

00551



**Universidad Nacional Autónoma  
de México**



**Instituto de Biotecnología**

ESTADO LIBRE NO SUJE  
DE LA BIBLIOTECA

**Estudios estructurales de dominios variables de la  
línea germinal  $\lambda 6a$ .**

Tesis que para obtener el grado de Maestro en Ciencias  
(dentro del programa de Posgrado en Ciencias Bioquímicas)

PRESENTA

**Biol. Paula González-Rubio Garrido**

Junio 2005

m<sup>c</sup> 346468



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **Agradecimientos**

Agradezco a CONACyT, beca No.181152, por el apoyo otorgado para la realización de este tesis.

Agradezco enormemente a los miembros de mi comité tutorial: Dr. Enrique Morett, Dr. Miguel Ángel Cevallos y Dr. Eduardo Horjales, por sus valiosas aportaciones a este trabajo.

Agradezco a mis sinodales: Dra. Irma Aguilar, Dr. Alejandro Fernández, Dra. Rosana Sánchez y al Dr. Baltasar Becerril, por sus recomendaciones para la elaboración de ésta tesis.

Quiero agradecer también a mis compañeros del laboratorio Jonathan, Yagul, Lilian, Eugenio, Sonia, Chayito y Mauricio; a Jerome y a mis queridas Margara y Laura; y muy especialmente a Enrique Rudiño, por todo.

*A Diego*

*A mis padres Conchita y Javier,  
y mis hermanos Andrea, Javier  
y Claudia.*

## Índice

Resumen .....	3
Introducción .....	4
Marco Teórico.....	6
<b>1 Consideraciones sobre cristalografía.....</b>	<b>6</b>
1.1 Cristalización: produciendo la materia prima.....	6
1.2 Difracción Por Rayos X: obteniendo los datos .....	7
1.3 Sobre cristales de proteínas y sus simetrías .....	9
1.4 Colecta de datos .....	11
1.5 Factores de estructura y obtención de fases: construyendo el modelo .....	13
1.6 Ajuste del modelo estructural .....	15
1.7 Parámetros estructurales de validación del modelo .....	16
<b>2 Amiloidosis dependiente de cadenas ligeras de anticuerpos .....</b>	<b>18</b>
2.1 Características generales de las fibras amiloideas .....	20
2.2 La amiloidosis primaria AL .....	21
2.2.1 Los dominios variables de cadenas ligeras de inmunoglobulinas .....	21
2.2.2 La importancia de la estructura primaria .....	23
2.2.3 Ensamblaje de la fibra amiloidea .....	24
2.2.4 Características estructurales de dominios variables de cadenas ligeras amiloidogénicas .....	26
2.2.5 Características estructurales de dominios variables de cadenas ligeras $\lambda 6a$ .....	27
<b>3 Antecedentes .....</b>	<b>29</b>
<b>Objetivos .....</b>	<b>32</b>
Objetivo general .....	32
Objetivos particulares .....	32
<b>4 Metodología .....</b>	<b>32</b>
4.1 Procesamiento de datos.....	32
Integración y auto asignación de índices (autoindexing) .....	32
Ordenamiento y determinación de escalas relativas (Sorting y Scaling) .....	32
4.2 Construcción del modelo tridimensional .....	33
Obtención de fases por Reemplazo molecular .....	33
Afinamiento del modelo .....	33
Validación del modelo .....	33
4.3 Análisis comparativo de los dominios variables .....	34
<b>5 Resultados.....</b>	<b>35</b>
5.1 Procesamiento de los datos de difracción .....	35
5.2 Construcción del modelo cristalográfico de V $\lambda 6a$ JL2 y su mutante V $\lambda 6a$ JL2-H8P .....	36

5.2.1 Obtención de fases por Reemplazo Molecular y construcción del modelo.....	36
5.2.2 Afinamiento de los modelos .....	36
5.2.3 <i>Particularidades del afinamiento del modelo dimérico de la forma I en P4<sub>1</sub>22</i> .....	37
5.2.4 <i>Particularidades del afinamiento del modelo octamérico de la forma II en P2<sub>1</sub></i> .....	39
5.2.5 <i>Particularidades del afinamiento del modelo monomérico de la Forma III en I4<sub>1</sub>22</i> .....	41
5.2.6 <i>Particularidades del afinamiento del modelo tetramérico de Vλ6aJL2-H8P en P2<sub>1</sub></i> .....	43
<b>5.3 Tres grupos espaciales un mismo empaquetamiento helicoidal .....</b>	<b>44</b>
<b>5.4 Estructura monomérica del dominio variable Vλ6aJL2 y su mutante Vλ6aJL2-H8P.....</b>	<b>50</b>
<b>5.5 Descripción de la estructura de la interfase monómero-monómero del dímero formado por dominios variables Vλ6aJL2 .....</b>	<b>62</b>
<b>5.6 La hélice cristalina como un símil de la fibra amiloidea.....</b>	<b>66</b>
<b>6 Conclusiones.....</b>	<b>81</b>
6.1 Modelo de formación del arreglo helicoidal fibrilar de Vλ6aJL2 .....	81
<b>Perspectivas .....</b>	<b>82</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>83</b>
<b>Apéndice I</b>	
<b>Purificación y cristalización de la enzima 5-aminolevulinato sintasa (Hema) .....</b>	<b>87</b>

## Resumen

La formación de agregados fibrilares amiloides es la base de enfermedades un grupo de enfermedades conocidas como amiloidosis entre las que destaca la amiloidosis asociada a de cadenas ligeras de inmunoglobulinas.

En este trabajo se busca explicar las propiedades estructurales que conducen a la formación de fibras amiloides por los dominios variables de cadenas ligeras de inmunoglobulinas, codificados por la línea germinal lambda-6a, la cual se ha relacionado importantemente con éste padecimiento.

Se resolvió la estructura tridimensional por cristalografía de rayos X de dos dominios variables recombinantes generados a partir del gene V $\lambda$ 6a y el gene de unión JL2: V $\lambda$ 6a JL2 y su mutante H8P no-amiloidogénica. Se obtuvo la estructura de cada uno a resoluciones de 2.2-2.5Å y con valores de R y de R<sub>free</sub> de 20% y 24%, aproximadamente. En el caso de V $\lambda$ 6aJL2, se observó que el dominio variable presenta una estructura estabilizada por la formación de dímeros. Estos últimos, producen en los cristales, arreglos periódicos helicoidales de simetría 4<sub>1</sub>, que son el resultado de las interacciones entre residuos de la línea germinal y algunos vinculados con la formación de fibras que se distribuyen en la superficie del dímero y que forman grandes interfases de contacto que impiden el paso del solvente. En el caso del dominio mutante V $\lambda$ 6aJL2-H8P, aunque el dominio forma dímeros, estos no presentaron en el cristal, la estructura helicoidal presente en la no-mutante, la cual se estabiliza por la formación de puentes salinos donde participan principalmente, la His8 y el Asp85.

Se propone que la hélice cristalina podría ser un símil de la estructura fibrilar amiloidea, donde el dímero sería el elemento estable de nucleación y donde la His8 favorece el arreglo periódico.

Como apéndice, se incluye en esta tesis el trabajo realizado con la enzima 5-aminolevulinato sintasa de *Bradyrhizobium japonicum*, referente a experimentos relacionados para lograr su cristalización.

## Introducción

La comprensión cabal de los fenómenos biológicos a nivel molecular toma forma al conjuntar el estudio sistemático de la estructura y la función de las proteínas.

La disciplina que desarrolla y utiliza técnicas experimentales que permiten conocer, desde diferentes perspectivas, las bases moleculares y estructurales de la actividad biológica es la biología estructural, y constituye una de las vertientes más importantes de la actividad científica moderna.

La biología estructural debe su desarrollo a la conjugación de distintas técnicas que intentan, a partir de su estructura tridimensional, esclarecer las incógnitas de los complejos macromoleculares esenciales para la vida, así como de aquellos que la perturban. Una de estas técnicas es la cristalografía de proteínas.

En los últimos años, la cristalografía de rayos X, ha abierto una puerta al universo de análisis de las moléculas esenciales para la vida. Sus virtudes analíticas, así como los avances en sus técnicas de estudio, han fomentado su utilización en la investigación de las biomoléculas.

La cristalografía de rayos X de proteínas es una técnica lo suficientemente poderosa para identificar detalladamente la ubicación espacial de las alteraciones evolutivas que, en la naturaleza, condujeron al advenimiento de nuevas funciones; así como distinguir la ubicación de mutaciones responsables de enfermedades. Permite por otro lado, visualizar las diversas conformaciones que pueden adoptar las proteínas y reconocer, con prolijidad atómica, la índole de las interacciones que éstas mantienen al formar complejos con sus

contrapartes celulares (otras proteínas, ácidos nucleicos, etc), tanto en procesos constitutivos como patológicos.

Entre las patologías que afectan fuertemente la función celular se encuentran aquellas relacionadas con la acumulación de proteínas disfuncionales en agregados fibrilares o amorfos.

La amiloidosis asociada a cadenas ligeras es una enfermedad que se caracteriza por la acumulación de agregados proteináceos filamentosos estables y ordenados que se conocen como fibras amiloideas.

La estructura atómica de las fibras amiloideas es aún una incógnita y por lo tanto los elementos que le confieren estabilidad aún se ignoran. El carácter estructural de los dominios variables de cadenas ligeras que componen las fibras aún no se ha esclarecido con precisión y por lo tanto, la naturaleza de las interacciones capaces de estabilizar una conformación del dominio, que promueva un arreglo altamente ordenado como lo es la fibra, se han referido sucintamente.

Se han descrito varias generalidades para los agregados amiloides producidos por distintas proteínas. Éstas han conducido a una mayor comprensión del fenómeno; sin embargo, con el creciente desarrollo de nuevas técnicas analíticas y de observación de estructuras moleculares, es cada vez más evidente que muchas de estas generalidades se tornan absurdas al tomarse al pie de la letra, ya que se observan claras particularidades en cada agregado amiloide. Las contribuciones que se puedan hacer para esclarecer las propiedades de semejante agregado patológico resultan entonces, de gran trascendencia.

En este contexto, la utilización de la cristalografía de rayos X para determinar la estructura tridimensional de proteínas precursoras de agregados amiloides -como los dominios variables de cadenas ligeras-, ya sea en sus formas monomérica, dimérica y oligomérica, brinda información crucial para entender los mecanismos de formación de la fibra y su función.

El interés en resolver la estructura tridimensional del dominio variable V $\lambda$ 6aJL2, radica en que, como dominio variable prototipo de la línea germinal  $\lambda$ 6a pudiera brindar nociones de los elementos propios de la línea germinal que promueven o impiden la formación de las fibras amiloideas.

A lo largo de éste trabajo se discute la hipótesis de que el arreglo helicoidal en que se disponen los dominios variables en el cristal, sugiere grandes similitudes con el agregado fibrilar patológico. Con base en este supuesto, se describen las características que confieren orden y estabilidad al arreglo helicoidal, así como se describen

los residuos implicados en su formación. Para tales descripciones, se realiza previamente una descripción detallada de la estructura monomérica y dimérica del dominio variable.

Con tal propósito y con el afán de que los resultados cristalográficos sean accesibles aún para el lector inexperto, se introducen, inicialmente, algunos aspectos importantes a considerar concernientes a la cristalografía de proteínas. Posteriormente, se expone el panorama de la investigación sobre fibras amiloideas, y en particular el concerniente a la amiloidosis asociada a cadenas ligeras.

La sección de resultados comprende tanto resultados cristalográficos como la descripción estructural del dominio, del dímero y del arreglo helicoidal.

A manera de apéndice se incluye un trabajo previo relativo a la cristalización de la enzima 5-aminolevulinato sintasa.

## Marco Teórico

### 1 Consideraciones sobre cristalografía de proteínas

El proceso de construcción de un modelo tridimensional por cristalografía de rayos X comprende varias etapas que en las secciones siguientes se reseñarán: cristalización, colecta de datos, integración y reconocimiento de simetrías, procesamiento de datos, obtención de fases, construcción del modelo y las subsecuentes inferencias funcionales con base en la estructura.

#### 1.1 Cristalización: Produciendo la materia prima<sup>1</sup>

Los cristales de proteína, como todos los tipos de cristales, son arreglos tridimensionales regulares mantenidos por uniones no covalentes de moléculas ordenadas de acuerdo a simetrías bien definidas.

Al ser la proteína la unidad constitutiva del cristal, la pureza de ésta es una condición categórica en la obtención del mismo. Gracias a los avances en las herramientas biotecnológicas, la obtención de proteína pura en grandes cantidades (mayor al 99%, sin contaminantes y con homogeneidad conformacional y oligomérica) se ha hecho más sencilla. Cualquier heterogeneidad puede afectar el crecimiento cristalino ya sea impidiéndolo o provocando alteraciones en el empaquetamiento que en consecuencia afecten la difracción.

El que una proteína cristalice y la calidad del cristal que forme, dependen en gran medida de la estabilidad estructural de la molécula, la cual a su vez responde a su flexibilidad conformacional. El empaquetamiento cristalino depende de esta estabilidad estructural y en él, los contactos proteína-proteína son esenciales. Los puentes salinos y de hidrógeno, las interacciones van der Waals, los enlaces dipolo-dipolo y de apilamiento planar (*stacking*) son algunos de ellos. La cohesión débil entre las moléculas se debe a que sólo una pequeña parte de la superficie de la macromolécula participa en los contactos intermoleculares y el resto está en contacto con el solvente.

La formación de un cristal de proteína requiere de un estado de sobresaturación, es decir, donde la concentración de proteína exceda su valor de equilibrio de solubilidad que alcance un estado termodinámicamente inestable que conduce a una fase cristalina cuando regresa al equilibrio. La sobre-saturación es función tanto de la alta concentración de la proteína, como de los factores que disminuyen su solubilidad (disminución de la velocidad de evaporación, pH, fuerza iónica, temperatura, adición de agentes precipitantes, entre otros). El crecimiento de cristales de estas moléculas debe darse, por consiguiente, en condiciones acuosas y químicas complejas que en conjunto constituyen la solución precipitante.

Hasta hace unos años, producir cristales de proteína era una tarea colosal debido a la enorme cantidad de variables involucradas en el proceso y a

<sup>1</sup> La información que se resume en esta sección se puede consultar en el libro *Protein Crystallisation* editado por Terese M. Bergfors (Bergfors, 1999).

la fragilidad de los cristales. El desarrollo de micro-métodos para cristalización que permitieran alcanzar la supersaturación de la proteína por medio de diálisis y difusión de vapor, significó un parteaguas en la cristalografía de las macromoléculas. Estos métodos (algunos de ellos descritos en la sección Métodos) permiten un manejo cuidadoso de todas las variables involucradas en el proceso.

La cristalización comienza con una fase de nucleación, seguida de una fase de crecimiento. La aparición de un cristal macroscópico de proteína, compuesto de alrededor de  $10^5$  moléculas, empieza con la asociación de agregados de proteína cuyos contactos intermoleculares no covalentes semejan aquellos del cristal final. Este estado pre-nuclear eventualmente alcanza un tamaño nuclear crítico y se estabiliza, entonces el crecimiento procede por la adición de moléculas a la red cristalina.

Cuando se determina una estructura cristalográfica por difracción de rayos<sup>2</sup> X, un aspecto taxativo de la posibilidad de observación, es la resolución a la cual, la fuente de radiación y la calidad del cristal, permiten que se resuelva la estructura de la molécula que lo conforma. A medida que la resolución aumenta, el detalle de las observaciones es mucho mayor y por lo tanto, las explicaciones erigibles a partir de ellas son más precisas. Por lo tanto, un aspecto

fundamental en esta ciencia es la obtención de cristales de buena calidad.

La calidad del cristal, es decir, cuál es la máxima resolución a la que puede difractar y por lo tanto dar información, depende del empaquetamiento de las moléculas en la red cristalina, de la morfología externa del cristal y de la estructura interna del mismo (la pureza de la proteína y de todos los productos químicos utilizados); sin embargo, la morfología externa de un cristal no siempre refleja su calidad, por lo que hasta que no se difracte, no se sabe la resolución máxima que brinda. Con la disponibilidad de fuentes poderosas de rayos X, instrumentos para colectas de datos cada vez más rápidos y computadoras más veloces, la producción de cristales que difracten a altas resoluciones se ha vuelto el cuello de botella de la cristalografía de macromoléculas.

Se abordaran a continuación algunos aspectos relacionados con la difracción por rayos X y las propiedades simétricas del cristal que repercuten en la misma; así como, los procesos relacionados con la construcción de estructuras cristalográficas.

## 1.2 Difracción Por Rayos X: obteniendo los datos

Aunque en teoría los rayos X permitirían ver la difracción de una sola molécula, la intensidad con la que ésta difractaría sería muy pequeña, indistinguible del ruido, por lo que al utilizar cristales con  $10^5$  moléculas se amplifica esta señal. Por otro lado, si se tuviera una fuente de rayos X, suficientemente intensa para poder detectar la difracción de una sola molécula, su intensidad sería tal que la

<sup>2</sup> Se utilizan los rayos X debido a que su longitud de onda (1.5 Å) es equiparable al tamaño de la nube electrónica alrededor de los átomos (1.0 Å), lo que permite que dimensiones tan pequeñas puedan ser observadas indirectamente. Es una observación indirecta porque a diferencia de los microscopios, donde se tienen lentes para combinar y recolectar los rayos de luz visibles reflejados por el objeto a observar, para los rayos X no existen tales lentes y por lo tanto la aproximación para recombinar los rayos difractados que se capturan en un detector conlleva otras complicaciones

molécula se destruiría antes de emitir la difracción deseada. La señal amplificadora es el resultado de la difracción de los electrones de las proteínas que conforman el cristal, por lo tanto, depende del arreglo cristalino que se ve afectado por las condiciones descritas en la sección 1.1.2.

Cuando se hace cristalografía de rayos X, el objetivo principal es obtener datos que nos permitan construir modelos tridimensionales con la mayor resolución posible. Los límites de la resolución son revelados por el patrón de difracción<sup>3</sup> (Sands, 1975). Con base en él se conoce la simetría de la celda unitaria, se miden las intensidades de difracción y se calculan los factores de estructura o amplitudes de cada onda difractada<sup>4</sup> (Sands, 1975). A partir de estos últimos -indispensables para la determinación estructural-, se genera un mapa de densidad<sup>5</sup> que permite conocer la posición de los átomos, según la distribución electrónica de la fuente de difracción, es decir, la nube de electrones de cada átomo en la celda unitaria del cristal (Rhodes, 2000).

La colecta de los datos de difracción constituye la última etapa experimental y debe ser llevada a cabo con el mismo rigor que las otras etapas experimentales. Si bien existen grandes avances que la han hecho más sencilla y rápida, y que muchos de los parámetros

necesarios para su ejecución pueden ajustarse automáticamente, las decisiones acuciosas que el investigador pueda tomar sobre como proceder en la colecta, determinan la calidad de los datos primarios de difracción. Dos factores sumamente importantes dependerán, entre otros, de estas decisiones: la resolución y la integridad de los datos (Dauter, 1999).

La resolución de un conjunto de datos de difracción, se refiere a la mínima distancia con que dos objetos pueden identificarse como diferentes a partir del patrón de dichos datos de difracción. La resolución determina la cantidad de datos de los cuales se pueden conocer sus fases<sup>6</sup> y por lo tanto que pueden ser utilizados para la determinación de la estructura (Rhodes, 2000). La integridad de estos datos describe la cantidad de observaciones que permitan conocer la estructura a partir de las simetrías que conforman el cristal. Durante las primeras difracciones es posible conocer estas propiedades de simetría y de ellas dependerá la estrategia a seguir (Dauter, 1999).

La simetría es un concepto esencial sobre el cual la cristalografía se funda, desarrolla y expande. Es importante abordar algunos de sus aspectos fundamentales para comprender mejor cómo responde a ella la estrategia de colecta para obtener datos más completos, y cómo determina las propiedades cristalinas. En la sección

<sup>3</sup>Un patrón de difracción es la imagen en el espacio recíproco de todos los átomos que conforman el cristal difractado. Cada punto del patrón representa la reflexión de todos los átomos que por su arreglo espacial en el cristal producen ondas de difracción que se interfieren positivamente.

<sup>4</sup>Un factor de estructura es una serie de Fourier que describe un rayo X difractado que produce una reflexión en el detector

<sup>5</sup>Un mapa de densidad electrónica es una representación topográfica de las zonas espaciales con mayor densidad de electrones. Es el producto espacial de la difracción de la nube de electrones de los átomos que conforman la proteína y por lo tanto es la guía para encontrar la estructura a la que pertenece dicho mapa.

<sup>6</sup>La fase se refiere al ángulo con que cada rayo difracta desde el cristal. Ya que durante la difracción cada punto en el patrón de difracción es la contribución de todos los átomos que difractaron en fase, el reconocimiento de aquella que distingue a una onda difractada de otra, es indispensable para ubicar espacialmente cada átomo. Debido a que estas fases no se pueden conocer de manera directa se emplean distintos métodos para inferirlas.

siguiente abordaremos brevemente este tema.

### 1.3 Sobre cristales de proteínas y sus simetrías

Como ya dijimos en el capítulo anterior, un cristal es un ordenamiento simétrico de moléculas caracterizado por un conjunto de parámetros que definen

exactamente la posición  $(x,y,z)$  y la periodicidad (traslaciones dentro del cristal) de la unidad fundamental que lo compone: la celda unitaria (Sands, 1975). Una celda unitaria es el paralelogramo más pequeño que conforma el cristal y está definido por seis parámetros (Rhodes, 2000): tres longitudes  $a, b, c$  (en los ejes  $x, y, z$ ) y tres ángulos  $\alpha, \beta, \gamma$  (Figura 1.1).

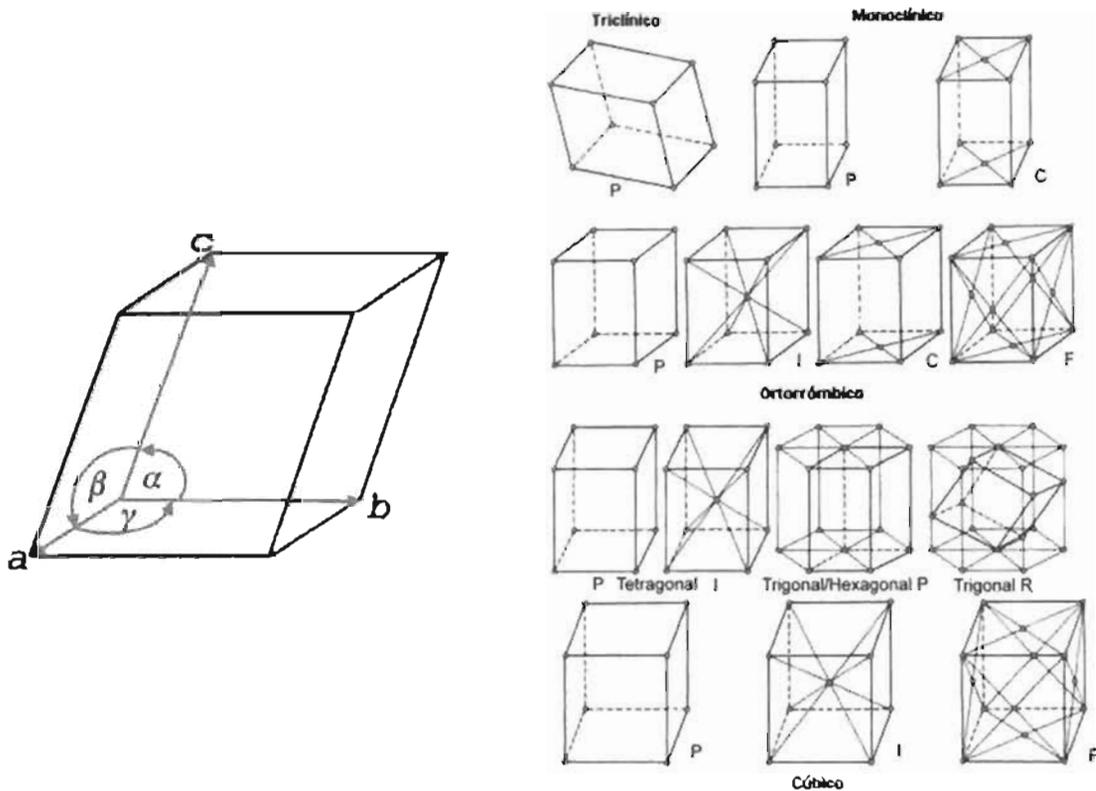


Figura 1.1. Muestra a la izquierda, una celda unitaria en la que se especifican sus lados  $a, b$  y  $c$  y ángulos  $\alpha, \beta$  y  $\gamma$ . A la derecha las distintas redes cristalinas. Figuras tomadas de Structural Medicine Course en <http://www-structmed.cimr.cam.ac.uk/course.html>.

Cada celda unitaria se define por una red cristalina, es decir, un arreglo de puntos sobre los vértices ( $P$ ), caras ( $C$  o  $F$ ) o centro ( $I$ ) de la celda unitaria, de

tal manera que alrededor de cada uno se encuentra el mismo ambiente y orientación que el que rodea a los demás (Glasser Dent, 2001)(Figura 1.1).

Clases cristalinas (Laue con *)	Redes cristalinas compatibles y su simetría	Número de grupos espaciales	Simetría mínima	Restricción métrica (celda unitaria)	Sistema cristalino
1 1*	P 1	2	1 ó 1	Ninguna $a \neq b \neq c$ y $\alpha \neq \beta \neq \gamma \neq 90$	Triclínico
2 m 2/m*	P C (1) 2/m	13	Un 2 ó 2	$a \neq b \neq c$ $\alpha = \gamma = 90 \beta \neq 90$	Monoclínico
222 2mm mmm*	P C (A,B) I F mmm	59	Tres 2 ó 2	$a \neq b \neq c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90$	Ortorrómico
4 4/m* 4mm 422 42m 4/mmm*	P I 4/mmm	68	Un 4 ó 4	$a = b \neq c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90$	Tetragonal
23 m3* 432 43m m3m*	P I F m3m	36	Cuatro 3 ó 3	$a = b = c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90$	Cúbico
6 6 6m* 6mm 622 62m 6/mmm*	P 6/mmm	27	Un 6 ó 6	$a = b \neq c$ $\alpha = \beta = 90 \gamma = 120$	Hexagonal
3 3* 3m 32 3m*	P 3m (R) 6/mmm	25	Un 3 ó 3	$a = b \neq c$ $\alpha = \beta = 90 \gamma = 120$	Trigonal
Total: 32, 11*	14 independientes	230			7

Cuadro 1.1. Se describen las propiedades de simetría asociadas con cada celda unitaria. Las 14 redes de simetría compatibles con las clases cristalinas y su correspondencia con los 7 sistemas cristalinos que restringen las dimensiones de la celda unitaria. Al combinar las redes cristalinas con los grupos puntuales se obtienen 230 modos de repetir un objeto en el espacio tridimensional, a lo que se llama grupos espaciales. Figura tomada de (Glasser Dent, 2001).

La simetría fundamental que ostenta un cristal es la repetición por traslación, en las tres dimensiones, de su celda unitaria para generarlo (Sands, 1975). Cada celda unitaria se forma por la aplicación de operadores de simetría a la unidad asimétrica<sup>7</sup> (la molécula funcional, o parte de ella). Las moléculas en la celda unitaria pueden estar relacionadas por elementos de simetría que no están alineados con los elementos de simetría de la celda unitaria completa y que se consideran simetrías no-cristalográficas ya que no

generan todo el cristal (Rhodes, 2000). Cabe aclarar que la unidad asimétrica, si tiene simetría propia, puede consistir en muchas unidades biológicas o sólo la mitad de la unidad funcional de la proteína (Rhodes, 2000). Es importante tener en mente esto ya que la simetría de las macromoléculas funcionales en solución es una propiedad indispensable a considerar para entender su función.

Las repeticiones dentro de la celda unitaria se describen por los operadores de simetría o elementos de simetría y el punto donde estos se conjugan es el eje de simetría (Glasser Dent, 2001). Debido a que las proteínas están constituidas generalmente por enantiómeros L de aminoácidos, los

<sup>7</sup>Existen 230 grupos espaciales tridimensionales de los cuales las moléculas biológicas sólo cristalizan en aquellos que no poseen simetría de inversión (sólo 65), los operadores simétricos para aplicar a la unidad asimétrica para generar la celda unitaria dependen de la naturaleza del grupo espacial al que pertenece ésta.

elementos de simetría que son aplicables a la reconstrucción de un cristal de proteína se limitan a las traslaciones, las rotaciones alrededor de un eje de simetría y la combinación de estos dos: la roto-traslación a lo largo de un eje helicoidal (Glasser Dent, 2001).

En los cristales, los ejes de simetría sólo pueden ser: binarios (2), ternarios (3), cuaternarios (4) ó senarios (6), dependiendo del número de repeticiones que se produzcan de la unidad asimétrica (Glasser Dent, 2001). Estos definen el orden de la rotación. Los ejes helicoidales por otro lado, se representan con el número de orden de la rotación, con un subíndice que cuantifica el deslizamiento a lo largo del eje<sup>8</sup>.

La simetría total dentro de la celda unitaria se describe por varios elementos de simetría que al pasar en conjunto por un mismo eje forman distintas clases cristalinas que tienen que ser compatibles con la periodicidad por traslación en el cristal (Glasser Dent, 2001) (cuadro 1.1). Sólo existen 14 modos de repetición por traslación compatibles con las clases cristalinas, y se conocen como redes de Bravais (Sands, 1975), las cuales, describen el ambiente equiparable alrededor de cualquier punto dentro de la red cristalina según el arreglo de puntos dentro de la celda unitaria. Sin embargo, la red cristalina no es infinita, se encuentra restringida a las dimensiones de la celda unitaria, según la simetría mínima que alberga, por 7 sistemas cristalinos (Rhodes, 2000) (Cuadro 1.1). Al combinar las redes cristalinas con los grupos puntuales (las clases cristalinas) se obtienen 230 modos de repetir un

objeto en el espacio tridimensional, llenando el espacio completamente (sin dejar agujeros), a lo que se llama grupos espaciales (Glasser Dent, 2001). La descripción de los 230 grupos espaciales agrupados en grupos puntuales y sistemas cristalinos se encuentra en las International Tables for X-Ray crystallography.

El grupo espacial se define por un símbolo crítico formado por la letra mayúscula que corresponde a la red cristalina, seguida de tres números con subíndice que indican los operadores de simetría ejecutables que reconstruyen el cristal (Rhodes, 2000) (ej.  $P4_122$ , donde P indica que la unidad asimétrica está en los vértices de la celda;  $4_1$ , que para generar el cristal se le aplican operadores de simetría alrededor de un eje de simetría cuaternario con una traslación asociada de  $1/4$  del periodo en la dirección del eje de la celda unitaria; y los dos últimos 2 a que en los otros ejes se le aplican simetrías binarias).

Las restricciones en las posibles simetrías que ostentan las proteínas, limitan la cantidad de grupos espaciales que pueden describir las repeticiones en cristales formados por estas moléculas a sólo 65 de los 230 grupos espaciales (Rhodes, 2000)(Cuadro 1.1).

#### 1.4 Colecta de datos

La periodicidad<sup>9</sup> dentro del cristal -descrita por los grupos espaciales- es la característica fundamental que permite que sea capaz de amplificar la difracción de los rayos X (Rhodes, 2000). Se puede interpretar esta periodicidad

<sup>8</sup> Así, un eje helicoidal del tipo  $4_1$  representa que en cada una de las 4 rotaciones, la traslación asociada es de  $1/4$  del periodo en la dirección del eje de la celda unitaria.

<sup>9</sup> La periodicidad de un cristal no siempre es perfecta ya que hay muchos desordenes locales y dislocaciones que la afectan.

tridimensional como una colección de planos paralelos -tal como lo hizo Bragg<sup>10</sup>- con igual separación interplanar y una misma dirección en común (ej. un vector que se describe por una normal), que se interceptan en todas direcciones dentro del cristal (Rhodes, 2000). Estos planos se especifican por tres índices hkl (índices de Miller) que cortan respectivamente, los ejes a, b y c de la celda unitaria (Rhodes, 2000) un cierto número de veces, y que representan la red cristalina. Esta última, describe el espacio real, es decir, el espacio tridimensional que contiene a la unidad asimétrica. Se puede construir una inversa de la red real y obtener una red recíproca donde la dirección de los planos se describa por la normal de los planos originales (Rhodes, 2000), pero que el espaciamiento entre ellos esté relacionado por el inverso de la distancia inter-planar de la red real. Esta red recíproca es lo que se observa en un patrón de difracción.

Cuando los rayos X interactúan con los electrones de las moléculas dentro del cristal, son reemitidos en todas direcciones. Aquellos reemitidos por distintos electrones, viajan distintas distancias y por lo tanto difieren en sus fases relativas (Rhodes, 2000). Si estos rayos (ondas) son emitidos con la misma fase<sup>11</sup> se interfieren positivamente. Por lo tanto, la amplitud resultante es la diferencia de las amplitudes individuales. La interferencia positiva de estas ondas es lo que se observa en un patrón de difracción como puntos de distintas intensidades.

Entonces, si se consideran los planos que describen el cristal, como espejos que reflejan a los rayos X (produciendo cada punto en el plano difracta rayos X), entonces podemos considerar los puntos de difracción como reflexiones totales con cierta intensidad,  $I(hkl)$ . Esta última, es la suma o interferencia positiva de todas las amplitudes de onda de rayos incidentes y reflejados con un mismo ángulo (fase), por los planos paralelos de índice hkl que cumplan la ley de Bragg (Ec.1) (Rhodes, 2000),

Ec.1

$$2d_{hkl} \sin\theta_{hkl} = n\lambda$$

es decir, que difracten en fase, si y sólo si, la diferencia entre sus direcciones es igual a un múltiplo de la longitud de onda (diferencia en la dirección =  $n \times \lambda$ ). La ley de Bragg también predice que mientras más pequeña sea la distancia que separa los planos hkl (d), mayor será el ángulo  $\theta$  de difracción para esa difracción, proporcional a  $1/d$ , es decir al inverso de la distancia entre los planos (Rhodes, 2000).

La resolución máxima es entonces, la menor distancia entre los planos  $d_{hkl}$  contenida en el patrón de difracción, que a su vez es inversamente proporcional al ángulo de incidencia. Por lo tanto, los puntos bien definidos que se encuentren más alejados del centro del patrón serán los que contengan información más detallada y determinen el límite de la resolución (Rhodes, 2000).

El método de rotación durante la colecta de datos permite variar el ángulo de incidencia del rayo X y por lo tanto las reflexiones que se observarán en fase (Dauter, 1999). Si rotamos el cristal, rotamos los planos de Bragg y por lo

<sup>10</sup> La Ley de Bragg es la piedra angular de la cristalografía. Reduce el análisis de los datos de difracción a una variable geométrica  $d_{hkl}$  -el espaciamiento entre un conjunto de planos con índices h, k, l y a un parámetro físico de la fuente de rayos X,  $\lambda$  - la longitud de onda.

<sup>11</sup> La fase se refiere al ángulo de incidencia de la onda.

tanto, la red recíproca, en la misma dirección (Dauter, 1999). La simetría interna que muestre el cristal es una guía en la estrategia de colecta de datos a seguir, para lograr que distintos planos estén en la orientación correcta para difractar en fase. Gracias a los índices de Miller se pueden analizar las ausencias sistemáticas correspondientes a cada grupo espacial (puntos de difracción que no se observan en un patrón en una cierta orientación debido a que provenían de planos que no estaban en fase) y por lo tanto reconocer a qué grupo espacial pertenecen los datos de difracción (Rhodes, 2000).

En la práctica, el rayo incidente no está dirigido precisamente a lo largo de una sola línea y no todas las partes del cristal están en la misma orientación (Dauter, 1999). Los cristales están compuestos de pequeños bloques en mosaico con una pequeña desorientación de unos con otros. Esto conduce a que durante la difracción, algunas de las reflexiones difracten en una exposición pero se apaguen en la siguiente y, en consecuencia, sus intensidades serán medidas parcialmente en cada imagen, aunque habrá otras completas, esto se le llama mosaicidad (Dauter, 1999); cuando su valor alcanza el del intervalo de rotación, no se observa ninguna reflexión total. La selección del intervalo de rotación apropiada a la simetría del cristal, es el factor más importante que influencia la integridad de los datos.

Ya se mencionó que las dimensiones de la celda unitaria determinan las dimensiones de la red recíproca, que a su vez nos dice donde debemos buscar los datos. Lo que observamos en el patrón de difracción es una proyección no distorsionada de la precesión de la red recíproca. Como las distancias dentro de la red recíproca

son el inverso de las de la red real, las dimensiones de la celda unitaria son inversamente proporcionales a las distancias entre las reflexiones en el patrón de difracción. La estrategia de colecta de datos no sólo se basa en las dimensiones de la celda si no en su simetría interna. Si la celda tiene alta simetría entonces algunas de las orientaciones en que se difracte el cristal producen exactamente las mismas reflexiones, y así es posible reducir el número de orientaciones posibles para obtener todas las reflexiones únicas. Al comparar las ausencias sistemáticas que se observan en un patrón de difracción y compararlas con las que describen los distintos grupos espaciales se puede determinar el grupo espacial y reconocer cuáles orientaciones darían las mismas reflexiones.

### 1.5 Factores de estructura y obtención de fases: construyendo el modelo

Para construir un modelo tridimensional, la información del espacio recíproco debe reconstruirse en el espacio real tridimensional dentro de la celda unitaria.

Como cada reflexión es el resultado de la difracción de los rayos X, las reflexiones se tratan como ondas que se recombinan para dar la imagen de estas moléculas<sup>12</sup> (Rhodes, 2000). En una dirección determinada, la onda resultado de la suma de todas las ondas difractadas por todos los átomos del cristal,

<sup>12</sup> Las series de Fourier representan la suma de ondas individuales para describir una función periódica compleja. Es esta aproximación matemática la que nos permite asir la información de la difracción.

cuando sobre ellos incide un rayo X, tiene una amplitud y una fase que juntas definen un número complejo llamado factor de estructura.

El factor de estructura es una serie de Fourier en la que cada elemento describe la contribución de un átomo a la reflexión  $hkl$  (Rhodes, 2000) (Ec.2):

Ec.2

$$F_{hkl} = \int_{\text{Vol. celda}} \rho(x,y,z) \exp 2\pi i (hx_j + ky_j + lz_j) dV$$

donde se considera a la contribución de cada átomo a la difracción como una esfera de densidad electrónica, lo cual brinda la densidad electrónica dentro de la celda unitaria. Así, la contribución de cada átomo  $j$  a  $F_{hkl}$  depende del elemento que difracte, la amplitud de su contribución a la difracción y de su posición  $(x_j, y_j, z_j)$  en la celda unitaria, lo cual establece la fase de la onda que difractó.

Como se trata de rayos X difractados, su frecuencia es la de los rayos X. Un número complejo como el factor de estructura, se representa por un vector cuya longitud es la amplitud y el ángulo que forma con el eje  $x$ , es el ángulo de fase. La amplitud de  $F_{hkl}$  es proporcional al cuadrado de la intensidad de la reflexión  $I_{hkl}$  -que es lo que se mide de la difracción- pero la fase de cada rayo difractado no es obtenible a partir de los datos (Rhodes, 2000).

La obtención de las fases es uno de los problemas más grandes en la cristalografía de proteínas. La

información que proporcionan las fases conlleva a la construcción de un modelo correcto a partir del cálculo de la densidad electrónica a partir de los factores de estructura según la ecuación 3,

Ec.3

$$\rho(x,y,z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l F_{hkl} \exp -2\pi i (hx_j + ky_j + lz_j)$$

donde  $\rho(x,y,z)$  es la densidad electrónica total en la celda unitaria, y constituye la transformada de Fourier del factor de estructura, por lo que en este caso  $F_{hkl}$  es un número real. Es decir, se traduce la información del espacio recíproco al espacio real.

Existen varios métodos para conocer o inferir las fases de los datos de difracción para poder calcular la densidad electrónica sobre la cual se construirá el modelo tridimensional. Entre ellos están el Reemplazo Molecular (MR) (Rossmann, 2001), el Reemplazo Isomórfico Múltiple (MIR) o la Difracción Anómala Múltiple (MAD) (Terwilliger and Berendzen, 1999). Estos dos últimos son métodos que permiten un cálculo directo de las fases: MIR determinándolas *ab initio* al comparar los datos de difracción de un cristal nativo con los datos de difracción de cristales en los que se han difundido metales pesados que sirven de referencia; y por medio de MAD se determinan las fases difractando con rayos de distintas longitudes de onda que permitan obtener una difracción anómala de un átomo de referencia, cuya difracción sea conocida.

En este trabajo, se ahondará únicamente en el método de obtención de fases por reemplazo molecular, ya que fue el utilizado en la resolución de la estructura de la proteína con la que se trabajó en esta tesis.

El método de reemplazo molecular se basa en que si se conoce la estructura cristalográfica de alguna proteína con una identidad mayor al 20% -repartida a lo largo de toda la secuencia- con la proteína cuya estructura se quiere resolver, se pueden utilizar los factores de estructura de la estructura de la proteína similar para utilizar sus fases como una estimación inicial de las fases de los factores de estructura de la proteína problema, según la ecuación 4,

Ec.4

$$\rho(x,y,z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l F_{hkl}^{new} \exp(-2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j - \alpha'_{hkl}^{model}))$$

muy similar a la Ec.3 pero donde las amplitudes  $F_{hkl}^{new}$  se obtienen de los datos de difracción y las fases  $\alpha'_{hkl}^{model}$ , se obtienen del modelo ya existente (Rhodes, 2000).

El método de reemplazo molecular orienta y localiza, por medio de rotaciones y traslaciones, al modelo similar sobre la unidad asimétrica en el espacio real de la estructura a resolver (Rossmann, 2001). A partir de ese modelo de la proteína similar se calculan las fases que ésta genera y las mismas se usan como fases iniciales  $\alpha'_{hkl}^{model}$

necesarias para calcular la densidad electrónica correcta que defina las difracciones de la proteína problema.

## 1.6 Ajuste del modelo estructural

La densidad electrónica generada a partir de la inferencia indirecta de las fases, es el primer acercamiento a la estructura real del modelo. La interpretación de la densidad electrónica incluye la generación y afinamiento del modelo a partir de las difracciones (Rhodes, 2000).

El propósito de la cristalografía de proteínas es crear un modelo estructural lo más cercano posible a la realidad. Por medio del Reemplazo Molecular lo que se obtiene es un modelo "bosquejo" que necesita mejorarse, lo que se logra con un afinamiento cristalográfico. El afinamiento permite generar nuevos y mejores mapas de densidad electrónica - manual o automáticamente- a partir de las intensidades medidas y la inferencia de las fases correctas del modelo generado (Rhodes, 2000).

El afinamiento consiste en iteraciones computacionales sucesivas de minimización en las que se calcula un nuevo mapa de densidad y se modifica el modelo. Estas iteraciones permiten reducir la discrepancia entre el modelo generado a partir del reemplazo molecular, y los datos experimentales (Kleywegt, 1995). De éste modo se logra un modelo más afín a los datos, con base en la posición (coordenadas x,y,z) y el

factor B (o de Debye-Willer)<sup>13</sup> de los átomos constitutivos del cristal (Rhodes, 2000).

Se requieren ciclos de revisión manual y computacional de los modelos de la proteína para optimizar el ajuste de los datos. El afinamiento depende entonces, de la utilización de un visualizador gráfico que permita observar el mapa de densidad calculado, examinar y modificar el modelo, de tal modo que se realicen los ajustes manuales pertinentes -enfocándose en la cadena principal y en los átomos con mayor número de electrones- que, por medio de máxima verosimilitud, coloquen al modelo sobre el mapa de densidad (Rhodes, 2000).

El nuevo mapa de densidad puede presentar zonas que estén pobremente definidas y que impidan mejorar el modelo. Esto puede ocurrir porque las densidades presentes no sean interpretables, -probablemente por presentar zonas de conformaciones múltiples- o por que existan errores en el modelo (Rhodes, 2000). Es frecuente encontrar áreas que ajustan

perfectamente con el modelo y otras que no lo hacen, esta conducta está claramente influenciada por el desplazamiento atómico y se refleja en los factores B (Rhodes, 2000).

### 1.7 Parámetros estructurales de validación del modelo

Los modelos estructurales acarrean siempre un porcentaje de error debido a los límites en la resolución y a la inexactitud de las fases calculadas (Rhodes, 2000). Del cristalógrafo depende reducirlos lo más posible -desde las etapas de cristalización y la colecta de datos hasta el afinamiento- antes del análisis, la publicación y la divulgación de la estructura.

La complejidad de un modelo afinado depende de la cantidad de datos disponibles, es decir, del cociente entre el número de observaciones -es decir, el número de reflexiones totales- y el número de parámetros a afinar por el modelo. Si esta relación aumenta, mejora la calidad del modelo afinado obteniendo una mejor estimación de parámetros individuales.

Como se mencionó en la sección 1.1.2, el número máximo de observaciones en un patrón de difracción depende de la calidad del cristal y el límite de resolución. La integridad de los datos, es decir, el total de información que se tenga del contenido del cristal, depende tanto de la resolución como de la simetría que ostente el cristal. Como se mencionó anteriormente, la

<sup>13</sup> El factor B es una medida de la oscilación de un átomo alrededor de la posición especificada en el modelo, en función de la vibración térmica (Mair, 1980) como el desorden atómico dentro del cristal (Blundell, 1976). A partir de ellos podemos saber cuáles átomos tienen mayor libertad de movimiento y tener indicios de la dinámica del modelo, generalmente más estático (Rhodes, 2000). Por otro lado, pueden ser indicadores de un mal afinamiento. Al agregar los efectos del movimiento al modelo, éste se hace más real y ajusta mejor con los datos. La corrección de estos parámetros, es indispensable para hacer un buen ajuste y predicciones realistas sobre el promedio posicional de cada átomo (Rhodes, 2000).

integridad nos habla del número de intensidades utilizadas para la determinación de la estructura de la proteína y su afinamiento, según el conjunto de las reflexiones medidas. Gracias a este indicador se puede saber si los datos describen al cristal completo y por lo tanto repercute en la relación datos/parámetros. La integridad es, por lo tanto, un parámetro que debe conocerse para saber que tan fidedigno a la realidad es el modelo que se construye (Dauter, 1999, Rhodes, 2000).

La calidad del modelo estructural generado depende entonces de los factores antes señalados, pero también de criterios estadísticos que se han construido para su validación. El primero de ellos a considerar es el valor residual R (Brünger, 1987), el cual denota la confiabilidad de la determinación de una estructura dada, al verificar el nivel de coincidencia entre las amplitudes medidas en los datos experimentales -los datos de difracción- y aquellas calculadas por el modelo. Mientras más bajo es este valor, mejor es dicho ajuste. Una estructura bien afinada presenta un valor  $R \leq 15-20\%$ .

