

UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE MORELOS

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR

Efecto de fragmentos peptídicos en la formación de fibras amiloides de la proteína 6aJL2R24G inducidas por Cu(II)

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

Lic. en C. María Fernanda Mata Salgado

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Lina Andrea Rivillas Acevedo

Cuernavaca, Morelos.

mayo, 2024



PRESENTA:

Lic. en C. MARÍA FERNANDA MATA SALGADO

DIRECTORA 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. CÉSAR MILLÁN PACHECO

FACULTAD DE FARMACIA, UAEM

Dr. ENRIQUE RUDIÑO PIÑERA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

Dr. DANIEL ALEJANDRO FERNÁNDEZ VELAZCO

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

Dra. LINA ANDREA RIVILLAS ACEVEDO

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR, UAEM.

Agradecimientos

- Al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnología (CONAHCYT) por la beca otorgada durante mis estudios de maestría (CVU 1197746).
- A mi asesora de tesis, la Dra. Lina, por aceptarme en su grupo de trabajo desde el 2020. Por compartir sus conocimientos, por la confianza que depositó en mí, por escucharme y guiarme. Sobre todo, le agradezco por mostrarme la ciencia de una manera que jamás imaginé, y por ser una de las principales razones por las que he decidido seguir este camino. Muchas gracias.
- A los miembros de mi comité tutorial, la Dra. Nina y el Dr. César, por su constante disponibilidad, por guiarme, impulsarme y por mostrarme una salida cuando todo se volvía gris.
- A los miembros de mi comité revisor de tesis por el tiempo invertido y por sus valiosas correcciones.
- Al laboratorio de Bioquímica y Resonancia Magnética Nuclear del CIQ, UAEM por permitirnos usar sus equipos.
- A mi familia, por su constante apoyo, y en especial a mi hermana Denisse, mi compañera en este viaje, por escucharme, ser mi fuente de inspiración para seguir avanzando siempre, y por estar a mi lado cuando más necesitaba un salvavidas. Lo logramos. Gracias, chiquis.
- A Francisco, mi compañero de aventuras durante estos dos años, gracias por estar siempre a mi lado y apoyarme en cada decisión que he tomado. Te quiero mucho. ¡Muchas gracias!

Abreviaturas y acrónimos:

κ: Kappa

λ: Lambda

μg: Microgramos

AL: Amiloidosis de cadena ligera

C: Región constante

CDRs: Regiones Determinantes de Complementariedad, por sus siglas en inglés

D.O: Densidad óptica

CD: Dicroísmo circular, por sus siglas en inglés

DIC: N,N-Diisopropilcarbodiimida

DMSO: Dimetilsulfóxido

EPR: Resonancia Paramagnética Electrónica, por sus siglas en inglés

eq: Equivalentes

Fmoc: 9-fluorenilmetoxicarbonilo

Fig: Figura

IDPs: Proteínas intrínsecamente desordenadas, por sus siglas en inglés

IPTG: Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido

J: Segmento de unión

kDa: Kilodaltones

LC: Cadenas ligeras, por sus siglas en inglés

Min: Minutos

mL: Mililitros

mM: Milimolar

nm: nanometro

p/v: Porcentaje peso/volumen

R24G: Proteína 6aJL2-R24G

R24G-Cu(II): Complejo proteína 6aJL2-R24G con Cu(II)

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

rpm: Revoluciones por minuto

PDB: Banco de datos de proteínas, por sus siglas en inglés

t-Boc: terc-Butiloxicarbonilo

t-But: terc-Butilo

TFA: Ácido trifluoroacético

ThT: Tioflavina T

Tm: Temperatura de fusión

V: Región variable

Índice

1.- Introducción	8
1.1 Amiloidosis	8
1.2 Amiloidosis de cadena ligera	10
1.3 Proteína 6aJL2R24G	12
1.4 Efecto de iones metálicos en amiloidosis	13
1.5 Efecto de Cu(II) en la agregación de la proteína 6aJL2R24G	14
1.6 Péptidos inhibidores de la agregación de cadenas ligeras	15
2.- Hipótesis	18
3.- Objetivos	18
Objetivo general	18
Objetivos específicos	18
4.- Materiales y métodos	19
Transformación, sobreexpresión y purificación de proteínas.	19
Síntesis y purificación de los fragmentos de R24G	20
Predicción de amiloidogenicidad	21
Cinética de formación de fibras amiloides	21
Dicroísmo circular	21
Despegamiento térmico	21
Simulaciones de dinámica molecular	22
Acoplamiento molecular	23
5.-Resultados	24
Sobreexpresión y purificación de la proteína R24G	24
Identificación y purificación de los fragmentos de R24G	24
Predicción de amiloidogenicidad de los péptidos 37-43 y 74-80	26
Desplegamiento térmico de la proteína R24G	27
Cambios en la estructura secundaria de la proteína R24G	28
Cinética de formación de fibras amiloides de la proteína R24G	31
Acoplamiento molecular de la proteína R24G con los péptidos 37-43 y 74-80	33

6.- Discusión	38
Efecto de los péptidos en el desplegamiento térmico de la proteína R24G	39
Cambios en la estructura secundaria de la proteína R24G inducidos por los péptidos	39
Efecto de los péptidos en la cinética de formación de fibras amiloides	40
Predicción de los sitios de unión de los péptidos a la proteína R24G mediante acoplamiento molecular	42
7.- Conclusiones	44
8.- Perspectivas	44
9.- Bibliografía	45
Anexo I	50

1.- Introducción

1.1 Amiloidosis

Las proteínas son esenciales para el funcionamiento óptimo de las células; de hecho, este grupo de biomoléculas representa un poco más del 50% del peso seco celular y llevan a cabo una amplia gama de funciones vitales, desde actuar como componentes estructurales hasta servir como catalizadores biológicos e incluso participar en procesos inmunológicos [1]. Anteriormente, se creía que la función de las proteínas estaba intrínsecamente ligada a su estructura tridimensional. Sin embargo, aunque esta premisa sigue siendo en gran parte válida, se ha descubierto un grupo especial de proteínas conocidas como proteínas intrínsecamente desordenadas (IDP, por sus siglas en inglés), las cuales no poseen una estructura única al equilibrio, si no que existen como conjuntos heterogéneos de conformaciones y aún así, desempeñan funciones biológicas [2]. En cualesquiera de los dos casos y bajo ciertas condiciones, las proteínas pueden perder su estructura nativa, lo que las lleva a adoptar una conformación que puede provocar que se autoensamblen y formen agregados. Aunque este proceso podría representar una respuesta celular positiva para mantener el material no deseado en un lugar específico del citosol. Algunos de estos agregados se han reportado como funcionales, por ejemplo las bacterias *Escherichia coli* y *Salmonella spp.* aprovechan estas estructuras para mejorar su adhesión y formar colonias; por su parte, en los mamíferos se ha reportado el papel de la proteína Pmel17, la cual forma estas estructuras que juegan un papel importante en la síntesis de melanina [3]. Sin embargo, en la mayoría de los casos reportados hasta la fecha, estos agregados también pueden desencadenar diversas enfermedades [4]. Las enfermedades conformacionales comprenden un conjunto de trastornos que surgen cuando péptidos o proteínas específicas experimentan cambios, ya sea en su estructura secundaria o terciaria, resultando en su agregación y depósito en diferentes tejidos o compartimentos celulares [5]. El mal plegamiento y la agregación de proteínas están relacionados con más de 30 enfermedades humanas diferentes [4]. Dentro de este grupo de enfermedades se encuentran las amiloidosis. El término amiloidosis hace referencia a un grupo de enfermedades que se originan por la deposición de fibras amiloides, un material fibrilar insoluble y tóxico derivado de proteínas precursoras que se auto-ensamblan, en forma de manojos de proteínas

con conformación de hoja β altamente ordenada [6, 7]. Estas fibras se caracterizan por ser resistentes a la degradación enzimática; además, muchas han presentado experimentalmente un patrón específico de hojas β cruzadas cuando se examinan mediante difracción de rayos X [8]. Hasta el 2022, se han reportado 42 proteínas humanas que pueden formar este tipo de agregados entre las cuales destaca la proteína β amiloide, involucrada en la enfermedad de Alzheimer, la α sinucleína involucrada en la enfermedad de Parkinson, la amilina en la diabetes mellitus tipo 2, y las cadenas ligeras de inmunoglobulina en la amiloidosis de cadena ligera, entre otras [9].

Dependiendo del sitio donde se encuentren estos agregados, las amiloidosis se pueden dividir en amiloidosis localizada o amiloidosis sistémica. En el primer grupo, los agregados se encuentran en órganos o tejidos específicos; sin embargo, en el segundo caso estos agregados pueden depositarse en múltiples tejidos del cuerpo llevando a fallas multiorgánicas [10].

Sin importar la proteína precursora o el tejido/órgano afectado, se ha reportado que estas fibras amiloides guardan estructuras morfológicas similares. En todos los casos son estructuras alargadas y no ramificadas que presentan diámetros entre 7 y 13 nm; además, pueden interactuar con fluoróforos como el rojo Congo o la Tioflavina T (ThT) lo que permite estudiarlas mediante diversas técnicas espectroscópicas [11].

También se ha observado que, independientemente del precursor, para que éste cambie de un estado funcional soluble a un agregado fibrilar insoluble, debe atravesar las etapas de nucleación y crecimiento. Por ejemplo, al seguir la cinética de formación de estas fibras mediante la fluorescencia de ThT, en la mayoría de los casos se pueden distinguir tres fases, conocidas como fase de latencia, o lag, fase exponencial y fase estacionaria. En la fase lag, la proteína experimenta una serie de cambios conformacionales que la llevan a una estructura parcialmente desplegada hasta que se forma un núcleo fibrilar. Este núcleo se considera una estructura pequeña, capaz de iniciar la elongación de las fibras. A partir de este punto, comienza la fase de elongación, durante la cual se observa un rápido aumento en la fluorescencia de ThT, ya que los núcleos forman fibras amiloides mediante la incorporación continua de monómeros. Finalmente, se alcanza la fase estacionaria, donde se establece el equilibrio de la incorporación y liberación de monómeros y, por lo tanto, la fluorescencia de ThT se mantiene constante [11]. Este proceso se ilustra en la [Fig. 1](#).

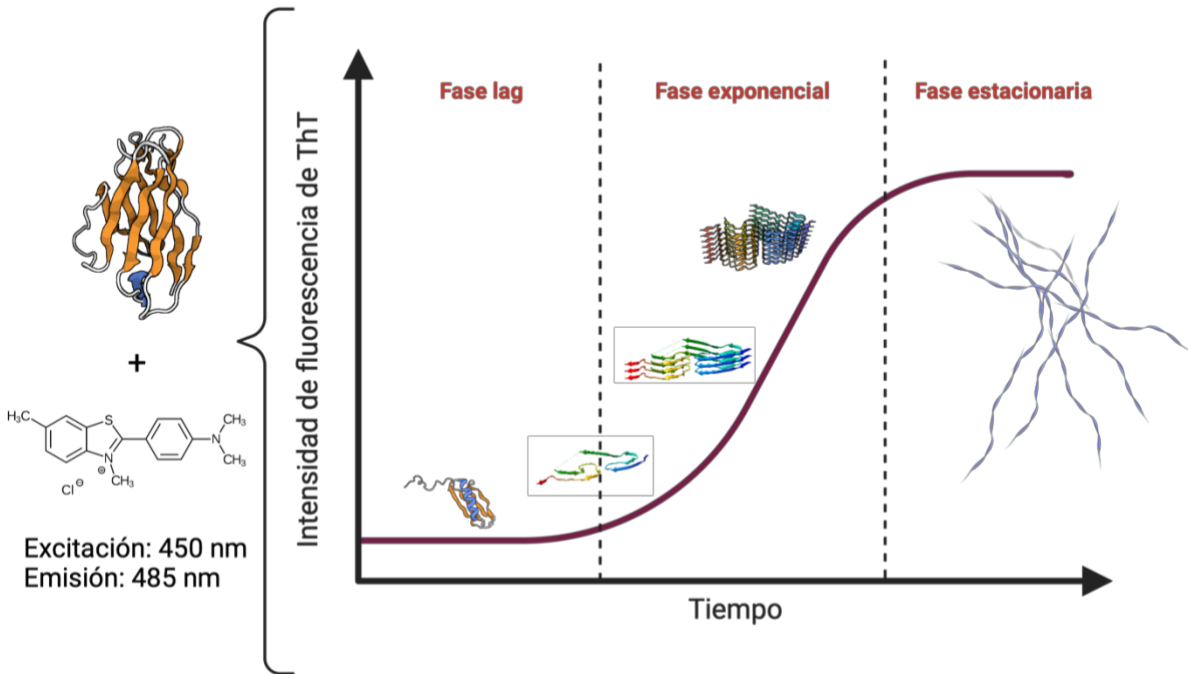


Fig. 1 Cinética de formación de fibras amiloides de una proteína globular. Se presenta la cinética de formación de fibras amiloides de una proteína globular siguiendo de la fluorescencia de ThT. Este fluoróforo extrínseco se excita a 450 nm y su emisión se registra a 485 nm. La gráfica revela tres regiones distintas: en primer lugar, la fase latente o lag, donde la proteína experimenta diversos cambios conformacionales que conducen a la formación del núcleo fibrilar. A continuación, se inicia la fase exponencial, en la que más monómeros se incorporan a este núcleo fibrilar, permitiendo el crecimiento de la fibra. Finalmente, se alcanza la fase estacionaria, en la cual la distribución del tamaño de las fibras amiloides ya no cambia y no se observa un aumento en la fluorescencia de ThT.

1.2 Amiloidosis de cadena ligera

La amiloidosis de cadena ligera (AL) es una de las formas más comunes de amiloidosis sistémica. Esta enfermedad se caracteriza por el depósito extracelular de fragmentos fibrilares compuestos principalmente por cadenas ligeras de inmunoglobulinas o, más comúnmente, por fragmentos del dominio variable de estas proteínas [12]. Las manifestaciones clínicas de la enfermedad son muy variadas ya que, al ser una amiloidosis sistémica, los pacientes presentan una falla multiorgánica; sin embargo, los órganos comúnmente afectados son el corazón, en el 75% de los casos, y los riñones con el 65% de los casos diagnosticados [13]. La presentación clínica también va a depender del patrón y la severidad del órgano afectado; sin embargo, entre los síntomas más comunes se encuentran disnea, letargia, pérdida de peso, tendencia al sangrado, hinchazón de las extremidades inferiores, orina espumosa, hipotensión ortostática o

neuropatía periférica, macroglosia y hematomas periorbitales, aunque estos últimos dos sólo ocurren en un tercio de todos los casos diagnosticados [14].

Debido a la dificultad para diagnosticar esta enfermedad, no se conoce su incidencia; sin embargo, se estima que la prevalencia va aumentando con la edad ya que es el doble para pacientes alrededor de los 65 años comparada con aquellos entre 34 y 54 años [10]. Además se estimó que en el 2018 la prevalencia global de esta enfermedad fue de aproximadamente 10.44 casos por millón de personas [15]. Por otra parte, estudiar este padecimiento representa un reto debido a la dinámica conformacional de sus proteínas precursoras, las cadenas ligeras de inmunoglobulina.

Los vertebrados superiores poseen únicamente dos isotipos de cadenas ligeras de inmunoglobulina, lambda (λ) y kappa (κ), los cuales son funcionalmente indistinguibles. Los *loci* de ambas familias albergan genes que codifican segmentos de la región variable (V), unión (J) y constantes (C). Para la familia lambda, su *locus* se sitúa en el cromosoma 22, conteniendo aproximadamente 30 genes que codifican la región variable, además de 7 segmentos de unión, cada uno asociado a un segmento constante. Por otra parte, el *locus* de la familia kappa se localiza en el cromosoma 2, con alrededor de 35 genes variables, 7 genes de unión y un gen constante [16].

Una vez sintetizadas, estas cadenas ligeras se pliegan en una estructura tridimensional específica, generando dos dominios: el dominio variable, conformado por la unión de los genes V y J, y el constante. Cada uno de estos dominios está compuesto por aproximadamente 110 aminoácidos, y se pliegan individualmente para formar lo que se conoce como el dominio de inmunoglobulina, compuesto por dos hojas β unidas por un puente disulfuro [17].

Otra característica estructural relevante es la presencia de las regiones determinantes de complementariedad (CDRs por sus siglas en inglés) dentro del dominio variable. Estas regiones son las responsables del reconocimiento del antígeno y, por ende, son propensas a diversas mutaciones, lo que conlleva a que cada individuo tenga un conjunto único de proteínas [16].

Además, se ha reportado que en AL las cadenas ligeras de la familia λ se encuentran sobreexpresadas en comparación con las cadenas ligeras de la familia κ . En individuos sanos, la relación λ : κ es 1:2; mientras que en individuos que presentan la enfermedad, la relación cambia a 3:1. Además de esto, se ha observado que ciertas líneas germinales también se encuentran más sobreexpresadas en la enfermedad, una de ellas es la λ VI. Dentro de los casos

asociados a la familia λ , el 30% contienen a la línea germinal λ VI 6a [18]. Una de las proteínas más estudiadas para entender mejor la AL, que se encuentra dentro de esta línea germinal, es la cadena ligera 6aJL2. Esta proteína se compone de la secuencia codificada por la línea germinal 6a y el segmento de unión JL2. Este segmento de unión se seleccionó porque se ha reportado que es el más utilizado por las células plasmáticas en la AL, incluyendo las que secretan la cadena ligera λ 6 [19].

1.3 Proteína 6aJL2R24G

Aproximadamente un 25% de los casos de AL asociados a proteínas λ 6 presentan una mutante en la cual la Arg en la posición 24 es sustituida por Gly (R24G). Esta única mutación hace que la proteína sea termodinámicamente más inestable y forme fibras amiloides *in vitro* más rápidamente que la proteína 6aJL2 [19, 20].

La estructura cristalográfica de la proteína 6aJL2-R24G se muestra en la Fig. 2. La proteína contiene ocho hebras β , las cuales se empaquetan entre ellas y forman dos hojas β antiparalelas. Una de ellas se forma por las hebras A (aminoácidos 3 a 12), B (17 a 23), D (63 a 67) y E (72 a 78). La otra hoja está conformada por las hebras C (34 a 39), C' (46 a 50), F (87 a 94) y G (100 a 110). Estas dos hojas β se unen entre sí por medio de un puente disulfuro entre las Cys22 y Cys91. Las tres regiones CDR contienen los residuos 24 a 34 en la CDR 1, 50 a 56 en la CDR 2 y 95 a 99 en la CDR3 [21, 22, 23]. Otra característica estructural de esta proteína es un triptófano conservado en la posición 36 [21], muy cerca del puente disulfuro. La cercanía del Trp con el puente disulfuro apaga su fluorescencia intrínseca; por lo tanto, la proteína no presenta emisión de fluorescencia en su estado nativo [20].

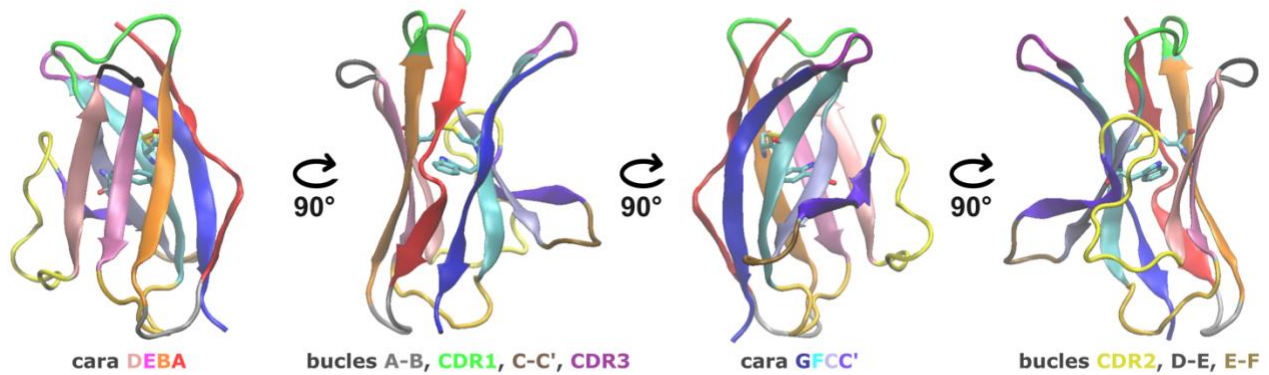


Fig. 2 Estructura de la proteína 6aJL2R24G (PDB ID: 5JPJ). La proteína se forma por ocho hebras β que se empaquetan para formar dos hojas β antiparalelas. Una de estas está compuesta por las hebras A (rojo), B (naranja), D (rosa pastel) y E (rosa), mientras que la segunda se forma por las hebras C (morado claro), C' (morado), F (azul) y G (azul rey), las Regiones Determinantes de Complementariedad, CDR1 (verde), CDR2 (amarillo) y CDR3 (magenta). También se muestra el puente disulfuro entre las Cys22 y Cys91 y el triptófano conservado de la posición 36.

1.4 Efecto de iones metálicos en amiloidosis

Los iones metálicos como el Co(II), Zn(II), Fe(II), Mg(II), Cu(II), entre otros, constituyen elementos integrales en algunas proteínas y son una pieza clave para su correcto funcionamiento. La concentración requerida de estos iones metálicos en el organismo es muy pequeña; sin embargo, la falta de éstos lleva a diversas condiciones patológicas [24].

A pesar de desempeñar un papel crucial en el correcto funcionamiento proteico, se ha observado que la agregación de ciertas proteínas relacionadas con enfermedades conformacionales puede ser afectada por la presencia de iones metálicos. Un ejemplo es la hormona peptídica amilina, cuya interacción con Cu(II) ha sido reportada. Presumiblemente, este ion se une a los residuos His18, Ser19 y Ser20, lo que resulta en la inhibición de la formación de fibras amiloides de la proteína [25]

Para la proteína A β , implicada en la enfermedad de Alzheimer, se ha demostrado que la presencia de Al(III), Fe(III), Zn(II) y Cu(II) induce su agregación. Destacan el Zn(II) y el Cu(II), ya que el primero puede inducir este efecto incluso a concentraciones cercanas a las fisiológicas; mientras que, el segundo sólo lo hace en un rango de pH entre 6 y 7 [26].

Otra enfermedad relacionada es el Parkinson, donde se ha informado que la interacción de la proteína α -sinucleína con iones metálicos como Al(III), Cu(II) y Fe(III) acelera la formación de fibras amiloides [27].

La β 2-microglobulina es una cadena ligera que pertenece al complejo mayor de histocompatibilidad de clase 1. Esta proteína contiene 7 hebras β que se empaquetan para formar un β sándwich que se mantiene unido entre sí mediante un puente disulfuro entre las Cys25 y la Cys80 [28], lo cual la hace estructuralmente muy parecida a la proteína R24G. Además, se ha reportado que es capaz de interactuar de manera específica con el Cu(II) y que esta interacción la desestabiliza y la hace más propensa a formar fibras amiloides. Mediante estudios de Resonancia Magnética Nuclear, (RMN), se determinó que los sitios de unión de la proteína al Cu(II), a pH 7, involucraba a tres de las cuatro histidinas que contiene la proteína, la His13, His31 e His51. Sin embargo, también se determinó que cuando el pH baja a 6.5 sólo la His13 contribuye con la unión [29].

1.5 Efecto de Cu(II) en la agregación de la proteína 6aJL2R24G

En un estudio reciente se reportó que el Cu(II) puede interactuar con la proteína R24G y que esta interacción acelera la formación de fibras amiloides de la proteína y hace que ésta sea menos estable. Después de realizar experimentos de calorimetría y RMN, se concluyó que la proteína tiene dos sitios de unión de moderada afinidad, alrededor de las His8 e His99 [30]. Se propuso, mediante simulaciones de dinámica molecular, que la desestabilización de la proteína se debe a la pérdida de interacciones entre los dominios CDR3 y CDR1, cuando el Cu(II) se une a la His99, haciendo que la proteína sea más propensa a formar fibras amiloides *in vitro*. [30].

Además, se ha reportado que la proteína en estado nativo o completamente desplegado no es capaz de formar agregados fibrilares. Es por eso que se sugiere la participación de intermediarios parcialmente desplegados para la formación de las fibras amiloides [31, 13]; sin embargo, los cambios conformacionales que conducen a estos intermediarios aún no han sido caracterizados [31].

1.6 Péptidos inhibidores de la agregación de cadenas ligeras

En 2000 y 2001 se reportaron dos secuencias cortas de péptidos derivadas de la proteína SMA, FTLTISS (71-77) y YQQKPGQ (36-42), que demostraron ser capaces de inhibir la formación de agregados de esta proteína en ausencia (71-77) y en presencia de Cu(II) (36-42) [32, 33].

La proteína SMA es una proteína derivada de paciente con AL, esta proteína fue aislada de los ganglios linfáticos de un paciente con amiloidosis primaria. Esta proteína pertenece a la familia de cadenas ligeras κ VI y difiere únicamente en 7 aminoácidos con la proteína de línea germinal [34]. Se reportó que la proteína chaperona BiP era capaz de interactuar con la proteína SMA, y esta interacción inhibía de manera eficiente la agregación de la proteína. Esta capacidad se observó claramente en relaciones de 30:1 de SMA:BiP [32]. BiP es una chaperona presente en el lumen del retículo endoplásmico (RE). Esta proteína se une transitoriamente a las proteínas recién sintetizadas en el RE y de manera permanente a aquellas que se encuentran mal plegadas, subglicosiladas o no ensambladas. Sin embargo, BiP no es capaz de unirse a proteínas nativas [35]. Esto sugiere que la proteína debería exponer un sitio reconocible por BiP para inhibir su agregación, por lo que un exceso de péptidos capaces de unirse a esta región específica también debería tener un efecto inhibitorio [32]. Es por eso que se sintetizaron 18 heptapéptidos, de los cuales sólo dos mostraron un efecto inhibitorio: el péptido 69-75 (TDFTLTI) y el 71-77 (FTLTISS). Este grupo de trabajo centró su interés en el péptido 71-77, ya que, en condiciones nativas, no sería accesible para la chaperona BiP debido a que se encuentra oculto por la formación del puente disulfuro que mantiene unido al β sándwich. Además, una diferencia importante encontrada para la inhibición de la agregación con este péptido es que se necesitaba una relación péptido:proteína de 5:1 para observar el efecto. [32]. Posteriormente, se reportó el efecto de otro fragmento de SMA en la agregación de la proteína inducida por Cu(II). En presencia de Cu(II) la proteína forma agregados de tipo no fibrilar, además, bajo estas condiciones la chaperona BiP no inhibe la agregación de la proteína y, consistentemente, el péptido 71-77 pierde su efecto. Sin embargo, el péptido 36-42 (YQQKPGQ) es capaz de inhibir la agregación de la proteína inducida por Cu(II) [33].

