



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**El pH en la estabilidad y fibrillogénesis de 6aJL2, un
modelo de agregación amiloide**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

Ana Irene Leal Cervantes



**DIRECTOR DE TESIS:
Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco
2010**



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.

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno

Leal

Cervantes

Ana Irene

56 61 47 01

Universidad Nacional Autonoma de Mexico

Facultad de Ciencias

Biología

40604472-5

2. Datos del tutor

Dr.

Daniel Alejandro

Fernández

Velasco

3. Datos del sinodal 1

Dra.

Carmen Nina

Pastor

Colón

4. Datos del sinodal 2

Dr.

Ismael

Bustos

Jaimes

5. Datos del sinodal 3

Dr.

Luís Miguel

Blancas

Mejía

6. Datos del sinodal 4

Dr.

Luís

del Pozo

Yauner

7. Datos del trabajo escrito.

El pH en la estabilidad y fibrilogénesis de 6aJL2, un modelo de agregación amiloide. 77 pp

2010

AGRADECIMIENTOS

Primero, agradezco a mis padres por todo lo que me han brindado, en especial el apoyo durante los últimos meses para que acabará mi tesis. A mi hermana Carmen, le agradezco su ayuda incondicional, tanto en la parte teórica de mi proyecto, como en lo personal. No hubiera sobrevivido sin ella. Agradezco además a mi hermano Rodrigo por su apoyo y paciencia.

Agradezco a mi tutor el Dr. Alejandro Fernández por la confianza depositada en mí durante la realización de este proyecto y su valiosa asesoría para realizarlo. Este trabajo no estaría completo sin la ayuda experimental, asesoría y paciencia infinita del Dr. Luis Blancas, mi tutor no oficial: gracias.

Agradezco a mis amigos por los buenos momentos pasados durante la carrera y su apoyo a lo largo de ésta; en particular agradezco a Mónica, mi compañera en el laboratorio, por el incontable número de horas que pasó ahí para hacerme compañía – incluyendo la noche de las fibras –, a Luisa y a Monx, por su apoyo incondicional.

Agradezco a mis compañeros del Laboratorio de Fisicoquímica e Ingeniería de Proteínas por su ayuda en algunos de mis experimentos y para responder las dudas repentinas. Finalmente, agradezco a Laurita e Isabel por su imprescindible apoyo técnico.

Este proyecto se realizó con el apoyo del CONACyT, proyecto 102182 y parcialmente con el apoyo del PAPIIT, proyecto IN206510. Agradezco a la DGAPA-UNAM por la beca de tesista de licenciatura que me fue otorgada dentro del proyecto de PAPIIT IN206510.

A mi familia

*“ Of all the ways that proteins can go bad,
becoming an amyloid is surely one of the worst.”*

J. Schnabel

ÍNDICE	
RESUMEN	3
LISTA DE ABREVIATURAS	4
I. INTRODUCCIÓN	5
A) Marco conceptual: plegamiento de proteínas	5
B) Antecedentes	7
1. Amiloidosis	7
a) Estructura de las fibras amiloides	11
b) Mecanismos de formación de las fibras	14
c) Patogénesis	19
2. Amiloidosis de cadenas ligeras	20
a) anticuerpos	20
b) Amiloidosis AL y asociación de las proteínas λ 6a al riñón	22
3. 6aJL2	25
4. Plegamiento y fibrilogénesis de cadenas ligeras	27
5. Importancia del pH	29
II. OBJETIVOS	32
III. JUSTIFICACIÓN	33
IV. HIPÓTESIS	34
V. MATERIAL Y MÉTODOS	35
A) Sobreexpresión y purificación de 6aJL2	35
B) Experimentos al equilibrio	36
1. Incubación a diferentes valores de pH en ausencia de agente caotrópico	
a) Fluorescencia intrínseca	37
b) Unión de ANS	38
c) Dicroísmo circular	
2. Desnaturalización por agentes caotrópicos	
C) Ensayo de fibrilogénesis <i>in vitro</i> a diferentes valores de pH	
VI. RESULTADOS	42
A) Propiedades espectroscópicas a diferentes valores de pH en ausencia de agente caotrópico	42
1. En presencia de NaCl	42
2. En ausencia de NaCl	49
B) Estabilidad termodinámica	54

C) Formación de fibrillas	57
VII. DISCUSIÓN	62
VIII. CONCLUSIONES	74
IX. REFERENCIAS	

RESUMEN

La amiloidosis de cadenas ligeras, o amiloidosis AL, se caracteriza por el depósito extracelular de dominios variables de cadenas ligeras monoclonales en la forma de fibras amiloides insolubles. Las cadenas codificadas por el segmento génico 6a, único miembro del subgrupo $\lambda 6$, están asociadas fuertemente con la acumulación amiloide *in vivo*. El dominio variable 6aJL2 es una proteína recombinante modelo, construida a partir de la secuencia de la línea germinal de los segmentos génicos 6a y jL2. Presenta el plegamiento característico de las inmunoglobulinas, el sándwich β formado por dos hojas β antiparalelas.

El propósito de este trabajo fue caracterizar los cambios conformacionales que sufre 6aJL2 al variar el pH.

Se encontró que 6aJL2 tiene una mayor estabilidad a valores de pH entre 3.5 y 4.5, que son cercanos a su punto isoeléctrico. Nuestros resultados muestran la existencia de dos conjuntos de conformeros de 6aJL2, uno a valores de pH por debajo de su punto isoeléctrico ($\text{pH} \leq 4.5$) y otro por encima de éste (pH entre 4.5 y 8.0); ambos mantienen la integridad de la estructura de las hojas β antiparalelas. A valores de $\text{pH} < 4.5$, el conjunto de conformeros alcanza rápidamente (cinco minutos) el estado de equilibrio, sus espectros de fluorescencia intrínseca presentan un poco de dispersión al inicio, tienen una ligera unión a ANS y sus espectros de DC en el UV lejano sólo presentan un mínimo definido a 217 nm. A $\text{pH} \geq 5.0$, el conjunto de conformeros alcanza un primer equilibrio rápido a los 5 minutos de incubación pero sufre una desestabilización a escalas temporales mayores (24 horas), sus espectros de fluorescencia no presentan dispersión, su unión a ANS es despreciable y los espectros de DC en el UV lejano presentan además un hombro a 230 nm.

Por otra parte, en general, se ha encontrado que la propensión a la formación de fibras amiloides está relacionada con la disminución en la estabilidad termodinámica; en el caso de 6aJL2, al variar el pH no se encontró una correlación entre el valor ΔG con la velocidad de extensión fibrilar o con el tiempo de retardo en la formación de fibras al variar el pH. Nuestros

resultados sugieren que en condiciones fisiológicas, la forma precursora tiene características estructurales cercanas al estado nativo.

ABREVIATURAS

βA	péptido β amiloide
ACTH	hormona adenocorticotrópica
AL	amiloidosis de cadenas ligeras
ANS	ácido 8-anilino-1-naftalen-sulfónico
CDR	regiones determinantes de complementariedad
CME	centro de masa espectral
DC	dicroísmo circular
FR	regiones marco
GH	hormona de crecimiento
GuHCl	cloruro de guanidina
IF	intensidad de fluorescencia
LCDD	enfermedad por deposición de cadenas ligeras
SDS	dodecil sulfato de sodio
ThT	Tioflavina T
V_L	domino variable de la cadena ligera

I. INTRODUCCIÓN

A) Marco conceptual: plegamiento de proteínas

La mayoría de las funciones biológicas son llevadas a cabo, a nivel molecular, por proteínas. Dentro o fuera de la célula, las proteínas pueden tener un papel estructural, catalizar reacciones químicas, participar en la señalización intra e intercelular o cumplir funciones efectoras altamente especializadas como los anticuerpos (Alberts *et al.*, 2002).

Para que una proteína sea biológicamente activa, debe adoptar una estructura tridimensional específica, conocida como estructura nativa, la cual adquiere por medio del proceso de plegamiento (Dill *et al.*, 2008; Maury, 2009). El hecho de que una proteína lleve a cabo su función de manera adecuada depende de la formación de la estructura correcta; incluso en las proteínas intrínsecamente desordenadas en las que el estado plegado sólo se alcanza tras la unión del ligante biológico (Fink, 2005).

Dicha estructura tridimensional se debe principalmente a la interacción entre los grupos funcionales de las cadenas laterales de los aminoácidos de la cadena polipeptídica, a través de interacciones débiles no covalentes como puentes de hidrógeno, interacciones de van der Waals e interacciones electrostáticas (Nelson y Cox, 2008; Dill *et al.*, 2008).

El trabajo de Anfinsen con la ribonucleasa demostró que toda la información necesaria para que una proteína adquiriera espontáneamente su conformación nativa está contenida en su secuencia de aminoácidos (Anfinsen, 1973). De acuerdo al principio termodinámico que él propuso, bajo las condiciones fisicoquímicas correctas, un polipéptido alcanza su estado biológicamente activo de manera espontánea al acceder a su conformación de mínima energía, la cual está determinada por su estructura primaria (Cooper, 1999; Dill *et al.*, 2008; Maury, 2009). La conformación nativa corresponde a uno de los miles de conformeros posibles y se alcanza de manera rápida. Esto sugiere que una cadena polipeptídica no se pliega por una búsqueda aleatoria del espacio conformacional, si no que más bien sigue un camino preferencial de conformaciones, o vía de plegamiento, para alcanzar su estado nativo (Levinthal, 1968).

In vivo, el proceso de plegamiento es asistido por las chaperonas y la maquinaria de degradación de proteínas, las cuáles conforman un complejo de control de calidad. Como su nombre lo indica, estos sistemas asisten y controlan el plegamiento de los polipéptidos recién sintetizados y eliminan aquellas moléculas incapaces de plegarse correctamente o que pierden su plegamiento nativo por alguna situación de estrés (Maury, 2009; del Pozo-Yauner *et al.*, 2008b).

El estado nativo es un estado conformacional compacto y estructuralmente homogéneo, con actividad biológica, mientras que el estado desplegado es un ensamble de estructuras heterogéneo. Desde el estado desplegado, las moléculas siguen diferentes vías cinéticas que convergen en el estado nativo, el cual corresponde a un mínimo de energía bien definido. Esto implica que el estado nativo es alcanzado a través de un proceso continuo en el cual hay una disminución de la libertad conformacional y por lo tanto de la energía libre del polipéptido (Dill *et al.*, 2008; del Pozo-Yauner *et al.*, 2008b). Se ha encontrado que los paisajes de energía para el plegamiento de las proteínas, a pesar de ser complejos, tienen un mínimo bien definido que corresponde al estado nativo bajo condiciones fisiológicas¹. Esto sugiere que, además de las secuencias protéicas, los paisajes de energía han sido seleccionados por la evolución para que las proteínas globulares adopten una estructura tridimensional específica (Chiti y Dobson, 2006; Monsellier y Chiti, 2007).

El planteamiento de la existencia de vías de plegamiento ha llevado a una búsqueda para caracterizarlas. Su estudio puede ser abordado, desde el punto de vista termodinámico, asumiendo la existencia de un equilibrio entre diferentes estados conformacionales con propiedades fisicoquímicas y estructurales distinguibles entre sí (Dill *et al.*, 2008).

En los últimos diez años se ha encontrado que el plegamiento de las proteínas pequeñas monoméricas, de alrededor de 100 aminoácidos, se puede describir como un modelo de dos estados, en el cual sólo los estados nativo y desplegado están poblados significativamente (Jackson, 1998). La interconversión entre estas dos especies es muy rápida, por lo que no es posible detectar intermediarios estructurales (del Pozo-Yauner *et al.*, 2008b). En esta categoría

¹ Más adelante veremos que existe un gran número de proteínas que presentan otro mínimo caracterizado por la formación de especies oligoméricas insolubles.

de proteínas, el ensamble desplegado y el estado nativo están separados por una única barrera energética, conocida como el estado de transición (del Pozo-Yauner *et al.*, 2008b).

Por otro lado, las proteínas de mayor tamaño (oligómeros o proteínas con varios dominios) generalmente se pliegan por un mecanismo más complejo en el que participa al menos un intermediario estructural, el cual es diferenciable de los otros dos estados por sus propiedades fisicoquímicas o estructurales. En algunos casos, se ha sugerido que los intermediarios observados durante las reacciones de plegamiento *in vitro* corresponden en realidad a especies fuera de la vía de plegamiento, o a especies mal plegadas que actúan como trampas cinéticas. Estas especies pueden favorecer procesos irreversibles como la agregación (Jackson, 1998).

