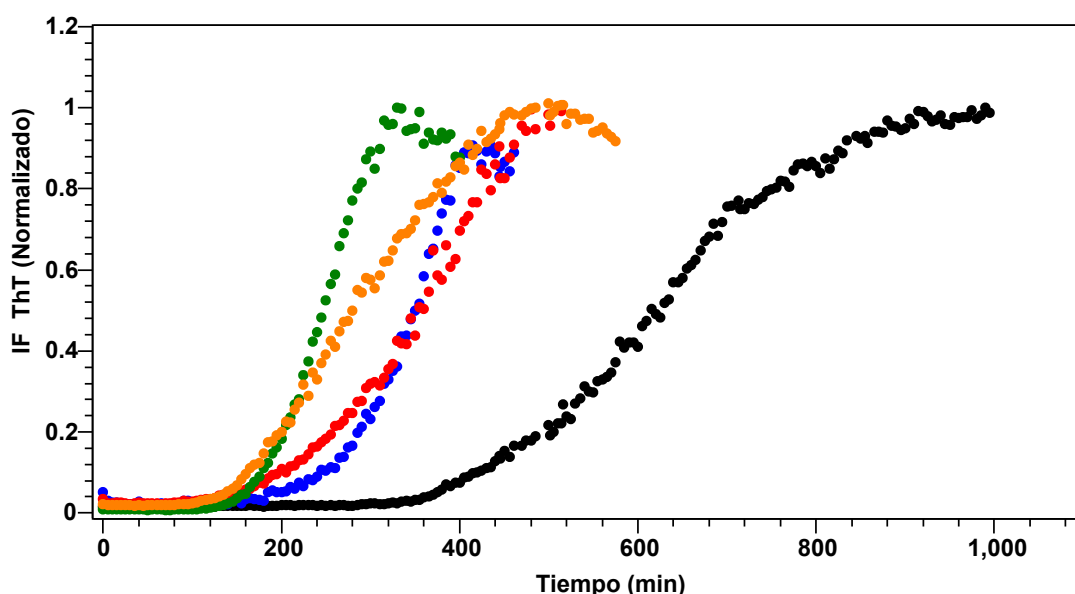


Figura 8. Cinética de la Fibrillogénesis *in vitro* de 6aJL2-R24G. Cinética de formación de fibras de la proteína seguida por fluorescencia del ThT en ausencia (**negra**) y presencia de **1**, **2**, **3** y **4** equivalentes de Cu^{2+} (trazos representativos).

VII.2 Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

Como se mencionó anteriormente, el ThT se ha convertido en un estándar muy utilizado en la identificación de fibras amiloides, tanto *in vivo* como *in vitro*. En soluciones de proteína, la interacción de ThT con fibras amiloides es altamente específica. Ni los agregados amorfos ni las proteínas solubles en estados plegados, desplegados o parcialmente plegados mejoran la fluorescencia del ThT, aunque se ha observado que moléculas como ADN, carbohidratos, y algunas proteínas, entre otros, pueden unir ThT y provocar un falso positivo (Gade Malmos et al., 2017). Con el fin de confirmar la presencia de fibras amiloides, las muestras fueron observadas por microscopía electrónica de transmisión, tomando el punto final de cada cinética.

La **Figura 9** muestra imágenes capturadas por MET, y confirman la presencia de fibras amiloides para todas las condiciones experimentales probadas en este trabajo. Las imágenes muestran agregados de origen proteico, los cuales presentan la morfología típica de fibras amiloides: fibras largas, de variada longitud y no ramificadas.

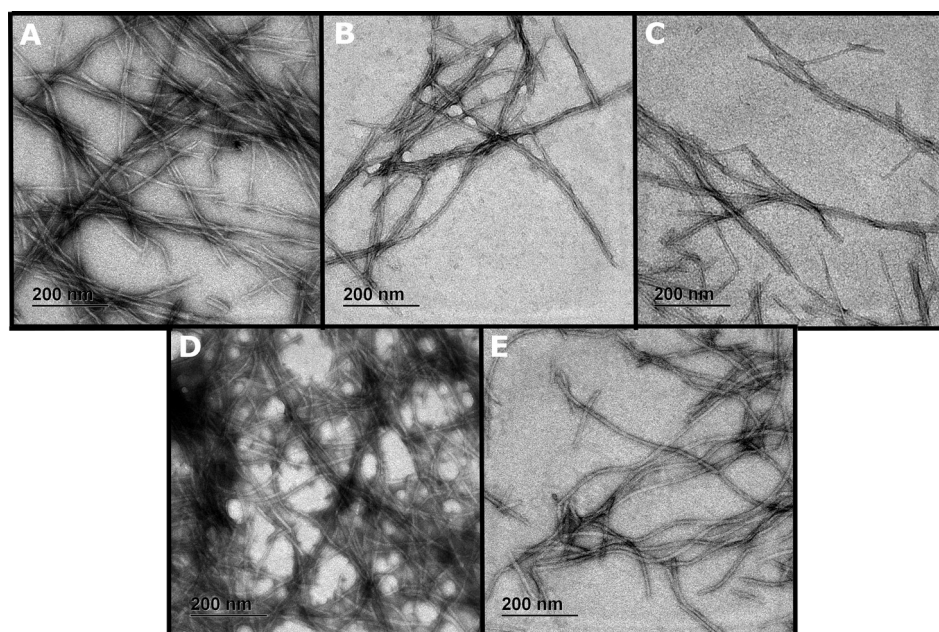


Figura 9. Imágenes por MET de fibras amiloides. Micrografías electrónicas de transmisión de los agregados al final de la cinética de formación de fibras amiloides de 6aJL2-R24G en ausencia (A) y presencia de 1eq (B), 2eq (C), 3eq (D) y 4eq (E) de Cu^{2+} .

VII.3 Efecto del Cu^{2+} en la estabilidad térmica de 6aJL2-R24G

A fin de evaluar el efecto de la interacción del Cu^{2+} con la proteína, se determinó la T_m de la proteína en ausencia y presencia de Cu^{2+} , aprovechando la característica del sistema, en la que la fluorescencia del único triptófano está apagada por el puente disulfuro cuando la proteína se encuentra en estado plegado, y emite a 350nm cuando la proteína se encuentra desplegada y el Trp y el puente disulfuro se alejan. Las curvas de desplegamiento por temperatura se muestran en la **Figura 10**. En todos los casos se observa una tendencia sigmoideal, y esta sigmoide se ajustó a la ecuación de Boltzmann; $A2+(A1-A2)/(1+\exp((x-x_0)/dx))$, donde X_0 corresponde a la temperatura media de desplegamiento (T_m).

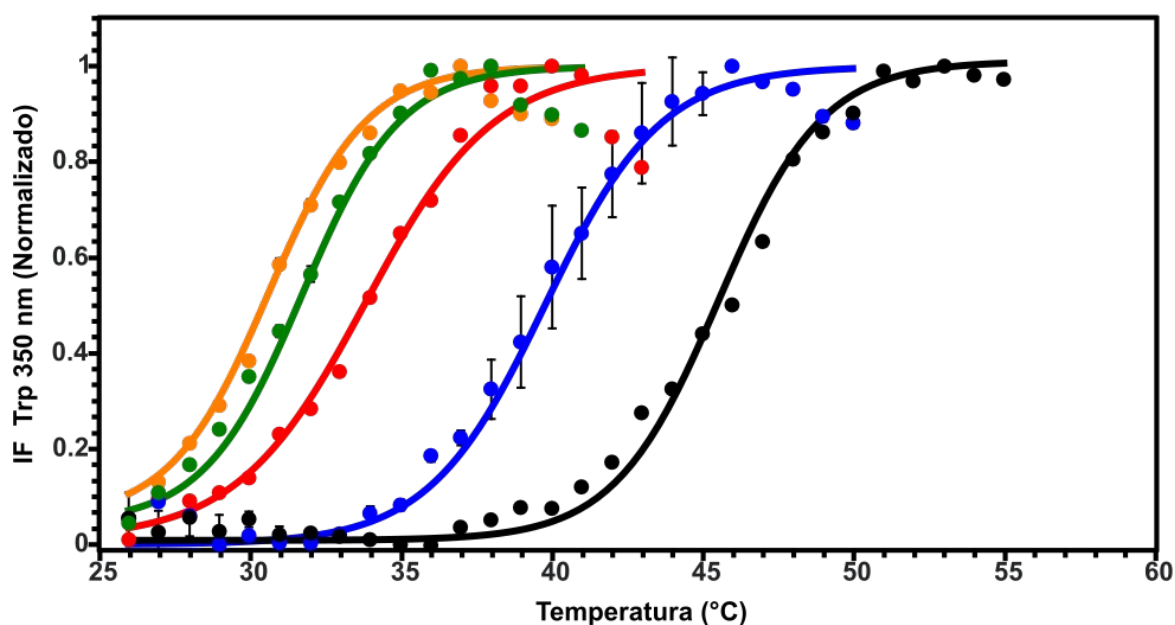


Figura 10. Desplegamiento térmico de 6aJL2-R24G. En ausencia (negro) y en presencia de 1eq , 2eq , 3eq y 4eq de Cu^{2+} . Las líneas sólidas en el gráfico representan el ajuste a la ecuación de Boltzmann para cada condición.

De acuerdo con el ajuste de datos en la ecuación, se obtuvieron los valores de T_m para cada una de las condiciones: 6aJL2-R24G de 45.9 ± 0.08 °C, mientras que en la presencia de 1 a 4 eq de Cu^{2+} la T_m disminuyó a 39.46 ± 0.15 , 33.54 ± 0.23 , 30.72 ± 0.75 y 30.71 ± 0.43 °C, respectivamente. Por lo tanto, la interacción de Cu^{2+} con 6aJL2-R24G reduce la estabilidad

en la estructura terciaria de la proteína y, probablemente, contribuye a la propensión de formación de fibras amiloides.

Es bien sabido que una vez desplegada la proteína por inducción de calor, puede replegarse nuevamente en su estado nativo después de reducir la temperatura (**Figura 11A**). Se determinó la capacidad de replegamiento de la proteína a diferentes concentraciones de Cu^{2+} , probando que a 1 y 2 equivalentes de Cu^{2+} es capaz de replegarse una vez que se baja la temperatura a 25 °C (**figura 11B y C**, respectivamente). Sin embargo a 3 y 4 equivalentes de Cu^{2+} la proteína no se repliega (**Figura 11D y E**, respectivamente).

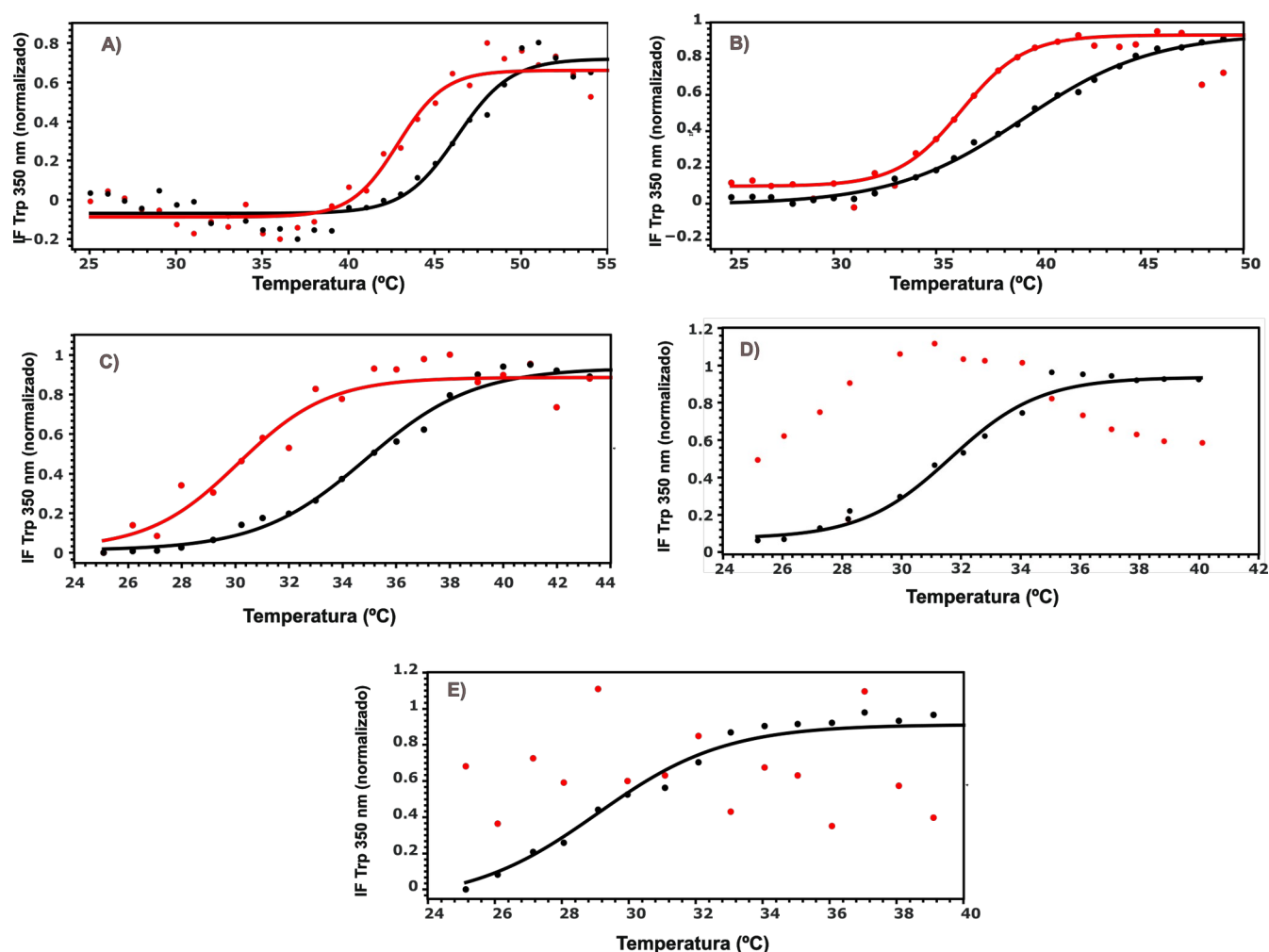


Figura 11. Desplegamiento y replegamiento de 6aJL2-R24G. Desplegamiento y **replegamiento en presencia de 0 (A), 1 (B), 2 (C), 3 (D) y 4 (E) equivalentes de Cu^{2+}**

VII.4 Predicción de sitios de unión de Cu^{2+} en 6aJL2-R24G

Metal Ion Binding (MIB) es un servidor de predicción y acoplamiento de sitios de unión para iones metálicos, el cual proporciona un enfoque integrado y preciso para buscar los residuos en los sitios de unión a tales ligandos basado en una estructura de consulta y una base de datos. Mediante el método de transformación de fragmentos. La estructura de la proteína de consulta se compara con cada plantilla de unión a metales en la base de datos, para localizar los residuos de unión a iones metálicos. A cada residuo de la proteína de consulta se le asigna una puntuación de unión que se compone de medidas de conservación de secuencia y estructura. Cuando la puntuación de unión de un residuo es superior a un umbral específico, se predice que este residuo será un residuo de unión a metales. Según la alineación de la estructura 3D local entre la proteína de consulta y la plantilla de unión de iones metálicos, el ión metálico en la plantilla de unión de metales se puede transformar en la estructura de la proteína de consulta.

En la **figura 12** se muestran las puntuaciones de unión a Cu^{2+} obtenidas para cada uno de los aminoácidos de la secuencia de 6aJL2-R24G (PDB: 5JPJ). Los residuos con mayor puntuación fueron: Asn1, Met3, Thr5, His8, Ser32, Asn33, Pro60, Asp61, Ser71, Asn72, Ala87, Asp88, Tyr90, Asp95, Ser96, Ser97, Asn98 e His99. Esto sugiere su posible participación en la coordinación de Cu^{2+} .

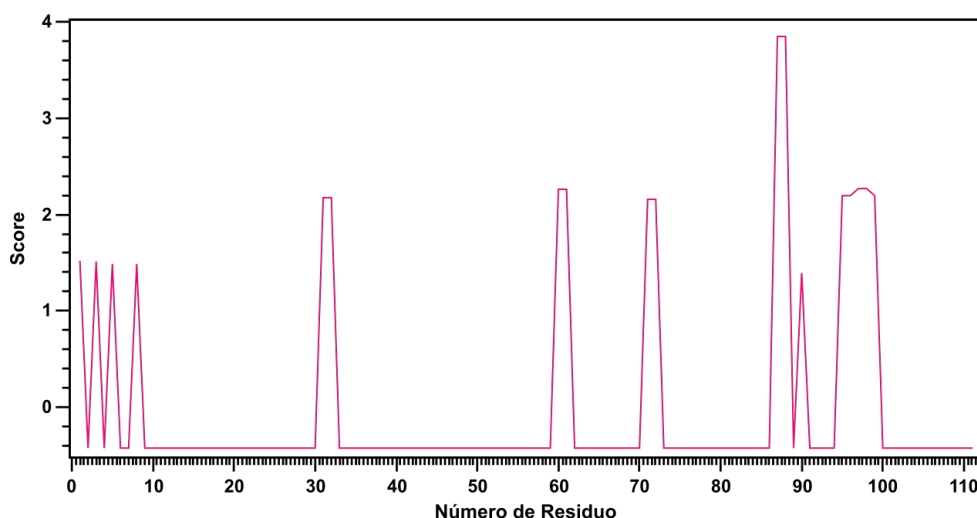


Figura 12. Predicción de aminoácidos que interactúan con Cu^{2+} .

Además de predecir los residuos de unión y estimar las puntuaciones, MIB también predice la posición acoplada del ión metálico en la estructura de la proteína, en los sitios de mayor potencial de unión. El sitio de unión a Cu^{2+} que muestra mayor potencial de unión con la proteína 6aJL2-R24G involucra los aminoácidos A87 y D88, con un puntaje de interacción de 1.051, seguido por el sitio conformado por S97 y N98 (0.663); P60 y D61 (0.661), D95; S96 y H99 (0.645); S31 y N32 (0.640) y finalmente con S71 y N72 (0.636) cada pose de unión al ión metálico se muestra en la **figura 13**. Cabe resaltar que otros aminoácidos con puntuaciones altas de unión fueron N1 (1.51), M3 (1.51), T5 (1.48), H8 (1.48), sin embargo el servidor MIB no los mostró.

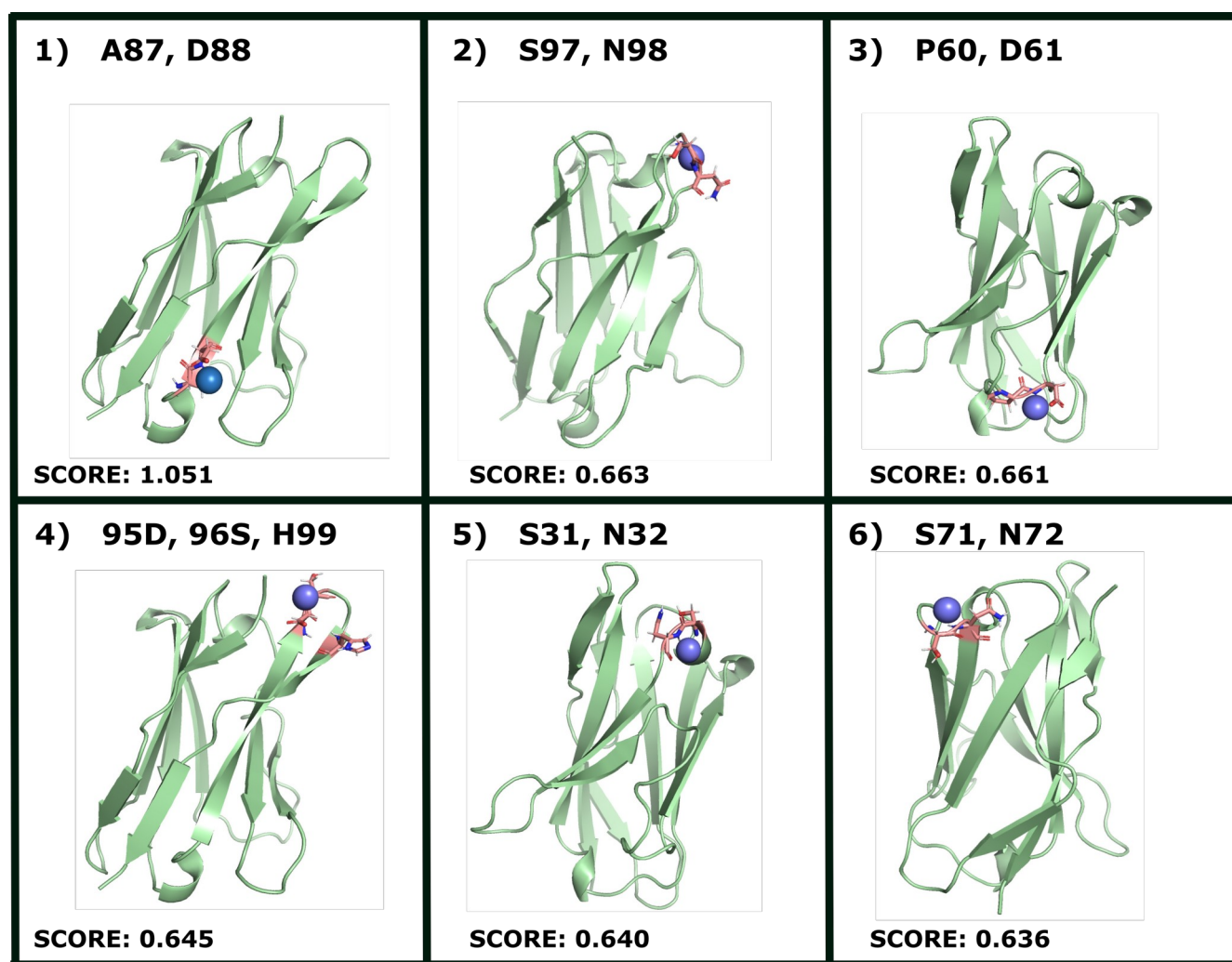


Figura 13. Predicción de sitios potenciales de unión a Cu^{2+} . Los residuos predichos en la unión a Cu^{2+} (esfera azul) se ilustran como *sticks* (CHNOS). Las imágenes fueron creadas utilizando pymol.

VII.5 Sitios de unión de Cu^{2+} a 6aJL2-R24G

Con el objetivo de establecer los posibles sitios de unión del Cu^{2+} a la proteína, se realizaron experimentos de RMN. En este tipo de experimento se correlacionan los protones unidos a nitrógenos de la cadena principal, cuyas señales en el espectro corresponden a cada uno de los residuos de la proteína. Cuando se produce una interacción entre distintas moléculas, se generan cambios en las señales de los espectros de HSQC. Una manera de determinar si existe o no interacción es comparar los espectros de la proteína con el espectro del complejo formado. Debido a que el Cu^{2+} es un ión paramagnético, las señales del espectro HSQC de la proteína que se encuentren cerca o interactuando con el ión metálico mostrarán un ensanchamiento y pérdida de intensidad debido al efecto de mejora de relajación paramagnética (Clore & Iwahara, 2009; Exley et al., 2012).

El espectro HSQC de la proteína 6aJL2-R24G (**Figura 14A**) muestra señales dispersas y definidas, indicativo de una proteína plegada. Al adicionar 0.2 equivalentes de Cu^{2+} los cambios detectados en el espectro fueron mínimos (**Figura 14B**), por lo que se continuó con la titulación. Al adicionar 0.5 equivalentes de Cu^{2+} los cambios fueron más notorios (**Figura 14 C**), y se observan cambios en la intensidad de varios residuos. Al adicionar 1.0 equivalente de Cu^{2+} , el espectro se vio mucho más afectado (**Figura 14D**) perdiendo la mayor parte de las señales, lo que dificulta el rastreo de los posibles sitios de unión. Debido a lo anterior, se utilizó el espectro con 0.5 equivalentes de Cu^{2+} para analizar los sitios más probables de unión.