Para la proteína R24G se ha estudiado el papel inhibitor de diversos compuestos químicos, entre los que destacan la melatonina, tetraciclina, quercetina, rifampicina y epigalato, siendo este último el que mejores resultados ha presentado [36]. Sin embargo, aún no se ha estudiado el efecto de péptidos inhibidores en este sistema que, además, ya se conoce que también es capaz de interactuar con el Cu(II). Estudiar el efecto antiagregación de la proteína en presencia de diferentes péptidos ayudaría, no sólo a encontrar un posible tratamiento, sino que también podría dar luz sobre el mecanismo que lleva a que la proteína pase de un estado nativo a formar agregados. A pesar de que SMA pertenece a la familia de cadenas ligeras κ VI y R24G pertenece a la familia λ 6, guardan una identidad de secuencia del 44.8% (Esquema 1). Al realizar el alineamiento estructural de las dos proteínas, se tomaron las secuencias ASLTISG (74-80) y YQQRPGS (37-43), que serían las regiones equivalentes en R24G de los péptidos de SMA (Fig. 3).

SMA- PROTEIN	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNRNYLAWYQQKPGQPP
R24G-PROTEIN	NFML...H.VSE.P.KTV..S.TG.SGSIA.----..VQ....R...SS.
SMA- PROTEIN	KLLIYWASTRESGVPDRFSGS--GSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCHQY-
R24G-PROTEIN	TTV..EDNQ.P.....IDS.SNSAS....G.KT..E.D...QS.D
SMA- PROTEIN	YSHPQTFGQGTKLLKR
R24G-PROTEIN	S.NHVV..G....TVL

Esquema 1. Alineamiento de las secuencias de la proteína SMA y R24G. El alineamiento de ambas secuencias se realizó utilizando la herramienta EMBOSS Needle en línea (https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/psa/emboss_needle) [37]. La secuencia correspondiente al péptido 36-42 en SMA y 37-43 en R24G se muestra en azul y la secuencia 71-77 en SMA y 74-80 en la R24G se muestra en rojo. Cada punto indica una similitud de aminoácido entre las dos secuencias, reflejando una coincidencia directa en esa posición. Los guiones representan los huecos o gaps introducidos en las secuencias para optimizar el alineamiento global. Las letras representan los aminoácidos que no coinciden entre las dos secuencias, señalando diferencias específicas en esas posiciones.

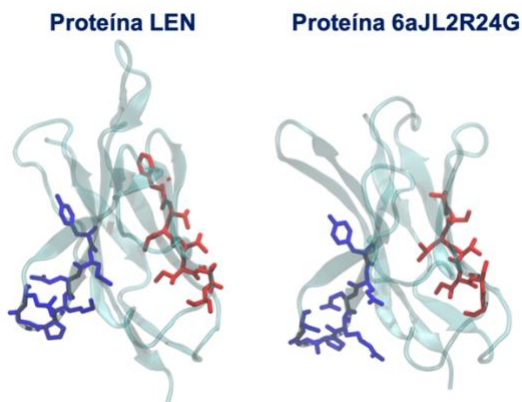


Fig. 3 Comparación de los sitios donde se obtuvieron los péptidos inhibidores de ambas proteínas. La proteína LEN se muestra a la izquierda (PDB ID: 1LVE), ésta es otra proteína perteneciente a la familia de las kIV, que difiere de la SMA en 8 aminoácidos, de los cuales ninguno cae en las regiones resaltadas; se usó esta proteína ya que a la fecha no se encuentra la estructura de la proteína SMA en el PDB. En color azul se muestran los péptidos 36-42 para LEN y 37-43 para R24G, mientras que, en rojo se muestra la secuencia 71-77 para LEN y 74-80 para R24G.

Por todo lo anterior, en este trabajo se evaluó el efecto de los péptidos ASLTISG (74-80) y YQQRPGS (37-43) en la agregación de la proteína R24G en presencia y en ausencia de Cu(II). En las condiciones probadas se encontró que ambos péptidos son capaces de interactuar con la proteína R24G, y esa interacción hace que la proteína R24G sea termodinámicamente más estable, tanto en presencia como en ausencia de Cu(II). Además, se observó que la interacción de la proteína R24G con el péptido 37-43 retrasa la formación de fibras amiloides; sin embargo, la interacción de este mismo péptido con el complejo R24G-Cu(II) reduce el tiempo de latencia del proceso de formación de fibras y lo hace más eficiente. La interacción del péptido 74-80 ya sea con la proteína R24G o con el complejo R24G-Cu(II) alarga el tlag del proceso de formación de fibras amiloides; sin embargo no se observa efecto en la eficiencia de la reacción. Aún son necesarios más estudios para caracterizar la unión y el mecanismo por el cual estos péptidos tienen el efecto observado.

2.- Hipótesis

Los péptidos ASLTISG (74-80) y YQQRPGS (37-43) se unen a regiones expuestas de la proteína R24G e inhiben su agregación.

3.- Objetivos

Objetivo general

Evaluar el efecto de los péptidos 37-43 y 74-80 en la agregación de la proteína R24G en presencia y ausencia de Cu(II)

Objetivos específicos

- Sobreexpresar y purificar la proteína 6aJL2R24G
- Sintetizar y purificar los péptidos 37-43 y 74-80
- Estudiar la estabilidad térmica de la proteína R24G y del complejo R24G-Cu(II) en presencia y ausencia de los péptidos
- Evaluar la cinética de formación de fibras amiloides de las proteínas en presencia y ausencia los péptidos y de Cu(II)
- Evaluar los cambios en estructura secundaria de la proteína en presencia y ausencia de los péptidos y de Cu(II).

4.- Materiales y métodos

Transformación, sobreexpresión y purificación de proteínas

La obtención de la proteína R24G se realizó empleando la cepa de *E. coli* BL21-DE3 y el plásmido pET-27(+b) con el gen que codifica para la proteína de interés. La transformación se llevó a cabo mediante choque térmico, incubando las bacterias con el plásmido a 42°C durante 90 segundos, seguido por un enfriamiento en hielo durante 2 minutos. Posteriormente, se sembraron en cajas Petri con medio LB sólido suplementado con 60 µg/mL de kanamicina, y se mantuvieron a 37°C durante 14 horas. Una colonia aislada se seleccionó y se cultivó en medio YT2x con 60 µg/mL de kanamicina, a 37°C y 160 rpm, hasta alcanzar una D.O_{600nm} de 0.8.

La inducción se realizó con IPTG a una concentración 1 mM, se incubó durante 14 horas a 150 rpm y temperatura ambiente. Después de este tiempo, las células se centrifugaron a 4200 rpm durante 20 min a 4°C, y el lisado del periplasma celular se llevó a cabo por choque osmótico, comenzando con la resuspensión del botón en una solución al 20% (p/v) de sacarosa, Tris 100 mM, pH 8.0 y EDTA 1 mM. Tras la resuspensión, se incubaron durante 20 minutos en hielo y luego se centrifugaron a 8000 rpm durante 20 min a 4°C. El sobrenadante se descartó y se completó el proceso de lisis celular adicionando 20 mL de agua fría, por litro de cultivo, al botón bacteriano y resuspendiéndolo suavemente. Posteriormente, se llevó al último ciclo de centrifugación a 12,500 rpm durante 45 min a 4°C, para separar el sobrenadante rico en proteína del botón celular.

Se tomaron muestras de cada paso de la lisis y se analizaron por SDS-PAGE al 14%. El sobrenadante obtenido se filtró a través de una membrana con poro de 0.22 µm y se concentró mediante centrifugación utilizando un centrífugo con corte en 3 kDa hasta obtener un volumen final de 10 mL. La muestra filtrada y concentrada se aplicó en una columna de exclusión molecular Superdex 200 y se eluyó utilizando un buffer MES 10 mM pH 7.4, NaCl 75 mM. Se monitoreó la absorbancia de cada fracción obtenida con un espectrofotómetro Genesis UV-Vis Biomate 160 en una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Se seleccionaron las fracciones con una absorbancia mayor a 0.5, se corrió un SDS-PAGE al 14% para determinar la pureza de la proteína de interés en estas fracciones. Todas las fracciones que contenían la proteína

pura se combinaron, y se cuantificaron utilizando el coeficiente de extinción molar a 280 nm ($\epsilon=14565 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Síntesis y purificación de los fragmentos de R24G

Los péptidos detallados en la [tabla 1](#) fueron producidos mediante síntesis química en fase sólida utilizando la metodología Fmoc [38]. Cada péptido se sintetizó sobre 300 mg de resina RINK-amide MBHA. El proceso de síntesis consistió en ciclos alternados de desprotección y acoplamiento. Para la desprotección, se aplicaron cuatro ciclos de 30 minutos cada uno utilizando piperidina al 50%, con el objetivo de eliminar el grupo 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) del extremo N-terminal de la cadena peptídica en crecimiento. En cuanto al acoplamiento, se emplearon aminoácidos con el grupo Fmoc unido a su extremo N-terminal y protegidos en sus cadenas laterales con grupos terc-Butiloxicarbonilo (t-Boc) o terc-butilo (t-But), en una proporción 1:3 de resina:aminoácido. Para asegurar la eficiencia del acoplamiento, se utilizó el reactivo N,N-Diisopropilcarbodiimida (DIC). La reacción de acoplamiento se llevó a cabo sometiendo el reactor a dos ciclos de microondas de 6 segundos, seguidos de una incubación de máximo 12 horas, a temperatura ambiente y agitación constante. La eficiencia de cada paso se verificó con la reacción colorimétrica de ninhidrina [39]. Este proceso se repitió hasta completar la secuencia peptídica deseada. Finalmente, el péptido se liberó de la resina mediante hidrólisis ácida utilizando ácido trifluoroacético (TFA). Los péptidos resultantes se analizaron por espectrometría de masas con ionización ESI.

Tabla 1. Péptidos obtenidos mediante síntesis química en fase sólida

Péptido	Secuencia	Peso esperado (g/mol)
37-43	YQQRPGS	833.891
74-80	ASLTISG	645.725

Una vez obtenidos los péptidos, se procedió con el proceso de purificación. Cada péptido se disolvió en una solución compuesta por 10 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) y 10 mL de agua desionizada, seguido de filtración a través de una membrana de nylon con poro de 0.22 μm . La purificación de los péptidos se llevó a cabo utilizando el equipo PerkinElmer Series 200 con una columna C-18, aplicando un gradiente lineal de 0 a 100% de acetonitrilo con 0.05% de TFA. Los picos obtenidos fueron liofilizados y almacenados a temperatura ambiente hasta su uso.

Predicción de amiloidogenicidad

Se evaluó la amiloidogenicidad de los dos péptidos usando los servidores AmylPred2 [40] y FoldAmyloid [41]

Cinética de formación de fibras amiloides

Se evaluó la formación de fibras amiloides siguiendo la emisión de fluorescencia a 482 nm del ThT a lo largo del tiempo. La concentración de proteína usada fue de 25 μM , la concentración de Cu(II) fue de 50 μM y la de péptido 125 μM , esto para garantizar las relaciones estequiométricas 1:2:5 respectivamente. En todos los casos se usó buffer MES 10 mM pH 7.4, NaCl 75 mM. Las cinéticas se realizaron a 37°C con agitación constante. El tiempo lag de cada cinética se obtuvo por el punto de intersección de los ajustes lineales de las fases lag y exponencial. El valor de la pendiente se obtuvo realizando el ajuste lineal a la fase exponencial. Cada condición se corrió por triplicado y el análisis estadístico se realizó mediante pruebas de distribución t de Student usando el servidor JASP [42].

Dicroísmo circular

Para evaluar si la unión de los péptidos a la proteína R24G en presencia y en ausencia de Cu(II) causa un cambio en la estructura secundaria de la proteína se realizó una titulación de las proteínas y de los complejos proteína-Cu(II) con cada uno de los péptidos y se siguió por dicroísmo circular en la región del UV-lejano. La concentración de proteína usada fue de 20 μM , la de Cu(II) fue de 40 μM y la de los péptidos 100 μM , para garantizar la relación estequiométrica 1:2:5. Se usó una celda de cuarzo con paso óptico 0.1 cm y el espectro se colectó con un ancho de banda de 10 nm y una velocidad de 100 nm/min de 200 a 250 nm. Posteriormente los espectros obtenidos se deconvolucionaron usando el servidor BeStSel [43]

Despegamiento térmico

Una característica estructural de estas proteínas es que contienen un triptófano conservado en la posición 36, del cual, su fluorescencia intrínseca se encuentra apagada cuando la proteína se encuentra en su estado plegado debido a su cercanía con el puente disulfuro entre la Cys22

y la Cys91. Por lo tanto, cuando la proteína se despliega, este triptófano se aleja del puente disulfuro y la intensidad de fluorescencia aumenta. Para evaluar la estabilidad térmica de la proteína y del complejo proteína-Cu(II) en presencia y ausencia de los péptidos se usó un equipo CaryEclipse siguiendo la emisión de fluorescencia a 350 nm con una excitación de 295 nm con un barrido de temperatura de 25°C hasta 55°C, aumentando 1°C por minuto. Para evaluar si el desplegamiento es reversible se repitió el experimento con una rampa de 55°C hasta 25°C. Las concentraciones usadas fueron 10 µM de proteína, de 20 µM de Cu(II) y 50 µM de los péptidos, para garantizar la relación estequiométrica 1:2:5. Los datos se ajustaron a una sigmoide usando la ecuación de Boltzmann $A_2 + (A_1 - A_2) / (1 + \exp((x - x_0) / dx))$ y a partir de ahí se obtuvo la T_m. Este experimento se realizó por triplicado para cada una de las condiciones y el análisis estadístico se realizó mediante pruebas de t de Student usando el servidor JASP [44]

Simulaciones de dinámica molecular

Se corrieron simulaciones de dinámica molecular de la proteína 6aJL2R24G. Las coordenadas atómicas de la proteína se obtuvieron a partir de la estructura depositada en el PDB (PDB ID:5JPJ) [21]. La proteína fue solvatada usando agua TIP4P en una caja cúbica con 15 Å de borde y 0.1 M NaCl para semejar las condiciones experimentales. Las simulaciones se realizaron usando el campo de fuerza OPLS-AAL [45] dentro de GROMACS 2021.3 [46]. Los sistemas se estabilizaron mediante un proceso de equilibrio que involucró 50,000 pasos de minimización de energía seguidos por 100 ps de dinámica NVT y NPT antes de iniciar con la producción de dinámica molecular. Las interacciones electrostáticas se trataron utilizando el método Particle Mesh Ewald para interacciones electrostáticas de largo alcance, con un corte de 10 Å para interacciones electrostáticas de corto alcance. Las interacciones de Van der Waals se llevaron a cero entre 10 y 12 Å. La presión y la temperatura se mantuvieron a 1 bar y 298 K, respectivamente, utilizando el barostato de Parrinello-Rahman y un termostato Berendsen modificado. Todos los enlaces se restringieron utilizando el método LINCS. Durante el proceso de equilibrio, no se fijaron átomos específicos y se realizó un procedimiento de minimización en todos los átomos. El tiempo de integración se estableció en 2 fs, y las coordenadas atómicas se guardaron cada picosegundo durante las simulaciones. Se realizaron tres corridas de 500 ns cada una. Las trayectorias se analizaron utilizando herramientas de GROMACS 2021.3 y se visualizaron en VMD [47].

Para visualizar la diversidad conformacional de la proteína R24G a lo largo de toda la dinámica, se concatenaron las trayectorias de las tres réplicas y analizaron los clusters obtenidos con la herramienta gmx cluster en GROMACS usando un corte en 0.13 nm sobre los carbonos α .

Acoplamiento molecular

Se llevaron a cabo acoplamientos moleculares del cluster más poblado de la proteína R24G generado por dinámica molecular con los péptidos 37-43 y 74-80 utilizando el servidor CABS-dock [48] para identificar los posibles sitios de unión de los péptidos a la proteína. Además, se examinó el caso de la proteína parcialmente desplegada debido a la apertura del bucle C-C'. Para este fin, se tomó la estructura cristalográfica depositada en el PDB con el código 5JPJ y se modeló dicho bucle utilizando la herramienta de Edición de Estructuras en Chimera [49]. El análisis de contactos entre el complejo proteína-péptido se realizó promediando los contactos entre cada uno de los clusters obtenidos por el servidor CABS-Dock.

5.-Resultados

Sobreexpresión y purificación de la proteína R24G

La sobreexpresión de la proteína fue exitosa. Se obtuvo un sobrenadante rico en la proteína R24G, tal como se observa en el último carril de la Fig. 4D, el cual presenta una banda abundante entre 10 y 15 kDa, la cual coincide con la masa esperada de la proteína de 11,853.86 Da.

En la Fig. 4A se muestra el cromatograma de purificación, obtenido al medir la absorbancia a 280 nm de cada una de las fracciones recolectadas después del paso por la columna de exclusión molecular. Se observa un pico mayoritario entre las fracciones 35 y 60, por lo que se analizaron por SDS-Page al 14% para identificar aquellas que contenían a la proteína R24G pura (Fig. 4B-D). A partir del SDS-PAGE fue claro que las fracciones 43 a 57 presentaban a la proteína en estado monomérico y sin contaminantes. Por lo tanto, se combinaron estas fracciones y se cuantificaron. Posteriormente, la muestra se fraccionó en pequeñas alícuotas y se almacenó a -68 °C hasta su uso.

Identificación y purificación de los fragmentos de R24G

La espectrometría de masas realizada a los fragmentos sintetizados confirmó la presencia de ambos péptidos, como se ilustra en la Fig. 5. Se identificaron los iones moleculares más abundantes para cada caso, con una masa de 833.42 Da para el primero y 646.36 Da para el segundo, los cuales coinciden con los valores esperados según se muestra en la Tabla 1.

Una vez caracterizados por masas, los péptidos se purificaron siguiendo la metodología antes descrita, se liofilizaron y se almacenaron a temperatura ambiente hasta su uso (Fig. 6).

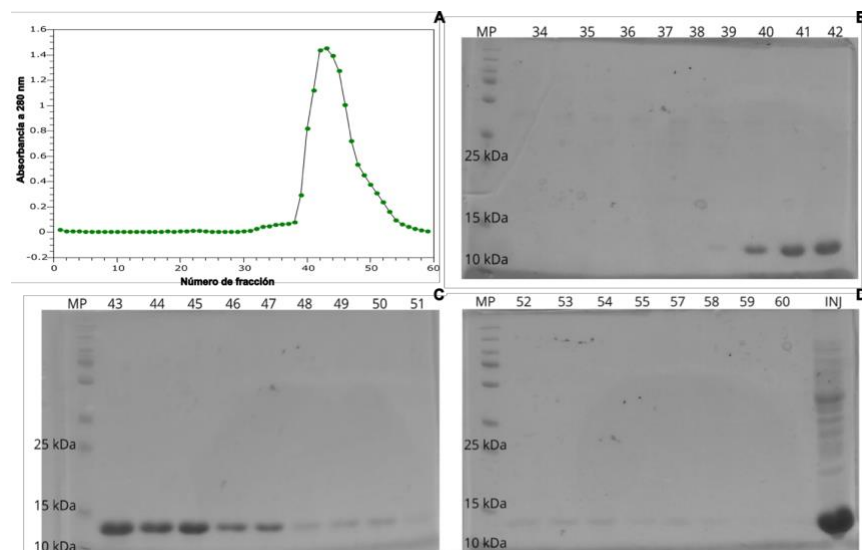


Fig. 4 Cromatograma de purificación por exclusión molecular de la proteína 6aJL2R24G. En (A) se muestra el cromatograma del proceso de purificación por una columna de exclusión molecular Sephadex 200, en (B-D) se muestra el SDS-PAGE de poliacrilamida al 14% de las fracciones 34 a 60, en (D) en el carril INJ se observa la muestra inyectada en la columna Sephadex 200.

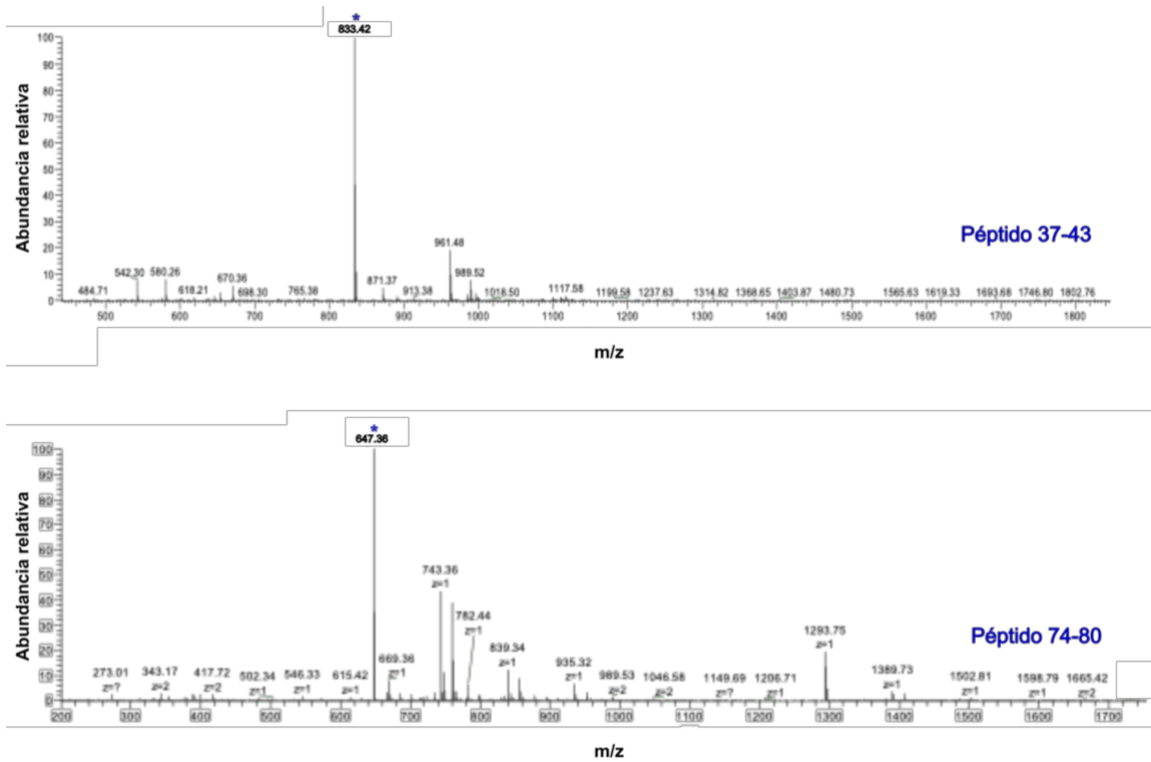


Fig. 5 Espectros de masas de los péptidos 37-43 (YQQRPGS), parte superior, y 74-80 (ASLTISG), parte inferior.

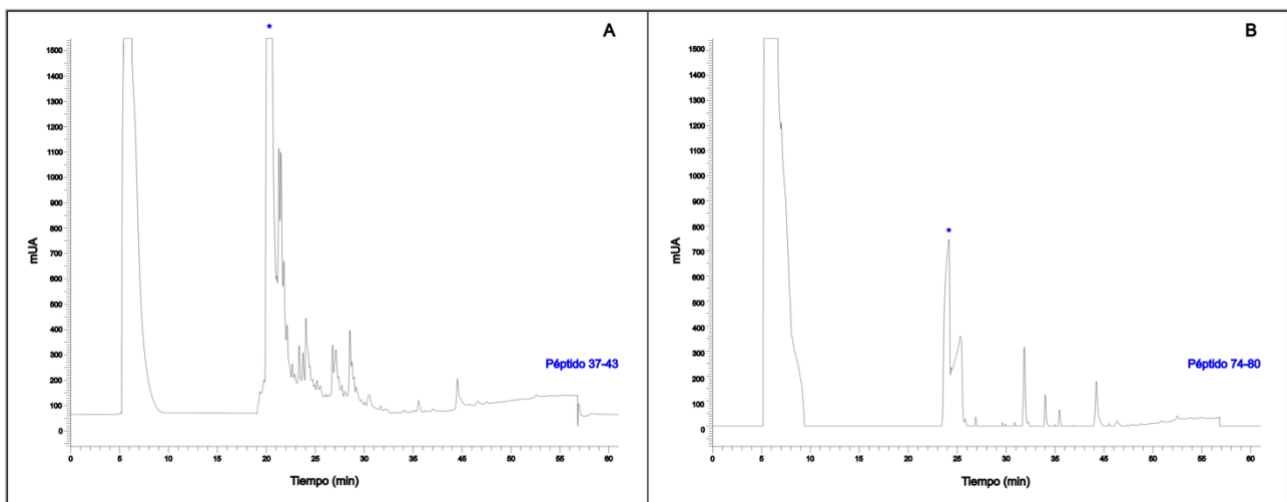


Fig. 6 Cromatogramas de la purificación de los péptidos 37-43 (YQQRPGS) y 74-80 (ASLTISG). Se obtuvo un cromatograma con un pico mayoritario, típico de un péptido sintético.