Otro parámetro importante por considerar - al cual no muchos le prestan atención- es el factor residual libre o  $R_{free}$ . El valor R es un estadístico de prueba que es dependiente del modelo por lo que Brünger, en 1992, introdujo otro estadístico de prueba que se calcula a partir de un grupo de datos que se omiten del afinamiento del modelo, el valor  $R_{free}$  (Brünger, 1992). Este

valor se estableció como un índice objetivo de la calidad de estructuras macromoleculares a resoluciones medias. Representa por lo tanto, otra medida independiente de la concordancia entre el modelo y los datos cristalográficos (Mathews, 1997). Un  $R_{free}$  no debe separarse del R por más de 5 punto porcentuales ya que si el primero se eleva demasiado quiere decir que hay un sobreafinamiento. Es decir, el modelo se aleja de la realidad. La validación que promueve el  $R_{free}$  es determinante en un afinamiento cuidadoso. En este sentido, han habido muchos intentos para mitigar el efecto negativo de omitir grupos de datos en el afinamiento, para así poder calcular el  $R_{free}$  mejorando su valor (Chen, *et al.*, 1999).

Por otro lado, una medida para evaluar la consecución del afinamiento es mediante la inspección en cada ciclo de los factores B, ya que estos, al ser una medida del desplazamiento atómico pueden indicar errores (Rhodes, 2000). Muchas veces después de que el afinamiento converge, existen regiones que indican desorden al presentar factores B fuera del margen permitido (0-100Å). Cuando se analizan los mapas de densidad y de diferencias se puede evidenciar la existencia de conformaciones múltiples en esas regiones (Rhodes, 2000). Si se incluye estas conformaciones en el afinamiento se pueden mejorar el R,  $R_{free}$  y el mapa, revelando más claramente la naturaleza del desorden.

La etapa del afinamiento en que se introducen moléculas de agua debe realizarse con precaución para que los factores B no se afecten. Muchas veces para bajar los valores de R y  $R_{free}$  se construyen moléculas de agua donde podrían estar otras moléculas, sin embargo, esto no representa un buen afinamiento. La baja en estos valores puede repercutir en un alza de los factores B de la proteína; es decir, que figure una deslocalización de la nube electrónica irreal, que si fuera tal no se vería para evaluarla.

El  $R_{free}$  es una buena herramienta para saber cuándo la adición de moléculas de agua mejora

o no el modelo y también para saber cuando colocarlas o aumentarlas durante el procesamiento (Chen, *et al.*, 1999).

Se ha planteado un panorama general sobre los procesos que subyacen a la obtención de un modelo cristalográfico tridimensional. Para una descripción más profunda sobre la cristalografía de proteínas es comendable revisar el libro de Rhodes *Made Crystals Clear* (Rhodes, 2000).

En la sección siguiente, se introduce el cuadro conceptual y de investigación, en que se sustenta el objetivo de ésta tesis.

## 2 Amiloidosis dependiente de cadenas ligeras de anticuerpos.

Amiloidosis se les llama a un conjunto de enfermedades humanas que se asocian con la deposición de agregados proteínicos filamentosos estables y ordenados, que se conocen como fibras amiloideas (Sipe and Cohen, 2000). La deposición de agregados amiloideos se vincula con enfermedades como el Alzheimer, la Diabetes tipo II, las encefalitis espongióformes, el Parkinson y la Amiloidosis asociada a cadenas ligeras de inmunoglobulinas (AL) (Kisilevsky, 2000). En cada uno de estos estados patológicos, una proteína específica o un fragmento de ella cambia de su forma soluble a fibras insolubles que se acumulan en una gran cantidad de tejidos y órganos (Uversky and Fink, 2004) causando la muerte celular, la

disfunción tisular y en muchos casos la muerte.

Se conocen aproximadamente 20 proteínas, que no guardan entre sí ninguna relación de secuencia o estructura, cuyas versiones mutantes están involucradas con algún tipo de amiloidosis (Dobson, 2001). Antes de formar las fibras las proteínas amiloidogénicas pueden ser conformacionalmente ricas en hojas  $\beta$ ,  $\alpha$ -hélices, hélices- $\beta$ , o contener tanto  $\alpha$ -hélices como hojas  $\beta$  (Uversky and Fink, 2004).

El descubrimiento de que muchas proteínas amiloidogénicas como la lisozima, la transtiretina, la cistatina C y la  $\beta$ 2-microglobulin (sólo por citar algunos ejemplos) tenían una estabilidad de plegamiento menor al de su contraparte normal, cuando

La etapa del afinamiento en que se introducen moléculas de agua debe realizarse con precaución para que los factores B no se afecten. Muchas veces para bajar los valores de R y  $R_{free}$  se construyen moléculas de agua donde podrían estar otras moléculas, sin embargo, esto no representa un buen afinamiento. La baja en estos valores puede repercutir en un alza de los factores B de la proteína; es decir, que figure una deslocalización de la nube electrónica irreal, que si fuera tal no se vería para evaluarla.

El  $R_{free}$  es una buena herramienta para saber cuándo la adición de moléculas de agua mejora

o no el modelo y también para saber cuando colocarlas o aumentarlas durante el procesamiento (Chen, *et al.*, 1999).

Se ha planteado un panorama general sobre los procesos que subyacen a la obtención de un modelo cristalográfico tridimensional. Para una descripción más profunda sobre la cristalografía de proteínas es comendable revisar el libro de Rhodes *Made Crystals Clear* (Rhodes, 2000).

En la sección siguiente, se introduce el cuadro conceptual y de investigación, en que se sustenta el objetivo de ésta tesis.

## 2 Amiloidosis dependiente de cadenas ligeras de anticuerpos.

Amiloidosis se les llama a un conjunto de enfermedades humanas que se asocian con la deposición de agregados proteínicos filamentosos estables y ordenados, que se conocen como fibras amiloideas (Sipe and Cohen, 2000). La deposición de agregados amiloideos se vincula con enfermedades como el Alzheimer, la Diabetes tipo II, las encefalitis espongióforas, el Parkinson y la Amiloidosis asociada a cadenas ligeras de inmunoglobulinas (AL) (Kisilevsky, 2000). En cada uno de estos estados patológicos, una proteína específica o un fragmento de ella cambia de su forma soluble a fibras insolubles que se acumulan en una gran cantidad de tejidos y órganos (Uversky and Fink, 2004) causando la muerte celular, la

disfunción tisular y en muchos casos la muerte.

Se conocen aproximadamente 20 proteínas, que no guardan entre sí ninguna relación de secuencia o estructura, cuyas versiones mutantes están involucradas con algún tipo de amiloidosis (Dobson, 2001). Antes de formar las fibras las proteínas amiloidogénicas pueden ser conformacionalmente ricas en hojas  $\beta$ ,  $\alpha$ -hélices, hélices- $\beta$ , o contener tanto  $\alpha$ -hélices como hojas  $\beta$  (Uversky and Fink, 2004).

El descubrimiento de que muchas proteínas amiloidogénicas como la lisozima, la transtiretina, la cistatina C y la  $\beta$ 2-microglobulina (sólo por citar algunos ejemplos) tenían una estabilidad de plegamiento menor al de su contraparte normal, cuando

componen agregados fibrilares, sentó las bases constitutivas del paradigma sobre el cual se funda gran parte de la investigación actual en el campo: el de las "enfermedades conformacionales" (Bellotti, *et al.*, 2000) (Dobson, 2001). Dicho paradigma ha sido nutrido por aplicaciones conceptuales, instrumentales y de observación que han sugerido que los agregados amorfos o en fibras se deben a intermediarios de plegamiento de las proteínas precursoras (Dobson, 1999, 2001, Horwich, 2002, Stefani and Dobson, 2003, Stefani, 2004).

Las enfermedades conformacionales pueden dividirse en tres grupos: El primer grupo los constituyen las amiloidosis en donde los agregados fibrilares son causados por proteínas mutantes. El segundo grupo incluye aquellas proteínas donde un error genético, que usualmente afecta a un solo aminoácido, produce una proteína no-plegada que es extremadamente susceptible a las proteasas y conduce a la formación de agregados amorfos; y el tercero por proteínas que oligomerizan inadecuadamente (Foguel and Silva, 2004).

Para explicar las bases moleculares de la formación de fibras amiloideas se ha propuesto que la fibrillogénesis ocurre cuando la estructura nativa "rígida"<sup>14</sup> se *desestabiliza* e induce un plegamiento parcial que favorece las interacciones moleculares específicas como la atracción electrostática, los puentes de hidrógeno y los contactos hidrofóbicos necesarios para la oligomerización y la fibrillogénesis (Uversky and Fink, 2004).

Existen muchos ejemplos que sustentan esta hipótesis. Tal es el caso de la transtiretina -que produce amiloidosis sistémica- cuya conformación nativa tetramérica se disocia formando un intermediario de plegamiento susceptible a la fibrilación (Lai, *et al.*, 1996). La cistatina C -que produce angiopatía amiloidea-, fibriliza al darse un intercambio de dominios (*domain swapping*). En este proceso es necesario un desplegado parcial para lograr que una parte de la estructura de cada monómero reemplace a los elementos estructurales correspondientes de otro monómero y así, formar un oligómero donde cada subunidad tenga una estructura similar al monómero plegado (Rousseau, *et al.*, 2001).

Sin embargo, la habilidad de las cadenas polipeptídicas para formar estructuras amiloideas, bajo ciertas condiciones experimentales, no se restringe al pequeño número de proteínas asociadas a los desordenes clínicos reconocidos, y por tanto se ha propuesto que constituye una característica genérica de todas las cadenas polipeptídicas (Dobson, 1999, 2001, Uversky and Fink, 2004). Existen evidencias experimentales -como el caso del dominio SH3 de la fosfatidil inositol 3-cinasa no-patogénica (Guijarro, *et al.*, 1998)- de que muchas proteínas cuya estabilidad estructural se afecta, ya sea por una proteólisis limitada, desplegamiento parcial por condiciones desnaturalizantes, o por caer en una trampa cinética durante el plegamiento, pueden formar fibras.

En los últimos años, gracias a hallazgos recientes, la validez general de la hipótesis de las enfermedades conformacionales se ha visto cuestionada (Plakoutsi, *et al.*, 2004). Por un lado, se encontró que péptidos pequeños -de aproximadamente 5

<sup>14</sup> Generalmente se asume que el estado nativo de una proteína es el estado termodinámicamente más estable y por lo tanto rígido, debido a que es su estructura cristalográfica -la cual se considera como un estado rígido- la que se suele asumir como el representante de la estructura nativa (Louis, *et al.*, 2005)

residuos- no estructurados debido a su tamaño, eran capaces de formar fibras (Lopez De La Paz, *et al.*, 2002). Por otro lado, un gran número de observaciones muestran que los agregados fibrilares pueden originarse por la acumulación de proteínas globulares en estado nativo o cuasi-nativo (Bousset, *et al.*, 2002, Laurine, *et al.*, 2003), como el prion de levadura Ure2p (Bousset, *et al.*, 2002) y la litostatina (Laurine, *et al.*, 2003), los cuales mantienen su contenido de estructura secundaria nativo. La habilidad de estas proteínas para formar fibras bajo condiciones cercanas a las fisiológicas sugiere que no se requiere un desplegamiento sustancial (Plakoutsi, *et al.*, 2004) en el proceso de fibrilogénesis.

## 2.1 Características generales de las fibras amiloideas obtenidas *in vitro*

A pesar de que no existe hasta el momento una estructura que describa con detalle atómico una fibra amiloidea, se han propuesto modelos muy convincentes basados en distintas técnicas como son, la microscopía de fuerza atómica (Ionescu-Zanetti, *et al.*, 1999, Khurana, *et al.*, 2003), la difracción de fibras por rayos X (Sunde, *et al.*, 1997, Sunde and Blake, 1997) y la criomicroscopía electrónica (Sunde and Blake, 1997, Serpell, *et al.*, 2000).

Los estudios realizados por criomicroscopía electrónica (Serpell, *et al.*, 2000), microscopía de fuerza atómica (Ionescu-Zanetti, *et al.*, 1999) y por difracción de rayos X de fibras (Sunde, *et al.*, 1997) originadas por varias proteínas (Lisozima, la cadena ligera SMA,  $\beta$ -mioglobina, la insulina, transtiretina, y la  $\alpha$ -sinucleína, entre otras) han mostrado que, a pesar del tamaño, estructura nativa o función de

la proteína precursora, en todos los tipos de amiloidosis se forman fibras que muestran una birrefringencia verde -al verse con luz polarizada- después de teñirse con rojo del congo (Pepys, *et al.*, 1996); y fluorescencia a 482nm con tioflavina T. Además, todas presentan una ultra-estructura similar:

- 1) Las fibras poseen un diámetro de entre 7-15 nm;
- 2) Son estructuras helicoidales no ramificadas de longitud indefinida;
- 3) Al realizar difracción por rayos X de las fibras se observan reflexiones meridionales a 4.7-4.8Å y reflexiones ecuatoriales a 10Å características del patrón  $\beta$  cruzado (Pauling and Corey, 1951), el cual sugiere un núcleo de la estructura de la fibra compuesto por varias hojas  $\beta$  paralelas que corren a lo largo del eje de la fibra, y cuyas cadenas  $\beta$  están orientadas perpendiculares al mismo (Sunde, *et al.*, 1997);
- 4) El núcleo estructural de la fibra parece estar estabilizado por puentes de hidrógeno que involucran a la cadena principal (Dobson, 2003);

Adicionalmente a su componente proteínico, la fibra amiloidea contiene otros factores como glucosaminoglicanos, cuyas contribuciones a la patogénesis amiloidea no se han establecido con precisión (Stevens, *et al.*, 1995).

## 2.2 La amiloidosis asociada a cadenas ligeras de inmunoglobulinas (AL)

La amiloidosis AL es una enfermedad degenerativa que consiste en la acumulación de cadenas ligeras monoclonales (Solomon, *et al.*, 1982) (principalmente su región variable ( $V_L$ ) (Shirahama and Cohen, 1967, Shirahama, *et al.*, 1973)) en forma de fibras amiloideas causando muerte celular. La acumulación puede darse en prácticamente en cualquier tejido, a excepción del parénquima cerebral (Perfetti, *et al.*, 1999). La amiloidosis AL es la forma más común de amiloidosis en los países occidentales y la única causada por un tumor (Perfetti, *et al.*, 1998).

Las células plasmáticas monoclonales de la médula ósea que producen las cadenas ligeras amiloidogénicas son derivadas de la expansión neoplástica de un linfocito B que ha sido sujeto a selección antígeno-dirigida (Perfetti, *et al.*, 1998, Perfetti, *et al.*, 1999, Perfetti, *et al.*, 2002); sin embargo la historia natural de la clona amiloidogénica aún no se conoce.

### 2.2.1 Los dominios variables de cadenas ligeras de inmunoglobulinas

Las inmunoglobulinas están constituidas por dos cadenas ligeras (L) y dos cadenas pesadas (H) (Figura 2.2). Ambas cadenas se componen de series de dominios discretos con estructuras muy similares. Cada dominio se construye por dos hojas  $\beta$  unidas por un puente disulfuro. Las cadenas pesadas están formadas por un dominio variable ( $V_H$ ) y 3 dominios constantes, y las cadenas ligeras las conforman un dominio variable ( $V_L$ ) y uno constante ( $C_L$ ) (Janeway, 2001).

Los dominios variables constan de tres regiones de gran variabilidad de secuencia llamados CDRs (que por sus siglas en inglés significa región determinante de complementariedad), involucrados en la unión al antígeno, y 3 o 4 regiones menos variables FRs (que por sus siglas en inglés significa región de andamiaje) que rodean a los CDRs y que determinan el andamiaje del dominio (Solomon and Weiss, 1995, Janeway, 2001)(Figura 2.2).

En el humano existen dos tipos de cadenas ligeras:  $\kappa$  y  $\lambda$ . En las cadenas ligeras  $\lambda$  ambos dominios son de alrededor de 107 aminoácidos. La secuencia del dominio variable es especificado por dos segmentos génicos: el segmento V, que codifica los primeros 95-98 aminoácidos y el segmento de unión J -por *joining*-, los 13 aminoácidos faltantes. El dominio constante está especificado por un tercer gene, C (Janeway, 2001).

Existen muchos segmentos génicos diferentes para conformar el dominio  $V_L$ . La diversidad en las inmunoglobulinas está dada por estos genes y por la diversificación somática que se genera por mutaciones y recombinación somática de los segmentos génicos (Janeway, 2001).

A partir de análisis de secuencia y de estudios inmunológicos de cadenas ligeras aisladas de inmunoglobulinas monoclonales, se observó la existencia de una gran diversidad estructural de las cadenas ligeras. Con base en estos análisis, y con base en la homología de secuencia del FR1 se dispusieron las bases químicas de clasificación de las cadenas ligeras  $\lambda$  y  $\kappa$  en múltiples subgrupos (Kabat, *et al.*, 1979). Estos subgrupos se catalogaron como líneas germinales al identificar los genes que los codifican, y hasta ahora se conocen 13 de ellos (Solomon and Weiss, 1995).

La proporción de los tipos  $\kappa$  y  $\lambda$  de cadenas ligeras en el humano es 3:2, y cualquier variación en ella causa la proliferación anormal de una clona de células B que expresan la misma cadena ligera (Solomon and Weiss, 1995). La expresión, en la célula plasmática, de las cadenas ligeras  $\lambda$  se da cuando ha ocurrido alguna deficiencia en la producción de su isotipo  $\kappa$  (Perfetti, *et al.*, 1998). Ambos tipos de cadenas ligeras pueden provocar amiloidosis AL pero las cadenas ligeras  $\lambda$  están

involucradas en la acumulación amiloidea dos o tres veces más que las cadenas  $\kappa$  (Isobe and Osserman, 1974, 1974, Bellotti, *et al.*, 2000).

Se ha propuesto que la agregación de los dominios variables de las cadenas ligeras se debe a un aumento en su concentración, asociado a una sobreproducción de las mismas sin la expresión concomitante de las cadenas pesadas; así como a una proteólisis limitada de las cadenas ligeras (Hurle, *et al.*, 1994).

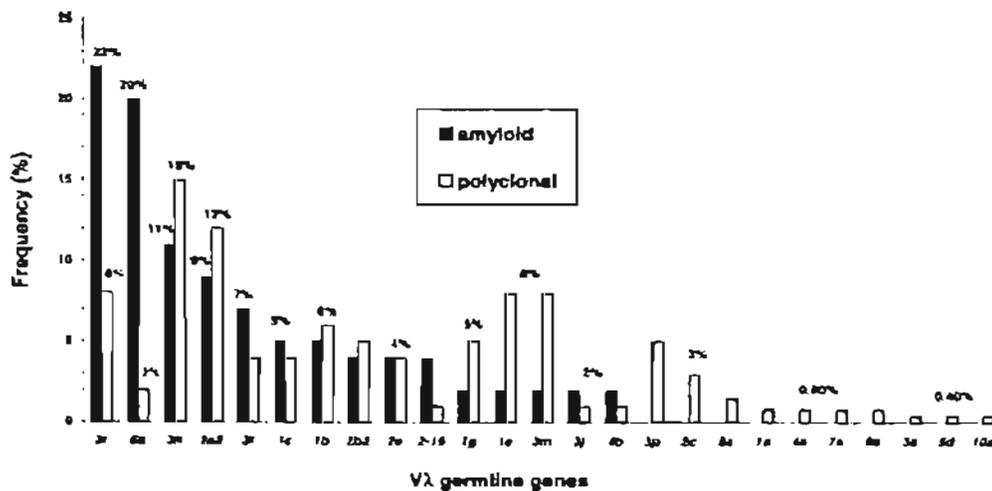


Figura 2.1 Muestra los repertorios de las líneas germinales V $\lambda$  en células plasmáticas derivadas de amiloidosis primaria y de la médula ósea. Se evidencia que en el caso de la amiloidosis, los dos segmentos génicos 3r y 6a están sobrerrepresentados y por lo tanto asociados a este desorden clínico. Tomado de Perfetti, *et al.*, 2002 (Perfetti, *et al.*, 2002)

Se ha demostrado que los dominios variables provenientes de la línea germinal  $\lambda 6a$  -principalmente en el riñón- (Solomon, *et al.*, 1982, Perfetti, *et al.*, 2002) y de la línea germinal  $\lambda 3r$  -en varios órganos- (Perfetti, *et al.*, 2002) son las principales responsable de este tipo de patologías (Figura 2.1). En consecuencia, se sugirió que podían ser intrínsecamente amiloidogénicas (Solomon, *et al.*, 1982, Pokkuluri, *et al.*, 1999, Perfetti, *et al.*, 2002).

El mecanismo de formación de fibras por cadenas ligeras, así como las

características estructurales primarias que hacen a sus dominios variables amiloidogénicos no se han dilucidado completamente, pero en el caso de la línea germinal  $\lambda 6a$ , con base en estudios de su secuencia primaria, se le atribuye un papel importante en tal propensión, a la presencia de una inserción de dos residuos, distintiva de la línea germinal: los residuos 68 y 69 (66a y 66b según nomenclatura de Kabat) (Dwulet, *et al.*, 1985, Bellotti, *et al.*, 2000).

### 2.2.2 La importancia de la estructura primaria

Debido a su gran variabilidad intrínseca, la secuenciación de muchas cadenas ligeras amiloidogénicas ( $\kappa$  o  $\lambda$ ) no ha sido suficiente para establecer una secuencia consenso requerida para la agregación amiloidea; no obstante se han identificado algunas posiciones críticas de aminoácidos que podrían estar involucrados en la amiloidogénesis (Figura 2.2). Algunos de estos residuos vinculados con la formación de fibras se originan de la línea germinal, mientras que otros se deben a mutaciones somáticas (Stevens, *et al.*, 1995).

Con base en los análisis comparativos de la estructura primaria

de las cadenas ligeras patogénicas y no-patogénicas (Dwulet, *et al.*, 1985), así como en experimentos de mutagénesis (Hurle, *et al.*, 1994, Raffin, *et al.*, 1999), se ha mostrado que ciertas sustituciones de aminoácidos en el dominio variable pueden potenciar la formación de la fibra (Figura 2.2). Se creía que estas sustituciones estaban asociadas a las regiones de dimerización o a los CDRs, pero ocurren a todo lo largo de la estructura tridimensional, afectando considerablemente los FRs. Esto sugirió que se trataba de sustituciones que desestabilizaban el plegamiento (Hurle, *et al.*, 1994).

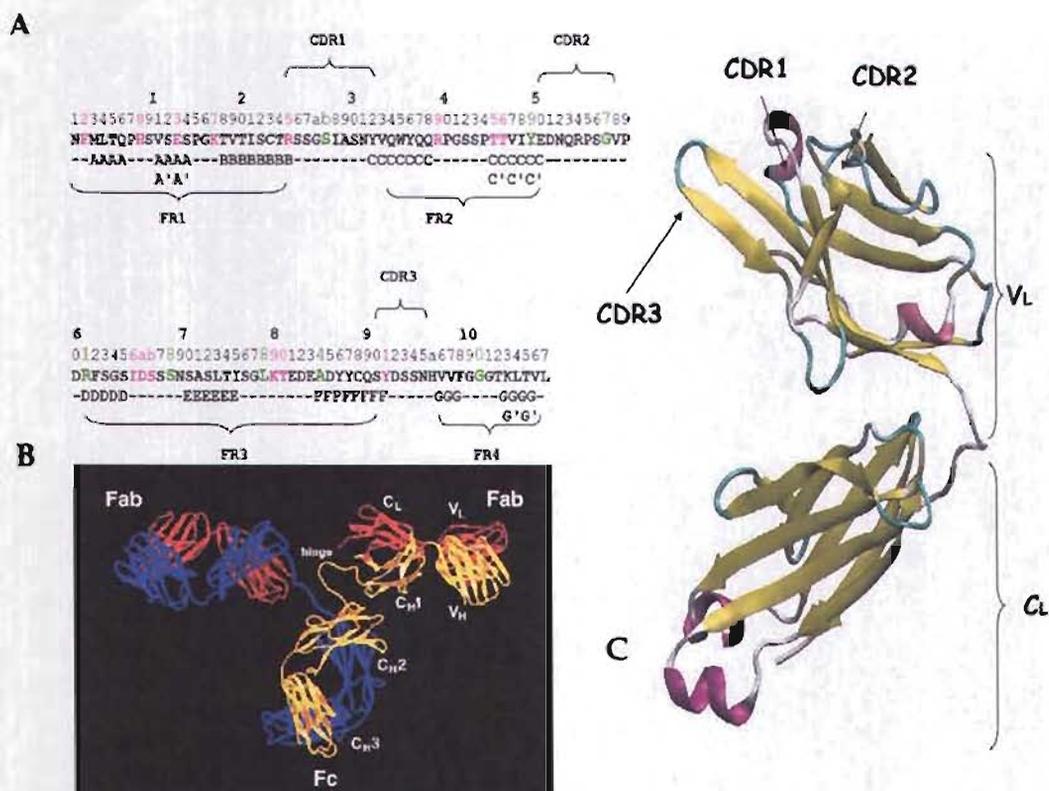


Figura 2.2. (A) Muestra la estructura primaria del dominio variable de la línea germinal  $\lambda 6a$  V  $\lambda 6a$  J12 donde se especifican las regiones correspondientes a los CDRs y FRs, así como los residuos característicos de la línea germinal (resaltados en rosa) y posiciones cuyas sustituciones se han asociado con la formación de fibras amiloidas (resaltados en verde). (B) Muestra un esquema de una inmunoglobulina G (IgG) donde en rojo se señalan las cadenas ligeras y en amarillo las pesadas. (C) Muestra la estructura de una cadena ligera donde se señala la localización de los CDRs.

Existen estudios que muestran que estas sustituciones alteran la estabilidad termodinámica de las cadenas ligeras y se ha postulado que generan una conformación menos estable, con mayor tendencia a la agregación y formación de fibras (Raffen, *et al.*, 1999, Wall, *et al.*, 1999, Khurana, *et al.*, 2001). Estos hallazgos justificaron la inserción de la amiloidosis AL dentro del marco común de las enfermedades conformacionales, paradigma que constituye la base teórica sobre la que se funda el análisis de la fibrillogénesis por cadenas ligeras. No obstante, es difícil analizar el papel de la estabilidad de los distintos plegamientos presentes en los dominios  $V_L$  con distintas estructuras primarias debido a la inestabilidad intrínseca de las cadenas ligeras (Raffen, *et al.*, 1999, Wall, *et al.*, 1999). Las interacciones no covalentes que se producen entre el dominio  $V_L$  y el dominio variable de las cadenas pesadas ( $V_H$ ) (Bellotti, *et al.*, 2000), así como los contactos intramoleculares del dominio  $V_L$ , son los responsables de la estabilización de este último, al formar las inmunoglobulinas funcionales.

### 2.2.3 Ensamblaje de la fibra amiloidea

Existen algunas similitudes en el mecanismo de agregación amiloidea de diferentes proteínas (Bitan, *et al.*, 2003, Caughey and Lansbury, 2003, Dobson, 2003). A partir de observaciones realizadas por microscopía de fuerza atómica de fibras producidas por distintas proteínas (Lisozima, la cadena ligera SMA,  $\beta$ -mioglobina, la insulina, y la  $\alpha$ -sinucleína) (Ionescu-Zanetti, *et al.*, 1999, Khurana, *et al.*, 2003, Khurana, *et al.*, 2003) se propuso el modelo jerárquico de ensamblaje (HAM) para explicar la fibrillogénesis (Khurana, *et al.*, 2003). En él se propone que en el

caso de la cadena ligera SMA (Figura 2.3), el proceso de fibrillogénesis se inicia por una polimerización por nucleación homogénea de un intermediario de plegamiento de las cadenas ligeras que da forma al primer precursor de la fibra: el protofilamento. Los protofilamentos nacientes se van alargando por la adición de monómeros parcialmente plegados. Este tipo de protofilamentos luego se asocian entre sí formando protofibras de 2 ó 3 protofilamentos entrecruzados. Posteriormente dos protofibras se entrecruzan para dar la fibra madura (Khurana, *et al.*, 2003).

Se ha propuesto que la primera etapa en la formación de la fibra es el ensamblaje de oligómeros solubles como resultado de interacciones relativamente no-específicas (Dobson, 2003) que posteriormente se agregan en estados pre-fibrilares como protofilamentos. Se ha observado a partir de estudios realizados por microscopía de fuerza atómica, que bajo ciertas condiciones experimentales los protofilamentos forman estructuras distintivas en forma de anillos (Lashuel, *et al.*, 2002, Dobson, 2003), oligómeros anulares a partir de los cuales se inicia el crecimiento de la fibra (Zhu, *et al.*, 2004).

Con base en la identificación de las características de estructura primaria que comparten todos los dominios variables de cadenas ligeras amiloidogénicas y a algunos modelos estructurales, Stevens y sus colaboradores (Stevens, *et al.*, 1995) propusieron un modelo de mecanismo molecular de tres pasos por el cual las cadenas ligeras pudieran formar fibras (Figura 2.4):

- 1) El primer paso, propone, es la asociación de dos dominios nativos  $V_L$  para formar un dímero no covalente. Los dímeros de  $V_L$  se

ensamblan en complejos simétricos que emulan la estructura del Fab de un anticuerpo (Epp, *et al.*, 1974).

- 2) Subsecuentemente, los dímeros se empalman para formar polímeros filamentosos no covalentes. Se produce la formación de un filamento pro-amiloide por interacciones de "cabeza con cola" de un dímero con el otro, los cuales están relacionados por una rotación de aproximadamente  $90^\circ$  alrededor de un eje de simetría 2. En este proceso tanto el CDR1 como el CDR2 (Asp31 y Asp50, respectivamente) están involucrados en el empaquetamiento de la fibra.

Adicionalmente, en el dímero de  $V_L$  los residuos Asp50 y Ser42 de ambos monómeros pueden formar puentes salinos que favorecen la polimerización, debido a que la simetría 2 de los sitios de interacción provoca que la energía libre se duplique. Se han visto estructuras consideradas como protofibrillas con un alto contenido de hojas  $\beta$ , en poblaciones pequeñas y heterogéneas de ensamblados esféricos o tubulares de 2.5-5.0 nm (Stefani and Dobson, 2003).

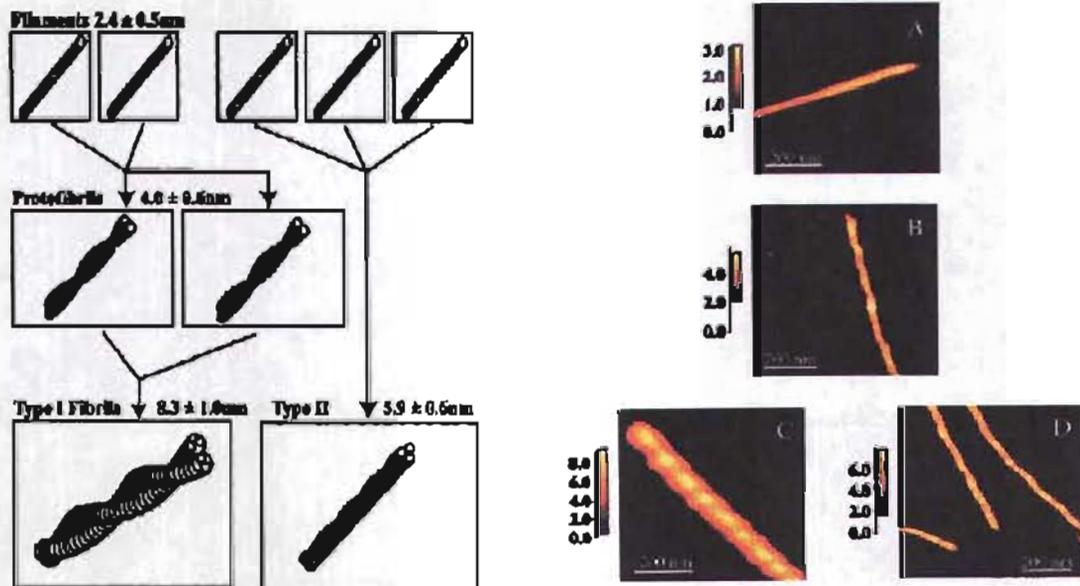


Figura 2.3. Modelo jerárquico de ensamblaje. Imágenes por microscopía electrónica de (a) un filamento típico de la cadena ligera SMA, (b) protofibrilla, (c) fibra tipo I y (d) fibra tipo II. El grosor de cada uno de estos ensamblados es de  $2.4 \pm 0.3$ ,  $4.0 \pm 0.4$ ,  $8.3 \pm 0.9$  y  $5.9 \pm 0.5$  nm, respectivamente. Tomado de Ionescu-Zanetti, *et al.*, 1999 (Ionescu-Zanetti, *et al.*, 1999).

- 3) Finalmente se da el empaquetamiento de filamentos para constituir una fibra estable. Gracias a la superficie del filamento que se forma, resultado de la rotación axial de cada dímero sucesivo, los

filamentos pro-amiloide se asocian de manera antiparalela por interacciones laterales. La unión de dos filamentos adquiere entonces un diámetro de 10 nm aproximadamente.

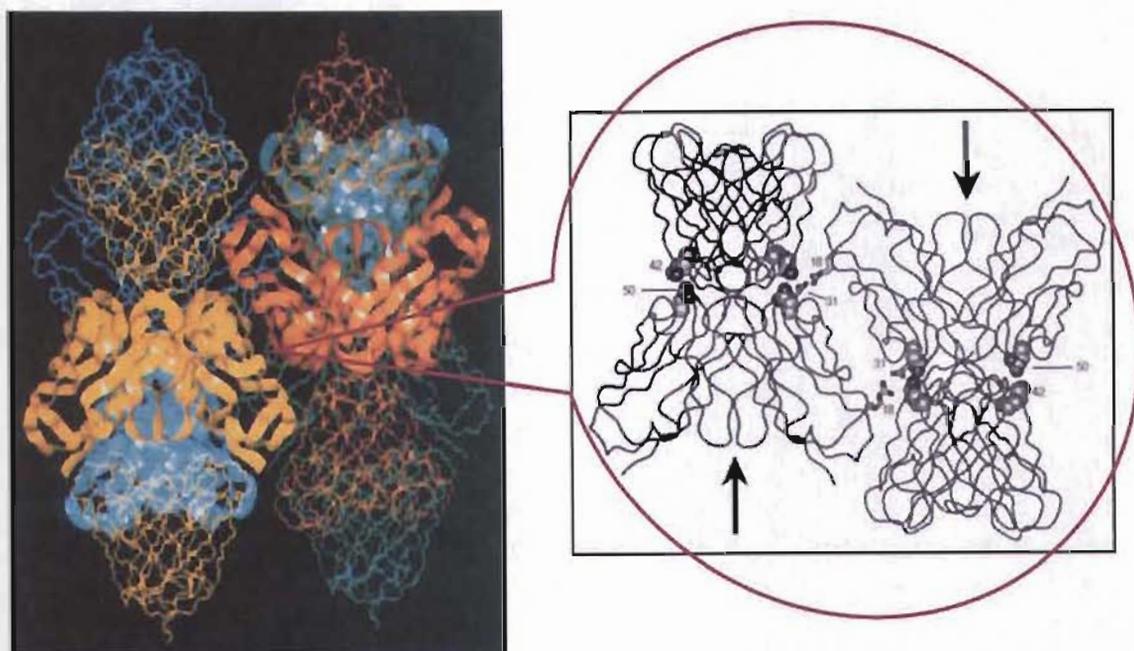


Figura 2.4. Muestra el Modelo de autoensamblaje propuesto por Stevens para la formación de fibras amiloides. A la izquierda se muestra el modelo estructural de la fibra que se genera por la asociación de "cabeza con cola" de dímeros de dominios variables que interactúan por residuos de los CDRs.

Debido a que la estabilización de la fibra depende de muchas interacciones intra- e inter-moleculares, Stevens sugirió que aunque el mecanismo que propone sea de tres pasos, estos se dan simultáneamente hasta formar un centro de nucleación estable.

Observó también que en las cadenas ligeras  $\lambda$  y  $\kappa$ , la mayoría de las posiciones vinculadas con la formación de la fibra estaban distribuidas en la superficie de la cadena ligera involucrada en la unión al antígeno, es decir los CDRs. Las cadenas laterales de estos residuos se extienden hacia el solvente permitiendo la interacción con otras moléculas en solución. Propuso entonces que los aminoácidos preferentemente involucrados con la formación de fibras no participan en interacciones del empaquetamiento interno del dominio  $V_L$  y por lo tanto, su

estabilidad molecular no tendría por qué afectarse (Stevens, *et al.*, 1995)

#### 2.2.4 Características estructurales de cadenas ligeras amiloidogénicas

La comprensión cabal de los elementos estructurales de los dominios variables es indispensable para abordar los mecanismos moleculares que subyacen a la formación de las fibras amiloides por este tipo de proteínas.

Se conoce la estructura tridimensional de algunos dominios variables de cadenas ligeras amiloidogénicas. El  $V_L$  de la cadena ligera  $\kappa$  Bre se ha cristalizado en dos formas (Schormann, *et al.*, 1995): la forma I Bre, cristaliza como dímero y en la forma II como dodecámero. Al comparar la estructura de Bre con la estructura terciaria de la cadena ligera  $\kappa$  no-amiloidogénica Rei (Helms and Wetzel, 1996), un cambio en la

estructura del asa 40-44 que forma parte de la interfase entre monómeros en el dímero normal debida al reemplazo de la Pro40 de Rei por una Leu en BreI (Schormann, *et al.*, 1995). Se ha sugerido que esta sustitución puede afectar el empaquetamiento del dominio  $V_L$  con el  $C_L$  (Nieba, *et al.*, 1997) y provocar un cambio en la conformación de toda la cadena ligera. En consecuencia, se propuso que la Pro40 constituye un motivo que impide la agregación de Rei (Wood, *et al.*, 1995, Richardson and Richardson, 2002)).

La segunda forma de Bre en dodecámero, forma una hélice de 12 monómeros de  $V_L$  (Steinrauf, *et al.*, 1999) con un arreglo pseudo-hexagonal con un diámetro de 115 Å y un paso de hélice de 38.8 Å por vuelta de 180° con un cilindro interno de agua.

Con base en estudios comparativos de varias estructuras de cadenas ligeras se observó que el Asp en la posición 31 del CDR1 y el Asp en la posición 50 del CDR2, tanto en cadenas ligeras  $\kappa$  como en  $\lambda$ , está estrechamente asociado a la formación de fibras (Stevens, *et al.*, 1995). Schormann encontró en BREI variaciones importantes tanto en los tres CDRS como en los FR2 y FR3 (Schormann, *et al.*, 1995).

Por su lado, Huang describió en la estructura dimérica del dominio variable  $\lambda_3$  Cle, una interacción de los dominios  $V_L$  por 10 puentes de hidrógeno entre las cadenas principales del CDR3 y el CDR2.

La estructura de Cle ( $\lambda_3$ ) muestra que la Glu89 -presente en las cadenas ligeras  $\lambda_3$  y  $\lambda_6$ , así como en varias  $\kappa$ - se encuentra en la interfase entre dominios variables y parece jugar un papel importante en la agregación (Huang, *et al.*, 1996, Huang, *et al.*, 1996)

al hacer puente de hidrógeno con la Tyr36.

### 2.2.5 Características estructurales de los dominios variables de cadenas ligeras $\lambda_6a$ .

Se conocen las estructuras tridimensionales de dos dominios variables pertenecientes a la línea germinal  $\lambda_6a$ : Wil y Jto<sup>15</sup> (Pokkuluri, *et al.*, 1999), el primero, amiloidogénico y el segundo, responsable de la formación de agregados amorfos.

A partir de la predicción de la estructura primaria especificada por los genes de la línea germinal y con base en las secuencias de Wil y Jto se realizó una comparación que reveló 10 y 9 sustituciones, respectivamente, producidas por mutación somática (Pokkuluri, *et al.*, 1999).

Los dominios variables de las cadenas ligeras  $\lambda_6a$  se distinguen por varios residuos que ocupan las posiciones 2, 8, 13, 17, 25, 39, 45, 46, 66, 79 y 80 y que difieren en carga y polaridad con los de otras cadenas ligeras  $\lambda$  (Figura 2.2).

Además, los dominios variables  $\lambda_6a$  se caracterizan por la inserción de dos residuos 66a y 66b, antes descrita. Las estructuras cristalográficas de Wil y Jto, muestran la extensión de un asa en el FR3 -provocada por dicha inserción- que aumenta la superficie adyacente al CDR1.

Existen 3 características asociadas al asa extendida del FR3 y a su interacción con el CDR1, a partir de las estructuras de Wil y Jto (Figura 2.5):

- (a) En Jto la Arg68 (66b nomenclatura de Kabat) mantiene una interacción

<sup>15</sup> Se les nombra de este modo según las iniciales del paciente cuya secuencia fue utilizada para clonar el gene que codifica el dominio variable de la cadena ligera amiloidogénica.

iónica con el Asp en la posición 29 (en Wil se localiza una Thr) que al parecer contribuye a incrementar la estabilidad del dominio, ya que

cuando mutan la posición 68 en Jto por una Ser, la proteína se hace menos estable y más propensa a formar fibras.

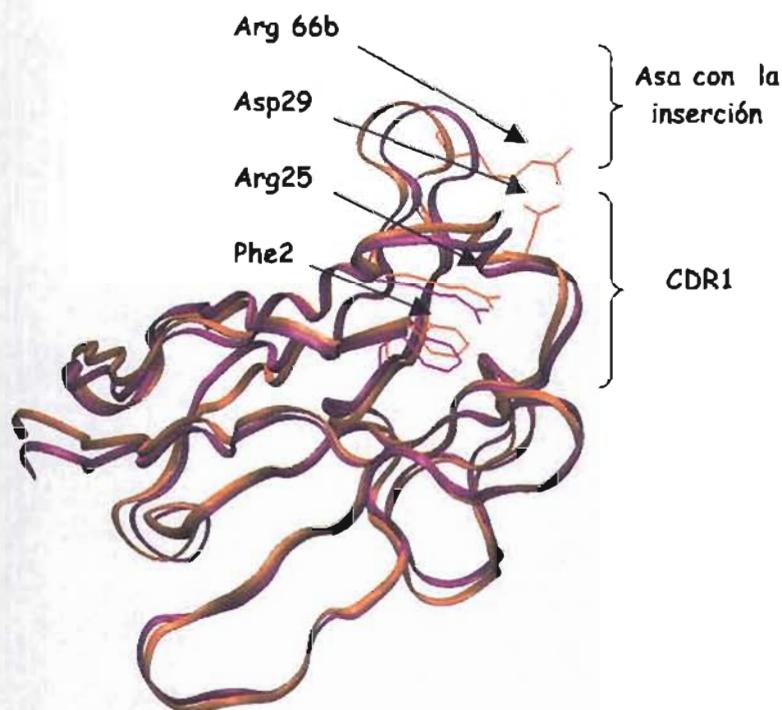


Figura 25 Estructuras de Wil (morado) y Jto (naranja) mostrando la interacción en *stacking* entre la Phe2 y la Arg25 en ambas, y el puente salino en Jto entre la Arg66b y el Asp29.

(b) En la posición 25 del CDR1 se encuentra una Arg en vez de una Gly (como en la mayoría de las  $\lambda$ ), la cual interacciona en apilamiento planar (*stacking*) con una cara del anillo fenilo de la Phe2 (interacción encontrada también en otro tipo de proteínas (Flocco and Mowbray, 1994, Pokkuluri, *et al.*, 1999)).

(c) El asa del FR3 junto con los residuos Ser27, Ser29, Asn30 y Leu4, forman una cavidad hidrofóbica dentro de la cual se localiza la Phe2, y donde la Arg25 forma puentes de hidrógeno con los oxígenos carbonílicos de la cadena principal y su grupo guanidino se expone al solvente cerca de la Asn30.

### 3 Antecedentes

En el laboratorio del Dr. Baltazar Becerril, en aras de evaluar la influencia de la línea germinal  $\lambda 6a$  en la tendencia de los dominios variables  $\lambda 6a$  a la deposición amiloidea, construyeron un dominio variable recombinante a partir del gene de la línea germinal V $\lambda 6a$  -que codifica los primeros 99 aminoácidos- y el gene JL2 (Del Pozo, *et al.*, en revisión) (el cual se ha encontrado con más frecuencia asociado a la línea germinal en su recombinación para la formación de las cadenas ligeras (Perfetti, *et al.*, 2002)) que codifica los 12 aminoácidos restantes. Como resultado de la recombinación de V $\lambda 6a$  y JL2 hay un residuo adicional entre ambos segmentos. De este modo el dominio variable V $\lambda 6a$ JL2 está conformado por 111 residuos y tiene un peso molecular de 11952.9 daltones.

Con el dominio variable V $\lambda 6a$ JL2 y algunas de sus mutantes realizaron ensayos de fibrilogénesis *in vitro*, evaluando la estabilidad termodinámica que favorece la formación de las fibras. Han demostrado que V $\lambda 6a$ JL2 es la menos amiloidogénica de todos sus dominios variables mutantes, incluyendo Wil y Jto (Del Pozo, *et al.*, en revisión).

Con base en estudios comparativos entre Wil y Jto (Pokkuluri, *et al.*, 1999), en el análisis de la fibrilogénesis evaluada en función de ciertas mutaciones en V $\lambda 6a$ JL2 (Del Pozo, *et al.*, en revisión) y siguiendo la descripción realizada por Richardson sobre las distintas estrategias que las hojas  $\beta$  despliegan contra la agregación (Richardson and Richardson, 2002), propusieron la existencia de cuatro

motivos importantes en la estructura de las cadenas ligeras  $\lambda 6a$  y que podrían estar jugando un papel crítico en la agregación amiloidea:

- (a) El N-terminal, ya que en él, la Pro7 permite dar un giro a esta región que favorece la interacción de la Phe2 y la Arg25. En la misma región, la sustitución de la His8 de V $\lambda 6a$ JL2 por Pro, produce un aumento en la estabilidad de la proteína, la cual se afecta si esta sustitución se acompaña de otra en la posición 2 (F2L o F2S) que compromete la interacción entre la Phe2 y la Arg25 (Del Pozo, *et al.*, en revisión).
- (b) El CDR1, debido a la interacción que sostiene la Arg25 con el N-terminal y a que en Jto el Asp en la posición 29 -en vez de una Ser, presente en Wil- cambia el carácter iónico de esta región y forma un puente salino con la Arg68. Por otro lado, la Gly28 -tanto en Wil como en Jto- permite el giro de la Arg25 logrando la conformación en bucle del CDR1, en vez de en forma de hélice (conformación canónica tipo I A, que presenta una Gly25) la cual se encuentra en otras cadenas ligeras. Es por ello que se ha propuesto podría tratarse de una nueva conformación canónica (Del Pozo, *et al.*, en revisión).
- (c) El asa 56-61 que forma parte de la interfase entre monómeros y donde la Asn61 (presente en Jto) es remplazada por una Arg (se observa en Wil) que impide la formación del puente salino con el Asp82, causando una vecindad hidrofóbica

que desestabiliza el dominio estructural (Bellotti, *et al.*, 2000).

- (d) El bulbo  $\beta$  en el FR4, cuya Gly100 (en Jto) protruye al solvente e impide la agregación de las cadenas  $\beta$ .