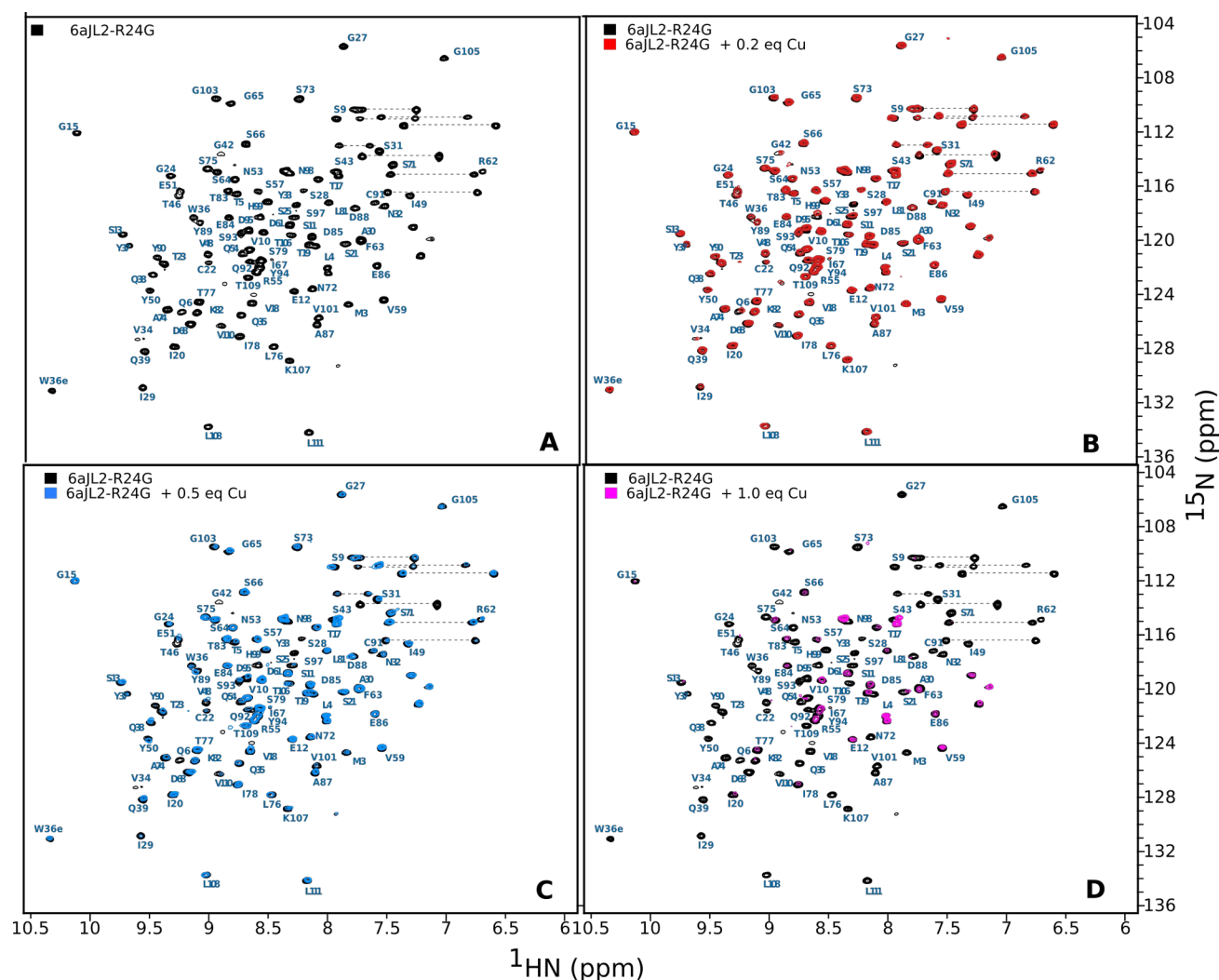


Figura 14. Espectros HSQC de 6aJL2-R24G titulada con Cu^{2+} . A) Proteína en ausencia de Cu^{2+} . B) Sobrelape del espectro de la proteína en ausencia y presencia de 0.2 equivalentes de Cu^{2+} . C) Sobrelape del espectro de la proteína en ausencia y presencia de 0.5 equivalentes de Cu^{2+} y D) Sobrelape del espectro de la proteína en ausencia y presencia de 1.0 equivalente de Cu^{2+} .

En la **Figura 15** se sobrelaparon los espectros de la proteína en ausencia y presencia de 0.5 equivalentes de Cu^{2+} . Al compararlos es evidente que hay varios residuos cuya intensidad disminuyó parcial o totalmente. Para determinar cuantitativamente los cambios en intensidad, se calculó I/I_0 para cada residuo asignado (**Figura 15C**), donde I es la intensidad de las señales de 6aJL2-R24G con 0.5 equivalentes de Cu^{2+} , e I_0 es la intensidad de las señales de la proteína en ausencia de Cu^{2+} . Este cociente se mapeó en la estructura 3D de la proteína

(Figura 15B) con un gradiente de color de azul a rojo, en donde azul es no cambio y rojo es grandes cambios. Las áreas en gris corresponden a residuos no asignados.

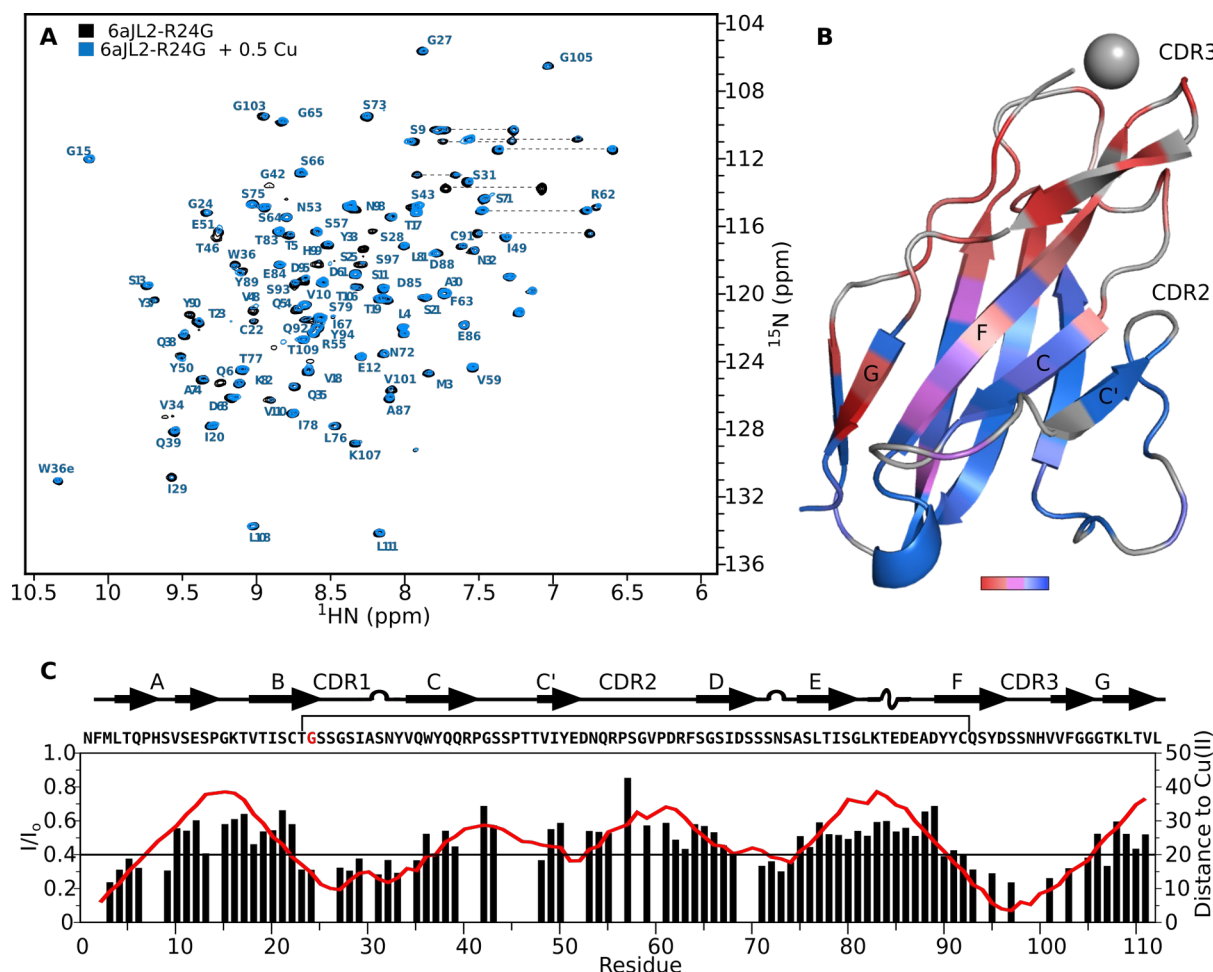


Figura 15. Espectro HSQC 1H-15N de 6aJL2-R24G en presencia de Cu^{2+} . A) 6aJL2-R24G en ausencia (negro) y presencia (azul) de 0.2 equivalentes de Cu^{2+} . B) Cambios en la intensidad de las señales inducida por Cu^{2+} mapeadas en la estructura 3D de 6aJL2-R24G (entrada PDB 2MKW), codificadas por colores según las perturbaciones a través de un gradiente lineal de azul (sin cambio) a rojo. C) Relación de intensidad entre 6aJL2-R24G y el complejo Cu^{2+} - 6aJL2-R24G; la línea roja indica la distancia entre el Cu^{2+} , ubicado cerca de H99, y los demás residuos de la proteína.

Tomando en cuenta la diferencia de intensidades superiores a 0.4, los residuos más afectados fueron 3–6, 9, 23, 24, 27–29, 31–33, 35, 48, 71–74, 90, 92, 93, 95, 97, 101, 103, 105, y 107. El efecto en la intensidad de todos estos residuos se puede explicar por un efecto a larga distancia de la unión del Cu^{2+} . Al ubicar el Cu^{2+} como una esfera en la H99 (Figura

15B) y calcular la distancia entre los residuos de proteína y el centro metálico, existe una buena correlación entre la proximidad del Cu^{2+} y la pérdida de intensidad. Esto se puede ver más claramente al seguir la línea roja de la **figura 15C**, la cual indica la distancia entre cada residuo y el Cu^{2+} ubicado en la H99. Se observa claramente que la tendencia de variación entre la distancia de los residuos al centro metálico corresponde con los cambios en el cociente de intensidad.

VII.6 Caracterización termodinámica de la unión de Cu^{2+} a 6aJL2-R24G

La técnica de calorimetría de titulación isotérmica nos permitió determinar los parámetros termodinámicos de la unión de Cu^{2+} a 6aJL2-R24G. La proteína fue colocada en la celda del equipo a una concentración 0.1 mM y se tituló con el Cu^{2+} a 2.1 mM a 25°C. Los calores de inyección en la isoterma son positivos lo que indica el carácter endotérmico del proceso de unión de 6aJL2-R24G al ión metálico. En la titulación se puede observar que de 0 a 2.5 equivalentes de Cu^{2+} existe una tendencia sigmoideal con saturación de la señal entre 2 y 2.5 equivalentes de Cu^{2+} . Sin embargo, a mayores equivalentes de Cu^{2+} se observa un ligero aumento en los calores de inyección, lo que está indicando que están ocurriendo otros procesos (**Figura 16** paneles derechos). Estos procesos pueden ser el inicio del desplegamiento o agregación de la proteína inducida por la unión a Cu^{2+} ; o unión de Cu^{2+} a otros sitios de la proteína con menor afinidad. Hasta este punto del proyecto no ha sido posible distinguir cual de estos procesos ocurrió.

Debido a que no podemos explicar qué ocurre arriba de 2.5 equivalentes de Cu^{2+} , la escala del termograma se limitó hasta este cociente molar y se ajustó a un modelo de dos sitios de unión secuenciales (**Figura 16** paneles izquierdos). Las K_d determinadas con este ajuste fueron 0.1 μM para el primer sitio y 0.3 μM para el segundo. El panel derecho muestra el termograma con escala de hasta 4 equivalentes.

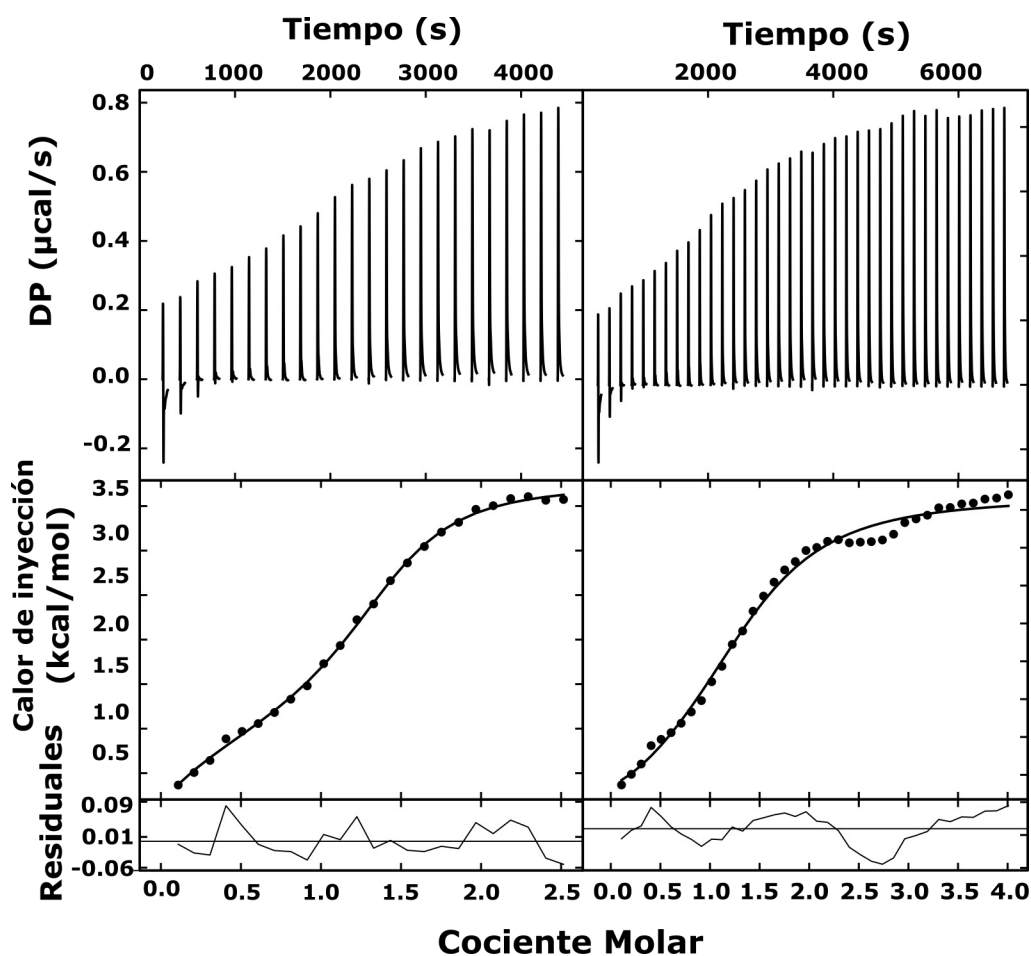


Figura 16. Titulación isotérmica de 6aJL2-R24 con Cu^{2+} . Los paneles superiores muestran los datos crudos de la titulación. Los paneles inferiores muestran la integración de los datos del panel superior, el ajuste a un modelo de dos sitios de unión y el análisis residual del ajuste.

VII.7 Cambios en la estructura secundaria inducidos por la unión de Cu^{2+}

Para determinar si la coordinación de Cu^{2+} a 6aJL2-R24G afecta la estructura secundaria, se realizó una titulación de la proteína con el ion metálico, y se siguió por dicroísmo circular (DC) en el UV lejano. La **Figura 17A** muestra el espectro de la proteína 6aJL2-R24G (negro), donde se observa un máximo positivo a 205 nm y un pico negativo a 220 nm. De acuerdo con los datos de deconvolución por el servidor BeStSel, la proteína presenta un porcentaje mayoritario de estructura β antiparalela, lo cual, concuerda con los datos estructurales por cristalografía de rayos X y RMN (**Figura 17B**) (González-Andrade et al., 2013b; Maya-

Martinez et al., 2015; Rudiño-Piñera et al., 2019), e indica que la proteína se encuentra en estado plegado. Cabe resaltar que una característica típica del espectro de DC de esta proteína es una señal negativa en 230 nm que está asociada principalmente al triptófano y regiones ricas en tirosinas de la proteína (Baden et al., 2008).

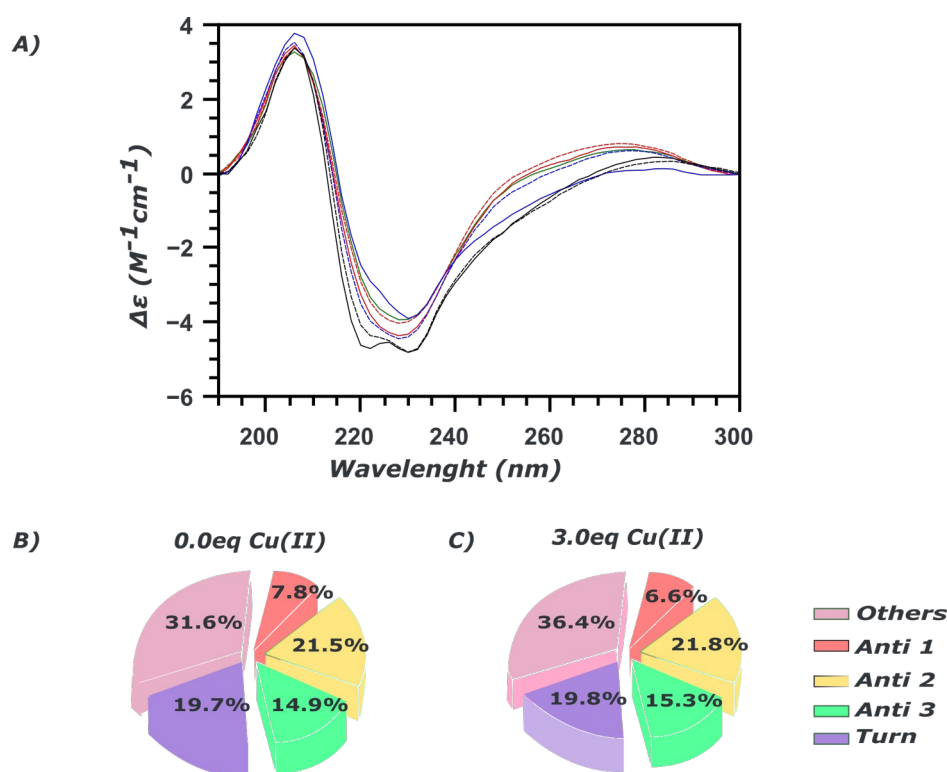


Figura 17. Espectro de DC de 6aJL2-R24G en el UV lejano. A) titulación de 6aJL2-R24G sin Cu^{2+} (línea continua negra), con 0.5 (línea punteada negra), 1 (línea continua), 1.5 (línea discontinua), 2 (línea continua), 2.5 (línea discontinua), 3 (línea continua) equivalentes de Cu^{2+} . Se muestra el porcentaje en estructura secundaria registrada al inicio **B)** y final de la titulación con Cu^{2+} **C)**.

Después de la adición de concentraciones crecientes de Cu^{2+} los espectros presentaron algunos cambios (**figura 17A**). Por ejemplo, la señal negativa a 230 nm desaparece luego de la adición de 1 equivalente de Cu^{2+} , además, desde 0.5 equivalentes de Cu^{2+} los espectros presentan menor intensidad. A pesar de estas diferencias, los resultados de la deconvolución indican que no hay cambios en el porcentaje de hojas β antiparalela, indicando que la interacción de cobre con la proteína no afecta su estructura secundaria (**tabla 1**).

Tabla 1. Porcentajes de estructura secundaria del complejo Cu^{2+} - 6aJL2-R24G, obtenidos con el software BestSel.

Equivalente s Cu^{2+}	Hélice	Hoja beta antiparalela	Hoja beta Paralela	Giro	Otros *	RMSD
0.0	0	44.5	0	13.7	41.5	0.0980
0.5	0	44.5	0	13.6	41.8	0.1094
1.0	0	44.5	0	13.6	41.8	0.0998
1.5	0	44.5	0	13.6	41.8	0.0984
2.0	0	44.5	0	13.6	41.6	0.0999
2.5	0	44.5	0	13.6	41.7	0.0097
3.0	0	44.5	0	13.6	41.7	0.1000

RMSD: Root-mean-square deviation of atomic positions

* **Otros incluye 3,10 hélices, π -helix, β -puentes, curvas, loops/irregulares y regiones invisibles de la estructura.**

Los cambios producidos en la señal a 230 nm sugiere que las cadenas laterales de los residuos aromáticos: adoptan una conformación diferente, están expuestas a un ambiente diferente y / o cambian su dinámica. Los resultados de DC sugieren que la unión de Cu (II) no induce cambios importantes en la estructura secundaria, pero puede inducir cambios conformacionales en la estructura terciaria de la proteína.

VII.8 Caracterización de la interacción Cu^{2+} -proteína

Debido a que el Cu^{2+} es un ion paramagnético, la interacción con otra molécula genera señales de absorción electrónica. La proteína fue titulada con Cu^{2+} y los cambios espectroscópicos fueron seguidos por absorción electrónica y dicroísmo circular en la región UV-visible. La adición del ion metálico originó señales en la región UV-Visible (**Figura 18A**), indicando la coordinación del Cu^{2+} con la proteína. Las señales por absorción electrónica y DC se saturaron en 2 equivalentes de Cu^{2+} , indicando una estequiometría 2:1 para el complejo Cu^{2+} - 6aJL2-R24G.

El espectro de DC del complejo Cu^{2+} -6aJL2-R24G (**figura 18B**) muestra dos señales de LMCT, una negativa en 33000 cm^{-1} y una señal positiva en 29500 cm^{-1} . Además, se aprecia el incremento de una banda $d-d$ al rededor 16000 cm^{-1} . De acuerdo con la literatura, las bandas

LMCT de 29500 y 33000 cm^{-1} coinciden con energías de bandas de transferencia de carga de amidas desprotonadas e imidazol, respectivamente. Por lo tanto, el Cu^{2+} se une a histidinas y amidas desprotonadas de la cadena principal.

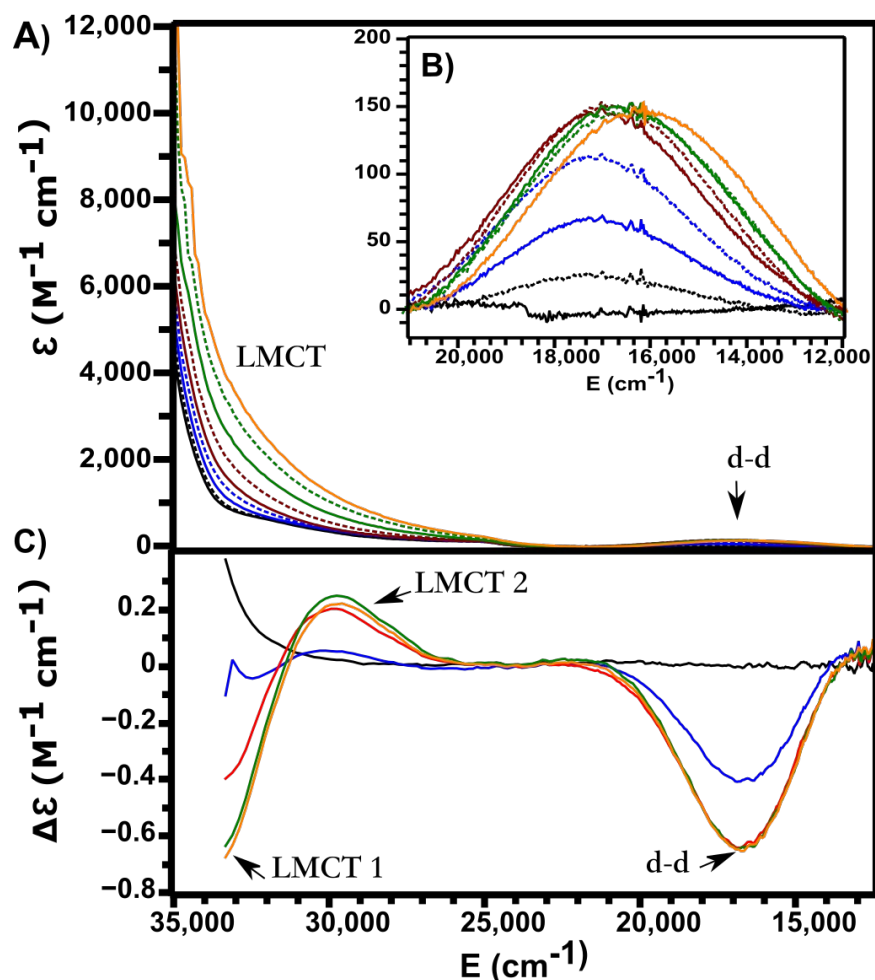


Figura 18. Transiciones electrónicas del complejo Cu^{2+} - 6aJL2-R24G. Titulación de 6aJL2-R24G con 0, 1, 2, 3 y 4 eq. (A) Espectro de absorción UV-visible, (B) imagen ampliada de las bandas d-d en la región visible del espectro C) Espectro de DC.