Predicción de amiloidogenicidad de los péptidos 37-43 y 74-80

Antes de iniciar los análisis, se evaluó la amiloidogenicidad de las secuencias de los péptidos 37-43 y 74-80 utilizando los programas predictores de amiloidogenicidad AMYLPRED2 [50] y FoldAmyloid [51]. Los resultados de estos análisis se presentan en la Fig. 7. Los resultados obtenidos con el *software* FoldAmyloid, que establece un umbral de perfil de valores mayor a 21.4 para reconocer una secuencia peptídica como amiloidogénica, indican que en el péptido 37-43 sólo el primer aminoácido superó este umbral, mientras que para el péptido 74-80, sólo los residuos 3 y 4 lo superaron. Por lo tanto, ninguno de los péptidos es amiloidogénico. Sin embargo, el predictor AMYLPRED2 indicó que el péptido 37-43 no es amiloidogénico, pero el péptido 74-80 tiene 87.5% de aminoácidos amiloidogénicos.

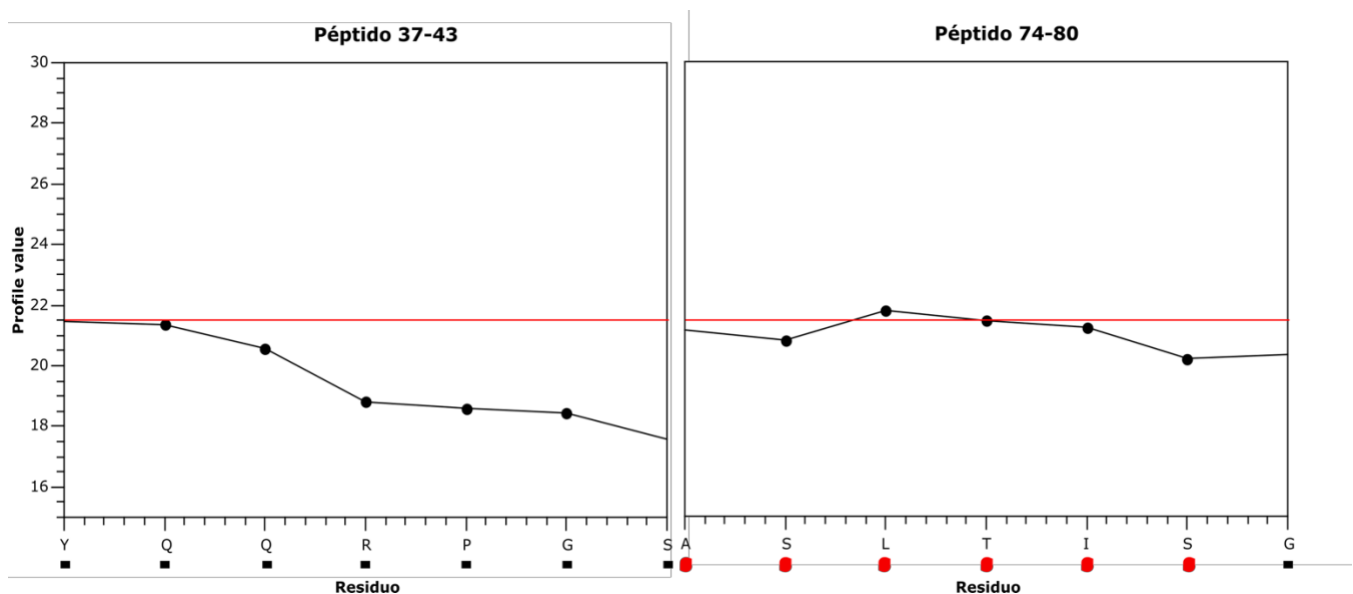


Fig. 7 Predicción de amiloidogenicidad de los péptidos 37-43 y 74-80. En las gráficas se resume el resultado obtenido con el predictor FoldAmyloid y AMYLPRED2. Según FoldAmyloid, un péptido se consideraría amiloidogénico si sus valores están por encima del umbral de 21.4 (línea roja). En AMYLPRED2 los resultados se presentan mediante los símbolos que aparecen debajo de la secuencia peptídica. Un punto rojo indica secuencia amiloidogénica, mientras que un guion negro representa una secuencia no amiloidogénica.

Para confirmar o descartar lo predicho, se llevaron a cabo cinéticas de formación de fibras amiloides de cada péptido, tanto en presencia como en ausencia de Cu(II). Los resultados de estos experimentos se presentan en la Fig. 8 y se observó que ninguno de los dos péptidos agrega a 37°C y una concentración de 125 µM en ausencia y presencia de Cu(II).

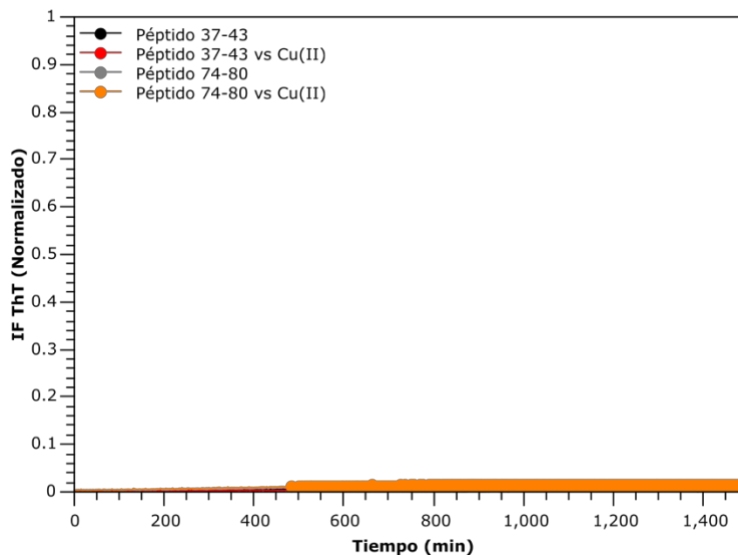


Fig. 8 Cinéticas de formación de fibras amiloides de los fragmentos de R24G. Cinéticas representativa de la agregación de los péptidos en presencia y ausencia de Cu(II). La normalización se realizó tomando como máximo la IF máxima de la proteína R24G.

Desplegamiento térmico de la proteína R24G

Para estudiar si la interacción con los péptidos tiene un efecto en la estabilidad térmica de la proteína se siguió el desplegamiento térmico en presencia de los péptidos y en presencia y ausencia de Cu(II). Los resultados de este experimento se presentan en la Fig. 9 y la Tabla 2, donde se muestran las temperaturas de transición (T_m) de estos procesos junto con el valor p obtenido del análisis estadístico. Se puede observar que los replegamientos presentan histéresis. Para hacer la comparación se utilizaron los datos de T_m de la proteína R24G y del complejo proteína R24G-Cu(II), 45.9 ± 0.1 °C y 33.5 ± 0.2 °C, respectivamente, previamente reportados por nuestro grupo de investigación [30]. Para la proteína R24G en presencia de los péptidos 37-43 y 74-80 se observaron valores de T_m aparentes de 47.2 ± 0.2 °C y 47.3 ± 0.2 °C (Tabla 4), respectivamente los cuales son ligeramente mayores a los anteriormente reportados. De acuerdo con el análisis de t de Student, estos valores son significativamente diferentes a los de la proteína R24G y se podría pensar que los péptidos aumentan la estabilidad térmica de la proteína. En el caso del complejo R24G-Cu(II) en presencia de los péptidos, también se observaron cambios significativos en los valores de T_m , ya que aumentaron a 38.2 ± 0.3 °C y 37.92 ± 1 °C en presencia de los péptidos 37-43 y 74-80, respectivamente. Estos resultados indican que en presencia de los péptidos, la proteína R24G aumenta su estabilidad térmica tanto en ausencia como en presencia de Cu(II).

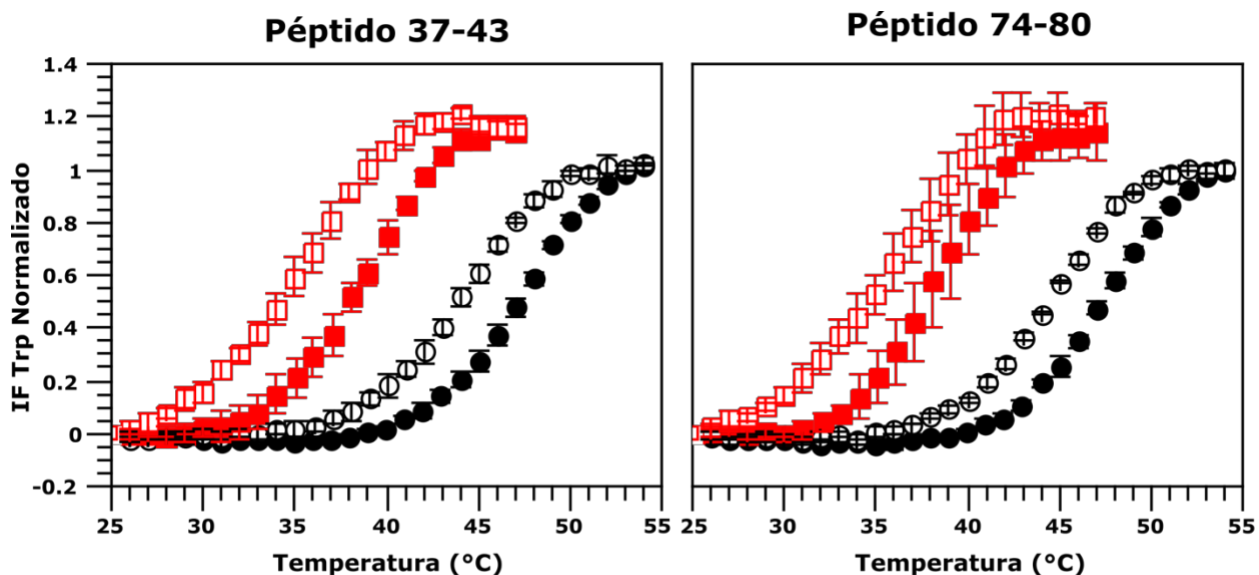


Fig. 9.- Despliegamiento térmico de la proteína R24G en presencia de los péptidos 37-43 y 74-80 y en ausencia y presencia de Cu(II). En el panel de la izquierda se muestra el despliegamiento y replegamiento térmico de la proteína R24G en presencia del péptido 37-43 (círculos negros llenos) y del complejo proteína R24G-Cu(II) en presencia del péptido 37-43 (cuadrados rojos llenos). Los símbolos vacíos representan el replegamiento de cada condición. En el panel derecho se muestra el despliegamiento y replegamiento térmico de la proteína R24G en presencia del péptido 74-80 (círculos negros llenos) y del complejo proteína R24G-Cu(II) en presencia del péptido 74-80 (cuadrados rojos llenos). Los símbolos vacíos representan los replegamientos de cada condición.

Tabla 2.- Tm aparente de la proteína R24G en presencia de los péptidos 37-43 y 74-80 en presencia y ausencia de Cu(II). Se reportan los valores promedio de Tm y los valores p obtenidos del análisis t de Student al comparar a la proteína R24G sola y en presencia de los péptidos y el complejo proteína R24G-Cu(II) contra R24G-Cu(II) con péptidos.

	Proteína R24G vs péptido 37-43	Complejo Proteína R24G-Cu(II) vs péptido 37-43	Proteína R24G vs péptido 74-80	Complejo proteína R24G-Cu(II) vs péptido 74-80
Tm (°C)	47.2 ± 0.2	38.2 ± 0.3	47.3 ± 0.2	37.9 ± 1.0
valor p	0.001***	<0.001***	<0.001***	0.003***

*** p<0.005 diferencia muy significativa

Cambios en la estructura secundaria de la proteína R24G

Para saber si la interacción de los péptidos con la proteína R24G induce cambios en la estructura secundaria de la proteína se colectaron espectros de dicroísmo circular. En la Fig. 10 se presentan los espectros de la proteína R24G en presencia y ausencia de Cu(II). Ambos espectros exhiben un máximo alrededor de 200 nm y un mínimo a 218 nm, características típicas de proteínas con hebras β. La deconvolución de los datos indica que el porcentaje de hélices y hebras β disminuye ligeramente y aumenta el porcentaje de giros y otras estructuras

en presencia de Cu(II) (Tabla 3). La deconvolución de los espectros de los péptidos indica la presencia de estructura secundaria con un alto porcentaje de hojas beta (Tabla 3).

Al examinar el efecto de la interacción de la proteína R24G con el péptido 37-43 en la estructura secundaria (Fig. 11A), se observó que el espectro de la proteína R24G en presencia del péptido presenta un aumento en estructura de hoja beta con respecto a la de proteína R24G sola (Tabla 3). Sin embargo, al sumar los espectros de la proteína R24G y del péptido, el espectro resultante es básicamente idéntico que el experimental, sugiriendo que las diferencias observadas se deben a la suma de ambos espectros y no a cambios en la estructura secundaria.

Asimismo, se evaluaron las diferencias entre el complejo proteína R24G-Cu(II) en ausencia y presencia del péptido 37-43 (Fig. 11B) y se observó un incremento en el porcentaje de estructura hoja beta en presencia del péptido (Tabla 3), pero al sumar los espectros del complejo proteína R24G-Cu(II) con el de la proteína R24G-péptido, se obtuvo básicamente el espectro experimental (Fig. 11B) por lo que no se debe a cambios en la estructura secundaria de la proteína.

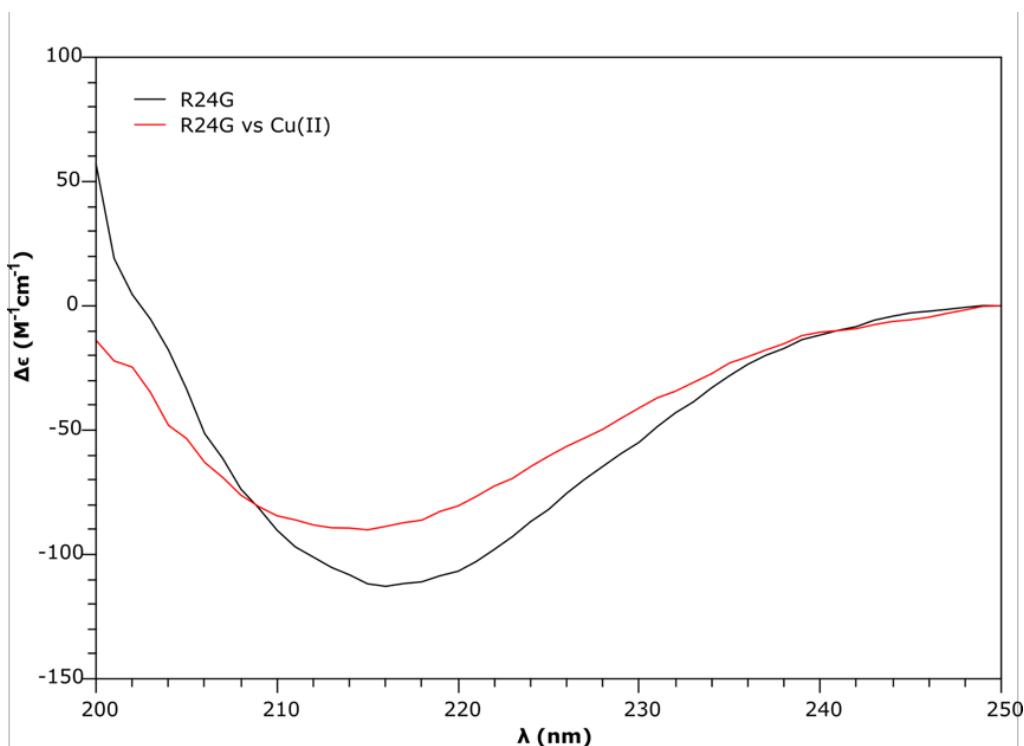


Fig. 10.- Espectros de dicroísmo circular de la proteína R24G en ausencia y presencia de Cu(II). Se muestra el espectro de dicroísmo circular obtenido para la proteína R24G (línea negra) y de la proteína R24G en presencia de Cu(II) (línea roja).

Tabla 3.- Estructura secundaria de la proteína R24G en ausencia y presencia de Cu(II) y/o péptidos

Muestra	% Hélice	% Hebra β antiparalela	% Hebra β paralela	% Giros	% Otros*	RMSD
Proteína R24G	4.7	36.1	0	12.6	46.6	0.026
Proteína R24G-Cu(II)	1.5	30.2	0	17.6	50.7	0.043
Proteína R24G con el péptido 37-43	0	43.1	0	12.5	44.4	0.043
Péptido 37-43	1.6	27.2	0	19.7	51.5	0.07
Péptido 37-43-Cu(II)	0	28	0	19.8	52.2	0.05
Proteína R24G-Cu(II) con péptido 37-43	3	38.3	0	11.7	47	0.052
Péptido 74-80	0.5	28.5	0	20.5	50.5	0.09
Péptido 74-80-Cu(II)	0.5	28.5	0	20.5	50.5	0.09
Proteína R24G con péptido 74-80	0	43	0.5	12.4	44.1	0.052
Proteína R24G-Cu(II) con péptido 74-80	0	44.2	0	12.2	43.6	0.047

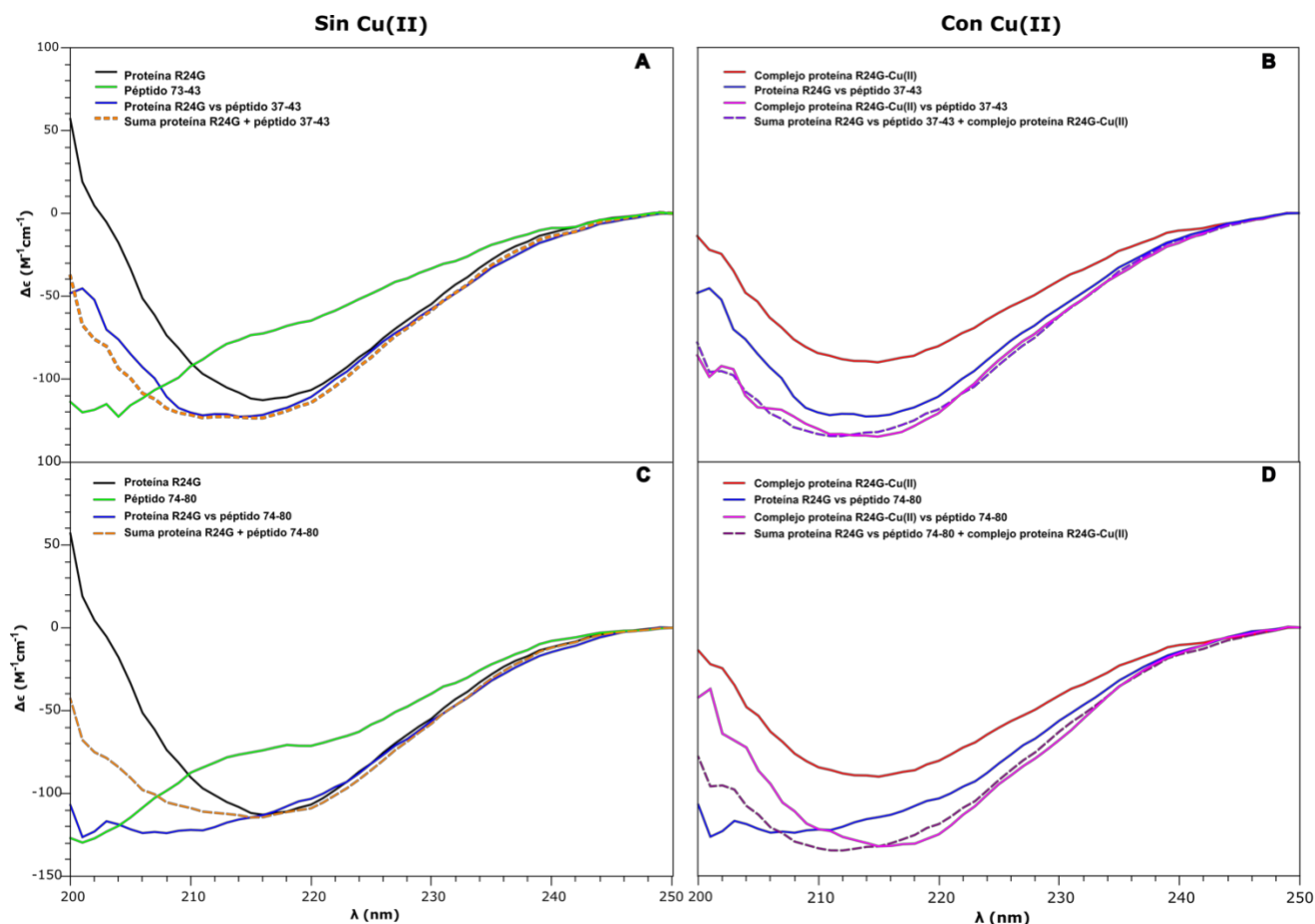


Fig. 11.- Espectros de dicroísmo circular de la proteína R24G en presencia y ausencia de Cu(II) y/o péptidos. En el panel (A) se muestran los espectros de dicroísmo circular de la proteína R24G en ausencia y presencia del péptido 37-43; en (B) se muestran los espectros del complejo proteína R24G-Cu(II) en presencia del péptido 37-43; en el panel (C) se muestran los espectros de dicroísmo circular de la proteína R24G en ausencia y presencia del péptido 74-80; en (D) se muestran los espectros del complejo proteína R24G-Cu(II) en presencia del péptido 74-80.

Por otra parte, al evaluar el efecto de la interacción del péptido 74-80 con la proteína R24G se observó un aumento en el porcentaje de hebras beta, de 36% a 43% (Fig. 11C, Tabla 3). La suma de los espectros del péptido y la proteína no coincide completamente con el espectro experimental (Fig. 11C). Al comparar los espectros del complejo entre la proteína R24G y Cu(II) en ausencia y presencia del péptido se observa un aumento en el porcentaje de hojas beta. Al sumar los espectros de la proteína R24G-Cu(II) con el de la proteína R24G-péptido se obtiene un espectro muy similar al experimental, pero con un ligero corrimiento hacia longitudes de onda más cortas.

Es importante señalar que el espectro de la proteína R24G no presenta la banda característica en 230 nm, atribuida a los residuos aromáticos [52], y los porcentajes de estructura secundaria obtenidos de la deconvolución presentan menor porcentaje de hoja beta comparados con los típicos reportados para esta proteína [30, 53]. Por lo tanto, se puede suponer que la proteína utilizada en este ensayo no se encontraba en el estado nativo.

Cinética de formación de fibras amiloides de la proteína R24G

Se evaluó el efecto de los péptidos en la formación de fibras amiloides de la proteína R24G en presencia y ausencia de Cu(II). En la Fig. 12 se presenta una gráfica representativa de cada proceso. Los tiempos lag obtenidos se detallan en la Tabla 5. En todos los casos se observó la formación de fibras amiloides. El tiempo lag del complejo de la proteína R24G-Cu(II) comparado con el tiempo lag de la proteína R24G no presenta diferencia estadísticamente significativa según el análisis de t de Student. Esto contradice lo que nuestro grupo de investigación reportó sobre el mismo sistema a una concentración de proteína más alta [30]; sin embargo, el valor de la desviación estándar obtenido para la proteína R24G es muy grande, lo cual podría explicar por qué no se observaron cambios significativos. Por otra parte, al analizar las cinéticas en presencia de los péptidos se observan diferencias en los tiempos lag. Los tiempos lag de la proteína R24G aumentan de 312 ± 142 a 518 ± 14 y 750 ± 237 minutos en presencia de los péptidos 37-43 y 74-80, respectivamente. De acuerdo con el análisis de t de Student, las diferencias en los tiempos de latencia son estadísticamente significativas, lo que indica que los péptidos retrasan la formación de fibras amiloides de la proteína R24G.

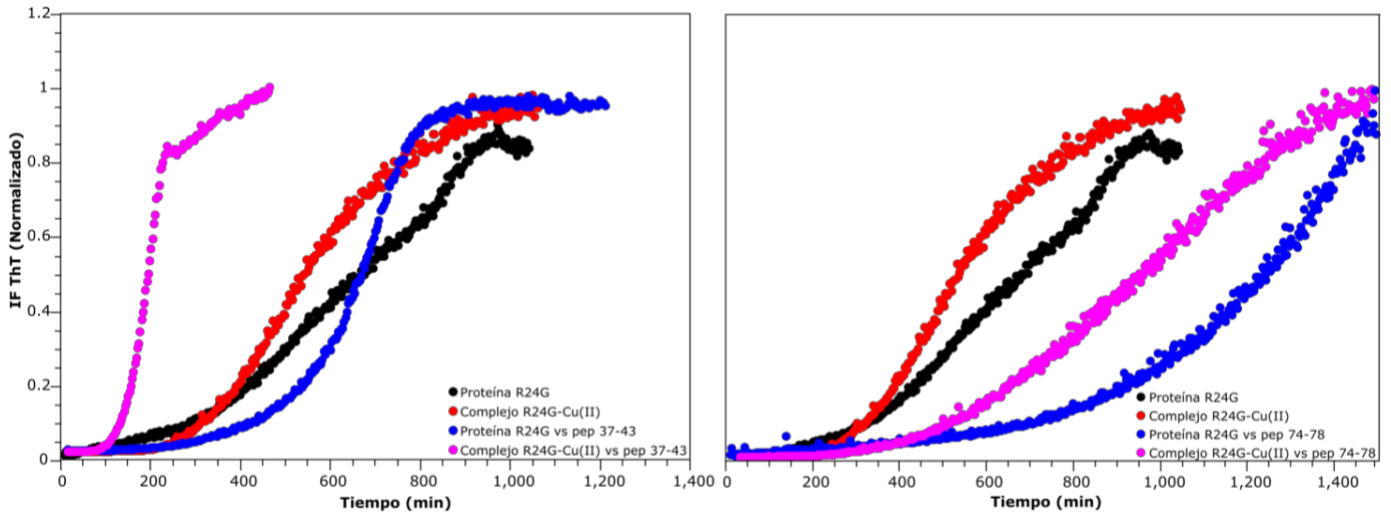


Fig. 12 Cinéticas de agregación de la proteína R24G. Se grafica una cinética representativa de la proteína R24G en cada condición.

Tabla 5.- Tiempos lag del proceso de agregación de la proteína R24G en presencia y ausencia de los péptidos y de Cu(II) En esta tabla se presentan los tiempos lag promedio de las tres réplicas de agregación de cada condición, y el valor p del análisis t de Student del tiempo de latencia de la proteína R24G comparada con la proteína R24G con péptidos o la proteína R24G-Cu(II) comparada con péptidos.