La estructura atómica de las fibras amiloideas es aún una incógnita y por lo tanto los elementos que le confieren estabilidad aún se ignoran. El carácter estructural de los dominios variables de cadenas ligeras que componen las fibras aún no se ha esclarecido con precisión y por lo tanto, la naturaleza de las interacciones capaces de estabilizar una conformación del dominio, que promueva un arreglo altamente ordenado como lo es la fibra, se han referido sucintamente.

Se han descrito varias generalidades para los agregados amiloides producidos por distintas proteínas. Éstas han conducido a una mayor comprensión del fenómeno; sin embargo, con el creciente desarrollo de nuevas técnicas analíticas y de observación de estructuras moleculares, es cada vez más evidente que muchas de estas generalidades se tornan absurdas al tomarse al pie de la letra, ya que se observan claras particularidades en cada agregado amiloide (Sunde, *et al.*, 1997, Plakoutsi, *et al.*, 2004). Las contribuciones que se puedan hacer para esclarecer las propiedades de semejante agregado patológico resultan entonces, de gran trascendencia.

En este contexto, la determinación de estructuras tridimensionales monoméricas, diméricas y oligoméricas de las cadenas ligeras

amiloidogénicas es de gran ayuda para la interpretación de los mecanismos de formación de la fibra y su función.

Surgió por lo tanto el interés de resolver la estructura tridimensional del dominio variable V $\lambda$ 6aJL2, el cual, como dominio variable prototipo de la línea germinal  $\lambda$ 6a pudiera brindar nociones de los elementos propios de la línea germinal que promueven o impiden la formación de sus fibras amiloideas.

Con este fin, se realizaron los experimentos preliminares para la determinación de la estructura cristalográfica de dicho dominio.

En nuestro laboratorio, con la colaboración del candidato a Dr. Luis del Pozo, se logró cristalizar en distintas condiciones de Acetato de Na (1.6, 1.8 y 2.0 mM) a una concentración de 10 mg/ml en un buffer de MES 100 mM a pH 6.5 (Tabla 2.1). Los cristales que se obtuvieron mostraron una morfología externa muy similar: todos eran barras con extremos distintos, ya fuera en forma piramidal o en ángulo y representaron tres formas cristalinas distintas.

Estos cristales se difractaron en el Laboratorio Universitario de Estructura de Proteínas ubicado en el Instituto de Química de CU y en la línea X6a NIGMS del Sincrotrón de Brookhaven (National Synchrotron Light Source (NSLS)) (Tabla 2.2).

El procesamiento preliminar de los datos de difracción de cada cristal, se realizó en tres grupos espaciales P $4_1$ 22, I $4_1$ 22 y P2 $_1$ , a una resolución de 2.5, 2.0 y 2.2 Å, respectivamente (Tabla 2.1).

	Vl6aJL2	Cristalización	Grupo Espacial	celda unitaria	Res. Máx
1	cristal forma I	Acet. Na 1.8 M*	P4(1)22	70.97 70.97 95.1 90 90 90	2.5
2	cristal forma II	Acet. Na 1.4 M*	P2(1)	68.55 101.64 71.21 90 91.2 90	2.2
3	cristal forma III	Acet. Na 2.0 M*	I4(1)22	73.112 73.112 93.11 90 90 90	1.9
<b>Vl6aJL2-H8P</b>					
4	cristal forma I	20% NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 80% K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1% PEG 400	P2(1)	40.94 85.50 69.15 90 91.2 90	2.2

Tabla 2.1. Muestra las condiciones en que se obtuvieron cristales de Vl6aJL2 y de su mutante H8P, así como la resolución máxima a la que difractaron y sus propiedades de simetría.\* Fueron cristalizadas en MES 100mM pH6.5 10 mg/ml de proteína. LA resolución máxima está dada en Å.

	Vl6aJL2			Vl6aJL2-H8P
	Forma I	Forma II	Forma III	Forma I
Datos de difracción	P4122	P21	I4122	P21
Detector	ADSC 210 CCD	Raxis II-C	RAXIS II-C	ADSC 210 CCD
Longitud de onda	0.9795	1.5418	1.5418	0.9795
Rayo	106.76 101.28	99.87 97.29	99.791 97.105	106.76 101.28
Distancia	230.034	99.997	100	230.0340
Grados de difracción				
Mosaicidad	0.64	1.16	0.64	

Tabla 2.2. Se muestran las variables involucradas en el experimento de difracción. Los cristales I de Vl6aJL2 y Vl6aJL2-H8P se difractaron en el Sincrotron de Brookhaven, y los de las formas II y III de Vl6aJL2 en el LUDP.

Durante el desarrollo de ésta tesis, la Dra. Lilian Segura cristalizó la mutante Vl6aJL2-H8P en 20% NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 80% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1% PEG 400 y se obtuvieron cristales con una morfología externa en forma de barras muy delgadas como láminas dobles encastradas que sin embargo, se

podieron difractar exitosamente. La difracción se realizó en la línea X6a NIGMS del Sincrotrón de Brookhaven (Tabla 2.2).

Los datos de difracción del cristal de Vl6aJL2-H8P brindaron una resolución máxima de 2.2 en un grupo espacial P2<sub>1</sub> (Tablas 2.1).

## Objetivos

### Objetivo General

Determinar la estructura cristalográfica del dominio variable recombinante de la línea germinal  $\lambda 6a$ , V $\lambda 6a$ JL2 en busca de una explicación a las propiedades estructurales que conducen a la formación de fibras por este tipo de proteínas.

### Objetivos Particulares

- 1) Determinar la estructura cristalográfica del dominio variable V $\lambda 6a$ JL2.
- 2) Explicar la naturaleza estructural de los dominios variables de cadenas ligeras de inmunoglobulinas de la línea germinal  $\lambda 6a$  que forman fibras amiloides.
- 3) Proponer un mecanismo de agregación en fibras del dominio variable V $\lambda 6a$ JL2 a partir de sus características estructurales.
- 4) Determinar la estructura cristalográfica de la mutante V $\lambda 6a$ JL2-H8P
- 5) Reconocer las diferencias estructurales entre V $\lambda 6a$ JL2 y V $\lambda 6a$ JL2-H8P y plantear sus implicaciones en la formación de agregados fibrilares.

## 4 Metodología

### 4.1 Procesamiento de datos

#### Integración y auto asignación de índices (autoindexing).

Los datos de difracción se integraron con el programa MOSFLM (Powell, 1999). En primer lugar, se determina la simetría del cristal, las dimensiones de la celda unitaria (por la auto-asignación de índices de Miller) y se establece el grupo espacial evaluando las ausencias sistemáticas de las difracciones medidas. Posteriormente, se hace un pre-afinamiento de los parámetros de detección: distancia del cristal al detector, la orientación del cristal y la mosaicidad.

En el siguiente paso, se integran las intensidades difractadas calculando la parcialidad o totalidad de las reflexiones. Este proceso condujo a

algunos ajustes tanto en las dimensiones de la celda como en la resolución máxima a la que se podía trabajar con los datos de difracción de los cuatro cristales.

#### Ordenamiento y determinación de escalas relativas (Sorting y Scaling)

Para poder hacer una comparación de las reflexiones relacionadas por simetría, las reflexiones tienen que ser posteriormente ordenadas según sus índices de Miller y expresadas en una unidad asimétrica en el espacio recíproco. A continuación, es necesario dar una escala común a todas las imágenes de difracción obtenidas, lo cual permitirá evaluar la simetría asignada a los datos y la calidad de los mismos.

Los procesos señalados en el párrafo anterior se realizaron con los programas Sort y Scala, respectivamente, del grupo de programas CCP4 (*Computational Collaborative Project 4*) (CCP4, 1994).

## 4.2 Construcción del modelo tridimensional

### Obtención de fases por Reemplazo molecular

El modelo utilizado para realizar el reemplazo molecular fue la estructura cristalográfica de Wil (código de PDB: 1cd0) (Pokkuluri, *et al.*, 1999) (una variante particular del  $V_L$  de la línea germinal  $\lambda 6a$  con una identidad de 89%). El reemplazo molecular se realizó con el programa CNS (A.T.Brunger, 1998) para el caso de  $V\lambda 6aJL2$  en  $P4_122$  y  $P2_1$ . En el caso de  $V\lambda 6aJL2$  en  $I4_122$  y de la mutante  $V\lambda 6aJL2-H8P$  en  $P2_1$ , el reemplazo molecular se realizó con el programa MOLREP de CCP4. Se realiza *a priori* un análisis de Mathews, a partir del peso molecular de la proteína, la simetría del cristal y el tamaño de la celda unitaria, que calcula el número de moléculas que constituyen la unidad asimétrica dentro de ella, considerando que haya aproximadamente 50% de solvente.

### Afinamiento del modelo

Los ajustes manuales necesarios para acoplar el modelo en su mapa de densidad electrónica y la búsqueda de ligantes, se realizaron con los programas de visualización y ajuste O (T.A. Jones, 1990) y COOT de CCP4 *Molecular Graphics Project*, con mapas de densidad  $2f_0-f_c$  a  $1\sigma$  y los mapas de diferencias  $f_0-f_c$  a  $2.5$  y  $-2.5\sigma$ . Las minimizaciones y ajustes de los factores B así como la búsqueda de moléculas de agua se realizaron con el programa CNS. Es

importante considerar, antes de realizar el afinamiento, la relación entre los datos observados y los parámetros a medir (4 por cada átomo ( $x,y,z$  y el factor B) en un afinamiento isotrópico<sup>16</sup>).

### Validación del modelo

La validación de la geometría del modelo se realizó con base en el gráfico de Ramachandran<sup>17</sup> y por medio de las desviaciones medias cuadradas (rmsd por *root-mean-square deviation*) de las longitudes de enlace, ángulos y conformaciones se evaluó el cumplimiento del modelo de las restricciones fisicoquímicas aceptadas. Por otro lado, la validación de la concordancia del modelo con los datos experimentales de difracción, se realizó por los criterios establecidos por Brünger: factor  $R$ <sup>18</sup> y factor  $R_{free}$ <sup>19</sup>; así como la figura de mérito del modelo (FOM por *figure of merit*). Se consideraron buenos estimadores de

<sup>16</sup> Por lo general, debido a los límites de resolución se construyen modelos en los que se considera el desplazamiento atómico como una nube de electrones uniforme en todas direcciones (isotrópica).

<sup>17</sup> Permite identificar regiones del modelo con conformaciones que violen los ángulos permitidos  $\phi-\psi$  para cada residuo.

<sup>18</sup> El factor R esta dado por

$$R = \frac{\sum_{h,k,l} ||F_{obs}(h,k,l) - F_{calc}(h,k,l)||}{\sum_{h,k,l} |F_{obs}(h,k,l)|}$$

Mientras menor sea este índice, mayor es la congruencia entre el modelo y los datos experimentales. Su valor ideal se encuentra entre valores de  $R \leq 20-25\%$ . Durante el reemplazo molecular se aceptan valores de 40-30%.

<sup>19</sup> El valor  $R_{free}$  se calcula con un conjunto reducido de reflexiones (generalmente de 5-10%) que se excluyen *ab initio* del cálculo del factor R y que son omitidos de la construcción del modelo:

$$R_{free} = \frac{\sum_{h,k,l \in T} ||F_{obs}(h,k,l) - F_{calc}(h,k,l)||}{\sum_{h,k,l \in T} |F_{obs}(h,k,l)|}$$

Este índice evalúa el ajuste del modelo sobre un conjunto de intensidades cuantificadas que no se incluyen en el afinamiento. Previene del sobre ajuste de los modelos.

fases iniciales valores de  $R \leq 30-40\%$ , y como indicadores de un modelo que ha llegado a la convergencia, valores de  $R \leq 20-25\%$  y de  $R_{\text{free}}$  que no discrepara del  $R$  en más de 5 puntos porcentuales.

### 4.3 Análisis comparativo de los dominios variables

Los alineamientos de secuencia de cadenas ligeras  $\lambda$  se realizaron con ClustalW. La búsqueda de secuencias homólogas de V $\lambda$ 6aJL2 se realizó con BLASTP contra la base de datos de secuencias no redundantes usando el servidor de la *Kioto Encyclopaedia of Genes and Genomes* (KEGG), con un valor de corte de  $e^{-50}$ , y contra la base de datos del *Protein Data Bank* (PDB).

Con el programa O se realizaron las sobre-posiciones de los dominios variables de distintas líneas germinales con los que se trabajo:  $\lambda$ 3 Fab Hil (8fab),  $\lambda$ 1 Loc (3bjl) (Schiffer, *et al.*, 1989),  $\lambda$ 2 Mcg (1dcl) (Huang, *et al.*, 1996),  $\lambda$ 3 Cle (1lil) (Huang, *et al.*, 1996),  $\kappa$  Bre (1bre) (Schormann, *et al.*, 1995),  $\lambda$ 6 Jto (1cd0) y  $\lambda$ 6 Wil (2cd0) (Pokkuluri, *et al.*, 1999).

El análisis de los contactos cristalinos y el cálculo de las superficies de contacto se realizaron con el programa CNS. La representación gráfica de la proteína se realizó con los programas O, COOT, y VMD (Humphrey, *et al.*, 1996).

## 5 Resultados

### 5.1 Procesamiento de los datos de difracción

Se resolvieron tres estructuras tridimensionales por cristalografía de rayos X de la proteína recombinante V $\lambda$ 6aJL2 y una de la mutante V $\lambda$ 6aJL2-H8P (Tabla 2.1).

Los valores estadísticos del procesamiento de los datos de V $\lambda$ 6aJL2 en tres formas cristalinas distintas describen un procesamiento correcto con buena calidad de los datos en los grupos espaciales atribuidos y a las resoluciones especificadas en la Tabla 5.1. El  $R_{merge}$  es bajo (por lo general es difícil que sean menores a 1% (Leslie, 1999) se encuentran siempre en el intervalo de 2 y 3%), el  $1/\sigma$  es alto, es

decir las intensidades son distinguibles del ruido de fondo en el detector de la difracción, la integridad es mayor al 90%, por lo que se tienen datos de casi todo el cristal, la multiplicidad, es decir cuantas veces se obtuvo cada observación, es alta también y la relación datos-parámetros muestra es suficiente para proceder a un correcto afinamiento. En el único caso donde se encuentra por debajo del límite es en el de P4<sub>1</sub>22 (Tabla 5.1) (Es necesaria por lo menos una observación y media para calcular cada parámetro). El detalle de los modelos construidos del dominio variable V $\lambda$ 6aJL2 y su mutante H8P es hasta un límite de resolución de entre 2 y 2.5 Å.

Datos del procesamiento	V $\lambda$ 6aJL2			V $\lambda$ 6aJL2-H8P
	Forma I	Forma II	Forma III	Forma I
Grupo Espacial	P4122	P21	I4122	P21
Celda				
a	70.9707	68.5007	73.112	40.94
b	70.9707	101.5841	73.112	85.4951
c	95.1197	71.2759	93.106	69.1519
$\alpha$	90	90	90	90
$\beta$	90	91.1926	90	91.2029
$\gamma$	90	90	90	90
Intervalo de Resolución	(16.760 - 2.5 Å)	(27.017 - 2.200 Å)	(17.418 - 2.5 Å)	(36.911 - 2.3 Å)
No. de reflexiones	8435	42900	8868	20860
No. de reflexiones rechazadas	52/70256	93/102481	1/34708	1/38262
$R_{merge}$	0.065 (0.349)	0.078 (0.228)	0.122 (0.199)	0.044(0.126)
$1/\sigma$	8.96 (2.0)	6.37 (3.0)	5.3 (3.6)	10.2(4.8)
Integridad (%)	99.6 (100.0)	91.6 (88.9)	97.2 (99.8)	85.3(66.4)
Multiplicidad	7.9 (8.2)	2.3 (2.3)	4.8 (5.3)	1.9(1.8)
Factor B según el Wilsonplot	50.578	22.52	10.821	24.381
Moléculas por unidad asimétrica	2	8	1	4
No.observac./No.parámetros a medir (iso)	1.26	1.60	2.64	1.35

Tabla 5.1. Integración de los datos de difracción de las tres formas cristalinas de V $\lambda$ 6aJL2 y su mutante V $\lambda$ 6aJL2-H8P.\* Para el caso de la forma III se muestran los valores estadísticos del procesamiento final de los datos ya que existieron algunos problemas que se describen en la sección correspondiente.

## 5.2 Construcción del modelo cristalográfico de Vλ6aJL2 y su mutante Vλ6aJL2-H8P

### 5.2.1 Obtención de fases por Reemplazo Molecular y construcción del modelo.

El reemplazo molecular para obtener las fases de los tres conjuntos de datos de Vλ6aJL2 y del conjunto de datos de su mutante H8P, se realizó con el programa CNS utilizando como modelo el dominio variable Wil (Pokkuluri, *et al.*, 1999) que presenta una identidad de 89% con nuestra proteína problema. Por

esta razón durante el reemplazo los coeficientes de correlación, así como los valores de R, mostraron una buena correlación del modelo con los datos de difracción (Tabla 5.2) que se refleja en valores de R de alrededor de 40%. El análisis de Mathews para cada grupo espacial permitió conocer el número probable de moléculas en la unidad asimétrica: en el caso de P4<sub>1</sub>22 se encontró un dímero, en el caso de P2<sub>1</sub> un octámero y en el caso de I4<sub>1</sub>22 un monómero (Tabla 5.2).

Análisis Mathews	Vλ6aJL2			Vλ6aJL2-H8P
	Forma I	Forma II	Forma III	
PM 11953	P4 <sub>1</sub> 22	P2 <sub>1</sub>	I4 <sub>1</sub> 22	P2 <sub>1</sub>
No. mol/ u.asim	2	8	1	4
Coef. Mathews	2.5	2.8	2.6	2.6
% solvente	50.87	55.6	52.4	52.4
<b>Reemplazo Molecular</b>				
R-factor	0.408	0.454	0.427	0.438

Tabla 5.2. Muestra los distintos valores que determinaron el reemplazo molecular para cada forma cristalina de Vλ6aJL2 y de su mutante Vλ6aJL2-H8P.

### 5.2.2 Afinamiento de los modelos tridimensionales

Se afinó el modelo generado por reemplazo molecular por ciclos iterativos de minimización y ajuste de factores B, alternando con ajustes manuales sobre el mapa de densidad 2fo-*fc* a 1σ y corrigiendo el modelo en función de las densidades positivas (a 2.5σ) o negativas (a -2.5σ) que presentara el mapa de diferencias fo-*fc*.

En el caso de Vλ6aJL2 en sus tres formas cristalinas las regiones que mostraban menos densidad electrónica fueron los residuos del N-terminal como el C-terminal (1-3 y 103-107), las cuales siempre presentan un cierto desorden. Llamó la atención que los residuos 7-8,

40-42, 92-95a, 24-28, 61-69, algunos de ellos distintivos de la línea germinal, presentaban también poca densidad electrónica; sin embargo, como se verá en las siguientes secciones, al aplicar distintas técnicas –como el templado simulado– esta circunstancia pudo superarse obteniendo densidades electrónicas en las regiones en que hacía falta. Por lo tanto, los valores de R y R<sub>free</sub> a lo largo del afinamiento reflejaron una correcta consecución del ajuste (Tabla 5.3), el cual condujo a la construcción de un modelo final con valores de R de alrededor del 20 % para Vλ6aJL2 y de 19% para Vλ6aJL2-H8P y valores de R<sub>free</sub> de alrededor del 23% y

del 22 %, respectivamente, con valores de FOM mayores a 80% en todos los

casos.

Estadística del Modelo		Vλ6aJL2			
		Forma I	Forma II	Forma III	Vλ6aJL2-H8P
Minimización de cuerpo Rígido	Rcrys	0.3443(0.4101)	0.34	0.33658	0.3621(0.4230)
	Rfree	0.3622(0.4466)	0.3457	0.3433	0.3607(0.4030)
Proceso de Templado (T=2500K)	Rcrys	0.2696	0.2563	0.3145	0.2577(0.2737)
	Rfree	0.3139	0.2946	0.3755	0.3089(0.3388)
Modific. manuales y Búsqueda de lig	Rcyst	0.2432	0.2456	0.2562	0.2309(0.2266)
	Rfree	0.2885	0.2813	0.2907	0.2817(0.2523)
Búsqueda de aguas	Rcyst	0.2314 (0.3261)	0.2230 (0.3690)	0.2394(0.26990)	0.2206(0.2111)
	Rfree	0.2868 (0.3606)	0.2646 (0.3838)	0.2682(0.3483)	0.2740 (0.2819)
Rcrist, mejor modelo isotrópico		0.2093 (0.33)	0.2004 (0.24)	0.2123 (0.25)	0.197(0.20)
Rfree, mejor modelo isotrópico		0.2354 (0.44)	0.2390 (0.33)	0.2603 (0.33)	0.229(0.28)
FOM		0.82	0.8217	0.88	0.84
No. átomos de proteína en la unidad asimétrica		1680	6720	840	3360
No. de iones acetato en la unidad asimétrica		1	0	0	0
No. de átomos de solvente en la unidad asimétrica		31	217	24	196
rmsd de la longitud de enlace (Å)		0.027	0.021	0.027	0.025
rmsd del ángulo (grados)		2.184	1.951	2.235	2.14
Residuos en las regiones núcleo $\phi$ - $\psi$ (%)		97.75	97.41	95.50	99.1
Residuos en regiones no permitidas (%)		2.25	2.59	4.50	0.9

Tabla 5.3. Se especifican los parámetros de validación de los modelos estructurales construidos para Vλ6aJL2 y Vλ6aJL2-H8P. Los criterios geométricos de validación de los distintos modelos, muestran un correcto ajuste a las resoluciones máximas en que se trabajó en cada caso.

### 5.2.3 Particularidades del afinamiento del modelo dimerico de la Formal en P4<sub>1</sub>22

Como ya ha sido mencionado, durante el afinamiento se examina el ajuste del modelo sobre el mapa de densidad y las decisiones de modificación se toman en función de la información que brinda el mapa de diferencias. Este último muestra las regiones donde el modelo no explica los datos, ya sea porque se coloca parte del modelo donde no debe existir (muestra picos de densidad negativa en  $\sigma$ ) o porque haya regiones donde sea necesario agregar algo al modelo (muestra regiones de densidad positiva).

Al revisar los picos de densidad electrónica positiva, se vio que la mayoría correspondían a moléculas de

agua (todos eran de alrededor de  $3\sigma$ ) faltantes en el modelo; sin embargo, se encontró uno en particular cuya

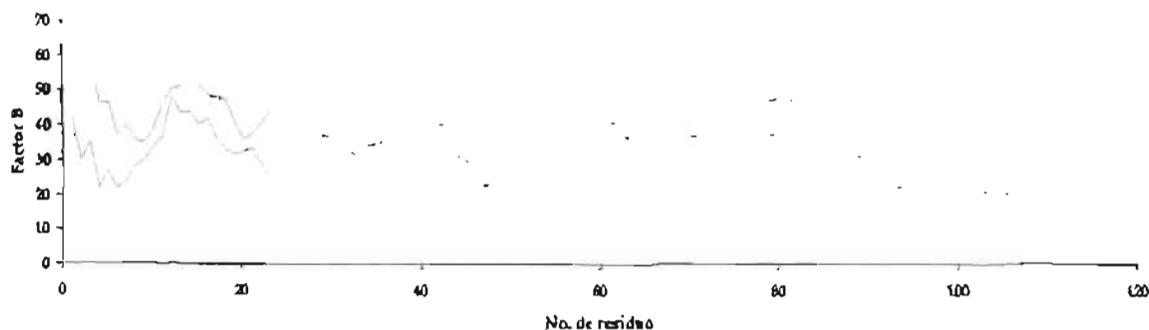
densidad era muy grande (alrededor de  $5\sigma$ ) y se creyó podría corresponder a una molécula de MES proveniente del líquido madre. Al incluir esta molécula en el modelo, en dos conformaciones distintas por separado o con conformaciones alternas, los valores estadísticos del modelo empeoraron (Tabla 5.4). Adicionalmente, el mapa de diferencias, mostraba densidades negativas donde se había colocado el MES. Esto evidenciaba que no existía tal molécula en el cristal.

P4, 22	R	R <sub>rec</sub>
Ajustes manuales	0.2471	0.287
C/MES (1)	0.2498	0.2888
C/MES (2)	0.2471	0.2908
C/MES dos conformaciones	0.2501	0.291
Con PO4	0.2306	0.2846
Con PO4 y H2O	0.2308	0.2886
C/33 H2O	0.2325	0.2908
Con PO4 parciales	0.2297	0.288
Con Acetato	0.2432	0.2885
Con Act y 31 H2O	0.2314	0.2868

Tabla 5.4. Valores estadísticos de los modelos de V<sub>l6a</sub>JL2 con MES, PO4 y Acet durante los afinamientos. C/MES (1) se refiere a una conformación del Mes y (2) a otra. C/MES con dos conformaciones, se refiere a la incorporación al modelo de las dos conformaciones que habían sido evaluadas independientemente, pero ahora con ocupaciones parciales de 0.5 cada una. El PO4 también se evaluó con conformaciones parciales de 0.5

La localización del pico de densidad positiva en que se había colocado el MES coincidía con un eje de simetría, por lo que gran parte de esta

densidad podía deberse al ruido generado por pequeños errores en el tamaño determinado para la celda unitaria. Se propuso entonces que podría tratarse de una molécula más pequeña que no incluyera el pico sobre el eje sino sólo los picos laterales intensos que existían y se colocó en esa posición una molécula de fosfato en el modelo. Los resultados fueron claros: no se obtuvieron mejores valores estadísticos de validación del modelo y la densidad negativa aparecía nuevamente. Fue entonces que se optó por ubicar en esa posición una molécula de acetato de sodio, también proveniente del líquido madre y que posee menos electrones. Esta decisión ayudó a optimizar el modelo (Figura 5.1), ya que los valores estadísticos mejoraron y ya no aparecía ninguna densidad negativa en la zona (Tabla 5.4 y Figura 4.1).



Gráfica 4.1 Muestra comparativamente la tendencia de los factores B en el monómero A (rojo) y el B (azul) del modelo dimérico final. El monómero A muestra valores B menores y es probable que se deba a la asociación del ión acetato a este monómero.

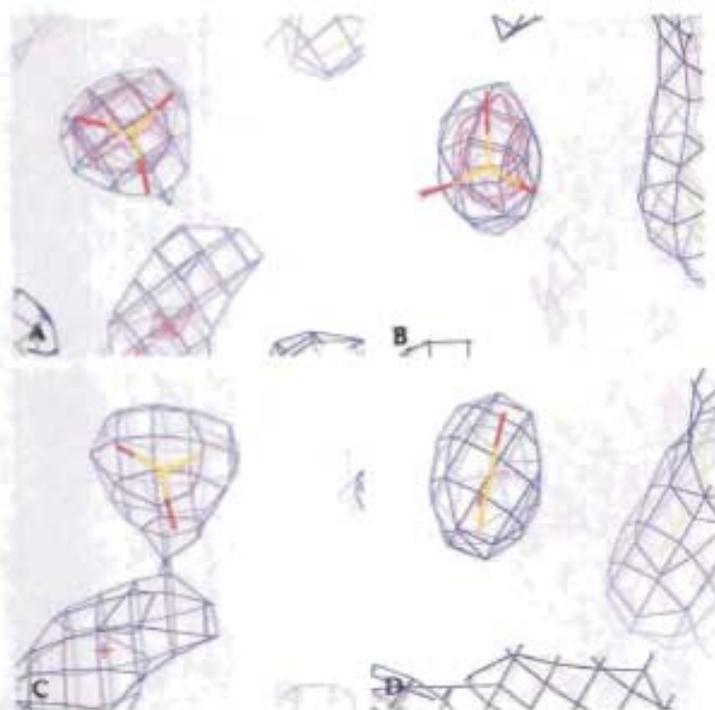


Figura 4.1. (A) y (B) Muestran densidad electrónica en rojo que corresponde al pico negativo a 5.60 en el mapa de diferencias fo-fo en donde se había colocado el fosfato. Vista frontal y lateral respectivamente. (C) y (D) Muestran la desaparición del pico negativo al ubicar un acetato en esa posición. Nótese que la densidad electrónica del mapa de densidad 2fo-fo (azul) a 1σ se ha ajustado con las fases del acetato y por ello desaparece la densidad negativa.

La molécula de acetato se encuentra coordinada con el monómero A en la región del asa 80-84. Esta unión puede ser que estabilice al monómero completo, ya que en su densidad electrónica no se encuentran tantas regiones discontinuas como en el monómero B y los factores B del monómero A son más bajos (Gráfica 4.1).

#### 5.2.4 Particularidades del afinamiento del modelo octamérico de la Forma II en P2<sub>1</sub>

Al ajustar el octámero del modelo construido en el grupo espacial P2<sub>1</sub>, fue evidente que las zonas más problemáticas eran las mismas que en el caso anterior. La única diferencia real radicaba en que el asa 91-96, correspondiente al CDR3, sólo presentaba una densidad electrónica

continua en el monómero A pero no en el resto.

Para lograr obtener en esa zona del modelo una densidad positiva en el mapa, se realizó un proceso de templado simulado (*simulated annealing*) para el asa de cada monómero. Este procedimiento consiste en: 1) omitir los aminoácidos dudosos del cálculo de las fases y 2) provocar un calentamiento del sistema en que se encuentra la proteína para lograr sacar al modelo de un mínimo local -al que se encuentra sujeto debido a la asignación de las fases del reemplazo molecular- para lograr que llegue a otro mínimo local que nos permita modificar la densidad electrónica en función de las fases del modelo correcto. Con base en esta aproximación, se pudo reconstruir el CDR3 en los monómeros B-G (Figura

5.2), pero no en el monómero H, el cual no mostró mejora alguna en la densidad electrónica de esa región, lo que se

traduce en una elevación de los factores B en esa región (Gráfica 5.2).

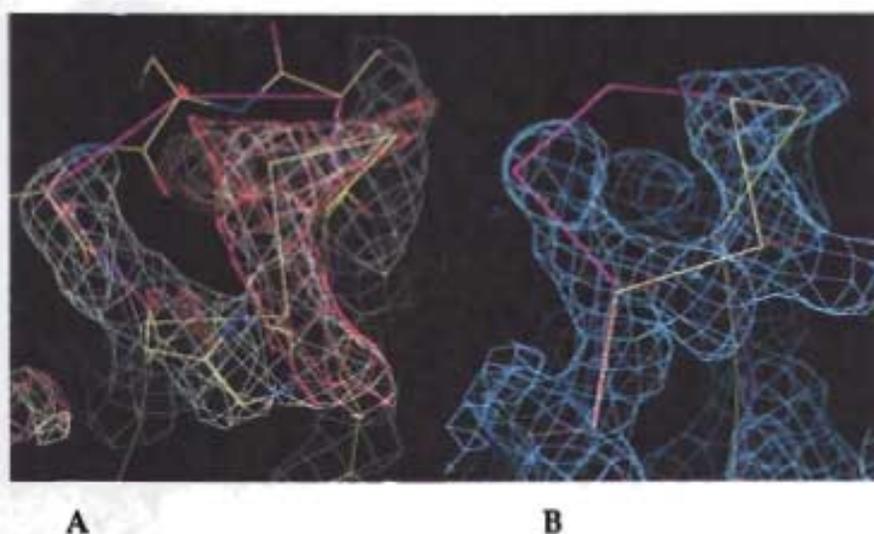
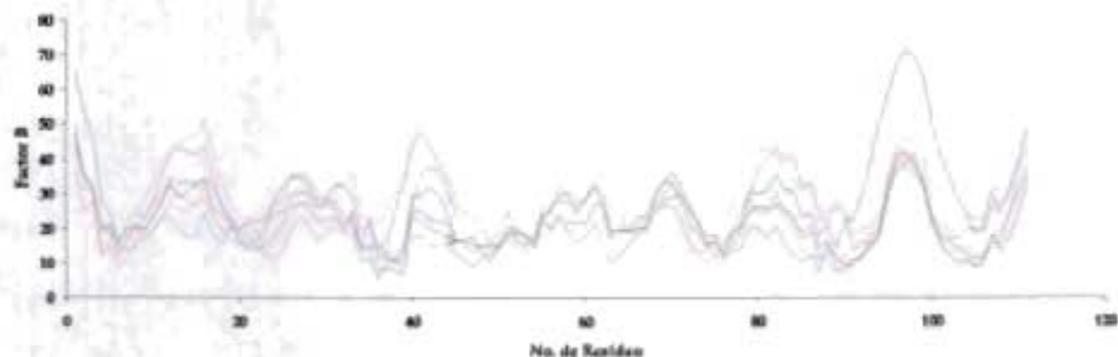


Figura 5.2. Muestra en (a) el mapa de densidad electrónica  $2fo-fc$  segmentado (amarillo), en rojo se muestra la densidad electrónica del mapa  $fo-fc$  generado por *simulated annealing*, el cual muestra por donde debe construirse el modelo. Se observa como el modelo original del CDR3 (magenta) toma una dirección contraria a la que sugiere la densidad electrónica del *simulated annealing*; ocupando la posición que la His95a tomaría en su modelo correcto. (b) En amarillo se observa el modelo correcto del CDR3 sobre el nuevo mapa  $2fo-fc$ .



Gráfica 5.2. Muestra comparativamente la tendencia de los factores B en cada monómero del modelo octamérico final que constituye esta forma cristalina (P2<sub>1</sub>). Monómero A (rojo), monómero B (naranja), Monómero C (verde), Monómero D (morado), Monómero E (rosa), Monómero F (azul cielo), Monómero G (lila), Monómero H (azul marino). Este último muestra una elevación sustancial de sus valores de B en la región 91-97 que se traduce en una pobre densidad electrónica.

### 5.2.5 Particularidades en el procesamiento de los datos de difracción y afinamiento del modelo generado de la Forma III en I4<sub>1</sub>22

Durante el procesamiento de los datos de difracción del tercer cristal, estos mostraban irregularidades en el gráfico de Wilson a resoluciones mayores a 2.5 Å (Figura 4.3). Dicho gráfico debe mostrar un ajuste lineal del logaritmo de escalamiento de las intensidades en función de la resolución. Cualquier desviación de esta recta sugiere una

revisión de los datos, es decir un reprocesamiento de los distintos grupos espaciales y/o a distintas resoluciones que eliminen los problemas en dicho gráfico. El efecto que este problema podría acarrear, se hizo evidente al afinar el modelo, incluyendo en el proceso, los datos en la resolución máxima que ostentaba el conjunto de datos, o los datos entre 2.5 y 2.0 Å.

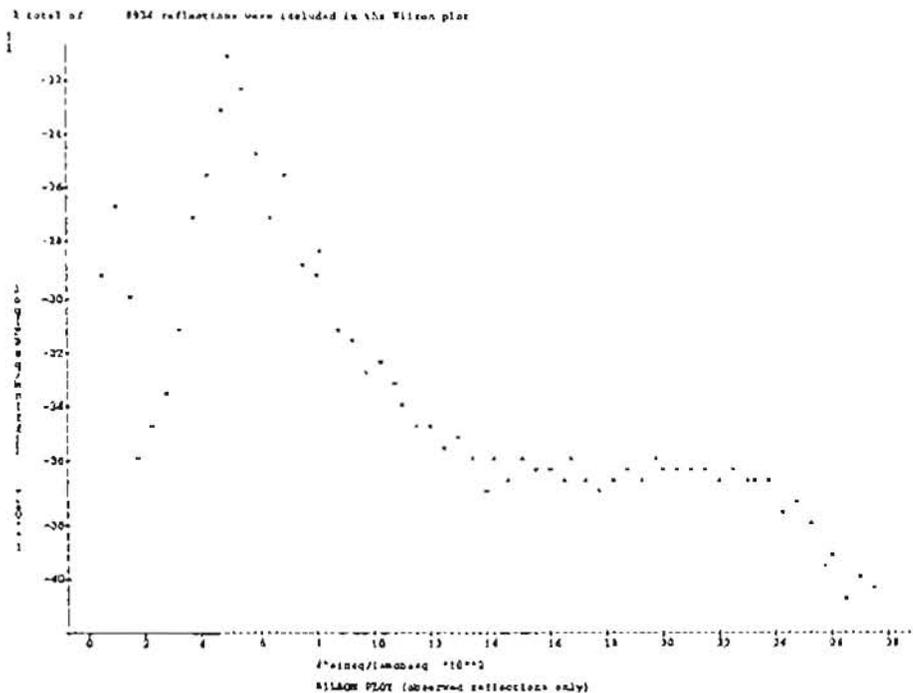


Figura 5.3. Gráfico de Wilson de los datos de los datos de difracción de la forma cristalina 3 en el grupo espacial I4<sub>1</sub>22.

Con ayuda de MOSFLM se integraron los datos de difracción del tercer cristal en cuatro grupos espaciales distintos que fueron, en orden ascendente de simetría: C2, F222, I2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub> e I4<sub>1</sub>22. El procesamiento de los datos en estos grupos espaciales mostraba por lo general valores estadísticos que permitían pensar que los datos pudieran pertenecer a cualquiera de ellos (Tabla

4.5). Esto implica que si no existen otros indicios de error, el conjunto de datos tiene el grupo espacial de mayor simetría dentro de los analizados; no obstante, el gráfico de Wilson siempre mostró irregularidades, lo que en realidad hizo dudar mucho de la calidad de los datos de difracción de ese cristal.

La revisión de los datos de difracción en distintos grupos espaciales y a una resolución máxima de 2.5 Å, puede conducir a algunos problemas durante la determinación de la estructura:

1) Por lo general las reflexiones a resoluciones mayores a 2.5 Å son las más informativas a pesar de ser las más débiles, por lo cual se busca siempre alcanzar resoluciones altas. En este caso, a pesar de contar con reflexiones hasta 2.0 Å no resultó conveniente utilizarlas debido a los problemas que presentaban según el gráfico de Wilson. Otra evidencia clara de éstos fue que cuando se intentó afinar los modelos a resoluciones arriba de 2.5 Å (incluyendo hasta 2.0 Å) los valores estadísticos de prueba mostraban que el modelo ya no estaba explicando bien los datos (se ahondará en estos aspectos en párrafos subsiguientes). En este caso, en vez de brindar más información, la oscurecían.

2) El procesar los datos en distintos grupos espaciales (diferentes a aquel sugerido durante la estrategia de colecta) condujo a que en algunos grupos espaciales las oscilaciones colectadas no fueran suficientes para obtener todas las reflexiones que por simetría generarían todo el cristal. Esto provocó cambios considerables en la integridad y en la multiplicidad de los datos a medida que disminuía la simetría del grupo espacial que se utilizaba (Tabla 5.5).

El afinamiento del modelo en todos los grupos espaciales propuestos para los datos de difracción de este cristal, no procedió adecuadamente al utilizar las reflexiones a resoluciones

mayores a 2.5 Å. Los valores estadísticos del modelo: el R y  $R_{free}$  no bajaban de manera conjunta -como es de esperar durante un correcto afinamiento- y en algunos casos aumentaban, ya fuera de manera conjunta, o simplemente el  $R_{free}$  comenzaba a mostrar sobre-afinamiento (sube el  $R_{free}$  mientras baja el R) (no se muestran datos).

El afinamiento a 2.5 Å en los 4 grupos espaciales permitió obtener mejores modelos que los que se habían generado a resoluciones más altas. No obstante, la disminución en el número de reflexiones asequibles a esta resolución, afectaba considerablemente la relación datos/parámetros y por lo tanto, la información que se podía utilizar para la construcción del modelo (Tabla 5.6).

El único grupo espacial en el que la relación datos parámetros a una resolución de 2.5 Å era suficiente para clacular los parámetros necesarios para la construcción del modelo (Tabla 5.1), y donde el afinamiento pudo proceder adecuadamente, fue en  $I4_122$  (Tabla 5.3). Otro indicador de que resolver la estructura en este grupo espacial llevaría a un modelo correcto de la estructura en el cristal, fue que en todos los grupos espaciales, el arreglo cristalino estaba caracterizado por una simetría  $4_1$  (como el que se observa en las figuras 5.3 y 5.4). Para usar los datos con menor simetría se hubiera necesitado usar simetrías no-cristalográficas; sin embargo el hecho de que en todos los grupos espaciales los datos (y las soluciones de reemplazo molecular) coincidieran, así como la estadística de los errores de medida, es evidencia de que el grupo correcto (con la calidad que se obtiene en todos) es el de mayor simetría, es decir  $I4_122$ .

		V $\lambda$ 6aJL2 Forma III			
Datos de procesamiento		Procesamiento 1	Procesamiento 2	Procesamiento 3	Procesamiento 4
Grupo Espacial		I4122	I212121	F222	C2
Celda					
	a	73.112	93.126	93.125	93.1267
	b	73.112	73.13	103.3383	103.4846
	c	93.1056	73.088	103.5346	69.5551
	$\alpha$	90	90	90	90
	$\beta$	90	90	90	132.0102
	$\gamma$	90	90	90	90
Intervalo de Resolución		(17.418 -1.9 Å)	(21.229 -1.800 Å)	(25.820 -1.9 Å)	(19.811 -2.1 Å)
No. de reflexiones		8934	12090	15110	20058
No. de reflexiones rechazadas		2/47770	0/27731	0/36773	0/38904
Rmerge		0.130 (0.331)	0.090 (0.222)	0.119 (0.391)	0.088 (0.222)
I/ $\sigma$		5.3 (2.3)	8.3 (3.5)	6.4 (1.9)	8.2 (3.5)
Integridad (%)		97.2 (84.1)	89.4 (87.8)	71.7 (59.9)	68.2 (73.0)
Multiplicidad		4.8 (3.1)	2.4 (2.2)	2.6 (1.7)	2.0 (1.8)
Factor B según el gráfico de Wilson		10.821	12.895	9.166	13.456
Moléculas por unidad asimétrica		1	4	2	4
No.observaciones/No.parámetros a medir (I $\sigma$ )		2.66	0.90	2.25	1.49

Tabla 5.5. Datos de integración del tercer cristal en cuatro grupos espaciales distintos.

La estructura se resolvió en este grupo espacial. Por otro lado, los valores estadísticos de prueba de los modelos resultantes de los ciclos iterativos de

afinamiento en este grupo espacial, muestran una mejor coincidencia de los datos de difracción obtenidos con el modelo generado (Tabla 5.3).

Datos de procesamiento	I4122	I212121	F222	C2
Intervalo de Resolución	(17.418 -2.5 Å)	(21.229 -2.5 Å)	(25.820 -2.5 Å)	(19.811 -2.5 Å)
No. de reflexiones	8934	12090	6203	11179
No. de reflexiones rechazadas	1/34708	0/27731	0/36773	0/38904
Rmerge	0.122 (0.199)	0.090 (0.185)	0.119 (0.195)	0.088 (0.167)
I/ $\sigma$	5.3 (3.6)	8.3 (4.2)	6.4 (4.0)	8.2 (4.6)
Integridad (%)	97.2 (99.8)	89.4 (91.1)	71.7 (75.3)	68.2 (70.5)
Multiplicidad	4.8 (5.3)	2.4 (2.3)	2.6 (2.8)	2.0 (2.0)
Moléculas por unidad asimétrica	1	4	2	4
No.observaciones/No.parámetros a medir (I $\sigma$ )	2.66	0.90	0.92	0.83

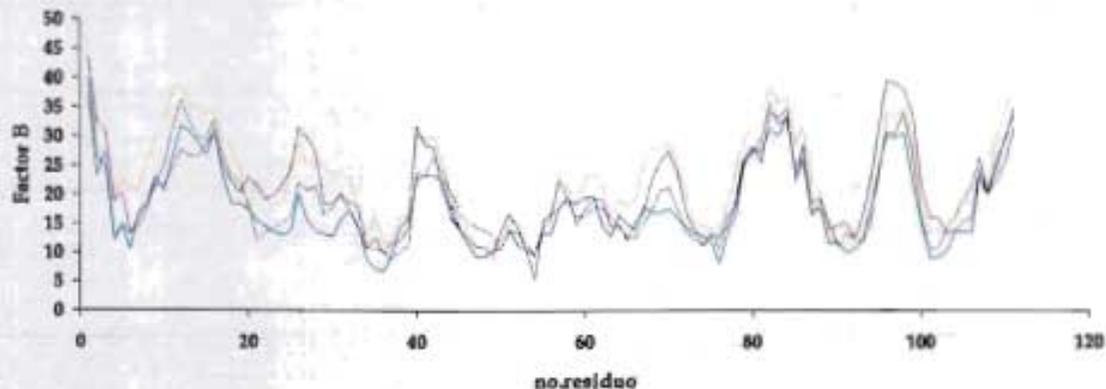
Tabla 5.6. Muestra los resultados del procesamiento de los datos del cristal III en tres distintos grupos espaciales.

5.2.6 Particularidades del afinamiento del modelo tetramérico de V $\lambda$ 6aJL2-H8P en P2<sub>1</sub>  
En el procesamiento de los datos de difracción del cristal de V $\lambda$ 6aJL2-H8P

también se observaba un gráfico de Wilson con pequeñas irregularidades a altas resoluciones; sin embargo, éstas no afectaron la calidad de los datos. El

afinamiento del modelo tridimensional sólo requirió ajustes en el N y C-terminal y en los residuos 13,16, 82-86, 96 y 98. El ajuste del modelo al mapa de densidad llegó a convergencia, a pesar de que los valores estadísticos no mostraban bajas considerables (Tabla 5.3).

A partir de los valores que los criterios estadísticos que validan los modelos generados, se considera que éstos llegaron a convergencia y permiten observar con un detalle atómico de resolución de 2-2.5 Å las propiedades estructurales de los dominios variables, las cuales serán descritas en la sección 5.4.



Gráfica 5.3. Muestra comparativamente los factores B de cada monómero de Vλ6aJL2-H8P en el modelo final.

### 5.3 Tres grupos espaciales un mismo empaquetamiento helicoidal

El empaquetamiento cristalino de Vλ6aJL2 muestra lagunas particularidades que resulta interesante resaltar en esta sección debido a las propiedades amiloidogénicas del dominio.

El ordenamiento cristalino del dominio variable Vλ6aJL2 se da en un arreglo helicoidal con simetría  $4_1$  (Figura 5.3 y 5.4), en todos los grupos espaciales en que se resolvió su estructura (aún en

todos aquellos donde se procesaron los datos del tercer cristal). En el caso de  $P4_122$  e  $I4_122$  como simetrías cristalográficas y en el caso de  $P2_1$  como simetrías no-cristalográficas.

Esta hélice cristalina está formada por una repetición de dímeros de dominios variables a lo largo de su eje de paso, relacionados por la simetría  $4_1$  (Figura 5.3 y 5.5). Como se verá en la sección 5.5, la naturaleza de estos dímeros es muy similar a la de los dímeros  $V_L V_H$ .