B) Antecedentes

1. Amiloidosis

En la célula, la síntesis de una cadena polipeptídica y su plegamiento son procesos simultáneos. Sin embargo, a pesar de que una cadena polipeptídica puede adoptar la conformación nativa por sí sola, en ocasiones, debido a las condiciones intercelulares, se requieren múltiples factores – como chaperonas y prolin *cis-trans* isomerasas- para asegurar su plegamiento correcto y que se convierta en una entidad funcional (Nelson y Cox, 2008). Adicionalmente, en todos los seres vivos existen sistemas complejos que reconocen y eliminan a las proteínas que son incapaces de plegarse correctamente o que han adquirido un plegamiento incorrecto (del Pozo-Yauner *et al.*, 2008b).

A pesar de la alta eficiencia de estos sistemas de control de calidad, existe un gran número de enfermedades humanas que se originan por proteínas que fallan en adoptar o permanecer en su estado conformacional nativo funcional y escapan a dicho control. Generalmente se conocen como enfermedades de plegamiento incorrecto o anómalo, también son llamadas enfermedades conformacionales (Chiti y Dobson, 2006).

El plegamiento nativo de una proteína puede ser comprometido por cambios en su secuencia nativa, lo cual perjudica la eficiencia del plegamiento. Esto puede, por una parte, aumentar la probabilidad de su degradación o modificar su tránsito dentro de la célula, lo cual resulta en una reducción de la cantidad de proteína disponible para que lleve a cabo su papel fisiológico. Éste es el caso de la fibrosis quística, por ejemplo (Chiti y Dobson, 2006). Sin embargo, el grupo más grande de enfermedades asociadas al plegamiento está relacionado a la conversión de especies funcionales solubles (péptidos o proteínas) a un estado agregado (Chiti y Dobson; 2006). La formación intracelular o en el espacio extracelular de agregados de alto peso molecular insolubles puede ser sin forma definida (agregados amorfos) o en agregados fibrilares altamente organizados. El depósito de estos últimos -conocido como amiloide- caracteriza a un número creciente de enfermedades neurodegenerativas y síndromes clínicos referidos colectivamente como amiloidosis o enfermedades por deposición de proteínas (Chiti y Dobson, 2009). Este término agrupa a un número creciente de enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer, de Parkinson o las encefalopatías espongiiformes, así como diversos síndromes clínicos como la amiloidosis de cadenas ligeras y la diabetes tipo II. Algunas de estas enfermedades son muy frecuentes (la diabetes tipo II, la enfermedad de Alzheimer o la de Parkinson), mientras que otras son relativamente raras (del Pozo-Yauner *et al*, 2008b).

A la fecha, más de 40 enfermedades de plegamiento han sido descritas (tabla 1). Se trata de un grupo de enfermedades clínicamente heterogéneo ya que cada una posee una etiología distinta y cada una está asociada con la agregación de un único péptido o de una proteína dominante (Chiti y Dobson, 2009).

La distribución de los depósitos amiloides se da en forma de placas, las cuales generalmente comprometen la función del o los órganos involucrados. En términos generales, las amiloidosis se pueden clasificar en **condiciones neurodegenerativas**, cuando la agregación ocurre en el cerebro, en **amiloidosis localizadas no neuropáticas**, en las cuáles la agregación ocurre en un solo tipo de tejido que no es el cerebro y en **amiloidosis no neuropáticas sistémicas**, en las cuales la agregación ocurre en múltiples tejidos (Chiti y Dobson, 2006).

Dentro de estas condiciones algunas son esporádicas (85%), mientras que otras se originan de mutaciones específicas y son hereditarias (10%). Adicionalmente, las encefalopatías espongiiformes pueden ser transmisibles (5%) en humanos y en otros mamíferos (Chiti y Dobson, 2006).

Tabla1. Enfermedades humanas asociadas a la formación de depósitos extracelulares amiloides o inclusiones intracelulares con características tipo-amiloide (modificada de Chiti y Dobson, 2006)

Enfermedad	Proteína o péptido precursor	Estructura nativa del precursor
Enfermedades neurodegenerativas		
Enfermedad de Alzheimer ¹ Encefalopatías espogiformes ^{1,3}	β amiloide (β A) Proteína prión o fragmentos	Nativamente desplegado Nativamente desplegado (residuos 1-120) o hélice α (residuos 121-230)
Enfermedad de Parkinson ¹ Demencia con cuerpos de Lewy ¹ Demencia forntotemporal con Parkinsonismo ¹	α -sinucleína α -sinucleína Tau	Nativamente desplegado Nativamente desplegado Nativamente desplegado
Esclerosis lateral amiotrófica ² Enfermedad de Huntington ²	Superóxido dismutasa 1 Huntingtina con expansión poliQ	Todo β , tipo Ig Mayoritariamente nativamente desplegado
Ataxias espinocerebelares ²	Ataxinas con expansión poliQ Proteína de unión a caja TATA	Dominio AXH hojas β , El resto desconocido
Ataxia espinocerebelar 17 ²	con expansión poliQ	A+ β de residuos 159-339 El resto desconocido
Atrofia muscular espinobulbar ²	Receptor de andrógenos con expansión poliQ	Dominio de unión al ligando todo α , el resto desconocido
Atrofia hereditaria dentadorrubro-palidoluisiana ² Demencia familiar británica ² Demencia familiar danesa ²	Atrofina-1 con expansión poliQ ABri ADan	Desconocido Nativamente desplegado Nativamente desplegado

(continúa...)

Enfermedad	Proteína o péptido precursor	Estructura nativa del precursor
Amiloidosis sistémicas no neuropática		
Amiloidosis AL ¹	Cadenas ligeras de inmunoglobulinas o fragmentos	Todo β , tipo Ig
Amiloidosis AA ¹	Fragmentos de la proteína A amiloide sérica	Todo α , no se conoce El patrón de plegamiento
Fiebre mediterránea familiar ¹	Fragmentos de la proteína A amiloide sérica	Todo α , no se conoce El patrón de plegamiento
Amiloidosis sistémica senil ¹	Transtiretina silvestre	Todo β tipo prealbumina
Polineuropatía amiloidótica familiar ²	Mutantes de transtiretina	Todo β tipo prealbumina
Amiloidosis relacionada con la hemodiálisis I	β 2-microglobulina	Todo β , tipo Ig
Amiloidosis ApoAI ¹	Fragmento N-terminal de la apolipoproteína AI	Nativamente desplegado
Amiloidosis ApoAII ¹	Fragmento N-terminal de la apolipoproteína AII	Desconocido
Amiloidosis ApoAIV ²	Fragmento N-terminal de la apolipoproteína AII	Desconocido
Amiloidosis finlandesa hereditaria ²	Fragmentos de mutantes de gelsolina	Nativamente desplegado
Amiloidosis por lisozima ¹	Mutantes de lisozima	$\alpha+\beta$
Amiloidosis por fibrinógeno ¹	Variantes de la cadena α del fibrinógeno	Desconocido
Angiopatía cerebral amiloide islándica hereditaria ²	Mutantes de la cistatina C	$\alpha+\beta$, tipo cistatina
Enfermedades noneuropáticas localizadas		
Diabetes tipo II ¹	Amilina o polipéptido amiloide de los islotes	Nativamente desplegado
Carcinoma medular de la tiroides ¹	Cacitonina	Nativamente desplegado
Amiloidosis atrial ¹	Factor natriurético atrial	Nativamente desplegado
Hemorragía cerebral hereditaria con amiloidosis ²	Mutantes del péptido β amiloide	Nativamente desplegado
Prolactinoma hipofisiario	Prolactina	Todo α

(continúa...)

Enfermedad	Proteína o péptido precursor	Estructura nativa del precursor
Amiloidosis por inyección localizada ¹	Insulina	Todo α
Amiloidosis aórtica medial ¹	Medina	Desconocido
Distrofia cornea celosítica hereditaria ²	Fragmentos C-terminal de la querato-epitelina	Desconocido
Amiloidosis de la córnea asociada a triquiasis ¹	Lactoferrina	$\alpha+\beta$, tipo proteína de unión periplásmica
Cataratas ¹	γ -cristalinas	Todo β , tipo γ -cristalina
Tumores odontogénicos epiteliales calcificantes ¹	Desconocido	Desconocido
Proteinosis pulmonar alveolar ²	Proteína de surfactante pulmonar C	Desconocido
Miositis por cuerpos de inclusión ¹	Péptido β amiloide	Nativamente desplegado
Amiloidosis liquén cutánea ¹	Queratinas	Desconocido

¹Predominantemente esporádica, aunque se han documentado casos hereditarios

²Predominantemente hereditaria, aunque se han documentado formas esporádicas

³Cinco por ciento de los casos son transmisibles

a) Estructura de las fibras amiloides

El núcleo de los depósitos amiloides es de origen protéico, pero además están presentes especies asociadas llamadas moléculas accesorias, que incluyen iones metálicos (Zn^{2+} y Cu^{2+}), glicosaminoglicanos, glicoproteínas como el compuesto sérico P amiloide y la apolipoproteína E, así como componentes de matriz extracelular como colágena, heparan sulfato y el proteoglicano perlecan (Stevens y Kisilevsky, 2000; Chiti y Dobson, 2006). Estudios *in vitro* han demostrado que dichas moléculas pueden promover la fibrillogénesis de algunos precursores amiloides, estabilizar las fibrillas o aumentar la toxicidad amiloide. Sin embargo, su papel *in vivo* no se conoce bien (del Pozo-Yauner *et al.*, 2008b).

A pesar de la diversidad de estructural de los precursores amiloidogénicos, los agregados fibrilares comparten características morfológicas, tintoriales y espectroscópicas.

Bajo microscopía electrónica, los agregados amiloides aparecen como manojos de fibrillas rígidas, no ramificadas con una longitud variable entre 100 y 1600 nm y un diámetro entre 7,5 y 10 nm dependiendo de su origen químico. Constan de un número variable de protofilamentos (generalmente dos a seis), de 2 a 5 nm de diámetro que se asocian de manera helicoidal, para formar fibrillas trenzadas (Figura 1.1a). Las fibrillas tienen la capacidad de unir ciertos colorantes específicos, como la Tioflavina T (ThT), lo cual resulta en un aumento en la emisión de fluorescencia, o el rojo Congo o Sirius, cuya unión a las fibrillas se caracteriza por una birrefringencia color verde manzana bajo luz polarizada; aunque la especificidad de la birrefringencia resultante ha sido cuestionada recientemente (Khurana *et al.*, 2001) (Wall *et al.*, 1999a; Westermark *et al.*, 1999; Krebs *et al.*, 2004; Chiti y Dobson, 2006).

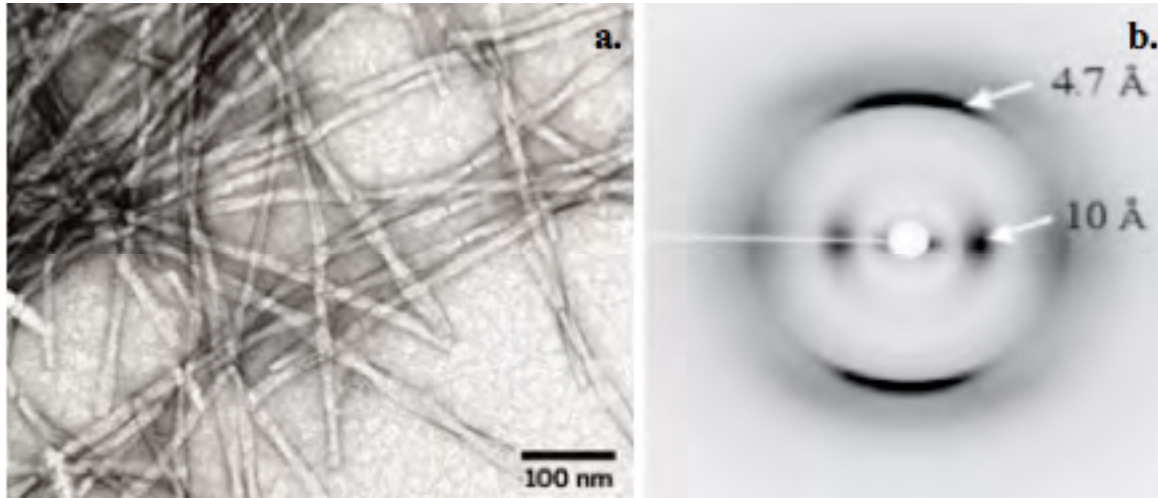


Figura 1.1. (a) Fibras amiloides vistas bajo microscopía electrónica; nótese en particular, la ausencia de ramificaciones (tomada de Arnold, 2008). (b) Patrón de refracción de rayos X, característico de las fibras amiloides correspondiente al patrón β cruzado. La reflexión meridional a 4.7\AA corresponde a las repeticiones entre hebras, mientras que la reflexión ecuatorial a 10\AA resulta del apilamiento entre hojas (ver figura 1.2) (modificado de Fowler *et al.*, 2007).