VII.9 Papel de las Histidinas en la unión a Cu^{2+} .

Con el fin de confirmar el papel de las histidinas en la coordinación de Cu^{2+} , se hicieron 3 mutantes; H8S, dH99 y H8s/dH99. La mutagénesis se hizo en colaboración con la Dra. Clarita Olvera, en el Instituto de Biotecnología (IBt), UNAM.

VII.10 Sobreexpresión y purificación de las mutantes de histidinas

Cada mutante se sobreexpresó en *E. coli* D3 y se siguió el protocolo de inducción y purificación descrito en la metodología. En la **figura 19** se muestran los geles del proceso de sobreexpresión para las 3 mutantes de histidinas. En todos los casos se observa una banda intensa sólo después de inducir la sobreexpresión de las proteínas. Esta banda se espera esté presente en todos los pasos de la lisis, excepto en los carriles S.S. y P.A (sobrenadante de sacarosa y botón de agua, respectivamente). El hecho de que se observe la banda en S.S. y P.A. indica que se pierde parte de la proteína durante el proceso de lisis. Sin embargo, la banda en el carril S.A (sobrenadante de agua) tiene buena intensidad en el gel de cada mutante.

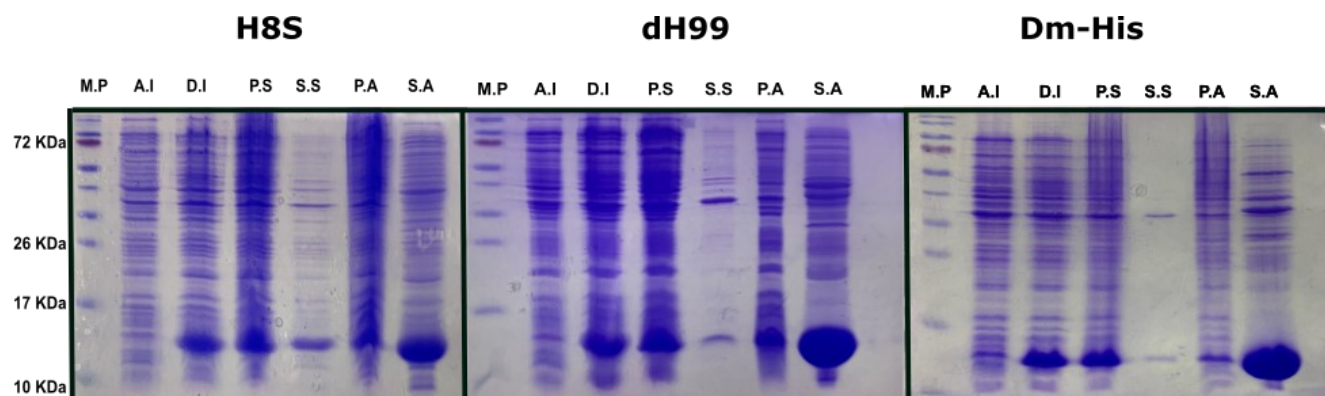


Figura 19. SDS-PAGE de la sobreexpresión de mutantes de histidinas. Gel al 14%. Los rótulos de cada pozo representan: AI: Antes de inducir; DI: después de inducir; S.S: sobrenadante de sacarosa; P.S: botón de sacarosa; P.A: botón de agua; S.A: sobrenadante de agua.

El proceso de purificación se realizó de acuerdo a lo descrito en la metodología. Como lo muestra la **Figura 20**, para cada mutante se obtuvieron fracciones suficientemente puras, las cuales, fueron utilizadas para realizar los experimentos posteriores.

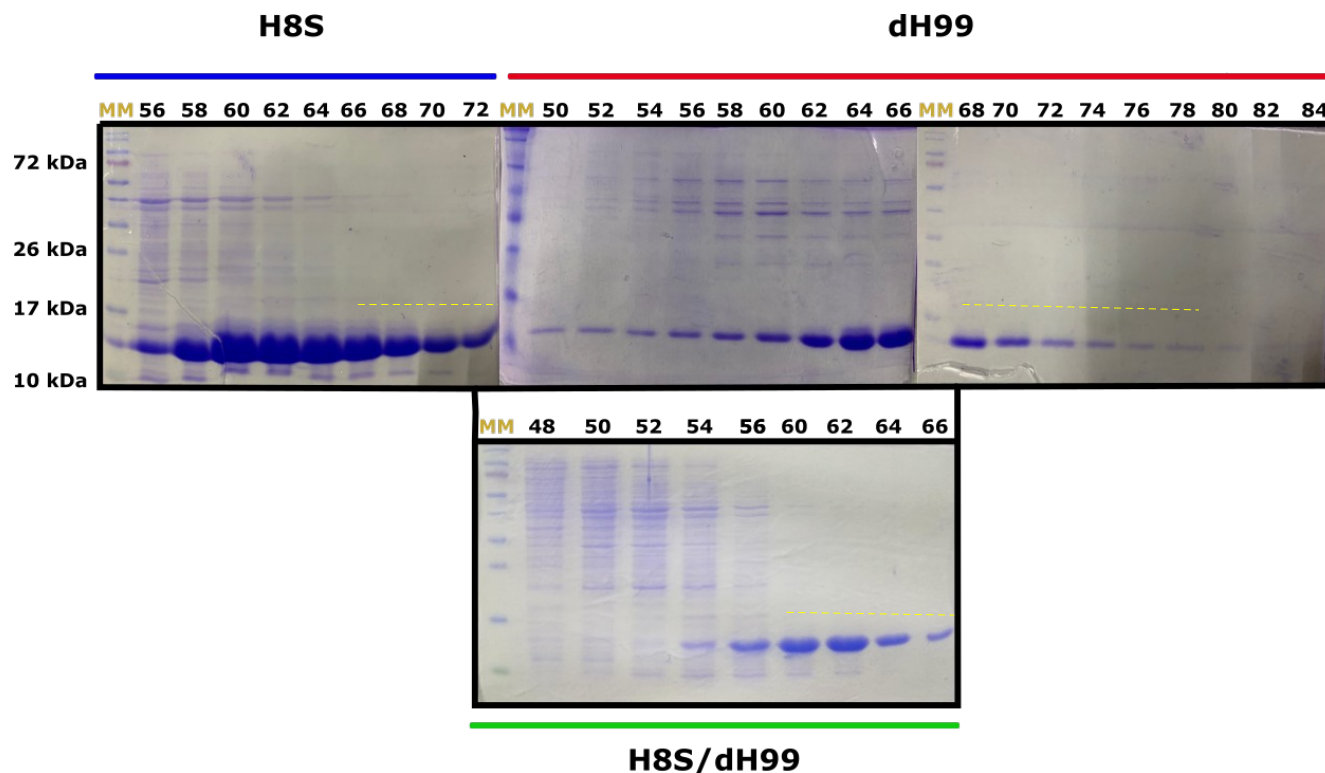


Figura 20. SDS-PAGE de la purificación de las mutantes de histidinas. Geles de las fracciones de la elución de las mutantes H8S, H99 y H8S/dH99 por una columna de exclusión molecular con flujo de 1 ml/min. La línea punteada amarilla en los geles, representa las fracciones utilizadas para los experimentos.

VII.11 Efecto de las variaciones de histidinas en la agregación y estabilidad de 6aJL2-R24G.

Utilizando la metodología descrita anteriormente, se evaluó la capacidad de formación de fibras para cada una de las mutantes. Los resultados presentados sobre la mutante H8S/dH99 son parte de la tesis de licenciatura de Alan Morales Ortiz (datos sin publicar) y se presentan en esta tesis para comparar las observaciones sobre esta proteína con lo observado para 6aJL2-R24G y las demás mutantes de histidina

Todas las proteínas agregaron como fibras amiloides con un patrón de polimerización dependiente de nucleación. En la **Figura 21** se muestran las cinéticas de formación de fibras de las mutantes comparadas con la cinética de 6aJL2-R24G. Se puede observar que las

mutaciones indujeron cambios en los tiempos lag de las cinéticas. Los tiempos lag estimados fueron 102.5 ± 16.2 min, 317.8 ± 39.42 min y 121.4 ± 46.5 min para H8S, dH99, H8S/dH99, respectivamente. El tiempo lag de la proteína 6aJL2-R24G fue de $378.6 \text{ min} \pm 45.9$. De esta reducción en tiempos lag es claro que la sustitución de la H8 por serina hace que la proteína sea más amiloidogénica, pues su tiempo lag se reduce a la mitad comparado con el de la proteína R24G. Esto se confirma en la proteína H8S/dH99 que también presentó una drástica reducción en el tiempo lag. La remoción de la H99 mostró una ligera disminución en el tiempo lag, sin embargo, al considerar los errores, los tiempos lag de 6aJL2-R24G y dH99 se sobrelapan

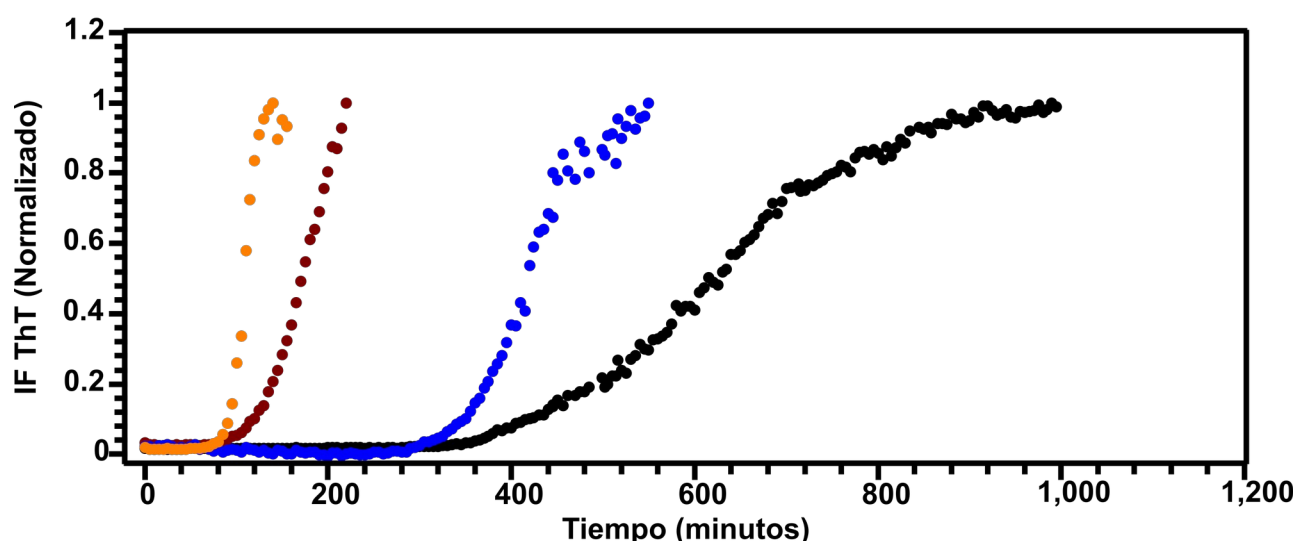


Figura 21. Formación de fibras de las mutantes de Histidinas. La imagen muestra la cinética de formación de fibras para 6aJL2-R24G, H8S, dH99 y dm-His. Todas las cinéticas se corrieron a una concentración de $100 \mu\text{M}$ de proteína en buffer MES pH 7.4, NaCl, 75 mM, en presencia de ThT $20 \mu\text{M}$.

También se evaluó la estabilidad térmica de las mutantes por fluorescencia. Como se muestra en la **Figura 22**, las curvas de desnaturalización se revelan como una sola transición cooperativa, ajustándose adecuadamente a un modelo de dos estados.

Comparando la T_m de 6aJL2-R24G (45.9°C), la proteína H8S presenta una T_m de $46.6 \pm 0.04^\circ\text{C}$, la proteína dH99 presentó una T_m de $38.69 \pm 0.51^\circ\text{C}$ y la proteína H8S/dH99

presentó una T_m de 39.0 ± 0.1 °C. Al comparar estas T_m es claro que la sustitución de la H8 por serina no afecta la estabilidad térmica de la proteína, mientras que la delección de la H99 sí hace a la proteína térmicamente más inestable, pues se observa una reducción de 7°C en la T_m . La T_m de la proteína H8S/dH99 confirma la pérdida de estabilidad térmica al remover la H99.

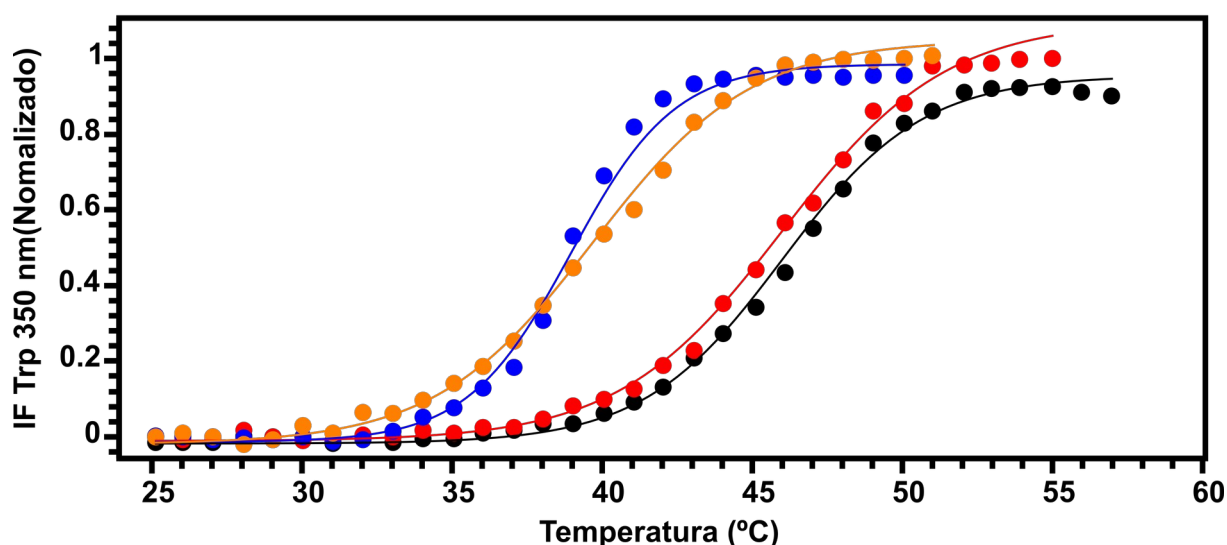


Figura 22. Desplegamiento térmico de mutantes de histidinas. Se indujo el desdoblamiento de las 6aJL2-R24G, H8S, dH99 y H8S/dH99, aumentando la temperatura de 25 a 60°C y registrando la emisión del Trp a 350nm.

VII.12 Efecto del Cu^{2+} en la agregación y estabilidad de las mutantes de histidinas

Para evaluar el efecto del Cu^{2+} en la estabilidad y amiloidogenicidad de las mutantes de histidinas, se realizaron cinéticas de formación de fibras amiloides y se determinaron las T_m de las proteínas en ausencia y presencia de Cu^{2+} .

Como se observa en la **Figura 23**, el Cu^{2+} acelera la formación de fibras amiloides en todas la mutantes. Los tiempos lag estimados se listan en la **tabla 2**. En el caso de la proteína H8S solo se observa disminución en el tiempo lag a partir de 2 equivalentes de Cu^{2+} . Para la proteína dH99 se observa disminución en el tiempo lag desde 1 equivalente, pero no se observan cambios comparado con 2 equivalentes de Cu^{2+} . En el caso de la proteína

H8S/dH99 se observa que el Cu^{2+} tiene efecto en la cinética solo a concentraciones arriba de 2 equivalentes.

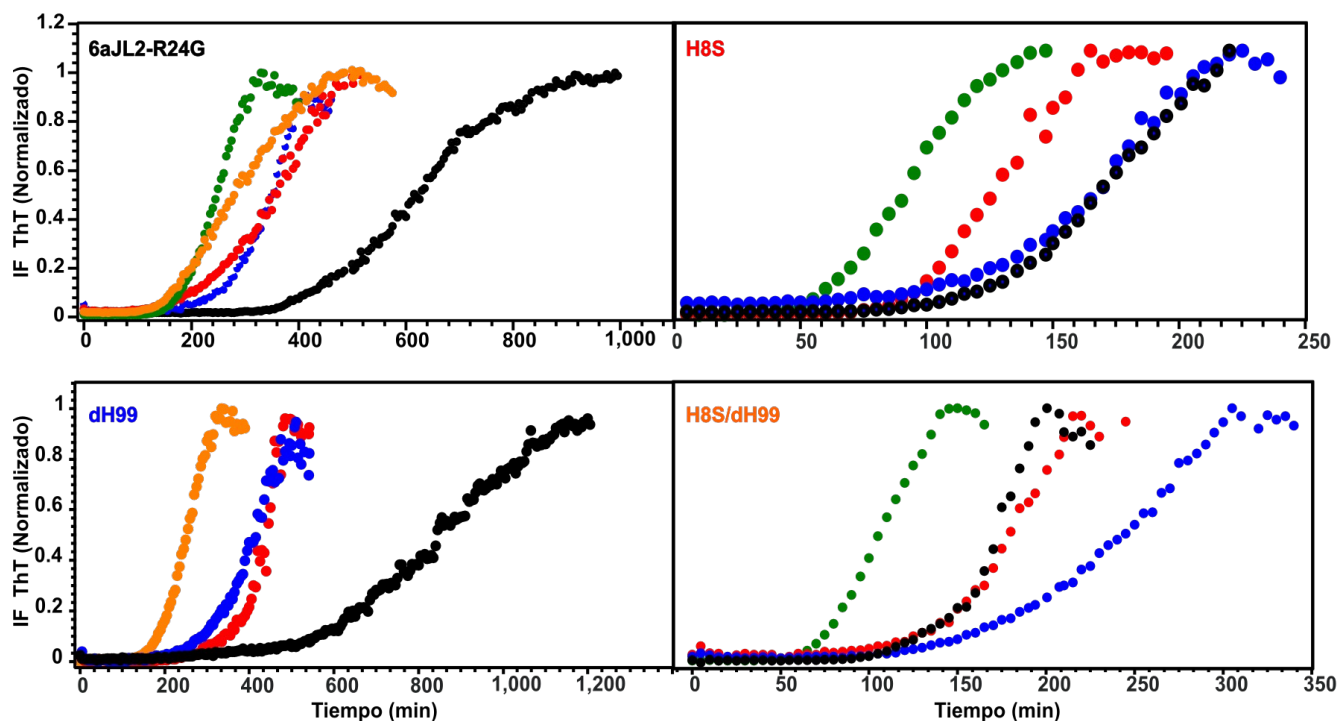


Figura 23. Cinéticas de agregación de 6aJL2-R24G y las mutantes H8S, dH99 y H8S/dH99 en presencia de Cu^{2+} . En todos los casos la cinética en negro es la proteína en ausencia de Cu^{2+} y presencia de 1, 2, 3 y 4 equivalentes de Cu^{2+} .

Tabla 2. Tiempos lag de formación de fibras amiloides.

Equivalentes Cu^{2+}	Tiempos lag (min)			
	WT	H8S	dH99	H8S/dH99
0	328.6 ± 49.9	102.8 ± 16.2	317.8 ± 39.42	121.4 ± 46.5
1	257 ± 24.6	102.8 ± 14.28	264 ± 85.6	158.2 ± 13.8
2	130 ± 31.6	91 ± 16.8	338 ± 81	152.2 ± 23.8
3	183.6 ± 26.8	52	ND	64.2 ± 8.6
4	132.3 ± 18.7	ND	163 ± 229	ND

***ND (No Disponible):** no se tienen los datos completos de las cinéticas de agregación a algunos equivalentes de Cu^{2+} debido a que la universidad cerró por contingencia COVID-19 y no fue posible completar los experimentos.

De la misma manera, los cambios en la estabilidad térmica de las proteínas en presencia de Cu^{2+} se evaluó por fluorescencia y se estimaron las T_m 's (**Figura 24 y Tabla 3**).

Se puede observar que en todas las mutantes, la adición de Cu^{2+} induce una disminución en la T_m . Sin embargo, el cambio más grande se observa en la proteína H8S al adicionar 1 equivalente de Cu^{2+} , y se puede suponer que este Cu^{2+} se está uniendo a la H99, lo cual podría significar que la unión del ión metálico a la H99 es el responsable de la mayor desestabilización térmica de la proteína. En las otras variantes, la T_m decae poco con la adición de Cu^{2+} y los cambios más grandes se observan a partir de 2 equivalentes de Cu^{2+} .

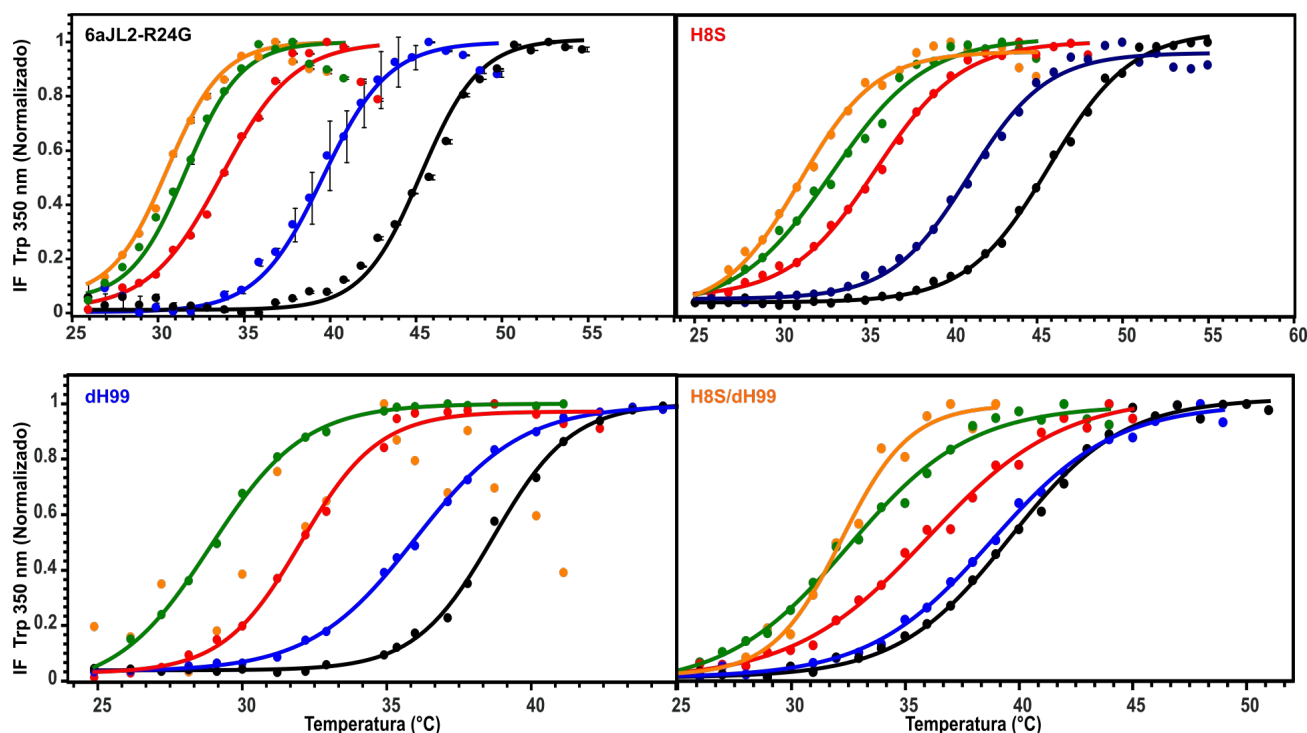


Figura 24. Cinéticas de desplegamiento de 6aJL2-R24G y las mutantes H8S, dH99 y H8S/dH99 en presencia de Cu^{2+} . En todos los casos la cinética en negro es la proteína en ausencia de Cu^{2+} y presencia de 1, 2, 3 y 4 equivalentes de Cu^{2+}

Tabla 3. T_m de las variantes de histidina en presencia de Cu²⁺

Equivalentes Cu ²⁺	T _m (°C)			
	WT	H8S	dH99	H8S/dH99
0	45.9 ± 0.08	45.5 ± 0.04	38.69 ± 0.51	39 ± 0.1
1	39.46 ± 0.15	41.6 ± 1.67	36 ± 3.70	38 ± 1.0
2	33.54 ± 0.23	35.2 ± 4.8	32 ± 1.15	34.5 ± 2.0
3	30.72 ± 0.75	32.6 ± 2.7	28.9 ± 1.44	31.2 ± 1.8
4	30.71 ± 0.43	31.1	ND*	30.8 ± 1.6

*ND: no determinada

VII.13 Efecto del Cu²⁺ en la estructura secundaria de las mutantes de histidina

Los espectros de DC en el UV lejano muestran que la proteína H8S presenta un máximo positivo a 210 nm y un pico negativo a 238 nm (**Figura 25A**), mientras que la proteína H8S/dH99 presenta un máximo a 205 y dos mínimos a 220 y 230nm (**Figura 25B**). La deconvolución de los espectros en ausencia de Cu²⁺ indican que las proteínas tienen un alto porcentaje de estructura hoja β, tal como R24G. Al realizar la titulación con Cu²⁺, se observa disminución en la intensidad de las señales desde bajos equivalentes del ión metálico. Particularmente, H8S sufre pérdida de intensidad de la banda de 238nm. Por su parte H8S/dH99 se observa menor pérdida de intensidad y la banda de 230nm desaparece a partir de 1 equivalente de Cu²⁺. Por el momento no se tiene este análisis para la mutante dH99, por que no fue posible acceder al laboratorio debido a la contingencia COVID-19.