	Proteína R24G		
	Sin péptidos	5eq 37-43	5eq 74-80
t_{lag} (min)	312 ± 142	518 ± 14	750 ± 237
Valor p	--	0.03*	0.03*
	Complejo proteína R24G-Cu(II)		
	Sin péptido	5eq 37-43	5eq 74-80
t_{lag} (min)	270 ± 28	105 ± 40	445 ± 139
Valor p	--	0.002***	0.049*

* p<0.05 diferencia significativa

*** p<0.005 diferencia muy significativa

Por otro lado, los tiempos de latencia del complejo proteína R24G-Cu(II) en presencia de los péptidos 37-43 y 74-80 cambian de 270 ± 28 min a 105 ± 40 min y 445 ± 139 min, respectivamente. De acuerdo con el análisis t de Student sus diferencias son estadísticamente significativas, especialmente para el péptido 37-43. Lo que indica que la interacción del péptido 37-43 con el complejo proteína R24G-Cu(II) acelera la formación de fibras mientras que la presencia del péptido 74-80 retrasa su formación.

Al analizar las cinéticas se observan cambios en la pendiente de la fase exponencial. Por esta razón se determinaron las constantes de velocidad de cada una como se muestran en la Tabla 6 y se analizaron con la prueba t de Student para establecer si hay diferencias significativas. En el caso de la proteína R24G y del complejo de la proteína R24G-Cu(II), a pesar de no haber

observado diferencias significativas en su tiempo de latencia, sí se observaron diferencias en la constante de velocidad, siendo más rápido el proceso de fibrilización en el complejo proteína R24G-Cu(II). Ahora, en presencia de los péptidos, la proteína R24G no presenta diferencias significativas en las constantes de velocidad (Tabla 6), mientras que el complejo proteína R24G-Cu(II), en presencia del péptido 37-43, presenta constantes de velocidad significativamente más altas, lo que indica que la interacción con el péptido no sólo acelera la fase de nucleación, sino también la fase de elongación de las fibras. Para el complejo proteína R24G-Cu(II) en presencia del péptido 74-80 se observaron cambios significativos entre el complejo y el péptido, pero no se observaron cambios entre la proteína R24G y el complejo proteína R24G-Cu(II)-péptido.

Tabla 6.- Constantes de velocidad de la fase exponencial de las cinéticas de formación de fibras amiloides de la proteína R24G. En esta tabla se presentan los valores de las constantes de velocidad (K) de la fase exponencial de la cinética de formación de fibras amiloides de las tres réplicas de cada condición, también se muestra el valor p obtenido por el análisis estadístico de t de Student comparando a la proteína R24G contra péptidos y complejo proteína R24G-Cu(II) contra péptidos.

Equivalentes de péptido	Proteína R24G		
	Sin péptido	5eq 37-43	5eq 74-80
K (1x10⁻³min⁻¹)	1.08 ± 0.25	2.8 ± 1.08	2.12 ± 1.22
Valor p_{R24G}	--	0.055	0.22
Valor p_{R24G-Cu(II)}	0.019*	0.63	0.7
	Complejo proteína R24G-Cu(II)		
	Sin péptido	5eq 37-43	5eq 74-80
K (1x10⁻³min⁻¹)	2.44 ± 0.56	8.21 ± 0.96	1.1 ± 0.1
Valor p_{R24G}	0.019*	<0.001***	0.92
Valor p_{R24G-Cu(II)}	--	<0.001***	0.015*

* p<0.05 diferencia significativa

*** p<0.005 diferencia muy significativa

Acoplamiento molecular de la proteína R24G con los péptidos 37-43 y 74-80

Para tratar de predecir los sitios a los cuales se están uniendo los péptidos en la proteína R24G se realizaron experimentos de acoplamiento molecular. Estos experimentos se corrieron usando el servidor en línea CABS-Dock (<https://biocomp.chem.uw.edu.pl/CABSdock>) [54]. Este servidor realiza acoplamientos moleculares de manera global haciendo uso del modelo de proteína de grano grueso de CABS. Entre las ventajas del uso de este servidor se encuentran la flexibilidad de proteínas, ya que, al utilizar un enfoque de simulación flexible, permite que las proteínas se muevan y se adapten durante el proceso de acoplamiento. También se puede mencionar la rapidez y la precisión de sus resultados, ya que explora de manera exhaustiva el espacio

conformacional de los péptidos y evalúa múltiples posiciones u orientaciones en el complejo proteína-péptido [54]. Antes de llevar a cabo el experimento, se obtuvieron los *clusters* de la dinámica molecular de la proteína R24G con corte en 0.13 nm en el C α . Los resultados de este experimento se muestran en la Fig 13A. Se obtuvieron 7 clusters de los cuales se eligió al cluster más poblado para realizar los acoplamientos.

Se ha reportado que el bucle C-C' es importante para el mecanismo antiagregación de la proteína y además es uno de los primeros en desplegarse cuando la proteína R24G se encuentra a 37° [55]. Es por eso que también se analizó el caso de la proteína con este bucle desplegado. La comparación de ambas estructuras se muestra en la Fig 13B.

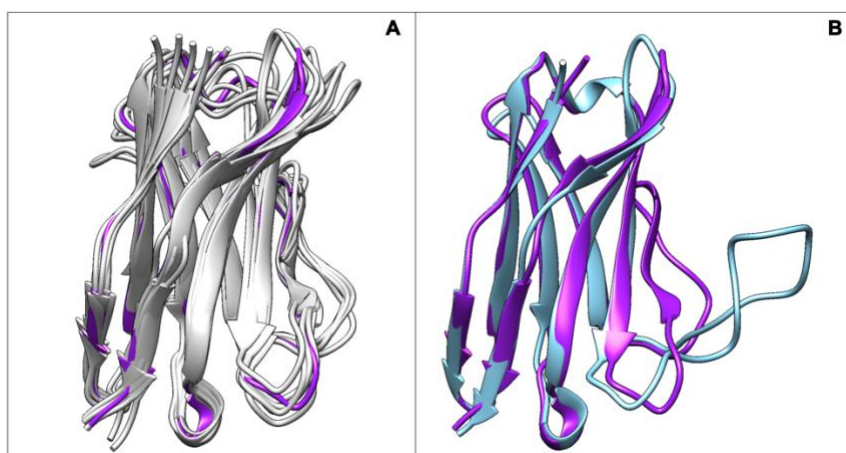


Fig. 13 Estructuras a las que se realizó el acoplamiento molecular de la proteína R24G. En A se muestran los *clusters* obtenidos de la proteína R24G con corte en 0.13 nm, en color magenta se resalta la estructura del *clúster* más poblado. En B se muestra una comparación entre la estructura del *cluster* más poblado (morado) y la estructura con el bucle C-C' modificada obtenida por el servidor Chimera [49] (azul).

Con el fin de estudiar los sitios de unión preferidos para cada uno de los péptidos en las dos condiciones de la proteína se analizaron los contactos entre las estructuras de clúster obtenidas por el servidor CABS-Dock entre el péptido y la proteína. Los resultados se muestran en la Fig. 14.

En la estructura nativa se puede observar que ambos péptidos muestran una preferencia por unirse entre los residuos 33 a 49, correspondientes a la hebra C y el bucle C-C', y a los aminoácidos 89 a 106, correspondientes a la hebra F, G y el loop que conecta a ambos. Por otra parte, al evaluar la interacción con la proteína con el bucle C-C' modificado, el péptido 74-80 se unió prácticamente a toda la proteína sin una preferencia marcada.

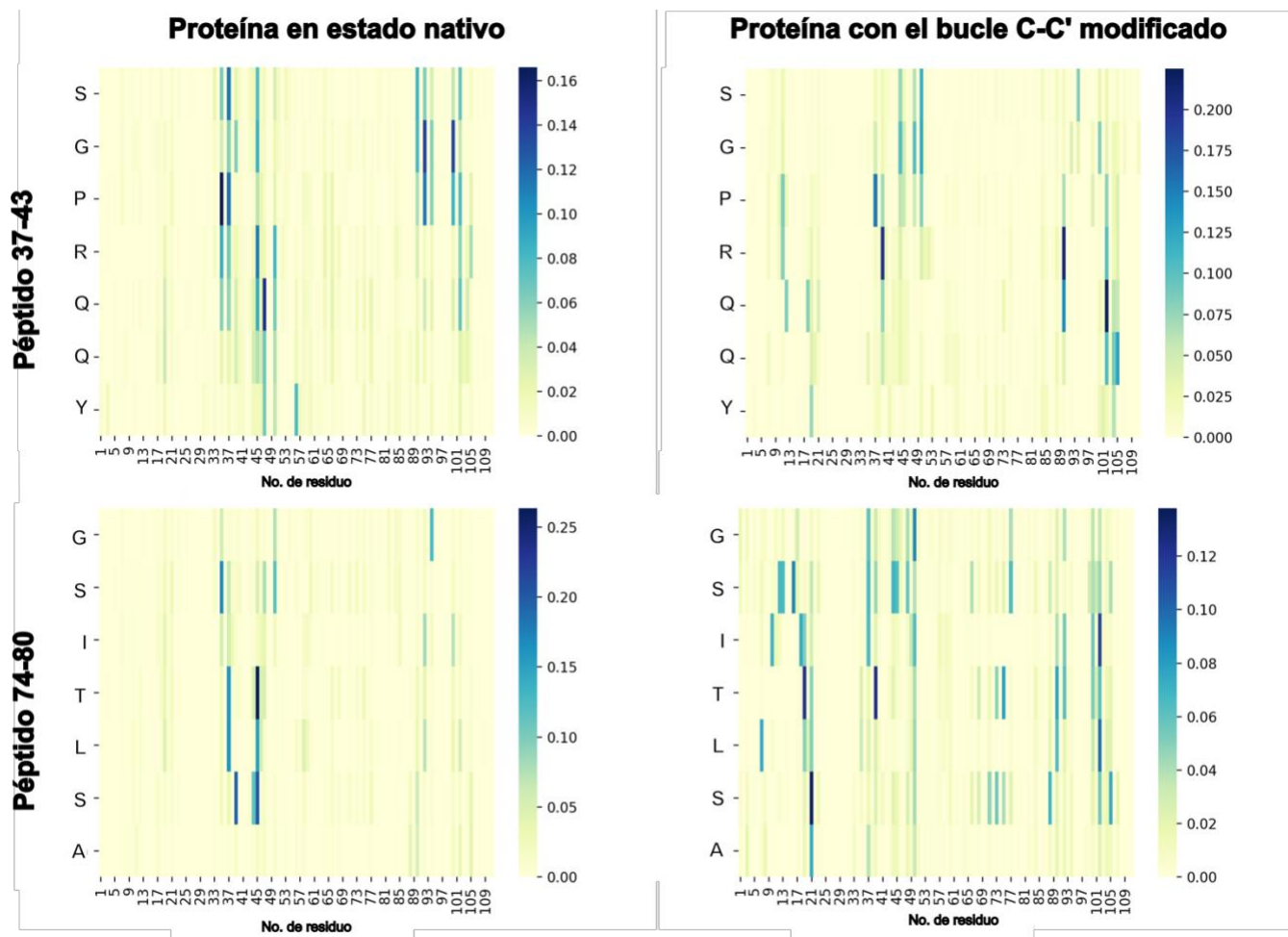


Fig. 14 Contactos entre los péptidos con las diferentes conformaciones de la proteína R24G obtenidos del acoplamiento molecular

En la Fig. 15 se muestran las estructuras con la mejor pose obtenidas de la interacción del péptido 37-43 con la proteína R24G en estado nativo (Fig. 15A) y con el bucle C-C' modificado (Fig. 15B). Cuando la proteína se encuentra en estado nativo, el péptido 37-43 se une a aminoácidos que se encuentran en las hebras C, C', F y G y en el CDR2 (Fig. 15C). Cuando la proteína cambia de conformación a una con el bucle C-C' desplegado, el péptido se une a residuos en las hebras A, C, C', F, G y el bucle C-C'. A pesar de no interactuar exactamente con los mismos aminoácidos en ambos casos, se puede observar que se une a las regiones descritas en los contactos globales.

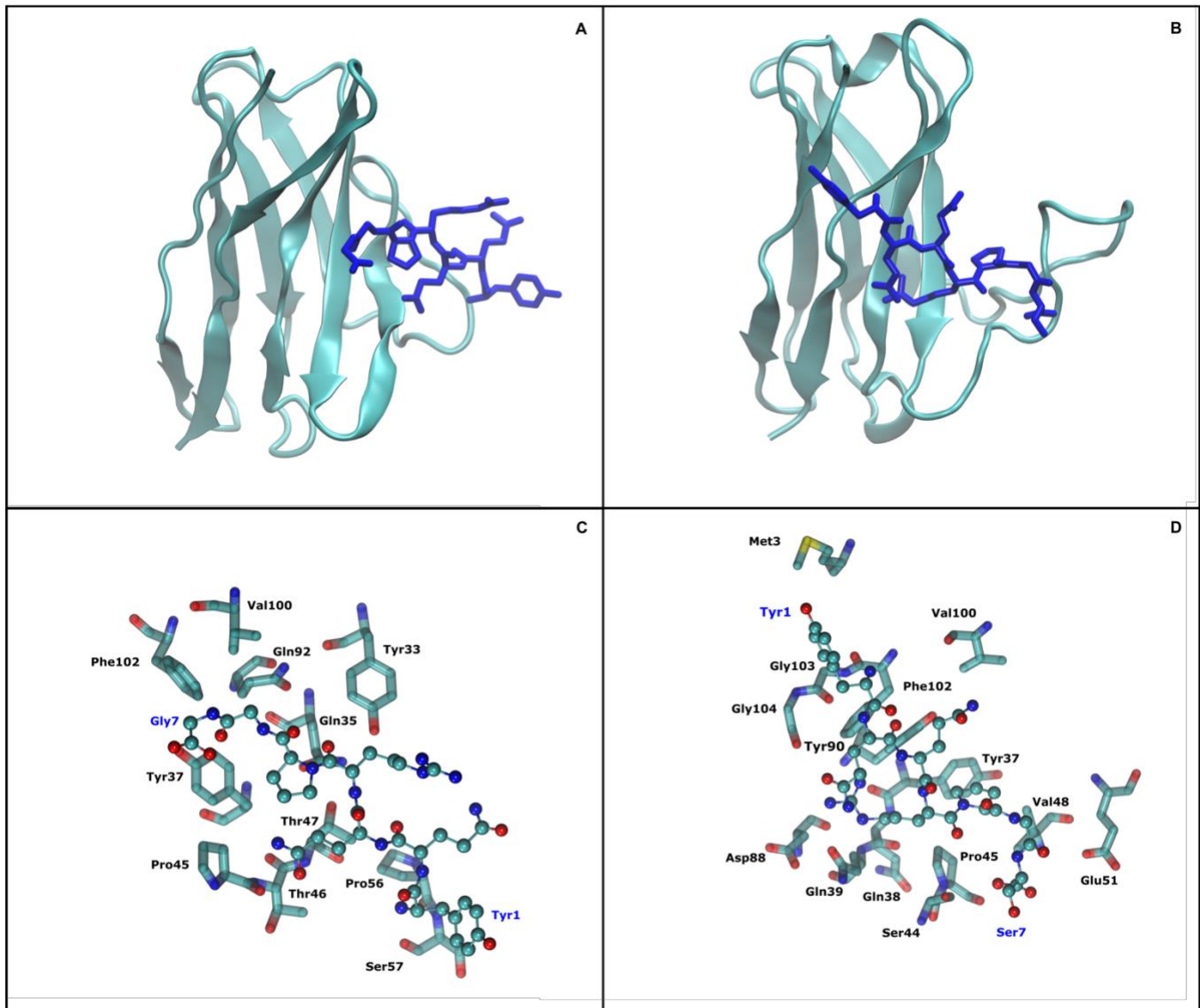


Fig. 15 Mejor pose de la interacción de la proteína R24G con el péptido 37-43 obtenidos del acoplamiento molecular. En el panel A se muestra la mejor pose de la interacción de la proteína en estado plegado con el péptido 37-43; en el panel C se muestran los contactos del péptido, en representación de esferas, con los aminoácidos de la proteína con una distancia menor a 5 Å, en representación de cilindros. En B se observa la mejor pose obtenida de la interacción de la proteína con el bucle C-C' modificado; en D se muestran los contactos del péptido con los aminoácidos en la proteína.

Además, en la Fig. 16 se muestra la mejor pose obtenida de la interacción del péptido 74-80 con la proteína R24G en estado nativo (Fig. 16A) y con el bucle C-C' desplegado (Fig. 16B). Cuando la proteína R24G se encuentra totalmente plegada, el péptido 74-80 se une a aminoácidos que se encuentran en las hebras C, F y G y en el bucle C-C' (Fig. 16C). A diferencia del péptido anterior, cuando la proteína cambia de conformación, el péptido se une a residuos en las hebras A, B, E, G y el bucle D-E. Confirmando así que los sitios de unión preferidos por el péptido cambian cuando la proteína no se encuentra en el estado nativo.

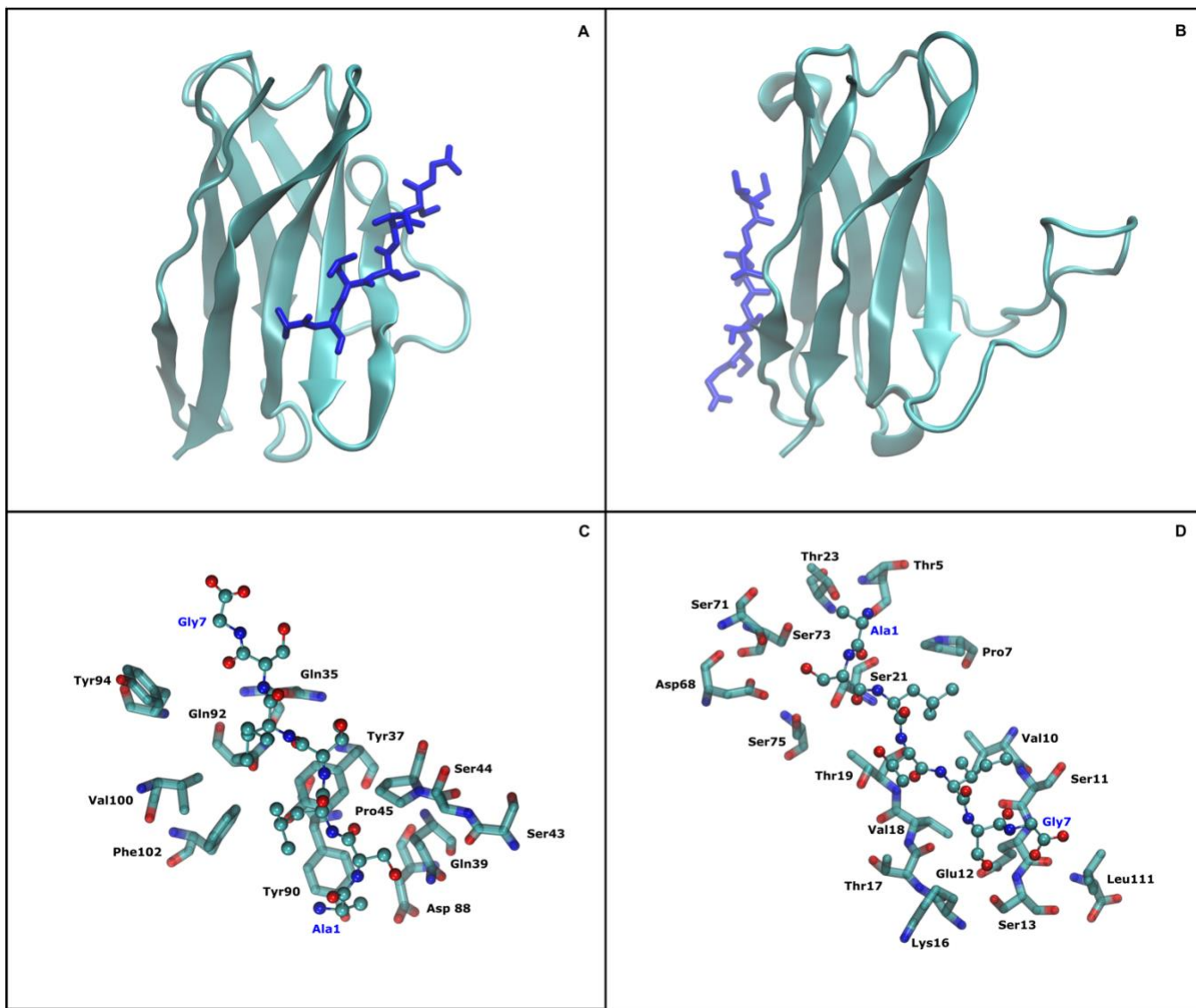


Fig. 16 Mejor pose de la interacción de la proteína R24G con el péptido 74-80 obtenidos del acoplamiento molecular. En el panel A se muestra la mejor pose de la interacción de la proteína en estado plegado con el péptido 74-80; en el panel C se muestran los contactos del péptido, en representación de esferas, con los aminoácidos de la proteína, en representación de cilindros, con una distancia menor a 5 Å. En B se observa la mejor pose obtenida de la interacción del péptido con la proteína con el bucle C-C' modificado; en D se muestran los contactos del péptido con los aminoácidos en la proteína.

6.- Discusión

La amiloidosis de cadena ligera es la amiloidosis sistémica más común; sin embargo, a la fecha, su diagnóstico y tratamiento continúa siendo un reto para el personal de salud, no sólo porque al ser una amiloidosis sistémica la falla multiorgánica hace que los pacientes presenten un cuadro poco específico para el diagnóstico, sino que además, la naturaleza de las proteínas precursoras de esta enfermedad hace que cada paciente presente proteínas con una gran diversidad a nivel de secuencia. A pesar de esto, se ha reportado que la familia $\lambda 6$ es una de las más presentes en individuos con la enfermedad [18], y que aproximadamente una cuarta parte de los pacientes con sobreexpresión de esta familia presentan la mutación de Arg 24 a Gly (R24G) [19]. El efecto de esta mutación en la proteína 6a fue descrito en 2017, se reportó que este cambio conduce a una pérdida de interacción entre la Arg24 y la Phe2, el cual se encuentra en el extremo amino terminal de la proteína haciendo que éste último se vuelva más lábil, además de tener un efecto en la pérdida de interacciones con el *bucle* CDR1 que conduce a la desestabilización final del *bucle* C-C", el cual parece ser importante en el mecanismo antiagregación de la proteína [31]. A la fecha, se ha reportado en la base de datos del PDB una estructura de fibra amiloide proveniente del corazón de un paciente con amiloidosis de cadena ligera (PDB ID:6HUD) donde se puede observar la mutación en la proteína R24G [56].

Por otra parte, en el 2020 se reportó que la proteína R24G es capaz de interactuar con 2 equivalentes de Cu(II), en las histidinas 8 y 99, y que esta interacción hace que la proteína sea un 30% menos estable térmicamente y forme fibras amiloides *in vitro* más rápido. Se planteó, mediante simulaciones de dinámica molecular, que el mecanismo que lleva a esta desestabilización es la unión del Cu(II) a la His99 induciendo la pérdida de aún más interacciones en el CDR1 de la proteína lo que llevaba de nuevo a una desestabilización del *bucle* C-C" [30]. Sin embargo, también se sabe que este efecto desestabilizador, principalmente en la formación de fibras amiloides, requiere la unión de los dos equivalentes Cu(II) a la proteína lo que presumiblemente habla de un proceso cooperativo [57].

En este estudio, se evaluó el impacto de dos péptidos en la agregación y estabilidad de la proteína R24G. Estos péptidos fueron seleccionados debido a los resultados prometedores obtenidos previamente en la proteína SMA [32, 33]. Los autores de estos estudios reportaron que la relación mínima necesaria para observar estos efectos era de 1:5 proteína:péptido [32]. Por lo tanto, en todos los experimentos realizados en este trabajo, se mantuvo esa relación.

Los péptidos analizados se encuentran en regiones que son importantes para la agregación de la proteína. La secuencia que contiene al péptido 37-43 se encuentra entre la hebra C y el bucle que conecta a las hebras C-C', el cual se ha reportado como uno de los primeros en desnaturalizarse a 37°C [55], mientras que la secuencia 74-80 se encuentra principalmente en la hebra E y una pequeña parte en el bucle que conecta a esta hebra con la hebra F; esta región también se ha reportado como una de las primeras en desplegarse en la proteína a 37°C y es la primera en desplegarse cuando la proteína se encuentra en condiciones ácidas [55].

Efecto de los péptidos en el desplegamiento térmico de la proteína R24G

Los resultados de T_m indican que la interacción de la proteína con los péptidos incrementa la estabilidad térmica aproximadamente 2°C, mientras que la interacción de los péptidos con el complejo proteína R24G-Cu(II) induce un aumento de la T_m de aproximadamente 5°C, indicando que la unión de los péptidos al complejo estabiliza térmicamente a la proteína. Este cambio puede deberse a que el péptido se une a una región de la proteína que permite que el Trp36 permanezca cerca del puente disulfuro a mayores temperaturas durante el desplegamiento. Esto estaría en concordancia con estudios que indican que la estabilidad térmica de la proteína R24G sólo refleja la capacidad del Trp 36 de separarse del puente disulfuro, lo cual puede ocurrir en diferentes intermediarios conformacionales [55].

Cambios en la estructura secundaria de la proteína R24G inducidos por los péptidos.

Los espectros de dicroísmo circular corresponden a los de una proteína rica en hojas beta, tal como se espera para la proteína R24G; sin embargo, no se observa la señal a 230 nm característica de esta proteína, la cual se atribuye al *clúster* de residuos aromáticos presentes en la proteína [52], lo que podría sugerir que la proteína presenta una dinámica global diferente a la observada en estudios anteriores. Por otra parte, el espectro de dicroísmo circular del complejo R24G-Cu(II) indica que existen diferencias en el porcentaje de estructura secundaria comparado con la proteína R24G sola, lo cual contradice lo reportado [30]. Esto puede deberse a que la proteína utilizada no estaba en la misma conformación en los dos experimentos, lo cual está en concordancia con la pérdida de la señal a 230 nm. Partiendo de esta premisa, es complicado explicar los cambios observados en los espectros de dicroísmo circular de la

proteína en presencia de los péptidos 37-43 o 74-80, pues los cambios conformacionales podrían deberse a interacciones no nativas.