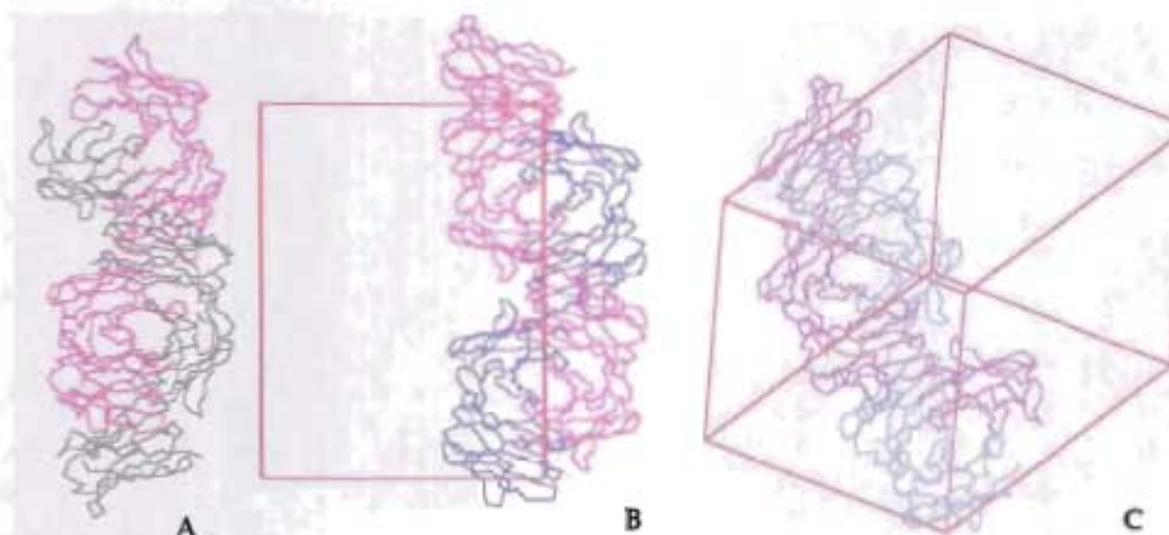


Figura 5.3. Paso de las hélices cristalinas formadas por Vλ6aJL2 a lo largo del eje Z en P4<sub>1</sub>22 (a) e I4<sub>1</sub>22 (b) y con la desviación de 45° con respecto al eje de P2<sub>1</sub>.

En el contexto en que se enmarca este trabajo, el hallazgo de la hélice de Vλ6aJL2 en todas sus formas cristalinas condujo a la formulación de varias preguntas: ¿El arreglo helicoidal es consistente en los tres grupos espaciales en que se observa? ¿Los contactos cristalinos que se generan para constituir tal arreglo podrían interpretarse como posibles contactos que se generen en las fibras patológicas que producen este tipo de proteínas? ¿Existe alguna coincidencia entre las dimensiones de esta hélice y las dimensiones que presentan los estadios prefibrilares?

Para responder estas preguntas se evaluaron por varias vías las similitudes entre los arreglos helicoidales en cada uno de los grupos espaciales. Se realizó en primer lugar, un análisis de las auto-rotaciones que explican las simetrías que las reflexiones mantienen independientemente del modelo. Este análisis evidenció la periodicidad de simetría 4 en uno de los ejes en cada uno de los grupos espaciales (Figura 5.4.) y las simetrías

correspondientes al arreglo dimérico alrededor de un eje de simetría 2.

Posteriormente, con el afán de evaluar la desviación que pudiera tener cada dímero como una unidad, con respecto al eje de la hélice, se realizó una sobre-posición de cada dímero con el inmediato a lo largo de ésta. La relación de las matrices de rotación se encuentra en el Cuadro 6.1. Esta información sugiere que en los casos de P4<sub>1</sub>22 e I4<sub>1</sub>22 no existe ninguna desviación de la hélice con respecto al eje por el cual pasa, el eje Z. En lo que respecta a la hélice presente en el grupo espacial P2<sub>1</sub>, se observa que la desviación que ésta muestra con respecto al eje Z es de 45° (Figuras 5.3 y 5.4 y Cuadro 5.1), esta desviación también es evidente a la luz del análisis de las auto-rotaciones de las reflexiones de este grupo espacial (Figura 5.4.d) y al ver que la orientación de los dímeros difiere con respecto al eje de las hélices P4<sub>1</sub>22 e I4<sub>1</sub>22 en 4°.

Para comparar la disposición de los dímeros a lo largo de la hélice se sobre-pusieron las hélices de los tres grupos espaciales. Se observó una ligera

expansión de los dominios debidas a los cambios en las concentraciones de acetato de sodio en que crecieron los diferentes cristales. Tales variaciones en el empaquetamiento determinan tanto la longitud del paso de las hélices como el diámetro de las mismas (Figura 5.5).

El paso de las hélices en los tres grupos espaciales comprende el arreglo de 8 monómeros, es decir, la repetición de 4 dímeros. En el caso de  $P4_122$  e  $I4_122$  el paso de la hélice a lo largo del eje Z es de 95.12 y 93.10 Å respectivamente, y corresponde a la longitud del eje c de la

celda unitaria (Tabla 5.1). En  $P2_1$  el paso de la hélice a lo largo de su eje es de 96.87 Å.

El diámetro que presentan las hélices en cada uno de los grupos espaciales es de dimensiones muy similares. El diámetro aproximado que presenta la hélice en  $P4_122$ ,  $P2_1$  e  $I4_122$  es de 50.184, 50.40 y 51.69 respectivamente. El cálculo de estas dimensiones se hizo con base en la longitud del eje de la celda unitaria a lo largo del cual se observan el arreglo de las hélices desde el eje por el cual corren (Figura 5.5).

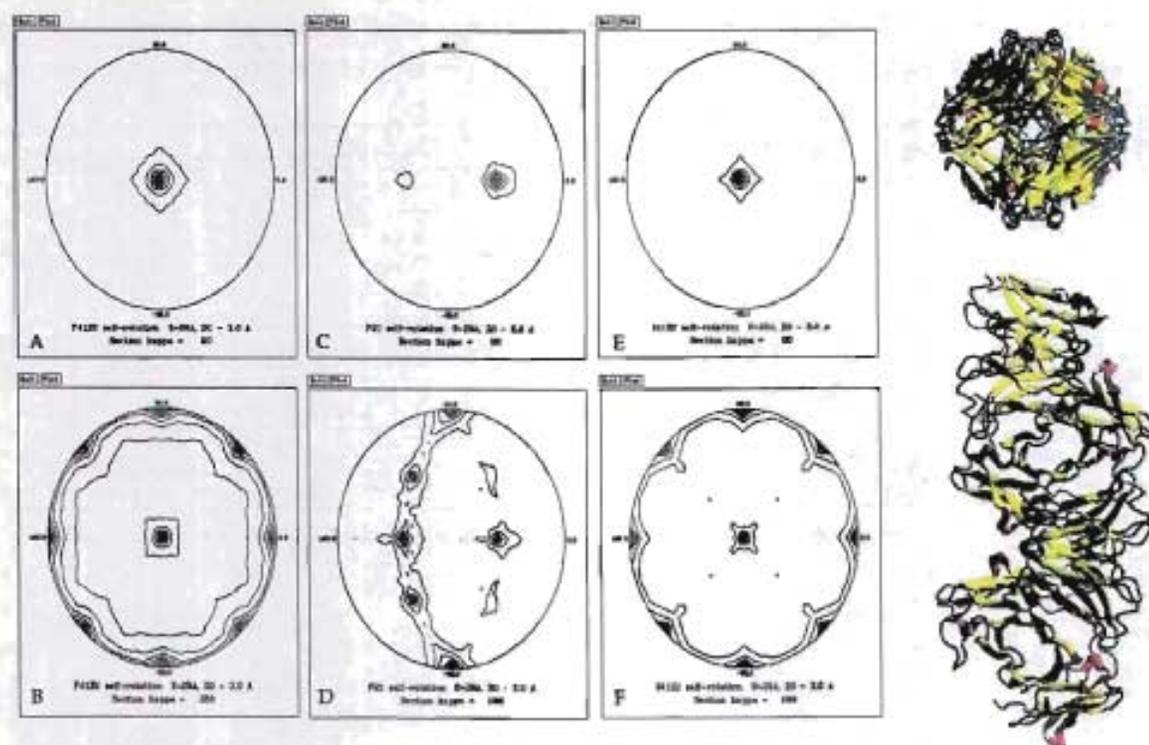


Figura 5.4. Autorotaciones a  $90^\circ$  (a, c y e) y  $180^\circ$  (b, d y f) de las reflexiones medidas de los cristales I, II y III en tres grupos espaciales distintos  $P4_122$  (a) (b),  $P2_1$  (c) (d) e  $I4_122$  (e) (f) respectivamente, que muestran un arreglo con simetría 4 en los datos de difracción (el pico al centro a más de  $5\sigma$  en a, c y e) y un arreglo de simetría 2 en los alrededores de la imagen polar (con picos con más de  $5\sigma$  cada  $45^\circ$  en b, d y f). En el caso de  $P2_1$  se observa al eje de simetría 4 desviado  $45^\circ$  del eje Z (c) y las simetrías 2 (d) son coherentes con esta desviación. A la derecha arriba se muestra la hélice cristalina en diagrama de su estructura secundaria vista en la dirección de su eje de simetría 4, abajo se muestra un paso de la hélice donde se observan las simetrías 2 correspondientes al arreglo dímérico.

Todo lo descrito anteriormente, indica que el arreglo helicoidal en los tres grupos espaciales es prácticamente

el mismo. En consecuencia surgió la siguiente hipótesis: ¿El arreglo helicoidal alude a algún estadio fibrilar

-como el protofilamento- del agregado amiloide que forman este tipo de proteínas?

En cristales de dominios variables de cadenas ligeras involucrados en padecimientos amiloidóticos es frecuente encontrar, arreglos helicoidales de distintas

características (Pokkuluri, *et al.*, 1999, Steinrauf, *et al.*, 1999) -como los que forman Wil y Bre (Figura 5.23) que se discuten en la sección 5.6. La hélice de V16aJL2 en todas sus formas cristalinas, es otra evidencia de ello (Figura 5.3 y 5.5).

P4<sub>1</sub>22

## Monómero A en C

The 111 atoms have an r.m.s. fit of 0.336

Laq > xyz(1) = 0.0108\*x+ 0.0091\*y+ -0.0407\*z+ 35.1282  
 Laq > xyz(2) = -0.9998\*x+ 0.0116\*y+ 0.0177\*z+ 36.3188  
 Laq > xyz(3) = 0.0182\*x+ 0.0405\*y+ 0.9990\*z+ 23.5113

## Monómero A en E

The 111 atoms have an r.m.s. fit of 0.001

Laq > xyz(1) = -1.0000\*x+ 0.0000\*y+ 0.0000\*z+ 70.9706  
 Laq > xyz(2) = 0.0000\*x+ -1.0000\*y+ 0.0000\*z+ -0.0004  
 Laq > xyz(3) = 0.0000\*x+ 0.0000\*y+ 1.0000\*z+ 47.3586

## Monómero A en G

Laq > The 111 atoms have an r.m.s. fit of 0.339

Laq > xyz(1) = -0.0108\*x+ -0.9991\*y+ -0.0407\*z+ 34.9588  
 Laq > xyz(2) = 0.9998\*x+ -0.0116\*y+ 0.0177\*z+ -33.7948  
 Laq > xyz(3) = -0.0181\*x+ -0.0405\*y+ 0.9990\*z+ 72.8128

P2<sub>1</sub>

## Monómero A en C

Laq > The 107 atoms have an r.m.s. fit of 0.314

Laq > xyz(1) = 0.5037\*x+ -0.7113\*y+ 0.4902\*z+ 34.8601  
 Laq > xyz(2) = 0.7314\*x+ 0.0402\*y+ -0.6801\*z+ 20.6473  
 Laq > xyz(3) = 0.4587\*x+ 0.7012\*y+ 0.5451\*z+ -67.4021

## Monómero A en E

Laq > The 107 atoms have an r.m.s. fit of 0.458

Laq > xyz(1) = 0.0213\*x+ -0.0180\*y+ 0.9996\*z+ -0.2533  
 Laq > xyz(2) = 0.0374\*x+ -0.9991\*y+ -0.0187\*z+ 85.9608  
 Laq > xyz(3) = 0.9991\*x+ 0.0378\*y+ -0.0206\*z+ -70.8008

## Monómero A en G

Laq > The 107 atoms have an r.m.s. fit of 0.437

Laq > xyz(1) = 0.5165\*x+ 0.7075\*y+ 0.4893\*z+ -88.4240  
 Laq > xyz(2) = -0.6089\*x+ -0.0179\*y+ 0.7423\*z+ 66.2066  
 Laq > xyz(3) = 0.0334\*x+ -0.7065\*y+ 0.4631\*z+ -33.6010

I4<sub>1</sub>22

## Monómero A en C

Laq > The 111 atoms have an r.m.s. fit of 0.001

Laq > xyz(1) = 0.0000\*x+ -1.0000\*y+ 0.0000\*z+ 36.6789  
 Laq > xyz(2) = 1.0000\*x+ 0.0000\*y+ 0.0000\*z+ -0.0020  
 Laq > xyz(3) = 0.0000\*x+ 0.0000\*y+ 1.0000\*z+ -23.2688

## Monómero A en E

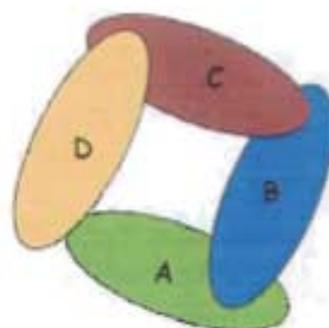
Laq > The 111 atoms have an r.m.s. fit of 0.001

Laq > xyz(1) = -1.0000\*x+ 0.0000\*y+ 0.0000\*z+ 36.5901  
 Laq > xyz(2) = 0.0000\*x+ -1.0000\*y+ 0.0000\*z+ 36.5783  
 Laq > xyz(3) = 0.0000\*x+ 0.0000\*y+ 1.0000\*z+ -46.5386

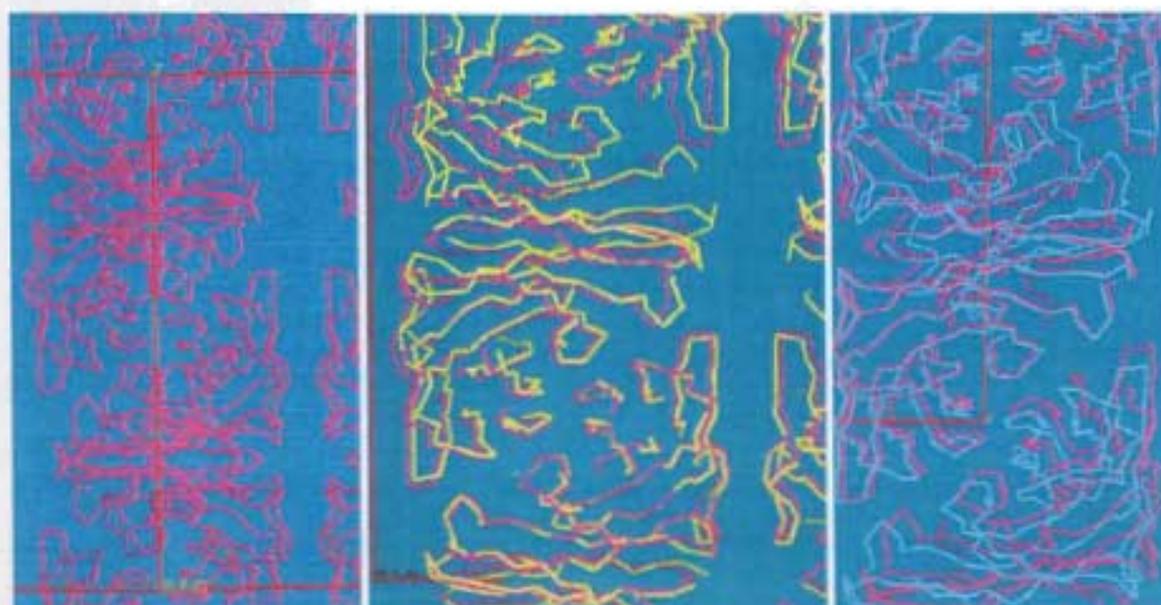
## Monómero A en G

Laq > The 111 atoms have an r.m.s. fit of 0.001

Laq > xyz(1) = 0.0000\*x+ 1.0000\*y+ 0.0000\*z+ -0.0012  
 Laq > xyz(2) = -1.0000\*x+ 0.0000\*y+ 0.0000\*z+ 36.5783  
 Laq > xyz(3) = 0.0000\*x+ 0.0000\*y+ 1.0000\*z+ -69.8073



Cuadro 5.1. Se considera el paso de la hélice formado por 4 dimeros (AB, CD, EF, GH), las matrices de rotación que se muestran son las necesarias para transformar el dimerio AB en CD, en EF y en GH. En los casos de P4<sub>1</sub>22 e I4<sub>1</sub>22 se observa que las rotaciones son exactas cuando se hace esta transformación que requiere 90°, 180° y 270° respectivamente. Sugiere que no hay una desviación de la hélice con respecto al eje por el que pasa y que se trata de rotaciones cristalográficas. En el caso de P2<sub>1</sub>, aunque se trata de simetrías no-cristalográficas, se observa una orientación casi exacta de los dimeros pero cada monómero difiere de la posición simétrica por alrededor de 3 grados.



A

B

C

Grupo Espacial	Paso de la hélice (Å)	diámetro (Å)	[acetato]
P2 <sub>1</sub>	96.87	50.40	1.4M
P4 <sub>1</sub> 22	95.12	50.18	1.8M
I4 <sub>1</sub> 22	93.10	51.69	2.0M

Figura 5.5. Se muestra el ancho de la hélice visto a lo largo de su paso en I4<sub>1</sub>22 (a); (b) P4<sub>1</sub>22 (amarillo) sobre puesta en I4<sub>1</sub>22 (rosa) y (c) P2<sub>1</sub> (azul) sobrepuesta en I4<sub>1</sub>22. Los valores de rms de desviación son de 1.5 (b) y 1.7 (c). Se observa que hay un desplazamiento de las posiciones dimericas en cada hélice con respecto a la de I4<sub>1</sub>22 que responde a una ligera expansión en el empaquetamiento de la fibra a medida que disminuyen las concentraciones de acetato de sodio en que crecieron los cristales en cada caso.

Pese a que se observa tal comportamiento, se le ha prestado poco interés debido a que se suele asumir que las condiciones cristalinas no permiten observar paralelismos con lo que sucede en el medio biológico (Rhodes, 2000); sin embargo, existen dos propiedades de los cristales que nos permiten hacer interpretaciones de importancia biológica. Una de ellas es que los cristales de proteína están altamente hidratados al presentar un contenido de solvente de un 40-80% (Finney, 1977). Esto permite que dentro del cristal se den, por ejemplo movimientos de

residuos o de dominios enteros que son medibles a partir de los parámetros de desplazamiento atómico (Schomaker, 1967, Rudino-Pinera, *et al.*, 2002, Chaudhry, *et al.*, 2004). La segunda propiedad es que, gracias al empaquetamiento cristalino se pueden explicar propiedades funcionales importantes (Dasgupta, *et al.*, 1997). Tal es el caso de los cristales de cadherinas (Shapiro, *et al.*, 1995), donde los contactos cristalinos simulan las adhesiones célula-célula requeridas en la formación del tejido durante el desarrollo embrionario.

¿Es posible entonces, que la propensión intrínseca a la formación de fibras conduzca a que, aún en un ambiente cristalino, el dominio variable se agregue en la forma en que suele hacerlo para formar las fibras patológicas? En el contexto, esbozado anteriormente, no es absurdo pensar que una proteína que suele formar agregados fibrilares *in vivo*, lo haga también en un cristal; máxime que el proceso de fibrillogénesis tiene muchos puntos en común al de la formación de cristales (Dobson, 2003, Khurana, *et al.*, 2003). La fibrillogénesis como la cristalización, comienzan por una fase de nucleación donde la proteína se asocia en agregados -gracias a interacciones intramoleculares no covalentes- hasta llegar a un estado nuclear crítico que promueve la fase de crecimiento. En el caso de proteínas globulares, tal proceso, ya sea en la formación de la fibra o de un cristal, puede verse sometido a los mismos factores (Louis, *et al.*, 2005).

En la estructura helicoidal de V $\lambda$ 6aJL2 se observan algunos elementos que concuerdan con algunas de las características -encontradas en los estudios realizados por difracción de fibras amiloideas (Sunde, *et al.*, 1997, Sunde and Blake, 1997) constituidas por distintas proteínas, en los estudios de microscopía de fuerza atómica (Ionescu-Zanetti, *et al.*, 1999, Khurana, *et al.*, 2003, Khurana, *et al.*, 2003) y en los estudios de microscopía electrónica (Shirahama and Cohen, 1967, Shirahama, *et al.*, 1973, Serpell, *et al.*, 2000)- que, a *grosso modo*, describen las propiedades nucleares de los protofilamentos amiloideos. Entre estas características están las dimensiones del diámetro (5nm) de la hélice y la longitud de la repetición del motivo helicoidal (alrededor de 100Å) (Figura 5.5).

En los distintos cristales, la hélice de V $\lambda$ 6aJL2 presenta una longitud de paso de entre 93 y 97 Å (Figura 5.5). Según el modelo general que Sunde plantea para las estructuras amiloideas, a partir de resultados de difracción de fibras (Sunde, *et al.*, 1997), la repetición de los motivos constitutivos de la fibra se da a lo largo de una longitud de paso de aproximadamente 115 Å.

Los estudios realizados por microscopía electrónica (Sunde and Blake, 1997, Jimenez, *et al.*, 1999, Serpell, *et al.*, 2000) y por microscopía de fuerza atómica Zhu, 2004 #32)(Ionescu-Zanetti, *et al.*, 1999, Khurana, *et al.*, 2003), indican que los protofilamentos de dominios variables tienen entre 25-40 Å de diámetro. Estas dimensiones resultan ser menores a las que se observan en las hélices cristalinas de V $\lambda$ 6aJL2 (de aproximadamente 50Å) (Figura 5.5), aunque ya se han reportado casos de protofilamentos con estas dimensiones (Stevens, *et al.*, 1995). Por otro lado, algunas de las imágenes de microscopía electrónica de fibras de V $\lambda$ 6aJL2 (realizadas por la Dra Rosana Sánchez) parecen corresponder a un diámetro de aproximadamente 5 nm.

A la luz de las características descritas de la hélice cristalina que forma V $\lambda$ 6aJL2, surgieron otras preguntas: ¿En la formación del arreglo cristalino están involucrados los residuos que se han sugerido pueden favorecer la formación de fibras amiloideas, o aquellos que son característicos de la línea germinal? ¿La naturaleza del dímero V $\lambda$ V $\lambda$  influye en el arreglo helicoidal?

Es interesante señalar que el dominio variable mutante V $\lambda$ 6aJL2-H8P no presenta un arreglo helicoidal en su cristal, y en los experimentos de fibrillogénesis *in vitro* (Del Pozo, *et al.*, en preparación) muestra que la mutación

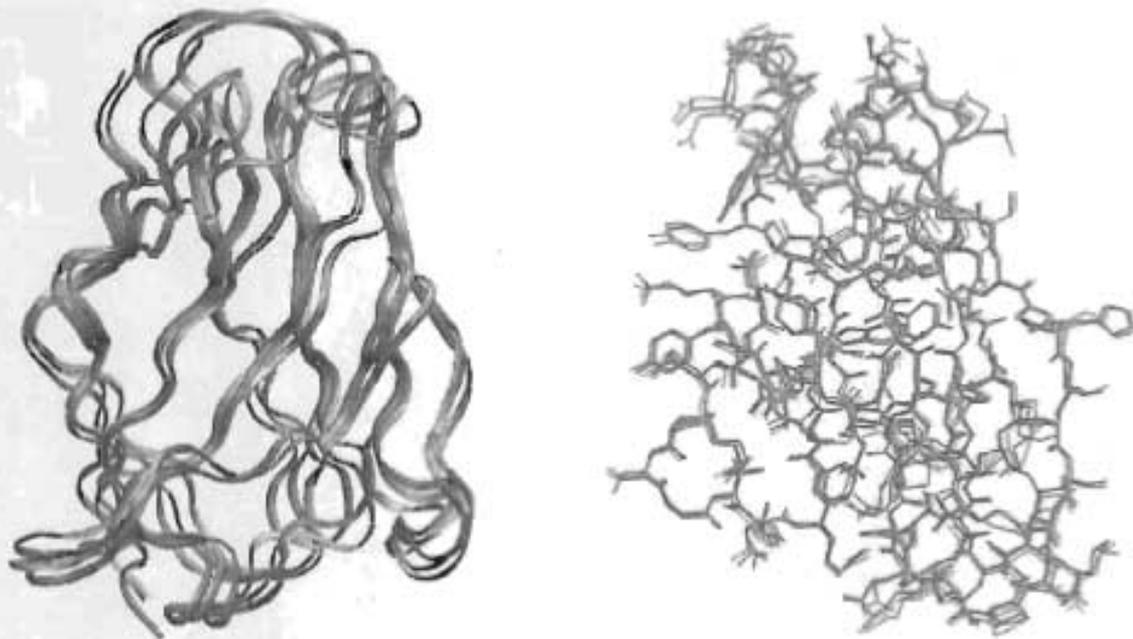
HSP disminuye drásticamente la formación de fibras.

Para tratar de responder las interrogantes previamente planteadas, es necesario describir los elementos de estructura terciaria y cuaternaria del dominio variable.

#### 5.4 Estructura monomérica del dominio variable V $\lambda$ 6aJL2 y su mutante V $\lambda$ 6aJL2-H8P.

Se comparó la estructura del monómero de V $\lambda$ 6aJL2 en sus distintos grupos espaciales incluyendo los distintos

monómeros de los grupos espaciales de bajas simetrías y los monómeros que constituyen la unidad asimétrica en el cristal de V $\lambda$ 6aJL2-H8P (Figura 5.6). Al realizar alineamientos estructurales de dominios variables por lo general se excluyen del cálculo de sobreposición los CDRs, por ser las regiones de mayor variabilidad tanto en longitud como en secuencia entre los V $\lambda$ s.



Valores rms de desviación en la sobreposición de cada monómero de V $\lambda$ 6a contra el monómero A de P4:22 (A)								
	monA p21	monB p21	monC p21	monD p21	monE p21	monF p21	monG p21	monH p21
monA P4:22	0.325	0.433	0.429	0.54	0.413	0.517	0.416	0.601
	monB P4:22	monA H8P	monB H8P	monC H8P	monD H8P	monA W1	monA J1c	
monA P4:22	0.39	0.61	0.415	0.523	0.34	0.48	1.389	1.309

Figura 5.6 A la derecha se muestra sobre-posición realizada con el programa O, en diagrama de residuos, de V $\lambda$ 6aJL2 en tres grupos espaciales (H4:22 (rojo), P2:1 (azul) y P4:22 (cian)). A la izquierda se muestra. Los valores de rms de desviación de la sobre-posición se muestran en la tabla inferior y son con respecto al monómero A de P4:22. A la izquierda en diagrama de listones V $\lambda$ 6aJL2 (fila), W1 (morado) y J1c (naranja).

monómeros de los grupos espaciales de bajas simetrías y los monómeros que constituyen la unidad asimétrica en el cristal de V $\lambda$ 6aJL2-H8P (Figura 5.6). Al realizar alineamientos estructurales de dominios variables por lo general se excluyen del cálculo de sobreposición los CDRs, por ser las regiones de mayor variabilidad tanto en longitud como en secuencia entre los V $\lambda$ s.

Las diferencias entre los distintos monómeros se restringieron a las regiones antes mencionadas y a pequeños cambios en las distancias de interacción de algunos residuos, por lo que en todos los grupos espaciales el dominio variable V $\lambda$ 6aJL2 y su mutante H8P mostró una estructura congruente.

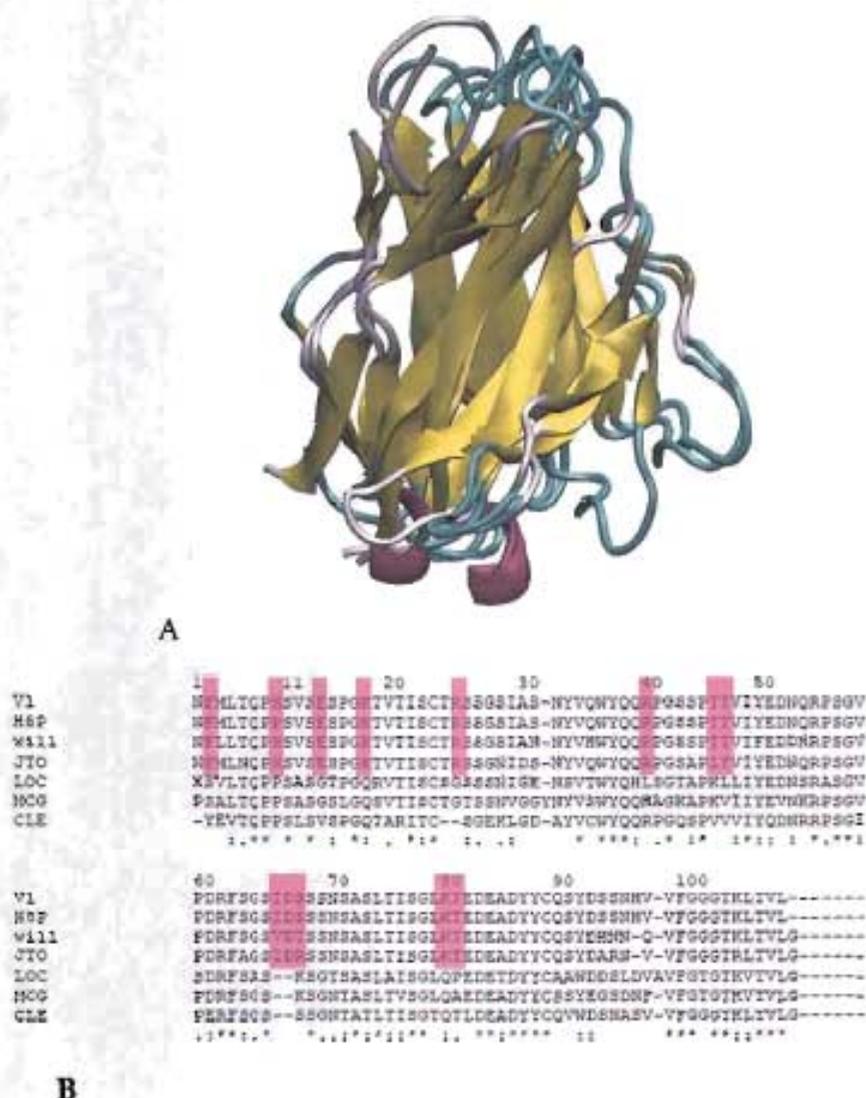


Figura 5.7. Muestra alineamiento de estructural de V $\lambda$ 6aJL2 contra Loc y Cle (A) y de secuencia (B) de los distintos dominios variables analizados. (A) Los valores de rms de desviación son 1.5 y 1.6 de Loc y Cle respectivamente; sobreposición realizada con el programa O. No se muestran en la figura Mcg, Wil ni J10, pero sus valores de rms de desviación fueron 1.4, 1.3 y 1.38 respectivamente. (B) Alineamiento múltiple realizado con Tcoffee, se sobresalta en rosa los residuos característicos de la línea germinal  $\lambda$ 6a. Al realizar con BLASTP 2.2.4 el alineamiento pareado de cada una de ellas con V $\lambda$ 6aJL2, los valores de identidad fueron: con Wil 89%, con J10 83%, con Loc 55%, con Mcg 61% y con Cle 61%.

En aras de evaluar la similitud estructural del dominio V $\lambda$ 6aJL2 con los dominios variables de otras cadenas ligeras, se realizó un análisis

comparativo por sobre-posición con las estructura cristalográficas de los V $\lambda$ s de

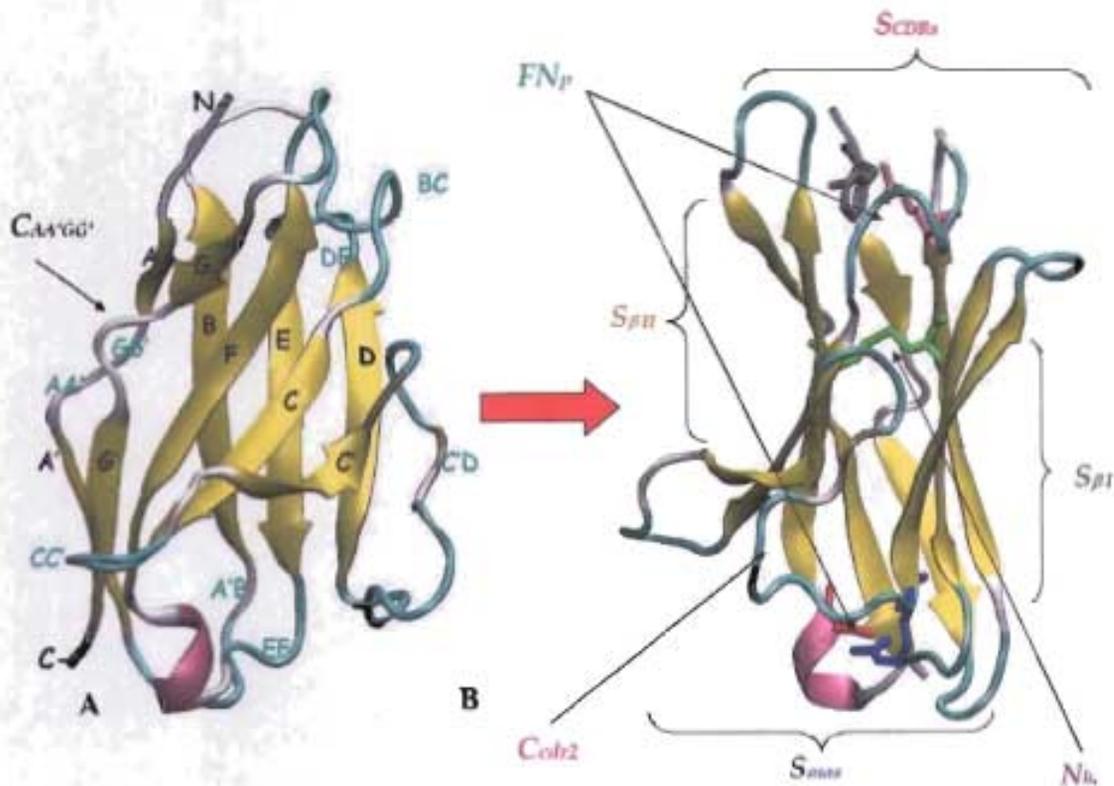


Figura 5.8. Representación de la estructura del dominio variable V $\lambda$ 6aJL2. En (A) se especifican las cadenas  $\beta$  que lo conforman; así como las regiones inter-cadenas: las cadenas  $\beta$  A, B, E y D forman la hoja  $\beta$  II y las cadenas A', C, C', F, G y G' la hoja  $\beta$  I. La nomenclatura de las hojas  $\beta$  corresponde a la de Gelfand y Kister (Gelfand and Kister, 1995). En (B) se observa una vista lateral del dominio variable de la izquierda. Se esquematiza la división por zonas que ayudará a seguir el razonamiento de los resultados:  $S_{\beta II}$  = superficie de contacto entre dímeros, que comprende los residuos de la hoja  $\beta$  II, y algunos adyacentes de las asas CC',  $S_{\beta III}$  = superficie relacionada que comprende los CDRs1 y 3, residuos del asa DE y del N-ter,  $S_{\beta I}$  = superficie expuesta de la hoja  $\beta$  I, comprende los residuos de esta hoja  $\beta$ , salvo las cadenas G y G',  $S_{\beta IV}$  = superficie comprendida por los asas de unión entre cadenas  $\beta$  al lado opuesto de los CDRs, comprende los residuos de las asas AB, CC', EF, y del C-ter,  $C_{\beta II}$  = a residuos de todo ese asa que se encuentran a un costado del  $\beta$ -sandwich,  $C_{\beta III}$  = costado correspondiente al empaquetamiento del  $\beta$ -sandwich por las cadenas A, A' y G, G',  $FN_p$  = fracción nuclear polar y  $N_h$  = Núcleo hidrofóbico del dominio. Se muestra también el empaquetamiento de las hojas  $\beta$  favorecido por el puente disulfuro (verde), la interacción en stacking de la Phe2 (gris) y la Arg25 (rosa); y el puente salino de la Arg82 (azul) y el Asp61 (rojo).

las cadenas ligeras Loc de la línea germinal  $\lambda$ 1, Mcg de la  $\lambda$ 2, Cle de la  $\lambda$ 3 y Wil y Jto de la  $\lambda$ 6a<sup>20</sup> (Figura 5.7.a); así como con el dominio variable de la cadena ligera  $\kappa$  Bre1. En este caso,

además del N y C-terminal y los CDRs 1 y 3 se eliminaron también del cálculo de sobre-posición, el CDR2 y la región de la inserción 66a y 66b, por ser propia de la línea germinal.

Se observó que la estructura de V $\lambda$ 6aJL2 muestra grandes similitudes con las estructuras de otros dominios

<sup>20</sup> Los códigos PDB de cada una de estas estructuras se especifican en la sección 4.3.

variables y muestra un plegamiento congruente con la estructura en  $\beta$ -sandwich característica de los dominios variables de inmunoglobulinas (Figura 5.6-8).

Las diferencias más notorias entre los dominios variables de las distintas líneas germinales se encontraron en los CDRs, tanto en sus longitudes como en sus conformaciones.

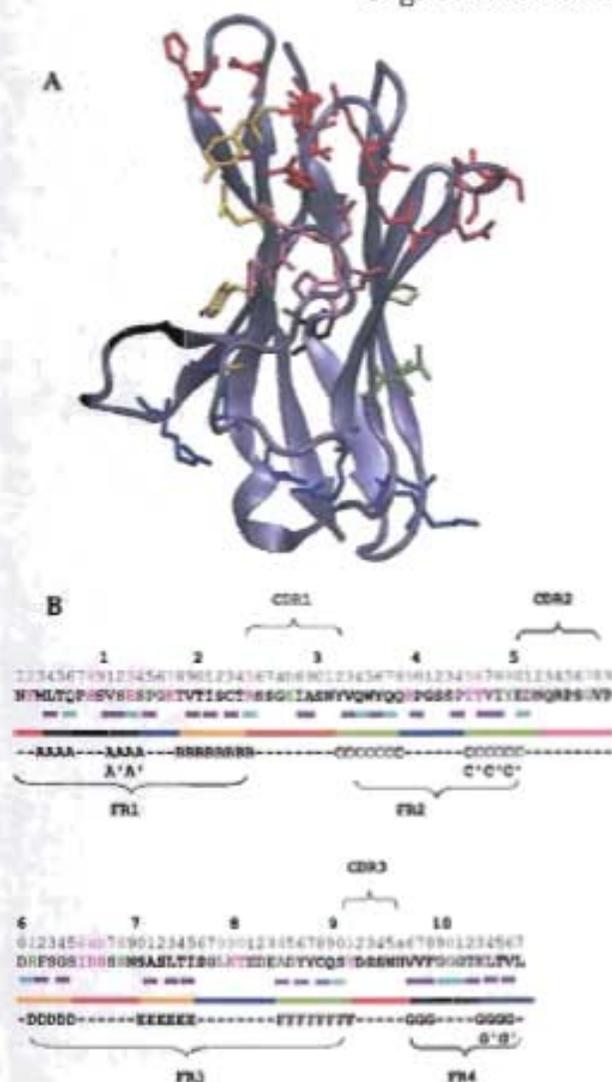


Figura 5.9. (A) Muestra de acuerdo al código de colores para cada zona, especificado en la figura 5.2, los enlaces que estabilizan cada zona y por lo tanto el dominio. (B) Se muestra la estructura primaria de V $\lambda$ 6JL2, especificando que residuos pertenecen a cada una de las zonas siguiendo el mismo código de color. Se especifica también los residuos que conforman cada cadena b, así como los pertenecientes a cada CDR y FR. En rosa se remarcan los residuos identificados como característicos de la línea germinal y en verde, aquellos que se han asociado con la tendencia a la deposición amiloidea.

A pesar de ellas, el arreglo intra-dominio de las cadenas  $\beta$  y la curvatura del dominio variable se mantiene. V $\lambda$ 6aJL2 y V $\lambda$ 6aJL2-H8P presentan el giro particular que toman las estructuras  $\beta$  en su conformación de más baja

energía (Pauling and Corey, 1951, Chothia, 1973), como se aprecia en la figura 5.8. La congruencia de ciertas posiciones de C $\alpha$ , muestran la alta homología estructural de los dominios variables analizados (Figura 5.7 y 5.8a).

Debido a que el dominio V $\lambda$ 6aJL2 y su mutante V $\lambda$ 6aJL2-H8P no muestran diferencias significativas, a lo largo de esta sección y la siguiente nos referiremos a las propiedades estructurales del dominio V $\lambda$ 6aJL2, pero dejando implícito que las mismas se aplican al dominio mutante.

En aras de facilitar la comprensión de los resultados, se ha hecho una división del dominio V $\lambda$ 6JL2 en zonas, las cuales se encuentran especificadas en las figuras 5.8b y 5.9. La composición de las cadenas  $\beta$  también se especifica en la figura 5.8a.

Enlaces que estabilizan el dominio V $\lambda$ 6aJL2					
S <sub>CDR3</sub>			S <sub>ASAS</sub>		
CDR1	Asn31 Arg25	p.hidrógeno	A/B	Glu13 Lys17	p.hidrógeno
CDR3	Asp92 His95a	p.salino	CC'	Gln37 Arg39	p.hidrógeno
DE	Asp66 Ser67	p.hidrógeno	<i>S<math>\beta</math>II</i> S <sub>ASAS</sub>		
	Asp66 Ser68	p.hidrógeno		Arg61 Asp82	p.salino
	CDR1 Nter		<i>S<math>\beta</math>II</i>		
	Ser22 Met3	p.hidrógeno	F	Asp85 Tyr87	p.hidrógeno
	Arg25 Phe2	stacking	F	Gln89 Tyr91	p.hidrógeno
	CDR1 CDR3		<i>S<math>\beta</math>II</i> C <sub>AA'GG'</sub>		
	Tyr32 Ser90	p.hidrógeno		F-Glu83 G'-Lys103	p.hidrógeno
	CDR1 DE			F-Glu83 G'-Thr105	p.hidrógeno
	Ile28 Ile66	int.hidrofóbica	<i>S<math>\beta</math>I</i>		
	CDR1 CDR2		B-E	Ser22 Ser72	p.hidrógeno
	Tyr32 Glu50	p.hidrógeno	B-E	Thr20 Thr74	p.hidrógeno
<i>C<sub>ADR</sub></i>			<i>FN<sub>p</sub></i>		
	Asn52 Gln53	p.hidrógeno		Arg61 Asp82	p.salino
	Tyr49 Glu50	p.hidrógeno		Tyr87 Arg39	p.hidrógeno
				Phe2 Arg25	stacking
<i>N<sub>h</sub></i>			<i>FN<sub>p</sub></i>		
Cys23	Cys88	covalente	De21	Pro7	int.hidrofóbica
Ile21	Val11	int.hidrofóbica	Val11	Val19	int.hidrofóbica
Val33	Leu4	int.hidrofóbica	Val197	Leu4	int.hidrofóbica
Ile75	Phe62	int.hidrofóbica			

Cuadro 5.2. Relación de las interacciones que estabilizan el dominio variable V $\lambda$ 6JL2 y V $\lambda$ 6JL2-H8P según la zona a la que pertenecen los residuos involucrados. La separación por zonas corresponde a la especificada en la figura 5.8 y 5.9.

El núcleo del dominio en V $\lambda$ 6JL2 y V $\lambda$ 6JL2-H8P cuenta con interacciones tanto polares (región FN<sub>p</sub>) como hidrofóbicas (región N<sub>h</sub>) que se dan debido al entrelazamiento entre el par de hojas  $\beta$  que estabiliza el plegamiento de la estructura en  $\beta$ -sandwich y constituye por ello el núcleo del dominio V $\lambda$ 6aJL2 (Figura 5.8b). En la figura 5.9a se especifican los residuos que se encuentran en cada una de las regiones en un código de color. Algunas

de las interacciones que participan en esta región y que contribuyen a estabilizar el dominio V<sub>L</sub> (Cuadro 5.2), se encuentran también en Wil y Jto. Los residuos que Chothia, *et al* (Chothia, *et al.*, 1998) identificó como constituyentes invariables del núcleo de los dominios V, se encuentran en V $\lambda$ 6aJL2.

El núcleo del dominio se estabiliza también por varias interacciones: en primer lugar, el puente di-sulfuro formado por la Cys23 (de la

cadena  $\beta$  B) y la Cys88 (de la cadena  $\beta$  F) (Figura 5.8b y Cuadro 5.2) que une las dos hojas  $\beta$  II y I respectivamente, en la región  $N_h$ , donde también se encuentran interacciones hidrofóbicas en las que participa el Trp35 y algunos otros residuos, especificados en el cuadro 5.2, que conforman el interior del  $\beta$ -sandwich. En la región  $FN_p$  adyacente a las regiones  $S_{loop}$  y  $S_{\beta II}$  se forma un

punto salino entre la Arg61 y el Asp82, que estabiliza el dominio estructural. En la región  $FN_p$  adyacente a  $S_{CDRs}$  se da la interacción en *stacking*, característica de las  $\lambda 6a$  (Pokkuluri, *et al.*, 1999), entre la Phe2 y la Arg25 (Figura 5.8). En la figura 5.10 se aprecia el ajuste de estas regiones con su mapa de densidad electrónica.

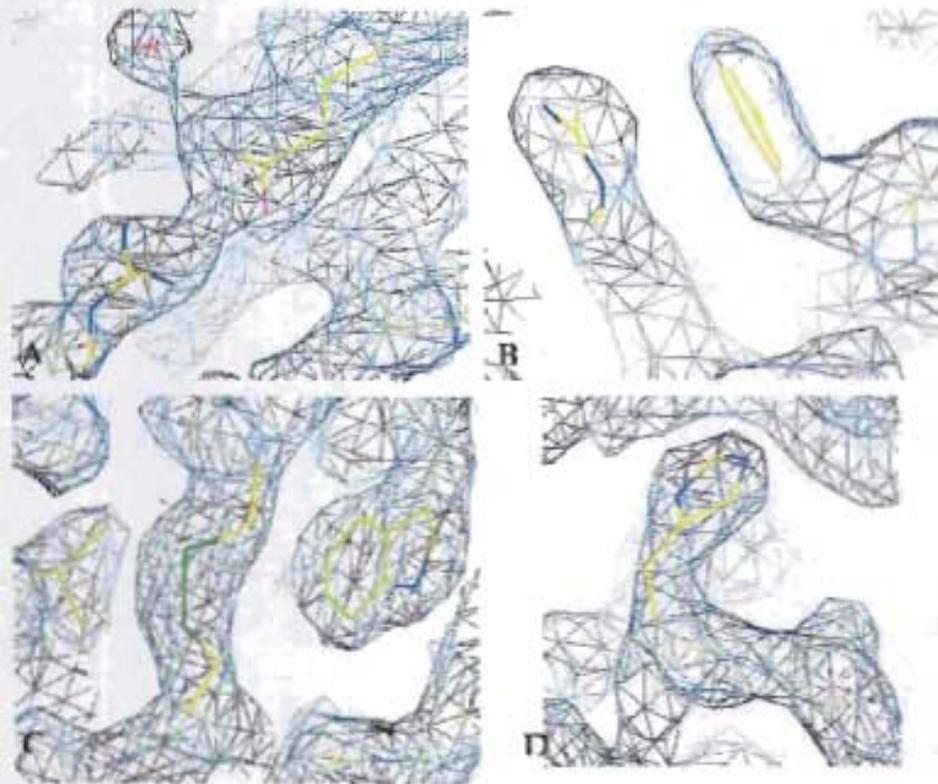


Figura 5.10 Muestra modelo en su mapa de densidad electrónica. (a) El puente salino entre la Arg61 y el Asp82; (b) el *stacking* entre la Phe2 y la Arg25; (c) el puente di-sulfuro entre Cys23 y Cys88 (d) la His8.