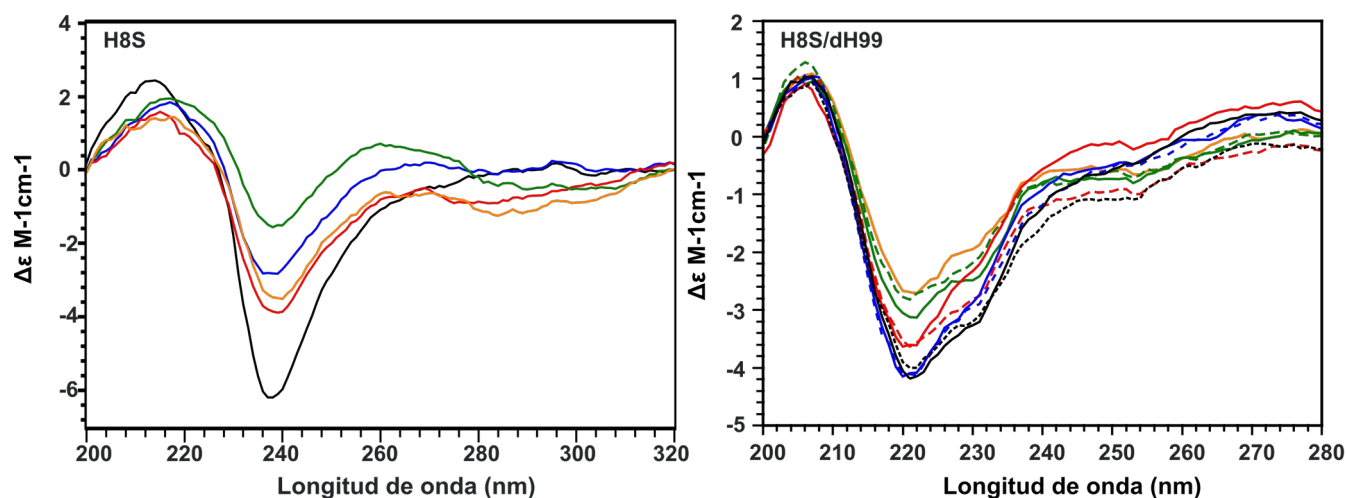


Figura 25. Cambios en la estructura secundaria de H8S y H8S/dH99. A) Titulación de H8S con Cu^{2+} seguida por DC en la región UV lejana. B) Titulación de H8S/dH99 con Cu^{2+} seguida por DC en la región UV lejana. En todos los casos, la línea negra es la proteína en ausencia de Cu^{2+} y en presencia de **1, 2, 3 y 4** equivalentes de Cu^{2+}

A pesar de todos estos cambios en los espectros, la deconvolución indica que no hay cambios en la estructura secundaria.

Tabla 4. Porcentajes de estructura secundaria de la deconvolución de los espectros de mutantes de histidinas con Cu^{2+} usando BestSel.

Equivalentes Cu^{2+}	Hoja beta antiparalela		Giro		Otros	
	H8S	H8S/dH99	H8S	H8S/dH99	H8S	H8S/dH99
0.0	44.5	44.7	13.7	14	41.5	41.4
0.5	44.6	44.7	13.6	13.9	41.8	41.4
1.0	44.7	44.7	13.6	13.9	41.8	41.4
1.5	44.6	44.7	13.6	13.9	41.8	41.4
2.0	44.5	44.6	13.6	13.9	41.6	41.5
2.5	44.5	44.7	13.6	13.8	41.7	41.4
3.0	44.5	44.7	13.6	13.8	41.7	41.5

VII.14 Titulación de las mutantes de histidinas con Cu^{2+} , seguida por dicroísmo circular y absorción electrónica.

Al igual que para la proteína con histidinas, se realizó la titulación con Cu^{2+} de las mutantes y se evaluaron los cambios por DC y absorción en la región UV-Vis. Los espectros se muestran en la **figura 26**, en todos los casos es posible apreciar la presencia de bandas LMCT y bandas d-d, lo que indica que todas las variantes unen Cu^{2+} . Las señales observadas son muy similares a las de la proteína R24G, con ligeras diferencias en energía de las bandas d-d. Este corrimiento a menores energías puede indicar que el centro metálico presenta menos nitrógenos en la esfera de coordinación (Rivillas-Acevedo et al., 2011). Los valores de energía e intensidad de cada una de las bandas observadas se listan en la **tabla 5**.

Tabla 5. Energías de los espectros de DC de la titulación de 6aJL2-R24G con Cu^{2+}

	Energía (cm^{-1}) ($\Delta\epsilon$ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$))					
Eq Cu^{2+}	6aJL2R24G			H8S		
1.0	34722 (-0.95)	29886 (0.12)	16835 (-0.30)	33862 (-0.30)	29931 (0.17)	16673 (-0.44)
2.0	34482 (-1.5)	29886 (0.21)	16835 (-0.37)	33862 (-0.49)	29931 (0.33)	16673 (-0.60)
3.0	34246 (-1.7)	29886 (0.32)	16835 (-0.37)	33603 (-0.62)	29931 (0.38)	16673(-0.60)
4.0	34246 (-2.3)	29886 (0.45)	16835 (-0.37)	33603 (-0.62)	29931 (0.38)	16673(-0.60)
	dH99			H8S/dH99		
1.0	32500 (-0.10)	29303 (0.01)	15896 (-0.20)	33000 (-0.2)	28900 (0.06)	16611 (-0.09)
2.0	33569 (-0.44)	29303 (0.12)	15896 (-0.35)	34105 (-1.0)	29000 (0.1)	16611 (-0.25)
3.0	33927 (-0.81)	29446 (0.20)	15896 (-0.50)	34000 (-1.26)	29239 (0.3)	16611 (-0.32)
4.0	34118 (-0.1)	29565 (0.28)	15598 (-0.58)	34000 (-1.8)	29239 (0.5)	16611 (-0.42)

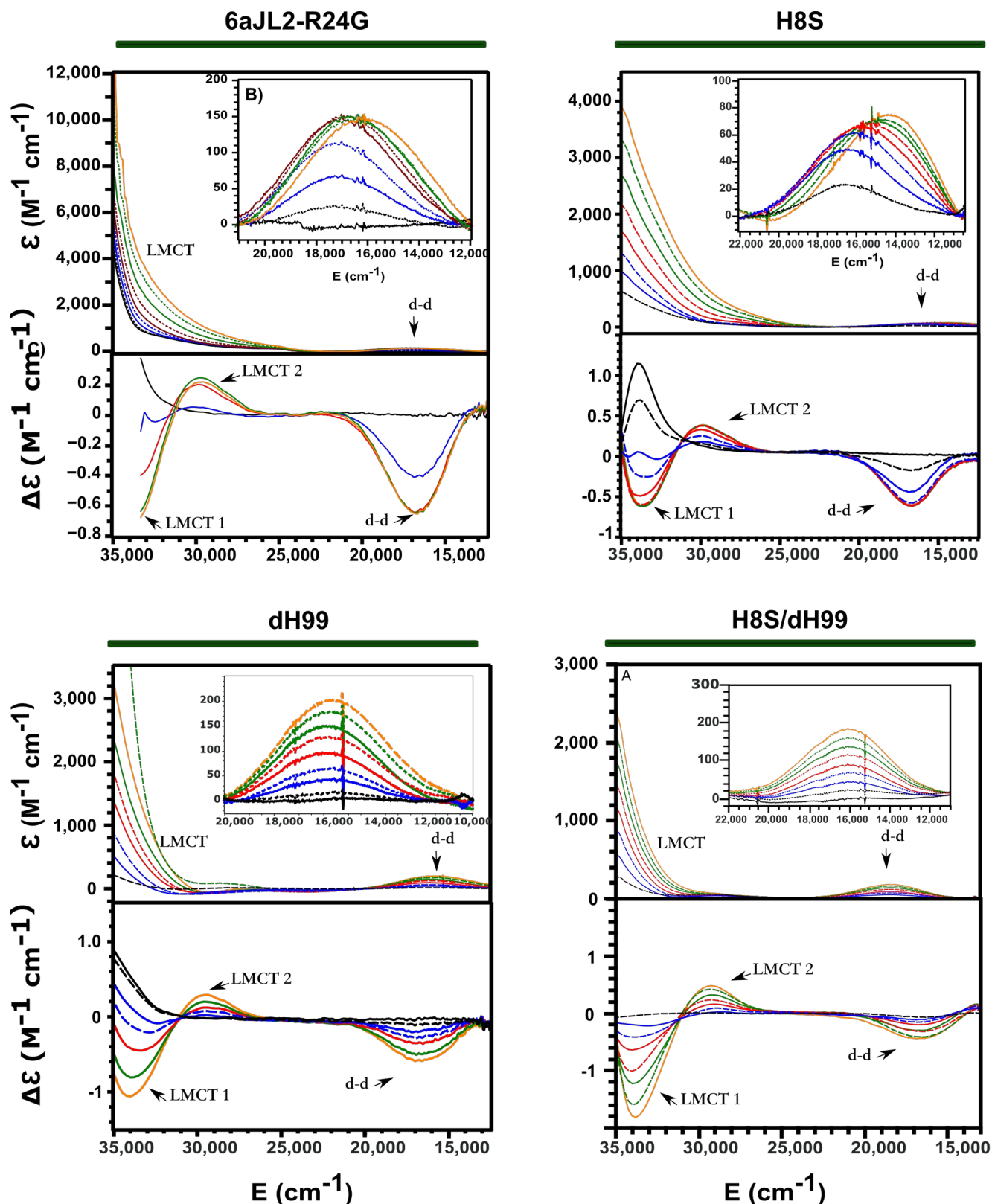


Figura 26. Titulación de las mutantes de histidinas con Cu^{2+} seguidas por absorción y DC en la región UV-Vis. En todos los casos negro es el espectro en ausencia de Cu^{2+} y en presencia de 1, 2, 3 y 4 eq de Cu^{2+} . Las líneas punteadas corresponden a titulaciones intermedias entre los equivalentes.

VIII. Discusión

• **Efecto del Cu^{2+} en la agregación de 6aJL2-R24G**

La amiloidosis de cadena ligera (AL) es la amiloidosis sistémica con mayor incidencia, originada por la deposición de fibras amiloides compuestas principalmente de dominios variables de cadenas ligeras de inmunoglobulina (Dispenzieri, Gertz, & Buadi, 2012). Dichas proteínas se ven afectadas por distintos factores que promueven perturbaciones estructurales que conducen a la formación de fibras amiloides, entre ellos: mutaciones (Hurle, Helms, Li, Chan, & Wetzel, 1994), estrés oxidativo (Hu, Qin, Xue, Fink, & Uversky, 2008; Nieva et al., 2008) e incluso interacciones con ligandos de matriz extracelular como glicosaminoglicanos (Martin & Ramirez-Alvarado, 2011)

El rol de los iones metálicos en la toxicidad y agregación de las proteínas tanto *in vivo* como *in vitro* ha sido ampliamente estudiado en diversos sistemas como Alzheimer (Rana & Sharma, 2019), diabetes mellitus II (Rivillas-Acevedo, Sánchez-López, Amero, & Quintanar, 2015b), amiloidosis relacionada a diálisis (Morgan et al., 2001), Parkinson (Binolfi et al., 2006), Creutzfeldt-Jakob (Davies et al., 2016), y cataratas (Quintanar et al., 2016), por citar algunos. De los iones metálicos divalentes más estudiados, el cobre es considerado un factor de alto riesgo en enfermedades de mal plegamiento de proteínas. Sin embargo, hasta la fecha no hay estudios reportados sobre el impacto de iones metálicos en la fisiopatología de la amiloidosis de cadena ligera.

El Cu^{2+} es un oligoelemento necesario para una amplia variedad de reacciones enzimáticas, críticas para la mayoría de las células vivas y para las funciones de un número cada vez mayor de otras proteínas, especialmente en los mamíferos (Tapiero, Townsend, & Tew, 2003). Varios reportes indican que la ceruloplasmina es la principal proteína que une cobre en el torrente sanguíneo (Hirano et al., 2005; Sato & Gitlin, 1991), en conjunto con la albumina y transcupreína, que son las principales proteínas de reserva de cobre plasmático, y las primeras en ser afectadas por alteraciones en la homeostasis, liberando el ión metálico al torrente sanguíneo (Ellingsen, Birk Moller, & Aaseth, 2014; C. Linder, 1996; M. C. Linder, 2020). Se han identificado pacientes con hipercupremia asociada a mieloma múltiple, cuyos iones metálicos no fueron identificados unidos ni a albumina ni a ceruloplasmina, si no una

IgG₁ (proteína asociada a mieloma), específicamente en la región de las cadenas ligeras tipo λ y en otras investigaciones lo han reportado en cadenas ligeras tipo κ (Goodman, Rodgeron, & Kauffman, 1967; Hultquist & Grant, 1978; LINDGARDE & ZETTERVALL, 1974)

El presente trabajo establece, por primera vez, que 6aJL2-R24G, una proteína modelo en el estudio de la enfermedad de amiloidosis de cadena ligera y cuya secuencia pertenece a la línea germinal $\lambda 6$, es capaz de unir Cu^{2+} . Además, se reporta el efecto de dicha interacción. Hemos evidenciado que en 6aJL2-R24G la unión de Cu^{2+} acelera la cinética de formación de fibras amiloides. El mayor efecto se obtuvo con la adición de 1 y 2 equivalentes del ión metálico a la muestra, calculándose el tiempo lag de la cinética de formación de fibras de la proteína en ausencia de cobre en 378.6 ± 45.9 min y reduciéndose a 257.0 ± 24.6 y 183.6 ± 18.7 min, respectivamente. Con 3 y 4 equivalentes de Cu^{2+} el tiempo lag de la cinética se mantuvo alrededor de los 130 min (**Figura 8**). En todos los casos se formaron fibras amiloides maduras, confirmadas a través de la técnica de MET (**Figura 9**). Estos resultados se suman a las investigaciones del efecto del Cu^{2+} sobre proteínas amiloidogénicas, donde el efecto es similar; por ejemplo, la unión de cobre a la microglobulina, con la cual 6aJL2-R24G comparte gran similitud estructural, induce la agregación amiloide (Dong et al., 2014) y otros sistemas con gran diferencia secuencial y estructural como: prión, tau, β -amiloide (Gaggelli, Kozlowski, Valensin, & Valensin, 2006) α -sinucleína (Davies et al., 2016), y transtirretina (Wilkinson-White & Easterbrook-Smith, 2007), entre otros.

- **Efecto del Cu^{2+} sobre la estabilidad de 6aJL-R24G**

La baja estabilidad de algunas proteínas, así como el ambiente químico en el que se encuentre, puede aumentar la capacidad de formar fibras amiloides. Como se mencionó anteriormente, la estabilidad puede verse afectada por diversos factores, entre ellos la unión de ligandos, como iones metálicos. La interacción de Cu^{2+} con 6aJL2-R24G afecta considerablemente su estabilidad estructural, reduciendo hasta 16 °C su T_m , observándose la mayor perturbación en 1 y 2 equivalentes de Cu^{2+} , que reducen su T_m 6.5 °C y 12.5 °C respectivamente (**Figura 10**). Además, bajo 1 y 2 equivalentes de Cu^{2+} la proteína puede replegarse reduciendo la temperatura a 25 °C, sin embargo a 3 y 4 equivalentes no regresa al estado nativo, probablemente por la unión de Cu^{2+} a otros sitios de la proteína que impiden

dicho proceso (**Figura 11**). En conjunto, estos resultados muestran que la unión de Cu^{2+} acelera la formación de fibras para 6aJL2-R24G, posiblemente induciendo una conformación menos estable en la proteína.

- **Estudio espectroscópico de la interacción Cu^{2+} - 6aJL-R24G**

Para obtener información sobre el mecanismo por el cual Cu^{2+} afecta la agregación de 6aJL2-R24G fueron utilizadas técnicas espectroscópicas. La espectroscopía de DC es una herramienta útil para sondear interacciones cobre-proteína, ya que permite la caracterización de transiciones electrónicas asociadas con el complejo quiral resultante. A diferencia de otras cadenas ligeras, donde la unión de cobre no originó señales (Diomedea et al., 2017; Hultquist & Grant, 1978), los espectros de absorción UV-Visible y DC del complejo Cu^{2+} -6aJL2-R24G fueron detectables. Se originaron bandas LMCT y bandas *d-d* (**Figura 18**). En los espectros UV-Visible y DC de 6aJL2-R24G, las bandas *d-d* se originan a energías alrededor de 16000 cm^{-1} , parecidas a bandas observables en la interacción de cobre con cadenas ligeras tipo κ (Hifumi, Taguchi, Kato, & Uda, 2017). De acuerdo con la literatura, señales originadas a estas energías son indicativo de la interacción de Cu^{2+} con aminoácidos (Holm, Kennepohl, & Solomon, 1996)

Las bandas LMCT observadas por absorción electrónica se centran alrededor de 33000 cm^{-1} , mientras que, por DC se observa una banda negativa en 29500 cm^{-1} y una positiva en 33000 cm^{-1} , lo que coincide con las bandas características de transferencia de carga de $\text{N}^- \rightarrow \text{Cu}^{2+}$ (31000 a 34000 cm^{-1}) típica de amidas desprotonadas, $\pi_1 \rightarrow \text{Cu}^{2+}$ del imidazol (27000 a 35700 cm^{-1}) y $\pi_2 \rightarrow \text{Cu}^{2+}$ del imidazol (32500 a 40800 cm^{-1}), respectivamente (Bernarducci, Schwindinger, Hughey, Krogh-Jespersen, & Schugar, 1981; Bryce, Roeske, & Gurd, 1966).

- **Estudio termodinámico del complejo Cu^{2+} - 6aJL-R24G**

Una vez que se estableció que 6aJL2-R24G es capaz de coordinar Cu^{2+} , se determinó la afinidad de dicha unión por ITC. Los resultados evidenciaron que la proteína posee al menos 2 sitios de unión para Cu^{2+} , lo cual concuerda con los espectros de UV-Visible y DC, donde la intensidad de las bandas *d-d* se saturan en 2 equivalentes. En el termograma se percibe que

a mayores equivalentes de Cu^{2+} hay absorción de calor, de menor valor que los observados para la unión de los primeros dos equivalentes de Cu^{2+} . Esto puede ser el resultado de los primeros pasos de la agregación de la proteína o sitios de unión de Cu^{2+} con menor afinidad. Incluso, por DC observamos cambios en el voltaje a partir de 2 eq de Cu^{2+} , lo cual es atribuido a las variaciones de dispersión de luz debido a un cambio de tamaño en la partícula o en su índice refractivo (Benjwal, 2006). Esto, a su vez, podría sustentar la absorción de calor por agregación a mayores equivalentes en el termograma.

El termograma de la titulación de Cu^{2+} a 6aJL2-R24G es endotérmico, y por lo tanto, el proceso de unión es entrópicamente controlado. El cambio en la entropía de unión puede estar relacionado a varios fenómenos: 1) desolvatación de iones metálicos con ruptura de su capa de hidratación una vez que se une, 2) reordenamiento de las moléculas de agua que rodean a la proteína, 3) mayores fluctuaciones o mayor flexibilidad en otras regiones de la proteína. Los resultados de ITC permitieron estimar constantes de disociación de 0.1 μM y 0.3 μM . Estos valores se encuentran en el rango submicromolar, semejantes a las afinidades por Cu^{2+} reportadas para algunas proteínas involucradas en otras enfermedades conformacionales, tales como α -sinucleína (Uversky, Li, & Fink, 2001), β -amiloide (Qiang et al., 2017; Tõugu, Karafin, & Palumaa, 2008), prión (Wells et al., 2006) y Tau (Zweckstetter et al., 2008). Incluso, la afinidad reportada para una cadena ligera tipo κ unida a Cu^{2+} se encuentra en el mismo orden de magnitud (Hifumi et al., 2017) pero con estequiometría 1:1 (Davis et al., 2001; Hifumi et al., 2017).

- ***Caracterización del complejo Cu^{2+} - 6aJL-R24G por RMN***

De acuerdo con los datos de RMN, uno de los sitios de unión propuestos en la coordinación de Cu^{2+} es la H99. Este sitio de unión comprende la cadena lateral de H99, N1 y D95. Otro posible sitio de unión es la H8; los espectros de RMN mostraron alteraciones en S7 y otros aminoácidos alrededor de este residuo, pero no son tan evidentes como los observados al rededor de la His99. Estas alteraciones se observan desde concentraciones subestequiométricas de Cu^{2+} , lo cual podría indicar que el Cu^{2+} se une a H99 e H8 al mismo tiempo. Esta suposición está respaldada por los resultados de ITC, que arrojaron afinidades muy similares para los dos sitios de unión.

Debido a que a más de 0.5 equivalente de Cu^{2+} se perdían todas las señales del espectro de RMN, no fue posible analizar a profundidad el sitio de unión que involucra a la H8, pero los espectros arrojaron suficiente información sobre el sitio de unión al rededor de H99. La esfera de coordinación de Cu^{2+} en este sitio involucra el CDR1 y el CDR3 de 6aJL2-R24G, y está localizado exactamente en la misma posición que el primer sitio de unión a Cu^{2+} propuesto para $\beta 2\text{m}$. Para esta proteína se ha propuesto que el Cu^{2+} se une a la H31 en el estado nativo, mientras que en estados no nativos de la proteína se une en H13, H51 e H84. El sitio de unión de Cu^{2+} involucra la amina desprotonada del N-terminal, de Q2, de H31 y de D59 (Eakin et al., 2002; Srikanth, Mendoza, Bridgewater, Zhang, & Vachet, 2009).

- **Efecto estructural de 6aJL-R24G por unión a Cu^{2+}**

La unión de Cu^{2+} a la proteína la hace más inestable termodinámicamente y acelera la formación de fibras amiloides. Además, se observan cambios en el espectro de DC que no corresponden a cambios en estructura secundaria, sino a cambios conformacionales en la estructura 3D. Esta pérdida de estabilidad puede deberse a que el Cu^{2+} se está uniendo en una región crítica para la estabilidad de la proteína. Como ya se ha reportado, la sustitución R24G hace a la proteína más amiloidogénica pues se pierde una interacción entre la región CDR1 y CDR3 estabilizado por R24 (Luis Del Pozo Yauner et al., 2008). Al unirse el Cu^{2+} cerca de esta región, se estarían perdiendo más interacciones entre estas dos regiones y es por esta razón disminuye la estabilidad de la proteína. Para evaluar esta hipótesis, se corrieron simulaciones de dinámica molecular en colaboración con la Dra. Nina Pastor. Durante las simulaciones de los complejos, se observa decaimiento de puentes de hidrógeno e incremento del radio de giro, lo que significa que la proteína está siendo desestabilizada por la unión a Cu^{2+} (**Figura A27 a y b**). La unión del Cu^{2+} a H8 y H99 incrementa las fluctuaciones en las asas EF y en las asas que conectan las hebras A-B y C-C', lo cual explica que la proteína forme fibras amiloides más rápido y presente T_m 's menores cuando se adicionan 2 equivalentes de Cu^{2+} . Este equilibrio en la dinámica del asa C' y del asa EF se ha demostrado que ocurre también en la proteína nativa 6aJL2 bajo pH ácidos (Velázquez-López et al., 2018).