A pesar de lo anterior, se intentó justificar lo observado. En la interacción de la proteína R24G con el péptido 37-43 no se observan cambios en la estructura secundaria de la proteína, ya que el espectro experimental es el resultado de la suma del espectro de la proteína R24G más el de 37-43. Por otro lado, el espectro de dicroísmo circular del complejo proteína R24G-Cu(II) en presencia del péptido 37-43 es la suma de los espectros del complejo proteína R4G-Cu(II) más el espectro de la proteína R24G en presencia de 37-43, lo que sugiere que se deben sumar los espectros de las mezclas, tal vez debido a que la interacción del péptido con la proteína R24G estabiliza intermediarios más compactos, lo cual está en concordancia con lo observado en los estudios de estabilidad térmica.

Por su parte, la interacción de la proteína R24G con el péptido 74-80 conduce a espectros de dicroísmo circular que no son la suma de los espectros individuales, ni de las mezclas. Por lo tanto, es posible que esta interacción sí está induciendo cambios en la estructura secundaria de la proteína en un estado no nativo. Por el contrario, la interacción del complejo proteína R24G-Cu(II) con el péptido 74-80 muestra espectros de dicroísmo circular muy parecidos a la suma de los espectros de las mezclas, con un ligero corrimiento a menores energías. Esto podría significar que el efecto observado en el espectro de dicroísmo circular no se debe a un cambio conformacional inducido por el péptido, sino que, se debe a una suma de espectros.

Efecto de los péptidos en la cinética de formación de fibras amiloides

El efecto observado de estos péptidos en la cinética de formación de fibras de la proteína R24G, contrario a lo reportado para la proteína SMA, fue que, en las condiciones estudiadas, ninguno de los péptidos logró inhibir el proceso de formación de fibras amiloides, sólo lo retrasaron. Esto puede indicar que los procesos que llevan a las proteínas a formar estos intermediarios de agregación son diferentes a pesar de tratarse de dos cadenas ligeras de inmunoglobulina muy parecidas en estructura.

En el caso del péptido 37-43, se observó un aumento en el tiempo de latencia, pero no se observaron diferencias significativas en la fase de elongación. Esto podría indicar que el péptido interactúa con una región de la proteína, presumiblemente el bucle C-C', que hace que llegue a una conformación amiloidogénica crítica de manera más lenta. Sin embargo, una vez que se

alcanza dicha conformación, la proteína es capaz de formar las fibras a la misma velocidad que cuando no se encuentra presente el péptido.

Por otra parte, cuando la cinética se hace en presencia de Cu(II) el efecto del péptido 37-43 es el contrario, pues el proceso de formación de fibras amiloides es significativamente más rápido, lo cual se refleja en una caída de aproximadamente un tercio en el tiempo lag, y una constante de velocidad en la fase de elongación aproximadamente 8 veces mayor. Una posible explicación de lo observado es un efecto en la dinámica de la proteína *per se*, ya que como se reportó anteriormente, cuando el Cu(II) forma un complejo con la proteína se pierden interacciones importantes que la llevan a ser menos estable y más propensa a formar fibras amiloides [30]. Dentro de los cambios observados se encuentra la desestabilización del bucle C-C', lo que podría llevar a que el péptido se una en esa región y aumente la desestabilización, conduciendo a la formación de fibras amiloides más rápido. Otra posibilidad es que haya otras regiones afectadas por la interacción con Cu(II), por lo tanto la proteína podría tener una mayor dinámica y el efecto compensatorio de la unión del péptido ya no es suficiente para retrasar la formación de fibras, e incluso puede llevarla a un estado que promueva la amiloidogenicidad. Además, hay que recordar que el péptido 71-77 de SMA no tuvo efecto en la agregación de la proteína en ausencia de Cu(II) [32], lo que refuerza la hipótesis de que el mecanismo que lleva a la agregación de estas dos proteínas es diferente.

El análisis de la interacción de la proteína R24G con el péptido 74-80 muestra retraso en la formación de fibras amiloides, pues el tiempo lag aumenta aproximadamente al doble, pero no se observan diferencias en la fase de elongación. Esto podría deberse a que el péptido se está uniendo a una región de la proteína que retrasa la formación de un intermediario crítico, pero una vez formado, la elongación fibrilar no es afectada por la presencia del péptido. Por su parte, la adición del péptido 74-80 al complejo proteína R24G-Cu(II) también retrasa la formación de fibras amiloides. En este caso, los tiempos de latencia y las constantes de velocidad de la fase de elongación del complejo R24G-Cu(II) con el péptido se parecen considerablemente a los de la proteína R24G sola y difieren significativamente de los del complejo de la proteína R24G-Cu(II). Por lo tanto, se sugiere que el péptido compite con la proteína por el Cu(II), imposibilitando que esté último se una a la proteína R24G y eliminando el efecto del ion metálico sobre la agregación de la proteína. Sin embargo, hacen falta más estudios para comprobar esta premisa.

Predicción de los sitios de unión de los péptidos a la proteína R24G mediante acoplamiento molecular.

Según los resultados obtenidos por el acoplamiento molecular se observó que, en la proteína nativa, ambos péptidos se unen preferencialmente a la hebra C, el bucle C-C', las hebras F y G. Estas regiones se han reportado como importantes para el mecanismo antiagregación de las cadenas ligeras [31].

Para el péptido 74-80, se postula que su unión a regiones específicas de la proteína provoca un retraso en la formación de fibras amiloides cuando interactúa con la proteína R24G. Sin embargo, una vez que la proteína logra adoptar un estado parcialmente desplegado, como se evidencia en este estudio, el péptido ya no se une de manera selectiva a estas regiones, lo que permite que la proteína inicie su proceso de agregación normal. Por lo tanto, no se observan cambios significativos en la constante de velocidad, pero sí en su tiempo de latencia. Respecto a la interacción de este péptido con el complejo proteína R24G-Cu(II), se sugiere que inicialmente logra interactuar con el complejo, lo que se refleja en una mejora en la estabilidad térmica y un espectro de dicroísmo circular similar a la suma de los espectros individuales del complejo proteína R24G-Cu(II) y R24G-péptido. Sin embargo, cuando la proteína adopta conformaciones no nativas, el péptido pierde afinidad por la proteína y comienza a competir por el Cu(II). Aunque se requieren más estudios para medir la afinidad por el Cu(II) de estas dos especies, se sugiere que el péptido es capaz de capturar el Cu(II) de la proteína, lo que podría explicar por qué en esta condición la cinética de formación de fibras amiloides se asemeja más a la de la proteína R24G sola.

Por otro lado, se requieren más estudios para comprender el papel del péptido 37-43 en el proceso de formación de fibras amiloides de la proteína R24G. Hasta el momento se propone que, en su estado plegado, el péptido se une preferentemente a sitios protectores de la agregación de la proteína R24G, específicamente a las hebras C, C', G y el bucle C-C'. Sin embargo, y a diferencia del péptido anterior, en este caso no parece haber un cambio significativo en los sitios de unión preferentes, independientemente de si la proteína se encuentra completamente plegada o con el bucle C-C' expuesto. Todo esto sugiere que la unión del péptido a estos sitios antiagregación no es suficiente para evitar la formación de fibras amiloides, pues cuando la proteína continúa con los cambios conformacionales, comienza a exponer otras regiones que parecen ser también importantes para la formación de fibras. De

hecho, según lo observado en el complejo proteína R24G-Cu(II), mantener cubiertas estas partes parece ser un factor clave para acelerar el proceso de formación de fibras, lo que señala la importancia de futuras investigaciones en este campo.

Aunque aún quedan más estudios por realizar para lograr caracterizar completamente el efecto de estos péptidos en la formación de fibras amiloides de la proteína R24G, este estudio resalta la importancia de investigar el papel de diferentes péptidos que sean capaces de inhibir o retrasar este proceso. Estos estudios podrían proporcionar información crucial sobre el mecanismo mediante el cual esta proteína cambia de una conformación nativa a una formación fibrilar y al comprender mejor este proceso, se pueden abrir nuevas vías para el desarrollo de terapias y tratamientos contra enfermedades relacionadas con la formación de fibras amiloides. Además, este estudio destaca el potencial de los péptidos como herramientas terapéuticas para modular la agregación de proteínas y proporciona una base sólida para investigaciones futuras en este campo.

7.- Conclusiones

- Ambos péptidos mejoran la estabilidad térmica de la proteína R24G en ausencia y en presencia de Cu(II).
- El péptido 37-43 retrasa la formación de fibras amiloides de la proteína R24G; sin embargo, acelera la formación de fibras del complejo R24G-Cu(II).
- El péptido 74-80 retrasa la formación de fibras amiloides de la proteína R24G en presencia y ausencia de Cu(II).
- De acuerdo con los estudios de docking molecular de la conformación nativa de la proteína R24G, ambos péptidos se unen preferentemente las hebras C, C' y el bucle C-C'. Mientras que en una conformación con el bucle C-C' desplegado, el péptido 37-43 conserva los sitios de unión, pero el péptido 74-80 no presenta sitios de unión preferentes.

8.- Perspectivas

- Evaluar el efecto de los péptidos 37-43 y 74-80 en la estructura secundaria de la proteína R24G en estado nativo.
- Evaluar otros fragmentos peptídicos que con potencial inhibidor en el mecanismo antiagregación de la proteína R24G.
- Determinar los parámetros fisicoquímicos de la interacción de estos fragmentos peptídicos con las proteínas.
- Evaluar los sitios de mayor afinidad de unión de los péptidos a las proteínas.
- Caracterizar el mecanismo de inhibición de la formación de fibras amiloides de la proteína R24G luego de la interacción con los fragmentos peptídicos.

9.- Bibliografía

- [1] J. B. Reece, L. A. Urry y M. L. Cain, Campbell biology, Pearson, 2017.
- [2] A. H. Martinelli, F. C. Lopes, E. B. John, C. R. Carlini y R. Ligabue-Braun, «Modulation of disordered proteins with a focus on neurodegenerative diseases and other pathologies.,» *International journal of molecular sciences*, vol. 20, nº 6, p. 1322, 2019.
- [3] D. M. Fowler, A. V. Koulov, W. E. Balch y J. W. Kelly, «Functional amyloid—from bacteria to humans,» *Trends in biochemical sciences*, vol. 32, nº 5, pp. 217-224, 2007.
- [4] X. Fernandez-Busquets, N. S. de Groot, D. Fernandez y S. Ventura, «Recent structural and computational insights into conformational diseases.,» *Current medicinal chemistry*, vol. 15, nº 13, pp. 1336-1349, 2008.
- [5] R. R. Kopito and D. Ron, "Conformational disease.,» *Nature cell biology*, vol. 2, no. 11, pp. E207-E209, 2000.
- [6] G. Merlini and V. Bellotti, "Molecular mechanisms of amyloidosis," *New England Journal of Medicine*, vol. 349, no. 6, pp. 583-596, 2003.
- [7] A. D. Wechalekar, J. D. Gillmore and P. N. Hawkins, "Systemic amyloidosis," *The Lancet*, vol. 387, no. 10038, pp. 2641-2654, 2016.
- [8] D. S. Eisenberg y M. R. Sawaya, «Structural studies of amyloid proteins at the molecular level.,» *Annual review of biochemistry*, vol. 86, pp. 69-95, 2017.
- [9] B. JN, D. A, E. DS, F. M, M. G, S. MJM, S. Y y W. P., «Amyloid nomenclature 2022: update, novel proteins, and recommendations by the International Society of Amyloidosis (ISA) Nomenclature Committee.,» *Amyloid*, vol. 29, nº 4, pp. 213-219, 2022.
- [10] G. Merlini, A. Dispenzieri, V. Santhorawala, S. O. Schönland, G. Palladini, P. N. Hawkins and M. A. Gertz, "Systemic immunoglobulin light chain amyloidosis.,» *Nature reviews Disease primers*, vol. 4, no. 1, pp. 1-19, 2018.
- [11] F. Chiti y C. M. Dobson, «Protein misfolding, amyloid formation, and human disease: a summary of progress over the last decade.,» *Annual review of biochemistry*, vol. 86, pp. 27-68, 2017.
- [12] A. Solomon y D. T. Weiss, «Protein and host factors implicated in the pathogenesis of light chain amyloidosis (AL amyloidosis),» *Amyloid*, vol. 2, nº 4, pp. 269-279, 1995.
- [13] R. M. Absmeier, G. J. Rottenaicher, H. L. Svilenov, P. Kazman y J. Buchner, «Antibodies gone bad—the molecular mechanism of light chain amyloidosis,» *The FEBS Journal*, 2022.
- [14] S. Mahmood, G. Palladini, V. Santhorawala y A. Wechalekar, «Update on treatment of light chain amyloidosis,» *haematologica*, vol. 99, nº 2, p. 209, 214.
- [15] N. Kumar, N. J. Zhang, D. Cherepanov, D. Romanus, M. Hughes y D. V. Faller, «Global epidemiology of amyloid light-chain amyloidosis,» *Orphanet Journal of Rare Diseases*, vol. 17, nº 1, p. 278, 2022.
- [16] A. K. Abbas, A. H. Lichtman y S. Pillai, «Antigen Recognition in the Adaptive Immune System,» de *Basic Immunology. Functions and Disorders of the Immune System*, Elsevier, 2016, pp. 79-102.
- [17] B. Alberts, *Molecular Biology of the Cell*, 6 ed., Taylor and Francis Group, 2015.

- [18] M. Ramirez-Alvarado, «Amyloid formation in light chain amyloidosis,» *Current topics in medicinal chemistry*, vol. 12, n° 22, pp. 2523-2533, 2012.
- [19] L. del Pozo Yauner, E. Ortiz, R. Sánchez, R. Sánchez-López, L. Güereca, C. L. Murphy, ... and B. Becerril, "Influence of the germline sequence on the thermodynamic stability and fibrillogenicity of human lambda 6 light chains.," *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, vol. 72, no. 2, pp. 684-692, 2008.
- [20] M. González-Andrade, B. Becerril-Luján, R. Sánchez-López, H. Ceceña-Álvarez, J. I. Pérez-Carreón, E. Ortiz, ... and L. del Pozo-Yauner, "Mutational and genetic determinants of λ 6 light chain amyloidogenesis," *The FEBS journal*, vol. 280, no. 23, pp. 6173-6183, 2013.
- [21] E. Rudiño-Piñera, Á. E. Peláez-Aguilar, C. Amero and A. Díaz-Vilchis, "Crystal structure of 6aJL2-R24G light chain variable domain: Does crystal packing explain amyloid fibril formation?," *Biochemistry and biophysics reports*, vol. 20, p. 100682, 2019.
- [22] R. Maya-Martínez, P. Gil-Rodríguez and C. Amero, "Solution structure of 6aJL2 and 6aJL2-R24G amyloidogenic light chain proteins," *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 456, no. 2, pp. 695-699, 2015.
- [23] O. D. Luna-Martínez, A. Hernández-Santoyo, M. I. Villalba-Velázquez, R. Sánchez-Alcalá, D. A. Fernández-Velasco y B. Becerril, «Stabilizing an amyloidogenic λ 6 light chain variable domain,» *The FEBS Journal*, vol. 284, n° 21, pp. 3702-3717, 2017.
- [24] A. Kessel and N. Ben-Tal, *Introduction to proteins: Structure, function, and motion*, Second ed., CRC Press, 2018.
- [25] L. Rivillas-Acevedo, C. Sánchez-López, C. Amero and L. Quintanar, "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*, vol. 54, no. 8, pp. 3788-3796, 2015.
- [26] T. Miura, K. Suzuki, N. Kohata and H. Takeuchi, "Metal binding modes of Alzheimer's amyloid β -peptide in insoluble aggregates and soluble complexes," *Biochemistry*, vol. 39, no. 23, pp. 7024-7031, 2000.
- [27] V. N. Uversky, J. Li and A. L. Fink, "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*, vol. 276, no. 47, pp. 44284-44296, 2001.
- [28] P. J. Bjorkman, M. A. Saper, B. Samraoui, W. S. Bennett, J. T. Strominger y D. C. Wiley, «Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2,» *Nature*, vol. 329, n° 6139, pp. 506-512, 1987.
- [29] J. Villanueva, M. Hoshino, H. Katou, J. Kardos, K. Hasegawa, H. Naiki y Y. Goto, «Increase in the conformational flexibility of β 2-microglobulin upon copper binding: A possible role for copper in dialysis-related amyloidosis,» *Protein Science*, vol. 13, n° 3, pp. 797-809, 2004.
- [30] A. E. Peláez-Aguilar, G. Valdés-García, L. French-Pacheco, N. Pastor, C. Amero and L. Rivillas-Acevedo, "Site-Specific Interactions with Copper Promote Amyloid Fibril Formation for λ 6aJL2-R24G," *ACS omega*, vol. 5, no. 13, pp. 7085-7095, 2020.
- [31] Valdés-García, G., C. Millan-Pacheco and N. Pastor, "Convergent mechanisms favor fast amyloid formation," *Biopolymers*, vol. 107, no. 8, p. e23027, 2017.

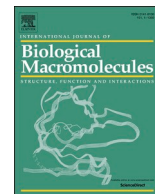
- [32] D. P. Davis, R. Raffin, J. L. Dul, S. M. Vogen, E. K. Williamson, F. J. Stevens y Y. Argon, «Inhibition of amyloid fiber assembly by both BiP and its target peptide,» *Immunity*, vol. 13, n° 4, pp. 433-442, 2000.
- [33] D. P. Davis, G. Gallo, S. M. Vogen, J. L. Dul, K. L. Sciarretta, A. Kumar, ... y Y. Argon, «Both the environment and somatic mutations govern the aggregation pathway of pathogenic immunoglobulin light chain,» *Journal of molecular biology*, vol. 313, n° 5, pp. 1021-1034, 2001.
- [34] P. Stevens, R. Raffin, D. Hanson, Y. Deng, M. Berrios-Hammond, F. Westholm, M. Schiffer, F. Stevens, C. Murphy, A. Solomon y M. Eulitz, «Recombinant immunoglobulin variable domains generated from synthetic genes provide a system for in vitro characterization of light-chain amyloid proteins.,» *Protein Science*, n° 3, pp. 421-432, 1995.
- [35] M. J. Gething, «Role and regulation of the ER chaperone BiP,» *In Seminars in cell & developmental biology*, vol. 10, n° 5, pp. 465-472, 1999.
- [36] A. E. Pelaez-Aguilar, L. Rivillas-Acevedo, L. French-Pacheco, G. Valdes-Garcia, R. Maya-Martinez, N. Pastor y C. Amero, «Inhibition of light chain 6aJL2-R24G amyloid fiber formation associated with light chain amyloidosis,» *Biochemistry*, vol. 54, n° 32, pp. 4978-4986, 2015.
- [37] F. Madeira, M. Pearce, A. R. Tivey, P. Basutkar, J. Lee, O. Edbali, ... y R. Lopez, «Search and sequence analysis tools services from EMBL-EBI in 2022,» *Nucleic acids research*, vol. 50, n° W1, pp. W276-W279, 2022.
- [38] R. Ingenito, E. Bianchi, D. Fattori y A. Pessi, «Solid phase synthesis of peptide C-terminal thioesters by Fmoc/t-Bu chemistry.,» *Journal of the American Chemical Society*, pp. 11369-11374, 1999.
- [39] V. K. Sarin, S. B. Kent, J. P. Tam y R. B. Merrifield, «Quantitative monitoring of solid-phase peptide synthesis by the ninhydrin reaction.,» *Analytical biochemistry*, pp. 147-157, 1981.
- [40] A. C. Tsohis, N. C. Papandreou, V. A. Iconomidou y S. J. Hamodrakas, «A consensus method for the prediction of ‘aggregation-prone’ peptides in globular proteins.,» *PloS one*, vol. 8, n° 1, 2013.
- [41] S. O. Garbuzynskiy, M. Y. Lobanov y O. V. Galzitskaya, «FoldAmyloid: a method of prediction of amyloidogenic regions from protein sequence,» *Bioinformatics*, vol. 26, n° 3, pp. 326-332, 2010.
- [42] J. team, «JASP (Version 0.18.3)[Computer software],» 2024. [En línea]. Available: <https://jasp-stats.org/>.
- [43] A. Micsonai, F. Wien, É. Bulyáki, J. Kun, É. Moussong, Y. H. Lee, ... y J. Kardos, «BeStSel: a web server for accurate protein secondary structure prediction and fold recognition from the circular dichroism spectra.,» *Nucleic acids research*, vol. 46, n° W1, pp. W315-W322, 2018.
- [44] J. Team, «JASP (Version 0.18.3)[Computer software],» 2024. [En línea]. Available: <https://jasp-stats.org/>.
- [45] W. Jorgensen, D. Maxwell y J. Tirado-Rives, «Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids,» *Journal of the American Chemical Society*, vol. 118, n° 45, pp. 11225-11236., 1996.
- [46] M. J. Abraham, T. Murtola, R. Schulz, S. Páll, J. C. Smith, B. Hess y E. Lindahl, «GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers,» *SoftwareX*, vol. 1, pp. 19-25, 2015.
- [47] W. Humphrey, A. Dalke y K. Schulten, «VMD: visual molecular dynamics,» *Journal of molecular graphics*, vol. 14, n° 1, pp. 33-38, 1996.

- [48] M. Kurcinski, A. Badaczewska-Dawid, M. Kolinski, A. Kolinski y S. Kmiecik, «Flexible docking of peptides to proteins using CABS-dock,» *Protein Science*, vol. 29, n° 1, pp. 211-222, 2020.
- [49] E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng y T. E. Ferrin, «UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis,» *Journal of computational chemistry*, vol. 25, n° 13, pp. 1605-1612, 2004.
- [50] T. AC, P. NC, I. VA y H. SJ, « A consensus method for the prediction of ‘aggregation-prone’ peptides in globular proteins,» *PloS one*, vol. 8, n° 1, p. e54175, 2013.
- [51] S. O. Garbuzynskiy, M. Y. Lobanov y O. V. Galzitskaya, «FoldAmyloid: a method of prediction of amyloidogenic regions from protein sequence,» *Bioinformatics*, vol. 26, n° 3, pp. 326-332, 2010.
- [52] E. M. O. B. A. Baden, F. C. Peterson, B. F. Volkman, M. Ramirez-Alvarado y J. R. Thompson, «Altered dimer interface decreases stability in an amyloidogenic protein.,» *Journal of Biological Chemistry*, vol. 283, n° 23, pp. 15853-15860, 2008.
- [53] A. M. ORTIZ, «Caracterización del efecto del Zn (II) en la formación de fibras amiloides de la proteína 6aJL2-R24G.,» 2023. [En línea]. Available: <http://riaa.uaem.mx/xmlui/>.
- [54] M. Kurcinski, A. Badaczewska-Dawid, M. Kolinski, A. Kolinski y S. Kmiecik, «Flexible docking of peptides to proteins using CABS-dock,» *Protein Science*, vol. 29, n° 1, pp. 211-222, 2020.
- [55] Y. Meunier-Carmenate, G. Valdés-García, R. Maya-Martinez, L. French-Pacheco, A. Fernández-Silva, Y. González-Onofre, ... y C. Amero, «Unfolding and aggregation pathways of variable domains from immunoglobulin light chains,» *Biochemistry*, vol. 62, n° 5, pp. 1000-1011, 2023.
- [56] P. Swuec, F. Lavatelli, M. Tasaki, C. Paissoni, P. Rognoni, M. Maritan, ... y M. Bolognesi, «Cryo-EM structure of cardiac amyloid fibrils from an immunoglobulin light chain AL amyloidosis patient,» *Nature communications*, vol. 10, n° 1, p. 1269, 2019.
- [57] A. E. Pelaez-Aguilar, F. Mata-Salgado, A. Morales-Ortiz, C. Millán-Pacheco, C. Olvera-Carranza, J. Salgado-Delgado, N. Pastor y L. Rivillas-Acevedo, «Cu(II) binding to the λ 6aJL2-R24G antibody light chain protein associated with light chain amyloidosis disease: The role of histidines,» *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. In press, 2024.
- [58] E. Desport, F. Bridoux, C. Sirac, S. Delbes, S. Bender, B. Fernandez and A. ... Jaccard, "AL amyloidosis," *Orphanet journal of rare diseases*, vol. 7, no. 1, pp. 1-13, 2012.
- [59] M. F. Jobling, X. Huang, L. R. Stewart, K. J. Barnham, C. Curtain, I. Volitakis, M. Perugini, A. R. White, R. A. Cherny, C. L. Masters, C. J. Barrow, S. J. Collins, A. I. Bush y R. Cappai, «Copper and zinc binding modulates the aggregation and neurotoxic properties of the prion peptide PrP106-126,» *Biochemistry*, vol. 40, pp. 8073-8084, 2001.
- [60] A. Binolfi, R. M. Rasia, C. W. Bertoncini, M. Ceolin, M. Zweckstetter, C. Griesinger, T. M. Jovin y C. O. Fernández, «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*, vol. 128, n° 30, pp. 9893-9901, 2006.
- [61] A. E. Pelaez-Aguilar, «Caracterización de la interacción de Cu²⁺ con la proteína 6aJL2-R24G.,» Cuernavaca, 2021.
- [62] B. A. Reva, A. V. Finkelstein y J. Skolnick, «What is the probability of a chance prediction of a protein structure with an rmsd of 6 Å?,» *Folding and Design*, pp. 141-147, 1998.
- [63] M. Y. Lobanov, N. S. Bogatyreva y O. V. Galzitskaya, «Radius of gyration as an indicator of protein structure compactness,» *Molecular Biology*, pp. 623-628., 2008.