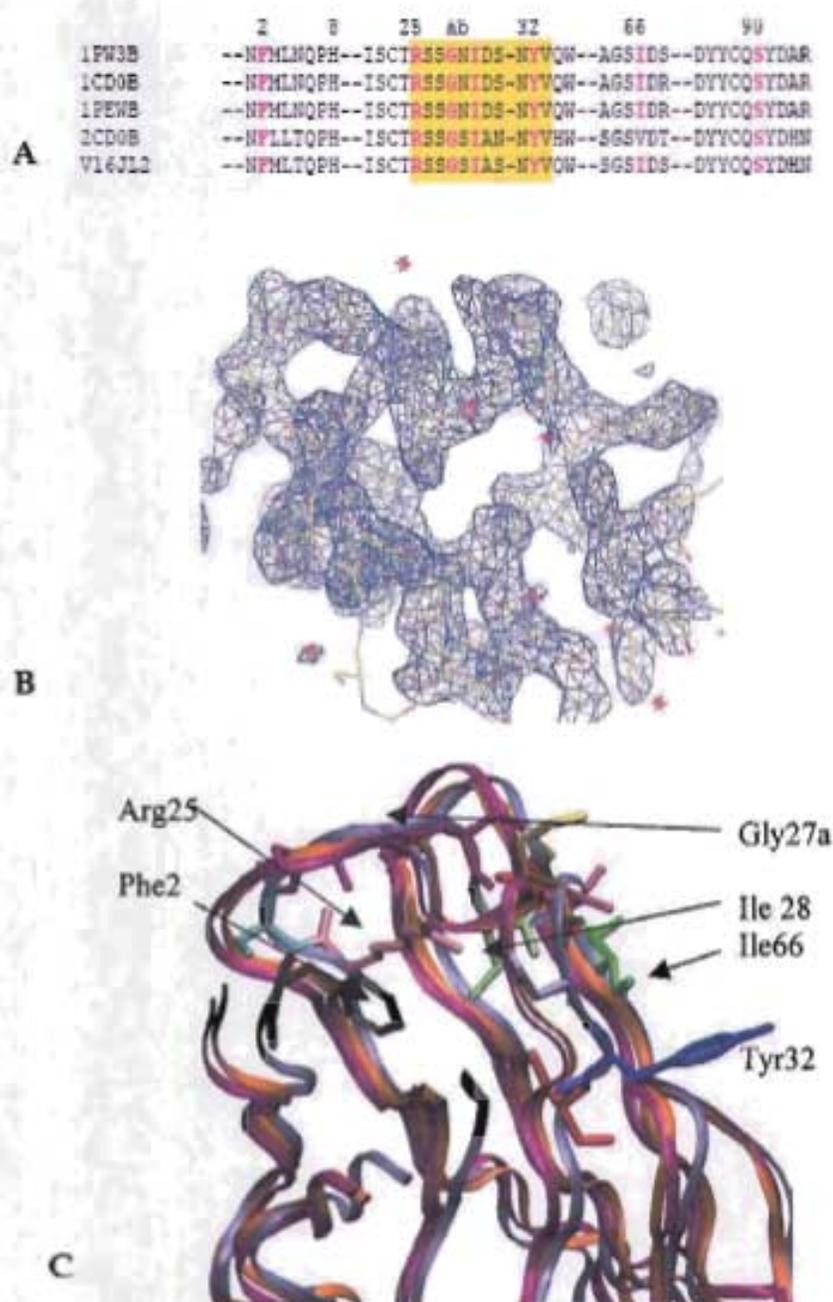
Se ha planteado que los puentes de hidrógeno existentes en la superficie de los dominios  $V_L$  contribuyen fuertemente a su estabilización (Raffen, *et al.*, 1999, Pokkuluri, *et al.*, 2002). En la superficie del dominio  $V\lambda 6aJL2$  se observan algunas interacciones de este tipo que contribuyen a estabilizar el dominio entero -al formarse enlaces que

conectan distintas zonas- o sus regiones (cuadro 5.2 y Figura 5.9a).

En Jto, la Lys79, un residuo distintivo de la línea germinal  $\lambda 6a$  forma un puente salino con el Glu81, interacción que en  $V\lambda 6JL2$  no se presenta debido a un cambio en la conformación de la lisina; sin embargo, ocurre una interacción compensatoria

	2	25	ab	32	66	90	92	95a
VIL	-NEMLTQPH--ISCTRSSGSIASNYVQW--SGSIDS--DYQCQSYDSSN--HVV							
gb_AF462671_1	-NEMLTQPH--ISCTRSSGSIASNYVQW--SGSIDS--DYQCQSFENIT--HVV							
gb_AF462687_1	-FFRLTQPH--ISCTRSSGSIASNYVQW--SGSIDS--DYQCQSFDSST--HVV							
gb_HSA578357_1	-QSVLTQPH--ISCTRSSGSIASNYVQW--SGSIDS--DYQCQSYDSSS--VWV							
gb_HSA496503_1	-NEMLTQPH--ISCTRSSGSIASNYVQW--SGSIDS--DYQCQSYDSSN--LWV							
gb_AF124182_1	-NEMLTQPH--ISCTRSSGSIASNYVQW--SGSIDS--DYQCQSYDTNI--HWV							
gb_AF115359_1	-DEMLTQPH--ISCTRSSGSIASNYVQW--SGSIDS--DYQCQSYDTNI--HWV							
gb_AF054653_1	-NEMLTQPH--ISCTRSSGSIASNYVQW--SGSIDT--DYQCQSYDGSN--HWV							
gb_AF018265_1	-NEMLTQPH--ISCTRSSGSIASNYVQW--SGSIDT--DYQCQSYDSEN--HWV							
gb_HSIGVLCXX_1	-NEMLTQPH--ISCTRSSGSIASNYVQW--SGSIDN--DYQCQSYDSSK--LWV							
prf_3009325A	-NEMLTQPH--ISCTRSSGSIASNYVQW--SGSIDS--DYQCQSYDSSN--HVV							
gb_HSA276098_1	-NEMLTQPH--ISCTRSSGSIASNYVQW--SGSIDS--DYQCQSYDSSN--HVV							
gb_AB064195_1	ANEMLTQPH--ISCTRSSGSIASNYVQW--SGSIDS--DYQCQSYDSSN--HVV							
gb_AF124188_1	-NEMLTQPH--ISCTRSSGSIASNYVQW--SGSIDS--DYQCQSYDGSN--HVI							
gb_AF054654_1	-DEMLTQPH--ISCTRSSGSIASNYVQW--SGSIDS--DYQCQSYDGSN--HVI							
gb_AF320841_1	-NEMLTQPH--ISCTRSSGSIASNYVQW--SGSIDS--DYQCQSYDGSN--HVI							
gb_AF063721_1	-NEMLTQPH--ISCTRSSGSIASNYVQW--SGSIDR--DYQCQSYDSTN--HVI							
gb_AB064190_1	ANEMLTQPH--ISCTRSSGSIASNYVQW--SGSIDS--DYQCQSYDSSD--HGA							
gb_AB064191_1	ANEMLTQPH--ISCTRSSGSIASNYVQW--SGSIDS--DYQCQSYDSAY--HWV							
gb_AB064234_1	ANEMLTQPH--ISCTRSSGSIASNYVQW--SGSIDS--DYQCQSYDSSN--HVV							
gb_AB064194_1	ANEMLTQPH--ISCTRSSGSIASNYVQW--SGSIDS--DYQCQSYDSSN--HVV							
gb_AB064229_1	ANEMLTQPH--ISCTRSSGSIASNYVQW--SGSIDS--DYQCQSYDSSN--HWV							
gb_HSIGVLC95_1	-NEMLTQPH--ISCTRSSGSIASNYVQW--SGSIDS--DYQCQSYDSSN--QV							
gb_AB064232_1	ANEMLTQPH--ISCTRSSGSIASNYVQW--SGSIDS--DYQCQSYDSSN--QV							
gb_HSIGVLC94_1	-DEMLTQPH--ISCTRSSGSIASNYVQW--SGSIDS--DYQCQSYDSSN--QV							
gb_AB064193_1	ANEMLTQPH--ISCTRSSGSIASNYVQW--SGSIDS--DYQCQSYDSSN--QV							
gb_AB064196_1	ANEMLTQPH--ISCTRSSGSIASNYVQW--SGSIDS--DYQCQSYDSSN--QV							
gb_HSIGVLC96_1	-NEMLTQPH--ISCTRSSGSIASNYVQW--SGSIDS--DYQCQSYDSSI--WV							
gb_AB064231_1	ANEMLTQPH--ISCTRSSGSIASNYVQW--SGSIDS--DYQCQSYDSSN--WV							
gb_AB064235_1	ANEMLTQPH--ISCTRSSGSIASNYVQW--SGSIDS--DYQCQSYDSSN--WV							
gb_HSIGVLC99_1	-NEMLTQPH--ISCTRSSGSIASNYVQW--SGSIDS--DYQCQSYDSTR--WV							
gb_AF320839_1	-NEMLTQPH--ISCTRSSGSIASNYVQW--SGSIDS--DYQCQSYDTNN--VV							
gb_HSIGVLC98_1	-NEMLTQPH--ISCTRSSGSIASNYVQW--SGSIDS--DYQCQSYHNN--VV							
gb_AF124184_1	-NEMLTQPH--ISCTRSSGSIASNYVQW--SGSIDT--DYQCQSYDSSN--VI							
gb_AF054652_1	-DEMLTQPH--ISCTRSSGSIASNYVQW--SGSIDT--DYQCQSYDSSN--VI							
gb_AF462661_1	-NEMLTQPH--ISCTRSSGSIASNYVQW--SGSIDS--DYQCQSYDSSN--WV							
gb_AF115356_1	-DEMLTQPH--ISCTRSSGSIASNYVQW--SGSIDS--DYQCQSYDSSK--VV							
gb_AY190823_1	ANEMLTQPH--ISCTRSSGSIASNYVQW--SGSIDS--DYQCQSYDSSN--WV							
gb_HSA241410_1	-NEMLTQPH--ISCTRSSGSIASNYVQW--SGSIDS--DYCHSYDSSN--VV							
gb_HSU76686_1	-NEMLTQPH--ISCTRSSGSIASNYVQW--SGSIDS--DYQCQSYDSSN--VV							
gb_AF121762_1	-NEMLTQPH--ISCTRSSGSIASNYVQW--SGSIDS--DYQCQSYDSSS--VV							
gb_AF320830_1	-NEMLTQPH--ISCTRSSGSIASNYVQW--SGSIDS--DYQCQSYDSSN--VV							
gb_HSA578358_1	-NEMLTQPH--ISCTRSSGSIASNYVQW--SGSVDS--DYQCQSYDTNT--QV							
gbu_AY998673_1	--EMLTQPH--ISCTRSSGSIASNYVQW--SGSIDS--DYQCQSYDSSN--RV							
gb_HSVJ637L_1	--ELTQPH--ISCTRSSGSIASNYVQW--SGSIDS--DYQCQSYDSSN--RV							
tr_Q96JD0_HUMAN	-NEMLTQPH--ISCTRSSGSIASNYVQW--SGSIDS--DYQCQSYDSSI--HVI							
gb_AF063699_1	-NEMLTQPH--ISCTRSSGSIASNYVQW--SGSIDS--DYQCQSYDSSN--HVV							
gb_AB064028_1	-NEMLTQPH--ISCTRSSGSIASNYVQW--SGSIDS--DYQCQSYDSSN--LWV							
gb_AF462678_1	-NEMLTQPH--ISCTRSSGSIASNYVQW--SGSVDS--DYQCQSYDSSN--HVI							
gb_AF063733_1	-NEMLTQPH--ISCTRSSGSIASNYVQW--SGSIDS--DYQCQSYDIRN--FAV							
tr_Q96JD1_HUMAN	-NEMLTQPH--ISCTRSSGSIASNYVQW--SGSIDS--DYQCQSYDSSN--VAL							

Figura 5.11. Alineamiento múltiple de 50 secuencias de cadenas ligeras  $\lambda$  con ClustalW realizado con una búsqueda de secuencias homólogas de V<sub>H</sub>6aJL2 con BLASTP contra la base de datos de secuencias no redundantes usando el servidor del KEGG (Kioto Enciclopedia of Genes and Genomes), con un valor de corte de  $e^{-10^{00}}$ . Se observa que en la región correspondiente al CDR1 (amarillo) la secuencia se conserva en varias de ellas, así como las posiciones de residuos asociadas a este grupo y los residuos esenciales para la conformación del asa CDR1 (rosa). En oliva se muestra la secuencia del CDR3 y en azul están marcados los residuos esenciales para la conformación de este asa. Remarcadas con un cuadro naranja están las que pertenecen a la familia  $\lambda 6$  y en cuadro azul las de la familia  $\lambda 1$ . Algunas de las secuencias no estaban anotadas pero su alineamiento permitió identificar su equivalencia.



**Figura 5.12.** Estructura primaria y tridimensional del CDR1. (a) Muestra un alineamiento realizado con Tcoffee. La búsqueda de V16aJL2 se realizó con BLASTP contra la base de datos de las secuencias de dominios variables cuya estructura tridimensional se conoce y se encuentra depositada en el *Protein Data Bank* (PDB): Jto (1CD0), Wil (2CD0), (1PW3), (1PEW) y la estructura de V16aJL2. En rosa están resaltados los residuos esenciales para mantener la geometría del CDR1. (b) Muestra el mapa de densidad electrónica del CDR1. (c) Muestra la conformación que adquiere el CDR1 en las tres estructuras de dominios variables  $\lambda 6$ , Wil, Jto y V16aJL2. Se muestra en lila el dominio en V16aJL2 y en la región del CDR1 vemos la superposición de Jto (naranja) y Wil (morado) en esa región. Se observan en rosa la Arg25, y en negro la Phe2, en verde las Ile28 y 66, en gris la Asn31, en amarillo la Ser90 y la Tyr32 en azul.

entre la Lys103 y la Gln83, conectando las regiones  $S_{HIV}$   $CAAYGG$ .

Otro enlace considerado como estabilizador en Jto se forma entre el Asp29 y la Arg66b. En V16JL2 se pierde

esta interacción ya que la posición 29 es una alanina y la 66b una serina. Por otro lado, se había propuesto (Pokkuluri, *et al.*, 1999) que la inserción 66ab ampliaba la superficie de contacto con el CDR1 (ver sección 2.2.4); sin embargo, en V $\lambda$ 6JL2, se observa que el asa DE (65-69) en la región S<sub>CDRs</sub> se extiende hacia el solvente adquiriendo una conformación que aleja al residuo 66b de cualquier posible contacto con el CDR1 y sólo es posible que estas regiones se conecten hidrofóticamente por medio de la Ile66 (como se describe más adelante (Figura 5.12)). En la región C<sub>MA'GG'</sub> no se observa ninguna formación de enlaces superficiales que ayuden a la estabilización del plegamiento. En la zona hay dos protuberancias: una correspondiente a la His8 en la región AA' (Figura 5.8) que se extiende hacia la superficie del dominio V<sub>L</sub>. Tanto en Wil como en Jto, la dirección de la His es a 90° de la orientación de la prolina de las  $\lambda$ 1 y  $\lambda$ 2 y de H8P, orientación que toma la His8 en V $\lambda$ 6aJL2. La segunda protuberancia de la zona corresponde al bulbo- $\beta$  de glicinas (99-101) en la región GG'. (Figura 5.8) El bulbo- $\beta$  es idéntico en las  $\lambda$ 6 y las  $\lambda$ 3, y se extiende a la superficie del dominio propiciando la segmentación de la cadena  $\beta$  G en G y G'. Como se vió en la sección 2.2.4, se ha sugerido que ambas regiones constituyen motivos que podrían impedir la agregación de las estructuras  $\beta$  (Richardson and Richardson, 2002) (Del Pozo, *et al.*, en revisión).

Los CDRs como ya se mencionó representan regiones de alta variabilidad y sus características son importantes en la definición del dominio variable. En el caso de V $\lambda$ 6JL2, el CDR2 adopta la forma canónica tipo 1 descrita para esta región en las cadenas ligeras  $\lambda$  (Al-Lazikani, *et al.*, 1997), pero el CDR1 y el CDR3 adoptan una

conformación distinta a las estructuras antes descritas (Al-Lazikani, *et al.*, 1997, Chothia, *et al.*, 1998).

El CDR1 en las  $\lambda$ 6a, está formado por la secuencia 25-RSSGSIASNYV-33 donde tanto la Arg25 como la Asn31 estabilizan la conformación del mismo, la primera al formar el *stacking* con la Phe2 y la segunda uniéndose por puente de hidrógeno a la Arg25. La interacción que se da entre la posición 32 y la Ser90 conecta el CDR1 con el CDR3. La presencia del aminoácido hidrofóbico Ile28 también permite que el CDR1 adquiera una geometría distinta al orientarse al interior y mantener contactos hidrofóbicos con la Ile66 del asa DE. Un residuo esencial en la estructura del asa es la Gly27a ya que al presentar ángulos  $\phi$  y  $\psi$  prohibidos para otros aminoácidos, permite que el CDR1 tome una conformación en bucle, como sugiere Del Pozo, *et al.*, constituyendo una nueva conformación.

Como se puede apreciar en el alineamiento de la Figura 5.11, la región del CDR1 está muy conservada entre un grupo de 50 secuencias de dominios variables de cadenas ligeras de inmunoglobulinas pertenecientes a las familias  $\lambda$ 1 y  $\lambda$ 6. Particularmente, destaca la conservación de los residuos, que por las interacciones que sostienen o las geometrías que permiten, se consideraron esenciales para la conformación de la región (Figura 5.11, resaltados en rosa). En los casos en que se conoce la estructura tridimensional de la proteína se observa que el CDR1 adopta la conformación descrita, la cual, Del Pozo, *et al.* propusieron como una nueva estructura canónica (Figura 5.12a y c) (Del Pozo, *et al.* en revisión). El CDR3 por su parte, presenta la inserción de la His95a -producto de la recombinación de V $\lambda$ 6 con el J $\lambda$ 2-, que ocasiona un cambio en la conformación

del CDR orientándolo hacia el CDRI. La secuencia de esta región 90-SYDSSNHV-96 se ve también relativamente

conservada según el alineamiento de la Figura 5.11.

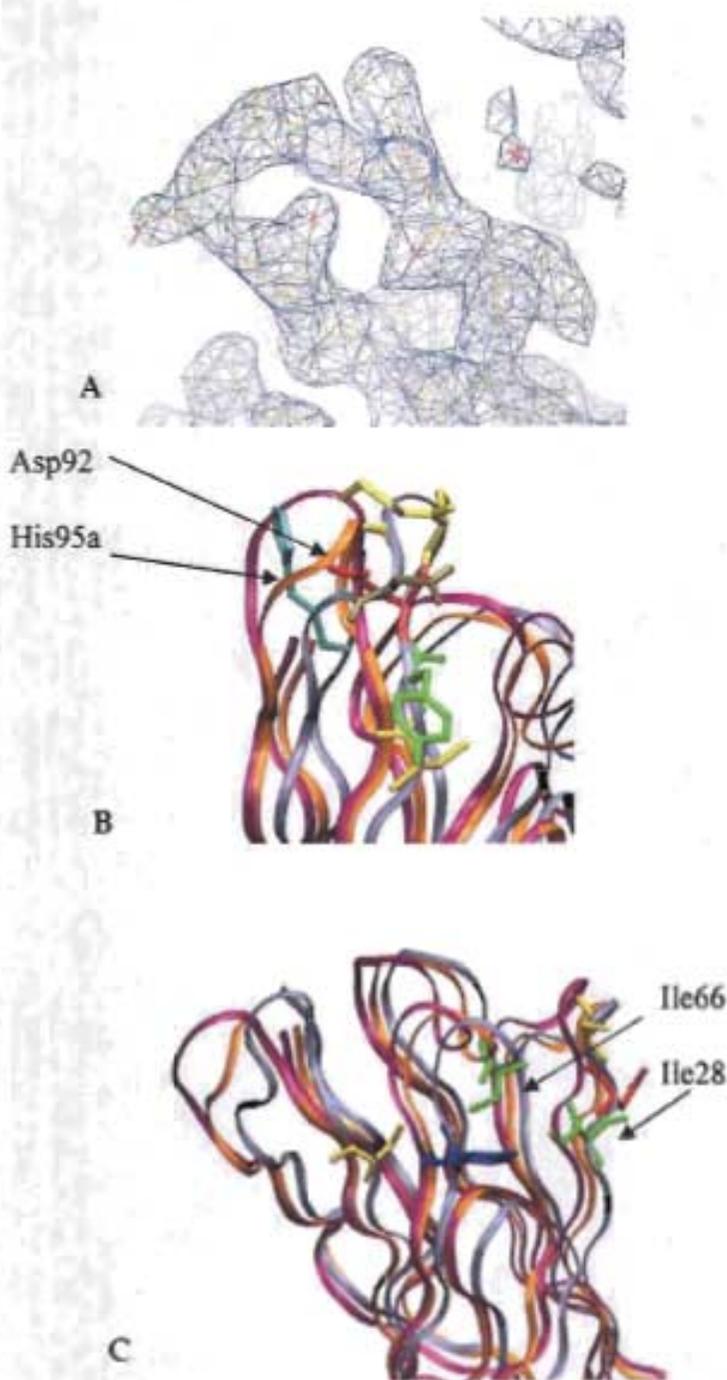


Figura 5.13. (A) Se observa que el CDR3 en su mapa de densidad electrónica. En el alineamiento de la figura 5.11 se observa que la secuencia se conserva en varias de ellas. La inserción de la His95a (cian en esta figura y resaltado en azul en la figura 5.11), artificial en V16aJL2, se observa presente en varias de las secuencias analizadas junto con el Asp92 (rojo en esta figura y resaltado en azul en la figura 5.11). (B) Muestra la estructura del CDR3 en V16aJL2 (lila), en comparación con W1l (Morado) y J1o (naranja) (C) Muestra las conexiones entre el asa DE con el CDR1 y de este con el CDR3: Las Ile28 y 66 (verde).

Aun no se han determinado las estructuras tridimensionales de dominios variables que ostenten esta secuencia en su CDR3; sin embargo, en V $\lambda$ 6aJL2 el puente salino que se forma entre la His95a y el Asp92 parece contribuir a la conformación de la región, y ambos residuos se encuentran en esas posiciones en algunas de las secuencias de cadenas ligeras comprendidas en nuestro análisis, lo que probablemente indique que existe una geometría distinta para el CDR3 (Figura 5.13b). Las características estructurales descritas del dominio variable V $\lambda$ 6aJL2 sugieren que el dominio está en una conformación estable y que la mutación H8P no provoca ningún efecto en la estabilidad:

- a) La existencia de varios enlaces estabilizadores en la superficie (puentes de hidrógeno, puentes salinos, interacciones de apilamiento planar);
- b) El núcleo hidrofóbico que mantiene estable el plegamiento de los  $\beta$ -sandwich de los dominios variables (Chothia, *et al.*, 1985, Chothia, *et al.*, 1998) se conserva;
- c) Sus hojas  $\beta$  mantienen el giro a la derecha -conformación que se ha descrito como la de más baja energía en las estructuras  $\beta$  (Pauling and Corey, 1951) (Chothia, 1973)-.
- d) las vibraciones atómicas del dominio V $\lambda$ 6aJL2 y V $\lambda$ 6aJL2-H8P muestran una gran congruencia entre sí, al comparar los distintos monómeros de la unidad asimétrica de todos los grupos espaciales (Gráficas 5.1-3).

Las características particulares de los CDRs 1 y 3 de V $\lambda$ 6aJL2, cuyas geometrías son distintas a aquellas reportadas para estos CDRs en los dominios variables de cadenas ligeras  $\lambda$ ,

les confieren propiedades estabilizadoras del dominio, ya sea porque forman enlaces que se dan entre residuos del mismo CDR, estabilizando el asa, o porque se dan entre dos CDRs o con el asa DE y estabilizan la zona  $S_{CDRs}$ . Como se encuentran especialmente involucrados en la dimerización, sus particularidades se describen en la sección siguiente.

De acuerdo a las interacciones de estabilización que se ven en la estructura de V $\lambda$ 6aJL2, ninguna de las posiciones que se han sugerido -con base en experimentos de mutagénesis- serían capaces de desestabilizar la estructura del dominio, y por lo tanto, de favorecer la formación de fibras amiloideas, se encuentran implicadas en la estabilización del dominio V $\lambda$ 6aJL2, a excepción de la Arg61 cuya sustitución podría comprometer el puente salino que forma con el Asp82.

Como se mencionó anteriormente en esta sección, las características estructurales aquí descritas, se aplican a todos los monómeros pertenecientes a cada forma cristalina de V $\lambda$ 6aJL2 y de V $\lambda$ 6aJL2-H8P, y por lo tanto cada uno de ellos presenta esta conformación estable.

En el campo de investigación de los agregados amiloideos se adjudica a un conformero distinto a la conformación nativa de la proteína precursora la capacidad fibrilogénica (Shirahama, *et al.*, 1973, Isobe and Ossertman, 1974, Solomon, *et al.*, 1982, Colon, 1992, Hurlle, *et al.*, 1994, Stevens, *et al.*, 1995, Helms and Wetzel, 1996, Huang, *et al.*, 1996, Serpell, *et al.*, 1997, Sunde and Blake, 1997, Dobson and Karplus, 1999, Wall, *et al.*, 1999, Kisilevsky, 2000, Serpell, *et al.*, 2000, Ferreira and De Felice, 2001, Horwich, 2002, Lashuel, *et al.*, 2002, Bitan, *et al.*, 2003, Bitan, *et al.*, 2003, Caughey and

Lansbury, 2003, Khurana, *et al.*, 2003, Stefani and Dobson, 2003, Foguel and Silva, 2004, Stefani, 2004, Uversky and Fink, 2004, Zhu, *et al.*, 2004, Louis, *et al.*, 2005). Aunque existen evidencias de que en muchos casos, como el Alzheimer (Zhang, *et al.*, 2000, Bitan, *et al.*, 2003), las enfermedades causadas por priones, las amiloidosis causadas por la transtiretina (Per Hammarstrom and Kelly, 2003) y el Parkinson (Uversky, 2003) –entre otras–, las fibras amiloideas son causadas por intermediarios de plegamiento claramente identificados por dicroísmo circular y espectroscopia de resonancia magnética nuclear, en el caso de las amiloidosis causadas por cadenas ligeras aún no se han identificado los distintos estados conformacionales que podrían estar involucrados en el padecimiento. La inestabilidad intrínseca de las cadenas ligeras, ha dificultado el análisis del papel de la estabilidad de los distintos plegamientos que los dominios  $V_L$  con distintas estructuras primarias (Raffen, *et al.*, 1999, Wall, *et al.*, 1999).

Por otro lado, generalmente se asume que el estado nativo de una proteína es el estado termodinámicamente más estable y por lo tanto rígido, ya que suele considerarse a la estructura cristalográfica de una proteína –la cual se cree es un estado rígido– como el representante de la estructura nativa (Louis, *et al.*, 2005); sin embargo, como bien apunta Ferreira (Ferreira and De Felice, 2001), pueden existir muchos cónformeros que correspondan al mínimo global de energía libre en el embudo (*funnel*) de plegamiento, y por lo tanto, que el estado nativo no sea uno solo. Por otro lado, la estructura cristalográfica es un promedio de las múltiples conformaciones que una proteína puede adoptar que son

importantes funcionalmente (Rhodes, 2000, Rudino-Pinera, *et al.*, 2002, Sibsankar Kundu, 2002, Chaudhry, *et al.*, 2004).

Las estructuras proteicas, aún en su estado más estable sufren vibraciones que repercuten en su correcto funcionamiento (Rhodes, 2000, Rudino-Pinera, *et al.*, 2002, Sibsankar Kundu, 2002, Chaudhry, *et al.*, 2004, Louis, *et al.*, 2005). En el caso de  $V_{\lambda 6a}JL2$  en sus tres formas cristalinas y la mutante  $V_{\lambda 6a}JL2$ -H8P, estas vibraciones (medidas con base en sus parámetros de desplazamiento atómico: Factor B) muestran regiones que vibran en conjunto. Las vibraciones de algunas regiones son más altas que otras pero que al ser congruentes las de la estructura en un grupo espacial con las de los otros, muestran que la estructura de  $V_{\lambda 6a}JL2$  en sus tres formas cristalinas, a pesar de ser una proteína recombinante, se presenta en una estructura estable que es muy parecida a la de otros dominios variables (Figura 5.6-5.8).

Aunque en muchas ocasiones pueden ocurrir en las proteínas cambios conformacionales que acarreen estructuras aberrantes que puedan ser precursoras de agregados ordenados, no cualquier intermediario de plegamiento sería capaz de desplegar tal comportamiento, necesitaría tener un alto orden y un plegamiento estable para formar arreglos periódicos (Jelinski, 1999).

Se ha propuesto que la inestabilidad intrínseca de las cadenas ligeras se ve contrarrestada por las interacciones con las cadenas pesadas (Chothia, *et al.*, 1985, Chothia, *et al.*, 1998). Se ahondará en la siguiente sección sobre los aspectos relacionados con la dimerización de  $V_{\lambda 6a}JL2$  y como ésta favorece la estabilidad del dominio.

## 5.5 Descripción de la estructura de la interfase monómero-monómero del dímero formado por dominios variables V $\lambda$ 6aJL2

Se comparó la estructura del dímero de V $\lambda$ 6aJL2 en sus distintos grupos espaciales y del dímero de V $\lambda$ 6aJL2-H8P con las estructuras de los dímeros de Loc (V $L_1$ V $L_2$ <sup>21</sup>), Mcg (V $L_1$ V $L_2$ ), Cle (V $L_1$ V $L_2$ ), BreI (V $L_1$ V $L_2$ ), y con el del fragmento Fab Hil (Saul and Poljak, 1992) (V $L$ V $H$ ). Se excluyeron del cálculo de sobre-posición las regiones amino- y carboxilo-terminal, así como los CDRs.

Los dímeros V $L$ V $L$  son muy similares a los dímeros V $L$ V $H$  en las inmunoglobulinas (Epp, *et al.*, 1974). El dímero V $L_1$ V $L_2$  de V $\lambda$ 6aJL2 evidenció esto al compararlo con el dímero V $L$ V $H$  Fab Hil, cuya cadena ligera pertenece a la línea germinal  $\lambda$ 3 (Figura 5.14).

A pesar de las similitudes que el dímero V $L$ V $L$  tiene con el dímero V $L$ V $H$  existen variaciones en algunas regiones de la interfase dimerica vinculadas con el N y C-terminal y con los CDRs, en razón de que el dímero esté formado por dos V $L$ , cuyas longitudes y conformaciones de las regiones mencionadas varían considerable con respecto a las de un V $H$ . A pesar de que ambos dímeros están relacionados por un eje de simetría 2, al sobreponer el V $L_1$  de ambos se observó una rotación del V $H$  con respecto a la posición que toma V $L_2$ , producto de las variaciones antes mencionadas. El dímero V $L$ V $L$ , formado por monómeros idénticos, tiene una

simetría 2 casi perfecta, mientras que en el V $L$ V $H$ , el V $H$  muestra una rotación con respecto al V $L$  de aproximadamente 6°. No obstante, el V $L$ V $L$  mantiene un núcleo de interacciones esenciales y conservadas entre todos los dímeros de dominios variables analizados (Figura 5.14). Las diferencias más notables se encuentran en la superficie del dímero y responden, por un lado, a la simetría del dímero y por otro, a las características descritas de los asas del dominio variable.

El dímero de dominios variables V $\lambda$ 6aJL2 se empaqueta en el barril de 8 hojas  $\beta$  que se ha descrito para dímeros V $L$ V $H$  (Schiffer, *et al.*, 1973) (Chothia, *et al.*, 1985, Potapov, *et al.*, 2004). Dicho barril está constituido por 4 cadenas  $\beta$  (C,C',F y G) que conforman la hoja  $\beta$  II (zona  $S_{\beta}$  II) del V $L_1$  con las correspondientes del V $L_2$  (Figura 5.14 a 5.16). Estas regiones corresponden a los FRs 2 y 3. La superficie de contacto entre los monómeros dentro del dímero V $L_1$ V $L_2$  de V $\lambda$ 6aJL2-H8P y V $\lambda$ 6aJL2 varía de 1087-1340.5 Å<sup>2</sup> (Figura 5.16a), la cual coincide con los cálculos en otros reportes (Potapov, *et al.*, 2004).

Algunos residuos del núcleo de la interfase no-covalente en el dímero de V $\lambda$ 6aJL2, concuerdan con el núcleo común a todos los dímeros de dominios V propuesto a partir de los análisis de más de 50 inmunoglobulinas (Potapov, *et al.*, 2004).

La superficie de contacto en esta interfase está embebida en el núcleo del dominio V $\lambda$ 6aJL2 (Figura 5.8) y por lo tanto las interacciones de dimerización estabilizan el dominio. Se ha demostrado que las posiciones conservadas asociadas al núcleo de la interfase dimerica están unidas convalentemente con las posiciones que conforman el núcleo del dominio, y por lo tanto están relacionadas con el

<sup>21</sup> Utilizaremos esta nomenclatura para referirnos a los dímeros de dominios variables V $L$ V $L$  de cadenas ligeras donde el subíndice 1 indica la que arbitrariamente correspondería al dominio variable de cadena ligera en un V $L$ V $H$  y el subíndice 2 al dominio V $L$  que correspondería al V $H$ . Más adelante se incluye en esta nomenclatura un subíndice a o b que se aplica para distinguir un dímero de otro en el arreglo cristalino.

plegamiento del mismo (Potapov, *et al.*, 2004). Potapov propuso que estas posiciones conservadas involucradas en la formación del dímero, favorecían o agilizaban el reconocimiento y la unión de los dominios variables en las cadenas ligeras (Potapov, *et al.*, 2004) y, en consecuencia promueven la estabilización del dominio variable (como se emencionó en la sección 2.2.1). La unión de las cadenas ligeras con las cadenas pesadas estabiliza la conformación de las primeras, del

mismo modo, la dimerización de dominios V $\lambda$ 6aJL2, en un arreglo alrededor de un eje de simetría 2, propicia la estabilización del plegamiento en  $\beta$ -sandwich del dominio V $\lambda$ 6aJL2.

La interfase dimérica se rige por un arreglo simétrico de residuos hidrofóbicos y polares no cargados que forman el núcleo de dimerización (Figura 5.15 y 5.16).

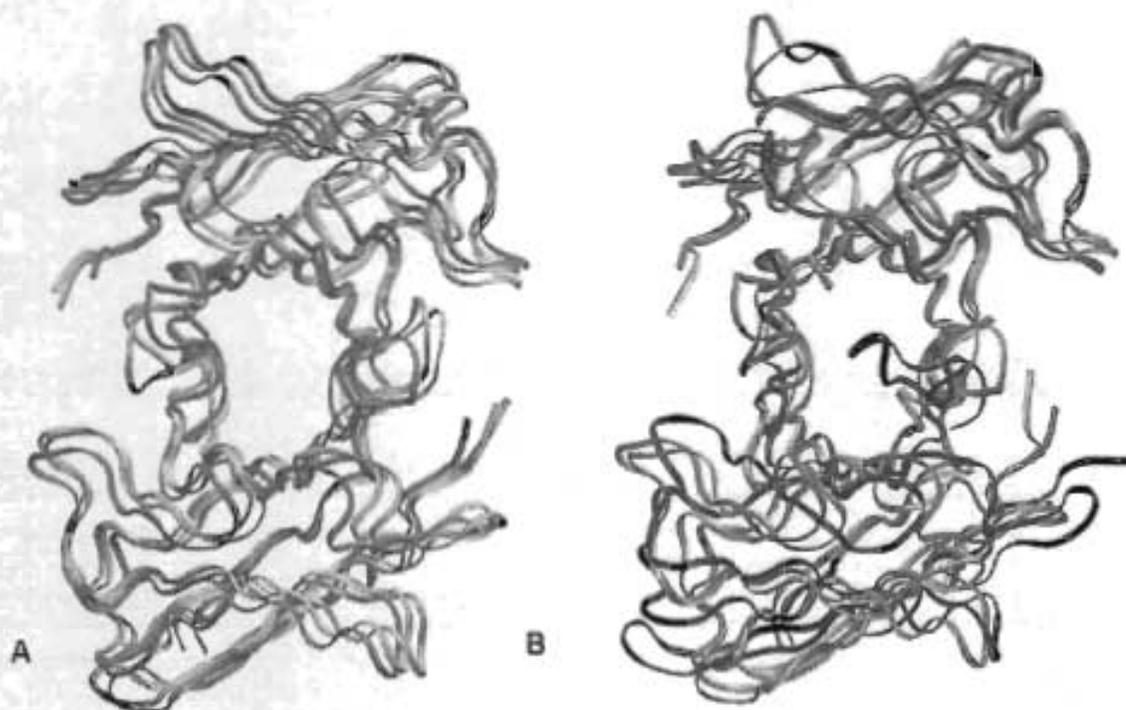


Figura 5.14. Muestra la sobre-posición de dímeros V $L_1$ V $L_2$  de V $\lambda$ 6aJL2 (rojo) contra (A)WIL (azul) y10 (amarillo) rms de desviación 1.61 y 1.58 respectivamente; (B) contra el dímero V $\lambda$ 1V $\lambda$ 11 del Fab H11 (negro), el V $\lambda$ 1V $\lambda$ 12 de la  $\kappa$  Bre (verde). Sus valores de desviación rms son 1.9, y 1.52 respectivamente.

Algunas de las distancias entre estos residuos cambian ligeramente en cada grupo espacial debido a variaciones en el empaquetamiento producto de las concentraciones de acetato de sodio en que creció el cristal.

En la región S $\lambda$  II se observan varios residuos -que se encuentra tanto en las  $\lambda$ 3,  $\lambda$ 1 como en las  $\lambda$ 6- en posiciones conservadas y que se disponen en la misma conformación para sus interacciones en el dímero de dominios variables (Figura 5.15).

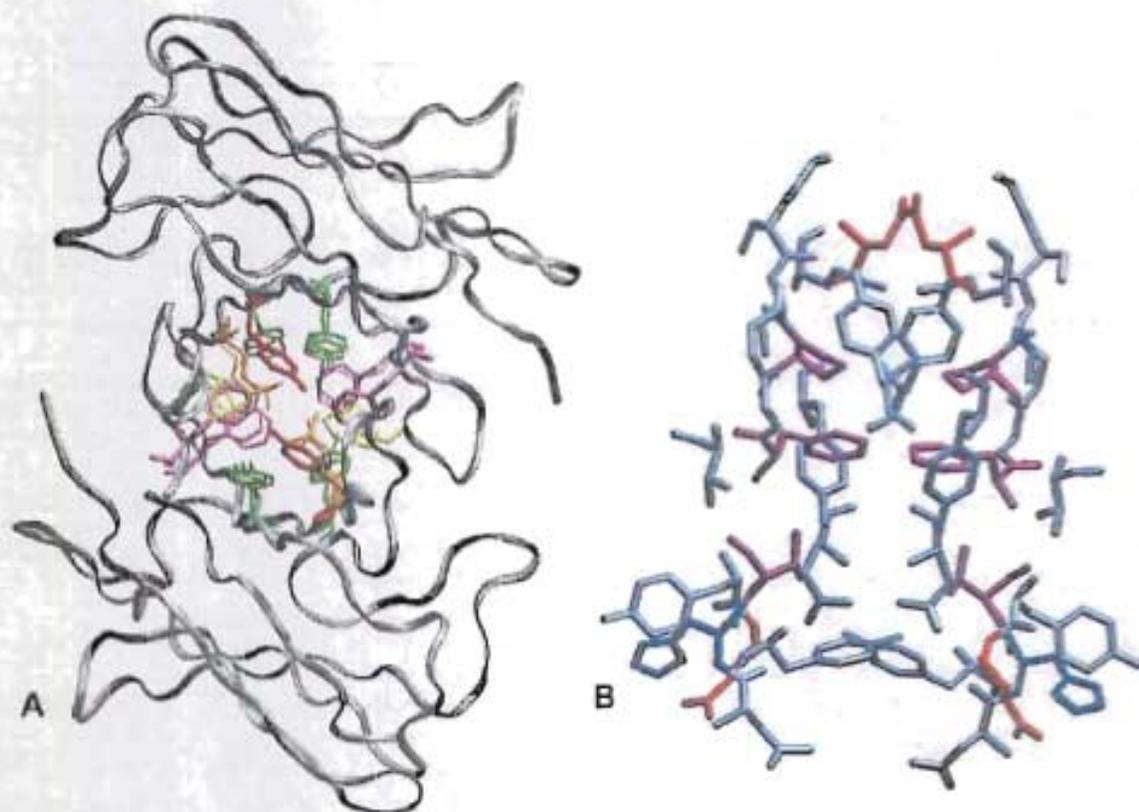


Figura 5.15 (A) Muestra el dímero  $V_{L1}V_{L2}$  de  $V_{L6a}JL2$  con una sobre-posición de los residuos que guardan las mismas conformaciones y que forman la interfase dimerica en  $V_{L6a}JL2$  Cle y Loc. Se observa el cambio de conformación de la Tyr91 de  $V_{L6a}JL2$  (en verde) con respecto a la de Loc (en rojo) el cual impide el puente de hidrógeno con la Gln89. (B) Se esquematiza la interfase según sus propiedades fisicoquímicas: polar (gris), hidrofóbico (morado), básicos (azul) y ácido (rojo). El núcleo hidrofóbico está constituido por la Phe98, la Pro44 y la Val96, y los residuos polares y neutros Tyr32, Gln34, Tyr36, Gln38, Ser43, Thr46, Tyr49, Glu50, Asp85, Tyr87, Gln89, Tyr91, Asn95, His95a. Se observa el arreglo de simétrico en la interfase dimerica de Tyr 32, 36, 87 y 91, el Glu81, Asp85 y Gln34. Se observa la formación del puente salino entre la His95a y el Glu50 de monómeros distintos.

La comparación del dímero  $V_{L6a}JL2$  con los dímeros de las distintas cadenas ligeras  $\lambda$  mostró algunas diferencias debidas a los residuos presentes en la posición 34, 46, 91, 95, 95a, y 96 que sin embargo, no alteran la disposición simétrica del dímero.

En la superficie de las hojas  $\beta$  II de cada monómero se observa un arreglo simétrico de 4 tirosinas. Huang, et al describió un arreglo idéntico entre monómeros entre los residuos Gln89 y Tyr91 en Rei, Cle y Mcg, el cual

encontramos en las estructuras homólogas  $\lambda 6$  de  $V_{L6a}JL2$ . En la circunscripción de la interfase monómero-monómero se encuentran interacciones relacionadas con los CDRs. El CDR2, despliega interacciones que involucran a residuos del CDR3 y del CDR1. La triada Tyr32-Glu50-Tyr50 que se da por los contactos del CDR1 (Tyr32) y del CDR2 (Tyr49-Glu50), se pone en contacto con la His95a del CDR3 gracias a la geometría que éste despliega.



Una evidencia de que el dímero representa un estado oligomérico de más baja energía que promueve la estabilización del dominio, se encuentra en el hecho de que en muchos de los cristales de dominios variables -sin importar si se trata de dominios variables no-patológicos o que forme agregados amiloides-, estos se encuentran en una asociación dimérica (Schiffer, *et al.*, 1973, Colman, *et al.*, 1974, Epp, *et al.*, 1974, Schiffer, *et al.*, 1989, Saul and Poljak, 1992, Huang, *et al.*, 1996, Pokkuluri, *et al.*, 1999) muy similar al dímero  $V_L V_H$  en las inmunoglobulinas.

Para formar estructuras periódicas es necesario que la proteína precursora tenga un alto orden y plegamiento estable. En el caso del arreglo helicoidal del dominio  $V_{\lambda 6a} J_{L2}$ , el alto orden interno está dado tanto por elementos que estabilizan el plegamiento del dominio  $V_{\lambda 6a} J_{L2}$ , como por la estructura dimérica.

Se han descrito ya, las características terciarias del dominio variable  $V_{\lambda 6a} J_{L2}$  y de su dímero. Pero, ¿cómo interactúan los dominios  $V_{\lambda 6a} J_{L2}$  cuando se ensamblan en oligómeros mayores de alta simetría? ¿Es posible entonces que sea el dímero un elemento de nucleación para la formación de la fibra? Esta es una hipótesis que se discutirá en la sección siguiente.

## 5.6 La hélice cristalina como un símil de la fibra amiloidea

A lo largo del trabajo se han planteado algunas interrogantes producto de la observación del arreglo helicoidal cristalino que es conveniente retomar y discutir en esta sección: ¿El arreglo helicoidal alude a algún estadio fibrilar

-como el protofilamento- del agregado amiloide que forman este tipo de proteínas? ¿En la formación del arreglo cristalino están involucrados los residuos que se han sugerido pueden favorecer la formación de fibras amiloides, o aquellos que son distintivos de la línea germinal? ¿La naturaleza del dímero  $V_L V_L$  influye en el arreglo helicoidal? ¿Es posible que la propensión intrínseca a la formación de fibras conduzca a que, aún en un ambiente cristalino, el dominio variable se agregue en la forma en que suele hacerlo para formar las fibras patológicas? ¿En los cristales de las mutantes que abaten la formación de la fibra *in vitro* será posible que el arreglo helicoidal se vea alterado? ¿Cómo interactúan los dominios  $V_{\lambda 6a} J_{L2}$  cuando se ensamblan en oligómeros mayores de alta simetría? ¿Los contactos cristalinos que se generan para constituir tal arreglo podrían interpretarse como posibles contactos que se generen en las fibras patológicas que producen este tipo de proteínas? ¿Es posible que sea el dímero un elemento de nucleación para la formación de la fibra?

Las respuestas que se pueden dar a estas preguntas a partir de la estructura cristalográfica no son categóricas, sin embargo, dan perspectivas de las propiedades que podrían repercutir en la formación de agregados amiloides por este tipo de proteínas.

Existen elementos que sugieren que la hélice cristalina pudiera ser un símil de algún estadio del agregado amiloide patológico. Fueron ya señaladas las dimensiones del diámetro y la longitud de la repetición del motivo helicoidal (Figura 5.5). Otro elemento que es importante describir es la estructura  $\beta$ -cruzada (Figura 5.18).