Como se ha mencionado a lo largo de esta investigación, el cobre actúa como un cofactor importante en proteínas relacionadas en enfermedades de mal plegamiento, pudiendo acelerar o retrasar el plegamiento incorrecto de las proteínas y la tasa de agregación *in vitro*. En algunas proteínas dentro de este grupo, la interacción de Cu^{2+} disminuye el porcentaje de estructura secundaria, induciéndolas a la agregación, como por ejemplo, a la proteína prión (Younan et al., 2011), a la β 2-microglobulina (Deng, Yan, Singh, & Cieplak, 2006) y la γ -D cristalina (Quintanar et al., 2016). En otros sistemas como amilina (Article et al., 2016) o GAPR-1 (Sheng, Olich, Geerts, Kaloyanova, & Helms, 2019) la interacción con el ion metálico no afecta su estructura secundaria. El espectro de DC de 6aJL2-R24G, en la región UV lejana, mostró que durante la titulación con Cu^{2+} la estructura secundaria de la proteína no cambia, sin embargo se pierde la señal a 230 nm. Esta señal es una característica de la proteína 6aJL-R24G se ha propuesto que es originada por cadenas laterales de residuos aromáticos, en particular, tirosinas y triptófano (Baden et al., 2008). La proteína posee un grupo de tirosinas cercano a H99 e H8, por lo tanto, la unión de Cu^{2+} podría inducir una reorganización de estas tirosinas. Esto se evaluó por dinámica molecular y se encontró que la Y33 está localizada al final del CDR1 y está conectada con el asa del CDR2, que contiene a la Y50. Por lo tanto, de acuerdo con los datos de dinámica molecular y el espectro de DC, la unión de Cu^{2+} a 6aJL2-R24G podría alterar varias cadenas laterales de tirosinas llevando a cambios en la señal a 230 nm (**Figura B30**).

Se sabe que los principales sitios de unión para Cu^{2+} son las cadenas laterales de histidina y cisteína, además del grupo amino del N-terminal. A menudo también se ven involucradas cadenas laterales de metioninas y grupos COO^- del ácido aspártico y glutamina. Las amidas desprotonadas junto a las histidinas también están involucradas, ya que las histidinas funcionan como ancla para los iones metálicos (Hureau & Dorlet, 2012).

- ***Efecto del Cu^{2+} sobre 6aJL-R24G en ausencia de histidinas***

Para evaluar si el Cu^{2+} se une a los dos sitios propuestos se prepararon tres mutantes de histidinas, H8S, dH99 y H8S/dH99. Ninguna de las variaciones indujo cambios en la estructura secundaria de la proteína. Sin embargo, la sustitución de H8S hizo a la proteína más amiloidogénica, aunque no cambió la T_m . Esto está en concordancia con lo observado

para la proteína 6aJL2-H8S (Hernández-Santoyo et al., 2010). La H8 se encuentra en el N-Terminal de la proteína, cadena A, que se ha reportado como un sitio antiagregación importante (Nowak, 2004; O’Nuallain et al., 2007) y mutaciones en esta zona pueden promover la agregación. En el caso de la mutación H8S posiblemente pudiera llegar a perturbar puentes de hidrógeno a través de las cadenas A-G, observadas en 6aJL2 durante simulaciones (Del Pozo-Yauner et al., 2014; Valdés-García et al., 2017).

Por el contrario, la remoción de la H99 no afectó la fase lag de la proteína, sin embargo se ve afectada la velocidad de crecimiento de las fibras, además disminuyó su estabilidad térmica. La H99 se encuentra al inicio del segmento de unión entre el dominio variable y constante de la cadena ligera de inmunoglobulina, JL2, y se encuentra en el asa que conforma el CDR3 (Maya-Martinez et al., 2015). El asa CDR3 se caracteriza por ser una región altamente dinámica tanto en cadenas κ como en λ , por lo tanto, cambios en esta zona pudieran alterar la estabilidad de la misma (Blancas-Mejía et al., 2018b; Valdés-García et al., 2017). Además, estructuras cristalográficas y de RMN, muestran posibles interacciones polares entre la cadena principal de H99 y D95 y la cadena lateral de H99 con la cadena principal de V100. Así, si se elimina la H99 se alterarían dichas interacciones y esto podría contribuir a la reducción en la estabilidad de la proteína. Finalmente, la mutante H8S/dH99 mostró características de ambas proteínas: reducción de su estabilidad térmica; posiblemente debido a la delección de H99, y aumento de la amiloidogenicidad, tal vez resultado de la mutación H8S.

Al evaluar el efecto del Cu^{2+} en la estabilidad térmica y amiloidogenicidad de las mutantes de histidina se observó que la adición de 1 eq de Cu^{2+} a las tres mutantes no afecta significativamente la cinética de formación fibras. Sin embargo, sí afecta la estabilidad térmica de la mutante H8S, y parece no afectar la estabilidad térmica de las demás mutantes. Esto indica que la unión de Cu^{2+} a la H99 promueve el desplegamiento de la proteína con mayor eficiencia. Esto coincide con lo observado en las dinámicas moleculares del complejo Cu^{2+} -6aJL2-R24G, que indica que la unión del ion metálico a H99 aumenta las fluctuaciones del carbono alfa de la cadena principal, específicamente en las regiones del asa C” y el CDR1 debido a pérdida de interacciones con el CDR3 (**Figura A28 y A29**). Estos resultados concuerdan con reportes anteriores que resaltan la importancia del asa C”, que como se ha

mencionado antes, pertenece a una región anti agregación de los dominios variables (L. Del Pozo Yauner, Ortiz, & Becerril, 2006; González-Andrade et al., 2013c; Pokkuluri et al., 1999; Richardson & Richardson, 2002; Valdés-García et al., 2017).

Al adicionar 2eq de Cu^{2+} la T_m de H8S se redujo 11 °C mientras que las T_m de dH99 y H8S/dH99 se redujeron 6 y 4 °C. Por otro lado, las cinéticas de formación de fibras se aceleran ligeramente para H8S y dH99, y no cambian para H8S/dH99. Esto indica que además de los sitios de unión H8 y H99, el Cu^{2+} puede unirse a otras regiones de la proteína. Esto está en concordancia con lo observado en las titulaciones seguidas por absorción y DC, en donde se observan juegos de señales en las 3 mutantes, indicando que las histidinas no son los únicos sitios de unión. En el caso de la proteína H8S/dH99 se observan señales de menor intensidad y bandas *d-d* de menor energía, lo cual indica interacciones de campo ligando menores, usualmente indicativos de coordinación con menor cantidad de ligandos nitrógeno. A 3 y 4 eq de Cu^{2+} se observó nuevamente una reducción significativa del tiempo lag, lo que sugiere que cambios conformacionales y/o dinámica de la proteína después de la unión de 2 eq de Cu^{2+} y en ausencia de histidinas pudieran exponer nuevos sitios de unión para el ión metálico contribuyendo a la pérdida de la estabilidad y a la propensión a formar fibras amiloides.

Por otra parte, los resultados de calorimetría para H8S/dH99 muestran afinidad por Cu^{2+} de 0.1 mM (6aJL2-R24G; $Kd1= 0.1 \mu\text{M}$, $Kd2= 0.3 \mu\text{M}$) (Morales, 2019). Por lo tanto, la proteína sin histidinas H8 y H99 es capaz de unir Cu^{2+} , pero con menor afinidad.

Histidina, el aminoácido comúnmente involucrado en la unión de Cu^{2+} , es un residuo poco común en las secuencias de Ig de línea germinal, incluso en algunas líneas germinales la presencia de 2 histidinas en un único dominio variable es muy raro (Davis et al., 2001). De acuerdo con la base de datos ALbase (<http://albase.bumc.bu.edu/aldb>), H8 esta altamente conservada (94%) entre las cadenas $\lambda 6a$ de pacientes e individuos sanos, mientras que H99 esta presente en el 27% de ellas y menos conservada en individuos sanos, ésto posiblemente debido a que se encuentra en la unión entre los segmentos genéticos de dominio variable y el segmento de unión al dominio constante (**Figura C31**).

- ***Posible efecto del Cu^{2+} sobre fibras amiloides la proteína***

Recientemente se han reportado dos estructuras por crio-microscopía electrónica de fibras amiloides formadas por cadenas ligeras de inmunoglobulina, las cuales, fueron aisladas de pacientes: una del subtipo $\lambda 1$ (Rademaker et al., 2019), cuya secuencia carece de histidinas y otra del subtipo $\lambda 6$ (Swuec et al., 2019), la cual posee en su secuencia ambas histidinas (H8 y H99), y además incluye la mutación R24G. Se ha propuesto que para formar las fibras amiloides partiendo desde cadenas ligeras de inmunoglobulina es necesario el desplegamiento de la proteína (Rudiño-Piñera et al., 2019). En la reciente estructura por crio-microscopía electrónica de la fibra amiloide del subgrupo $\lambda 6$, se observan interacciones que no se encuentran en el estado plegado nativo, contrario a lo que sugiere otro reporte, donde se propone el ensamblaje de monómeros en la formación de fibras en las cadenas ligeras (Hernández-Santoyo et al., 2010). La estructura de la fibra amiloide determinada por crio-microscopía está compuesta por dos segmentos que forman el corazón interno de la fibra. El primer segmento en forma de “caparazón de caracol” es formado por las hebras $\beta 1$ – $\beta 5$ que comprende del N-terminal hasta la Y37. El segundo segmento en forma de “C” rodea al primer segmento y lo conforman las hebras $\beta 6$ – $\beta 9$, las cuales contienen los residuos S66 al G105. La H8 se encuentra en un tramo del N-terminal localizada en la fibra amiloide en el giro entre $\beta 1$ – $\beta 2$, mientras que, H99, localizada en el CDR3 (Gln92-Val101) en la proteína nativa junto con CDR1 (Thr23-Gln35), contribuyen a la formación del núcleo estructurado de la fibra. Otro residuo importante en la estabilización de la fibra y que también es propuesto en la interacción de Cu^{2+} en 6aJL2-R24G es el Asp95, cuyo puente salino con Lys16, alivian la repulsión electrostática en la estructura fibrilar. Estas evidencias estructurales de la fibras amiloide $\lambda 6$ podría sugerir que la unión de Cu^{2+} a ambas histidinas además de desestabilizar la estructura nativa de la proteína y la propensión a la agregación, podría contribuir a interacciones moleculares que estabilizan el ensamblaje de las fibras amiloides. (Swuec et al., 2019).

Nuestros hallazgos no implican que la unión de Cu^{2+} sea una causa clínica común de amiloidosis de cadena ligera. Más bien la yuxtaposición de dos histidinas y residuos que ayuden a formar el sitio de unión, proporciona un ejemplo de ganancia de función fortuita, como resultado de la diversificación natural del repertorio de anticuerpos. Aunque no hay

evidencias del papel de los iones metálicos en el desarrollo de la enfermedad, es bien sabido que todos los órganos y tejidos tienen eficientes mecanismos homeostáticos para prevenir la descompartmentalización anormal de iones metálicos. Sin embargo, la pérdida de homeostasis es observada en varias enfermedades neurodegenerativas, y los niveles anormales de iones metálicos podrían conducir a un comportamiento errático de las proteínas. Además, los niveles de Cu^{2+} y Zn^{2+} están alterados en la diabetes mellitus tipo 2, sugiriendo el vínculo entre la homeostasis de iones metálicos y la diabetes. Por lo tanto, si se pierde el control homeostático, puede haber una interacción anormal metal-proteína *in vivo*, lo cual conduce a un estado patológico. En el entorno adecuado, está comprobado que una inmunoglobulina puede coordinar iones metálicos, por lo tanto esto pudiera contribuir a la enfermedad como en los sistemas ya mencionados.

IX. Conclusiones.

- 1.** El ion metálico Cu^{2+} es capaz de unirse a 6aJL2-R24G en estequiometría 2:1, presentado un sitio de menor y otro de mayor afinidad (rango submicromolar). Dicho proceso de unión es favorecido entrópicamente.
- 2.** La unión de Cu^{2+} a 6aJL2-R24G promueve la agregación amiloidogénica de dicha proteína, posiblemente, induciendo desestabilización de la estructura terciaria por unión a H8 y H99, afectando redes de contactos por dicha interacción.
- 3.** La interacción Cu^{2+} /6aJL2-R24G no induce cambio en la estructura secundaria de la proteína.
- 4.** La H8 y H99 en 6aJL2-R24G son residuos importantes en la agregación amiloidogénica de la proteína inducida por Cu^{2+} , sin embargo no son los únicos sitios posibles para la coordinación.

X. Perspectivas

- Continuar con la caracterización espectroscópica de la unión del Cu^{2+} con 6aJL-R24G y 6aJL2 empleando la técnica de Resonancia Paramagnética electrónica, la cual proporcionará información importante sobre la estructura electrónica y geométrica del complejo metal-proteína.
- Continuar con el estudio termodinámico de las mutantes H8S y dH99 en presencia de Cu^{2+}
- Realizar mutagénesis en residuos en la vecindad de H99 para determinar el sitio de anclaje con menor afinidad.
- Determinar la estructura tridimensional del complejo 6aJL2-R24G- Cu^{2+}
- Estandarizar el efecto del Zn^{2+} en la agregación de 6aJL2 y 6aJL2-R24G por medio de técnicas como fluorescencia, ITC, CD, TEM y RMN.

XI. Referencias

- Abraham, R. S., Geyer, S. M., Price-Troska, T. L., Allmer, C., Kyle, R. A., Gertz, M. A., & Fonseca, R. (2003). Immunoglobulin light chain variable (V) region genes influence clinical presentation and outcome in light chain-associated amyloidosis (AL). *Blood*, 101(10), 3801–3808. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-09-2707>
- Al-Mashikhi, S. A., Li-Chan, E., & Nakai, S. (1988). Separation of Immunoglobulins and Lactoferrin from Cheese Whey by Chelating Chromatography. *Journal of Dairy Science*, 71(7), 1747–1755. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(88\)79741-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(88)79741-6)
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell* (4th ed.). New York: Garland Science.
- Alghrably, M., Czaban, I., Jaremko, Ł., & Jaremko, M. (2019). Interaction of amylin species with transition metals and membranes. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 191(November 2018), 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2018.11.004>
- Anfinsen, C. B. (1972). The formation and stabilization of protein structure. *The Biochemical Journal*, 128(4), 737–749. <https://doi.org/10.1042/bj1280737>
- Astbury, W. T., Dickinson, S., & Bailey, K. (1935). The X-ray interpretation of denaturation and the structure of the seed globulins. *Biochemical Journal*, 29(10), 2351-2360.1. <https://doi.org/10.1042/bj0292351>
- Audas, T. E., Audas, D. E., Jacob, M. D., Ho, J. J. D., Khacho, M., Wang, M., Lee, S. (2016). Adaptation to Stressors by Systemic Protein Amyloidogenesis. *Developmental Cell*, 39(2), 155–168. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.09.002>
- Baden, E. M., Owen, B. A. L., Peterson, F. C., Volkman, B. F., Ramirez-Alvarado, M., & Thompson, J. R. (2008). Altered dimer interface decreases stability in an amyloidogenic protein. *Journal of Biological Chemistry*, 283(23), 15853–15860. <https://doi.org/10.1074/jbc.M705347200>
- Bai, Y. (1999). Kinetic evidence for an on-pathway intermediate in the folding of cytochrome c. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(2), 477–480. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.2.477>
- Baldwin, R. L. (1996). On-pathway versus off-pathway folding intermediates. *Folding and Design*, 1(1), R1–R8. [https://doi.org/10.1016/S1359-0278\(96\)00003-X](https://doi.org/10.1016/S1359-0278(96)00003-X)
- Bauer, R., Müller, A., Richter, M., Schneider, K., Frey, J., & Engelhardt, W. (1997). Influence of heavy metal ions on antibodies and immune complexes investigated by dynamic light scattering

- and enzyme-linked immunosorbent assay. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1334(1), 98–108. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(96\)00078-5](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(96)00078-5)
- Benjwal, S. (2006). Monitoring protein aggregation during thermal unfolding in circular dichroism experiments. *Protein Science*, 15(3), 635–639. <https://doi.org/10.1110/ps.051917406>
 - Benson, M., Witt, T., Bonnin, J., Matthews, B., & Abonour, R. (2011). Light chain (AL) amyloidosis in the central nervous system (CNS). *Amyloid: The Journal of Protein Folding Disorders*, 18(1), 112–113. <https://doi.org/10.3109/13506129.2011.574354041>
 - Bernarducci, E., Schwindinger, W. F., Hughey, J. L., Krogh-Jespersen, K., & Schugar, H. J. (1981). Electronic spectra of copper(II)-imidazole and copper(II)-pyrazole chromophores. *Journal of the American Chemical Society*, 103(7), 1686–1691. <https://doi.org/10.1021/ja00397a017>
 - Binolfi, A., Rasia, R. M., Bertocini, C. W., Ceolin, M., Zweckstetter, M., Griesinger, C., ... Fernández, C. O. (2006). Interaction of α -synuclein with divalent metal ions reveals key differences: A link between structure, binding specificity and fibrillation enhancement. *Journal of the American Chemical Society*, 128(30), 9893–9901. <https://doi.org/10.1021/ja0618649>
 - Blancas-Mejia, L. M., Misra, P., Dick, C. J., Cooper, S. A., Redhage, K. R., Bergman, M. R., ... Ramirez-Alvarado, M. (2018a). Immunoglobulin light chain amyloid aggregation. *Chemical Communications*, 54(76), 10664–10674. <https://doi.org/10.1039/C8CC04396E>
 - Blancas-Mejia, L. M., Misra, P., Dick, C. J., Cooper, S. A., Redhage, K. R., Bergman, M. R., ... Ramirez-Alvarado, M. (2018b). Immunoglobulin light chain amyloid aggregation. *Chemical Communications*, 54(76), 10664–10674. <https://doi.org/10.1039/C8CC04396E>
 - Blancas-Mejía, L. M., & Ramirez-Alvarado, M. (2013). Systemic Amyloidoses. *Annual Review of Biochemistry*, 82(1), 745–774. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-072611-130030>
 - Blancas-Mejia, L. M., Tellez, L. A., del Pozo-Yauner, L., Becerril, B., Sanchez-Ruiz, J. M., & Fernandez-Velasco, D. A. (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(4), 1153–1166. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.12.069>
 - Bollen, Y. J. M., Sánchez, I. E., & van Mierlo, C. P. M. (2004). Formation of On- and Off-Pathway Intermediates in the Folding Kinetics of *Azotobacter vinelandii* Apoflavodoxin †. *Biochemistry*, 43(32), 10475–10489. <https://doi.org/10.1021/bi049545m>
 - Borghesani, V., Alies, B., & Hureau, C. (2018). CuII Binding to Various Forms of Amyloid- β Peptides: Are They Friends or Foes? *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2018(1), 2. <https://doi.org/10.1002/ejic.201701374>
 - Brender, J. R., Hartman, K., Nanga, R. P. R., Popovych, N., De La Salud Bea, R., Vivekanandan, S., ... Ramamoorthy, A. (2010). Role of zinc in human islet amyloid

- polypeptide aggregation. *Journal of the American Chemical Society*, 132(26), 8973–8983. <https://doi.org/10.1021/ja1007867>
- Bryce, G. F., Roeske, R. W., & Gurd, R. N. (1966). L-histidine-containing peptides as models for the interaction of copper (II) and nickel (II) ions with sperm whale apomyoglobin. *Journal of Biological Chemistry*, 241(5), 1072–1080.
 - Bryngelson, J. D., Onuchic, J. N., Socci, N. D., & Wolynes, P. G. (1995). Funnels, pathways, and the energy landscape of protein folding: A synthesis. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 21(3), 167–195. <https://doi.org/10.1002/prot.340210302>
 - Cabrita, L. D., Dobson, C. M., & Christodoulou, J. (2010). Protein folding on the ribosome. *Current Opinion in Structural Biology*, 20(1), 33–45. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2010.01.005>
 - Carboni, E., & Lingor, P. (2015). Insights on the interaction of alpha-synuclein and metals in the pathophysiology of Parkinson's disease. *Metallomics*, 7(3), 395–404. <https://doi.org/10.1039/c4mt00339j>
 - Ch'ang, L., Yen, C., Best, L., Schell, M., & Solomon, A. (1994). Identification and chracterization of a functional human IG V germline gene. 31(I), 531–536.
 - Chaturvedi, S. K., Siddiqi, M. K., Alam, P., & Khan, R. H. (2016). Protein misfolding and aggregation: Mechanism, factors and detection. *Process Biochemistry*, 51(9), 1183–1192. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.05.015>
 - Chiti, F., & Dobson, C. M. (2017). Protein Misfolding, Amyloid Formation, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade. *Annual Review of Biochemistry*, 86(1), 27–68. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045115>
 - Clark, P. (2004). Protein folding in the cell: reshaping the folding funnel. *Trends in Biochemical Sciences*, 29(10), 527–534. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2004.08.008>
 - Clore, G. M., & Iwahara, J. (2009). Theory, Practice, and Applications of Paramagnetic Relaxation Enhancement for the Characterization of Transient Low-Population Stat(1) Clore, G. M.; Iwahara, J. Theory, Practice, and Applications of Paramagnetic Relaxation Enhancement for the Characteriza. *Chemical Reviews*, 109(9), 4108–4139. <https://doi.org/10.1021/cr900033p>
 - Cotton, F. A. (1964). Ligand field theory. *Journal of Chemical Education*, 41(9), 466–476. https://doi.org/10.1007/978-3-540-72816-0_13096
 - Davies, K. M., Mercer, J. F. B., Chen, N., & Double, K. L. (2016). Copper dyshomeostasis in Parkinson's disease: Implications for pathogenesis and indications for novel therapeutics. *Clinical Science*, 130(8), 565–574. <https://doi.org/10.1042/CS20150153>
 - Davis, D. P., Gallo, G., Vogen, S. M., Dul, J. L., Sciarretta, K. L., Kumar, A., ... Argon, Y. (2001). Both the environment and somatic mutations govern the aggregation pathway of

- pathogenic immunoglobulin light chain. *Journal of Molecular Biology*, 313(5), 1021–1034. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5092>
- Del Pozo-Yauner, L., Wall, J. S., González Andrade, M., Sánchez-López, R., Rodríguez-Ambriz, S. L., Pérez Carreón, J. I., ... Fernández-Velasco, D. A. (2014). The N-terminal strand modulates immunoglobulin light chain fibrillogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 443(2), 495–499. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.11.123>
 - Del Pozo Yauner, L., Ortiz, E., & Becerril, B. (2006). The CDR1 of the human λ VI light chains adopts a new canonical structure. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 62(1), 122–129. <https://doi.org/10.1002/prot.20779>
 - Del Pozo Yauner, Luis, Ortiz, E., Sánchez, R., Sánchez-López, R., Güereca, L., Murphy, C. L., ... Becerril, B. (2008). Influence of the germline sequence on the thermodynamic stability and fibrillogenicity of human lambda 6 light chains. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 72(2), 684–692. <https://doi.org/10.1002/prot.21934>
 - Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G., Zhu, G., Pfeifer, J., & Bax, A. (1995). NMRPipe: A multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes *. *Journal of Biomolecular NMR*, 6, 277–293.
 - Deng, N. J., Yan, L., Singh, D., & Cieplak, P. (2006). Molecular basis for the Cu²⁺ binding-induced destabilization of β 2-microglobulin revealed by molecular dynamics simulation. *Biophysical Journal*, 90(11), 3865–3879. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.064444>
 - Diomedea, L., Romeo, M., Rognoni, P., Beeg, M., Foray, C., Ghibaudi, E., ... Salmona, M. (2017). Cardiac Light Chain Amyloidosis: The Role of Metal Ions in Oxidative Stress and Mitochondrial Damage. *Antioxidants and Redox Signaling*, 27(9), 567–582. <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6848>
 - Dispenzieri, A., Gertz, M. A., & Buadi, F. (2012). What do I need to know about immunoglobulin light chain (AL) amyloidosis? *Blood Reviews*, 26(4), 137–154. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2012.03.001>
 - Dobson, C. M. (2003). Protein folding and misfolding. *Nature*, 426(6968), 884–890. <https://doi.org/10.1038/nature02261>
 - Dobson, C. M., & Karplus, M. (1999). The fundamentals of protein folding: bringing together theory and experiment. *Current Opinion in Structural Biology*, 9(1), 92–101. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(99\)80012-8](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(99)80012-8)
 - Dong, J., Joseph, C. A., Borotto, N. B., Gill, V. L., Maroney, M. J., & Vachet, R. W. (2014). Unique effect of Cu(II) in the metal-induced amyloid formation of β -2-microglobulin. *Biochemistry*, 53(8), 1263–1274. <https://doi.org/10.1021/bi4016583>