Asimismo, los agregados amiloides presentan un patrón de difracción de rayos X característico (Figura 1.1b), correspondiente a un patrón β cruzado, en el cuál las hojas β extendidas que forman las fibrillas se orientan paralelamente al eje longitudinal de la fibrilla, mientras que las hebras β que forman las hojas se orientan perpendicularmente al eje de la fibra (Fowler, 2007) (Figura 1.2a). Esta organización sugiere la presencia de interacciones hidrofóbicas o polares a lo largo del eje fibrillar (Figura 1.2b) (del Pozo-Yauner *et al.*, 2008b).

La comparación de las estructuras fibrilares resueltas a la fecha revelan que las propiedades fisicoquímicas del esqueleto polipeptídico son el determinante principal de la estructura fibrilar, mientras que las interacciones entre las cadenas laterales y el disolvente determinan la arquitectura particular de la fibrillas (Chiti y Dobson, 2006). En general, se observa un núcleo formado únicamente por hojas β que interactúan estrechamente entre sí, en donde además el residuo n de la hebra x interactúa con los residuos n de las hebras $x-1$ y $x+1$ respectivamente (Fowler, 2007). Típicamente dos o más de estas hojas paralelas se apilan en registro (es decir con los extremos alineados sin que sobresalgan los extremos), una sobre la otra formando la estructura supramolecular de la fibrilla. Los segmentos que forman estas hojas presentan una estructura auto-complementaria que les permite asociarse entre sí. Las cadenas laterales polares que sobresalen entre las hojas se interdigitan estrechamente, formando lo que se ha denominado una cremallera estérica (Nelson, 2005). Por lo demás existen diferencias en pequeños detalles, como la longitud de las hojas β , si son paralelas o antiparalelas, las conformaciones de las asas, el número de hojas β en el protofilamento, y el espacio entre las hojas, el cual depende del impedimento estérico de las cadenas laterales empaquetadas en la fibrilla (Lührs *et al.*, 2005; Ferguson *et al.*, 2006; Chiti y Dobson, 2006).

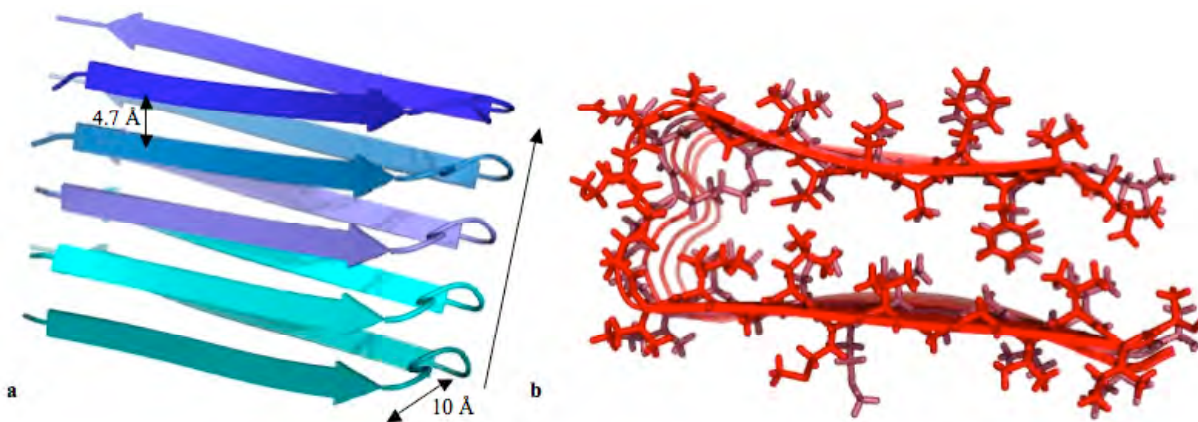


Figura 1.2 Estructura de las fibras obtenidas con el péptido β A (1-42) del patrón β cruzado de las fibras amiloides. Se indica con una flecha blanca el eje de la fibra (a). Apilamiento de los residuos presentes en diferentes hebras e interdigitación de los residuos al interior de las hojas β (b) (Código PDB:2BEG, figuras realizadas con PyMol).

b) Mecanismos de formación de las fibras

Se ha establecido claramente que el ensamblado de las fibrillas amiloides se da a través de un mecanismo de “crecimiento nucleado”, donde la conversión de un péptido o una proteína a su forma fibrillar incluye una fase de retardo o fase “lag” que es seguida por un crecimiento exponencial rápido (Chiti y Dobson, 2006).

Durante la fase lag se forman especies oligoméricas, en principio ricas en hojas β , que proveen los núcleos para la formación de fibras maduras. Esta fase puede disminuirse o incluso eliminarse si se agregan especies fibrilares preformadas a una muestra de proteína soluble en condiciones de agregación (adición de semillas) (Chiti y Dobson, 2006).

La cinética de formación de fibrillas sugiere que una vez que se forma el núcleo, el crecimiento fibrilar procede rápidamente por la adición de especies más pequeñas (monómeros u oligómeros) solubles al núcleo. Este es el caso, por ejemplo, de la β 2-microglobulina, para la cual Xue y colaboradores (2008) proponen la formación de un núcleo hexamérico al cual se agregan monómeros. En cuanto a los pasos posteriores que involucran la organización supramolecular de las fibras, en el caso de SMA, un dominio variable derivado de fibras amiloides de un paciente con amiloidosis AL, Ionescu-Zanetti y colaboradores (1999) describieron un mecanismo de ensamblado de fibrillas jerárquico en el cual el dominio soluble se ensambla para formar filamentos, los cuales se ensamblan en protofibrillas por entrelazamiento, y éstos a su vez se ensamblan en estructuras fibrilares más complejas.

Independientemente del mecanismo particular, numerosas evidencias apuntan a que la agregación amiloide es un proceso ocasionado por el plegamiento incorrecto de las proteínas precursoras (Kelly, 1996; Helms y Wetzel, 1996; Guijarro *et al.*, 1998; Belloti *et al.*, 2000; Ferrão-Gonzales *et al.*, 2000; McParland *et al.*, 2000 Fändrich *et al.*, 2003; Chiti y Dobson 2006; del Pozo-Yauner *et al.*, 2008b). El consenso general es que las proteínas globulares necesitan desplegarse al menos parcialmente para iniciar la agregación en fibras amiloides (Chiti y Dobson, 2006): la agregación amiloide se da por la exposición de regiones normalmente ocultas

en la conformación nativa (Goldschmidt, 2010). Las interacciones mediadas por dichas regiones parecen ser tanto polares como hidrofóbicas - en particular se ha descrito un papel para el apilamiento π - π en el ensamblaje de la fibras (Gazit, 2002). Para el caso particular de péptidos nativamente desplegados, se ha propuesto que adquieren estructura secundaria (tipo β) previo a su agregación fibrilar.

Esta hipótesis del cambio conformacional es apoyado por una gran cantidad de evidencia experimental: *in vitro* el proceso de agregación se favorece por condiciones ligeramente desestabilizantes del estado nativo, como bajas concentraciones de agentes caotrópicos, una disminución del pH, un aumento de la temperatura o altas presiones (Ionescu-Zanetti *et al.*, 1999; Khurana *et al.*, 2001; Souillac *et al.*, 2002a; Souillac *et al.*, 2002b, Qin *et al.*, 2007Lai *et al.*, 1996; Ferrão-Gonzales *et al.*, 2000, del Pozo-Yauner *et al.*, 2008b Chiti y Dobson, 2006; Chiti y Dobson, 2009). Adicionalmente, en las formas familiares de amiloidosis las mutaciones que afectan al precursor desestabilizan la estructura nativa, resultando en un aumento de las poblaciones no nativas (Chiti y Dobson, 2006).

Asimismo, en algunos casos de proteínas que formadas predominantemente por hojas β , se ha observado que la agregación puede darse a partir de estados conformacionales termodinámicamente diferentes al nativo, pero estructuralmente similares a éste, a través de fluctuaciones que ocurren bajo condiciones fisiológicas, por ejemplo fluctuaciones térmicas. Se trata de estados conformacionales de mayor energía que el nativo, pero separados de éste por una barrera energética relativamente baja (Chiti y Dobson, 2009).

Es importante señalar que la capacidad de formación *in vitro* de fibrillas amiloides no está restringida a los 24 precursores amiloidogénicos descritos a la fecha. El ejemplo más sobresaliente es la formación de fibras amiloides *in vitro* a partir de mioglobina (Fändrich, 2001). Actualmente se acepta que la agregación amiloide es una propiedad inherente o genérica del esqueleto polipeptídico, aunque la propensión a que se forme tal estructura varía dramáticamente con la secuencia (Esteras-Chopo *et al.*, 2005; Chiti y Dobson, 2006). Los agregados fibrilares representan un estado de menor energía que el estado nativo, sin embargo separado de éste por una gran barrera energética, por lo que se trata de un estado termodinámicamente más estable.

Por este motivo, incluso se ha sugerido que la estructura nativa representa un estado metaestable y que en un tiempo infinito, cualquier disolución de proteínas arriba de una concentración crítica eventualmente sufrirá una transición estructural a un estado agregado (Gazit, 2002). Al segregar las cadenas polipeptídicas recién sintetizadas del medio y pagar el costo energético de los ayudantes de plegamiento la maquinaria celular lleva a las cadenas polipeptídicas a su respectivo estado nativo. Los estados nativos de las proteínas globulares son menos estables pero estructuralmente más diversos que el estado fibrilar y cinéticamente atrapados. De esta manera el patrón de plegamiento amiloide, un estado más estable pero menos diverso, menos funcional y potencialmente peligroso, es evitado (del Pozo-Yauner *et al.*, 2008b).

A pesar de la toxicidad descrita para el amiloide, existe la noción de que es un patrón de plegamiento primitivo que probablemente fue prominente en la evolución temprana de la vida (Chernoff, 2004). En efecto, además de ser una propiedad inherente del esqueleto polipeptídico, las proteínas amiloidogénicas son diversas en secuencia, comparten pocas características y no presentan homología de secuencia o estructural (Chernoff, 2004).

La idea de que la estructura β cruzada es una estructura cuaternaria común, que ocurre fuera del contexto de daño tisular, se ha visto confirmada durante la última década. En efecto, se ha encontrado un número importante de proteínas que bajo ciertas condiciones forman agregados fibrilares con propiedades morfológicas, estructurales y tintoriales que permiten clasificarlas como fibras amiloides (Chiti y Dobson, 2006). Estas proteínas no presentan ninguna relación con las enfermedades por deposición de proteínas y la formación de las fibras es parte del ciclo de vida fisiológico normal de los organismos en las que se han encontrado (Fowler, 2007).

Estudios recientes en bacterias, hongos, insectos, invertebrados y mamíferos han identificado fibras amiloides que funcionan como componentes estructurales, regulatorios o de almacenamiento y como portadores de información (transmisión de distintos caracteres epigenéticos en levaduras) (Chernoff, 2004; Fowler, 2007; Maji *et al.*, 2009; Maury, 2009) (Tabla 2). Esto ha llevado al concepto reciente del amiloide funcional: la estructura descrita para las fibras amiloides corresponde a un patrón de plegamiento funcional formado por el

ensamblaje de proteínas o péptidos en hojas β unidas por puentes de hidrógeno intermoleculares (Fowler, 2007).

Las características únicas presentes en la estructura altamente ordenada de hojas β (resistencia a proteasas y detergentes como el SDS, alto punto de fusión, límite de cedencia comparable al acero, auto-propagación y, en algunos casos, auto-transmisibilidad) explican por qué, evolutivamente, algunos organismos han aprovechado la formación de amiloides por diferentes polipéptidos (Fowler, 2007; Cherny, 2008).

Aunque la formación de amiloides puede ser fisiológicamente útil para funciones especializadas y específicas, existen complejas vías de regulación (compartimentalización, nucleación a partir de una segunda proteína, interacción con chaperonas, síntesis bajo forma no activa) en los organismos en los que se han encontrado. Éstas aseguran que su formación sea regulada y tome lugar bajo condiciones altamente controladas (Chiti y Dobson, 2005; Fowler, 2007). En efecto, como las enfermedades de plegamiento ponen en evidencia, el patrón de plegamiento amiloide es potencialmente tóxico y además resistente a la degradación, lo que plantea un desafío importante para su uso.