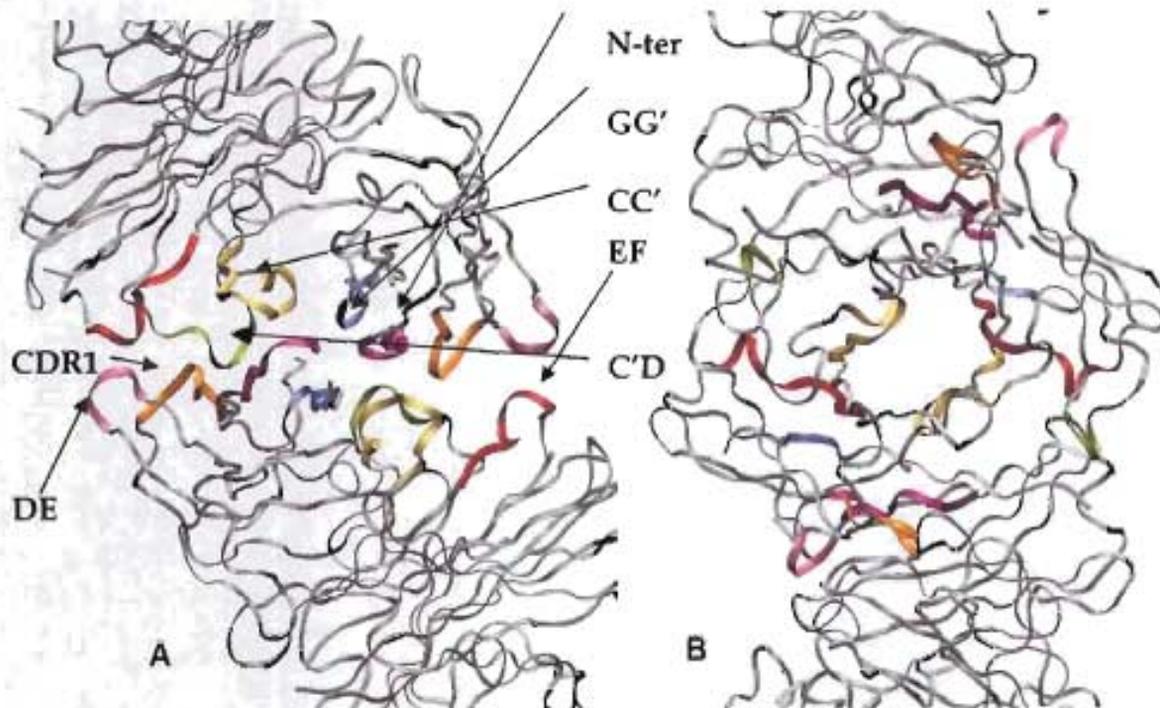
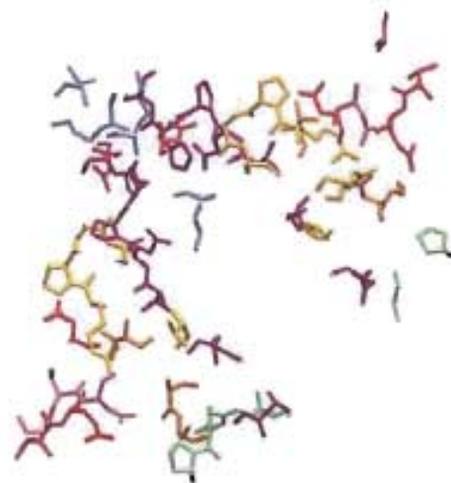


Figura 5.17. Se muestran las zonas de contacto en la interfase dímoro-dímoro. (a) Muestra la interfase en una vista a 90° de (b) donde se muestra el barril del dímoro con las regiones de la interfase aparentemente dispersas en él, pero que se restringen a su superficie. La zonas involucradas se remarcan con un código de color, las cadenas  $\beta$  A (N-ter) (morado), y GG' (azul) de  $V_{L1a}$  y  $V_{L2a}$  se empaquetan contra las cadenas  $\beta$  G' y A de  $V_{L2b}$  y  $V_{L1b}$ , respectivamente. La región AA' de  $V_{L1a}$  y  $V_{L2a}$  se contacta además con la cadena F (rojo) de  $V_{L1b}$  y  $V_{L2b}$ . El asa DE (rosa) y el CDR1 (naranja) de  $V_{L1a}$  y  $V_{L2a}$  se contactan con el asa EF (rojo) de  $V_{L1b}$  y  $V_{L2b}$  y el asa C'D (verde)  $V_{L1a}$  y  $V_{L2a}$  se conecta con el CDR1 de  $V_{L1b}$  y  $V_{L2b}$ . El asa CC' (amarillo) de  $V_{L1a}$  y  $V_{L2a}$  se contacta con el CDR1 y el N-ter de  $V_{L1b}$  y  $V_{L2b}$ .

V16aJL2	P4122	superficies dímoro-dímoro (Å <sup>2</sup> )
	<b>Interfase</b>	
	VL1aVL2a-VL1bVL2b	2006.04
	VL1bVL2b-VL1aVL2a	2025.42
	VL1cVL2c-VL1dVL2d	2037.56
	<b>P21</b>	
	<b>Interfase</b>	
	VL1aVL2a-VL1bVL2b	3132.98
	VL1bVL2b-VL1aVL2a	1719.09
	VL1cVL2c-VL1dVL2d	18232
	<b>J4122</b>	
	<b>Interfase</b>	
	VL1aVL2a-VL1bVL2b	2018.06
	VL1bVL2b-VL1aVL2a	2016.18
	VL1cVL2c-VL1dVL2d	2015.44



Cuadro 5.3 Superficies de contacto en las superficies dímoro-dímoro que participan en la formación de la hélice de VL6aJL2 en los tres grupos espaciales. Se muestran ala derecha los residuos involucrados en la interfase e el código de color referente a la zona a la que pertenecen según la figura 5.17.

El arreglo de los dímeros  $V_{L1}V_{L2}$  de  $V\lambda 6aJL2$  en esta hélice cristalográfica de simetría  $4_1$  produce una disposición de las cadenas  $\beta$  que conforman al dominio variable, perpendicular al eje de la hélice, similar al arreglo que define la estructura  $\beta$ -cruzada (Pauling and Corey, 1951) característica de las fibras amiloidosas (Sunde, *et al.*, 1997, Bellotti, *et al.*, 2000, Inouye, *et al.*, 2002); sin embargo, debido a la disposición de los dímeros en la hélice de  $V\lambda 6aJL2$ , las hojas  $\beta$  presentan una inclinación que ocasiona que el arreglo de las cadenas  $\beta$  no es en hojas paralelas continuas, como han propuesto varios modelos del núcleo fibrilar construidos para cadenas ligeras y otros tipos de proteínas amiloidogénicas (Figura 5.19).

La estructura  $\beta$ -cruzada se ha inferido a partir de experimentos con difracción de fibras; no obstante, los patrones de difracción de las fibras de cadenas ligeras no muestran la clara difracción a  $4.7 \text{ \AA}$  que describe tal estructura, y en cambio muestran difracciones más tenues a resoluciones cercanas a  $3.5 \text{ \AA}$  (Sunde, *et al.*, 1997) y que muestran otros componentes del orden interno de las fibras.

En el caso de la hélice cristalina de  $V\lambda 6aJL2$ , si nos enfocamos al empaquetamiento entre dos dímeros donde el dímero A está formado por  $V_{L1a}V_{L2a}$  y el dímero B por  $V_{L1b}V_{L2b}$  se observa que, debido a la simetría de la hélice, las cadenas  $\beta$  de ambos dímeros se organizan de manera tal que conforman cada lado de la hélice. Este arreglo se repite a cada lado de la hélice. Como un paso de hélice está formado por 4 dímeros, y en cada una de las tres interfases dímero-dímero que se encuentran en la longitud de paso de las

distintas hélices, se presenta tal arreglo de las cadenas  $\beta$ , es posible encontrar intercaladamente, un total de 18 cadenas  $\beta$  por cada lado a lo largo de la hélice (Figura 5.19) en la longitud de paso que presentan las hélices de  $V\lambda 6aJL2$  ( $93-96 \text{ \AA}$ ) (Figura 5.5).

Un primer indicio de que la hélice cristalina respondía a una naturaleza de contacto más estrecha que los que son debidos únicamente a contactos cristalinos, fue el encontrar una amplia superficie de interacción entre los dímeros que conforman la hélice. Las interfases entre dos dímeros (de alrededor de  $2000 \text{ \AA}^2$ ) son demasiado extendidas para deberse únicamente a la cohesión débil que, por lo general, se da entre las moléculas que conforman un cristal (Sands, 1975). Usualmente, sólo una pequeña parte de la superficie de la macromolécula participa en los contactos intermoleculares y el resto está en contacto con el solvente (Janin, 1997). En el caso de las superficies de contacto en la hélice de  $V\lambda 6aJL2$ , se observa que las amplias superficies de contacto obstruyen el paso de solvente en una gran proporción a lo ancho de la hélice y se observan interacciones fuertes participando en su formación.

La interfase entre los dímeros  $V_{L1a}V_{L2a}$  y  $V_{L1b}V_{L2b}$  es una superficie muy compacta (Figura 5.18) de más de  $2000 \text{ \AA}^2$  que muestra pequeñas diferencias entre los distintos grupos espaciales (Cuadro 5.3).

Está conformada por 7 zonas que producen una gran cantidad de contactos (Cuadro 5.4): El N-terminal (comprende a la cadena  $\beta$  A y la región AA'), el CDR1, las asas CC', C'D, DE y EF (de la región  $S_{\text{loop}}$ ) y la región GG' de cada monómero (Figura 5.8 y 5.17). La disposición de estas regiones en el

dímero parece muy dispersa, pero se restringe a la superficie del dímero. Si se mira en el contexto de la hélice se

forman dos caras bien definidas hacia las interfases (Figura 5.17 y 5.18).

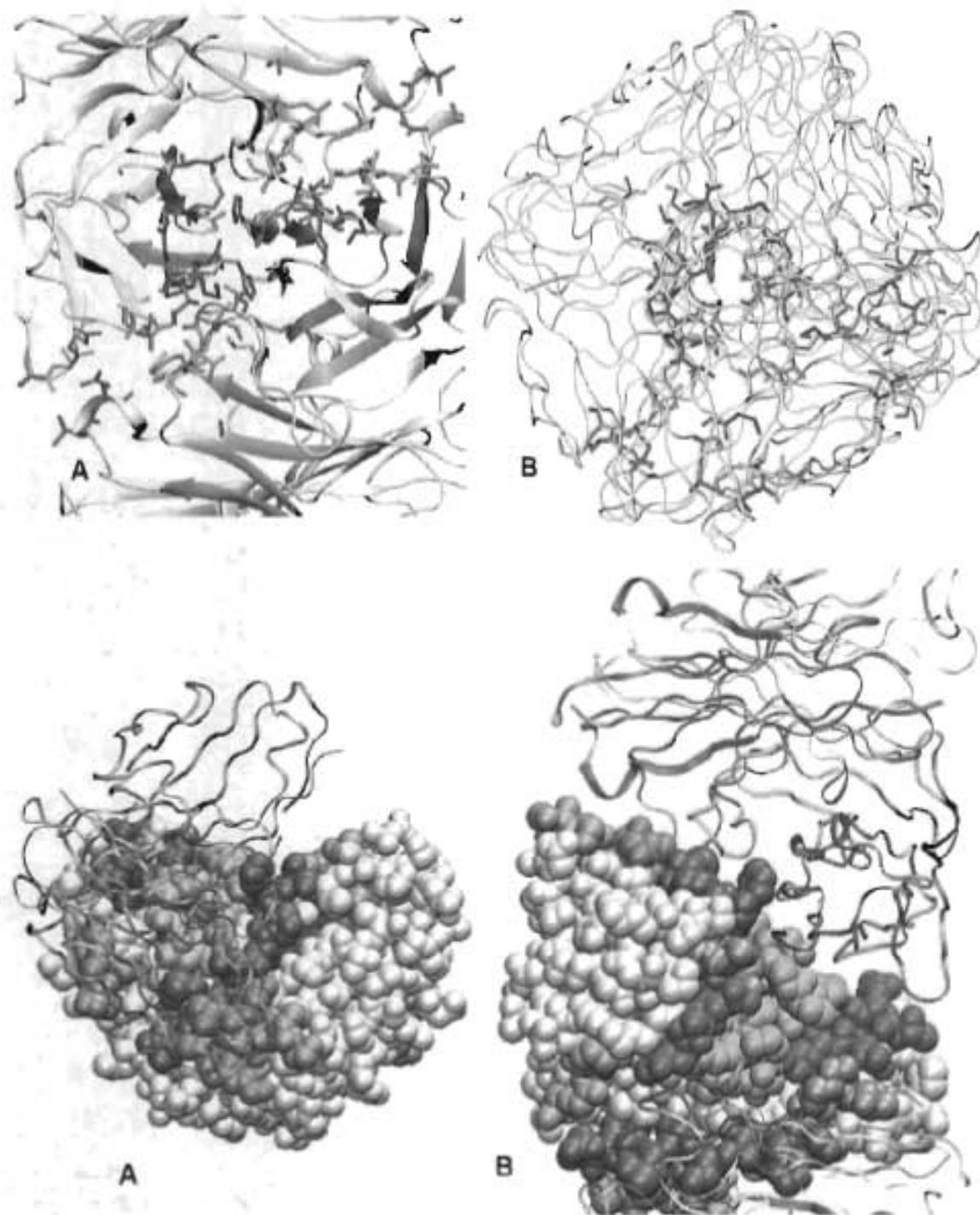


Figura 5.18. En la parte superior (a) muestra los residuos que participan en las interacciones de la interfase (b) en desde el eje de la hélice. En la parte inferior se muestra la superficie de contacto en la interfase dímero-dímero (a) muestra la interfase en un solo dímero vista desde el eje de la hélice; (b) Muestra la contribución de un dímero a dos interfases a lo largo de la hélice.

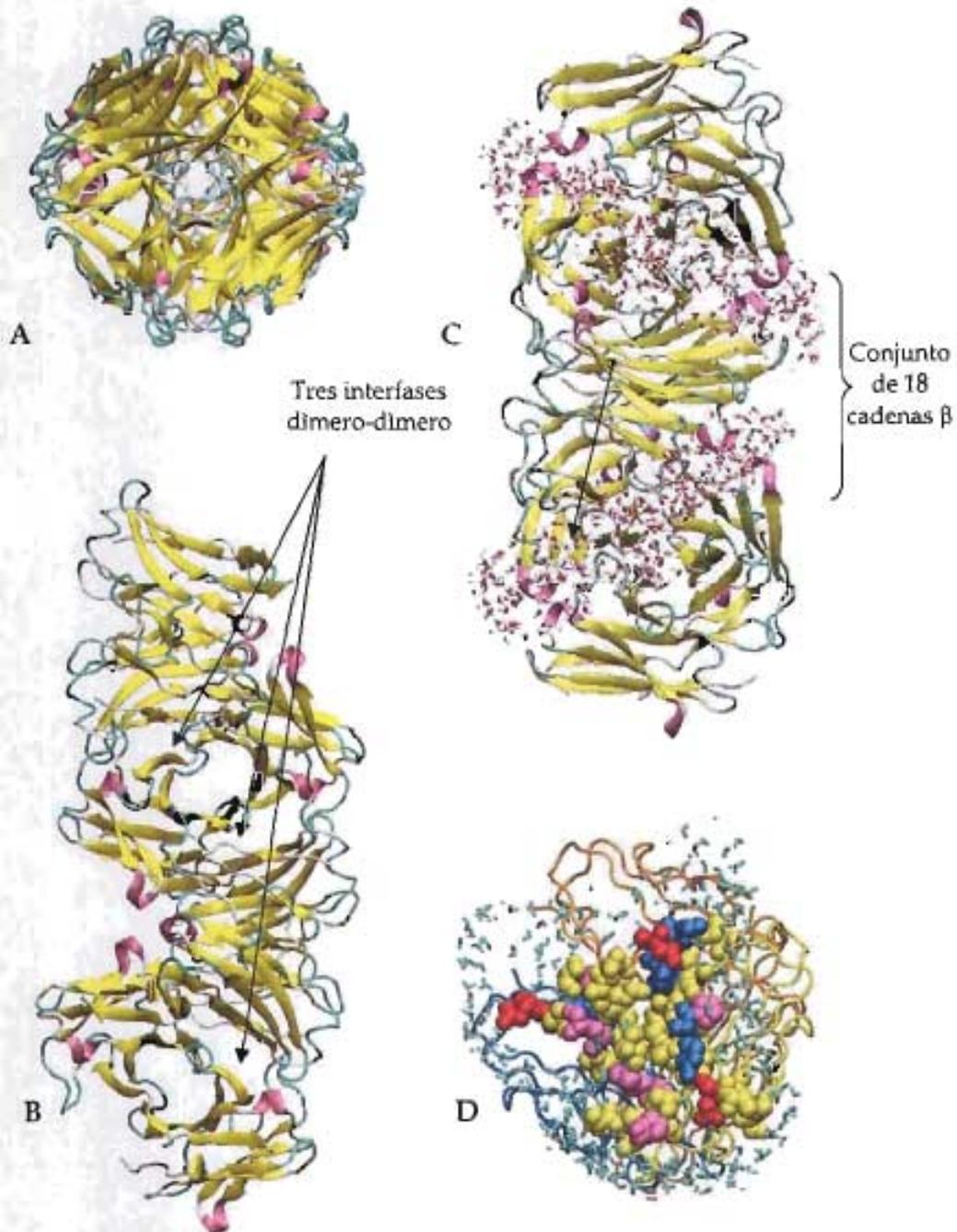


Figura 5.19. (a) Muestra la hélice de cuatro dímeros en la dirección del eje por el que pasa. (b) Muestra el arreglo de las hojas  $\beta$  que corren perpendiculares a lo largo del eje de la fibra. (c) Muestra la fibra a  $90^\circ$  de la vista (a) o (b) con anillos de agua simulados, que rodean las interfaces entre dímeros. (d) Se ve, desde la dirección del eje por el que corre la hélice, la superficie de contacto que no admite el paso del anillo de agua que la rodea. El código de color es según la naturaleza del aminoácido que participa: básicos (azul), ácidos (rojo), no-polares (morado) y polares (amarillo).

La interfase conformada por las zonas antes mencionadas no permite el paso de solvente (Figura 5.19) en la región del núcleo de la misma, aunque muchos de los residuos que participan son de carácter hidrofílico (Cuadro 5.4). Se realizó con el programa VMD una simulación en la que se introduce a la hélice en una caja de agua para evaluar si pudieran entrar en la interfase algunas moléculas de agua. Dicha simulación permitió ver que la compactación de la interfase no permite el paso del solvente ni la formación de cavidades en que pudiera existir solvente, tal es la complementariadad de la superficie (figura 5.17 y 5.18).

En la hélice de V $\lambda$ 6aJL2 el patrón del arreglo de las cadenas  $\beta$  sugiere que probablemente la disposición de las cadenas  $\beta$  en las fibras de esta proteína, no sea el mismo que constituye el núcleo de la fibra formado por otros tipos de proteínas. El orden y la estabilidad de la hélice de V $\lambda$ 6aJL2 se da gracias a interacciones como puentes salinos, -también capaces de estabilizar una estructura helicoidal- y por puentes de hidrógeno -tanto entre cadenas  $\beta$  como entre otras regiones de la proteína - que se extienden a lo largo de toda la longitud de la hélice y que conforman un núcleo de la hélice estable.

En el modelo de la estructura de la fibra de betabelinas que Inouye plantea, señala la importancia de los residuos que se encuentran en los asas que rodean a las cadenas  $\beta$ , en

las interacciones que mantienen la estructura fibrilar (Inouye, *et al.*, 2002).

Otra característica del arreglo helicoidal que llamo la atención es que varias interacciones que lo mantienen estable involucran tanto residuos característicos de la línea germinal como aquellos que se han propuesto pueden potenciar la formación de fibras (Cuadro 5.4) (Hurle, *et al.*, 1994, Wall, *et al.*, 1999, Raffin, *et al.*, 1999).

Como se mencionó en la sección 3 se han ubicado, a partir de los residuos distintivos de la línea germinal y de los que potencian la formación de fibras, algunos motivos en la secuencia del dominio variable que pudieran constituir estrategias para evitar la agregación, como el N-terminal, el bulbo- $\beta$ , el C-terminal y algunos residuos del CDR1, y de las asas C'D. Todas estas regiones se observan conformando la interfase de contacto entre dímeros en la hélice cristalina. Los residuos que participan en los contactos así como la descripción de las zonas se encuentran en un código de color en la Figura 5.17 y 5.18 y en el Cuadro 5.3.

Se ubicaron algunos residuos esenciales para el empaquetamiento de los dímeros en la hélice V $\lambda$ 6aJL2 (Cuadro 5.3). Algunas de las interacciones que se producen en esta interfase son dependientes de residuos característicos de la línea germinal  $\lambda$ 6a. Llama la atención en particular que, gracias a la conformación extendida del asa DE por la inserción 66a y 66b, se da la



encuentra en el  $V_{L1a}$  sostiene interacciones con residuos del  $V_{L2b}$  del dímero vecino, donde se encuentra la formación de una cavidad hidrofílica. La His8 se inserta en dicha cavidad en cuyo fondo se encuentra el Asp85 con el cual forma un puente salino (Cuadro 5.3 y Figura 5.20). Esta interacción permite la compactación de la interfase dímero-dímero al formarse en el centro del eje de la hélice. Por otro lado, le da gran estabilidad y

rigidez a la estructura helicoidal, máxime que a pesar de que estas interacciones se dan en el borde de la interfase en contacto con el solvente, la estructura helicoidal se mantiene (Figura 5.20); es decir, la depresión en la superficie de la interfase dímero-dímero donde se inserta la hélice, constituye una cavidad de exclusión de solvente que favorece la estabilidad de la hélice.

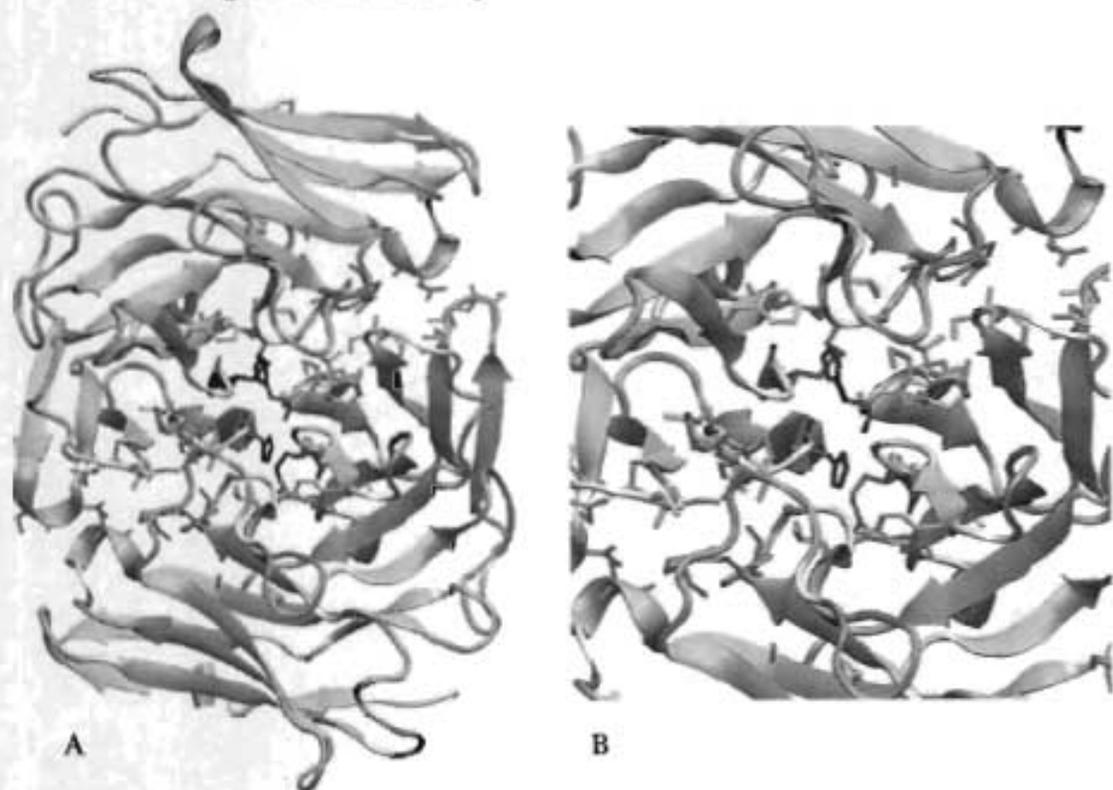


Figura 5.20. (a) Muestra los contactos en la interfase en un tetrámero de la hélice vista por su eje longitudinal. (b) Acercamiento de la interfase: N-ter (naranja), His8 (negra), Ser26 y 27 del CDR1 (cian), Arg39 (café), Pro40 y 59 (del CDR2) (morado), Thr45 (verde), asa DE (lila), Asp85 (rojo), Tyr87 (rosa) y Lys103 (azul).

La aglomeración periódica de los dímeros a lo largo del eje de la hélice se favorece tanto por esta interacción, como por la interacción de van der Waals de las His8 del  $V_{L1a}$

y la del  $V_{L1b}$  (Figura 5.20) y propicia que los grupos imidazol de cada una de ellas se oriente hacia lados contrarios permitiendo la

oligomerización helicoidal que se da en el cristal.

Con el afán de comprobar si los dímeros  $V_LV_H$  podrían ser capaces de formar un arreglo helicoidal de este estilo, se sobrepuso el dímero  $V_LV_H$  de Fab de Hil en la hélice de  $V\lambda 6JL2$  (Figura 5.21). Se observó que la cavidad en la interfase dímero-dímero que se forma cuando hay una interfase constituida por sólo  $V_LV_L$ , no se forma cuando hay dímeros  $V_LV_H$ . La rotación del  $V_H$  con respecto al  $V_L$  en el  $V_LV_H$  ocasiona que el dominio  $V_H$  se aleje de la superficie de contacto y por lo tanto no existe la posibilidad de que se de el anclaje de la His8. Por otro lado, las características

hidrofílicas del ambiente circundante a la His8 en la interfase entre dímeros  $V_LV_L$  se ven disminuidas en la interfase  $V_LV_L$ - $V_LV_H$  debido a la participación de residuos hidrofóbicos en la zona. Es debido al giro y a que el  $V_H$  presenta una cadena  $\beta$  adicional, que se eliminan todos los contactos que se podrían dar con la His8. Adicionalmente, se producen choques entre las asas EF de monómeros de distintos dímeros que conforman la interfase  $V_{L1}V_{L2}$ - $V_{L2}V_{H1}$ , y a lo largo de toda la interfase  $V_{L1}$ - $V_{L2}$ ,  $V_{L1}V_{H1}$  y  $V_LV_H$ , que rompen el arreglo simétrico de la estructura helicoidal.

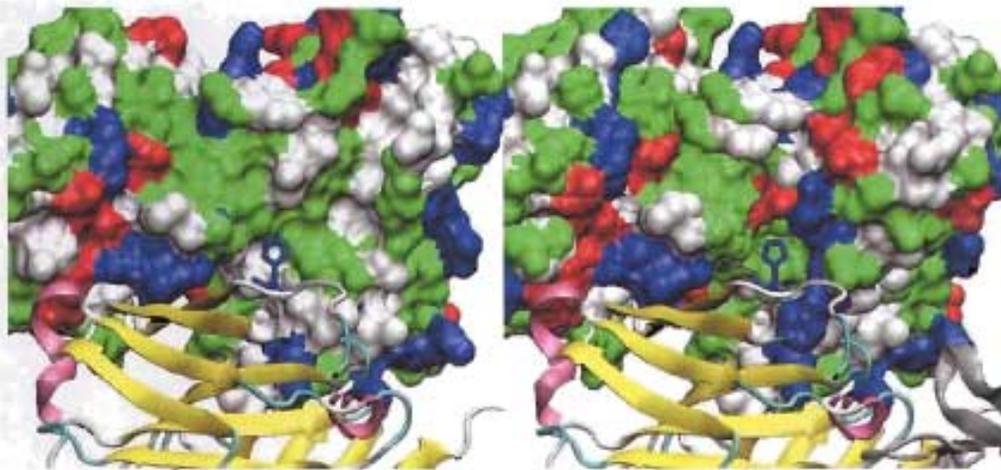


Figura 5.21. A la derecha se muestra la trasposición del dímero  $V_LV_H$  en la fibra de  $V\lambda 6JL2$ , donde la rotación de monómero  $V_H$  con respecto al  $V_L$  lo aleja de la superficie de contacto y por lo tanto no existe la cavidad polar para el anclaje de la His8 que se observa en la derecha en la hélice de  $V_LV_L$ s de  $V\lambda 6JL2$ , donde se encuentra en rojo el Asp85.

La importancia de la His8 en el arreglo helicoidal se refleja también en el hecho de que la mutante H8P, la cual no forma fibra *in vitro* (Del Pozo, *et al.*, en preparación) no presente en su

cristal, el arreglo helicoidal observado en los casos de

$V\lambda 6aJL2$  (Figura 5.22). En el caso del dominio variable  $V\lambda 6aJL2$ -H8P la sustitución de la His8 por una prolina lo impide (Figura 5.22). El arreglo de dímeros en  $V\lambda 6aJL2$ -H8P

produce una interfase de contacto de alrededor de 500 Å gobernada por

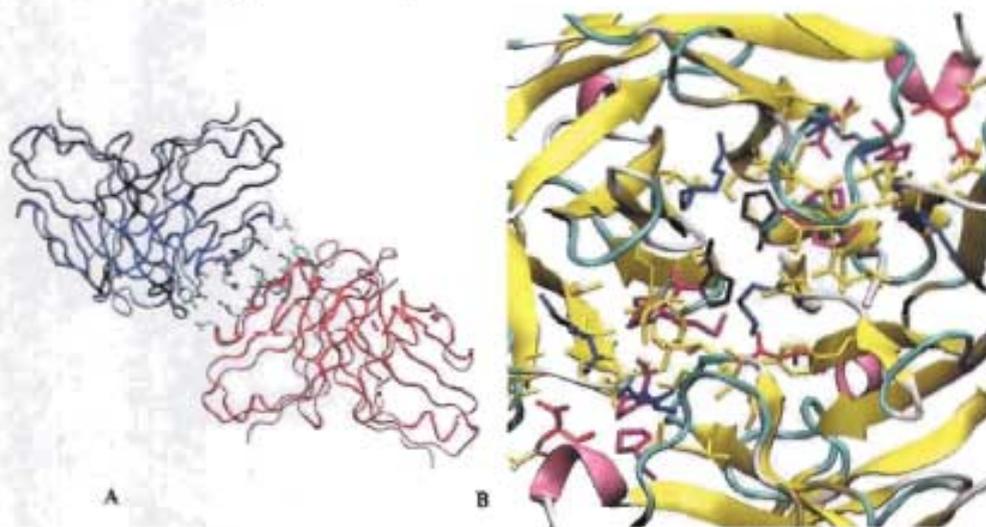


Figura 5.22 (a) Arreglo de la unidad asimétrica en  $V\lambda 6aJL2-H8P$  mostrando la interfase que se da entre dímeros (517.32 Å<sup>3</sup> y en la que participan Glu50, Arg54, Tyr32 y Asp61). (b) Sobreposición de los dímeros de  $V\lambda 6aJL2-H8P$  en la fibra de  $V\lambda 6aJL2$ , muestra que se mantenían muchos de los contactos de la superficie inter-dimérica en la fibra pero se pierden algunos asociados a la His8 y las particularidades que la conformación de esta permite en el arreglo de la fibra. Pro8 está en negro y el código de colores es según la naturaleza del aminoácido que participa: básicos (azul), ácidos (rojo), no-polares (morado) y polares (amarillo).

Como el dominio  $V\lambda 6JL2-H8P$  tiene una Pro en la posición 8 y no presentaba un arreglo helicoidal, se evaluó que elementos de interacción se verían comprometidos por la ausencia de la His. Para ello se realizó una sobre-posición del dímero de  $V\lambda 6JL2-H8P$  sobre uno de los dímeros de  $V\lambda 6JL2$  en la hélice. Cuando se transfirió el dímero de la mutante  $V\lambda 6JL2-H8P$  a una posición de un dímero de  $V\lambda 6JL2$ , se observó que se producen la mayoría de las interacciones que participan en la formación de la interfase dímero-dímero en la hélice de  $V\lambda 6aJL2$  (Cuadro 5.3). No obstante, aunque existe la cavidad que correspondería a la His8 y el Asp85 en el fondo de ella, no se puede dar esta interacción

interacciones entre el CDR2 y el asa DE.

debido a la presencia de la Pro, que por otro lado, confiere características

hidrofóbicas en una zona hidrofílica (Figura 5.22b).

La ausencia de la carga positiva del imidazol en la posición 8 y de las interacciones repulsivas que se darían al interactuar estos en una interfase dímero-dímero, ocasiona que el dominio  $V\lambda 6JL2-H8P$  no exhiba un arreglo periódico helicoidal en su cristal.

Ya se ha sugerido el papel de los residuos básicos en la estabilización de arreglos helicoidales, tal es el caso de las betabelinas (Inouye, *et al.*, 2002), en cuyo modelo, a partir de cristalografía de rayos X y de difracción de fibras, Inouye plantea la presencia de la interacción de una

histidina y una treonina, en la dirección del eje de la fibra, y la interacción dos lisinas perpendiculares al mismo. Ambas interacciones se dan en la interfase entre las unidades asimétricas que conforman la fibra en este caso, estabilizándola (Inouye, *et al.*, 2002). En la hélice de V $\lambda$ 6aJL2 además de la interacción His8-Asp85 se observa otro enlace que contribuyen a la

direccionalidad y estabilidad de la hélice al darse en la dirección del eje de la misma: el puente salino entre la His95a y el Glu50 (Figura 5.24). Este enlace resulta muy especial y particular de V $\lambda$ 6aJL2, al ser producto de la recombinación artificial para generar la proteína recombinante.

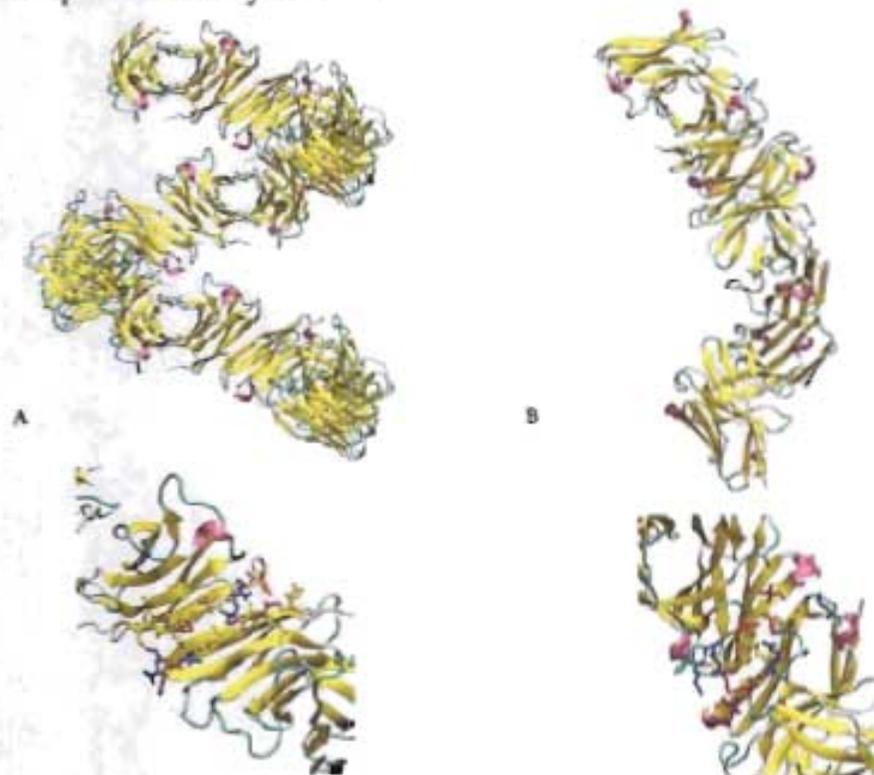


Figura 5.23 En (A) se observa el arreglo helicoidal en el cristal del dominio variable Bre y en su parte inferior la interfase entre sus dímeros de aproximadamente 1411.33 Å<sup>2</sup> y (B) muestra el arreglo helicoidal en el cristal del dominio variable de W11 y en su parte inferior la interfase entre sus dímeros de aproximadamente 1432.75 Å<sup>2</sup>. El código de colores de los residuos que participan es el especificado en la figura 6.6.

Varios residuos característicos de la línea germinal  $\lambda$ 6 (Pokkuluri, *et al.*, 1999) se encuentran en las interfases entre dímeros que van formando la hélice de V $\lambda$ 6aJL2, principalmente las asas (el CDR1 y el asa DE que contiene la inserción 66a

y b). Esto sugiere que el agregado helicoidal cristalino de V $\lambda$ 6aJL2 está especialmente favorecido por residuos que definen a la línea germinal  $\lambda$ 6a como propensa a generar cadenas ligeras amiloidogénicas. Adicionalmente,

varios de los residuos que se han catalogado como posiciones que disponen a la formación amiloide (Hurle, *et al.*, 1994, Raffin, *et al.*, 1999, Wall, *et al.*, 1999) se encuentran formando parte de ésta interfase. Es interesante notar, que todas estas regiones en el dímero  $V_LV_L$ , no se encuentran en el interior de los monómeros ni en la interfase monómero-monómero, sino en la superficie del dímero y se agrupan formando una gran interfase de interacción en la fibra (Figura 5.18).

Cabe mencionar que en un cristal de  $V\lambda 6aJL2$  -que no se incluyó en esta tesis debido a la baja calidad de sus datos de difracción-, no mostraba el arreglo helicoidal de los otros cristales. La pérdida del arreglo helicoidal en este cristal pudo deberse a que sufrió una gran deshidratación que provocó un aumento en la concentración de sales. Si se lograra comprobar, *in vitro*, que las altas concentraciones de sales, son capaces de impedir la fibrillogénesis de  $V\lambda 6aJL2$ , sería una evidencia que apoyaría la hipótesis de que la hélice encontrada en los otros cristales de  $V\lambda 6aJL2$  representa algún estadio primario de la fibra. De hecho, en los estudios de fibrillogénesis sobre superficies realizados por Zhu (Zhu, *et al.*, 2004) se observa que las altas concentraciones salinas provocan la formación de agregados amorfos de SMA.

Si se asume la hipótesis de que la hélice cristalina es un símil de un agregado pre-fibrilar, con base en lo anterior y sobre la evidencia

estructural que apunta a que las zonas involucradas en las interfases que compactan la hélice se encuentran en la superficie dimerica, se propone que en el caso de los dominios variables amiloidogénicos, el intermediario de plegamiento pudiera ser que se tratase del dímero  $V_LV_L$  y por lo tanto ser éste, el elemento de nucleación de la formación de la fibra de este tipo de proteínas; ya que una de las maneras de acceder a conformeros distintos es cuando ocurren cambios de oligomerización.

Khurana observó a partir experimentos de dicroísmo circular y resonancia magnética con el dominio variable de la cadena ligera Sma, la presencia de un estado estructural del dominio variable donde la fluorescencia de algunos de los residuos aromáticos que constituyen su interfase monómero-monómero, desaparecía (Khurana, *et al.*, 2001). Interpretó estos resultados como un intermediario de plegamiento capaz de formar fibras, que presentaba un plegamiento menor al de otro intermediario cuasi-nativo, que formaba agregados amorfos; sin embargo, el que la fluorescencia de los residuos aromáticos de la interfase del dímero  $V_LV_L$  no aparezca, puede deberse a la asociación de dos monómeros para formar el dímero.

La hélice de  $V\lambda 6aJL2$  presenta también varios enlaces que contribuyen a la direccionalidad y estabilidad de la hélice al darse en la dirección del eje de la misma. Como resultado de la simetría  $4_1$  de la

hélice, se observa un gran orden interno en la hélice que refleja, en primer lugar, la influencia del arreglo espacial del dímero  $V_L V_L$  en las propiedades de la hélice que forma y en segundo lugar, un patrón

que adoptan residuos característicos de la línea germinal, al darse un arreglo helicoidal de simetría  $4_1$  como el que se presenta en los cristales de  $V\lambda 6aJL2$  (Figura 5.24).

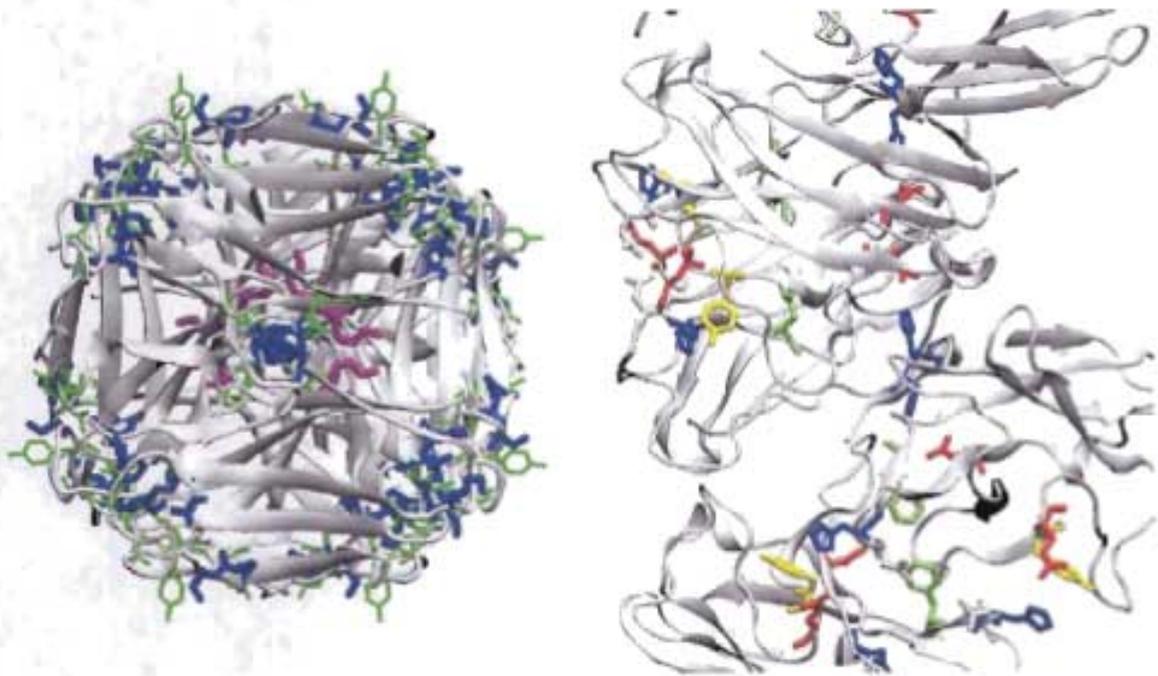


Figura 5.24. A la izquierda se observa el arreglo en los vértices de la hélice de los residuos característicos de la línea germinal (a excepción de las treoninas 45 y 46 y la arginina 39 (azul) y la distribución de los residuos relacionados con la amiloigenicidad (verde). En morado se muestra la Lis103. A la derecha se muestra la direccionalidad a lo largo del eje de la fibra de la His8 y His95a (azul) con los Glu50 y Asp85, respectivamente, la interacción hidrofóbica de las Phe98 (verde), y la Tyr49 (amarillo) orientada al exterior de la hélice.

Muchos dominios variables cristalizan en arreglos periódicos helicoidales. Tal es el caso del dominio variable  $\lambda$  Wil y el  $\kappa$  Bre; sin embargo, el arreglo de los dímeros en cada una de ellas es distinto al que se observa en la hélice de  $V\lambda 6aJL2$  (Figura 5.23).

Como se describió, en el caso de  $V\lambda 6aJL2$  se dan contactos  $V_{L1a}-V_{L1b}$  como  $V_{L1a}-V_{L2b}$  de distintos dímeros, mientras que en el caso de Bre y Wil los contactos entre dímeros

se dan entre  $V_{L1a}$  y  $V_{L2b}$  únicamente (Figura 5.23) formándose puentes de hidrógeno entre las cadenas  $\beta$  de su correspondiente región  $S_{\beta 1}$ ; sin embargo, en ambos casos la disposición de los dímeros varía de modo que los pasos de hélice son distintos en cada caso.

Estas diferencias en la naturaleza de las hélices que forma cada dominio variable cambian las dimensiones de las superficies de contacto entre dímeros (Figura 5.23).

Contactos en las superficies de contacto V/C en cadenas ligeras					Contactos en las superficies de contacto dím-dím en Bre y Wil						
Fab Hil	$\lambda$	Cle	$\lambda$	Bre	$\lambda$	Wil	$\lambda$				
VL		CL	VL	CL	VL	VL	VL	VL			
SER 9 OC	ALA 143 CB	3.8	PRO 8 CB	ALA 143 CB	4.2	THR 3 OC1	ASP 17 OD1	3.8	HIS 8 NEZ	PRO 59 CD	4.1
SER 11 OC	LYS 110 NZ	4.8	PRO 8 OC	THR 145 OC1	4.2	SER 7 OC	ALA 13 CB	3.2	PRO 59 CD	HIS 8 NEZ	4.1
SER 11 CB	PRO 141 OC	4.1	PRO 8 CC	THR 147 CC2	4.6	SER 7 CB	ASP 17 CB	4.2	SER 9 OC	THR 459 OC1	3.1
SER 11 OC	GLU 198 OE2	4.0	SER 9 OC	PRO 143 OC	2.8	PRO 8 CC	LEU 11 CB	3.8	SER 12 OC	SER 278 OC	2.8
GLU 87 OE1	TYR 140 OH	3.0	SER 9 CB	ALA 143 CB	4.0	PRO 8 CB	ALA 13 CB	4.6	SER 12 OC	ALA 29 CB	4.8
GLU 82 OE2	TYR 172 OH	4.4	SER 9 OC	HIS 198 NEZ	4.7	SER 9 OC	SER 14 OC	4.9	SER 12 CB	THR 668 CC2	3.4
THR 104 CC2	TYR 140 OH	3.3	SER 9 OC	GLU 199 OE1	3.8	SER 9 OC	LYS 107 NZ	2.6	SER 12 OC	ASN 69 OD1	4.9
THR 104 OC1	PRO 141 CB	3.7	SER 12 OC	LYS 110 CD	4.1	SER 10 OG	SER 12 OC	2.8	GLU 13 OE1	SER 378 CB	4.9
LEU 106 CD1	LYS 110 CE	4.1	SER 12 OC	PRO 143 OC	3.2	LEU 11 CD1	PRO 8 CC	4.0	GLU 13 OE1	ASN 30 OD1	3.8
LEU 106 CD2	TYR 140 CD	3.7	SER 12 OC	GLU 199 OE1	3.8	LEU 11 CD1	LEU 11 CD2	4.5	ARG 39 ME	SER 42 OC	4.0
LEU 106 CD1	PRO 141 OC	3.7	LYS 100 CB	ALA 140 CB	4.5	SER 12 CB	SER 9 CB	3.6	PRO 40 OG	PRO 40 OG	4.9
GLY 107 OT1	GLN 106 CB	2.8	THR 105 CC2	TYR 140 OH	3.6	SER 12 CB	SER 10 OC	2.8	THR 105 OC1	THR 668 CC2	4.5
GLY 107 OXT	PRO 109 CD	4.9	THR 105 OC1	PRO 141 CB	3.5	ALA 13 CB	PRO 8 CB	3.8	THR 105 OC1	SER 67 CB	4.4
GLY 107 OT1	TYR 140 OH	4.6	LEU 106A CD2	LYS 110 CB	4.8	SER 14 OG	GLN 100 OE1	3.9	LEU 107 CD1	SER 278 CB	4.0
			LEU 106A OXT	TYR 140 OH	4.4	ASP 17 OD2	THR 5 CC2	2.9	LEU 107 CD1	ASN 66 OD1	3.5
						ASP 17 CC	SER 7 OC	3.7			
						ASP 17 OD1	GLN 24 NEZ	3.8			
						ARG 18 CB	THR 23 CC2	3.3			
						ARG 18 THR	GLU 20 OE1	2.7			
						LYS 107 OXT	SER 9 OC	3.2			
						LYS 107 OXT	GLN 100 OE1	4.7			

Cuadro 5.5 Se muestran algunos de los contactos que se producen en la interfase V/C de las cadenas ligeras Fab Hil y Cle y los contactos dímero-dímero en los arreglos helicoidales de Wil y Bre, y se ven la coincidencia de estos residuos con los de la interfase V/C y algunos de la interfase dímero-dímero de V $\lambda$ 6aJL2.