- Dorshkind, K., & Rawlings, D. J. (2018). B-Cell Development. In *Hematology: Basic Principles and Practice* (Seventh Ed). <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35762-3.00020-2>
- Eakin, C. M., Knight, J. D., Morgan, C. J., Gelfand, M. A., & Miranker, A. D. (2002). Formation of a copper specific binding site in non-native states of β -2-microglobulin. *Biochemistry*, 41(34), 10646–10656. <https://doi.org/10.1021/bi025944a>
- Eisenberg, D., & Jucker, M. (2012). The amyloid state of proteins in human diseases. *Cell*, 148(6), 1188–1203. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.022>
- Ellingsen, D. G., Birk Moller, L., & Aaseth, J. (2014). Copper. In G. F. Nodberg, B. A. Fowler, & M. Nordberg (Eds.), *Handbook on the Toxicology of Metals* (4th ed., pp. 765–786). Academic Press.
- Eschenbacher, W. L. (2007). Amyloidosis. In *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference* (pp. 1–4). <https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.60787-1>
- Exley, C., Mold, M., Shardlow, E., Shuker, B., Ikpe, B., Wu, L., & Fraser, P. E. (2012). Copper is a potent inhibitor of the propensity for human ProIAPP1-48 to form amyloid fibrils in vitro. *Journal of Diabetes Research and Clinical Metabolism*, 1(1), 3. <https://doi.org/10.7243/2050-0866-1-3>
- Fitzpatrick, A. W. P., Falcon, B., He, S., Murzin, A. G., Murshudov, G., Garringer, H. J., ... Scheres, S. H. W. (2017). Cryo-EM structures of tau filaments from Alzheimer's disease. *Nature*, 547(7662), 185–190. <https://doi.org/10.1038/nature23002>
- Fowler, D. M., Koulov, A. V, Alory-Jost, C., Marks, M. S., Balch, W. E., & Kelly, J. W. (2005). Functional Amyloid Formation within Mammalian Tissue. *PLoS Biology*, 4(1), e6. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040006>
- Gade Malmos, K., Blancas-Mejia, L. M., Weber, B., Buchner, J., Ramirez-Alvarado, M., Naiki, H., & Otzen, D. (2017). ThT 101: a primer on the use of thioflavin T to investigate amyloid formation. *Amyloid*, 24(1), 1–16. <https://doi.org/10.1080/13506129.2017.1304905>
- Gaggelli, E., Kozlowski, H., Valensin, D., & Valensin, G. (2006). Copper homeostasis and neurodegenerative disorders (Alzheimer's, prion, and Parkinson's diseases and amyotrophic lateral sclerosis). *Chemical Reviews*, 106(6), 1995–2044. <https://doi.org/10.1021/cr040410w>
- Gianni, S., Ivarsson, Y., De Simone, A., Travaglini-Allocatelli, C., Brunori, M., & Vendruscolo, M. (2010). Structural characterization of a misfolded intermediate populated during the folding process of a PDZ domain. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(12), 1431–1437. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1956>
- Goldberg, A. L. (2003). Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature*, 426(6968), 895–899. <https://doi.org/10.1038/nature02263>

- González-Andrade, M., Becerril-Luján, B., Sánchez-López, R., Ceceña-Álvarez, H., Pérez-Carreón, J. I., Ortiz, E., ... Del Pozo-Yauner, L. (2013a). Mutational and genetic determinants of λ 6 light chain amyloidogenesis. *FEBS Journal*, 280(23), 6173–6183. <https://doi.org/10.1111/febs.12538>
- González-Andrade, M., Becerril-Luján, B., Sánchez-López, R., Ceceña-Álvarez, H., Pérez-Carreón, J. I., Ortiz, E., ... Del Pozo-Yauner, L. (2013b). Mutational and genetic determinants of λ 6 light chain amyloidogenesis. *FEBS Journal*, 280(23), 6173–6183. <https://doi.org/10.1111/febs.12538>
- González-Andrade, M., Becerril-Luján, B., Sánchez-López, R., Ceceña-Álvarez, H., Pérez-Carreón, J. I., Ortiz, E., ... Del Pozo-Yauner, L. (2013c). Mutational and genetic determinants of λ 6 light chain amyloidogenesis. *FEBS Journal*. <https://doi.org/10.1111/febs.12538>
- Goodman, S., Rodgerson, D., & Kauffman, J. (1967). Hypercupremia in a patient with multiple myeloma. *J Lab Clin Med*, 1(70), 57–62.
- Goto, Y., & Hamaguchi, K. (1979). The role of the intrachain disulfide bond in the conformation and stability of the constant fragment of the immunoglobulin light chain. *Journal of Biochemistry*, 86(5), 1433–1441. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a132661>
- Greenwald, J., & Riek, R. (2010). Biology of Amyloid: Structure, Function, and Regulation. *Structure*, 18(10), 1244–1260. <https://doi.org/10.1016/j.str.2010.08.009>
- Hartl, F. U. (2002). Molecular Chaperones in the Cytosol: from Nascent Chain to Folded Protein. *Science*, 295(5561), 1852–1858. <https://doi.org/10.1126/science.1068408>
- Hartl, F. Ulrich, Dobson, C. M., Ganguly, S., Kumar, S., Rathour, K. S., Hartl, F. U., ... Wason, J. D. (2009). Protein folding and misfolding. *Nature*, 426(7356), 466–468. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2010.170>
- Hernández-Santoyo, A., del Pozo Yauner, L., Fuentes-Silva, D., Ortiz, E., Rudiño-Piñera, E., Sánchez-López, R., ... Rodríguez-Romero, A. (2010). A single mutation at the sheet switch region results in conformational changes favoring λ 6 light-chain fibrillogenesis. *Journal of Molecular Biology*, 396(2), 280–292. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.11.038>
- Hernández Reyes, J. A., Galo-Hooker, E., Ruiz-Delgado, G. J., & Ruiz-Argüelles, G. J. (2012). Systemic immunoglobulin light-chain amyloidosis (AL) in Mexico A single institution, 30-year experience. *Revista de Investigación Clínica*, 604–608.
- Hifumi, E., Taguchi, H., Kato, R., & Uda, T. (2017). Role of the constant region domain in the structural diversity of human antibody light chains. *FASEB Journal*, 31(4), 1668–1677. <https://doi.org/10.1096/fj.201600819R>
- Hirano, K., Ogihara, T., Ogihara, H., Hiroi, M., Hasegawa, M., & Tamai, H. (2005). Identification of apo- and holo-forms of ceruloplasmin in patients with Wilson's disease using

- native polyacrylamide gel electrophoresis. *Clinical Biochemistry*, 38(1), 9–12. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2004.09.008>
- Holm, R. H., Kennepohl, P., & Solomon, E. I. (1996). Structural and functional aspects of metal sites in biology. *Chemical Reviews*, 96(7), 2239–2314. <https://doi.org/10.1021/cr9500390>
 - Hu, D., Qin, Z., Xue, B., Fink, A. L., & Uversky, V. N. (2008). Effect of methionine oxidation on the structural properties, conformational stability, and aggregation of immunoglobulin light chain LEN. *Biochemistry*, 47(33), 8665–8677. <https://doi.org/10.1021/bi800806d>
 - Hultquist, E., & Grant, P. (1978). A Copper-binding from a Myeloma. 253(4), 1195–1200.
 - Hureau, C., & Dorlet, P. (2012). Coordination of redox active metal ions to the amyloid precursor protein and to amyloid- β peptides involved in Alzheimer disease. Part 2: Dependence of Cu(II) binding sites with A β sequences. *Coordination Chemistry Reviews*, 256(19–20), 2175–2187. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.03.034>
 - Hurle, M. R., Helms, L. R., Li, L. I. N., Chan, W., & Wetzel, R. (1994). A role for destabilizing amino acid replacements. *Pnas*, 91(June), 5446–5450.
 - Jackson, M., & Hewitt, E. (2017). Why are Functional Amyloids Non-Toxic in Humans? *Biomolecules*, 7(4), 71. <https://doi.org/10.3390/biom7040071>
 - Jang, H., Arce, F. T., Mustata, M., Ramachandran, S., Capone, R., Nussinov, R., & Lal, R. (2011). Antimicrobial Protegrin-1 Forms Amyloid-Like Fibrils with Rapid Kinetics Suggesting a Functional Link. *Biophysical Journal*, 100(7), 1775–1783. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.01.072>
 - Karamanos, T. K., Jackson, M. P., Calabrese, A. N., Goodchild, S. C., Cawood, E. E., Thompson, G. S., ... Radford, S. E. (2019). Structural mapping of oligomeric intermediates in an amyloid assembly pathway. *ELife*, 8. <https://doi.org/10.7554/eLife.46574>
 - Karplus, M. (2011). Behind the folding funnel diagram. *Nature Chemical Biology*, 7(7), 401–404. <https://doi.org/10.1038/nchembio.565>
 - Keller, R. (n.d.). The Computer Aided Resonance Assignment Tutorial.
 - Keller, S., Vargas, C., Zhao, H., Piszczek, G., Brautigam, C. A., & Schuck, P. (2012). High-precision isothermal titration calorimetry with automated peak-shape analysis. *Analytical Chemistry*, 84(11), 5066–5073. <https://doi.org/10.1021/ac3007522>
 - Kennelly, P. J., & Rodwell, V. W. (2018). *Harper's illustrated biochemistry* (30 th).
 - Klimtchuk, E. S., Gursky, O., Patel, R. S., Laporte, K. L., Connors, L. H., Skinner, M., & Seldin, D. C. (2010). The critical role of the constant region in thermal stability and aggregation of amyloidogenic immunoglobulin light chain. *Biochemistry*, 49(45), 9848–9857. <https://doi.org/10.1021/bi101351c>

- Knowles, T. P. J., Vendruscolo, M., & Dobson, C. M. (2014). The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(6), 384–396. <https://doi.org/10.1038/nrm3810>
- Kumar, S., & Udgaonkar, J. B. (2010). Mechanisms of amyloid fibril formation by proteins. *Current Science*, 98(5), 639–656.
- Kyle, R. A., & Gertz, M. A. (1995). Primary systemic amyloidosis: clinical and laboratory features in 474 cases. *Seminars in Hematology*, 32(1), 45–59. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/787847>
- Lee, Shin. Choi, T.S., Lee, J.W., Lee, H.J., Mun, D., Akashi, S., Lee, S., Lim, H., & Kim, H. I. (2016). *Chemical Science Structure and assembly mechanisms of toxic human islet amyloid polypeptide oligomers associated with copper* †. 5398–5406. <https://doi.org/10.1039/c6sc00153j>
- Levinthal, C. (1968). Are there pathways for protein folding? *Journal de Chimie Physique*, 65, 44–45. <https://doi.org/10.1051/jcp/1968650044>
- Linder, C. (1996). Copper biochemistry and molecular biology. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 63(5), 797S–811S. <https://doi.org/doi.org/10.1093/ajcn/63.5.797>
- Linder, M. C. (2020). Copper homeostasis in mammals, with emphasis on secretion and excretion. A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(14), 1–22. <https://doi.org/10.3390/ijms21144932>
- Lindgarde, f., & Zettervall, O. (1974). Characterization of a Calcium-Binding IgG Myeloma Protein. *Scandinavian Journal of Immunology*, 3(3), 277–285. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.1974.tb01258.x>
- Mahmood, S., Palladini, G., Sanchorawala, V., & Wechalekar, A. (2014). Update on treatment of light chain amyloidosis. *Haematologica*, 99(2), 209–221. <https://doi.org/10.3324/haematol.2013.087619>
- Maji, S. K., Perrin, M. H., Sawaya, M. R., Jessberger, S., Vadodaria, K., Rissman, R. A., ... Riek, R. (2009). Functional Amyloids As Natural Storage of Peptide Hormones in Pituitary Secretory Granules. *Science*, 325(5938), 328–332. <https://doi.org/10.1126/science.1173155>
- Martin, D. J., & Ramirez-Alvarado, M. (2011). Glycosaminoglycans promote fibril formation by amyloidogenic immunoglobulin light chains through a transient interaction. *Biophysical Chemistry*, 158(1), 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2011.05.011>
- Mathis, C. A., Mason, N. S., Lopresti, B. J., & Klunk, W. E. (2012). Development of positron emission tomography β -Amyloid plaque imaging agents. *Seminars in Nuclear Medicine*, 42(6), 423–432. <https://doi.org/10.1053/j.semnuclmed.2012.07.001>

- Maya-Martinez, R., French-Pacheco, L., Valdés-García, G., Pastor, N., & Amero, C. (2019). Different dynamics in 6aJL2 Proteins Associated with AL Amyloidosis, a Conformational Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(17). <https://doi.org/10.3390/ijms20174078>
- Maya-Martinez, R., Gil-Rodriguez, P., & Amero, C. (2015). Solution structure of 6aJL2 and 6aJL2-R24G amyloidogenics light chain proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 456(2), 695–699. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.12.044>
- Melmed, G. M. (2009). Light Chain Amyloidosis: A Case Presentation and Review. *Baylor University Medical Center Proceedings*, 22(3), 280–283. <https://doi.org/10.1080/08998280.2009.11928533>
- Merlini, G. (2017). AL amyloidosis: From molecular mechanisms to targeted therapies. *Hematology*, 2017(1), 1–12. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2017.1.1>
- Merlini, G., & Stone, M. J. (2006). Dangerous small B-cell clones. *Blood*, 108(8), 2520–2530. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-03-001164>
- Micsonai, A., Wien, F., Bulyáki, É., Kun, J., Moussong, É., Lee, Y. H., ... Kardos, J. (2018). BeStSel: A web server for accurate protein secondary structure prediction and fold recognition from the circular dichroism spectra. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W315–W322. <https://doi.org/10.1093/nar/gky497>
- Micsonai, A., Wien, F., Kernya, L., Lee, Y.-H., Goto, Y., Réfrégiers, M., & Kardos, J. (2015). Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(24), E3095–103. <https://doi.org/10.1073/pnas.1500851112>
- Millhauser, G. L. (2004). Copper Binding in the Prion Protein. *Acc Chem Res*, 37(3), 79–85. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Morales. (2019). *Efecto de los iones metálicos en la agregación de una proteína involucrada en amiloidosis de cadena ligera*.
- Morgan, C. J., Gelfand, M., Atreya, C., & Miranker, A. D. (2001). Kidney dialysis-associated amyloidosis: A molecular role for copper in fiber formation. *Journal of Molecular Biology*, 309(2), 339–345. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4661>
- Neese, F. (2013). Introduction to Ligand Field Theory. *Practical Approaches to Biological Inorganic Chemistry*, 23–51. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-56351-4.00002->
- Nieva, J., Shafton, A., Altobelli, L. J., Tripuraneni, S., Rogel, J. K., Wentworth, A. D., ... Wentworth, P. (2008). Lipid-derived aldehydes accelerate light chain amyloid and amorphous aggregation. *Biochemistry*, 47(29), 7695–7705. <https://doi.org/10.1021/bi800333s>

- Nilsson, M. R. (2004). Techniques to study amyloid fibril formation in vitro. *Methods*, 34(1), 151–160. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2004.03.012>
- Nowak, M. (2004). Immunoglobulin kappa light chain and its amyloidogenic mutants: A molecular dynamics study. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 55(1), 11–21. <https://doi.org/10.1002/prot.10606>
- O’Nuallain, B., Allen, A., Kennel, S. J., Weiss, D. T., Solomon, A., & Wall, J. S. (2007). Localization of a Conformational Epitope Common to Non-Native and Fibrillar Immunoglobulin Light Chains †. *Biochemistry*, 46(5), 1240–1247. <https://doi.org/10.1021/bi0616605>
- Oberti, L., Rognoni, P., Barbiroli, A., Lavatelli, F., Russo, R., Maritan, M., ... Ricagno, S. (2017). Concurrent structural and biophysical traits link with immunoglobulin light chains amyloid propensity. *Scientific Reports*, 7(1), 16809. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16953-7>
- Ozaki, S., Abe, M., Wolfenbarger, D., Weiss, D., & Solomon, A. (1994). Preferential expression of human lambda-light-chain variable-region subgroups in multiple myeloma, AL amyloidosis, and Waldenström’s macroglobulinemia. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 71(2), 183–189.
- Paravastu, A. K., Leapman, R. D., Yau, W. M., & Tycko, R. (2008). Molecular structural basis for polymorphism in Alzheimer’s β -amyloid fibrils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(47), 18349–18354. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806270105>
- Perfetti, V, Vignarelli, M. C., Casarini, S., Ascari, E., & Merlini, G. (2001). Biological features of the clone involved in primary amyloidosis (AL). *Leukemia*, 15(2), 195–202. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402015>
- Perfetti, Vittorio, Casarini, S., Palladini, G., Vignarelli, M. C., Klersy, C., Diegoli, M., ... Merlini, G. (2002). Analysis of V λ -J λ expression in plasma cells from primary (AL) amyloidosis and normal bone marrow identifies 3r (λ III) as a new amyloid-associated germline gene segment. *Blood*, 100(3), 948–953. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-01-0114>
- Pokkuluri, P. R., Solomon, A., Weiss, D. T., & Stevens, F. J. (1999). *chains*. 171, 165–171.
- Prasansuklab, A., & Tencomnao, T. (2013). Amyloidosis in Alzheimer’s Disease: The Toxicity of Amyloid Beta (A β), Mechanisms of Its Accumulation and Implications of Medicinal Plants for Therapy. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2013/413808>
- Qiang, W., Yau, W. M., Lu, J. X., Collinge, J., & Tycko, R. (2017). Structural variation in amyloid- β fibrils from Alzheimer’s disease clinical subtypes. *Nature*, 541(7636), 217–221. <https://doi.org/10.1038/nature20814>

- Quintanar, L., Domínguez-Calva, J. A., Serebryany, E., Rivillas-Acevedo, L., Haase-Pettingell, C., Amero, C., & King, J. A. (2016). Copper and Zinc Ions Specifically Promote Nonamyloid Aggregation of the Highly Stable Human γ -D Crystallin. *ACS Chemical Biology*, 11(1), 263–272. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.5b00919>
- Quintanar, L., & Rivillas-Acevedo, L. (2015). *Europe PMC Funders Group Biophysical Screening for the Discovery of Small-Molecule Ligands* (Vol. 1008). <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-398-5>
- Radamaker, L., Lin, Y. H., Annamalai, K., Huhn, S., Hegenbart, U., Schönland, S. O., ... Fändrich, M. (2019). Cryo-EM structure of a light chain-derived amyloid fibril from a patient with systemic AL amyloidosis. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09032-0>
- Ramirez-Alvarado, M., Barnidge, D. R., Murray, D. L., Dispenzieri, A., Marin-Argany, M., Dick, C. J., ... Leung, N. (2017). Assessment of renal response with urinary exosomes in patients with AL amyloidosis: A proof of concept. *American Journal of Hematology*, 92(6), 536–541. <https://doi.org/10.1002/ajh.24717>
- Rana, M., & Sharma, A. K. (2019). Cu and Zn interactions with A β peptides: Consequence of coordination on aggregation and formation of neurotoxic soluble A β oligomers. *Metallomics*, 11(1), 64–84. <https://doi.org/10.1039/c8mt00203g>
- Raven, E., Le Brun, N. E., McMaster, J., Reedijk, J., & Robinson, N. J. (2013). Bioinorganic chemistry. In *Dalton Transactions* (Vol. 42). <https://doi.org/10.1039/c2dt90214a>
- Richardson, J. S., & Richardson, D. C. (2002). Natural β -sheet proteins use negative design to avoid edge-to-edge aggregation. *PNAS*, 99(5), 2754–2759. <https://doi.org/10.1524/klio.1980.62.62.235>
- Rivillas-Acevedo, L., Grande-Aztatzi, R., Lomelí, I., García, J. E., Barrios, E., Teloxa, S., ... Quintanar, L. (2011). Spectroscopic and electronic structure studies of copper(II) binding to His111 in the human prion protein fragment 106-115: Evaluating the role of protons and methionine residues. *Inorganic Chemistry*, 50(5), 1956–1972. <https://doi.org/10.1021/ic102381j>
- Rivillas-Acevedo, L., Sánchez-López, C., Amero, C., & Quintanar, L. (2015a). Structural basis for the inhibition of truncated islet amyloid polypeptide aggregation by Cu(II): Insights into the bioinorganic chemistry of type II diabetes. *Inorganic Chemistry*, 54(8), 3788–3796. <https://doi.org/10.1021/ic502945k>
- Rivillas-Acevedo, L., Sánchez-López, C., Amero, C., & Quintanar, L. (2015b). Structural basis for the inhibition of truncated islet amyloid polypeptide aggregation by Cu(II): Insights into the bioinorganic chemistry of type II diabetes. *Inorganic Chemistry*, 54(8), 3788–3796. <https://doi.org/10.1021/ic502945k>

- Rodriguez, J. A., Ivanova, M. I., Sawaya, M. R., Cascio, D., Reyes, F. E., Shi, D., ... Eisenberg, D. S. (2015). Structure of the toxic core of α -synuclein from invisible crystals. *Nature*, 525(7570), 486–490. <https://doi.org/10.1038/nature15368>
- Rotilio, G. (1980). Interaction of metal ions with proteins: an overview. *Inorganica Chimica Acta*, 40, X49. [https://doi.org/10.1016/S0020-1693\(00\)92105-4](https://doi.org/10.1016/S0020-1693(00)92105-4)
- Rowińska-Zyrek, M. (2016). Coordination of Zn^{2+} and Cu^{2+} to the membrane disrupting fragment of amylin. *Dalton Transactions*, 45(19), 8099–8106. <https://doi.org/10.1039/c6dt00628k>
- Rudiño-Piñera, E., Peláez-Aguilar, Á. E., Amero, C., & Díaz-Vilchis, A. (2019). Crystal structure of 6aJL2-R24G light chain variable domain: Does crystal packing explain amyloid fibril formation? *Biochemistry and Biophysics Reports*, 20(August), 100682. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2019.100682>
- Ryšavá, R. (2019). AL amyloidosis: advances in diagnostics and treatment. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 34(9), 1460–1466. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfy291>
- Sánchez-López, C., Cortés-Mejía, R., Miotto, M. C., Binolfi, A., Fernández, C. O., Del Campo, J. M., & Quintanar, L. (2016). Copper Coordination Features of Human Islet Amyloid Polypeptide: The Type 2 Diabetes Peptide. *Inorganic Chemistry*, 55(20), 10727–10740. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.6b01963>
- Sato, M., & Gitlin, J. D. (1991). Mechanisms of copper incorporation during the biosynthesis of human ceruloplasmin. *Journal of Biological Chemistry*, 266(8), 5128–5134.
- Sheng, J., Orlachs, N. K., Geerts, W. J., Kaloyanova, D. V., & Helms, J. B. (2019). Metal ions and redox balance regulate distinct amyloid-like aggregation pathways of GAPR-1. *Scientific Reports*, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51232-7>
- Solomon, A., Frangione, B., & Franklin, E. C. (1982). Bence Jones proteins and light chains of immunoglobulins. Preferential association of the V(λ VI) subgroup of human light chains with amyloidosis AL(λ). *Journal of Clinical Investigation*, 70(2), 453–460. <https://doi.org/10.1172/JCI110635>
- Srikanth, R., Mendoza, V. L., Bridgewater, J. D., Zhang, G., & Vachet, R. W. (2009). Copper binding to β -2-microglobulin and its pre-amyloid oligomers. *Biochemistry*, 48(41), 9871–9881. <https://doi.org/10.1021/bi901172y>
- Sunde, M., & Blake, C. (1997). The Structure of Amyloid Fibrils by Electron Microscopy and X-Ray Diffraction. In *Advances in Protein Chemistry Volume 50* (pp. 123–159). [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(08\)60320-4](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60320-4)
- Swuec, P., Lavatelli, F., Tasaki, M., Papissoni, C., Rognoni, P., Maritan, M., ... Bolognesi, M. (2019). Cryo-EM structure of cardiac amyloid fibrils from an immunoglobulin light chain AL