Tabla 2. Organismos y proteínas cuya estructura nativa es la β cruzada: ejemplos de amiloides funcionales (modificada de *Fowler et al.*, 2007 y Maury, 2009)

Especies	Proteína amiloide (proteína precursora)	Función descrita o propuesta
Bacterias		
<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella spp.</i>	Curli (CsgA)	Invasión del huésped al mediar la adhesión celular
<i>Streptomyces coelicolor</i>	Chaplina (ChpD-H)	Formación de hifas aéreas al modular la tensión superficial del agua
Hongos		
<i>Podospora anserine</i>	Prión [Het-s] (HET-s)	Regulación de la formación del heterocarionte
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	prion [PSI ⁺] (eRF3)	Regulación de las poliaminas
	prion [RNQ ⁺] (Rnq1)	Citoprotección
	URE2p	Regulación del catabolismo de nitrógeno
	Sup35p	Regulación del <i>read-through</i> de los codones de término
Muchos hongos	Hidrofobinas	Formación de la capa fungal, modulación de la tensión superficial y adhesión
Animales		
<i>Lepidoptera</i>	proteínas del corión	Protección de la cáscara del huevo
<i>Aplysia californica</i>	prión CPEB	Memoria de largo plazo
<i>Austrofundulus limnaeus</i>	proteínas de la envoltura del huevo	Resistencia a la deshidratación
<i>Nephila clavipes</i>	Espindroinas	Estructurales
<i>Homo sapiens</i>	Pmel17	Andamiaje y secuestro de intermediarios tóxicos durante la biosíntesis de melanina
	Péptidos de fibrina	Activación de factores hemostáticos
	hormonas y prohormonas (i.e. prolactina, ACTH, GH, oxitocina vasopresina)	Almacenamiento de prohormonas en la hipófisis

c) Patogénesis

La presencia de depósitos fibrilares, altamente organizados y muy estables, en los órganos de pacientes afectados por amiloidosis llevó originalmente a la suposición de que este material es el agente causal de las enfermedades (Chiti y Dobson, 2006). Fibrillas obtenidas a partir del péptido A β (1-42) y de variantes puntuales son tóxicas para cultivos de células neurales (Lührs *et al*, 2005) y causan la pérdida de sinapsis al ser inyectadas en cultivos (Lorenzo y Yankner, 1994). La inyección de fibrillas en monos Rhesus causa muerte neuronal y activación y degeneración de la microglia (Streit, 2006; Chiti y Dobson, 2006). Asimismo, es claro que en las amiloidosis sistémicas, la acumulación de grandes cantidades de depósitos amiloides causa daño mecánico y altera la arquitectura del tejido, lo cual finalmente impide que se realice la función del órgano afectado (Joss y Boulton-Jones, 2005).

Sin embargo, recientemente se ha acumulado evidencia de que las especies oligoméricas precursoras de las fibrillas amiloides pueden ser las verdaderas especies tóxicas (Chiti y Dobson, 2006). Esto es más marcado en las amiloidosis neuropáticas, en donde, por ejemplo, ratones transgénicos muestran deterioro cognitivo antes de la acumulación significativa de depósitos amiloides y, tanto en el caso de la enfermedad de Parkinson como en la enfermedad de Alzheimer, la severidad del daño cognitivo o su desencadenamiento se asocia con los niveles de oligómeros de bajo peso molecular más que con los depósitos amiloides (Chiti y Dobson, 2006). Además se ha observado que los agregados prefibrilares de diversos precursores amiloidogénicos, como la transtiretina, o de proteínas no amiloidogénicas como la apomiglobina, son altamente tóxicos para cultivos celulares (Chiti y Dobson, 2006). Esto sugiere que la formación de agregados podría ser un mecanismo para secuestrar a las especies tóxicas de bajo peso molecular.

Chiti y Dobson (2006) señalan que es lógico que estas especies causen más daño que las fibrillas amiloides, al menos al inicio de la enfermedad, debido a que la conversión de un precursor soluble a formas oligoméricas generará un gran número de especies no nativas, las cuales al estar mal plegadas inevitablemente expondrán grupos que normalmente se encuentran enterrados en la forma globular. En el medio altamente organizado y saturado de la célula, la exposición de estos resultará probablemente en interacciones inapropiadas con los demás componentes celulares. Estas interacciones a su vez pueden llevar al mal funcionamiento de aspectos cruciales de la células.

Aunque a la fecha no queda claro cuál es la especie responsable de la citotoxicidad observada en cada una de las amiloidosis, indudablemente la acumulación de material amiloide juega un papel en la patología de estas enfermedades. Las estrategias terapéuticas óptimas en un futuro tendrán que enfocarse a prevenir la agregación o la producción de la proteína amiloidogénica.

2. Amiloidosis de cadenas ligeras

a) Anticuerpos

Los anticuerpos son proteínas heterodiméricas que participan en la respuesta humoral del sistema inmune. Están formados por dos cadenas ligeras (L) idénticas de 22 kDa y dos cadenas pesadas (H) idénticas de 55 kDa o más. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada por un puente disulfuro y por interacciones no covalentes como puentes de hidrógeno, puentes salinos e interacciones hidrofóbicas para formar un heterodímero (H-L). Los dos dímeros están unidos por un puente disulfuro así como por numerosas interacciones no covalentes en la estructura funcional (Kindt *et al.*, 2007). Cada una de las cadenas está formada por diferentes dominios; a su vez cada dominio está estabilizado por un puente disulfuro (Figura 1.3). El dominio amino-terminal de ambas cadenas realiza el reconocimiento y unión de antígenos, mientras que la porción carboxi-terminal formada por los demás dominios media las funciones efectoras para la neutralización o eliminación de los antígenos.

Las cadenas ligeras están formadas por dos dominios de cerca de 110 aminoácidos. La porción amino-terminal corresponde al dominio variable V_L y presenta, al igual que el dominio variable de la cadena constante V_H , una alta variabilidad de secuencia. Las diferencias de especificidad de los diferentes anticuerpos se explican por diferencias en las secuencias de los dominios amino-terminal que corresponden a los dominios V_L y V_H . La variabilidad de estos dominios se debe, principalmente, al proceso de recombinación somática que ocurre durante la ontogenia del linfocito B, en el cual uno de varios segmentos variables (V_L) que codifican para el extremo amino-terminal es combinado con un segmento de unión (J_L) y uno constante (C_L), que codifica el dominio constante (Kindt *et al.*, 2007). Además, ocurren sustituciones en la secuencia de nucleótidos obtenida por el rearrreglo

somático, un proceso conocido como hipermutación somática, que genera diversidad adicional.

La mayor parte de la variabilidad de los V_L (así como de los V_H) está contenida en las asas que unen las hebras β . Éstas forman el sitio de unión a los antígenos de los anticuerpos y se conocen como regiones determinantes de complementariedad (CDR por sus siglas en inglés). El resto del dominio presenta menos variabilidad y se conoce como regiones marco (FR por sus siglas en inglés) (Kindt *et al.*, 2007).

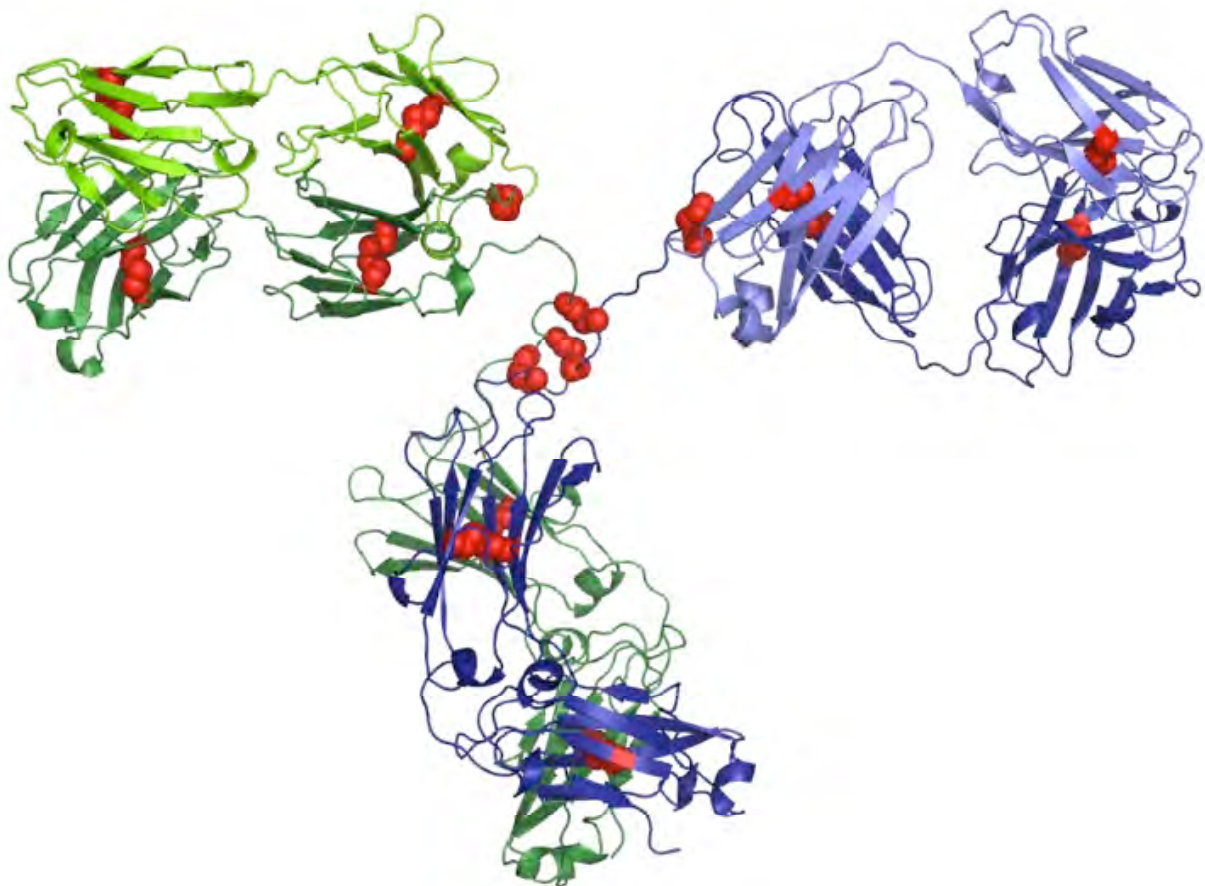


Figura 1.3. Estructura de un anticuerpo, en colores oscuros las cadenas pesadas y en colores claros las cadenas ligeras. Los dímeros H-L se muestran en verde y en azul. Se resaltan en rojo los puentes disulfuro.

Las cadenas ligeras se clasifican en dos grupos, κ y λ , con base en la secuencia del dominio carboxi-terminal. El genoma humano contiene aproximadamente 40 genes funcionales V_L de tipo κ y 31 de tipo λ , los cuales han sido clasificados en seis familias de genes κ y 10 de genes λ (del Pozo-Yauner *et al.*, 2008b).

b) Amiloidosis AL y asociación de las proteínas λ 6 al riñón

Dentro de las amiloidosis no neuropáticas sistémicas, la amiloidosis de cadenas ligeras (AL) se caracteriza por el depósito bajo forma de fibrillas insolubles del dominio variable (V_L) de cadenas ligeras de inmunoglobulinas o de éste y una fracción del dominio constante. Esta enfermedad representa la forma sistémica de amiloidosis más común en los países occidentales con una incidencia ajustada por edad de 5.1-12.8 casos por millón de individuos por año. Es una enfermedad degenerativa para la cual no hay tratamiento eficiente, rara antes de los 40 años, siendo la edad mediana de diagnóstico de 65 años. La supervivencia mediana en los pacientes sin mieloma es de 14.7 meses, aunque una minoría de pacientes sobrevive 5 años. Con tratamiento y dependiendo del órgano afectado, la supervivencia es de 24 a 26 meses (Joss y Boulton-Jones, 2005; del Pozo-Yauner *et al.*, 2008b).