- [64] S. Keller, C. Vargas, H. Zhao, G. Piszczek, Brautigam, C. A. y P. Schuck, «High-precision isothermal titration calorimetry with automated peak-shape analysis,» *Analytical chemistry*, vol. 84, n° 11, pp. 5066-5073, 2012.
- [65] H. Zhao, G. Piszczek y P. Schuck, «SEDPHAT—a platform for global ITC analysis and global multi-method analysis of molecular interactions,» *Methods*, vol. 76, pp. 137-148, 2015.
- [66] A. Waterhouse, M. Bertoni, S. Bienert, G. Studer, G. Tauriello, R. Gumienny, F. Heer, T. d. Beer, C. Rempfer, L. Bordoli, R. Lepore y T. Schwede, «SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes,» *Nucleic Acids*, p. W296–W303, 2018.
- [67] O. M. A., «Repositorio Institucional de Acceso Abierto (RIAA),» 2023. [En línea].

Anexo I

Durante la maestría trabajé en dos proyectos de investigación. El primero es el que se describió en este escrito. El segundo ya se encuentra publicado y se incluye en este anexo.



Cu(II) binding to the λ 6aJL2-R24G antibody light chain protein associated with light chain amyloidosis disease: The role of histidines

Angel E. Pelaez-Aguilar^{a,1}, Fernanda Mata-Salgado^{b,1}, Alan Morales-Ortiz^b, César Millán-Pacheco^c, Clarita Olvera-Carranza^d, Jesus Salgado-Delgado^d, Nina Pastor^{b,*}, Lina Rivillas-Acevedo^{b,*}

^a Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, Mexico

^b Centro de Investigación en Dinámica Celular-IICBA, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos 62209, Mexico

^c Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos 62209, Mexico

^d Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, 62210 Cuernavaca, Morelos, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Light chain
Copper
Amyloidosis

ABSTRACT

Light chain amyloidosis is a conformational disease caused by the abnormal proliferation and deposition of antibody light chains as amyloid fibers in organs and tissues. The effect of Cu(II) binding to the model recombinant protein 6aJL2-R24G was previously characterized in our group, and we found an acceleration of the aggregation kinetics of the protein. In this study, in order to confirm the Cu(II) binding sites, histidine variants of 6aJL2-R24G were prepared and the effects of their interaction with Cu(II) were analyzed by circular dichroism, fluorescence spectroscopy, isothermal calorimetry titrations, and molecular dynamics simulations. Confirming our earlier work, we found that His8 and His99 are the highest affinity Cu(II) binding sites, and that Cu(II) binding to both sites is a cooperative event.

1. Introduction

Light chain amyloidosis (AL) is a protein misfolding disorder caused by the abnormal proliferation of clonal plasma B cells that excessively secrete monoclonal antibody light chains into the bloodstream; these proteins deposit as amyloid fibers in organs and tissues [1–3]. All organs can be affected by these structures, even the central nervous system in very rare cases, leading to irreversible organ dysfunction and eventual patient death if not promptly diagnosed or effectively treated [4,5].

AL, also known as primary amyloidosis, is a rare disease. A recent study found a worldwide prevalence rate of ~50 cases per million people over 20 years and a crude annual incidence rate of ~10 cases per million people, generally affecting the population between 50 and 80 years of age [6–8]. The average life expectancy of patients with AL after diagnosis is approximately 3 years, although it may be shortened to 6 months in patients with cardiac damage. AL is the most common systemic amyloidosis, and the clinical manifestations depend on the

affected organ. However, common symptoms have been defined to facilitate the diagnosis: macroglossia, periorbital purpura, inflammation of the submandibular gland, skin hemorrhages, blood pressure changes, and excess antibody light chains in urine and blood [9].

Several studies have shown the close relationship between AL and the antibody light chain λ VI (6a) family proteins. The prevalence of 6a family proteins can reach up to 30 % in the disease, whereas they are expressed by only 2 % of plasma B cells in healthy individuals [10–12]. An allelic variant within family 6a was found to have the R24G mutation; this allele is found in 25 % of the proteins in this group. Notably, the three-dimensional structure by Cryo-EM of an antibody light chain amyloid fiber from the heart and kidneys of an AL patient with severe amyloid cardiomyopathy and kidney damage presents this R24G mutation as a background to the changes associated with antibody maturation [13–17].

In vitro studies with two recombinant proteins, one containing the germline-encoded 6a sequence and the other containing the R24G

* Corresponding authors at: Centro de Investigación en Dinámica Celular-IICBA, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad 1001, Col. Chamilpa, 62209 Cuernavaca, Morelos, Mexico.

E-mail addresses: nina@uaem.mx (N. Pastor), lrivillas@uaem.mx (L. Rivillas-Acevedo).

¹ These authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.132393>

Received 4 March 2024; Received in revised form 29 April 2024; Accepted 13 May 2024

Available online 17 May 2024

0141-8130/© 2024 Elsevier B.V. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

mutation fused with the frequently expressed J segment JL2, 6aJL2 and 6aJL2-R24G respectively, showed that the R24G variant is thermodynamically less stable and forms amyloid fibers more efficiently, due not only to the loss of interactions caused by the mutation but also to changes in the dynamics of the tertiary structure [14,18,19]. The 3D structure of 6aJL2-R24G is shown in Fig. 1.

Several factors may promote structural perturbations leading to aggregation of antibody light chains into amyloid fibers, including oxidative stress [20], mutations [21], and interactions with glycosaminoglycans [22]. The role of metal ions, particularly Cu(II) in protein toxicity and aggregation, both *in vivo* and *in vitro*, has been extensively studied in different systems. Although there are few reports regarding the effect of metal ions on the development of AL, studies have demonstrated the binding ability of immunoglobulins to Cu(II) both *in vivo* and *in vitro* [23–28].

Previously, we reported for the first time the interaction of Cu(II) with 6aJL2-R24G [29]. We found that the protein has two Cu(II) binding sites in its native state with submicromolar affinities. One of the proposed binding sites involves His99, Asp95, and Asn1, and three water molecules; the second site involves His8, Ser9, and three water molecules. According to our molecular dynamics simulations, Cu(II) binding only to His99 induces the loss of interactions between the CDR3 and CDR1, and the loop C-C' and CDR1, which promotes the fibril formation. Meanwhile, Cu(II) binding only to His8 results in few changes in the protein dynamics. However, when Cu(II) is bound to both histidines, the destabilizing effect is stronger, and the dynamics and intramolecular interactions of the protein ultimately promote the formation of amyloid fibers [29]. In this work, we evaluated the role of His99 and His8 on Cu(II) binding by mutagenesis, fluorescence spectroscopy, circular dichroism, and isothermal titration calorimetry. The promotion of amyloid fibers was determined by transmission electron microscopy. His99 was deleted as this residue is lost in the 77 % of the λ light chains reported in AL-Base [30]. On the other hand, His8 was substituted by Ser given that this substitution had been previously studied in the context of the 6aJL2 protein [31]. Molecular dynamics simulations of 6aJL2-R24G and the mutants in the absence of Cu(II) were used to explain the molecular changes induced by the mutations; the simulations of 6aJL2-R24G with Cu(II) are already published [29].

2. Materials and methods

2.1. Site-directed mutagenesis

To confirm the role of histidines in the coordination of Cu(II), three

mutants were constructed, R24G/H8S, R24G/ Δ H99, and R24G/H8S/ Δ H99. The selected mutations were introduced into the 6aJL2-R24G gene cloned into the pET27a vector, using the QuickChange II Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene, USA) according to supplier specifications. The oligonucleotide sequences used for mutagenesis are shown in Table 1. The obtained constructs were verified in an automatic DNA sequencer model 3130xl (Applied Biosystems, Thermo Scientific) at the DNA Synthesis and Sequencing Unit of the Biotechnology Institute of the National Autonomous University of Mexico.

2.2. Over-expression and purification

The recombinant proteins 6aJL2-R24G (R24G), 6aJL2-R24G/H8S (H8S), 6aJL2-R24G/ Δ H99 (Δ H99), and 6aJL2-R24G/H8S/ Δ H99 (H8S/ Δ H99) were expressed in *Escherichia coli* (DE3) previously transformed by heat shock with plasmid pET27b(+) containing the nucleotide sequence for each of the proteins. Bacteria were incubated in 2xYT medium containing 60 μ g/mL kanamycin, shaken at 200 rpm and 37 °C until an OD₆₀₀ of 0.9 was reached. They were then induced with 0.8 mM of IPTG and incubated overnight at 150 rpm and 25 °C. Cells were then centrifuged at 4000 rpm and 4 °C for 30 min. The bacterial pellet was lysed by osmotic shock by adding 20 % (w/v) sucrose solution, 100 mM Tris, pH 8.0, and 1 mM EDTA to the cells and gently shaking for 20 min. Then the cells were centrifuged at 4200 rpm for 20 min at 4 °C. The pellet was gently resuspended in cold water and let rest for 20 min. The cells were then centrifuged at 12,000 rpm for 40 min at 4 °C. The supernatant containing the protein of interest was filtered through a 0.22- μ m pore, concentrated by centrifugation, and loaded onto a Sephadex 200 size exclusion column in an ÅKTApurifier chromatograph. The

Table 1
Oligonucleotides used for site-directed mutagenesis.

Oligonucleotide name	DNA sequence (5' - 3')
H8S Fw	5' - TTT ATG CTG ACT CAG CCC TCC TCT GTG TCG GAG TCT CCG - 3'
H8S Rv	5' - CGG AGA CTC GCA CAC AGA GGA GGG CTG AGT CAG CAT AAA - 3'
Δ H99 Fw	5' - TCT TAT GAT AGC AGC AAT ^a GTG GTA TTC GGC GGA GGG AC - 3'
Δ H99 Rv	5' - GT CCC TCC GCC GAA TAC CAC ^a ATT GCT GCT ATC ATA AGA - 3'

The sequences to be modified are indicated in bold.

^a Deleted codon.

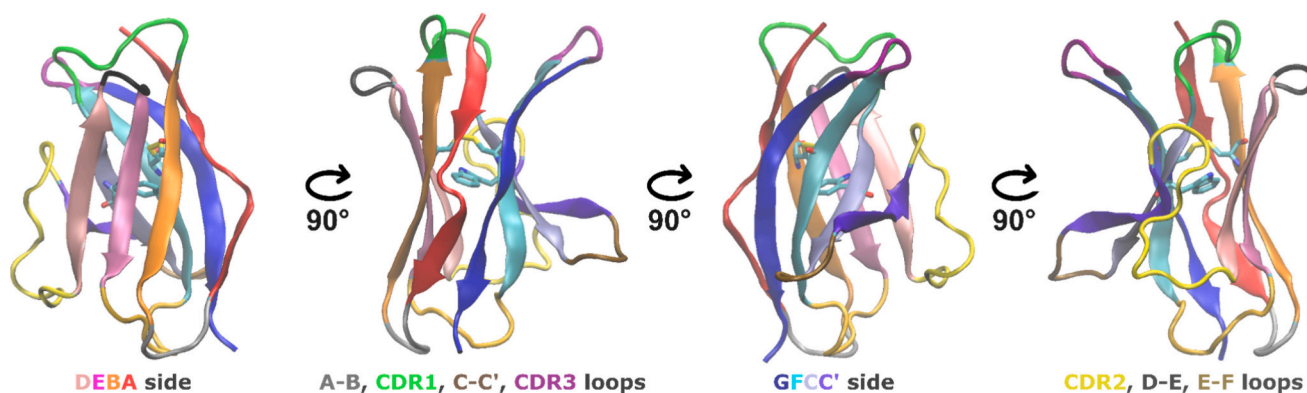


Fig. 1. 3D Structure of the 6aJL2-R24G protein (PDB ID 5JPJ). The protein has a beta sandwich conformation formed by eight beta strands forming two beta sheets, and seven loops. The residues involved in every strand and loop are: 3–12 strand A (red), 13–16 loop AB (gray), 17–23 strand B (orange), 25–31 CDR1 (green), 34–39 strand C (light purple), 40–45 loop C-C' (brown), 46–50 strand C' (purple), 51–54 loop CDR2 (yellow), 63–67 strand D (light pink), 68–71 loop DE (light blue), 72–78 strand E (pink), 79–86 loop EF (olive green), 87–94 strand F (light blue), 95–99 loop CDR3 (magenta), and 100–110 strand G (blue). W36 and the C22–C91 disulfide bridge are represented in sticks in CPK colors. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

protein was eluted in a 10 mM MES buffer, pH 7.4, and 75 mM NaCl. The purity of the protein was confirmed by SDS-PAGE. Finally, the protein concentration was determined by its molar extinction coefficient of $14,565 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 280 nm (ProtParam) [32].

2.3. *In vitro* fibrillogenesis

The kinetics of amyloid fiber formation were studied using thioflavin T (ThT) fluorescence following the emission maximum at 485 nm, having excited at 450 nm. Measurements were made every 5 min in a Cary Eclipse fluorometer equipped with a Peltier and magnetic stirrer. For amyloid fiber formation kinetics, the protein was used at a final concentration of 100 μM in 10 mM MES buffer, pH 7.4, and 75 mM NaCl, 20 μM of ThT, in the absence and presence of 1.0 and 2.0 equivalents of CuCl_2 , at 37 °C with constant agitation. The lag time was determined by fitting a linear regression to the nucleation and elongation phases of the kinetics; the intersection of the two straight lines corresponds to the kinetic lag time. At least three replicates of different purifications were performed.

In order to evaluate the statistical significance of the differences between R24G and the mutants in the presence and absence of Cu(II), a t-student analysis was run in the JASP software [33].

2.4. Transmission electron microscopy (TEM)

In order to evaluate the formation of amyloid fibers, the end point of every fiber formation kinetics experiment, with or without Cu(II), was decanted overnight, and the resulting pellet was washed with distilled water to remove the ThT excess; washing was repeated for several cycles. 10 μL of the fibrillar solution of protein in the absence and presence of 1 and 2 equivalents of Cu(II) were placed on a Formvar-coated copper grid for 1 min and stained with 2 μL of uranyl acetate solution. The samples were visualized in a CARL ZEISS 120-pound electron microscope running at 100 kV and coupled to a Gatan Ultrascan 1000 CCD camera (2000 \times 2000 pixels).

2.5. Thermal unfolding

In order to evaluate the thermal stability of the protein and the mutants in the presence and absence of Cu(II), thermal unfolding was studied by tracking tryptophan fluorescence taking advantage of the fact that the emission of the highly conserved W36 is quenched by the C22–C91 disulfide bridge when the protein is folded. Unfolding was induced by increasing the temperature by 1 °C/min from 25 to 60 °C, with excitation and emission wavelengths at 290 nm and 350 nm, respectively, in a Cary Eclipse Fluorometer. Proteins were used at a concentration of 10 μM in 10 mM MES buffer, pH 7.4, and 75 mM NaCl, in the absence and presence of 1 and 2 equivalents of Cu(II). The curves were fitted to a sigmoid with the Boltzmann equation $A_2 + (A_1 - A_2) / (1 + \exp((x - x_0) / dx))$, where x_0 corresponds to the T_m of the respective protein. At least three replicates were performed.

In order to evaluate the statistical significance of the differences between R24G and the mutants, or between the condition with and without Cu(II) for each protein, a t-student analysis was run in the JASP software [33].

2.6. Circular dichroism

To determine whether the coordination of Cu(II) to proteins affects their secondary structure, the proteins were titrated with CuCl_2 and followed by circular dichroism (CD) in the far UV region. 250 μL of 10 μM of each protein in 10 mM MES buffer, pH 7.4, and 75 mM NaCl, were poured in a 0.1 cm optical pathway quartz cell, and the spectrum was recorded with a bandwidth of 10 nm and a speed of 100 nm/min between 200 and 260 nm. The spectra were deconvoluted using the BestSel program [34].

2.7. Isothermal titration calorimetry (ITC)

In order to determine the affinity of the proteins for Cu(II), ITC experiments were performed on a Malvern ITC200 instrument at 25 °C, with the cell containing 250 μL of the histidine variants at a 100 μM concentration in 10 mM MES buffer, pH 7.4, and 75 mM NaCl, and the syringe containing 2.1 mM CuCl_2 . Each experiment consisted of 1.5 μL injections, with an injection spacing of 180 s. Three replicates were made. The heat of dilution was corrected by subtracting the background titration, consisting of the identical titrant solution into the buffer. The thermograms were integrated with the NIPTIC software package [35]. Data sets were fitted using a nonlinear least-squares algorithm for a one binding site model using SEDPHAT [36]. Graphics were done using the GUSSE program.

2.8. Molecular dynamics simulations

In order to evaluate the structural effect of the histidine mutations, molecular dynamics simulations in the absence of Cu(II) were run. The atomic coordinates of R24G were obtained from its crystal structure (PDB ID 5JPJ). The atomic coordinates of H8S, ΔH99 , and H8S/ ΔH99 were obtained by homology modeling using SWISS-MODEL [37]. Each protein was solvated using TIP4P water in a cubic box with 15 Å to the edge and 0.1 M NaCl. Simulations were performed using the OPLS-AAL force field within GROMACS 2021.3 [38]. The systems were stabilized through an equilibration process involving 50,000 steepest descent steps, followed by 100 ps of NVT and NPT dynamics, before initiating molecular dynamics production. Electrostatic interactions were treated using the Particle Mesh Ewald for long-range electrostatics with 10 Å cutoff for short-range electrostatic interactions. The Van der Waals interactions were switched to zero from 10 to 12 Å. The pressure and temperature were kept at 1 bar and 298 K with the Parrinello–Rahman barostat and a modified Berendsen thermostat respectively. All bonds were constrained using the LINCS method. No specific atoms were fixed during the equilibration process, and the minimization procedure was performed on all atoms. The integration time step was set to 2 femtoseconds, and the atomic coordinates were saved every picosecond during the simulations. Three 500 ns runs were carried out for each protein; the data for the three runs were pooled for analysis. Trajectories were analyzed using GROMACS 2021.3 tools and visualized in VMD [39].

For each protein, the RMSF deviations per residue were computed using the Gromacs tool `gmx rmsf`. Subsequently, the data from R24G were subtracted from those for each protein to identify zones with increased or decreased mobility because of the mutations. The standard deviation of the differences over the whole protein was used as a criterion for relevant changes.

In addition, for each protein the number of hydrogen bonds per residue was determined using the Gromacs tool `gmx hbonds`, with a donor-acceptor distance set at 3.5 Å and an angle restriction of 30°. Finally, interactions between each residue of the proteins were calculated using the `gmx select` tool with a cutoff of 5 Å, selecting all heavy atoms of each residue. In both cases the data for R24G were subtracted from the values obtained from each histidine variant, and the standard deviation of the differences was calculated and used as a criterion for significance in changes in interactions due to the mutations.

3. Results

3.1. Effect of histidine variants on R24G secondary structure, amyloidogenicity, and stability

In the interest of evaluating the role of these two histidines in the Cu(II) binding to R24G, it is important to analyze first the effect of deleting His99 and/or exchanging His8 by Ser in the stability and amyloidogenicity of R24G, in order to differentiate the effect of the mutations from the effect of Cu(II) binding. The far UV region CD spectra of the R24G,

H8S, Δ H99, and H8S/ Δ H99 proteins are shown in Fig. 2A. The R24G characteristic spectrum includes a positive band around 210 nm and two negative peaks around 220 and 230 nm [29]. The band around 230 nm has been attributed to tyrosine and tryptophan residues [15]. The CD spectra of the histidine variants are very similar to the R24G spectra, except for the Δ H99 and H8S/ Δ H99 variants that show a diminution in the intensity of the 230 nm band. Despite this difference, deconvolution of the spectra shows that the proteins have the same secondary structure as the R24G protein (Fig. S1).

Moreover, the thermal stability of the mutants was evaluated by tryptophan fluorescence; the temperature denaturation curves show a single cooperative transition that fits well with a two-state model (Fig. 2B). The H8S, Δ H99, and H8S/ Δ H99 mutants showed average and standard deviation Tms of 45.6 ± 0.1 °C, 38.7 ± 0.5 °C, and 39.2 ± 0.2 °C, respectively (Table 2). The t-student analysis of the three replicates of these Tms compared with the values of the R24G (Fig. S2) indicates that only Δ H99 and H8S/ Δ H99 show significantly different population means compared with the R24G Tm (45.9 ± 0.08 °C [29]). This indicates that the substitution of His8 for Ser does not affect the thermal stability of the protein, while the His99 deletion, on its own or in combination with H8S, makes the protein thermodynamically less stable.

The ThT fluorescence assays show that the three histidine variants aggregate as amyloid fibers with a nucleation-dependent polymerization pattern, and the morphology of the fibers was not affected by the histidine substitution (Fig. 3). However, while the previously reported lag time of the R24G protein is 378.6 ± 45.9 min [29], the estimated average lag times for H8S, Δ H99, and H8S/ Δ H99 are 102.8 ± 16.2 min, 317.8 ± 39.4 min, and 137.7 ± 14.5 min, respectively (Table 2, and fig. S2). The t-student analysis indicates that the lag times of H8S and H8S/ Δ H99 are significantly different compared to the R24G lag time, meaning that the substitution of His8 for Ser makes the protein more amyloidogenic. Moreover, the removal of His99 resulted in a slight reduction in the lag time, but the t-student analysis indicates that there is no significant difference between the lag times of the R24G and Δ H99 proteins. Thus, the removal of His99 has no effect on the initial steps of fiber formation for this protein.

As the kinetics of fiber formation seem to have differences in the exponential phase, the velocity constants were calculated (Table S1). The t-student analysis indicates that the elongation velocities of the histidine variants are not significantly different to those of the R24G parent protein. Finally, the end points of these kinetics were imaged by TEM to confirm the presence of fibers. In all cases, long and well-structured amyloid fibers were formed (Fig. 3B–D).

Molecular dynamics simulations of the histidine variants were run to understand the thermal stability and amyloidogenicity changes brought about by the histidine mutants in the absence of Cu(II). The effect of Cu(II) binding to the protein R24G was previously reported [29]. The simulations showed that the mutants have less intramolecular hydrogen bonds than the parent R24G, the H8S/ Δ H99 mutant having the least, followed by Δ H99 and H8S (Fig. S3). Moreover, the conformational diversity of each protein was assessed by clustering the structures sampled during the simulations; the representative structure of each cluster is depicted in Fig. 4A to C. The clustering cutoff used was 0.13 nm over alpha carbons. Seven clusters were obtained for R24G, five for H8S, three for Δ H99, and nine for H8S/ Δ H99 (Fig. 4), and every mutant visited different conformations. Compared with R24G, the H8S mutant shows more mobility at loops AB, CC', and DE (Fig. 4A). Meanwhile, Δ H99 appears to be more rigid, showing decreased mobility in the N-terminal region and loops DE and CDR3, but greater freedom at loop CC' (Fig. 4B). The H8S/ Δ H99 mutant shows the largest conformational diversity, primarily in the N-terminal region and loops DE, CDR1, and CDR3 (Fig. 4C).

Additionally, the alpha carbon root-mean square fluctuations (RMSF) and the number of heavy atom contacts were calculated for each protein in order to understand the relation between the structural fluctuations of each residue and the loss of interactions. The RMSF analysis indicates that each protein has a different dynamic fingerprint. The H8S protein shows more fluctuations at the GFCC' sheet, and less fluctuations at the N-terminal region and the CDR loops (Fig. S4A). The Δ H99 protein shows larger fluctuations at loop EF and at strands A, F, and G, but shows more stability at the CDR1, CDR2, and CDR3 (Fig. S4B). The H8S/ Δ H99 mutant shows more mobility at the CDR loops, particularly at CDR1 (Fig. S4A). Based on the contact differences between each mutant and R24G, it was found that H8S loses contacts between strands A and B and gains contacts between strands B and G, G and F, and F and C' (Figs. 4D and S5). The Δ H99 protein shows no localized loss and gain of contacts, which can suggest a global reorganization of the protein (Figs. 4E and S5). The H8S/ Δ H99 protein shows loss of contacts of strand A with strands B and G (Figs. 4F, S5).

3.2. Effect of Cu(II) on the His variants aggregation and stability

The CD spectra of the protein histidine variants were collected in the presence and absence of Cu(II). Fig. 5 shows that the addition of 1 and 2 equivalents of Cu(II) does not induce changes in the spectra of H8S/ Δ H99, but induces small changes in the intensity of the spectra of H8S and Δ H99. Despite these small differences, the deconvolution of the

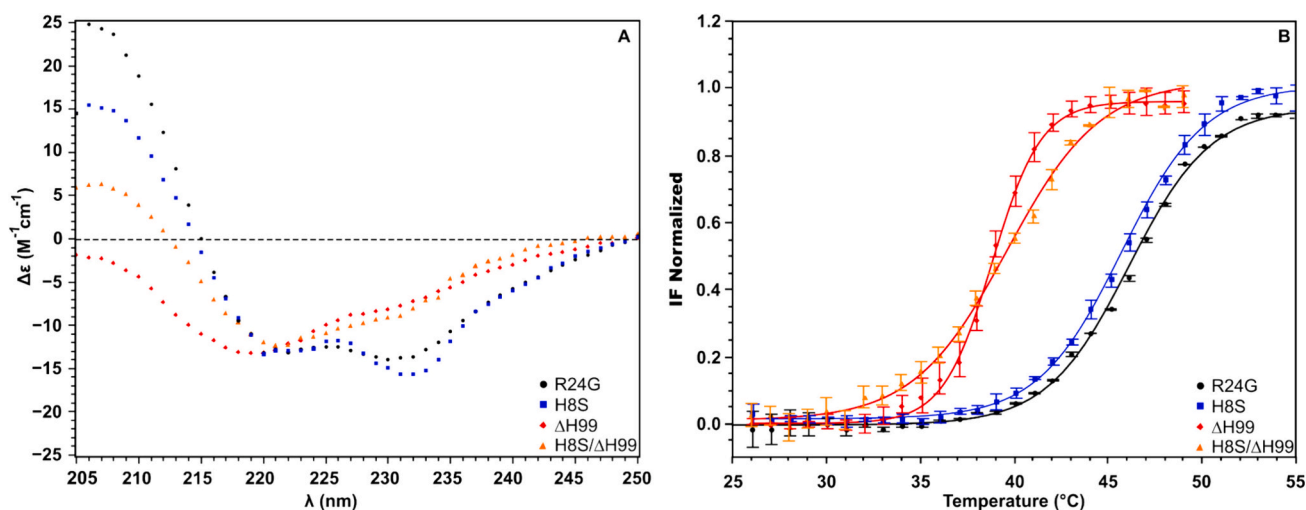


Fig. 2. R24G structural perturbation induced by histidine substitution and/or deletion. Comparison of the CD spectra (A), and the average and standard deviation of thermal stability of R24G and its histidine variants (B).