- amyloidosis patient. *Nature Communications*, 10(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09133-w>
- Tapiero, H., Townsend, D. M., & Tew, K. D. (2003). Trace elements in human physiology and pathology. Copper. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 57(9), 386–398. [https://doi.org/10.1016/S0753-3322\(03\)00012-X](https://doi.org/10.1016/S0753-3322(03)00012-X)
 - Tõugu, V., Karafin, A., & Palumaa, P. (2008). Binding of zinc(II) and copper(II) to the full-length Alzheimer's amyloid- β peptide. *Journal of Neurochemistry*, 104(5), 1249–1259. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.05061.x>
 - Uversky, V. N., Li, J., & Fink, A. L. (2001). Metal-triggered structural transformations, aggregation, and fibrillation of human α -synuclein: A possible molecular link between parkinson's disease and heavy metal exposure. *Journal of Biological Chemistry*, 276(47), 44284–44296. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105343200>
 - Valdés-García, G., Millán-Pacheco, C., & Pastor, N. (2017). Convergent mechanisms favor fast amyloid formation in two lambda 6a Ig light chain mutants. *Biopolymers*, 107(8). <https://doi.org/10.1002/bip.23027>
 - Valiente-Gabioud, A. A., Torres-Monserrat, V., Molina-Rubino, L., Binolfi, A., Griesinger, C., & Fernández, C. O. (2012). Structural basis behind the interaction of Zn²⁺ with the protein α -synuclein and the A β peptide: A comparative analysis. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 117, 334–341. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2012.06.011>
 - Velázquez-López, I., Valdés-García, G., Romero Romero, S., Maya Martínez, R., Leal-Cervantes, A. I., Costas, M., ... Fernández Velasco, D. A. (2018). Localized conformational changes trigger the pH-induced fibrillogenesis of an amyloidogenic λ light chain protein. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1862(7), 1656–1666. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.04.014>
 - Wall, J., Schell, M., Murphy, C., Hrnčić, R., Stevens, F. J., & Solomon, A. (1999). Thermodynamic instability of human λ 6 light chains: Correlation with fibrillogenicity. *Biochemistry*, 38(42), 14101–14108. <https://doi.org/10.1021/bi991131j>
 - Wasmer, C., Lange, A., Van Melckebeke, H., Siemer, A. B., Riek, R., & Meier, B. H. (2008). Amyloid fibrils of the HET-s(218-289) prion form a β solenoid with a triangular hydrophobic core. *Science*, 319(5869), 1523–1526. <https://doi.org/10.1126/science.1151839>
 - Wechalekar, A. D., Gillmore, J. D., & Hawkins, P. N. (2016). Systemic amyloidosis. *The Lancet*, 387(10038), 2641–2654. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)01274-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01274-X)
 - Wells, M. A., Jackson, G. S., Jones, S., Hosszu, L. L. P., Craven, C. J., Clarke, A. R., ... Waltho, J. P. (2006). A reassessment of copper(II) binding in the full-length prion protein. *Biochemical Journal*, 399(3), 435–444. <https://doi.org/10.1042/bj20060458>

- Whelly, S., Johnson, S., Powell, J., Borchardt, C., Hastert, M. C., & Cornwall, G. A. (2012). Nonpathological Extracellular Amyloid Is Present during Normal Epididymal Sperm Maturation. *PLoS ONE*, 7(5), e36394. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036394>
- Wilkins, M. R., Gasteiger, E., Bairoch, A., Sanchez, J. C., Williams, K. L., Appel, R. D., & Hochstrasser, D. F. (1999). Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods in Molecular Biology*, 112, 531–552.
- Wilkinson-White, L. E., & Easterbrook-Smith, S. B. (2007). Characterization of the Binding of Cu(II) and Zn(II) to Transthyretin: Effects on Amyloid Formation †. *Biochemistry*, 46(31), 9123–9132. <https://doi.org/10.1021/bi700607z>
- Wiltzius, J. J. W., Sievers, S. A., Sawaya, M. R., Cascio, D., Popov, D., Riek, C., & Eisenberg, D. (2008). Atomic structure of the cross- β spine of islet amyloid polypeptide (amylin). *Protein Science*, 17(9), 1467–1474. <https://doi.org/10.1110/ps.036509.108>
- Yadav, P., Leung, N., Sanders, P. W., & Cockwell, P. (2015). The use of immunoglobulin light chain assays in the diagnosis of paraprotein-related kidney disease. *Kidney International*, 87(4), 692–697. <https://doi.org/10.1038/ki.2014.333>
- Yamada, M., & Naiki, H. (2012). Cerebral Amyloid Angiopathy. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385883-2.00006-0>
- Younan, N. D., Klewpatinond, M., Davies, P., Ruban, A. V., Brown, D. R., & Viles, J. H. (2011). Copper(II)-induced secondary structure changes and reduced folding stability of the prion protein. *Journal of Molecular Biology*, 410(3), 369–382. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.05.013>
- Zandomenighi, G., Krebs, M. R. H., McCammon, M. G., & Fändrich, M. (2009). FTIR reveals structural differences between native β -sheet proteins and amyloid fibrils. *Protein Science*, 13(12), 3314–3321. <https://doi.org/10.1110/ps.041024904>
- Zhao, H., Piszczek, G., & Schuck, P. (2015). SEDPHAT - A platform for global ITC analysis and global multi-method analysis of molecular interactions. *Methods*, 76, 137–148. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.11.012Z>
- Zweckstetter, M., Soragni, A., Zambelli, B., Mukrasch, M. D., Biem, J., Jeganathan, S., ... Mandelkow, E. (2008). Structural characterization of binding of Cu(II) to Tau protein. *Biochemistry*, 47(41), 10841–10851. <https://doi.org/10.1021/bi8008856>

XII. Anexos

A. Dinámica molecular del complejo Cu^{2+} -6aJL2-R24G

Durante la simulación de los complejos 6aJL2-R24G- Cu^{2+} , las propiedades globales como el número total de enlaces de hidrógeno y el radio de giro se desplazan a valores más bajos y más altos, respectivamente (**Figura 27 a y b**). Esto significa que la proteína está siendo desestabilizada por la presencia de Cu^{2+} , lo que concuerda con lo observado experimentalmente.

Con el fin de observar si las perturbaciones son localizadas o distribuidas en toda la estructura de la proteína, se calcularon los RMSF del carbono alfa (**Figura 28**). Los cuales fueron mapeados en la estructura 3D de la proteína, dichas simulaciones evidencian que, cuando el Cu^{2+} está unido al sitio alrededor de H8 (**Figura 28C**), incrementan las fluctuaciones del carbono alfa en D95, un residuo clave en la coordinación de Cu^{2+} en la H99. Mientras que, cuando el Cu^{2+} se une alrededor de la H99 (complejo Cu/H99 y Cu/H8-H99) la proteína presenta mayores fluctuaciones en CDR1 y en el loop C" (**Figura 29B y 29D**). Una región ya debilitada por la sustitución de Arg 24 por Gly que disminuye la estabilidad de la proteína debido a la pérdida de interacción entre el CDR1 y el CDR3, que en la proteína nativa está estabilizado por la Arg24 (Luis Del Pozo Yauner et al., 2008). Tomando todo lo anterior en cuenta, se puede suponer que la unión de Cu^{2+} al sitio de la H99 puede estar induciendo mayor pérdida de interacciones entre el CDR3 y el CDR1, haciendo a la proteína más propensa a formar fibras amiloides. Previos reportes han mostrado la importancia del loop C" en la estabilidad de los anticuerpos, especialmente en 6aJL2-R24G (Richardson & Richardson, 2002; Valdés-García et al., 2017).

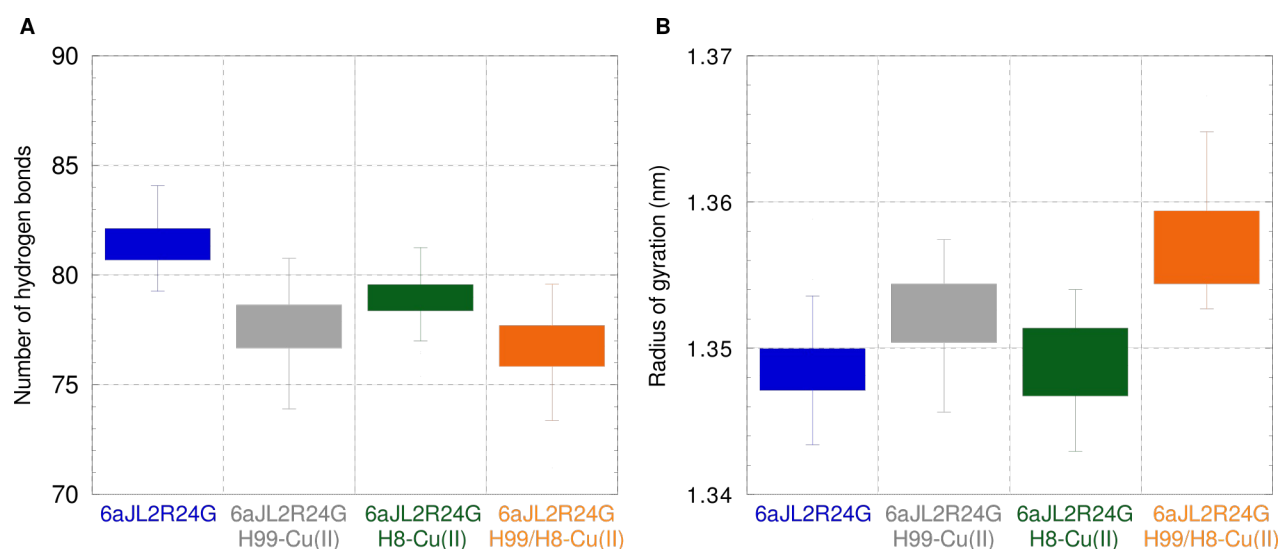


Figura A27. Propiedades conformacionales globales de los sistemas simulados. Los gráficos de barras representan el promedio para el número de enlaces de hidrógeno cada 10 ns (A) y el radio de giro (B). Las líneas grises muestran la mediana de los valores. 6aJL2-R24G solo (azul), 6aJL2R24G Cu²⁺ -His99 (gris), 6aJL2R24G Cu²⁺ -His8 (verde) y 6aJL2R24G Cu²⁺ - His99 / Cu²⁺ His8 (naranja). El análisis de Kruskal-Wallis2 mostró diferencias significativas con una $p < 0,0001$ para ambas propiedades, y un estadístico de Kruskal-Wallis de 135 y 115 para el número de enlaces de hidrógeno y el radio de giro, respectivamente.

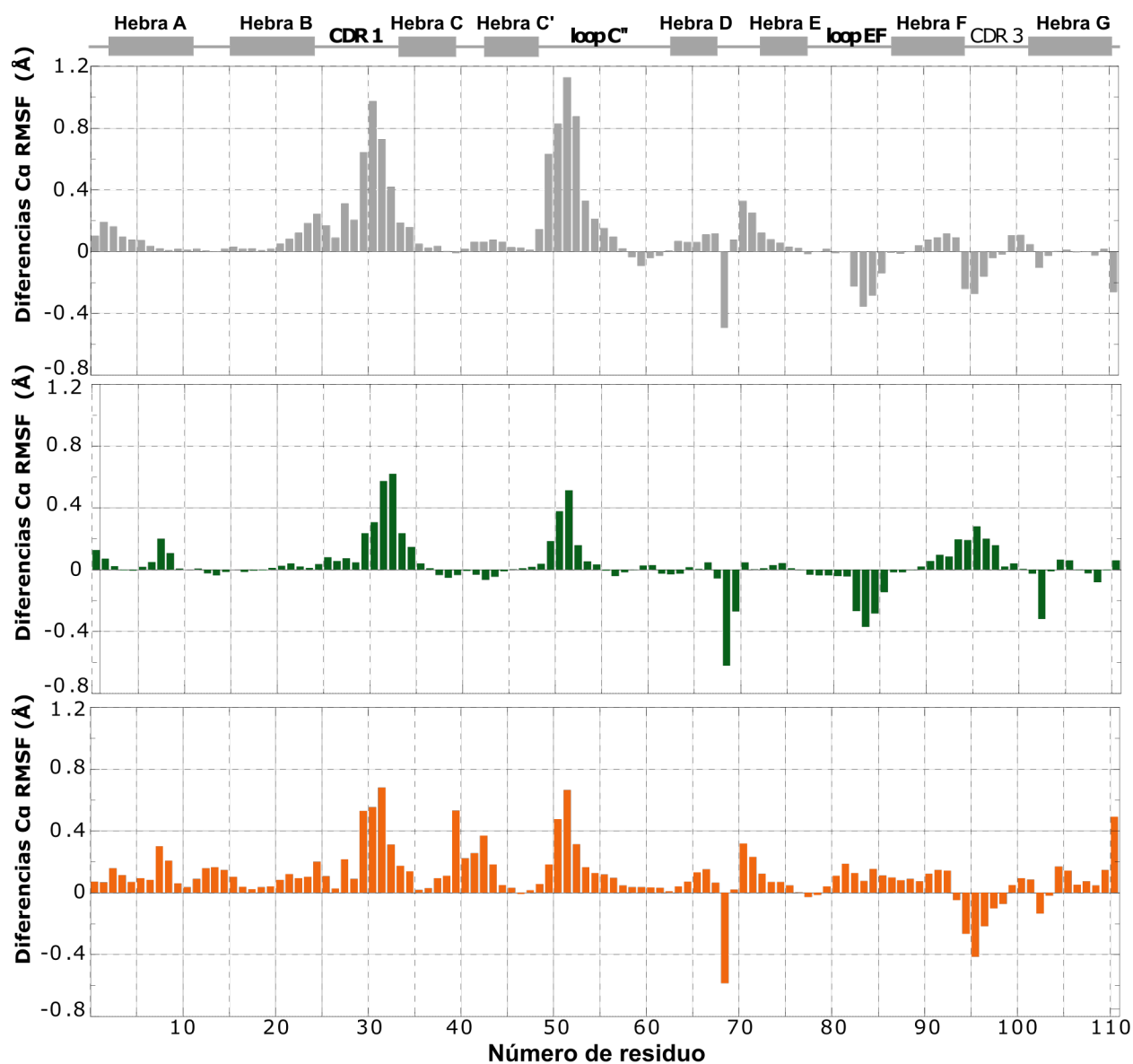


Figura A28. Diferencias en la dinámica de la cadena principal por residuo. Los valores de las fluctuaciones cuadráticas medias de carbonos alfa por residuo de 6aJL2-R24G se restaron de los complejos de Cu²⁺. Se muestran las diferencias resultantes para 6aJL2-R24G/Cu²⁺ H99, 6aJL2-R24G/Cu²⁺ H8 y 6aJL2-R24G/Cu²⁺:H99- Cu²⁺:H99. La localización de los residuos en la estructura secundaria es mostrada en la parte superior.

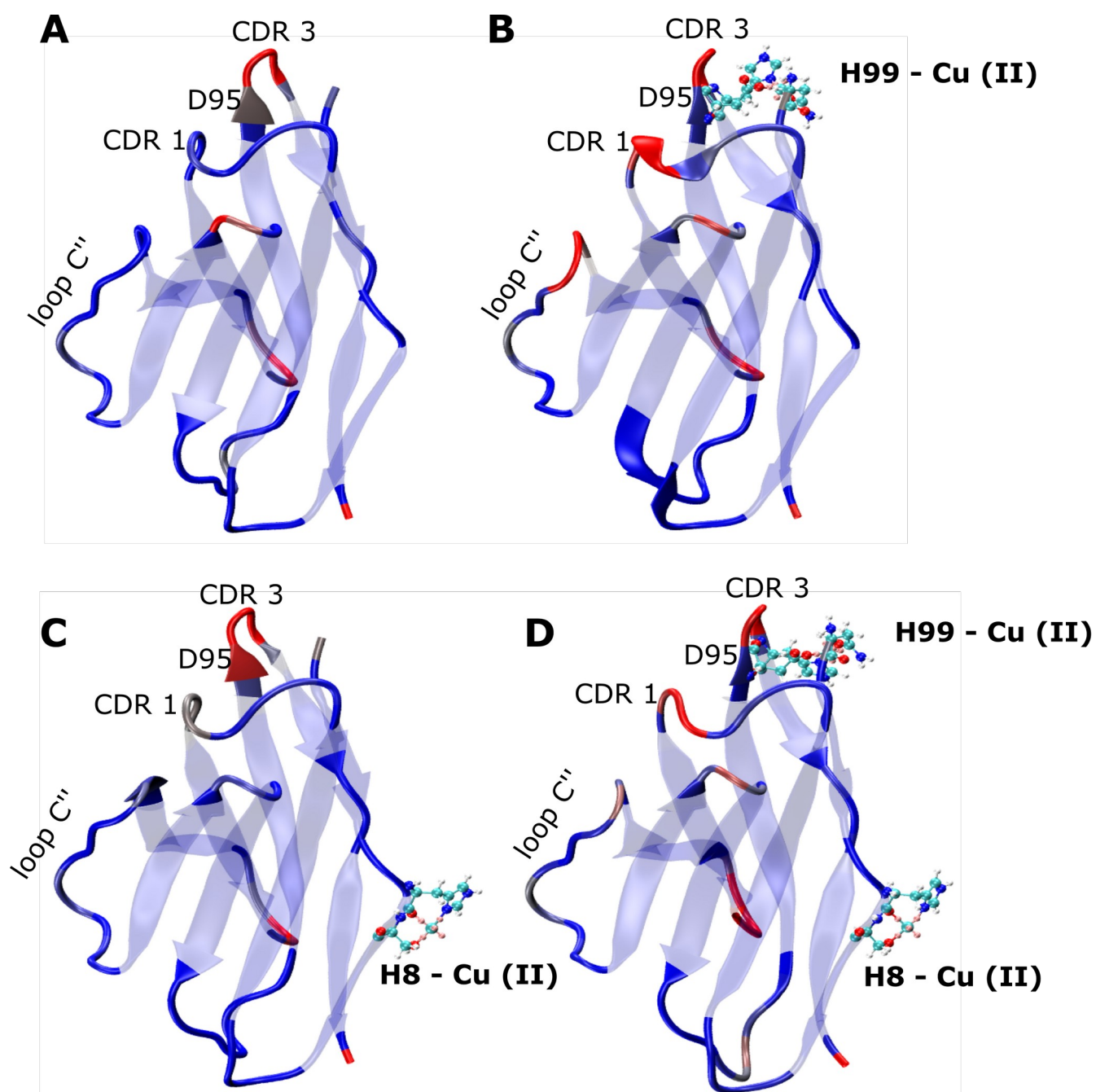


Figura A29 Valores de RMSF mapeados en la estructura 6aJL2-R24G. Los valores se calcularon para 6aJL2-R24G en ausencia (A), y presencia de Cu^{2+} -H99 (B), Cu^{2+} -H8 (C) y Cu^{2+} -H99 / Cu^{2+} -H8 (D). Las asas se muestran de color sólido, ya que mostraban los mayores cambios en la unión de Cu^{2+} . La escala de colores, azul-gris-rojo, muestra los valores de RMSF que van de bajo (azul) a alto (rojo).

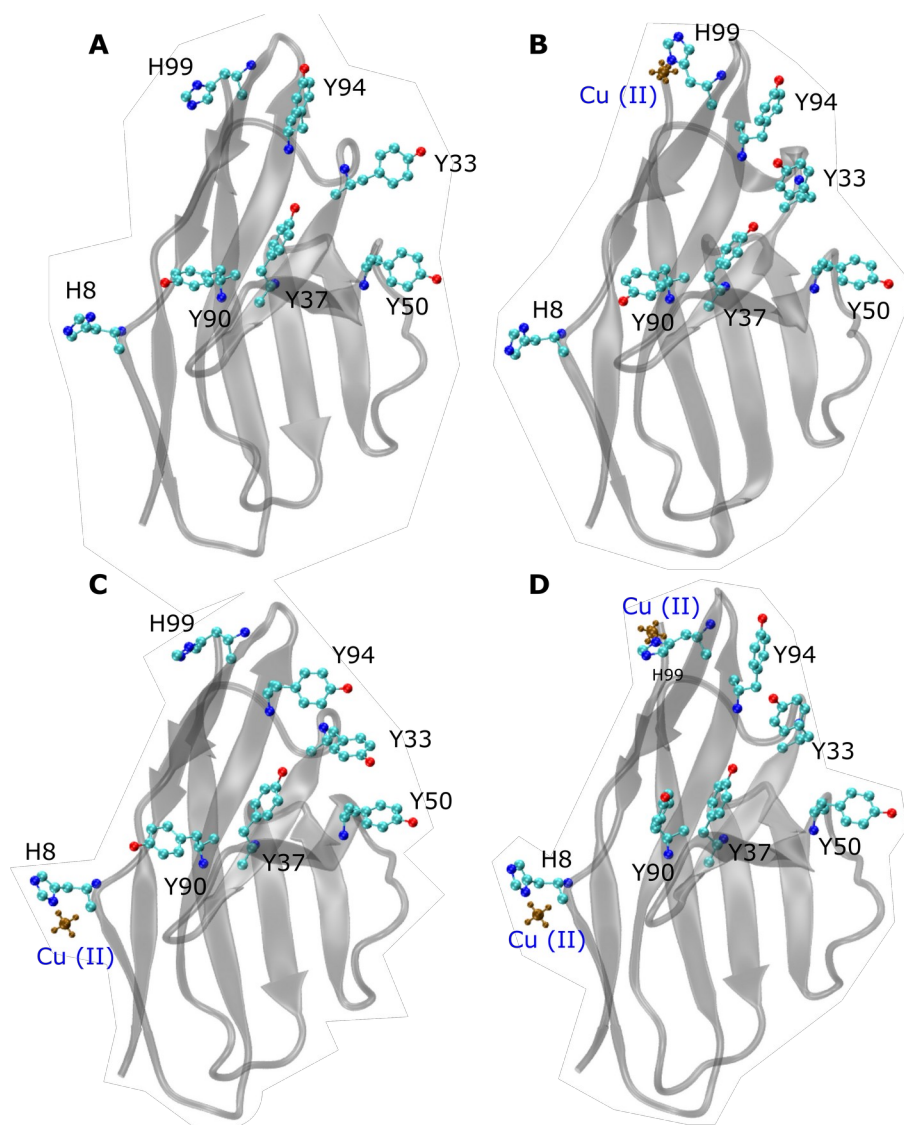
Anexo B: Conformaciones del grupo de tirosinas.

Figura B30. Conformaciones del grupo de tirosinas en ausencia 8A) y presencia de cobre unido a H99 (B), H8 (C) o a ambas histidinas (D). Se muestran estructuras representativas para cada condición. La estructura de la proteína se muestra en gris y residuos de Tyr e His son representados por colores CPK.

Anexo C: Alineamiento de la línea germinal 6a de pacientes con AL

Debido al reordenamiento genético, el proceso de hipermutación somática y mutaciones en diferentes aminoácidos en varias regiones de las proteínas, cada paciente con esta enfermedad presenta una secuencia de cadena ligera amiloidogénica diferente. Por lo anterior, se procedió a investigar el nivel de conservación de las histidinas dentro de secuencias de pacientes, las cuales son reportadas en la plataforma de Albase (<http://albase.bumc.bu.edu/aldb/search/query>). A través del servidor *Clustal Omega*, se realizó el alineamiento de 102 secuencias de pacientes con amiloidosis de cadena ligera y 25 secuencias del repertorio normal. Posteriormente, se generó la secuencia *logo* (<https://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>); que es una representación gráfica de un alineamiento múltiple de secuencias múltiples, cuyo propósito es identificar patrones dentro de las mismas. Cada cúmulo de letras, representa una posición en la secuencia de la cadena polipeptídica. La altura de cada cúmulo representa el nivel de conservación de la secuencia en esa posición, mientras que, la altura de cada letra, refleja la frecuencia relativa del aminoácido en la posición correspondiente (**Figura C31**). (Elaborado en el laboratorio de la Dra. Nina Pastor por el Dr. Gilberto Valdés García).