En la mayoría de los casos, los depósitos amiloides se localizan en uno o dos órganos. Los órganos más afectados son los riñones (40% de los casos) y el corazón (25%), pero también puede estar involucrado el hígado, los sistemas nervioso periférico y autónomo, el tracto gastrointestinal y el páncreas (Joss y Boulton-Jones, 2005; del Pozo-Yauner *et al.*, 2008b). No se conocen las bases que determinan la acumulación preferencial en ciertos órganos, aunque la secuenciación de cadenas amiloidogénicas demostró que todas ellas fueron sujetas al proceso de hipermutación somática y que la mayoría retenía evidencia de selección guiada por antígeno (Abraham *et al.*, 2004). Además se ha encontrado una correlación entre la línea germinal usada y el depósito preferencial en un órgano (Comenzo, 2001). Algunas proteínas AL pueden unirse a componentes específicos de una manera que recuerda el reconocimiento antígeno-anticuerpo, aunque este fenómeno sólo se ha demostrado en algunos casos (Obici, 2005). Asimismo, se demostró la existencia de un receptor de membrana de baja afinidad pero alta capacidad para cadenas ligeras (tanto asociadas a AL como la enfermedad por depósito de cadenas ligeras, LCDD) presente en cultivos de células de los túbulos proximales renales, por lo que receptores similares podrían estar presentes en otros órganos (Batuman y Guan, 1997; Belloti *et al.*, 2000). La principal diferencia entre las cadenas ligeras involucradas en AL y LCDD es que las primeras forman depósitos fibrilares, mientras que las segundas forman depósitos amorfos, asociados a la membrana basal. Además como se menciona más adelante, las cadenas ligeras involucradas en AL mayoritariamente son λ , mientras que las involucradas en LCDD son generalmente κ (Belloti y Merlini, 1996).

A diferencia de los demás tipos de amiloidosis, en la amiloidosis AL existe una gran variabilidad en la secuencia de los precursores amiloidogénicos debido a los procesos de recombinación e hipermutación somáticas que suceden en la maduración del sistema inmune y que le otorgan diversidad al repertorio de anticuerpos (del Pozo-Yauner *et al.*, 2008b). Las mutaciones somáticas pueden influenciar el comportamiento de las cadenas ligeras modificando la estructura global del V_L. Tanto las mutaciones en las FR como en los CDR pueden incrementar su propensión a la agregación, pero son aquellas que afectan las FR las que perturban más eficientemente el plegamiento del V_L y aumentan su tendencia a crear fibras (Belloti *et al.*, 2000).

La amiloidosis AL deriva de una sobreproducción de cadenas ligeras monoclonales, las cuales se excretan en forma libre y se vuelven amiloidogénicas cuando alcanzan una concentración substancial y persistente en el plasma, que supera la capacidad de los mecanismos de degradación (Obici, 2005; Wilson *et al.*, 2008). Cerca de una tercera parte de los pacientes con amiloidosis AL presentan mieloma y recíprocamente 10-15 % de los pacientes con mieloma también presentan amiloidosis AL. Los pacientes con otras causas de proliferación de células plasmáticas monoclonales también pueden desarrollar amiloidosis AL (Joss y Boulton-Jones, 2005). Sin embargo, sólo una pequeña porción de las cadenas ligeras monoclonales forman fibras amiloides *in vivo* (Obici, 2005). En efecto, el exceso de cadenas ligeras libres en suero y orina es relativamente frecuente en individuos mayores de 50 años y sólo un pequeño porcentaje de ellos presenta amiloidosis (del Pozo-Yauner *et al.*, 2008b).

Es posible que la capacidad de formar fibras amiloides esté relacionada con peculiaridades estructurales de la cadena ligera. Su depósito es probablemente consecuencia de la influencia de las características del V_L determinadas por su secuencia y de las condiciones ambientales en el órgano blanco. En todo caso, la evidencia apunta a una baja estabilidad termodinámica como uno de los principales factores que explica este comportamiento: análisis comparativos entre proteínas amiloidogénicas y no amiloidogénicas han demostrado la presencia de sustituciones en posiciones claves del V_L que disminuyen la estabilidad termodinámica de las primeras respecto a sus contrapartes no amiloidogénicas del mismo grupo (Hurle *et al.*, 1994; Wall *et al.*, 1999b; Obici, 2005). Además, al igual que en los otros tipos de amiloidosis, las condiciones que desestabilizan el plegamiento nativo de las

cadena ligeras, como altas temperaturas, valores de pH bajos y desnaturalizantes como urea o cloruro de guanidina promueven su agregación bajo forma de fibras *in vitro* (Ionescu-Zanetti *et al.*, 1999; Khurana *et al.*, 2001; Souillac *et al.*, 2002a; Souillac *et al.*, 2002b, Qin *et al.*, 2007). Esto sugiere que es necesario que ocurran rearrreglos conformacionales que formen especies parcialmente plegadas, las cuales actúan como precursores en la fibrilogénesis.

Es importante señalar que a diferencia de otras discrasias de células plasmáticas, el isotipo λ es prevalente en los casos de AL (proporción λ/κ es de 3:1) (Obici, 2005), cuando en linfocitos circulantes la proporción λ/κ es de 3:2 (Kindt *et al.*, 2007). Asimismo, se ha visto un uso preferencial en la líneas de AL de los segmentos génicos que hacen contribuciones mínimas al repertorio de individuos sanos: los segmentos génicos $V\lambda 6a$ y $V\lambda 3r$ han sido identificados como precursores de más de la mitad de las cadenas amiloidogénicas reportadas, mientras que tienen una frecuencia baja en el repertorio de individuos sanos (2 y 8% respectivamente) (Solomon *et al.*, 1982; Comenzo, 2001; Abraham *et al.*, 2003). Un caso similar se ha descrito en las cadenas κ , en donde los segmentos génicos los $V\kappa 8t$ y $V\kappa 18$ están sobrerrepresentados. Hasta el momento se desconoce el origen de la asociación de estos genes con la amiloidosis AL, pero la explicación más sencilla propuesta indica que la propensión a adoptar diferentes conformaciones moleculares está codificada en la secuencia (Obici, 2005; del Pozo-Yauner *et al.*, 2008b). La hipótesis termodinámica apunta a que la secuencia codificada es poco estable termodinámicamente. Esto es particularmente notorio en el caso del segmento génico $6a$, único miembro del subgrupo λVI . Notablemente, sólo una de las cadenas ligeras monoclonales λVI obtenidas de pacientes con mieloma no estuvo implicada en deposición AL *in vivo*, pero fácilmente forma fibras *in vitro* (Wall *et al.*, 1999b, del Pozo-Yauner *et al.*, 2008b). Sigue sin elucidarse qué factores determinan esta propensión, sin embargo, se ha observado que las cadenas λVI se depositan preferencialmente, aunque no exclusivamente, en el riñón (Comenzo, 2001; Obici, 2005). Está asociación parece estar ligada a interacciones mediadas por un receptor presente en las células mesangiales (Teng *et al.*, 2004), un fenómeno que induce una transformación fenotípica de las células blanco (Keeling *et al.*, 2004). También se le ha adjudicado un papel a la especificidad por los glicosaminoglicanos del tejido renal (Stevens y Kisilevsky, 2000; Obici, 2005).

3. 6aJL2

Con el objeto de evaluar la contribución de la estabilidad de la línea germinal del gen 6a en la formación de fibras, del Pozo-Yauner diseñó 6aJL2, un dominio variable recombinante construido a partir de la secuencia de la línea germinal de los segmentos génicos δa , único gen del subgrupo λVI , y $jI2$, segmento génico de unión usado más frecuentemente por las células plasmáticas AL λ (del Pozo-Yauner *et al.*, 2008b). 6aJL2 es un dominio globular compacto que presenta el plegamiento típico de la inmunoglobulinas, el llamado “sándwich β ”, formado por dos hojas β constituidas por 3 y 5 hebras antiparalelas, las cuales están unidas por asas de diferentes longitudes (Figura 1.4) (Hernández-Santoyo *et al.*, 2010).

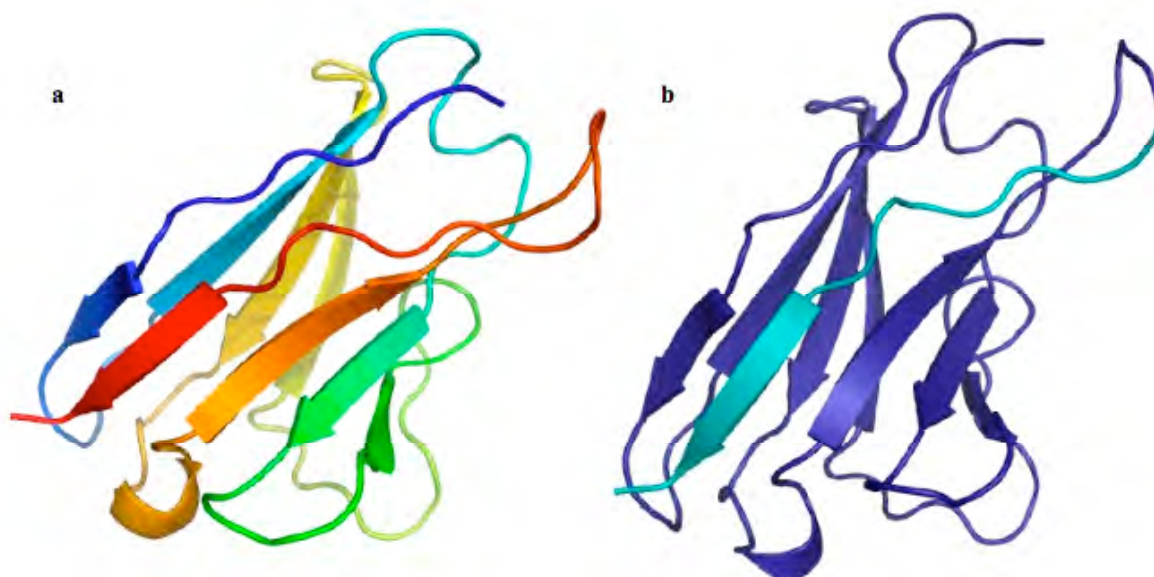


Figura 1.4. Estructura del dominio variable 6aJL2, formado por dos hojas β , constituidas a su vez por 5 y 3 hebras, respectivamente. (a) En azul, se observa el extremo amino y en rojo el extremo carboxilo, (b) porciones codificadas por el segmento génico δa y el segmento génico $jI2$, en azul y en cian respectivamente.

Las hojas β son estabilizadas por puentes de hidrógeno entre los grupos amino y carboxilo de las hebras adyacentes y se caracterizan por la alternancia de aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos, cuyas cadenas laterales están orientadas ortogonalmente al plano de la hoja. Asimismo, las hojas β se encuentran unidas entre sí por un puente disulfuro altamente conservado (Figura 1.5a). 6aJL2 presenta un único residuo de triptofano en la posición 35, el cual está totalmente conservado en los dominios V_L (Figura 1.5a) (Chotia *et al.*, 1998). En el estado nativo, éste se encuentra en cercanía con el puente disulfuro que une a las dos hojas β , por lo que su señal de fluorescencia se encuentra apagada. Los cambios

conformacionales que sufre el dominio al desplegarse o al formar fibrillas producen un aumento en la intensidad de fluorescencia que es indicativo de variaciones en la distancia entre el triptofano y el puente disulfuro (Figura 1.5b).

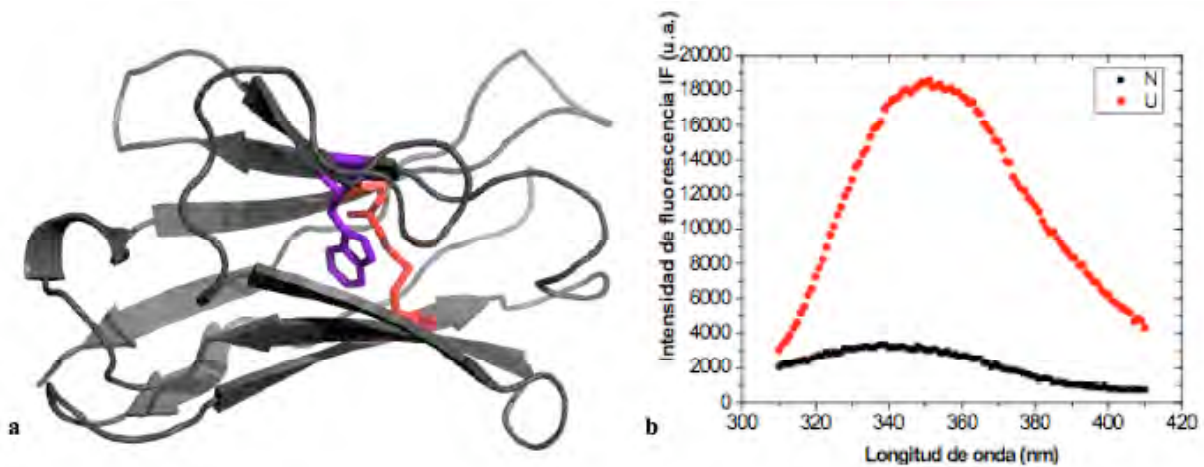


Figura 1.5. Cercanía del puente disulfuro (en rojo) y del único residuo de triptofano (en morado) presente en 6aJL2 (a). Espectro de fluorescencia de la proteína nativa (N) y desnaturalizada (U) (b).