Table 2

Average and standard deviation of the estimated Tms and lag times of the histidine variants in the presence and absence of Cu(II).

Cu(II) eq.	Tm (°C)			Lag time (min)		
	H8S	Δ H99	H8S/ Δ H99	H8S	Δ H99	H8S/ Δ H99
0.0	45.6 \pm 0.1	38.2 \pm 0.5 ^{aa}	39.2 \pm 0.2 ^{aa}	102.8 \pm 16.2 ^{bb}	317.8 \pm 39.4	137.7 \pm 14.5 ^{bb}
1.0	43.2 \pm 1.9	36.0 \pm 3.7	37.9 \pm 0.7*	102.8 \pm 14.3	198.1 \pm 85.6	160.3 \pm 22.5
2.0	33.6 \pm 0.2**	32.0 \pm 1.1*	34.9 \pm 1.9*	94.5 \pm 6.7	268.0 \pm 81.1	139.8 \pm 9.0

^aData significantly different compared with R24G without Cu(II): Tm 45.9 \pm 0.08 °C [29] (^a p < 0.05 significantly different; ^{aa} p < 0.001 very significantly different).

^bData significantly different from R24G without Cu(II): Lag time 328.6 \pm 49.9 min [29] (^b p < 0.05 significantly different; ^{bb} p < 0.001 very significantly different).

Data significantly different from the condition without Cu(II) of each protein (p < 0.05 significantly different; ** p < 0.001 very significantly different).

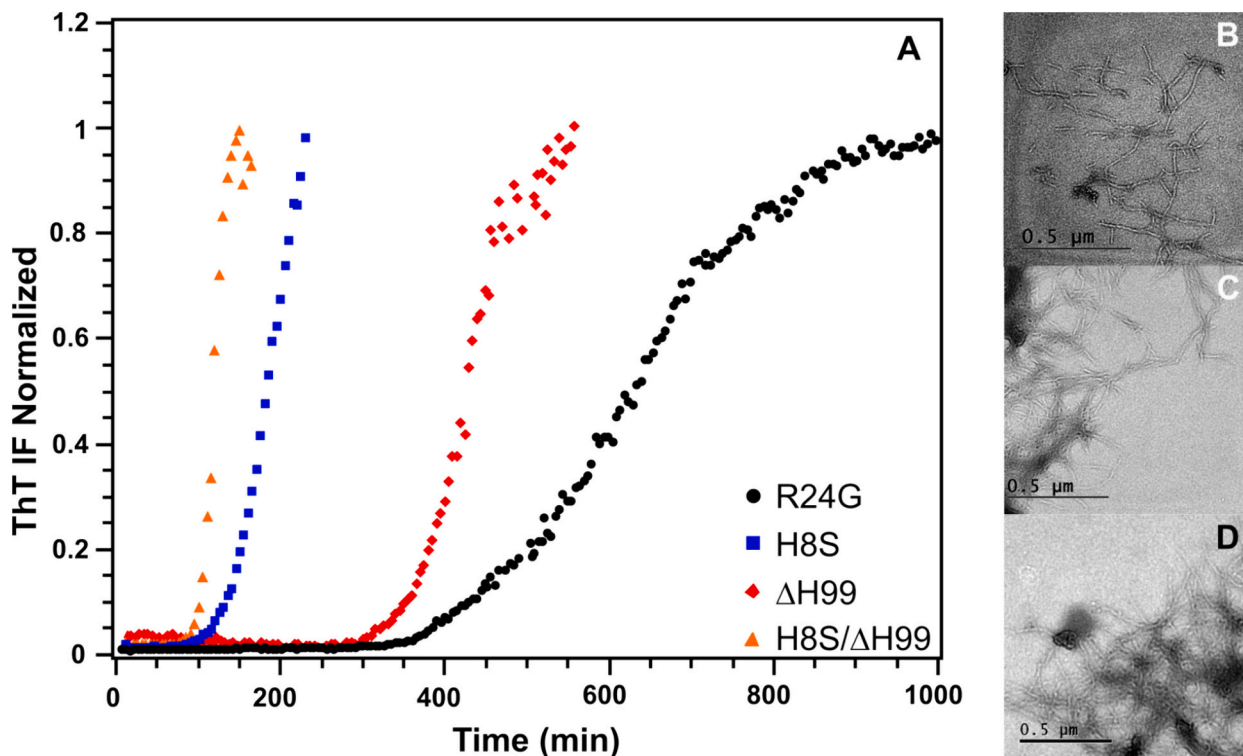


Fig. 3. Amyloid fiber kinetics of R24G histidine variants. Representative aggregation kinetics (A), and the TEM images of the H8S (B), Δ H99 (C), and H8S/ Δ H99 (D) variants.

spectra shows that the interaction with Cu(II) does not induce changes of the secondary structure of the proteins (Fig. S1).

The effect of the interaction with Cu(II) on the stability and amyloidogenicity of histidine mutants were evaluated by tryptophan and ThT fluorescence. The estimated lag times and apparent Tms are shown in Table 2. For H8S in the presence of Cu(II) (Fig. 5D), according to the t-student analysis, there is a significant decrease of the thermal stability only at 2 equivalents of Cu(II) (Table 2, Fig. S2). Likewise, Δ H99 in the presence of 1 equivalent of Cu(II) does not show a significant Tm change, but in the presence of 2 equivalents of Cu(II) the Tm decreases significantly (Table 2 and Fig. 5E). Finally, the addition of 1 and 2 equivalents of Cu(II) to H8S/ Δ H99 induces a statistically significant decrease of the Tm, however, there are no significant differences between the complex with 1 and 2 equivalents of Cu(II) (Fig. 5F). The p values from the t-student analysis are shown in Fig. S2.

All the amyloid fibril formation kinetics in the absence and presence of Cu(II) show a sigmoidal behavior. The t-student analysis comparing the lag time of each mutant protein without Cu(II) against the same protein with Cu(II) indicates that there is no significant difference in the lag times (Fig. 6, Table 2, and Fig. S2).

In order to measure the affinity of the variants for Cu(II), ITC experiments were performed. The ITC results were best fit to a one binding

site model (Fig. 7). The estimated K_d values were 68 μ M to H8S, 69 μ M to Δ H99, and 106 μ M for H8S/ Δ H99. These results indicate that the histidine variant proteins bind copper with low affinity. The isotherm of Δ H99 indicates more than one event as Cu(II) is added, thus only the first phenomenon corresponding to the highest affinity interaction was fitted to a one binding site model (Fig. S7).

4. Discussion

AL is the systemic amyloidosis with the highest incidence, caused by the deposition of amyloid fibers composed mainly of immunoglobulin light chain variable domains [9]. These proteins are influenced by several factors that promote structural perturbations leading to the formation of amyloid fibers.

Cu(II) is a trace element necessary for a variety of enzymatic reactions critical to most living cells and to the functions of an increasing number of other proteins, particularly in mammals [40]. The concentration of free Cu(II) in the blood is low; however, alterations in homeostasis result in the release of these metal ions into the bloodstream, which is why it is considered a high risk factor for protein misfolding diseases. To date, there are few studies on the effects of metal ions on the pathophysiology of AL, but in patients with hypercupremia associated

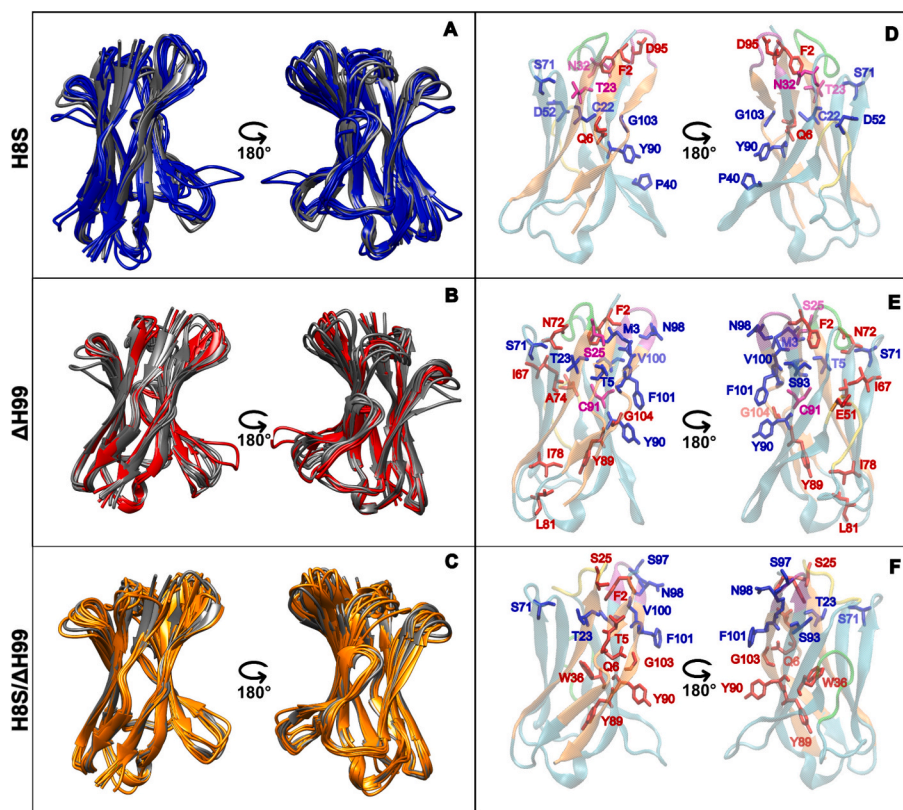


Fig. 4. Conformational and dynamic differences of R24G and the histidine variants. Panels A–C depict representative structures obtained by clustering of the sampled structures by each variant, compared to those of R24G (in gray). Panels D–F depict contact differences between each variant and R24G (red indicates loss of contacts and blue gain of contacts with respect to R24G). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

with multiple myeloma, metal ions have been identified not bound to albumin or ceruloplasmin, but to an IgG1 (myeloma-associated protein), specifically in the region of λ -type light chains. Other studies have reported Cu(II) binding to κ -type light chains [26,41].

We have previously reported that R24G, a model protein in the study of AL with sequences belonging to the $\lambda 6$ germline, is able to bind Cu(II), and that the interaction accelerates the kinetics of amyloid fiber formation. The greatest effect obtained with the addition of 1 and 2 equivalents of the metal ion to the sample does not affect the secondary structure, but reduces the lag time up to 50 %, and the thermal stability around 30 % [29]. ITC studies revealed that the protein contains two binding sites with dissociation constants in the submicromolar range (0.1 and 0.3 μM) [29], similar to values reported for other systems, and it is consistent with the affinity of a κ -type light chain for Cu(II) [26,41]. The Cu(II) binding sites proposed for R24G are His99 and His8 and the adjacent residues that may be involved in the coordination sphere.

In order to test these Cu(II) binding sites, three histidine variants were prepared. Comparison of the CD spectra shows that the H8S substitution and the deletion of His99 do not induce changes in the secondary structure of the protein. However, the band around 230 nm decreases in intensity in the His99 deleted variants. This band has been attributed to the tryptophan and a cluster of tyrosines located at the GFCC' face (Fig. 1) [15], and can be rationalized in terms of the relative positions and dynamics of the aromatic residues in the protein. Static arrangements would presumably lead to a strong CD signal, while the sampling of many different conformations would reduce the CD signal. Thus, given the number and type of rotamers sampled by the solvent-exposed aromatic residues during the simulations (Fig. S6), the removal of His99 seems to allow the exploration of more conformations of the aromatic residues nearby, leading also to the reorganization of the tyrosines and phenylalanines at the surface of the domain in the GFCC'

face; these changes in the number of sampled conformations and in the preferred conformations of these aromatic side chains may be the source of the differences in the CD spectra signal at 230 nm.

In addition, the histidine variations induce changes in the thermal stability and the amyloidogenicity of R24G. The H8S substitution rendered the protein more amyloidogenic, although its thermal stability does not change. These results are consistent with those previously reported for the 6aJL2-H8S protein in the context of 6aJL2 (that is, without the R24G mutation), a germline protein mutant that is more amyloidogenic without losing thermal stability [31]. All this may happen since His8 is in strand A, at the N terminus of the protein, which has been described as an important antiaggregation motif [42–44]. The molecular dynamics simulations of H8S showed the reorganization of the contacts between the strands A, B, G, and F, the antiaggregation motif.

On the contrary, the removal of H99 does not affect the lag phase of amyloid fiber formation, but its thermal stability decreased 6 °C. His99 is located at the frontier of the variable exon and the joining exon of the immunoglobulin variable light chain domain; it is found in the loop that forms CDR3 [45], and this position is prone to have both amino acid changes and insertions/deletions. The CDR3 loop is characterized for being a highly dynamic region in the κ and λ light chains, therefore changes in this region could alter the stability of the protein [19,22]. According to the molecular dynamics simulations, when His99 is removed, there is a global reorganization of the protein contacts, making the protein less stable. However, the amyloidogenicity does not increase because the changes are not located in the antiaggregation motifs (Fig. 4).

Additionally, the H8S/ΔH99 mutant showed characteristics of both proteins: reduced thermal stability, possibly due to deletion of His99, and increased amyloidogenicity as a result of the H8S substitution.

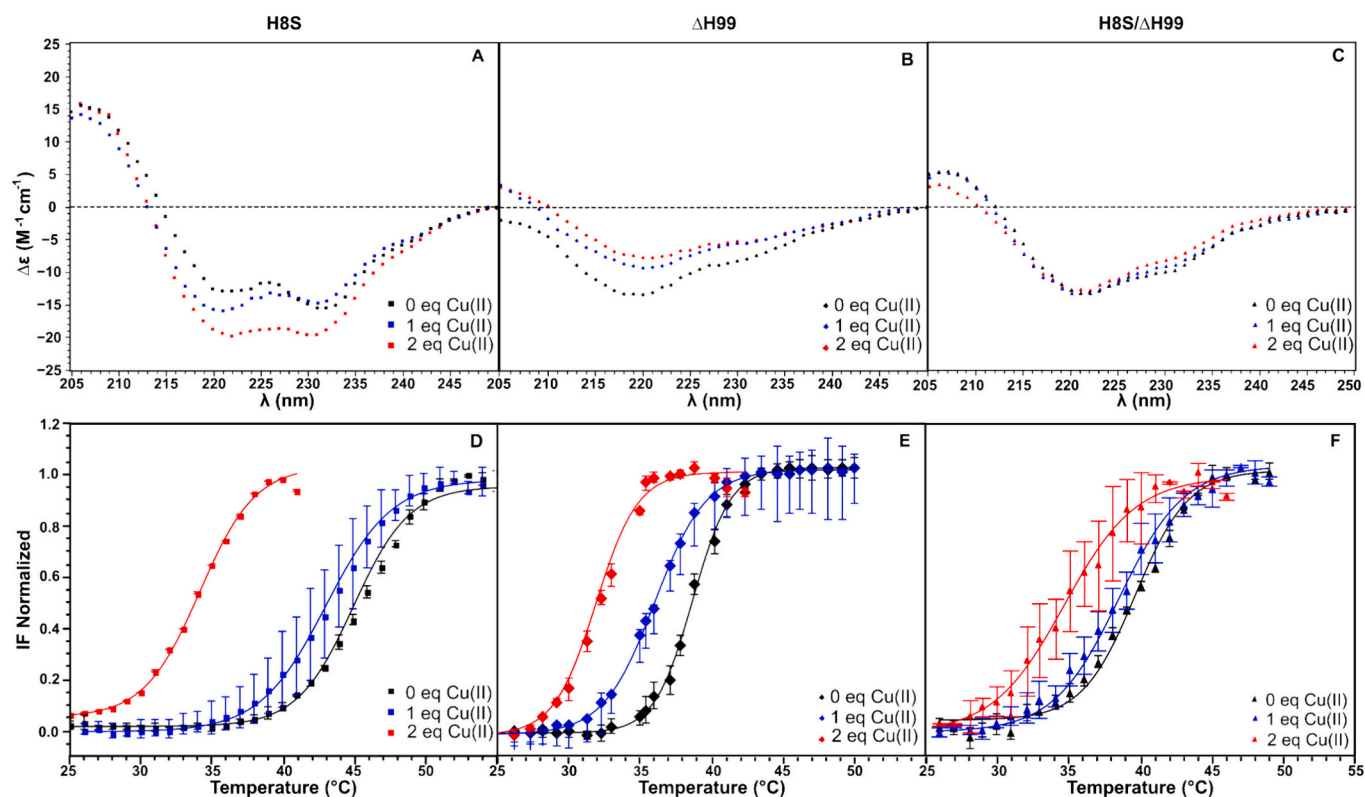


Fig. 5. Secondary structure and thermal stability of Cu(II)-histidine variant complexes. CD spectra (A to C), and the average and standard deviation of thermal stability plots (D to F) of each mutant with and without Cu(II).

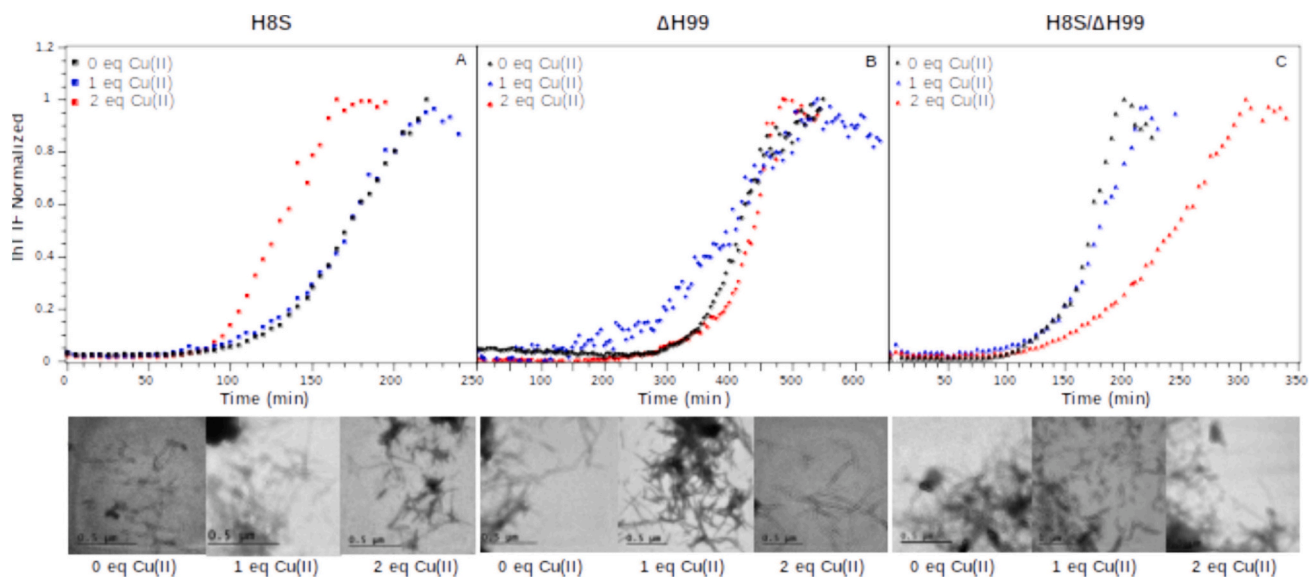


Fig. 6. Amyloid fibril formation kinetics and TEM images. From A to C representative kinetics of each protein. The panel below shows the TEM images at different Cu(II) equivalents.

However, the simulations showed that the mobility of the protein residues, the sampled conformations, and the loss of contacts and hydrogen bonds are not the same as those observed for H8S and Δ H99. H8S/ Δ H99 shows increased motion at the CDR loops and contact losses at strands A, G, and F of the protein, altering the antiaggregation motifs of the protein.

Regarding Cu(II) binding to the mutant proteins, it does not induce significant changes, either in the secondary structure content, or in the amyloid fibril formation kinetics of any of the histidine variants.

However, 2 equivalents of Cu(II) are needed to decrease the thermal stability of the H8S and Δ H99 proteins, suggesting that Cu(II) binding to His99 or His8 separately is not enough to promote unfolding of the protein with greater efficiency. The second equivalent of Cu(II) may be interacting with other residues of the proteins, yet to be identified, inducing a cooperative effect with the His8 or His99 sites and destabilizing the proteins. For the H8S/ Δ H99 protein, the addition of up to 2 equivalents of Cu(II) significantly changes the protein T_m. This could mean that Cu(II) binds to other sites that alter the protein stability. All

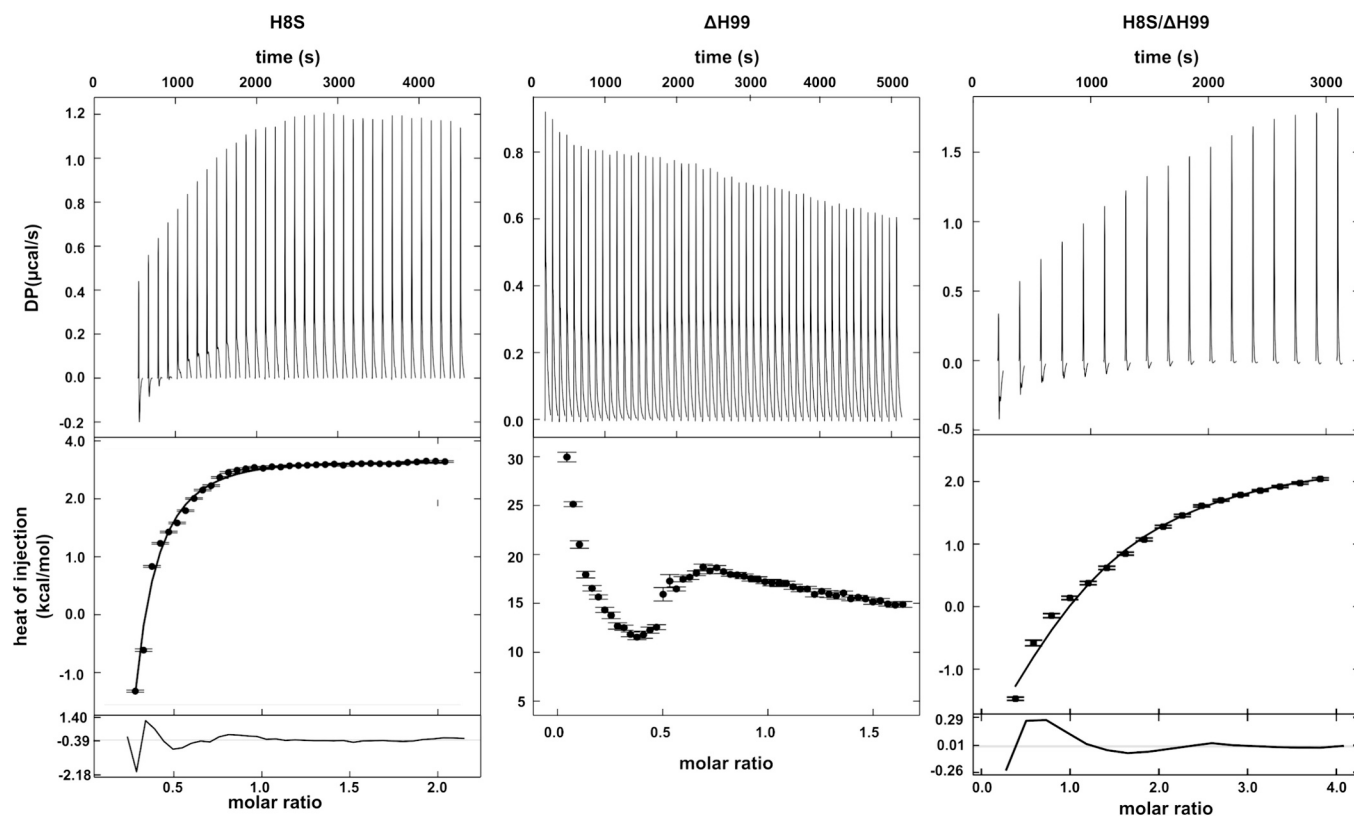


Fig. 7. Representative isothermal titration calorimetry of histidine variants with Cu(II). For each protein, the heat exchanged from each injection of Cu(II) is shown. The isotherms were fitted to a one binding site model.

this together seems to indicate that the thermal instability induced by Cu(II) in the R24G protein is a cooperative event in which the binding to both histidines is required.

Cu(II) binding to the proteins H8S, Δ H99, and H8S/ Δ H99 shows effects that do not correlate completely with the effect observed for the R24G protein. This seems to indicate that the reduction of the thermal stability and the increase of the amyloidogenicity induced by Cu(II) binding to the R24G protein is also a cooperative event. That is, Cu(II) binds to His8 and His99 at the same time, and both sites coordinated by Cu(II) are necessary to induce the conformational changes that lead to a faster amyloid fibril formation. This is in good correlation with the previously reported molecular dynamics simulations, that showed that Cu(II) binding to His8 and His99 increases the dynamics of the CDR1, CDR3, and loop C-C', making the protein more prone to form amyloid fibers [29].

In contrast to the T_m analysis discussed above, the ITC analysis shows that H8S and Δ H99 variants present K_d values of 68 μ M, and 69 μ M respectively, compared to the submicromolar K_d for R24G. Surprisingly, for H8S/ Δ H99 the fitting shows a K_d of 106 μ M, indicating that Cu(II) can bind to histidine-free sites, albeit with much lower affinity. In all cases, the K_d s are two and three orders of magnitude higher than that observed for R24G [29]. This means that His99 and His8 are the Cu(II) binding sites with the highest affinity, as previously reported, but when one of the histidines is removed, the affinity decays, in line with cooperative Cu(II) binding. This is in good correlation with a cooperative effect on R24G aggregation induced by Cu(II).