Se observó que algunos de los residuos que participan en la interfase de contacto entre dímeros en las hélices de V $\lambda$ 6aJL2 y en los arreglos helicoidales de Bre, Wil, pertenecen a la superficie hidrofóbica de los dominios variables que forman la interfase entre dominios variables y constantes de las cadenas ligeras completas de varias inmunoglobulinas (Nieba, *et al.*, 1997) (Cuadro 5.5). Entre estos residuos están las posiciones 8 y 9, 80-85 y 103-105 y corresponden a las regiones naranja en la figura 5.25.

Se calcularon las superficies de contacto de las interfases V/C de cadenas ligeras del Fab Hil, Mcg, Cle y Loc. Dichas superficies muestran dimensiones aproximadas a lo que

correspondería ser la contribución de cerca de una tercera parte, a la interfase entre dímeros en la hélice de V $\lambda$ 6aJL2 (Figura 5.25).

Como ya se mencionó, existen muchos tipos de interacciones que pueden estabilizar una estructura periódica (Stevens, *et al.*, 1995, Steinrauf, *et al.*, 1999, Inouye, *et al.*, 2002). Las interacciones entre dímeros en las hélices de Wil y Bre (Figura 5.23) y las que se dan en la hélice de V $\lambda$ 6aJL2 sugieren que existen distintas maneras de lograr un arreglo periódico helicoidal. Aunque existan propiedades muy similares entre los arreglos fibrilares, es un error pensar que todos se generan del mismo modo. V $\lambda$ 6aJL2 al igual que Wil –como se menciona en la introducción- provienen de la

línea germinal  $\lambda 6a$ , pese a ello, exhiben características distintas que

repercuten ligeramente en el arreglo cristalino que forman.

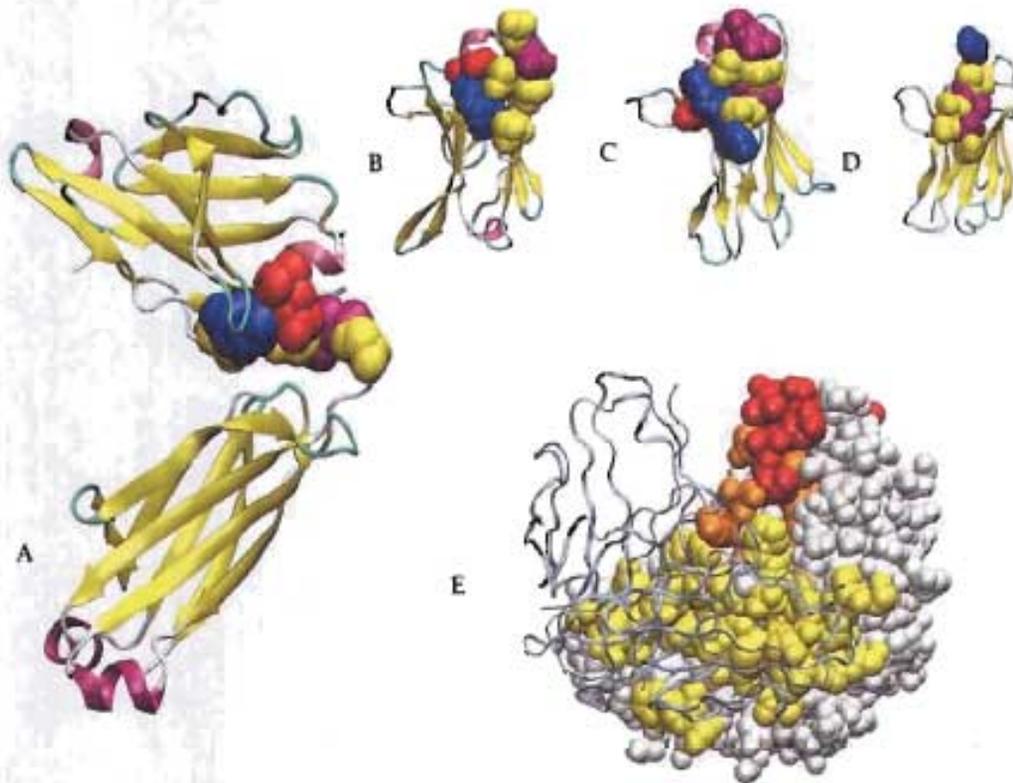


Figura 5.25 (a) Muestra la cadena ligera de C1e con los residuos del dominio variables que participan en la interfase V/C. (b), (c) y (d) Muestran los dominios variables W11, V $\lambda$ 6aJL2 y Bre, respectivamente con los residuos coincidentes correspondientes a la interfase V/C que participan en la interfase dímero-dímero en sus respectivos arreglos helicoidales. (Residuos 8-12, 105-107, y 80 según el código de color especificado en la figura 6.6. (e) Muestra la superficie de contacto en la hélice de V $\lambda$ 6aJL2, en amarillo y naranja, este último corresponde a los residuos de la interfase V/C que participan en los contactos dímero-dímero en la hélice. En rojo se muestran el resto de los residuos de la superficie V/C que no participan en la superficie dímero-dímero.

Según los análisis de fibrilogénesis *in vitro* realizados por Del Pozo, *et al.*, se ha visto que V $\lambda$ 6aJL2 es la menos amiloidogénica de todos los dominios V $\lambda$ 6a analizados (Del Pozo, *et al.*, en preparación) debido a que no contiene muchas de las mutaciones que se asocian con la formación de fibras; sin embargo, muchas de las posiciones a las que corresponderían

éstas, se ven claramente dispuestas en las superficies de los dímeros que

conforman la hélice, así como en la superficie de ésta.

## 6 Conclusiones

La hélice cristalina de Vλ6aJL2 es posible gracias a la asociación dimérica con simetría 2 de dominios V<sub>L</sub>. La constitución de este dímero por dos monómeros idénticos, propicia el arreglo helicoidal al permitir la formación de la cavidad de inserción de la His8 para formar la interacción estabilizadora con el Asp85. Este arreglo es posible también, gracias a la distribución de residuos que favorecen la formación de fibras y característicos de la línea germinal, a lo largo de la superficie del dímero. La complementariedad de superficie que muestra la interfase dímero-dímero en la hélice cristalina, se ve afectada por la sustitución de la His8 por Pro, impidiendo la formación de enlaces entre residuos distintivos de la línea germinal.

La participación importantísima de los residuos distintivos de la línea germinal y de las posiciones que favorecen la formación de fibras, en la estructuración de hélice, las dimensiones del diámetro de las hélices, y de su longitud de paso, así como el arreglo perpendicular de las cadenas β a lo largo de su eje, sugieren que la hélice cristalina pudiera ser un simulacro de la fibra patológica que forma Vλ6aJL2. Es muy posible que el dímero sea el elemento de nucleación ya que favorece la distribución de los

residuos que están implicados en la fibrillogénesis en toda su superficie -

no en el interior del dominio o en la interfase monómero monómero-, apoyando la hipótesis planteada por Stevens que la estabilidad del dominio variable no tendría por qué verse afectada (Stevens, *et al.*, 1995) y por lo tanto, la fibra estaría constituida por monómeros en una conformación muy cercana a la nativa. Por otro lado, el dímero es el complejo oligomérico primario de estabilización del dominio variable.

### 6.1 Modelo de formación del arreglo helicoidal fibrilar de Vλ6aJL2

De acuerdo a las propiedades de la hélice observada en los cristales de Vλ6aJL2, se propone un modelo para la formación de fibras por Vλ6aJL2.

Para explicar la fibrillogénesis, el modelo jerárquico de ensamblaje (HAM por sus siglas en inglés) propone que el proceso se inicia con una polimerización por nucleación homogénea de un intermediario de plegamiento de las cadenas ligeras que da forma al primer precursor de la fibra, el protofilamento (Ionescu-Zanetti, *et al.*, 1999). Se ha propuesto también que la primera etapa en la formación de la fibra es el ensamblaje de oligómeros solubles como resultado de interacciones relativamente no-específicas

(Dobson, 2003) y que posteriormente se agregan en estados pre-fibrilares como protofilamentos.

Para el caso de la fibra de V $\lambda$ 6aJL2 se propone que el intermediario de plegamiento es el dímero V<sub>L</sub>V<sub>L</sub> y a partir de él se da la nucleación. El primer paso sería entonces, al igual que en el modelo propuesto por Stevens (Stevens, *et al.*, 1995): la asociación de dos dominios nativos V<sub>L</sub> para formar un dímero no covalente pero con interacciones específicas, relacionado por una simetría 2. En contraste con el modelo mencionado, subsecuentemente, los dímeros se van asociando con una simetría 4<sub>1</sub> para formar polímeros filamentosos no-covalentes; de tal modo que el protofilamento sea un arreglo helicoidal -favorecido por las interacciones y las orientaciones que ostentan varios de los residuos característicos de la línea germinal y del dominio en particular- alrededor de un eje conductor gobernado por el anclaje la His8 al dímero vecino, y su interacción con el Asp85 y por la interacción de van deer Wals con la His8 vecina. Tal arreglo se favorece también por la formación del puente salino en la superficie de la hélice entre la His95a y el Glu50.

Se ha propuesto que los estadios fibrilares primarios de la fibrillogénesis son menos estables que la fibra madura debido a la escases de cavidades de exclusión de solvente en las primeras y que se ven incrementadas en la formación de agregados fibrilares maduros (Foguel and Silva, 2004). En este

sentido la estructura fibrilar formada por V $\lambda$ 6aJL2 tendría mayor estabilidad, ya que la orientación de la Tyr47 y el Glu50 permitiría entablar interacciones con otros protofilamentos compactando la zona de la interacción His8-Asp85 y favorecería a su alrededor una cavidad de exclusión de solvente mayor (Figura 5.24).

## PERSPECTIVAS

La difracción de fibras ofrecerá información crucial para comprobar las hipótesis, que se proponen aquí sobre el agregado fibrilar de V $\lambda$ 6aJL2. Las características que la hélice de V $\lambda$ 6aJL2 ostenta, tanto en la longitud del motivo helicoidal, como en su diámetro, podrán comprobarse al realizar la difracción de las fibras que este dominio forma *in vitro*.

A partir de los estudios a realizar por difracción de fibras podrá comprobarse el arreglo de las cadenas  $\beta$  que se ha propuesto para la hélice de V $\lambda$ 6aJL2 y cotejarse los espaciamientos entre ellas y sus longitudes, así como la disposición de los dímeros a lo largo de la hélice. Por otro lado, podrá verse el alto orden interno de la fibra y así comprobar el arreglo simétrico, altamente organizado de los residuos característicos de la línea

germinal que se ha propuesto. Quedará por evaluar otras características de las fibras amiloideas de V $\lambda$ 6aJL2 como son el empaquetamiento entre los protofilamentos y su cantidad en el agregado amiloide, así como el espaciado entre estos debido a la presencia de asas que unan el núcleo de la estructura  $\beta$ .

Por otro lado, los experimentos de alta presión hidrostática aplicados a las fibras amiloideas, así como experimentos de dicroísmo circular podrían dar una perspectiva adicional a la naturaleza conformacional del componente de las fibras de V $\lambda$ 6aJL2

No hay que olvidar, desde luego que tanto las fibras *in vitro* como una fibra cristalina, pueden representar una realidad parcial del fenómeno de los agregados amiloides. La fibra en particular puede ser producto únicamente de la proteína, pero el que estas se den depende también de los patrones anatómicos y temporales regidos por factores tejido-específicos que se entremezclan para favorecer la nucleación. Hasta que no se puedan hacer análisis estructurales de la fibra amiloide *in situ*, las preguntas sobre las características globales de las fibras amiloides quedarán pendientes.

#### Bibliografía

1. A.T.Brunger, P.D.A., G.M.Clore, W.L.Delano, P.Gros, R.W.Grosse-Kunstleve, J.-S.Jiang, J.Kuszewski, M.Nilges, N.S.Pannu, R.J.Read, L.M.Rice, T.Simonson, G.L.Warren (1998) Crystallography & NMR System. *Acta Cryst.* D54 905-921.
2. Al-Lazikani, B., Lesk, A.M.andChothia, C. (1997) Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins. *J Mol Biol.* 273 (4):927-48.
3. Bellotti, V., Mangione, P.andMerlini, G. (2000) Review: immunoglobulin light chain amyloidosis—the archetype of structural and pathogenic variability. *J Struct Biol.* 130 (2-3):280-9.
4. Bergfors, T.M. (1999) Protein Crystallization. International University Line.La Jolla, USA.
5. Bitan, G., Vollers, S.S.andTeplow, D.B. (2003) Elucidation of primary structure elements controlling early amyloid beta-protein oligomerization. *J Biol Chem.* 278 (37):34882-9.
6. Bitan, G., Kirkitadze, M.D., Lomakin, A., Vollers, S.S., Benedek, G.B.andTeplow, D.B. (2003) Amyloid beta - protein (A $\beta$ ) assembly: A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42 oligomerize through distinct pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100 (1):330-5.
7. Blundell, T.L.a.L.N.J. (1976) Protein Crystallography. Academic Press.New York, USA.
8. Bousset, L., Thomson, N.H., Radford, S.E.andMelki, R. (2002) The yeast prion Ure2p retains its native alpha-helical conformation upon assembly into protein fibrils in vitro. *Embo J.* 21 (12):2903-11.
9. Brünger, A. (1992) Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature.* 355 472-475.
10. Brünger, A., Kuriyan, J., Karplus, M. (1987) Crystallographic R factor refinement by molecular dynamics. *Science.* 235 458-460.
11. Caughey, B.andLansbury, P.T. (2003) Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. *Annu Rev Neurosci.* 26 267-98.
12. CCP4 (1994) The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 50 (Pt 5):760-3.
13. Chaudhry, C., Horwich, A.L., Brunger, A.T.andAdams, P.D. (2004) Exploring the structural dynamics of the E.coli chaperonin GroEL using translation-libration-screw crystallographic refinement of intermediate states. *J Mol Biol.* 342 (1):229-45.
14. Chen, Z., Blanc, E.andChapman, M.S. (1999) Improved free R factors for cross-validation of macromolecular structure - importance for real-space refinement. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 55 (Pt 1) 219-24.
15. Chothia, C., Gelfand, LandKister, A. (1998) Structural determinants in the sequences of immunoglobulin variable domain. *J Mol Biol.* 278 (2):457-79.
16. Chothia, C. (1973) Conformation of twisted beta-pleated sheets in proteins. *J Mol Biol.* 75 (2):295-302.
17. Chothia, C., Novotny, J., Brucoleri, R.andKarplus, M. (1985) Domain association in immunoglobulin molecules. The packing of variable domains. *J Mol Biol.* 186 (3):651-63.
18. Colman, P.M., Epp, O., Fehlhammer, H., Bode, W., Schiffer, M., Lattman, E.E., Jones, T.A.andPalm, W. (1974) X-ray studies on antibody fragments. *FEBS Lett.* 44 (2):194-9.
19. Colon, W., Kelly, J. W. (1992) Partial denaturation of transthyretin is sufficient for amyloid fibril formation in vitro. *Biochemistry.* 31 (36):8654-60.

germinal que se ha propuesto. Quedará por evaluar otras características de las fibras amiloideas de V $\lambda$ 6aJL2 como son el empaquetamiento entre los protofilamentos y su cantidad en el agregado amiloide, así como el espaciado entre estos debido a la presencia de asas que unan el núcleo de la estructura  $\beta$ .

Por otro lado, los experimentos de alta presión hidrostática aplicados a las fibras amiloideas, así como experimentos de dicroísmo circular podrían dar una perspectiva adicional a la naturaleza conformacional del componente de las fibras de V $\lambda$ 6aJL2

No hay que olvidar, desde luego que tanto las fibras *in vitro* como una fibra cristalina, pueden representar una realidad parcial del fenómeno de los agregados amiloides. La fibra en particular puede ser producto únicamente de la proteína, pero el que estas se den depende también de los patrones anatómicos y temporales regidos por factores tejido-específicos que se entremezclan para favorecer la nucleación. Hasta que no se puedan hacer análisis estructurales de la fibra amiloide *in situ*, las preguntas sobre las características globales de las fibras amiloides quedarán pendientes.

#### Bibliografía

1. A.T.Brunger, P.D.A., G.M.Clore, W.L.Delano, P.Gros, R.W.Grosse-Kunstleve, J.-S.Jiang, J.Kuszewski, M.Nilges, N.S.Pannu, R.J.Read, L.M.Rice, T.Simonson, G.L.Warren (1998) Crystallography & NMR System. *Acta Cryst.* D54 905-921.

2. Al-Lazikani, B., Lesk, A.M.andChothia, C. (1997) Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins. *J Mol Biol.* 273 (4):927-48.
3. Bellotti, V., Mangione, P.andMerlini, G. (2000) Review: immunoglobulin light chain amyloidosis—the archetype of structural and pathogenic variability. *J Struct Biol.* 130 (2-3):280-9.
4. Bergfors, T.M. (1999) Protein Crystallization. International University Line.La Jolla, USA.
5. Bitan, G., Vollers, S.S.andTeplow, D.B. (2003) Elucidation of primary structure elements controlling early amyloid beta-protein oligomerization. *J Biol Chem.* 278 (37):34882-9.
6. Bitan, G., Kirkitadze, M.D., Lomakin, A., Vollers, S.S., Benedek, G.B.andTeplow, D.B. (2003) Amyloid beta - protein (A $\beta$ ) assembly: A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42 oligomerize through distinct pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100 (1):330-5.
7. Blundell, T.L.a.L.N.J. (1976) Protein Crystallography. Academic Press.New York, USA.
8. Bousset, L., Thomson, N.H., Radford, S.E.andMelki, R. (2002) The yeast prion Ure2p retains its native alpha-helical conformation upon assembly into protein fibrils in vitro. *Embo J.* 21 (12):2903-11.
9. Brünger, A. (1992) Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature.* 355 472-475.
10. Brünger, A., Kuriyan, J., Karplus, M. (1987) Crystallographic R factor refinement by molecular dynamics. *Science.* 235 458-460.
11. Caughey, B.andLansbury, P.T. (2003) Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. *Annu Rev Neurosci.* 26 267-98.
12. CCP4 (1994) The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 50 (Pt 5):760-3.
13. Chaudhry, C., Horwich, A.L., Brunger, A.T.andAdams, P.D. (2004) Exploring the structural dynamics of the E.coli chaperonin GroEL using translation-libration-screw crystallographic refinement of intermediate states. *J Mol Biol.* 342 (1):229-45.
14. Chen, Z., Blanc, E.andChapman, M.S. (1999) Improved free R factors for cross-validation of macromolecular structure - importance for real-space refinement. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 55 (Pt 1) 219-24.
15. Chothia, C., Gelfand, LandKister, A. (1998) Structural determinants in the sequences of immunoglobulin variable domain. *J Mol Biol.* 278 (2):457-79.
16. Chothia, C. (1973) Conformation of twisted beta-pleated sheets in proteins. *J Mol Biol.* 75 (2):295-302.
17. Chothia, C., Novotny, J., Brucoleri, R.andKarplus, M. (1985) Domain association in immunoglobulin molecules. The packing of variable domains. *J Mol Biol.* 186 (3):651-63.
18. Colman, P.M., Epp, O., Fehlhammer, H., Bode, W., Schiffer, M., Lattman, E.E., Jones, T.A.andPalm, W. (1974) X-ray studies on antibody fragments. *FEBS Lett.* 44 (2):194-9.
19. Colon, W., Kelly, J. W. (1992) Partial denaturation of transthyretin is sufficient for amyloid fibril formation in vitro. *Biochemistry.* 31 (36):8654-60.

20. Dasgupta, S., Iyer, G.H., Bryant, S.H., Lawrence, C.E. and Bell, J.A. (1997) Extent and nature of contacts between protein molecules in crystal lattices and between subunits of protein oligomers. *Proteins*. 28 (4):494-514.
21. Dauter, Z. (1999) Data-collection strategies. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 55 (Pt 10) 1703-17.
22. Dobson, C.M. (2001) Protein folding and its links with human disease. *Biochem Soc Symp.* (68):1-26.
23. Dobson, C.M. (1999) Protein misfolding, evolution and disease. *Trends Biochem Sci*. 24 (9):329-32.
24. Dobson, C.M. (2003) Protein folding and misfolding. *Nature*. 426 (6968):884-90.
25. Dobson, C.M. and Karplus, M. (1999) The fundamentals of protein folding: bringing together theory and experiment. *Curr Opin Struct Biol*. 9 (1):92-101.
26. Dwulet, F.E., Strako, K. and Benson, M.D. (1985) Amino acid sequence of a lambda VI primary (AL) amyloid protein (WLT). *Scand J Immunol*. 22 (6):653-60.
27. Epp, O., Colman, P., Fehlhammer, H., Bode, W., Schiffer, M., Huber, R. and Palm, W. (1974) Crystal and molecular structure of a dimer composed of the variable portions of the Bence-Jones protein REL. *Eur J Biochem*. 45 (2):513-24.
28. Ferreira, S.T. and De Felice, F.G. (2001) PABMB Lecture. Protein dynamics, folding and misfolding: from basic physical chemistry to human conformational diseases. *FEBS Lett*. 498 (2-3):129-34.
29. Finney, J.L. (1977) The organization and function of water in protein crystals. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 278 (959):3-32.
30. Flocco, M.M. and Mowbray, S.L. (1994) Planar stacking interactions of arginine and aromatic side-chains in proteins. *J Mol Biol*. 235 (2):709-17.
31. Foguel, D. and Silva, J.L. (2004) New insights into the mechanisms of protein misfolding and aggregation in amyloidogenic diseases derived from pressure studies. *Biochemistry*. 43 (36):11361-70.
32. Gelfand, I.M. and Kister, A.E. (1995) Analysis of the relation between the sequence and secondary and three-dimensional structures of immunoglobulin molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92 (24):10884-8.
33. Glasser Dent, L.S. (2001) Symmetry. Electrónica. International Union of Crystallography by University College Cardiff Press. Cardiff, Wales.
34. Guijarro, J.L., Sunde, M., Jones, J.A., Campbell, I.D. and Dobson, C.M. (1998) Amyloid fibril formation by an SH3 domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95 (8):4224-8.
35. Helms, L.R. and Wetzel, R. (1996) Specificity of abnormal assembly in immunoglobulin light chain deposition disease and amyloidosis. *J Mol Biol*. 257 (1):77-86.
36. Horwich, A. (2002) Protein aggregation in disease: a role for folding intermediates forming specific multimeric interactions. *J Clin Invest*. 110 (9):1221-32.
37. Huang, D.B., Ainsworth, C., Solomon, A. and Schiffer, M. (1996) Pitfalls of molecular replacement: the structure determination of an immunoglobulin light-chain dimer. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 52 (Pt 6):1058-66.
38. Huang, D.B., Ainsworth, C.F., Stevens, F.J. and Schiffer, M. (1996) Three quaternary structures for a single protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93 (14):7017-21.
39. Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten, K. (1996) VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph*. 14 (1):33-8, 27-8.
40. Hurler, M.R., Helms, L.R., Li, L., Chan, W. and Wetzel, R. (1994) A role for destabilizing amino acid replacements in light-chain amyloidosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91 (12):5446-50.
41. Inouye, H., Bond, J.E., Deverin, S.P., Lim, A., Costello, C.E. and Kirschner, D.A. (2002) Molecular organization of amyloid protofilament-like assembly of betabellin 15D: helical array of beta-sandwiches. *Biophys J*. 83 (3):1716-27.
42. Ionescu-Zanetti, C., Khurana, R., Gillespie, J.R., Petrick, J.S., Trabachino, L.C., Minert, L.J., Carter, S.A. and Fink, A.L. (1999) Monitoring the assembly of Ig light-chain amyloid fibrils by atomic force microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96 (23):13175-9.
43. Isobe, T. and Osseerman, E.F. (1974) Plasma cell dyscrasia associated with the production of incomplete (deleted) IgG lambda molecules, gamma heavy chains, and free lambda chains containing carbohydrate: description of the first case. *Blood*. 43 (4):505-26.
44. Isobe, T. and Osseerman, E.F. (1974) Patterns of amyloidosis and their association with plasma-cell dyscrasia, monoclonal immunoglobulins and Bence-Jones proteins. *N Engl J Med*. 290 (9):473-7.
45. Janeway, C.A., Travers, M.W., Shlomchik, M. (2001) Immunobiology: The immune system in health and disease. 5th. Garland Publishing, New York, USA.
46. Janin, J. (1997) Specific versus non-specific contacts in protein crystals. *Nat Struct Biol*. 4 (12):973-4.
47. Jelinski, L. (1999) Chapter 7: Biologically Related Aspects of Nanoparticles, Nanostructured Materials, and Nanodevices. WTEC, Loyola College in Maryland.
48. Jimenez, J.L., Guijarro, J.L., Orlova, E., Zurdo, J., Dobson, C.M., Sunde, M. and Saibil, H.R. (1999) Cryo-electron microscopy structure of an SH3 amyloid fibril and model of the molecular packing. *Embo J*. 18 (4):815-21.
49. Kabat, E.A., Wu, T.T. and Bilofsky, H. (1979) Evidence supporting somatic assembly of the DNA segments (minigenes), coding for the framework, and complementarity-determining segments of immunoglobulin variable regions. *J Exp Med*. 149 (6):1299-313.
50. Khurana, R., Ionescu-Zanetti, C., Pope, M., Li, J., Nielson, L., Ramirez-Alvarado, M., Regan, L., Fink, A.L. and Carter, S.A. (2003) A general model for amyloid fibril assembly based on morphological studies using atomic force microscopy. *Biophys J*. 85 (2):1135-44.
51. Khurana, R., Gillespie, J.R., Talapatra, A., Minert, L.J., Ionescu-Zanetti, C., Millett, I. and Fink, A.L. (2001) Partially folded intermediates as critical precursors of light chain amyloid fibrils and amorphous aggregates. *Biochemistry*. 40 (12):3525-35.
52. Khurana, R., Souillac, P.O., Coats, A.C., Minert, L., Ionescu-Zanetti, C., Carter, S.A., Solomon, A. and Fink, A.L. (2003) A model for amyloid fibril formation in immunoglobulin light chains based on comparison of amyloidogenic and benign proteins and specific antibody binding. *Amyloid*. 10 (2):97-109.

53. Kisilevsky, R. (2000) Review: amyloidogenesis-  
unquestioned answers and unanswered questions. *J Struct Biol.* 130 (2-3):99-108.
54. Kleywegt, G.J., and Jones, T.A. (1995) Where  
freedom is given, liberties are taken. *Structure.*  
3 535-540.
55. Lai, Z., Colon, W. and Kelly, J.W. (1996) The acid-  
mediated denaturation pathway of transthyretin yields  
a conformational intermediate that can self-assemble  
into amyloid. *Biochemistry.* 35 (20):6470-82.
56. Lashuel, H.A., Hartley, D., Petre, B.M., Walz,  
T. and Lansbury, P.T., Jr. (2002) Neurodegenerative  
disease: amyloid pores from pathogenic mutations.  
*Nature.* 418 (6895):291.
57. Laurine, E., Gregoire, C., Fandrich, M., Engemann,  
S., Marchal, S., Thion, L., Mohr, M., Monsarrat, B.,  
Michel, B., Dobson, C.M., Wanker, E., Erard,  
M. and Verdier, J.M. (2003) Lithostathine quadruple-  
helical filaments form proteinase K-resistant deposits in  
Creutzfeldt-Jakob disease. *J Biol Chem.* 278 (51):51770-8.
58. Leslie, A.G. (1999) Integration of macromolecular  
diffraction data. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 55  
(Pt 10) 1696-702.
59. Lopez De La Paz, M., Goldie, K., Zurdo, J., Lacroix,  
E., Dobson, C.M., Hoenger, A. and Serrano, L. (2002) De  
novo designed peptide-based amyloid fibrils. *Proc Natl  
Acad Sci U S A.* 99 (25):16052-7.
60. Louis, J.M., Byeon, L.J., Baxa, U. and Gronenborn,  
A.M. (2005) The GB1 amyloid fibril: recruitment of the  
peripheral beta-strands of the domain swapped dimer  
into the polymeric interface. *J Mol Biol.* 348 (3):687-98.
61. Mair, S.L. (1980) Temperature dependence of the  
anharmonic Debye-Waller factor. *J. Phys. C: Solid State  
Phys.* 13 2857-2868.
62. Mathews, B. (1997) Recent transformations in  
structural biology. *In Methods in Enzymology.* 276.
63. Nieba, L., Honegger, A., Kribber, C. and Pluckthun,  
A. (1997) Disrupting the hydrophobic patches at the  
antibody variable/constant domain interface: improved  
in vivo folding and physical characterization of an  
engineered scFv fragment. *Protein Eng.* 10 (4):435-44.
64. Pauling, L. and Corey, R.B. (1951) The pleated sheet,  
a new layer configuration of polypeptide chains. *Proc  
Natl Acad Sci U S A.* 37 (5):251-6.
65. Pauling, L. and Corey, R.B. (1951) Configuration of  
polypeptide chains. *Nature.* 168 (4274):550-1.
66. Pepys, M.B., Tennent, G.A., Booth, D.R., Bellotti, V.,  
Lovat, L.B., Tan, S.Y., Persey, M.R., Hutchinson, W.L.,  
Booth, S.E., Madhoo, S., Soutar, A.K., Hawkins, P.N.,  
Van Zyl-Smit, R., Campistol, J.M., Fraser, P.E., Radford,  
S.E., Robinson, C.V., Sunde, M., Serpell, L.C. and Blake,  
C.C. (1996) Molecular mechanisms of fibrillogenesis  
and the protective role of amyloid P component: two  
possible avenues for therapy. *Ciba Found Symp.* 199 73-  
81; discussion 81-9.
67. Per Hammarstrom, R.L.W., Evan T.  
Powers, and Kelly, J.W. (2003) Prevention of  
Transthyretin  
Amyloid Disease by Changing  
Protein Misfolding Energetics. *Science.* 299 713-716.
68. Perfetti, V., Colli Vignarelli, M., Anesi, E., Garini, P.,  
Quaglini, S., Ascari, E. and Merlini, G. (1999) The  
degrees of plasma cell clonality and marrow infiltration  
adversely influence the prognosis of AL amyloidosis  
patients. *Haematologica.* 84 (3):218-21.
69. Perfetti, V., Casarini, S., Palladini, G., Vignarelli,  
M.C., Klersy, C., Diegoli, M., Ascari, E. and Merlini, G.  
(2002) Analysis of V(lambda)-J(lambda) expression in  
plasma cells from primary (AL) amyloidosis and  
normal bone marrow identifies 3r (lambdaIII) as a new  
amyloid-associated germline gene segment. *Blood.* 100  
(3):948-53.
70. Perfetti, V., Ubbiali, P., Vignarelli, M.C., Diegoli, M.,  
Fasani, R., Stoppini, M., Lisa, A., Mangione, P., Obici,  
L., Arbustini, E. and Merlini, G. (1998) Evidence that  
amyloidogenic light chains undergo antigen-driven  
selection. *Blood.* 91 (8):2948-54.
71. Plakoutsi, G., Taddei, N., Stefani, M. and Chiti, F.  
(2004) Aggregation of the Acylphosphatase from  
Sulfolobus solfataricus: the folded and partially  
unfolded states can both be precursors for amyloid  
formation. *J Biol Chem.* 279 (14):14111-9.
72. Pokkuluri, P.R., Raffin, R., Dieckman, L., Boogaard,  
C., Stevens, F.J. and Schiffer, M. (2002) Increasing protein  
stability by polar surface residues: domain-wide  
consequences of interactions within a loop. *Biophys J.* 82  
(1 Pt 1):391-8.
73. Pokkuluri, P.R., Solomon, A., Weiss, D.T., Stevens,  
F.J. and Schiffer, M. (1999) Tertiary structure of human  
lambda 6 light chains. *Amyloid.* 6 (3):165-71.
74. Potapov, V., Sobolev, V., Edelman, M., Kister,  
A. and Gelfand, I. (2004) Protein-protein recognition:  
juxtaposition of domain and interface cores in  
immunoglobulins and other sandwich-like proteins. *J  
Mol Biol.* 342 (2):665-79.
75. Powell, H.R. (1999) The Rossmann Fourier  
autoindexing algorithm in MOSFLM. *Acta Crystallogr D  
Biol Crystallogr.* 55 (Pt 10) 1690-5.
76. Raffin, R., Dieckman, L.J., Szpunar, M., Wunschl,  
C., Pokkuluri, P.R., Dave, P., Wilkins Stevens, P., Cai,  
X., Schiffer, M. and Stevens, F.J. (1999) Physicochemical  
consequences of amino acid variations that contribute  
to fibril formation by immunoglobulin light chains.  
*Protein Sci.* 8 (3):509-17.
77. Rhodes, G. (2000) Crystallography made crystal  
clear: a guide for users of macromolecular models. 2nd.  
Academic Press. San Diego, Calif.
78. Richardson, J.S. and Richardson, D.C. (2002) Natural  
beta-sheet proteins use negative design to avoid edge-  
to-edge aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99  
(5):2754-9.
79. Rossmann, M.G. (2001) Molecular replacement-  
historical background. *Acta Crystallogr D Biol  
Crystallogr.* 57 (Pt 10):1360-6.
80. Rousseau, F., Schymkowitz, J.W., Wilkinson,  
H.R. and Itzhaki, L.S. (2001) Three-dimensional domain  
swapping in p13suc1 occurs in the unfolded state and is  
controlled by conserved proline residues. *Proc Natl  
Acad Sci U S A.* 98 (10):5596-601.
81. Rudino-Pinera, E., Morales-Arrieta, S., Rojas-Trejo,  
S.P. and Horjales, E. (2002) Structural flexibility, an  
essential component of the allosteric activation in  
Escherichia coli glucosamine-6-phosphate deaminase.  
*Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 58 (Pt 1):10-20.
82. Sands, D. (1975) Introduction to crystallography.  
Dover Publications Inc. USA.
83. Saul, F.A. and Poljak, R.J. (1992) Crystal structure of  
human immunoglobulin fragment Fab New refined at  
2.0 Å resolution. *Proteins.* 14 (3):363-71.

84. Schiffer, M., Girling, R.L., Ely, K.R. and Edmundson, A.B. (1973) Structure of a lambda-type Bence-Jones protein at 3.5-Å resolution. *Biochemistry*. 12 (23):4620-31.
85. Schiffer, M., Ainsworth, C., Xu, Z.B., Carperos, W., Olsen, K., Solomon, A., Stevens, F.J. and Chang, C.H. (1989) Structure of a second crystal form of Bence-Jones protein. Loc: strikingly different domain associations in two crystal forms of a single protein. *Biochemistry*. 28 (9):4066-72.
86. Schomaker, V.T., K.N (1967) On the rigid-body motions of molecules in crystals. *Acta Cryst.* B24 63-76.
87. Schormann, N., Murrell, J.R., Liepnieks, J.J. and Benson, M.D. (1995) Tertiary structure of an amyloid immunoglobulin light chain protein: a proposed model for amyloid fibril formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92 (21):9490-4.
88. Serpell, L.C., Sunde, M. and Blake, C.C. (1997) The molecular basis of amyloidosis. *Cell Mol Life Sci*. 53 (11-12):871-87.
89. Serpell, L.C., Sunde, M., Benson, M.D., Tennent, G.A., Pepys, M.B. and Fraser, P.E. (2000) The protofilament substructure of amyloid fibrils. *J Mol Biol*. 300 (5):1033-9.
90. Shapiro, L., Fannon, A.M., Kwong, P.D., Thompson, A., Lehmann, M.S., Grubel, G., Legrand, J.F., Als-Nielsen, J., Colman, D.R. and Hendrickson, W.A. (1995) Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature*. 374 (6520):327-37.
91. Shirahama, T. and Cohen, A.S. (1967) High-resolution electron microscopic analysis of the amyloid fibril. *J Cell Biol*. 33 (3):679-708.
92. Shirahama, T., Benson, M.D., Cohen, A.S. and Tanaka, A. (1973) Fibrillar assemblage of variable segments of immunoglobulin light chains: an electron microscopic study. *J Immunol*. 110 (1):21-30.
93. Sibsankar Kundu, J.S.M., Dan C. Sorensen, and George N. Phillips Jr. (2002) Dynamics of Proteins in Crystals: Comparison of Experiment with Simple Models. *Biophysics Journal*. 83 (2):723-732.
94. Sipe, J.D. and Cohen, A.S. (2000) Review: history of the amyloid fibril. *J Struct Biol*. 130 (2-3):88-98.
95. Solomon, A., Frangione, B. and Franklin, E.C. (1982) Bence Jones proteins and light chains of immunoglobulins. Preferential association of the V lambda VI subgroup of human light chains with amyloidosis AL (lambda). *J Clin Invest*. 70 (2):453-60.
96. Solomon, A. and Weiss, D.T. (1995) Structural and functional properties of human lambda-light-chain variable-region subgroups. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2 (4):387-94.
97. Stefani, M. (2004) Protein misfolding and aggregation: new examples in medicine and biology of the dark side of the protein world. *Biochim Biophys Acta*. 1739 (1):5-25.
98. Stefani, M. and Dobson, C.M. (2003) Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. *J Mol Med*. 81 (11):678-99.
99. Steinrauf, L.K., Chiang, M.Y. and Shiu, D. (1999) Molecular structure of the amyloid-forming protein kappa I Bre. *J Biochem (Tokyo)*. 125 (2):422-9.
100. Stevens, F.J., Myatt, E.A., Chang, C.H., Westholm, F.A., Eulitz, M., Weiss, D.T., Murphy, C., Solomon, A. and Schiffer, M. (1995) A molecular model for self-assembly of amyloid fibrils: immunoglobulin light chains. *Biochemistry*. 34 (34):10697-702.
101. Sunde, M. and Blake, C. (1997) The structure of amyloid fibrils by electron microscopy and X-ray diffraction. *Adv Protein Chem*. 50 123-59.
102. Sunde, M., Serpell, L.C., Bartlam, M., Fraser, P.E., Pepys, M.B. and Blake, C.C. (1997) Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction. *J Mol Biol*. 273 (3):729-39.
103. T.A. Jones, M.B.M.K. (1990) O: A macromolecular modeling environment. In: *Crystallographic and Modeling Methods in Molecular Design*. 189-195.
104. Terwilliger, T.C. and Berendzen, J. (1999) Automated MAD and MR structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 55 (Pt 4) 849-61.
105. Uversky, V.N. and Fink, A.L. (2004) Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded. *Biochim Biophys Acta*. 1698 (2):131-53.
106. Uversky, V.N. (2003) A Protein-Chameleon: Conformational Plasticity of  $\alpha$ -Synuclein, a Disordered Protein Involved in Neurodegenerative Disorders. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*. 21 (2): 211-234.
107. Wall, J., Schell, M., Murphy, C., Hrnčić, R., Stevens, F.J. and Solomon, A. (1999) Thermodynamic instability of human lambda 6 light chains: correlation with fibrillogenicity. *Biochemistry*. 38 (42):14101-8.
108. Wood, S.J., Wetzel, R., Martin, J.D. and Hurle, M.R. (1995) Prolines and amyloidogenicity in fragments of the Alzheimer's peptide beta/A4. *Biochemistry*. 34 (3):724-30.
109. Zhang, S., Iwata, K., Lachenmann, M.J., Peng, J.W., Li, S., Stimson, E.R., Lu, Y., Felix, A.M., Maggio, J.E. and Lee, J.P. (2000) The Alzheimer's peptide  $\beta$  adopts a collapsed coil structure in water. *J Struct Biol*. 130 (2-3):130-41.
110. Zhu, M., Han, S., Zhou, F., Carter, S.A. and Fink, A.L. (2004) Annular oligomeric amyloid intermediates observed by in situ atomic force microscopy. *J Biol Chem*. 279 (23):24452-9.

## Apéndice I

### Purificación y cristalización de la enzima 5-aminolevulinato sintasa (HemA)

*La enzima 5-aminolevulinato sintasa  
(HemA)*

Las enzimas que participan en las vías metabólicas contemporáneas son biocatalizadores específicos eficientes. A veces las enzimas que participan en las diferentes rutas del metabolismo tienen estructuras y mecanismos catalíticos similares, lo que sugiere que evolucionaron a partir de una enzima precursora, ancestro común (Jurgens, 2000). Esta relación permite categorizar a dichos biocatalizadores en un número limitado de familias cuyos miembros poseen estructura o mecanismo catalítico similares o ambos (Gerl & Babbitt, 1998).

Uno de los grupos de enzimas más extendidos en la gama de reacciones del metabolismo es el de las enzimas dependientes de piridoxal fosfato (PLP). El PLP es uno de los cofactores más versátiles en la naturaleza. Las enzimas dependientes de PLP tienen un papel muy importante en el metabolismo de los aminoácidos y se encuentran en varias vías que van desde la interconversión de  $\alpha$ -aminoácidos -donde tienen un papel muy importante- hasta las de biosíntesis de antibióticos. La variedad que se observa en las reacciones químicas que se llevan a cabo por las enzimas pertenecientes a esta gran familia, ha llevado a la búsqueda de una

contraparte a nivel estructural que refleje esta gran diversidad. (Schneider, et al, 2000)

En los setentas, se propuso que las enzimas dependientes de PLP provenían de un ancestro común (Dunathan, 1974) relativamente inespecífico y capaz de catalizar reacciones químicas similares en diferentes vías metabólicas (Jensen, 1976). A partir de la evolución divergente de este ancestro, surgió un amplio espectro de reacciones en el metabolismo. Las nuevas funciones catalíticas pudieron haber surgido al retener la química de la catálisis mientras cambiaban la especificidad por el sustrato (Gerl & Babbitt, 1998).

Según el planteamiento evolutivo de Gerl y Babbitt todas las reacciones catalizadas por este tipo de enzimas tienen un paso en común y las variaciones se deben al control enzimático del intermediario quinoideo y a qué grupo unido al  $C\alpha$  del sustrato, se escinde. Así surgió una clasificación de estas enzimas con base en las características químicas de la reacción catalizada y se dividió a la superfamilia, en las clases  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , según el carbón involucrado en la reacción.

Goldsmith y sus colaboradores clasificaron a las enzimas dependientes de PLP en 5 diferentes tipos de

plegamiento (Grishin, 1995), tomando en cuenta el origen común propuesto por Dunathan y las diferencias en su secuencia primaria, la estructura secundaria predicha y a la información estructural disponible. Estos 5 grupos están representados por enzimas bien caracterizadas estructuralmente: el grupo de plegamiento tipo I, la familia aspartato aminotransferasa; el tipo II, la familia triptofano sintetasa  $\beta$ ; el tipo III, la familia alanina racemasa; el tipo IV, la familia D-amino ácidos y el tipo V, la familia de la glicógeno fosforilasa (con química distinta al resto de las PLP-dependientes) (Schneider, et al, 2000).

De la superfamilia de las PLP-dependientes se conocen 27 estructuras tridimensionales de las cuales, 18 son integrantes de la familia de plegamiento tipo I, por lo que es la mejor caracterizada estructuralmente (Schneider, et al, 2000).

Las enzimas pertenecientes a esta familia son activas como homodímeros aunque en algunos casos se ensamblan en complejos más grandes. Cada subunidad se pliega en dos dominios: uno grande cuya característica central es una hoja  $-\beta$  de siete cadenas; y uno pequeño que comprende la parte C-terminal de la cadena, y que se pliega en una hoja  $-\beta$  de tres o cuatro cadenas, cubierta por hélices  $\alpha$  a cada lado. La parte N-terminal no tiene un plegamiento común pero contribuye poco al dominio pequeño. El PLP se une covalentemente al dominio grande vía el  $\epsilon$ -grupo amino de la lisina en el N-terminal de una hélice corta que sigue a una lamina  $\beta$ . El fosfato de PLP se ancla al N-terminal de otra  $\alpha$ -hélice en el otro lado de la hoja  $-\beta$  y así, el anillo aromático del PLP se empaqueta en la vecindad de las láminas  $\beta$ . El sitio activo se encuentra ubicado entre los dos dominios, en la

interfase de las dos subunidades del dímero. Por lo tanto, algunos residuos de los dos dominios y de las dos subunidades están involucrados en la formación de los dos sitios activos y en la unión del cofactor (Schneider, et al, 2000).

Las enzimas dependientes de PLP utilizan el cofactor para facilitar el rompimiento heterolítico y específico de un enlace del  $C\alpha$  del aminoácido que se une covalentemente por base Schiff al cofactor. Los electrones del enlace roto se deslocalizan en el amino del PLP y residen principalmente en el anillo del cofactor formando un intermediario quinoideo.

A pesar de sus similitudes en plegamiento, sólo cinco segmentos correspondientes a las cadenas  $\beta$ -4,  $\beta$  7,  $\beta$  8,  $\beta$  9 y  $\beta$  10- son estrictamente sobrelapables entre estas enzimas. Esto condujo a una división en subclases de las cuales tres son subclases aminotransferasas. En las diferentes subclases que conforman a la familia tipo I, el sitio de unión a PLP es idéntico, aunque se ha visto que la lisina del sitio activo no se conserva estructuralmente. El único residuo conservado estructural y funcionalmente es un ácido aspártico que interactúa con el nitrógeno piridínico del PLP, lo que evidencia su importancia en la catálisis. Las interacciones enzima-cofactor, de gran importancia para el mecanismo catalítico en las aspartato aminotransferasas, así como el apilamiento del anillo piridínico y la red de enlaces hidrógeno en torno al oxígeno fenólico del PLP no se conservan. Esto sugiere que en las diferentes subclases se usan diferentes medios para llevar a cabo la catálisis. (Schneider, et al, 2000)

La enzima 5-aminolevulinato sintasa es una enzima dependiente de PLP que cataliza la condensación entre un aminoácido glicina y el ácido carboxílico de un tioesteres de CoA, succinil-CoA, descarboxilando a la glicina en su C $\alpha$  produciendo ácido 5-aminolevulínico (ALA).