Adicionalmente, 6aJL2 presenta un residuo de arginina en la posición 25, común a los dominios $V_L\lambda_6$, que contribuye a la estabilidad termodinámica de 6aJL2 del orden de $2.9 \pm 1.4 \text{ kcal.mol}^{-1}$, en parte al estar involucrada con el residuo de fenilalanina en la posición 2, en una interacción catión- π (del Pozo-Yauner, 2008).

Es importante señalar que a diferencia de muchos dominios variables, 6aJL2 es monomérico a las concentraciones de proteína utilizadas en espectroscopía (Blancas-Mejía, no publicado)

4. Plegamiento y fibrillogénesis de cadenas ligeras

Como se mencionó anteriormente, la hipótesis más aceptada para explicar la alta prevalencia de los dominios $V_L\lambda_6$ en casos de AL apunta a que la secuencia codificada por la línea germinal es poco estable termodinámica, lo cual facilita la formación de especies parcialmente plegadas (del Pozo-Yauner *et al.*, 2008b)

Sorprendentemente, al estudiar la estabilidad del dominio variable 6aJL2 usando cloruro de guanidina como agente caotrópico, se encontró que 6aJL2 es más estable que proteínas κ y λ amiloidogénicas para las cuales se han reportado los parámetros

termodinámicos de estabilidad, incluyendo a la única proteína $\lambda 6$ que se ha probado clínicamente como no amiloidogénica (Jto, $\Delta\Delta G = 3.7 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ respecto a 6aJL2). Estos resultados sugieren que la alta predisposición de las cadenas ligeras del subgrupo $\lambda 6$ a formar agregados amiloides *in vivo* no se puede atribuir únicamente a una baja estabilidad termodinámica de la línea germinal. Otros factores gobiernan el proceso de agregación amiloide (del Pozo-Yauner *et al.*, 2008).

La caracterización cinética y termodinámica del desplegamiento por urea o temperatura de 6aJL2 reveló la presencia de un intermediario después de varias horas de incubación a 37°C y pH 8.0 en presencia de condiciones ligeramente desnaturizantes. La formación de este intermediario parcialmente desplegado es irreversible. Su acumulación favorece la formación de fibras *in vitro*, disminuyendo la duración de la fase lag en las cinéticas de fibrillogénesis en las condiciones en las que se acumula esta especie (Blancas-Mejía *et al.*, 2009).

Esta descripción de un intermediario de plegamiento es la primera para cadenas ligeras λ . Sin embargo, en el caso de las cadenas κ , que han sido más estudiadas, existe la descripción de especies dentro y fuera de la vía de plegamiento que influyen la formación de fibrillas amiloides. Además, éstas se han encontrado a valores de pH bajos, lo cual los hace aún más interesantes.

En el caso de SMA, un $V_{L\kappa}$ recombinante que tiene la secuencia de un paciente con AL, Khurana y colaboradores (2001) demostraron mediante diferentes métodos espectroscópicos e hidrodinámicos la acumulación de dos intermediarios conformacionales con diferentes estructuras que aparecen a medida que el valor de pH disminuye. Para un valor de pH entre 4.0 y 5.0, observaron un primer intermediario que presenta cambios sustanciales de estructura terciaria, pero con poca pérdida de estructura secundaria. El segundo intermediario, observado a un valor de pH menor a 3.0 está relativamente desplegado y presenta una pérdida de estructura secundaria y terciaria sustancial. Sin embargo, se trata de una forma significativamente diferente al estado desnaturizado obtenido con urea. Además, los valores de pH bajos desestabilizaron la proteína y aceleraron la cinética de agregación.

Es notable que, al utilizar cloruro de guanidina (GuHCl) para desestabilizar este mismo dominio, se observaron dos intermediarios parcialmente plegados equivalentes a los dos encontrados previamente al variar el pH. A bajas concentraciones de GuHCl (cerca de 1M), Qin y colaboradores (2007) observaron una conformación parcialmente desplegada similar a la estructura nativa y al intermediario descrito a pH menor a 3.0, mientras que a concentraciones mayores de GuHCl encontraron un intermediario con mayor pérdida de estructura semejante al encontrado entre pH 4.0 y 5.0 (Khurana *et al.*, 2001). El intermediario más estructurado conduce, al igual que el encontrado al modificar el pH a la formación de agregados amorfos, mientras que el menos estructurado conduce a la formación de fibrillas. Es interesante que las estructuras encontradas al variar la concentración de GuHCl son comparables a aquellas encontradas al modificar el pH, ya que esto implica que en el caso de SMA, diferentes condiciones desestabilizantes llevan a estos dos intermediarios (Qin *et al.*, 2007).

El segundo caso, estudiado por el mismo grupo, corresponde a LEN, un V_{LK} recombinante no asociado a AL, pero que forma fibrillas *in vitro* bajo condiciones ligeramente desestabilizantes. A valores de pH ácidos, LEN mantiene una estructura similar a la que tiene a pH 8.0 y que no se parece a los intermediarios descritos en el caso de SMA. Sin embargo, a concentraciones altas de LEN, se encontró la formación de una especie oligomérica fuera de la vía, la cual, sorprendentemente, parece retardar la formación de fibras en vez de favorecerla (Souillac *et al.*, 2002b). Esta especie no se presenta ni a bajas concentraciones de proteína, ni a pH fisiológico, aún en presencia de concentraciones de urea moderadas (Souillac *et al.*, 2002a). Notablemente, estos dos casos sugieren que los mecanismos de oligomerización que llevan a la agregación amiloide podrían ser diferentes, aún para proteínas relacionadas.

5. Importancia del pH

Como se mencionó previamente, se ha establecido desde hace tiempo que para la mayoría de las proteínas, deben de ocurrir al menos cambios conformacionales del estado nativo para que se de la formación de fibrillas *in vivo* e *in vitro*. Experimentalmente, el uso de pH ácidos ha sido una de las condiciones más comunes para iniciar la formación de fibrillas *in vitro* (Hurle *et al.*, 1994; Lai *et al.*, 1996; Ionescu-Zanetti *et al.*, 1999; Lashuel *et al.*, 1999; Chiti *et al.*,

2001, Khurana *et al.*, 2001; Nielsen *et al.*, 2001; Souillac *et al.*; 2002a). El pH resulta por lo tanto un factor importante en el proceso de agregación amiloide.

Fisiológicamente, el pH podría ser un factor importante debido a que el riñón, órgano en el que se depositan preferencialmente las proteínas $\lambda 6$, es el único órgano en el cual hay variaciones fisiológicas significativas de pH. El pH de la orina excretada se considera fisiológicamente normal en un rango muy amplio (4.5 a 8.0) (Ganong, 2004) y en las células del túbulo proximal, en donde inicia el catabolismo de las cadenas ligeras, desciende al menos hasta 4.5 (Patton *et al.*, 1989; Ganong, 2004). Asimismo, se ha descrito que el proceso de agregación amiloide *in vivo* está asociado a un proceso de maduración en el compartimiento lisosomal maduro, a pH ácido (Teng *et al.*, 2004).

El plegamiento y la fibrillogénesis de 6aJL2 se ha estudiado principalmente a valores de pH cercanos al fisiológico. El tiempo lag para la formación de fibrillas a pH 8.0 es ligeramente mayor que el reportado a pH 7.5 (del Pozo-Yauner, 2008; Blancas-Mejía, 2009). Esta diferencia podría indicar que sucede algo similar al caso de SMA (Khurana *et al.*, 2001). Puesto que SMA y 6aJL2 son ambos dominios variables de cadenas ligeras y que cambios en el pH afectan la fibrillogénesis de SMA, podría suceder algo similar en el caso de 6aJL2 al disminuir el pH.

Existe un estudio respecto a la fibrillogénesis de proteínas $\lambda 6$ (incluyendo una proteína recombinante construida a partir de la secuencia de 6aJL2 reportada por del Pozo-Yauner) a pH 2 (Mishima *et al.*, 2009). Se reportó que bajo estas condiciones, las proteínas $\lambda 6$ estudiadas se encuentran altamente desplegadas aunque conservan el puente disulfuro y algunas interacciones entre residuos hidrofóbicos, lo cual les confiere cierta estructura residual. Los autores señalan que la presencia de estructura residual es indispensable para el proceso de fibrillogénesis. Sin embargo, la propensión para formar fibrillas (medida por el tiempo lag) que reportan para las proteínas estudiadas, incluyendo Jto y Wil -las cuales han sido ampliamente estudiadas (Wall *et al.*, 1999b; del Pozo-Yauner *et al.*, 2008)- contrasta con lo reportado en los estudios previos. La gran diferencia entre este estudio y los anteriores es la ausencia de NaCl en los amortiguadores de Mishima *et al.*. Aunque los autores adjudican la diferencia en los tiempos lag a la diferencia entre el pH utilizado en su estudio y el valor de pH empleado en los demás estudios, nuestros resultados indican, como se verá más adelante, que la diferencia es atribuible a la ausencia de NaCl.

Por lo tanto, con la finalidad de entender los factores que influyen en la tendencia de los dominios $V_L\lambda 6$ a formar depósitos amiloides, en este trabajo se caracterizaron los cambios conformacionales inducidos, la estabilidad y la cinética de fibrilogénesis de la proteína modelo 6aJL2 a diferentes valores de pH.

II. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es caracterizar los cambios conformacionales en el dominio variable recombinante de una cadena ligera, rV_L6aJL2, inducidos al variar el pH y relacionar dichos cambios con la estabilidad y fibrilogénesis de 6aJL2.

En particular, se busca:

- Determinar los cambios conformacionales a diferentes valores de pH;
- Obtener la estabilidad termodinámica al equilibrio (ΔG) a partir de experimentos de desnaturalización por urea a diferentes valores de pH;
- Caracterizar la formación de fibras amiloides a diferentes valores de pH.

III. JUSTIFICACIÓN

La deposición de placas amiloides se asocia con un número importante de enfermedades degenerativas fatales. En conjunto, este grupo de enfermedades tiene una alta incidencia (del Pozo-Yauner *et al.*, 2009b) . Sin embargo, a pesar del número cada vez mayor de proteínas o péptidos reconocidos como precursores amiloidogénicos, los mecanismos por los cuales éstos pasan de su forma soluble a agregados fibrilares altamente organizados no son claros. Entender esta transición es indispensable para poder desarrollar métodos de diagnóstico más confiables, así como estrategias terapéuticas más efectivas (Chiti y Dobson, 2006).

La relación documentada entre las proteínas $\lambda 6$ y la amiloidosis de cadenas ligeras (Solomon *et al.*, 1982; Comenzo, 2001; Abraham *et al.*, 2003) justifica el estudio de la secuencia codificada por la línea germinal. Así mismo, como se mencionó previamente, el pH es un factor importante para el proceso de agregación amiloide. En el caso de 6aJL2, el tiempo lag para la formación de fibrillas a pH 8.0 es ligeramente mayor (cerca de 5 horas) que el reportado a pH 7.5 (del Pozo-Yauner, 2008; Blancas-Mejía, 2009). Esta diferencia sugiere que modificaciones a la estructura debidas al valor de pH podrían jugar un papel importante en el mecanismo de agregación.

IV. HIPÓTESIS

- Cambios en el valor de pH generarán cambios en la estructura y en la estabilidad (ΔG) de 6aJL2, favoreciendo la formación de intermediarios.
- La presencia de dichas especies favorecerá el proceso de fibrilogénesis en ensayos *in vitro*.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

El extracto de levadura se obtuvo de Fluka Analytics y los demás reactivos de Sigma-Aldrich. Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico.