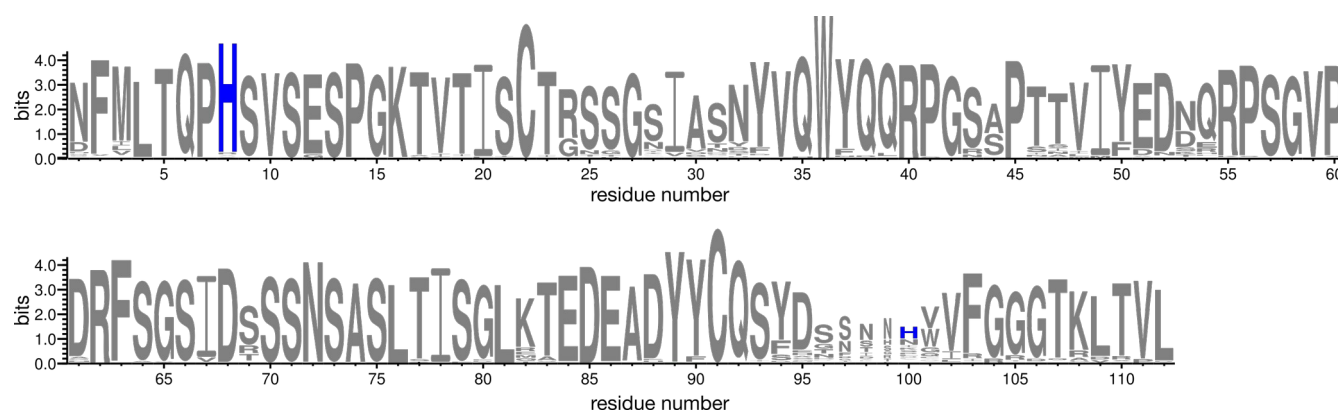


Figura C31. Alineamiento de la línea germinal 6a presente en pacientes con amiloidosis de cadena ligera. Secuencia de aminoácidos provenientes de 102 pacientes con dicho padecimiento. Descargados de AL-Base y alineados con servidor Clustal Omega. La secuencia logo fue generada con el servidor WebLogo 3. Las H8 y H99 están marcadas en azul

Anexo D: Efecto del Zn (II) en 6aJL2-R24G

El Zinc es un elemento traza esencial con funciones estructurales, catalíticas y reguladoras (Prasad et al., 1963; Brettger & Dell, 1982; Golden 1989). Se ha documentado que el zinc funciona como un componente crucial en mas de 300 enzimas y factores de transcripción, donde sirve como cofactor esencial para la actividad catalítica (Frederickson et al., 1989), incluso confiere estabilidad estructural a los dominios de proteínas de unión a ADN (Colvin et al., 2002). Estudios recientes sugieren que el zinc tiene importantes funciones de señalización, incluida la inhibición de la neurotransmisión de ácido γ -aminobutírico (Gustafson et al., 2003).

En general, la homeostasis del Zn es mantenida por tres familias de proteínas: 1) metalotioneínas, 2) proteínas transportadoras (ZnT) y 3) proteínas parecidas a Zrt-Irt (ZIP) (Palmiter 1998). Diversos estudios muestran un rol importante del Zn con la interacción de proteínas relacionadas a enfermedades conformacionales inclusive se menciona que el Zn^{2+} es más potente que el Cu^{2+} en inducir la agregación amiloide (Alies et al., 2013). Algunas proteínas relacionadas a la agregación amiloide por Zn^{2+} son β -amiloide (Lee et al 2018), α -Synucleina (Parkinson) (Valiente-Gabioud et al., 2012), γ -D cristalina (cataratas) (Quintanar et al., 2015) entre otras. Sorprendentemente se ha encontrado que el Zn^{2+} posee un efecto dual sobre la amiloidogénesis de hIAPP: a bajas concentraciones del ion metálico incrementa el tiempo lag para la formación de fibras y disminuye la tasa de adición para fibras existentes, mientras que tiene el efecto opuesto en altas concentraciones (Brender et al., 2010).

Tomando en consideración los antecedentes de este ion metálico sobre proteínas relacionadas a enfermedades conformacionales y que a la fecha de realización de esta tesis no existen reportes sobre la interacción de Zn^{2+} con cadenas ligeras, en este trabajo se evaluó su efecto sobre la proteína 6aJL-R24G, siguiéndose parte de la metodología anteriormente descrita (formación de fibras amiloides, estabilidad térmica). La estructura electrónica del Zn^{2+} no permite su estudio por espectroscopia debido a que es un metal diamagnético, es decir, posee todos sus electrones apareados.

I. Predicción de sitios de unión de Zn^{2+} a 6aJL2-R24G

A través del servidor MIB se determinaron los posibles sitios de unión del Zn^{2+} a 6aJL2-R24G. Como ya se mencionó, MIB busca similitudes de secuencia entre la proteína diana y las proteínas reportadas con sitios de unión de metales. La **figura D32** muestra los aminoácidos con mayor score en la predicción, los cuales podrían ser posibles sitios de unión a Zn^{2+} : Asp52, Thr83, Glu86, Asp88, Tyr94, Asp95 e His99.

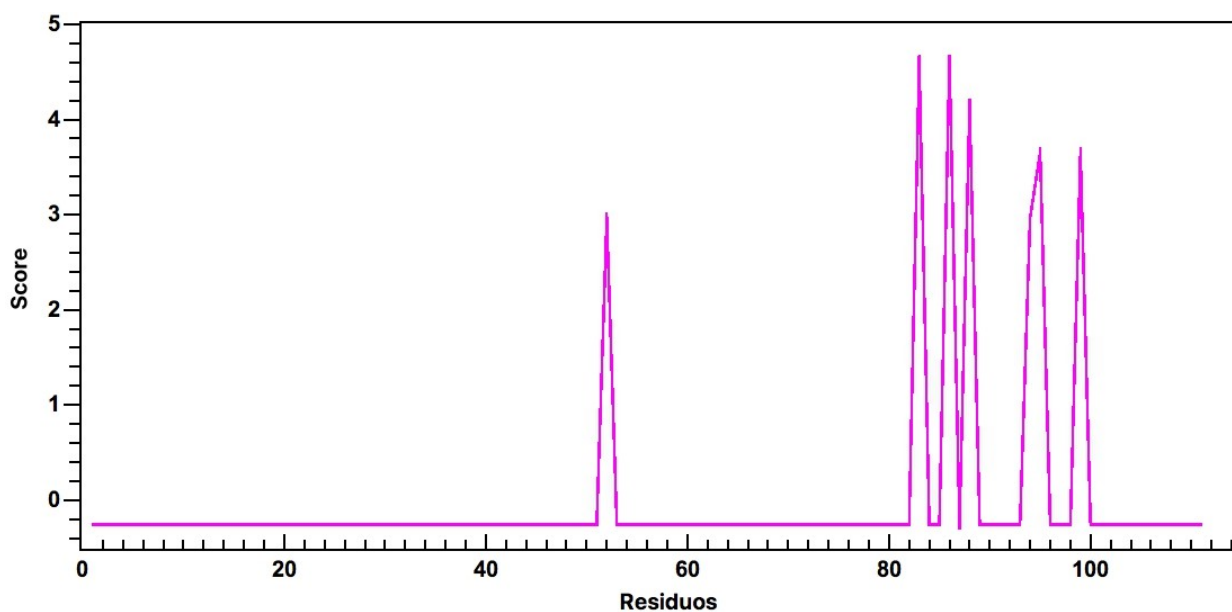


Figura D32. Predicción de sitios de unión a Zn^{2+} en la proteína 6aJL2-R24G, utilizando el servidor MIB.

Al igual que la predicción de Cu^{2+} a 6aJL2-R24G, uno de los sitios potenciales de unión del Zn^{2+} , podría involucrar la esfera de coordinación entre los residuos Asp95 e His99, sin embargo debe ser comprobado por RMN.

II. Efecto del Zn^{2+} sobre la agregación amiloide de 6aJL2-R24G

Al evaluar el efecto del Zn^{2+} en la formación de fibras amiloides de 6aJL2-R24G se obtuvieron datos muy variados (inhibe, acelera, no tiene efecto), sin embargo el más representativo y más obtenido fue el nulo efecto sobre la cinética a 4 eq del ion metálico, son necesarias más replicas y estandarización de las condiciones para datos mas certeros y complementarios.

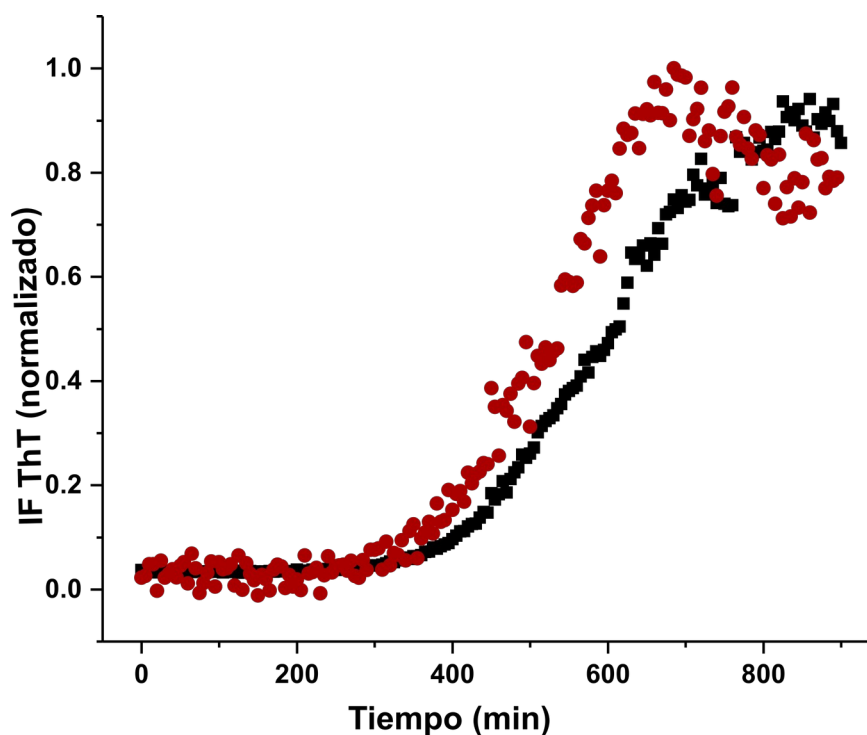


Figura D33. Cinética de la Fibrillogénesis *in vitro* de 6aJL2-R24G en presencia de Zn^{2+} . La cinética de formación de fibras de la proteína fue seguida por fluorescencia del ThT en ausencia (**negra**) y presencia **4** equivalentes de Zn^{2+} . El tiempo Lag de 6aJL2-R24G fue de 340 min, mientras que en presencia de Zn^{2+} fue de 320 min. Más replicas son necesarias.

III. Efecto del Zn^{2+} sobre la estabilidad térmica de 6aJL2-R24G

A fin de evaluar el efecto del Zn^{2+} con la proteína, se determinó la T_m de la proteína en ausencia y presencia del ion metálico. Aprovechando la característica del sistema antes mencionada, en la que la fluorescencia del único triptófano de 6aJL2-R24G es apagada por el puente disulfuro cuando la proteína se encuentra en estado plegado, es decir, al ir desplegándose la proteína la intensidad de fluorescencia del Trp ira en aumento al ser excitado a 350 nm. En todos los casos se observa una tendencia sigmoideal. Como puede observarse en la **figura D34** el Zn^{2+} no afecta la estabilidad térmica de la proteína en 0, 1, 2, 3 y 4 eq, manteniéndose la T_m en 45.6 °C. Incluso en 6aJL2, la proteína de linea germinal no provoca cambios en la estructura secundaria (**figura D35 y tabla D5**).

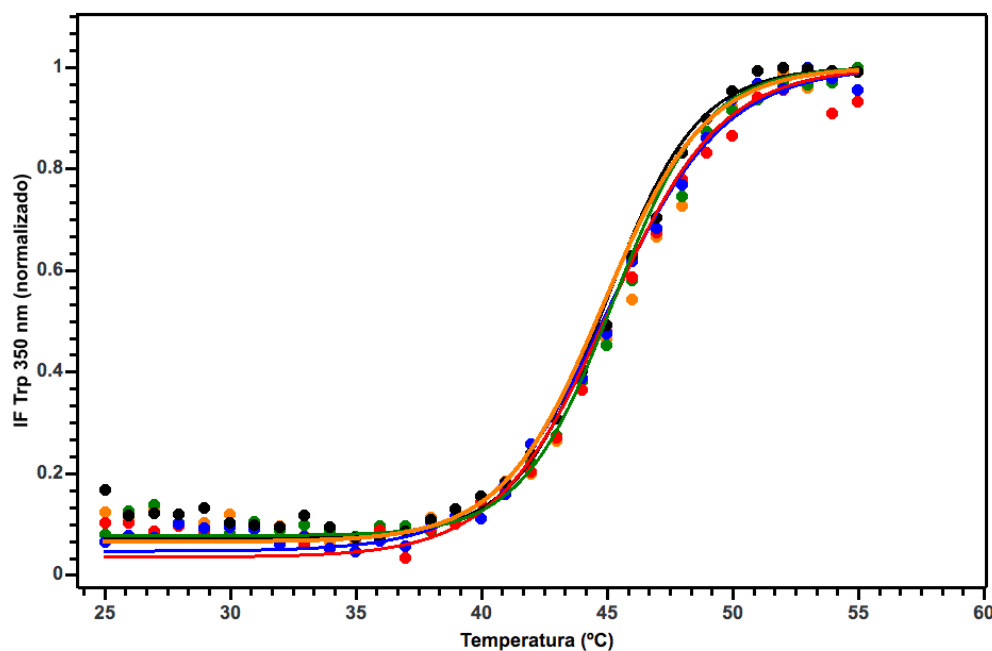


Figura D34. Desdoblamiento térmico de 6aJL2-R24G con presencia de Zn^{2+} . Las gráficas muestran el desdoblamiento de la proteína en ausencia (**negro**) y en presencia de **1eq**, **2eq**, **3eq** y **4eq** de Zn^{2+} . Las líneas sólidas en el gráfico representan el ajuste a la ecuación de Boltzmann para cada condición. En cada condición se obtuvo una T_m de 46 °C.

IV. Efecto del Zn^{2+} sobre la estructura secundaria de 6aJL2

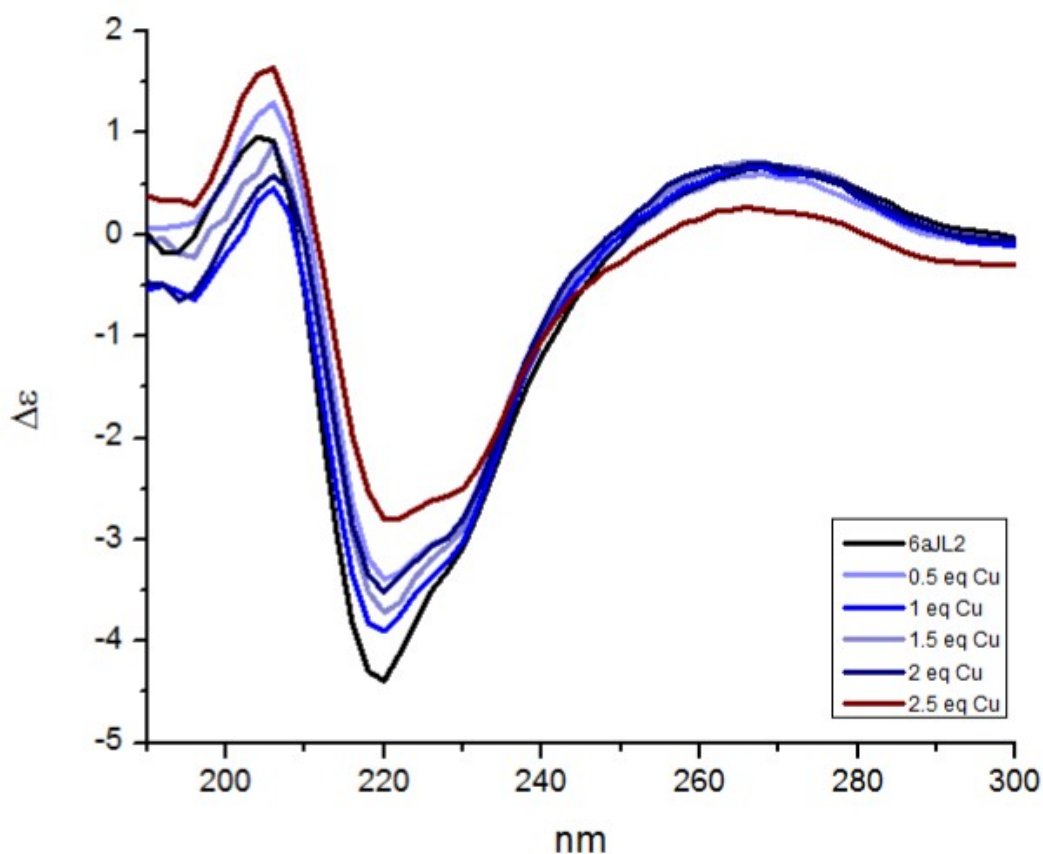


Figura D35. Titulación de 6aJL2 con Zn^{2+} seguida por DC en la región UV lejana.

Tabla D5. Porcentajes de estructura secundaria de la deconvolución de los espectros de 6aJL2 con Zn^{2+} usando BestSel.

6aJL2 + Zn		
Equivalentes Zn^{2+}	α (%)	β (%)
0	4	33
0.5	3	4
1	3	4
1.5	4	34
2	2	34
2.5	3	33

Los resultados obtenidos del Zn^{2+} sobre 6JL2-R24G, sugieren que dicho ion metálico no impacta sobre la agregación amiloide de la proteína, incluso podría pensarse que si existiera interacción con la proteína en estado nativo, tal como lo marca el predictor de sitios de unión a iones metálicos MIB, no afectaría la estructura secundaria de la proteína ni su estabilidad térmica. Debe señalarse que los resultados son preliminares y que durante las cinéticas de agregación de 6aJL2-R24G en la presencia de diferentes equivalentes de Zn^{2+} tuvieron comportamientos variados. Desde una perspectiva más general y tomando en cuenta la literatura, existen reportes donde se sugiere un efecto dual en otros sistemas, el cual dependería de las concentraciones de Zn^{2+} (Danielsson J. et al., 2007, Brender J. et al., 2010). Por lo tanto, es necesario estandarizar las pruebas de agregación y concentración del ion metálico así como la obtención de mas replicas de los experimentos. Este trabajo lo continuará una estudiante de maestría de nuestro laboratorio,

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 “**Caracterización de la interacción de Cu^{2+} con la proteína 6aJL2-R24G, relacionada con la enfermedad de amiloidosis de cadena ligera**” que presenta el alumno **Ángel Enrique Peláez Aguilar (5620141208)** 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. Alexis Rodríguez Solís CEIB-UAEM	APROBADO	
Dra. Ninfa Ramírez Durán FM-UAEMex	APROBADO	
Dr. Enrique Rudiño Piñera IBT-UNAM	APROBADO	
Dr. Carlos Daniel Amero Tello CIQ-UAEM	APROBADO	
Dra. Lina Andrea Rivillas Acevedo CIDC-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:2021-02-15 15:46:07 | Firmante

NXNwUKupH/bded1tfpSDKfb69z6Lk0Hy1yd7wKTRYrc1+9RI9GaX3sHwWt7gmXRMWcyB44gl7jSZnptx7JPkm/tecqVeUDg3DdZ+WTH54VoGelxwC+Dw0cFryQRrwe7tDP0HJ84cTGc9wAR6d9uKkr9Xb86cpFxyK49IOj48xs/HKI7216Wkgu5f6L+PRecRgPOJl/1XZy9pZJBQhVJQp31oApbVZFWAn+SGJg7RYrUYXU2Gtsu+oRMx5a4c98bStqCF8303dMZvS9lSHsoRCqhfhvOkJSCj9rCPu1o2/zgFSuoc3zSNzcilYrZpeHxcCDF/BdOgPOSRhIP407azw==

RODRIGO SAID RAZO HERNANDEZ | Fecha:2021-02-15 15:48:49 | Firmante

Mo9EPJqasi7mnfwclSqSVXnDK4M6LSczKGOx8wp+7+5J0dLynKvXsWCBWxHeLEMYRcafhXIEOlzHcqNpncldYnWVU4kHQRqMZUwCCzNQpVjgDGFFZK1bX6soWuR3t0SgdlqyhPdprLRuFy+rU1YMBwGBNVsege+/hXC8emW25zwhlQSGMQuRy026PQfr9+dKMzW1M8UwISOEB0T5jRPRKHphHO/smaVYF3U9kRqZMfYQI3V1Zl9o7nPkGy5sOLYurCU63zzFJ5d0b8jutzp3E+i9F69sMikC169fPRF8CVMt53WwUtsDqyHui7qK/LDLWwqHzZTz/fUfIUtoQ==

ALEXIS JOAVANY RODRIGUEZ SOLIS | Fecha:2021-02-15 16:04:40 | Firmante

UKxzgy2wAoZt3ZoXL3TEdZUE2TrL2j9l+pR084SUVTfbEl+kdbHit28XQHfVkrvZVXBef++3GZjM6PKpppx4RjH4ZRN4JBg93R2/2cwtw8f9cWUd9p+KDCmqj6VoFML9kWIryi1bFn2rFGe/U+OvXq6rZ+pE1vwWY3zSsMUs9Jm/izBlaqxeWjgR457qgScK9GDrlqxRIESSvWCWZ7Gs+eIgXr9NMvASfY+Y2cKGIxmYh6qH0gYsyEU71Zk74UvqFZdStPV1E6WYecmgLeFdoQN1p2eToRebSi7EJuQzHRMJrHf00RtMOXDIERsWkHBAEkQDRYcYTGDeza0a+KXXZQ==

NINFA RAMÍREZ DURÁN | Fecha:2021-02-15 17:04:24 | Firmante

MDCmPEnrPlmpSwdXfY4tDUKGeA6Ax+uqPfrubN1xZQw/0GJs0p5FiHnmHQmLnsZxwF52qH8GEKUZM8IMsIESQ43ss+j/1rPyx/1g+QDMiWeE8sJLp/fbF6en2Su/o94yovQDPucQ+hQB/ff0xs0lD4PDzQ5sDpuHb5tbvzDEX0rI8zUQUcSLouoci+/790njB+41zg5E5uDURsFLgbxEkE0ZDVgaatueiMmskMv15stESymZJSyUEfb3MJQ9FYiAszbKRhJaOLsBjBUezpJfPoAiBU0DeuMT909vj1Sz0VSJGYLS7tn1jkqZN1K0F3HGRLAylbw02PaKfRyQDng==

ENRIQUE RUDIÑO PIÑERA | Fecha:2021-02-16 09:28:20 | Firmante

aRv2sigd5o3tsdl7aK11vJ2S25i769aC3i0TThlk37wt9DrRwcJTJk48+rfzUhdpgy/d4Oix2HgexBL5/vrbPTJjicyelDcU15KdFyJaH3jFasnPIPjXtSFYXwuH/De7VkvGO204QkshvI/B5kDAGLXonBGVm2JkGII/3hjJIEX1cwFv87ZstYmJFKKaKTS6tKx2SDGYHLg8x6FncUrZecIt+A9HpiEi93y0rCi/vjF1qi7/AdmbaF9YtgAsd0J087HIDhbwz5RMbg/C8FokMa4p6TLGmkkELD8/0a4IHgZxGC+Yr5heUK3eb8IdjaL2OjEY4yh94MPTmqLPdgg==

CARLOS DANIEL AMERO TELLO | Fecha:2021-02-16 09:49:06 | Firmante

BNOdfClueJiAHDtR5X3A0Pede4srkhN4BCV1men4IRQuC05rp78X5lGMPkURQBSCQsGxx6u90pmAyEluslvSaV+6p/5oe8h64O0W6P9n6fY0L4R8Tgw4hUKOSQFZx38XPE5QdVmuleU3PETbetiGabb6x1XBEj+fAz63dqtw5UayDh1GECBnE1nA4/SE53lCguXYKNkFteuMJOWCLXbwT9f12ZWcwvV/f7IN96luWpGC1CVQb23StmixQJC4J4zn6OHG/lo4x+rzW8vRun/5lo1HT1fqHk1HSA1ZTuCx1g2ehK22QNeNGSm03l80MlpZ3FmlcoeCRTyvTaJWUkdxs/w==

LINA ANDREA RIVILLAS ACEVEDO | Fecha:2021-02-16 09:53:21 | Firmante

sRT8zeIVHBXiu25v9yOIGfPT4QCg3LZJkI0EaYIldvVbT1XD55Ka4fuWS6QDT54PneMaJWzCQuLc0ZdgfAJTGXWg6qzeCACIH5W9AQxysBto4c0wdLgVs8gCsX++PtlitXtkyv1gZeFxpjVR2eyZT08pjXxoz1eHsymw/Z8ogBSclQxX2GDPuB3VAN+CEqE9p8J9H9N0nKGY2UdfJg9SP4vMSzLve6a1lug48cHsffB923XfPjKooQeC9mwVY2z3WUXMT8sGB4pa1u77ARJaqsqjGWwg01matP7+vMh+IARo2A7gGuF85YsCZesFCvTmb5fqNLYhJbs1BvKA==

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



Qn8RPa

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/ccRaiJcAFaRfgAYSZyJj46wMbEHDFFEh>