Recently, Cryo-EM studies have described five structures of amyloid fibers formed by immunoglobulin light chains isolated from patients: two of the λ 1 subtype [46,47] with sequences that do not contain histidines, two of the λ 3 subtype [48] with a histidine at position 96, and another one of the λ 6 subtype in two tissues [16,17], which has both histidines (H8 and H99) in its sequence and also contains the R24G mutation. It has been proposed that unfolding of the protein is necessary

to form amyloid fibers starting from the native immunoglobulin fold [49]. In the recent Cryo-EM structures of the AL amyloid fibers, most of the observed interactions do not occur in the native folded state, thus confirming that the unfolding of the monomer is necessary for the fiber formation process.

The structure of the amyloid fiber determined by Cryo-EM consists of two segments that form the inner heart of the fiber. The first "snail shell" segment is formed by the β 1- β 5 strands and runs from the N-terminus to Y37. The second "C"-shaped segment surrounds the first segment and consists of the β 6- β 9 strands containing residues S66 to G105. H8 is in a section of the N-terminus located in the turn between β 1- β 2 in the amyloid fiber and interacts with Y37 at the C-terminus of the "snail shell", while H99, located in CDR3 (Gln92-Val101) in the native protein along with CDR1 (Thr23-Gln35) is also located at the surface of the fiber. Another important residue for the stabilization of the fiber, which is also responsible for the interaction with Cu(II) in R24G, is D95, which interacts with K16 and stabilizes the fiber structure through a salt bridge. These interactions in the λ 6 amyloid fibril structure and the positions of the H and D residues involved in Cu(II) binding may suggest that the association of Cu(II) with both histidines and D95, in addition to destabilizing the protein structure and increasing the tendency to aggregate, may contribute to molecular interactions that stabilize the amyloid fibrils.

Our results do not imply that Cu(II) binding is a common clinical cause of AL. Rather, the strategic position of two histidines and the residues that contribute to the formation of the Cu(II) binding sites are an example of gain of function as a result of natural diversification of the antibody repertoire. In the right environment, an immunoglobulin that has been shown to coordinate metal ions available due to homeostasis disruption could contribute to disease development as in the development of other protein misfolding diseases [50-54].

CRedit authorship contribution statement

Angel E. Pelaez-Aguilar: Writing – original draft, Validation, Methodology, Investigation, Formal analysis, Conceptualization. **Fernanda Mata-Salgado:** Writing – original draft, Visualization, Validation, Software, Methodology, Investigation, Formal analysis. **Alan Morales-Ortiz:** Visualization, Methodology, Investigation, Formal analysis. **César Millán-Pacheco:** Supervision, Software, Methodology, Investigation. **Clarita Olvera-Carranza:** Methodology, Investigation. **Jesus Salgado-Delgado:** Methodology, Investigation. **Nina Pastor:** Writing – review & editing, Validation, Resources, Methodology, Investigation, Formal analysis, Conceptualization. **Lina Rivillas-Acevedo:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Validation, Supervision, Resources, Project administration, Methodology, Investigation, Funding acquisition, Formal analysis, Conceptualization.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

The authors thank CONAHCYT grant AI-S22109. A.E.P.-A, F.M.-S and A.M.-O. thank CONAHCYT for PhD and Master fellowships. Also, authors thank LANEM facilities at CIQ-UAEM where CD data were collected, and LabDP. They also thank Dr. Guadalupe Trinidad Zavala from the Unidad de Microscopía, IBT-UNAM, for TEM images. Also, the authors thank the Laboratorio Nacional de Supercomputo del Sureste and LANCAD for supercomputing time.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jbiomac.2024.132393>.

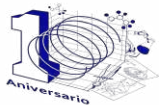
References

- [1] G. Martinez-Rivas, S. Bender, C. Sirac, Understanding AL amyloidosis with a little help from in vivo models, *Front. Immunol.* 13 (2022) 1008449, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1008449>.
- [2] K. Dorshkind, David J. Rawlings, B-cell development, *Hematology* (2018), <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35762-3.00020-2>.
- [3] G. Merlini, M.J. Stone, Dangerous small B-cell clones, *Blood* 108 (2006) 2520–2530, <https://doi.org/10.1182/blood-2006-03-001164>.
- [4] M.D. Benson, T.C. Witt, J. Bonnin, B. Matthews, R. Abonour, Light chain (AL) amyloidosis in the central nervous system (CNS), *Amyloid* 18 (2011) 112–113, <https://doi.org/10.3109/13506129.2011.574354041>.
- [5] G. Merlini, AL amyloidosis: from molecular mechanisms to targeted therapies, *Hematology* 2017 (2017) 1–12, <https://doi.org/10.1182/asheducation-2017.1.1>.
- [6] R.S. Abraham, S.M. Geyer, T.L. Price-Troska, C. Allmer, R.A. Kyle, M.A. Gertz, R. Fonseca, Immunoglobulin light chain variable (V) region genes influence clinical presentation and outcome in light chain-associated amyloidosis (AL), *Blood* 101 (2003) 3801–3808, <https://doi.org/10.1182/blood-2002-09-2707>.
- [7] N. Kumar, N.J. Zhang, D. Cherepanov, D. Romanus, M. Hughes, D.V. Faller, Global epidemiology of amyloid light-chain amyloidosis, *Orphanet J. Rare Dis.* 17 (2022), <https://doi.org/10.1186/s13023-022-02414-6>.
- [8] M. Rossi, G.G. Varrà, A. Porcari, R. Saro, L. Pagura, A. Lalaro, Re-definition of the epidemiology of cardiac amyloidosis, *Biomedicines* 10 (2022) 1566–1570, <https://doi.org/10.3390/biomedicines10071566>.
- [9] A. Dispenzieri, M.A. Gertz, F. Buadi, What do I need to know about immunoglobulin light chain (AL) amyloidosis? *Blood Rev.* 26 (2012) 137–154, <https://doi.org/10.1016/j.blre.2012.03.001>.
- [10] S. Ozaki, M. Abe, D. Wolfenbarger, D. Weiss, A. Solomon, Preferential expression of human lambda-light-chain variable-region subgroups in multiple myeloma, AL amyloidosis, and Waldenström's macroglobulinemia, *Clin. Immunol. Immunopathol.* 71 (1994) 183–189, <https://doi.org/10.1006/clin.1994.1070>.
- [11] V. Perfetti, S. Casarini, G. Palladini, M.C. Vignarelli, C. Klersy, M. Diegoli, E. Ascarì, G. Merlini, Analysis of V λ -J λ expression in plasma cells from primary (AL) amyloidosis and normal bone marrow identifies 3r (AIII) as a new amyloid-associated germline gene segment, *Blood* 100 (2002) 948–953, <https://doi.org/10.1182/blood-2002-01-0114>.
- [12] A. Solomon, B. Frangione, E.C. Franklin, Bence Jones proteins and light chains of immunoglobulins. Preferential association of the V(λ VI) subgroup of human light chains with amyloidosis AL(λ), *J. Clin. Invest.* 70 (1982) 453–460, <https://doi.org/10.1172/JCI110635>.
- [13] L.Y. Ch'ang, C.P. Yen, L. Besl, M. Schell, A. Solomon, Identification, and characterization of a functional human Ig V lambda VI germline gene, *Mol. Immunol.* 31 (1994) 531–536, [https://doi.org/10.1016/0161-5890\(94\)90040-x](https://doi.org/10.1016/0161-5890(94)90040-x).
- [14] L. del Pozo Yauner, E. Ortiz, R. Sánchez, R. Sánchez-López, L. Güereca, C. L. Murphy, A. Allen, J.S. Wall, D.A. Fernández-Velasco, A. Solomon, B. Becerril, Influence of the germline sequence on the thermodynamic stability and fibrillogenicity of human lambda 6 light chains, *Proteins* 72 (2008) 684–692, <https://doi.org/10.1002/prot.21934>.
- [15] M. González-Andrade, B. Becerril-Luján, R. Sánchez-López, H. Cecaña-Álvarez, J. I. Pérez-Carreón, E. Ortiz, D.A. Fernández-Velasco, L. Del Pozo-Yauner, Mutational and genetic determinants of λ 6 light chain amyloidogenesis, *FEBS J.* 280 (2013) 6173–6183, <https://doi.org/10.1111/febs.12538>.
- [16] P. Swuec, F. Lavatelli, M. Tasaki, C. Pissoni, P. Rognoni, M. Maritan, F. Brambilla, P. Milani, P. Mauri, C. Camilloni, G. Palladini, G. Merlini, S. Ricagno, M. Bolognesi, Cryo-EM structure of cardiac amyloid fibrils from an immunoglobulin light chain AL amyloidosis patient, *Nat. Commun.* 10 (2019) 1–9, <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09133-w>.
- [17] S. Puri, T. Schulte, A. Chaves-Sanjuan, G. Mazzini, S. Caminito, C. Pappone, L. Anastasia, P. Milani, G. Merlini, M. Bolognesi, M. Nuvolone, G. Palladini, S. Ricagno, The cryo-EM STRUCTURE of renal amyloid fibril suggests structurally homogeneous multiorgan aggregation in AL amyloidosis, *J. Mol. Biol.* 435 (2023), <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2023.168215>.
- [18] R. Maya-Martinez, L. French-Pacheco, G. Valdés-García, N. Pastor, C. Amero, Different dynamics in 6aJL2 proteins associated with AL amyloidosis, a conformational disease, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019) 4078, <https://doi.org/10.3390/ijms20174078>.
- [19] G. Valdés-García, C. Millán-Pacheco, N. Pastor, Convergent mechanisms favor fast amyloid formation in two lambda 6a Ig light chain mutants, *Biopolymers* 107 (2017), <https://doi.org/10.1002/bip.23027>.
- [20] D. Hu, Z. Qin, B. Xue, A.L. Fink, V.N. Uversky, Effect of methionine oxidation on the structural properties, conformational stability, and aggregation of immunoglobulin light chain LEN, *Biochemistry* 47 (2008) 8665–8677, <https://doi.org/10.1021/bi800806d>.
- [21] M.R. Hurler, L.R. Helms, L. Li, W. Chan, R. Wetzel, A role for destabilizing amino acid replacements in light-chain amyloidosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91 (1994) 5446–5450, <https://doi.org/10.1073/pnas.91.12.5446>.
- [22] L.M. Blancas-Mejía, P. Misra, C.J. Dick, S.A. Cooper, K.R. Redhage, M.R. Bergman, T.L. Jordan, K. Maar, M. Ramirez-Alvarado, Immunoglobulin light chain amyloid aggregation, *Chem. Commun.* 54 (2018) 10664–10674, <https://doi.org/10.1039/C8CC04396E>.
- [23] S.A. Al-Mashkhi, E. Li-Chan, S. Nakai, Separation of immunoglobulins and lactoferrin from cheese whey by chelating chromatography, *J. Dairy Sci.* 71 (1988) 1747–1755, [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(88\)79741-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(88)79741-6).
- [24] R. Bauer, A. Müller, M. Richter, K. Schneider, J. Frey, W. Engelhardt, Influence of heavy metal ions on antibodies and immune complexes investigated by dynamic light scattering and enzyme-linked immunosorbent assay, *Biochim. Biophys. Acta* 1334 (1997) 98–108, [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(96\)00078-5](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(96)00078-5).
- [25] B.L. Baker, D.E. Hultquist, A copper-binding immunoglobulin from a myeloma patient. Purification, identification, and physical characterization, *J. Biol. Chem.* 253 (1978) 1195–1200, [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)38129-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)38129-2).
- [26] D.P. Davis, G. Gallo, S.M. Vogen, J.L. Dul, K.L. Sciarretta, A. Kumar, R. Raffin, F. J. Stevens, Y. Argon, Both the environment and somatic mutations govern the aggregation pathway of pathogenic immunoglobulin light chain, *J. Mol. Biol.* 313 (2001) 1021–1034, <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5092>.
- [27] L. Diomedè, M. Romeo, P. Rognoni, M. Beeg, C. Foray, E. Ghibaudo, G. Palladini, R. A. Cherny, L. Verga, G.L. Capello, V. Perfetti, F. Fioridalo, G. Merlini, M. Salmona, Cardiac light chain amyloidosis: the role of metal ions in oxidative stress and mitochondrial damage, *Antioxid. Redox Signal.* 27 (2017) 567–582, <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6848>.
- [28] R. Russo, M. Romeo, T. Schulte, M. Maritan, L. Oberti, M. Barzago, A. Barbiroli, C. Pappone, L. Anastasia, G. Palladini, L. Diomedè, S. Ricagno, Cu(II) binding increases the soluble toxicity of amyloidogenic light chains, *Int. J. Mol. Sci.* 23 (2022) 950, <https://doi.org/10.3390/ijms23020950>.
- [29] A.E. Pelaez-Aguilar, G. Valdés-García, L. French-Pacheco, N. Pastor, C. Amero, L. Rivillas-Acevedo, Site-specific interactions with copper promote amyloid fibril formation for λ 6aJL2-R24G, *ACS Omega* 5 (2020) 7085–7095, <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b03220>.
- [30] K. Bodi, T. Prokhaeva, B. Spencer, M. Eberhard, L.H. Connors, D.C. Seldin, AL-Base: a visual platform analysis tool for the study of amyloidogenic immunoglobulin light chain sequences, *Amyloid* 16 (2009) 1–8, <https://doi.org/10.1080/13506120802676781>.
- [31] A. Hernández-Santoyo, L. del Pozo Yauner, D. Fuentes-Silva, E. Ortiz, E. Rudíño-Piñera, R. Sánchez-López, E. Horjales, B. Becerril, A. Rodríguez-Romero, A single mutation at the sheet switch region results in conformational changes favoring λ 6 light-chain fibrillogenesis, *J. Mol. Biol.* 396 (2010) 280–292, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.11.038>.
- [32] M.R. Wilkins, E. Gasteiger, A. Bairoch, J.C. Sanchez, K.L. Williams, R.D. Appel, D. F. Hochstrasser, Protein identification and analysis tools in the Expasy server, *Methods Mol. Biol.* 112 (1999) 531–552, <https://doi.org/10.1385/1-59259-584-7:531>.
- [33] JASP Team, JASP (Version 0.18.3) [Computer Software], 2024.

- [34] A. Micsonai, F. Wien, É. Bulyáki, J. Kun, É. Moussong, Y.H. Lee, Y. Goto, M. Réfrégiers, J. Kardos, BeStSel: a web server for accurate protein secondary structure prediction and fold recognition from the circular dichroism spectra, *Nucleic Acids Res.* 46 (2018) W315–W322, <https://doi.org/10.1093/nar/gky497>.
- [35] S. Keller, C. Vargas, H. Zhao, G. Piszczek, C.A. Brautigam, P. Schuck, High-precision isothermal titration calorimetry with automated peak-shape analysis, *Anal. Chem.* 84 (2012) 5066–5073, <https://doi.org/10.1021/ac3007522>.
- [36] H. Zhao, G. Piszczek, P. Schuck, SEDPHAT – a platform for global ITC analysis and global multi-method analysis of molecular interactions, *Methods* 76 (2015) 137–148, <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.11.012>.
- [37] A. Waterhouse, M. Bertoni, S. Bienert, G. Studer, G. Tauriello, R. Gumienny, F. T. Heer, T.A.P. de Beer, C. Rempfer, L. Bordoli, R. Lepore, T. Schwede, SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes, *Nucleic Acids Res.* 46 (2018) W296–W303, <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>.
- [38] M. Abraham, T. Murtola, R. Schulz, S. Páll, J. Smith, B. Hess, E. Lindahl, GROMACS: high performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers, 1, *SoftwareX* 1 (2015) 1–19, <https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>.
- [39] W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, VMD: visual molecular dynamics, *J. Mol. Graph.* 14 (1996), [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5) (338–27–8).
- [40] H. Tapiero, D.M. Townsend, K.D. Tew, Trace elements in human physiology and pathology. Copper, *Biomed. Pharmacother.* 57 (2003) 386–398, [https://doi.org/10.1016/S0753-3322\(03\)00012-X](https://doi.org/10.1016/S0753-3322(03)00012-X).
- [41] E. Hifumi, H. Taguchi, R. Kato, T. Uda, Role of the constant region domain in the structural diversity of human antibody light chains, *FASEB J.* 31 (2017) 1668–1677, <https://doi.org/10.1096/fj.201600819R>.
- [42] M. Nowak, Immunoglobulin kappa light chain and its amyloidogenic mutants: a molecular dynamics study, *Proteins* 55 (2004) 11–21, <https://doi.org/10.1002/prot.10606>.
- [43] B. O’Nuallain, A. Allen, S. Kennel, D. Weiss, A. Solomon, J. Wall, Localization of a conformational epitope common to non-native and fibrillar immunoglobulin light chains, *Biochemistry* 46 (2007) 1240–1247, <https://doi.org/10.1021/bi0616605>.
- [44] L. del Pozo-Yauner, J.S. Wall, M. González Andrade, R. Sánchez-López, S. L. Rodríguez-Ambríz, J.I. Pérez Carreón, A. Ochoa-Leyva, D.A. Fernández-Velasco, The N-terminal strand modulates immunoglobulin light chain fibrillogenesis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 443 (2014) 495–499, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.11.123>.
- [45] R. Maya-Martínez, P. Gil-Rodríguez, C. Amero, Solution structure of 6aJL2 and 6aJL2-R24G amyloidogenic light chain proteins, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 456 (2015) 695–699, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.12.044>.
- [46] L. Radamaker, Y.H. Lin, K. Annamalai, S. Huhn, U. Hegenbart, S.O. Schönland, M. Fändrich, Cryo-EM structure of a light chain-derived amyloid fibril from a patient with systemic AL amyloidosis, *Nat. Commun.* 10 (2019) 1103, <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09032-0>.
- [47] L. Radamaker, S. Karimi-Farsijani, G. Andreotti, J. Baur, M. Neumann, S. Schreiner, M. Fändrich, Role of mutations and post-translational modifications in systemic AL amyloidosis studied by cryo-EM, *Nat. Commun.* 12 (2021) 6434, <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26553-9>.
- [48] L. Radamaker, J. Baur, S. Huhn, C. Haupt, U. Hegenbart, S. Schönland, M. Fändrich, Cryo-EM reveals structural breaks in a patient-derived amyloid fibril from systemic AL amyloidosis, *Nat. Commun.* 12 (2021) 875, <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21126-2>.
- [49] E. Rudiño-Piñera, A.E. Peláez-Aguilar, C. Amero, A. Díaz-Vilchis, Crystal structure of 6aJL2-R24G light chain variable domain: does crystal packing explain amyloid fibril formation? *Biochem. Biophys. Res. Rep.* 20 (2019) 100682 <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2019.100682>.
- [50] M.F. Jobling, X. Huang, L.R. Stewart, K.J. Barnham, C. Curtain, I. Volitakis, M. Perugini, A.R. White, R.A. Cherny, C.L. Masters, C.J. Barrow, S.J. Collins, A. I. Bush, R. Cappai, Copper and zinc binding modulates the aggregation and neurotoxic properties of the prion peptide PrP106–126, *Biochemistry* 40 (2001) 8073–8084, <https://doi.org/10.1021/bi0029088>.
- [51] T. Miura, K. Suzuki, N. Kohata, H. Takeuchi, Metal binding modes of Alzheimer’s amyloid β -peptide in insoluble aggregates and soluble complexes, *Biochemistry* 39 (2000) 7024–7031, <https://doi.org/10.1021/bi0002479>.
- [52] V.N. Uversky, J. Li, A.L. Fink, Metal-triggered structural transformations, aggregation, and fibrillation of human α -synuclein: a possible molecular link between Parkinson’s disease and heavy metal exposure, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 44284–44296, <https://doi.org/10.1074/jbc.M105343200>.
- [53] A. Binolfi, R.M. Rasia, C.W. Bertoncini, M. Ceolin, M. Zweckstetter, C. Griesinger, T.M. Jovin, C.O. Fernández, Interaction of α -synuclein with divalent metal ions reveals key differences: a link between structure, binding specificity and fibrillation enhancement, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 9893–9901, <https://doi.org/10.1021/ja0618649>.
- [54] L. Rivillas-Acevedo, C. Sánchez-López, C. Amero, L. Quintanar, Structural basis for the inhibition of truncated islet amyloid polypeptide aggregation by Cu(II): insights into the bioinorganic chemistry of type II diabetes, *Inorg. Chem.* 54 (2015) 3788–3796, <https://doi.org/10.1021/ic502945k>.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Instituto de
Investigación en
Ciencias
Básicas y
Aplicadas



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

POSGRADO EN CIENCIAS

Cuernavaca, Mor., a 18 de mayo de 2024

DRA. LINA ANDREA RIVILLAS ACEVEDO
COORDINADORA DEL POSGRADO EN CIENCIAS

PRESENTE

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la tesis titulada: Efecto de fragmentos peptídicos en la formación de fibras amiloides de la proteína 6aJL2R24G inducidas por Cu(II), que presenta la L. en C. María Fernanda Mata Salgado (10002756) para obtener el título de Maestra en Ciencias.

Dirección de tesis: Dra. Lina Andrea Rivillas Acevedo

Unidad Académica: Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas (IICBA)

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN	FIRMA
Dra. Carmen Nina Pastor Colón CIDC-UAEM	APROBADO	
Dr. Cesar Millán Pacheco FF- UAEM	APROBADO	
Dr. Enrique Rudiño Piñera IBT-UNAM	APROBADO	
Dr. Daniel Alejandro Fernández Velazco FM-UNAM	APROBADO	
Dra. Lina Andrea Rivillas Acevedo CIDC - UAEM	APROBADO	





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

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

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

Sello electrónico

LINA ANDREA RIVILLAS ACEVEDO | Fecha:2024-05-18 15:01:42 | FIRMANTE

ynKdjiRAclomKlhV/BbHQemIFxpQECqteSIB9Xa5pvGvYiws3hVqlaMoen7TZY+KH9pBw2tWibiLh9v9Vw8LkZyNwG421kFZTJNGXd5IUICR/KtVoaxT4ZbilYk6Dqi2ghxHOkul5qm960Eh6Vaod8H7kFh4Hkm5/lunb+dUKL1f7Jb0BWFR2Aqeb1eOw88zC9+/3ywnwqEkXrV4GufEu7WIPDvwhmwmOvrN/mJGS7v36yQ1bjAs7kKNtuRMnEyGY0y52ENLhijfM4Qp9KHxJS4eoSAq9igVQl38MqFxCJkRfzYix78ST5akkCoqKPZ1+i5R73+VZx7LJDqO6dBrQ==

CESAR MILLAN PACHECO | Fecha:2024-05-19 15:21:30 | FIRMANTE

Lhipb+bVOIB1qmrzyMx/31jPPDgTCazwSApaZuqF6o0KeBYh8F/Puz/K1KFExUblboSkxba+3gkYBYBI8NcmO/8G8FT+u5czHLJ0U42dS6jUdUbtSqsveFRMKyNHLuudssBR6Ctd5yDhxGackUvezU3PLizGH3s4RYjADNHbFa8AbTQ/KDuKFEPayqexbaZELGkL6VEE1giZ8l+I0OBJx4hCmu6qxhs4TA9bHjkoG7FPADvKpY/9IoR5O8SPuLe/BnYmEciS6k7YpPvBr0NvxZBzbRiW0Tj5kOnbAZWWXOPfLz5XuXzw03w/pvub6cOTTOM9CteXIGEFmyrZVWFQ==

DANIEL ALEJANDRO FERNÁNDEZ VELASCO | Fecha:2024-05-20 06:12:42 | FIRMANTE

V4GXEuHrWsoUuMZd53ivmCCykR5EZ6GB/706Y7nhY9C+a1TfJcobwGYOzykpq8DnJctyhiMd5fwvDErvAR5XF6afkQEwbDTlfrHjM/FDK1D/pHgK4HXe2ACxr+uaL18EAs/zur7m0vzB73DOLHPTN1p0gUJyuPdqrduQw0dzfKQzxtTs5mJCj73rbsKMIHKOOYveTRE6B2ulkg3hPAWau31mhkVMZCV2Lvu0+S9dcQkOOxV+WnaMfbzFjdpB2vEKKf1pAnYqmOSjtODH/6HYp1WYfo7IXwECn/RyA1rxRo23w7pLW2JrSxo0dW5mN8ZBYDTyahLQs1q0JNSbTmLPaIA==

CARMEN NINA PASTOR COLON | Fecha:2024-05-20 08:36:22 | FIRMANTE

uJxMRH3qsj+wR3N5LYsE6AFv8wa0I8keTd8VNAajTfoBE4ipH14KGSlaaJa5rmOrZFwz6NfeLQeR917OxJwEkWZBmcWx9Uteep+MimKQjrfA9DIXzrUH1j3RIPoFNgyBTXRIIsRF34eT90tGVumygvVldr4+mz0m3MG29FPVoQJtdAboikud477HjN83R576XEr3Nm+Ktd8OVZ6EzL1FswWWC9doGkqnUJjQAnMzLO7qyhU0XtJjyWxFGNUzQkjXEwYEuRAu87tCNKVpApCVQXpd1GA2ikoyZcoQhiospsnyANZ76n11HXbcltCMIGcYNoxbVIFH+Uve4lq0gHQ==

ENRIQUE RUDIÑO PIÑERA | Fecha:2024-05-20 09:51:15 | FIRMANTE

P8j+J/uf5hEpB/ivMwIPErnwHDG5v7EfcIAsuCKPvHtUnMzL5w8offJWGx/xpjic9uuANDxLotnMM9ljl16tVqeP+NfZnMSVn3/oJ9d7yrdqZfIgyL9xKgDDoTua3OjPvo0WmX2ETt5oIFCDH5zMyiT0r3v+O3ik+7c058IRRrW2saWZK18H1J8X/YOVwTIU9Pdh2071ghWEksFiEICAJKWl6VEqjYwY+Z5cE6+3MCSiAf+WUoXpgKIWmx1kteXjp2y/DwQ2iCti2I3tAuTf4Nf/83ww2Dr8oE5v+dPo6DHh9o04axqj5o2uUD5TtvtOOLnnJAXY2C7RMR3OIQ==

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



YhBCc5igk

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/cbGIJ2LgPa4uwHlZabs69RS3McN9Zqj>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029