A) Sobreexpresión y purificación de 6aJL2

La sobreexpresión y purificación de la proteína recombinante 6aJL2 se llevó a cabo usando el protocolo descrito por del Pozo-Yauner *et al.* (2008), modificado por Blancas-Mejía *et al.* (2009). El amortiguador de trabajo utilizado fue fosfato de sodio 50 mM, NaCl 100 mM, pH 8.0, (PBS por sus siglas en inglés). Brevemente, células BL21-DE3 de *Escherichia coli* fueron transformadas con el plásmido pSyn1-6aJL2 o con el plásmido pET27-6aJL2 y se crecieron en medio YT2x (500mL), en presencia de ampicilina o kanamicina respectivamente, hasta alcanzar una densidad óptica de 1.0. Posteriormente se indujeron con IPTG 1 mM, a 30 °C, 150 rpm, durante 16 horas. Los medios se centrifugaron a 8000 rpm, a 4 °C, durante 15 minutos y los pellets se resuspendieron en 50 mL de una solución de sacarosa al 20% (p/v), Tris 0,1M y EDTA 0,1mM (pH 8.0) y se incubaron en hielo 15 minutos. Las células se centrifugaron a 8000 rpm por 15 min, se resuspendieron en agua destilada fría, se incubaron en hielo y se volvieron a centrifugar a 8000 rpm por 15 minutos y se descartó el precipitado. Las soluciones de trabajo se mantuvieron a 4 °C, y las células y el extracto periplásmico, en hielo.

El extracto periplásmico se concentró por ultrafiltración centrífuga a 5000 rpm usando una membrana de corte de 10 kDa (Amicon, Millipore), se filtró y se cargó en una columna de exclusión molecular Superdex-75, equilibrada en PBS pH 8.0, acoplada a un sistema FPLC que cuenta con un detector de absorbancia a 280nm.

Se juntaron las fracciones con proteína y su pureza se determinó por electroforesis en condiciones desnaturalizantes (PAGE-SDS), mientras que la integridad hidrodinámica de la proteína se verificó utilizando una columna Superdex 75 HR 10/30 analítica acoplada al sistema FPLC, usando la proteína obtenida en purificaciones anteriores como blanco.

La concentración de proteína se determinó por absorción de luz UV a 280 nm, usando un coeficiente de extinción molar de $1.2327 \text{ mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mL}$ calculado a partir de la secuencia de aminoácidos ($\text{PM}=11950 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) con el programa ProtPram (Blancas-Mejía *et al.*, 2009)

En la mayoría de los casos, la proteína obtenida se liofilizó y se almacenó a 4 °C. Para ciertos experimentos, se utilizó la proteína sin liofilizar.

B) Experimentos al equilibrio

Excepto en los casos en los que se menciona, la proteína liofilizada se resuspendió en agua estéril, para evitar aumentar la concentración de sales, y se determinó la concentración por absorción de UV.

A menos de que se indique lo contrario, los amortiguadores se prepararon siguiendo el protocolo de Khurana y colaboradores (2001): se utilizaron 50 mM del agente amortiguador apropiado con NaCl 100 mM (fosfato monobásico y ácido fosfórico para valores de pH 2.0 a 3.0, ácido acético y acetato de sodio de 3.5 a 5.5, BIS-TRIS de 6.0 a 6.5 y HEPES de 7.0 a 8.0, excepto en los experimentos de dicroísmo circular, en donde se utilizó fosfato dibásico).

De acuerdo con un estudio previo, el desplegamiento de 6aJL2 es reversible y alcanza un equilibrio dinámico en poco tiempo, mientras que la formación de fibrillas es un proceso cinético lento que ocurre a una escala temporal mayor (Blancas-Mejía, 2009). Se siguió por lo tanto la metodología propuesta en ese estudio, en donde se realizaron experimentos a una escala temporal corta (5 min) y a una escala temporal larga (24 h). Experimentos preliminares indicaron que el equilibrio a una escala temporal corta se alcanza en menos de 5 minutos.

1. Incubación a diferentes valores de pH en ausencia de agente caotrópico

Los experimentos descritos a continuación se realizaron simultáneamente, a partir de una misma muestra, a excepción del dicroísmo circular de aromáticos. En este caso, la proteína se concentró por ultrafiltración centrífuga a 5000 rpm con una membrana de corte de 10k Da y después se ultracentrifugó por una hora a 40000 rpm para evitar la presencia de agregados profibrilares.

Se preparó el volumen de muestra necesario para realizar dos lecturas, una a la escala temporal corta (5 min) y otra a la escala temporal larga (24 h), para evitar el blanqueamiento de la muestra.

Para alcanzar el valor de pH deseado, la proteína concentrada se diluyó en el amortiguador con el valor del pH de interés. Se preparó una serie de amortiguadores con NaCl 100 mM y una serie de amortiguadores sin NaCl.

a) Fluorescencia intrínseca

Las mediciones de fluorescencia se realizaron usando un espectrofluorómetro ISS PC1. La temperatura de las muestras se reguló con un Peltier, con una incertidumbre de 0.02°C.

La proteína se incubó a una concentración de 0.5 mg·mL⁻¹ a 37 °C a diferentes valores de pH. Las muestras se analizaron en un intervalo de pH de 2.0 a 8.0, con un escalón de 0.5 unidades. Como se indicó previamente, se tomó la primera medida a los 5 minutos y una segunda medida a las 24 horas. Las muestras se excitaron a 295 nm (ancho de banda 1.0 nm) y el espectro de emisión de fluorescencia se colectó en el intervalo de 310-410 nm (ancho de banda 0.5 nm). Se verificó el valor del pH de cada una de las muestras al terminar el experimento.

b) Unión de ANS

El ácido 8-anilino-1-naftalen-sulfónico (ANS) se utiliza comunmente para monitorear cambios conformacionales en proteínas asociados a la exposición u ocultamiento del disolvente de regiones hidrofóbicas (Chávez-Cárdenas, 1998; Souillac *et al.*, 2002a; Souillac *et al.*, 2002b). La unión no covalente del ANS a “parches” hidrofóbicos expuestos se caracteriza por un aumento en la intensidad de fluorescencia y una disminución de los valores de $\lambda_{\text{máx}}$ (efecto ipsocrómico) (Souillac, 2002b).

Las mediciones de fluorescencia se realizaron usando un espectrofluorómetro ISS PC1. Las muestras se excitaron a 380 nm (ancho de banda 1.0 nm) y el espectro de emisión de fluorescencia se colectó en el intervalo de 420 a 600 nm (ancho de banda 0.5 nm).

Se preparó una solución stock de ANS 1 mM y su concentración se verificó por absorción de UV a 350 nm, utilizando un coeficiente de extinción molar en agua de $5000\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (De Filippis *et al.*, 1996). La medición de unión a ANS se realizó inmediatamente después de medir fluorescencia intrínseca, agregando el volumen necesario de ANS a la celda con la muestra para una concentración final de $100\mu\text{M}$.

c) Dicroísmo circular

Los experimentos de dicroísmo circular se realizaron en un espectropolarímetro JASCO J-715, a 37°C , utilizando un Peltier para regular la temperatura.

Para el dicroísmo circular en el UV lejano, se utilizaron las mismas muestras que para medir la fluorescencia intrínseca. La concentración de proteína fue de $0.5\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, en una celda de 0.1 cm de paso de luz. Los espectros de elipticidad se colectaron de 210 a 250 nm, con un ancho de banda de 1.0 nm, excepto en los casos del amortiguador de BIS-TRIS en donde se colectaron de 215 a 250 nm.

Los experimentos de dicroísmo circular en el UV cercano (aromáticos) se realizaron a una concentración de $1.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, en una celda de 1.0 cm de paso de luz. Los espectros de elipticidad se colectaron en el rango de 250 a 320 nm , con un ancho de banda de 1.0 nm . En este caso, la misma muestra se midió a los 5 minutos y a las 24 horas.

2. Desnaturalización por agentes caotrópicos

Para evaluar la estabilidad de 6aJL2 a diferentes valores de pH, se siguió el cambio en la fluorescencia intrínseca del triptofano en presencia de concentraciones crecientes de urea (0 a 6 M). Escogimos la urea sobre otros agentes caotrópicos por su presencia fisiológica normal en el riñón.

Al igual que en los experimentos descritos previamente, se realizaron mediciones a los 5 minutos y a las 24 horas de incubación.

Para cada valor de pH, la proteína se incubó a una concentración de $0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ en los amortiguadores descritos previamente y en concentraciones variables de urea durante 5 minutos a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ y después se incubó 24 horas. A partir de los datos de fluorescencia a 352 nm ($\lambda_{\text{máx}}$) se calculó la fracción de proteína nativa en función de la concentración de urea, así como los centros de masa espectral (CME), dados por

$$CME = \frac{\sum I_i \lambda_i}{\sum I_i}$$

en donde I_i es la intensidad de fluorescencia correspondiente a la longitud de onda λ_i .

Los datos espectroscópicos se ajustaron usando un modelo de dos estados, asumiendo un equilibrio entre el estado nativo (**N**) y el desnaturalizado (**U**):

$$y_{obs} = \frac{(y_N + m_N [D]) + (y_U + m_U [D]) e^{-(\Delta G_{H_2O}^0 + m[D])/RT}}{1 + e^{-(\Delta G_{H_2O}^0 + m[D])/RT}}$$

en donde y_{obs} es la señal observada, y_N y y_U son la señal del estado nativo y del estado desnaturalizado respectivamente; $\Delta G_{H_2O}^0$ la energía libre de desplegamiento en ausencia de

desnaturalizante; D es la concentración de urea y m es $\delta_T \Delta G / \delta[D]$. Las líneas base de pre y post transición son descritas por las pendientes del ajuste lineal m_N y m_U respectivamente (Santoro y Bolen, 1988; Bolen y Santoro, 1988).

C) Ensayo de fibrillogénesis *in vitro* a diferentes valores de pH

La Tioflavina T (ThT) es un colorante que se une específicamente a los agregados amiloides, mas no a los precursores amiloidogénicos solubles ni a los agregados amorfos (LeVine III, 1999). Al hacerlo, se observa un incremento en la intensidad fluorescencia de dicho colorante, el cual es proporcional a la cantidad de fibras presentes (LeVine III, 1999). Esto permite su uso como sonda para monitorear la formación de fibrillas tipo amiloide *in vitro* de forma rutinaria (LeVine III, 1999).

Para estos experimentos, la proteína utilizada se ultracentrifugó a 40000 rpm durante 30 horas para eliminar posibles núcleos de fibrilación o fibras presentes en las muestras antes de iniciar la cinética.

Se prepararon 6.0 mL de solución de proteína (a una concentración final de $0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) en viales de polipropileno de fondo plano, a valores de pH 2.0, 3.0, 4.5, 7.0 y 8.0 en los amortiguadores con NaCl descritos previamente. Cada medición se realizó por triplicado. Las muestras se agitaron continuamente a 250 rpm con barras magnéticas recubiertas con teflón en una parrilla de agitación magnética multipuntos (Variomag) colocada dentro de una incubadora a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. A diferentes tiempos, se transfirieron alícuotas de $100 \text{ }\mu\text{L}$ a celdas de poliestireno con 2.6 mL de ThT $10 \text{ }\mu\text{M}$, pH 8.0. Las celdas se mezclaron por inversión y se midió la fluorescencia de la ThT en el espectrofluorómetro ISS PC1 usando una longitud de onda de excitación de 450 nm (ancho de banda 1.0 nm) y una longitud de emisión de 490 nm (ancho de banda 1.0 nm)

Ya que la formación de fibrillas *in vitro* sigue un crecimiento por nucleación (Chiti y Dobson, 2006), en el cual se presenta una fase de retardo antes del crecimiento de las fibrillas y que este mecanismo se ha observado para 6aJL2 (del Pozo-Yauner *et al.*, 2008; Blancas-Mejía *et*

al., 2009), se tomaron muestras cada dos horas durante el periodo correspondiente a la pre-transición y cada hora en la fase de crecimiento, al notarse un aumento en la intensidad de fluorescencia de la ThT. La cinética de formación de fibras se siguió por 50 horas.

A partir de la pendiente de la región lineal de la fase de crecimiento se obtuvieron las constantes de velocidad de crecimiento de las fibrillas. El tiempo de retardo se calculó mediante extrapolación de la recta de la fase lineal de crecimiento al valor basal.

VI. RESULTADOS

A) Propiedades espectroscópicas a diferentes valores de pH en ausencia de agente caotrópico.