ALA es un derivado aminoacídico de 5 carbonos que existe en todos los organismos vivos (XIE, et al, 2003) indispensable en la síntesis de tetrapirroles como la vitamina B12 y la clorofila (Jordan, 1991). Los tetrapirroles son necesarios en todos los organismos (Duncan, 1997) y la habilidad para producirlo es una de las características más distribuidas entre los seres vivos. Con la excepción del primer paso de la vía, los intermediarios de la protoporfirina a partir del ácido 5-aminolevulinico (ALA) parecen estar conservados entre todos los organismos productores de tetrapirroles aunque la naturaleza bioquímica de las enzimas individuales es muy variada (Woodard S., et al, 1995). La formación de ALA puede darse por dos vías distintas: la vía C4 o complejo glicina-succinil-CoA y la vía C5, en la cual se obtiene ALA a partir del glutamato. La primera se encuentra en la mayoría de los eucariontes (hongos, aves, protozoarios, mamíferos, invertebrados) -sin incluir a las plantas- y en las bacterias púrpura- $\alpha$  fotosintéticas no sulfurosas. La segunda, se encontró en un inicio en Archeobacterias, y se ha hallado también en la mayoría de las bacterias, en las plantas y en las algas (Woodard, S., et al, 1995).

En todos los organismos que utilizan la vía C4, como *Bradyrhizobium japonicum*, la 5-aminolevulinato sintasa (ALAS o HemA), codificada por el gene *hemA*, la enzima que cataliza la formación del 5-aminolevulinato. Esta

enzima pertenece a la subfamilia  $\alpha$  de enzimas dependientes de piridoxal fosfato (PLP) que catalizan condensaciones involucrando su C $\alpha$  en la reacción. A pesar de que las enzimas de esta familia son de importancia central en el metabolismo del hemo, la biotina, las ceramidas y los esfingolípidos, sus mecanismos enzimáticos aún no están completamente resueltos (ZHANG J & Ferreira G. 2002). Estructuralmente HemA se clasifica dentro del grupo de plegamiento tipo I de las enzimas dependientes de PLP, representado por la aspartato aminotransferasa.

La enzima HemA de *Bradyrhizobium japonicum* se compone de 409 aminoácidos y tiene un peso molecular de 44574 daltones.

#### *Mecanismo de reacción*

Con base en la estructura cristalográfica de la glucógeno fosforilasa b se ha deducido varias propiedades estructurales y funcionales de HemA, ya que ambas enzimas gozan de una estructura similar.

La gran disponibilidad de estructuras cristalinas de alta resolución de la aspartato aminotransferasa (AAT) y el conocimiento de las funciones de muchos de los residuos de su sitio activo, han permitido alineamientos de secuencia con HemA que han servido como herramientas eficientes para predecir las funciones de aminoácidos específicos en esta enzima. (Dongwei, et al, 1998(B))

Los estudios con ALAS de *Rhodobacter sphaereoides*, realizados por el grupo de Gloria Ferreira, han brindado información crítica para desarrollar el modelo del mecanismo catalítico de este tipo de enzimas. La condensación descarboxilativa llevada a cabo por ALAS procede, según estudios

cinéticos, de manera ordenada, empezando con la incorporación del cofactor, seguido de la posterior unión de glicina y culmina con la unión del succinil-CoA. Al completar la reacción se produce ALA y se liberan CoA y CO<sub>2</sub> (Zhang J & Ferreira G. 2002).

El primer paso en la función de la enzima es la formación de una aldimina interna entre ALAS y el PLP, por medio de una reacción autocatalítica. Se ha observado que las interacciones iónicas son muy importantes para la unión del PLP y la afinidad por éste es operativa a baja fuerza iónica (Whithing, 1975).

Existen muchos elementos estructurales asociados a la unión de este cofactor tan importante: en la unión del PLP está involucrado un ácido aspártico conservado que se localiza a una distancia de 30-40 aminoácidos en la dirección N-terminal de la lisina catalítica y que estructuralmente se encuentra a una distancia de fuerte interacción iónica con el anillo del cofactor. El Asp permite además, la formación del intermediario quinoideo y contribuye a la sustracción del protón que ocurre durante la catálisis. Gracias a su cadena lateral cargada negativamente estabiliza el estado protonado del anillo del PLP para que éste funcione como vertedero de electrones durante la catálisis. (Gong, et al, 1998)

Algunos alineamientos de ALAS muestran que estas enzimas comparten con otras enzimas dependientes de PLP un motivo rico en residuos de glicina (GXGXXG) en el dominio catalítico. Este motivo forma un asa entre una hoja  $\beta$  y una  $\alpha$ -hélice, que se une al piro-P del nucleótido del PLP vía una arginina conservada (Ferreira, 1995; Gong, et al, 1998). Se ha sugerido que las perturbaciones en este asa de glicina inducen cambios conformacionales y/o

alteraciones en la orientación del cofactor (Ferreira, 1995).

El primer paso del ciclo catalítico es la unión de la glicina: a pH 7.5 el sustrato glicina permanece poco protonada y su  $\alpha$ -NH<sub>3</sub> se puede asociar a la forma aldimina-protonada de ALAS (Zhang J & Ferreira G. 2002). Una arginina, también conservada, participa importantemente en el reconocimiento y la unión del sustrato glicina vía un enlace iónico entre su cadena lateral de guanidinio y el carboxilato del sustrato (Zhang J & Ferreira G. 2002; Shoolingin-Jordan, et al, 2003; Hunter G., et al, 1999). Dicha arginina se ha identificado como uno de los 4 residuos conservados en todas las AAT. En ALAS este aminoácido forma un puente salino con el C $\alpha$  y genera una carga positiva esencial para la actividad. El tamaño y la forma de la carga positiva alrededor de este aminoácido es esencial para la catálisis (Dongwei., et al, 1998).

Esta arginina, así como la que esta presente en el N-terminal del loop de glicinas contribuyen, con la lisina de la misma subunidad, en la formación del sitio activo y, por lo tanto, juegan un papel muy importante en la estabilidad del complejo enzima-coenzima-sustrato (Dongwei, et al, 1998).

La reacción procede primero por una transaldiminación entre el sustrato glicina y la aldimina interna para formar la aldimina externa. Entonces la glicina se desprotona en su posición pro-R. Se ha planteado que aquí la lisina juega una función catalítica ya que vía su grupo  $\epsilon$ -amino desprotonado sustrae el protón formando el intermediario carbanión con características quinoideas (ZHANG J & Ferreira G. 2002).

Hay varios candidatos involucrados en el proceso de desprotonación de la glicina: 1) el oxígeno del fenolato no protonado del

PLP y 2) el N del imidazol de una histidina altamente conservada del sitio activo. La determinación de la estructura de la 8-amino-7-oxononanoato sintasa (AONS) llevo a proponer que: 1) la carga negativa del oxígeno del fenolato es libre y puede aceptar un protón del aminoácido sustrato y 2) que la histidina del sitio activo se une por puente de hidrógeno al O3 del anillo del PLP y se involucra en una red de puentes de hidrógeno que facilitan la catálisis al acelerar el efecto del ácido aspártico del sitio activo en el pKa del N1 del anillo piridínico del PLP. Algo similar es plausible con ALAS particularmente porque el oxígeno fenolato protonado puede incrementar la electrofilicidad del anillo piridínico del cofactor y acelerar la reacción del sustrato entrante glicina. A juzgar por la estructura de AONS y el modelo de ALAS, es concebible que la subsiguiente remoción del protón del oxígeno fenolato pueda involucrar a la histidina en la red de enlaces de hidrógeno (ZHANG J & Ferreira G. 2002).

La presencia de succinil-CoA permite posteriormente la formación de una primera especie intermediaria quinoidea. El C $\alpha$  de la glicina se elimina después de la unión del succinil-CoA. Este intermediario reacciona con el tioéster de CoA en esa misma posición, lo que resulta en una descarboxilación catalizada por la enzima. (Bolt, et al,1999). Al removerse el grupo CoA, se forma entonces una aldimina de  $\alpha$ -amino- $\beta$ -cetoácido unido a la enzima estabilizada. La descarboxilación de este segundo intermediario, seguido de una reprotonación en la posición C5 de la aldimina entre el PLP y ALA conlleva a la formación de una 2-aminocetona, el ácido producto aminolevulinato. Finalmente la aldimina se disocia y se

libera ALA y la holoenzima (ZHANG J & Ferreira G. 2002).

Se ha propuesto que ALAS existe en dos estado conformacionales, una formación abierta donde los sustratos se unen y una cerrada inducida por la unión del succinil-CoA, que puede posicionar a la lisina del sitio activo en la proximidad para permitir la formación del primer intermediario quinoideo (ZHANG J & Ferreira G. 2002). Se sabe que muchas enzimas dependientes de PLP (AAT, TRPasa, AONS, la butirato ligasa) sostienen transiciones conformacionales hasta que un sustrato se une o se libera y donde la CoA juega un papel importante como detonador del mecanismo.

ALA puede por su lado, promover el cambio de conformación de abierto a cerrado al unirse a ALAS (ZHANG J & Ferreira G. 2002). Sorprendentemente, mientras que la glicina requiere de la unión del succinil-CoA a ALAS para que se acelere la abstracción del protón de su C2 y formar el intermediario quinoideo, el pegue de ALA es suficiente para promover esta formación, lo que sugiere que la longitud de la cadena carbonada y su grupo carboxilado determinan la tasa de formación de dicho intermediario. Existe también un modelo que sugiere que ALA se libera al ocurrir un cambio conformacional vinculado con éste, lo cual limita la tasa de recambio, y se convierte en el paso limitante de la reacción (Zhang J & Ferreira G. 2002).

La regulación de la síntesis de grupos hemos ha sido muy estudiada en levaduras y en eucariotes superiores especialmente en mamíferos. Hasta apenas unos años se ha prestado atención a lo que sucede en los sistemas bacterianos con *Rhodobacter spheroides*, ya que es capaz de alterar el contenido

de tetrapirroles en respuesta a las condiciones de cultivo. ALAS ha recibido atención por su función catalítica y su regulación.

Se ha observado la existencia de dos cisteínas muy conservadas que, al parecer, juegan un papel activador de la enzima (Neidle, et al, 1993). También se ha visto que algunos residuos muy conservados, esenciales en la formación del sitio activo, y que juegan papeles importantes en la unión del carboxilo del aminoácido sustrato glicina, al mutarse, son capaces de unir otro tipo de sustratos, es decir, de la naturaleza de los aminoácidos que ocupen esas posiciones depende el aminoácido que será sustrato. Se ha visto que no son permitidos grandes aminoácidos como sustrato (como el glutamato) y que el cambio en el sustrato no implica un cambio en la estereoespecificidad y siempre en consideración de las restricciones estructurales globales (Shoolingin-Jordan, et al, 2003).

### Antecedentes

En el grupo del doctor Morett lograron relajar la especificidad por la glicina de la enzima HemA, obteniendo una mutante con capacidad de unión de la alanina, sustrato de la enzima homóloga 8-amino-7-oxononanoato sintasa (AONS o BioF) que participa en la síntesis de biotina.

Este hallazgo condujo nuestro interés en resolver la estructura tridimensional de HemA y de su mutante con actividad HemA/BioF. Para lo cual, nos propusimos la tarea de comenzar una investigación cristalográfica sobre la enzima silvestre en primer lugar, ya que, aun no se cuenta con una caracterización estructural de ella, a pesar de que todas las enzimas de la vía de síntesis de

tetrapirroles ya han sido descritas estructuralmente.

## Metodología

### Materiales

El Dr. Morett nos facilitó el plásmido pet28(a+) con el gene *hemA<sub>wl</sub>*. Dicho plásmido contiene una secuencia His-Tag (6 Histidinas) en el amino terminal del gene *hemA<sub>wl</sub>*, una región para inducción con Isopropil Tiogalactosido (IPTG) y otra región para corte con tripsina. En nuestro laboratorio se usaron células competentes de la cepa BL21 (DE3) de *E. coli* para introducirles por electroporación, el plásmido mencionado. Como medio de cultivo se utilizó el medio mínimo M9. Todos los reactivos utilizados para los cultivos fueron Baker® y aquellos utilizados para la purificación y la cristalización fueron Sigma®. La purificación de la proteína por afinidad se realizó con una columna Hi-Trap de 5 ml de Amersham Pharmacia® (luego Amersham Biosciences y ahora parte de General Electric) en un equipo FPLC. La posterior separación por peso molecular se hizo en una columna de permeación en Gel HiLoad 26/60 Superdex 200 de 320 ml de Amersham Pharmacia® en un equipo FPLC. La proteína se concentró en filtros falcon Amicon Ultra de Millipore® para centrifuga. Las pruebas de cristalización se realizaron con los conjuntos de soluciones para ensayos de condiciones de cristalización de Hampton Research® Cryo, Lite, I, II y Low Ionic Strenght.

### Métodos

#### Expresión de la enzima

Construcción de células BL21-pet28a-*HemA<sub>wl</sub>*.

Para la producción de la enzima se purificaron los plásmidos pet28(a+)-HemA<sub>wt</sub> y se transformaron las células *E. coli* BL21(DE3) por electroporación. Las células BL21-pet28-HemA<sub>wt</sub> se crecieron a 37° C en cajas de petri. Las células se guardaron en glicerol a -70° C y en liofilizados para experimentos subsecuentes.

#### *Expresión de HemA<sub>wt</sub>*

Se prepararon 4 pre-inóculos de 25 ml de LB cada uno con 25 µg/ml de kanamicina y 25 µg/ml de cloranfenicol a 37° C durante 2 hrs y media, se inocularon cuatro litros de medio M9 con 25 µg/ml de kanamicina y se crecieron a 30° C. Al alcanzar una D.O de 0.4 se indujeron con 0.2mM de IPTG y se crecieron a 20° C al llegar a D.O = 1.0 se centrifugaron las células a 4° C 10 000 rpm durante 30 minutos. La pastilla se resuspendió en un amortiguador A (50mM PO<sub>4</sub> pH 7.8, 300mM NaCl, 1mM PMSF, 1mM DNAsa) (20 ml por litro de cultivo). La lisis se hizo por sonicación discontinua de 21 pulsos 12 veces con intervalos de 2 minutos. Se centrifugó 30 minutos a 4° C a 9 000 rpm. En cada etapa se tomaron muestras de 10 ml para el posterior análisis electroforético. La proteína recombinante producida bajo este sistema, tiene en la región N-terminal 6 amino ácidos adicionales representados en una secuencia His-Tag (6 Histidinas).

#### **Purificación de la enzima**

##### *Columna de afinidad (Hi-Trap)*

Inmediatamente se procedió a la purificación por la columna de afinidad con Niquel Hi-Trap. Se cargó la columna en el FPLC, se lavó primero con amortiguador A con un flujo de 4ml/min. La elusión se dió por un gradiente de amortiguador B ( 50mM PO<sub>4</sub> pH 7.8, 300mM NaCl 500mM

imidazol) primero con una concentración del amortiguador del 1% y después con 10%. Posteriormente, se eluyó con un gradiente en el tiempo hasta llegar a 60% y, finalmente, se eluyó al 100%. Se seleccionaron las fracciones donde había picos de absorción a una longitud de onda de 280 nm y se tomaron muestras de cada uno para el análisis electroforético. HemA se obtuvo al 57% de amortiguador B (Figura 1.A-I).

##### *Columna de permeación en gel (Hi-Load)*

Las fracciones con proteína se purificaron posteriormente con la columna de peso molecular Hi-Load para obtener una purificación de una sola forma oligomérica.

Para esta columna de permeación en gel se utilizó el amortiguador C (20mM PO<sub>4</sub> pH 6.5, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM DTT). Se eluyó con un flujo de 2.5 ml/min. Se colectaron las fracciones a partir de 100 ml en adelante. Se detectó absorbancia a 280 nm lo que nos indicaba la presencia de la apo-enzima.

##### *Concentración*

Se tomaron las fracciones con proteína y se dializaron contra el amortiguador C. Se concentró por partes cuidando constantemente el pH al que se encontraba la muestra. La mayor concentración que se obtuvo fue de 58 mg/ml. La concentración de proteína se midió a una absorbancia de 280 nm en un espectrofotómetro (coeficiente de extinción = 0.895% Abs 0.1% (=1 g/l)).

##### *Cristalización*

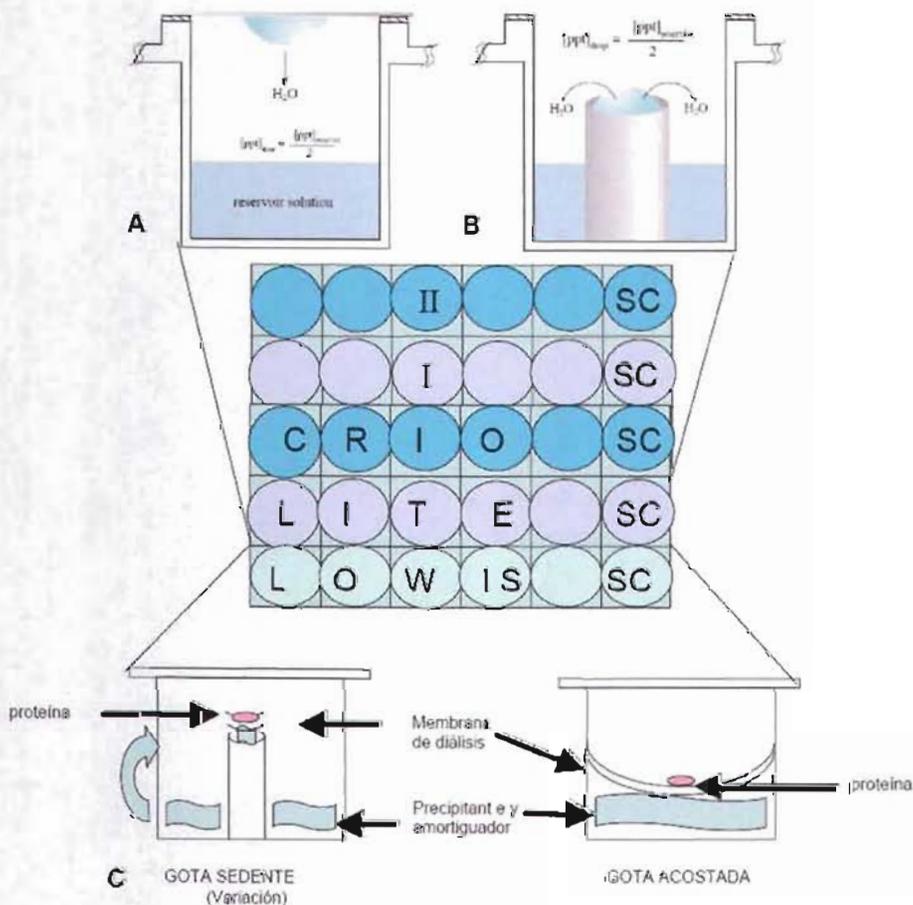
A las proteínas purificadas y concentradas a más de 10 mg/ml se les sometió a ensayos de cristalización con los conjuntos de soluciones para ensayos de condiciones de cristalización de Hampton Research® bajo el método

de gota colgante, gota sedente y un método de difusión de vapor implementado en el laboratorio (figura 2.A-I). Estos micro-métodos consisten en una gota que conjuga la solución madre (agentes cristalizantes) y la proteína en concentraciones distintas. Esta gota se equilibra, contra un recipiente conteniendo la solución madre sin proteína, por la difusión de los agentes volátiles hasta que la presión de vapor del la gota iguala la del reservorio.

Los ensayos de difracción se hicieron en el Laboratorio Universitario de Estructura de Proteínas ubicado en el Instituto de Química de CU.

### Resultados de la cristalización de Hema

Como mencionamos en el capítulo 1, la cristalización es un proceso multi-paramétrico donde se modifican constantemente todas las variables.



**Figura 2.A-I.** Micro-métodos para experimentos de cristalización por difusión de vapor. (a) Muestra el micro-método de gota colgante que consiste en colocar en el pozo el precipitante y el amortiguador (juntos componen la solución madre) (aproximadamente 1ml) y en un cubreobjetos se coloca una gota compuesta por la solución madre y proteína, donde se puede variar la concentración de ésta. El cubreobjetos se coloca sobre el pozo, y la gota queda colgando hacia la solución madre. (b) El método de gota sedente donde la gota se coloca sobre el extremo cóncavo un micro-tubo y el líquido madre en el pozo, el cual se tapa con un cubre objetos. (c) Muestra los micro-métodos implementados en el laboratorio. Del lado izquierdo la variación al método de gota sedente, el cual consiste en poner la solución madre en el extremo cóncavo del micro-tubo, sobre el una membrana de diálisis y sedente en ella, la gota de proteína. El de la derecha consiste en poner una membrana de diálisis sobre la solución madre y, sedente en la membrana la gota de proteína.

La finura con que debe hacerse este proceso conlleva la necesidad de remitirse constantemente a cambiar las condiciones en que se purifica y se concentra la proteína.

En un principio se separaba la proteína HemAwt por peso molecular, en un amortiguador 50 mM PO<sub>4</sub> pH 7.8 y 20mM de NaCl. En estas condiciones, se concentró la proteína hasta 2 mg/ml. No se logró concentrarla más porque la proteína precipitaba a mayor concentración. Con esta muestra de proteína, sin embargo, se realizaron los ensayos de cristalización Lite, I, II y Cryo a 4° y 18°. Es recomendable proceder a los ensayos de cristalización con concentraciones de proteína de entre 5-20 mg/ml. Aunque la concentración obtenida de proteína era tan baja que resultaba insuficiente para hacer pruebas de cristalización que dieran resultados contundentes, se observó que la proteína se precipitaba a baja fuerza iónica y se supuso que se mantenía más soluble a un pH cercano a su pI (6.35) -ya que en las pruebas de cristalización a pH (6.5) se observaba menos precipitado que en el resto-.

Se tenía que lograr una sobresaturación de la proteína de manera lenta para que pudiera regresar al equilibrio y formar núcleos cristalinos. Para ello, era necesario mantener soluble a la proteína por más tiempo. Se abordó el problema desde dos perspectivas distintas: 1) observar la dependencia de la solubilidad en la fuerza iónica y 2) ver la influencia del pH en la solubilidad.

La primera aproximación condujo a la realización de ensayos de solubilidad por diálisis contra un amortiguador en el que las únicas sales presentes fueran aquellas cuyas

concentraciones se proponía variar, es decir, NaCl. El ensayo se realizó entonces con un amortiguador de imidazol 50mM a pH7 variando la concentración de NaCl desde 150, 75, 30 hasta 15 mM. Al realizar el primer cambio se determinó que la disminución en la concentración de esta sal ocasionaba la precipitación de la proteína.

En respuesta a que la proteína se precipitaba a baja fuerza iónica, se realizó una nueva purificación en un amortiguador con alta fuerza iónica (50 mM PO<sub>4</sub> a pH 7.8 con 150mM de NaCl). En estas condiciones se concentró la proteína hasta 4.8 mg/ml. A pesar de que esta concentración seguía siendo muy baja, se hicieron diferentes ensayos de cristalización utilizando las soluciones de Hampton Research® para baja fuerza iónica, en los sistemas de cristalización diseñados en el laboratorio (Figura 1.A-I).

Se evaluó, en primer lugar, la eficiencia del nuevo sistema utilizando Lisozima (10, 20 y 50 mg/ml) como grupo control. Posteriormente, se hicieron varios ensayos con dos concentraciones distintas de HemAwt (2 y 4.8mg/ml) bajo diferentes concentraciones de los polietilenglicol (PEG) 3350 y 8000 (7.5, 10, 12.5, 15, 17.5 y 20%) que conformaban las soluciones del ensayo de baja fuerza iónica, con 5 mM de TRIS pH 8 como amortiguador.

Por esta vía, aunque en la mayoría de las condiciones había precipitado, se observó un crecimiento microcristalino de HemAwt en la condición que contenía PEG 8000 al 20% en el sistema de cristalización de gota sedente sobre membrana (Figura 1.A-I). Al parecer, la baja fuerza iónica de la solución madre, cuyo único agente precipitante era el PEG, favorecía la nucleación por una difusión de vapor lenta gracias a la

membrana que separaba la muestra de proteína del líquido madre en el reservorio. Sin embargo, la nucleación no era suficiente y aún se observaba mucho precipitado, por lo que se supuso que se había dado un cambio muy brusco de la fuerza iónica el cual impedía una adecuada nucleación.

Para evaluar la influencia de la variación del pH sobre la condición donde se había encontrado precipitado microcristalino en los experimentos anteriores, se hicieron ensayos con HemAwt a 4.8 mg/ml en PEG 8000 al 20%, a distintos pHs (4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5 y 9). En la mayoría de estas condiciones se observó precipitado; sin embargo, se observaron algunos microcristales a pH 5, 6, 6.5, y 7.5. Estos resultados constituyeron otra evidencia para abordar el problema de alcanzar la sobresaturación desde la segunda perspectiva: la influencia del pH en la solubilidad de la proteína.

Buscando condiciones más favorables para la solubilidad de la proteína y por lo tanto, para obtener mayores concentraciones de la misma (por lo menos cercanas a 10 mg/ml) se realizaron ensayos de diálisis de la proteína purificada en amortiguador 50 mM PO<sub>4</sub> a pH 7.8 con 150mM de NaCl contra el mismo amortiguador pero a pH 6.1, 6.3 y 6.5. El pH 6.5 favoreció la solubilidad de la proteína y permitió obtener una mayor concentración: 7.7 mg/ml.

Con esta muestra de proteína se realizaron los ensayos Cryo y II -ya que eran los únicos disponibles en el laboratorio en ese momento- en los micro-métodos de gota colgante y gota sedente. Pese al aumento en la concentración de la proteína, aún no se observaron crecimientos cristalinos de proteína. Los ensayos mostraban, en su mayoría, precipitados o formación de

cristales de sales. Estos se evaluaron por tinción y por manipulación: ninguno teñía como sería de esperar si se tratara de un cristal de proteína cuya cantidad de solvente permite la difusión del colorante y se rompían al tacto. Existieron, sin embargo, algunos precipitados cristalinos más promisorios en las pruebas realizadas en gota colgante.

Ya encontrados, el pH idóneo y la fuerza iónica adecuada para mantener a la proteína soluble, se procedió a la purificación de HemAwt con el amortiguador 50 mM PO<sub>4</sub> pH 6.5 150 mM NaCl. En todos los ensayos de purificación se observa un pico de absorbancia a 280 nm que corresponde a un peso molecular de aproximadamente 90 KD, lo que indica que el estado oligomérico de la proteína es un dímero. En esta nueva etapa se obtuvo una concentración de proteína de 8.86 mg/ml.

A partir de los resultados obtenidos durante los experimentos ya descritos (en que se obtenían precipitados cristalinos o microcristales), se realizaron a continuación, ensayos de precipitación con las sales de las soluciones en que éstos se encontraban: acetato de sodio y sulfato de amonio:

Precipitante	% de solubilidad	Punto saturación
NaCl	0.3	1.5 M partiendo de NaCl 5M
Acetato de Sodio	0.48	1.4M partiendo de AcNa 3M
Sulfato de amonio	0.21	0.74M partiendo de Su.A 3.5M

A partir de los puntos de saturación de la proteína con respecto a dichas sales, se diseñó una matriz para ensayos de cristalización donde se

	1	2	3	4		Resultado
NaCl + 20% PEG 8000	1.6 mM	1.7 mM	1.8 mM	1.9 mM	A	Cristal de sal
NaCl	1.6 mM	1.7 mM	1.8 mM	1.9 mM	B	Cristal de sal
Acetato de Sodio+ 25 mM MES pH 6.5	1.5 mM	1.6 mM	1.7 mM	1.8 mM	C	precipitado
Sulfato de amonio + 25 mM MES pH 6.5	0.8 mM	0.9 mM	1.0 mM	1.1 mM	D	precipitado
Sulfato de amonio con capa de parafina (variación de pH con ácido acético)	0.8 mM	0.9 mM	1.0 mM	1.1 mM	A	precipitado

variaron las concentraciones de cada uno de ellos por arriba de ese punto. Los experimentos se realizaron en los micro-métodos de gota colgante (Figura 1.A-1a).

Se introdujeron también en esa matriz, 20% PEG 8000, -debido a que en las pruebas de baja fuerza iónica había contribuido a una nucleación más favorable- y MES 25 mM pH 6.5 -ya que en algunas de las condiciones que mostraban una pequeña nucleación se encontraba presente cacodilato de Na<sup>22</sup> 25mM a pH 6.5-. La variación del pH era otra variable que nos interesaba modular durante estos ensayos. La supersaturación puede alcanzarse en proteínas con solubilidad dependiente del pH agregando ácidos o bases al reservorio para una difusión volátil de éstos. El cambio secuencial de pH se realizó con ácido acético adicionando 1µl cada día a la solución con sulfato de amonio, la cual no tenía amortiguador. El cambio en la solubilidad de la proteína en esta condición era modulado por la difusión volátil controlada del ácido acético por una capa de parafina en el reservorio. La matriz estaba conformada de la manera siguiente:

<sup>22</sup> Se cambió el cacodilato de sodio por MES debido a que el primero es tóxico y su manejo complicado

Los resultados de estos experimentos mostraron formación de cristales de sales, y de precipitados. El cambio secuencial del pH no funcionó ya que la proteína en esa condición precipitó al añadir por primera vez el ácido acético. Gracias a estos resultados se concluyó que el NaCl

efectivamente interfería con la nucleación de la proteína.

Adicionalmente, con el resto de la proteína a 8.86 mg/ml se realizaron los ensayos del conjunto de soluciones Hampton I donde también se observaron precipitados cristalinos con la formación de algunos microcristales en las condiciones mencionadas anteriormente, así como en HEPES pH 7.5, citrato de sodio pH 5.6 y distintos PEGS.

Por otro lado, las concentraciones de proteína que se habían obtenido hasta el momento aún eran insuficientes para aumentar la nucleación, por lo que se procedió a una revisión bibliográfica sobre los procedimientos empleados para la producción de esta enzima.

Existe una muy buena caracterización de HemA en *Rhodobacter sphaereoides* que ha sido el trabajo de años del grupo de la Dra. Gloria Ferreira. HemA de *R. sphaereoides* tiene una identidad del 82% con HemA de *B. japonicum*, además sus pI son muy similares (6.34 y 6.35) así como sus pesos moleculares 44332.64 y 44574.0 daltones, respectivamente. La información de la caracterización de HemA en *R. sphaereoides* se extrapola entonces, a nuestra proteína problema, y

con base en ella se tomaron ciertas decisiones que condujeron a modificaciones importantes en el método de sobre expresión (medio mínimo, tiempo de inducción, tiempo de crecimiento, etc), en el procedimiento de lisis de las células, y en la purificación. En dichas modificaciones se incluyeron aquellas que los resultados de cristalización habían sugerido pertinentes (cambio de pH y fuerza iónica). Los métodos de producción de la enzima ya estandarizados son los reportados en la sección de métodos.

Siguiendo esta pauta, se realizó una nueva purificación de donde se obtuvo una concentración de proteína a 20.56 mg/ml. Los resultados de los últimos experimentos de cristalización sugerían necesario eliminar el NaCl. Se quitó entonces esta sal del amortiguador de la muestra antes de la cristalización. Para ello, se dializó, según la cantidad que se utilizaría para los ensayos de cristalización, contra el mismo amortiguador 50 mM PO<sub>4</sub> pH 6.5 pero con 20 mM NaCl, para dejarle lo mínimo de NaCl necesario para que estuviera soluble. Se ensayaron las soluciones I, II y Cryo a dos temperaturas (4° y 18°). En todos los casos se observaron precipitados cristalinos o formación de microcristales. Se obtuvo, sin embargo, un cristal cúbico en una condición que contenía únicamente, PEG y glicerol. En estas condiciones sin sales en el precipitante, era muy plausible obtener cristales de proteína. No obstante, al hacer las pruebas de tinción o de manipulación para ver si se trataba de sal o proteína, no mostraba una clara tinción por lo que cabía la duda de si era de sal o proteína. Se llevó entonces a difractar al LUEP y se comprobó su naturaleza salina. Antes de poderlos

difractar, suponiendo que podrían ser de proteína, se ensayaron las condiciones alrededor de aquella en la que se obtuvo el cristal cúbico, variando las concentraciones de PEG 1500 y de glicerol, sin obtener ningún resultado promisorio.

Se buscó entonces eliminar cualquier contribución salina al crecimiento de los cristales, tanto los fosfatos del amortiguador como el NaCl. Con este objetivo, se dializó contra H<sub>2</sub>O y contra 125 mM MES pH 6.5. Adicionalmente, considerando que la enzima utiliza PLP como cofactor, se incluyó éste a 20 µM, ya que podría estar jugando un papel muy importante en la estabilización de la enzima. En consecuencia, se dializó la proteína también contra las dos soluciones anteriores con 20µM PLP. Estas muestras de proteína se ensayaron bajo distintas concentraciones y tipos de PEGS (25% PEG 1500, 24% PEG 3350, 25% PEG 1500 y 20% glicerol, 30% PEG MME 5000) y con algunas de las soluciones Cryo, I y II, previamente seleccionadas con base en los ensayos anteriores. Ninguno de estos ensayos mostró buenos resultados.

Con una nueva muestra a 18.88 mg/ml se hicieron nuevamente las pruebas de cristalización con las soluciones de Hampton Research® Cryo, I y II a 4° y 18°. Se quiso eliminar en esta etapa la interferencia de los fosfatos de amortiguador de muestra en el proceso de cristalización de la proteína. Para este fin, se cambió el amortiguador de muestra por MES 25mM pH 6.5. Se dializó la proteína contra MES 25 mM pH 6.5 con PLP 20 µM y se pusieron las soluciones del conjunto de soluciones II y parte del Cryo. Al dializar más proteína contra MES, ésta se precipitó en el segundo cambio, por lo que se regreso al

amortiguador 50 mM PO<sub>4</sub> pH 6.5 150 mM NaCl y se vio que la precipitación era reversible. Entonces se pusieron los ensayos Cryo y I faltantes, en los cuales se volvieron a obtener cristales de sales.

La proteína al parecer necesitaba un contenido mínimo de sales en su ambiente para poder ser soluble, sin embargo, estas sales oscurecían fuertemente los ensayos de cristalización. Por otro lado, la aproximación de bajar la solubilidad a baja fuerza iónica utilizando solo PEGs no había dado buenos resultados tampoco. En estas circunstancias se optó por utilizar un amortiguador de muestra donde hubiera un contenido mínimo de sales (fosfatos 20 mM sin NaCl) con base en las razones ya expuestas, pero también a que la afinidad del PLP es operativa a baja fuerza iónica.

No obstante, la sola adición de PLP no había contribuido considerablemente a mejorar los resultados, según se constató en los experimentos anteriores. Se eligió entonces, adicionar el primer sustrato de la enzima: la glicina.

Se purificó nuevamente la enzima y se concentró a 18 mg/ml. Se dializó

posteriormente contra el amortiguador C sin NaCl con 20 $\mu$ M PLP y 20 $\mu$ M glicina. Con esta muestra se realizaron nuevamente los ensayos I, II y Cryo de Hampton, y se obtuvieron algunos cristales en condiciones distintas. Entre ellas 1.5M MgCl<sub>2</sub>, 24% PEG 4000, 0.08M TRIS pH8.5 y 20% Glicerol y 0.1 Formiato de Mg y 50% Glicerol a 18° C (Figura 3.A-I). Ambos cristales se difractaron. La difracción a la que fue expuesto el cristal de 0.1 Formiato de Mg y 50% Glicerol, mostró que se trataba de un cristal de proteína. Sin embargo, la resolución máxima era sólo de 10 Å.

En esas condiciones, la proteína estaba a un pH cercano a su punto isoeléctrico (pH 6.5) y no había ningún amortiguador en la solución precipitante; por lo que al agregarle el formiato de Mg posiblemente hubo una ligera elevación del pH que favoreció el que la proteína llegara a un punto de saturación y formara esos pequeños cristales. Sin embargo, en esos experimentos, la concentración de proteína, aunque era elevada (18 mg/ml), no fue lo suficiente para que hubiera nucleación.



Figura 3.A-I. Cristales encontrados en 1.5M MgCl<sub>2</sub>, 24% PEG 4000, 0.08M TRIS pH8.5 y 20% Glicerol, a la derecha y 0.1 Formiato de Mg y 50% Glicerol a la izquierda. Este se difractó y se comprobó que era de proteína aunque la difracción era débil, hasta 10 Å de resolución.

Subsecuentemente, se realizaron ensayos alrededor de esa condición de

cristalización. El interés se enfocó entonces, en subir la concentración de la proteína lo más que se pudiera: se obtuvo una concentración de 58 mg/ml. Con esa concentración se repitió la condición con 0.1M de formiato de Mg y como no se tenía este reactivo en el laboratorio, se hicieron pruebas con formiato de Na, cloruro y sulfato de Mg a distintas concentraciones alrededor de 100mM para identificar el papel del formiato y del Mg en la cristalización. Sin embargo, ninguno de estos ensayos produjo cristales. La proteína se mostró como mucho más soluble apareciendo muchas gotas transparentes en los ensayos.

El fracaso en la reproducción del experimento en 0.1M de formiato de Mg y la falta de crecimiento microcristalino en las otras condiciones puede atribuirse a que el alza tan fuerte en la concentración sin que hubiera precipitación de la proteína fuera producto de un cambio en la oligomerización de la proteína durante la concentración de la enzima.

### Conclusiones

El objetivo principal de este trabajo, la determinación de la estructura cristalográfica de HemA, no se ha podido cumplir. Pese a los esfuerzos realizados por encontrar las condiciones de cristalización ideales para esta enzima, aún no ha sido posible obtener cristales de calidad. No se han podido reproducir los cristales de proteína obtenidos en Formiato de Mg 100mM y, aunque se han encontrado cristales en otras condiciones, aún no se ha podido logrado confirmar su naturaleza proteínica.

Sin embargo, la caracterización bioquímica que se realizó, dentro de sus limitaciones, favoreció algunos logros de importancia: (1) obtener altas concentraciones de proteína, (2) mantenerla soluble durante más tiempo y (3) obtener algunos pequeños cristales de proteína.

Mantener el pH de la solución de proteína a cristalizar cercano al pI de la misma, así como una alta fuerza iónica son determinantes en mantener soluble a la enzima. Esto permitió, al igual que los ajustes en el proceso de producción y purificación, obtener mayores concentraciones de proteína.

Por otro lado, consideramos que agregar el sustrato glicina a la muestra de proteína con amortiguador de fosfatos 20 mM pH 6.5 sin NaCl y PLP 100 $\mu$ M, justo antes de realizar las pruebas de cristalización, fue categórico en la obtención de cristales de proteína, ya que la unión del cofactor PLP no había mejorado los resultados.

Existen algunos problemas que obstaculizaron el avance de este proyecto. Una caracterización bioquímica profunda de la enzima y la realización de ensayos de actividad y de plegamiento son escenarios importantes cuyo conocimiento previo a la realización de experimentos de cristalización repercute en el éxito de los mismos. No obstante, para hacer éstos se requiere mucha proteína pura por lo cual, en cristalografía hay que convivir casi siempre con no disponer de esos resultados.

Otro factor a poner en consideración es el efecto que puede tener la geometría y el volumen de la gota en la nucleación. Existen algunas soluciones cuya tensión superficial deforma la gota impidiendo la nucleación. Otras soluciones son difíciles de medir con la pipeta lo que

acarrea errores en las concentraciones y genera variaciones imposibles de reproducir.

Otro aspecto interesante, es que muchas veces las proteínas provenientes de organismos halófilos o termófilos cristalizan con mayor facilidad que las de aquellos mesófilos, produciendo muchas veces cristales de mejor calidad. *B. japonicum* es un organismo mesófilo, así que probablemente, la selección de algún otro organismo extremófilo pudiera haber encausado el proyecto hacia mejores resultados.

#### Bibliografía de Apéndice I

- Alexander, FW., Sandmeier, E., Metha, PK & Christen, P. (1994) Evolutionary relationship among pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes. *Eur. J. Biochem.* 219, 953-960
- Alexeev, D., Alexeeva, M., Baxter, RL., Campopiano, DJ., Webster, SP & Sawyer, L. (1998) The crystal structure of 8-amino-7-oxononanoate sintase : a bacterial PLP-dependent, acyl-CoA-condensing enzyme. *J. Mol. Biol.* 284, 401-419
- Beck, C., Marty R., Klausli S., Hennecke, H. (1997) Dissection of the transcription machinery of housekeeping genes of *Bradihrizobium japonicum* *Journal of Bacteriology.* 179(2): 364-369
- Bolt EL., Kryszak L., Zeilstra-Ryalls J., Shoolingin-Jordan PM & Warren MJ. (1999) Characterization of the *Rhodobacter sphaeroides* 5-aminolaevulinic acid synthase isoenzymes, HemA and HemT, isolated from recombinant E.coli. *European journal Biochemistry.* 265: 290-299
- Brock, TD. & Madigan MT. (1991) *Microbiología*. Sexta edición. Prentice may Hispanoamericana, S.A. pp. 715-720
- Cordes, MHJ., Walsh, NP., McKnight, CJ & Sauer, RT. (1999) *Science* 284, 325-327
- Dongwei T., Barber MJ & Ferreira G. (1998) The role of tyrosine 121 in cofactor binding of 5-aminolevulinic acid synthase. *Protein Science* 7:1208-1213
- Dongwei T., Harrison T, Hunter GA & Ferreira G. (1998) Role of Arginina 439 In substrate binding of 5-aminolevulinic acid synthase. *Biochemistry* 37:1478-1484
- Dunathan, HC & Voet, JG (1974) Stereochemical evidence for the evolution of pyridoxal-phosphate enzymes of various function from a common ancestor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 712-716
- Dunathan, HC (1966) Conformation and reaction specificity in pyridoxal phosphate enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 55, 3888-3891
- Duncan, R., Faggart MA & Cornell, NW. (1997) Phylogenetic Analysis of the 5-aminolevulinic acid Synthase Gene. *Biol. Bull.* 193, 247-248
- Eisenberg MA & Star, C. (1968) Synthesis of 7-oxo-8-aminopelargonic acid, abiotin vitaminer, in cell free extracts of *Escherichia coli* biotin auxotrophs. *J. Bacteriol.* 96, 1291-1297
- Furuyama K & Sassa S. (2000) Interaccion between succinyl-CoA synthetase and the heme biosynthetic enzyme ALAS-E is disrupted in sideroblastic anemia. *Journal of Clinical Investigation* 105:757-764
- Gerlt, JA & Babbitt, PC (1998) *Curr. Opin. Biol. Sci.* 2, 607-612
- Gong J., Hunter G & Ferreira G. (1998) Aspartate 279 in aminolevulinic acid synthase affects catalysis through enhancing the function of the Pyridoxal 5-phosphate cofactor. *Biochemistry* 37:3509-3517
- Gong J., Kay CJ., Barber MJ & Ferreira G. (1996) Mutations at a glycine asa in aminolevulinic acid synthase affect pyridoxal phosphate cofactor binding and catalysis. *Biochemistry* 35:14109-14117
- Grishin, NV., Phillips MA & Goldsmith, EJ. (1995) Modelling of the spatial structure of eukaryotic ornithine decarboxylase. *Protein Sci.* 4, 1291-1304
- Hegyi, S & Gerstein, M. The relationship between protein structure and function: a comprehensive survey with application to the yeast genome. *J. Mol. Biol.* 288, 147-164.
- Hunter, GA. & Ferreira GC (1995) A continuous Spectrophotometric Assay for 5-aminolevulinic acid Synthase that utilizes substrate cycling. *Analytical biochemistry* 226:221-224
- Jensen, RA (1976) *Annu. Rev. Microbiol.* 30, 409-425
- Jurgens, C., Strom, A., Wegener, D., Hettwer S., Wilmanns M & Sterner R. (2000) Directed evolution of a (βα)<sub>8</sub>-barrel enzyme to catalyze related reactions in two different metabolic pathways *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97,9925-9930
- Lordan, PM (1991) The biosynthesis of 5-aminolevulinic acid and its transformation into uroporphyrinogen III. In *Biosynthesis of tetrapyrroles*. (Jordan PM, ed) pp.1-66 Amsterdam.
- Mariët J van der WERF & ZEIKUS G. (1996) 5-aminolevulinic acid production by *Escherichia coli* containing the *Rhodobacter sphaeroides* hemA Gene. *Applied and Environmental Microbiology* 62(10): 3560-3566
- Martin, AC., Orengo, CA., Hutchinson, EG., Jones, S., Karmirantzou, M., Laskowski, RA., Mitchell, JBO, Taroni, C & Thornton, JM (1998) Protein folds and functions. *Structure.* 6, 875-884
- Munakata H., Yamagami T., Nagai T., Yamamoto M & Hayashi N. (1993) Purification and structure of rat erythroid-specific- $\Delta$ -aminolevulinic acid Synthase. *Journal of Biochemistry* 114:103-111.
- Neidle, E. & Kaplan, S. (1993) Expression of the *Rhodobacter sphaeroides* hemA and hemT genes, encoding two 5-aminolevulinic acid synthase isozymes. *Journal of Bacteriology*, 175(8): 2292-2303
- Rhodes, G. (2000) *Crystallography. Made Crystal Clear: A Guide for Users of Macromolecular Models*. Second Edition. Academic Press, EUA.
- Rossmann, MG. (2001) Molecular Replacement-historical background. *Acta Crystal. Section D57*, 1360-1366
- Ruiz de Mena L, Fernández-Moreno MA., Bornstein B., Kaguni LS & Garesse R. (1999) Structure and regulated expression of the  $\Delta$ -aminolevulinic acid Synthase. *The journal of Biological Chemistry* 274(52):37321-37328

- Schneider G., Käck H & Lindqvist Y. (2000) The manifold of vitamin B<sub>6</sub> dependent enzymes. *Structure* 8:R1-R6
- Schneider, G., Käck, H & Lindqvist, Y. (2000) The manifold of vitamin B<sub>6</sub> dependent enzymes. *Structure*.8, R1-R6
- Scholnick, PL., Hammaker, LE. & Marver, HS. (1971) Soluble  $\delta$ -aminolevulinic acid synthase of rat liver. II Studies related to the mechanism of enzyme action and heme<sub>in</sub> inhibition. *The journal of Biological Chemistry*. Pp. 4132-4137
- Shoolingin-Jordan PM., Al-Daihan S., Alexeev D., Baxter RL., Bottomley SS., Kahari D., Roy I., Sarwar M., Sawyer L. & Wang S. (2003) 5-aminolevulinic acid synthase: mechanism, mutations and medicine. *Biochimica et Biophysica Acta* 1647:361-366
- Tan D & FERREIRA G. (1996) Active site of 5-aminolevulinic acid synthase residues at the subunit interface. Evidence from in vivo heterodimer formation. *Biochemistry* 35:8974-8941
- Woodard, S. & Dalley HA. (1995) Regulation of heme biosynthesis in E.coli. *Archives of biochemistry and biophysics*, 316(1): 110-115
- Xie L., Hall D., Eiteman MA & Altman E. (2003) Optimization of recombinant aminolevulinic acid synthase production in E.coli using factorial design. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 63:267-23
- Zhang J & Ferreira G. (2002) Transient state kinetic investigation of 5-aminolevulinic acid synthase reaction mechanism. *The journal of biological chemistry*, 277(47):44660-44669.