1. En presencia de NaCl

Como se mencionó anteriormente, la señal de fluorescencia del estado nativo del único residuo de triptofano presente en 6aJL2 en el estado nativo es mínima debido a su cercanía al puente disulfuro. Durante el desplegamiento, se observa un incremento en la señal de fluorescencia del triptofano debido a su alejamiento del puente disulfuro (Figura 1.5b). Este cambio en la señal de fluorescencia se utilizó por lo tanto como medida de los cambios conformacionales que sufre el dominio al variar el pH del sistema.

Las muestras incubadas durante 5 minutos, a 37° C a diferentes valores de pH presentaron dos comportamientos distintos. A $\text{pH} \leq 4.5$, los espectros mostraron una marcada dispersión de luz (de 310 a 330 nm), lo cual sugiere la presencia de especies oligoméricas de mayor peso molecular (Figura 5.1a). Sin embargo, la ausencia de turbidez visible sugiere que dichas especies son solubles. Por otra parte, a $\text{pH} > 4.5$, los espectros no presentaron dispersión de luz y su intensidad de fluorescencia, así como su máximo de emisión fueron muy similares ($\text{IF} \cong 8000$, $\lambda_{\text{máx}} \cong 337 \text{ nm}$) (Figura 5.1a).

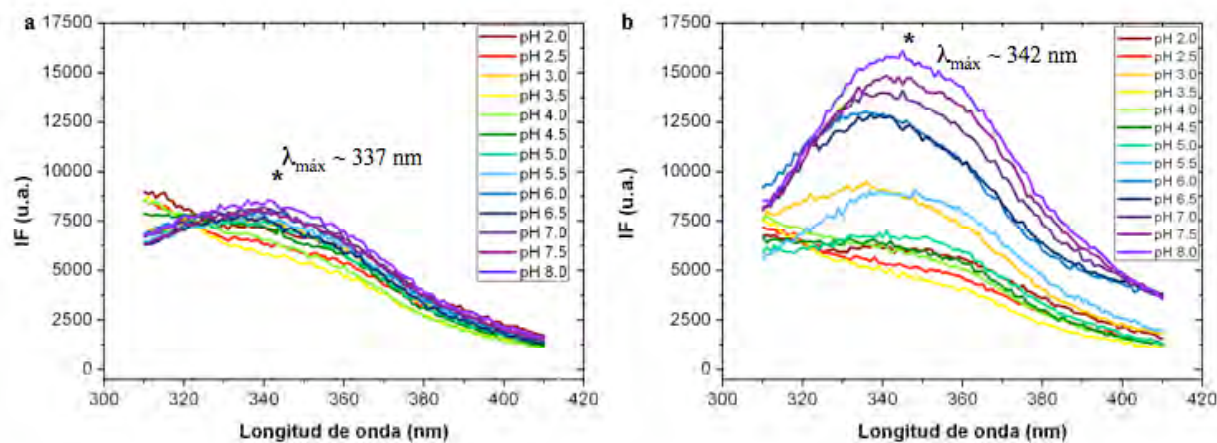


Figura 5.1. Espectros de fluorescencia obtenidos a los cinco minutos (a) y 24 horas de incubación (b) en presencia de NaCl.

Al comparar los espectros de fluorescencia de las muestras incubadas cinco minutos y 24 horas, se observó que los espectros de las muestras a $\text{pH} \leq 4.5$ fueron idénticos para ambos tiempos de incubación (Figura 5.2a). Por lo tanto, para estas muestras, los cambios inducidos al cambiar el valor de pH fueron muy rápidos y se mantuvieron. Por otra parte, las muestras a $\text{pH} > 4.5$ presentaron un aumento en la intensidad de fluorescencia, además de un efecto barocrómico ($\lambda_{\text{máx}} \cong 342 \text{ nm}$) a tiempos de incubación largos (Figura 5.2 y 5.1b). Estas muestras no presentaron evidencia de agregación en ninguno de los dos tiempos de incubación.

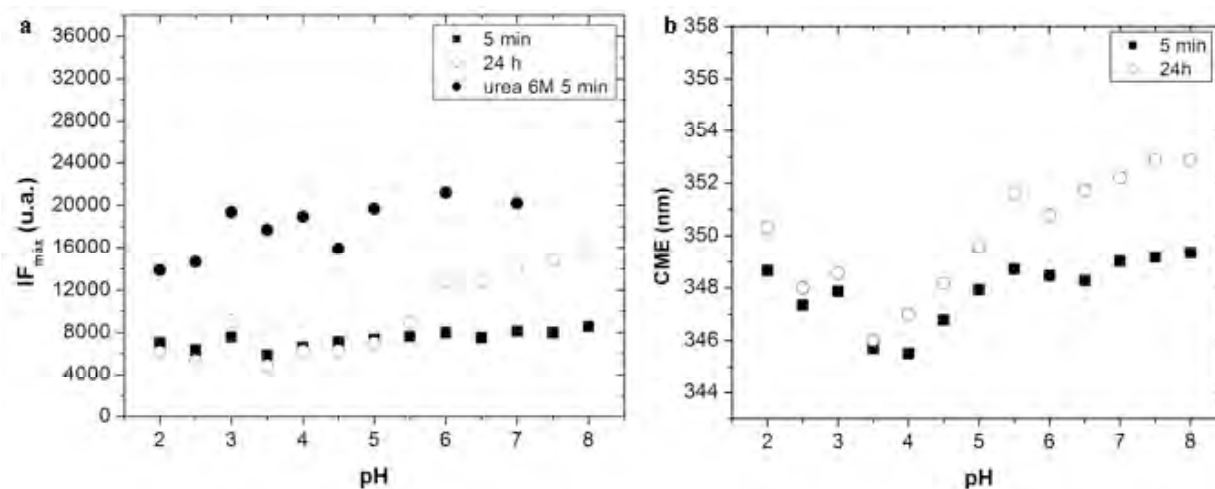


Figura 5.2. Intensidad de fluorescencia máxima en función del pH a los cinco minutos y 24 horas de incubación. Se muestran la intensidad de fluorescencia máxima obtenida en urea 6M a los cinco minutos de incubación como punto de comparación (a). CME a los cinco minutos y 24 horas de incubación (b).

Este mismo comportamiento se observó en los CME : los valores obtenidos para las muestras a $\text{pH} \leq 4.5$ fueron similares a los cinco minutos y a las 24 horas de incubación, mientras que para las muestras incubadas a un $\text{pH} > 4.5$ se observó un corrimiento hacia valores mayores (Figura 5.2b). El efecto barocrómico observado en el CME no corresponde a la formación de fibras amiloides, puesto que la formación de éstas presenta con un efecto ipsocrómico (datos no presentados; Touchette *et al.*, 2010). Es interesante que los valores menores corresponden a las muestras incubadas entre 3.5 y 4.5 (Figura 5.2b).

Tiempo seguido, se midió la unión de 6aJL2 a la sonda ANS. A los 5 minutos de incubación, 6aJL2 no une ANS apreciablemente ($IF_{\text{máx}} \cong 9000$). A valores de pH neutros o

ligeramente alcalinos, no hay un aumento significativo en la fluorescencia y se observó únicamente un desplazamiento heterogéneo del $\lambda_{\text{máx}}$ de 2-3 nm respecto a los blancos (Figuras 5.3a y 5.4). Aunque se observó un aumento en la fluorescencia en los valores de pH más ácidos, en especial a pH 2.0, ésta es apenas el doble de la fluorescencia del blanco y no estuvo acompañado del efecto ipsocrómico que caracteriza la unión de ANS a sitios hidrofóbicos expuestos, el cual se ha observado con 6aJL2 en condiciones desnaturalizantes (datos no presentados).

A las 24 hrs de incubación, la intensidad fluorescencia del ANS aumentó muy ligeramente en los valores de $\text{pH} \geq 5.0$ y disminuyó ligeramente a valores de $\text{pH} < 5.0$. Sin embargo, no se observa un corrimiento del $\lambda_{\text{máx}}$ (Figuras 5.3b y 5.4). La ausencia de desplazamiento del máximo de fluorescencia tampoco se observó en los CME de la fluorescencia del ANS (datos no presentados).

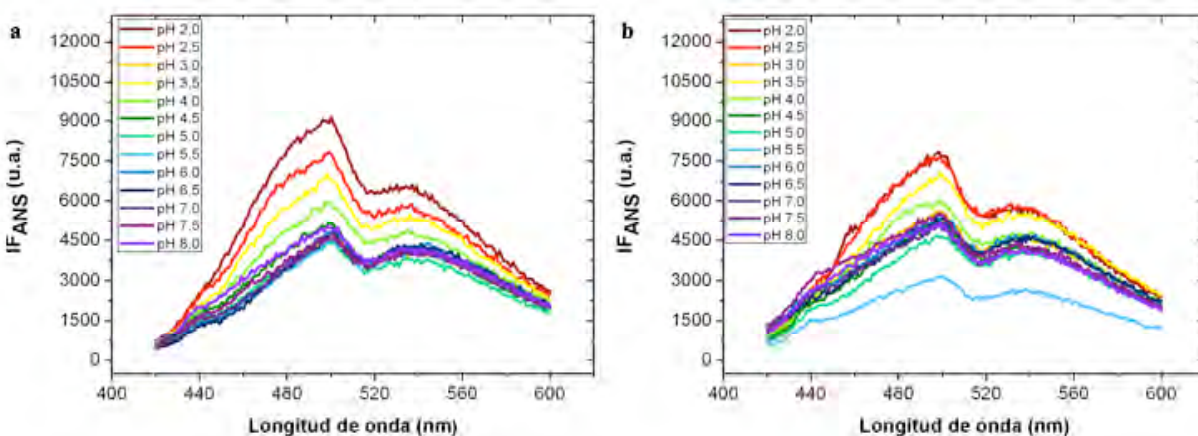


Figura 5.3. Espectros de fluorescencia de ANS a los cinco minutos (a) y 24 horas de incubación (b) en presencia de NaCl.

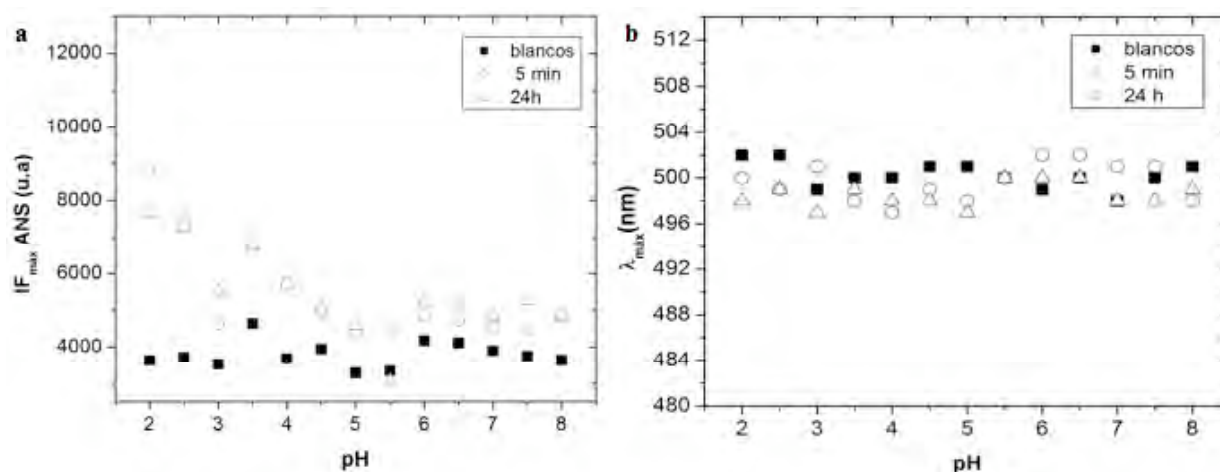


Figura 5.4. Intensidad de fluorescencia del ANS máxima en función del pH (a) y $\lambda_{\text{máx}}$ (b), a los cinco minutos y 24 horas de incubación en presencia de NaCl.

A pesar de la alta concentración de proteína utilizada, al igual que otros sandwiches- β (Ghose y Jirgensons,1971), 6aJL2 tiene poca señal en el dicroísmo de UV lejano. Los espectros obtenidos a los 5 minutos y 24 horas de incubación presentaron un mínimo a 217 nm consistente con una estructura de hojas- β antiparalelas. Además, para valores de $\text{pH} \geq 4.5$, presentaron una banda a 230 nm (Figura 5.5). Esta señal se ha observado en otros dominios variables y se ha adjudicado a las interacciones de grupos de residuos aromáticos (Qin *et al.*, 2007). El hombro a 230 nm es más pronunciado a valores de pH cercanos a la neutralidad y desaparece a valores de pH ácidos (Figura 5.6b).

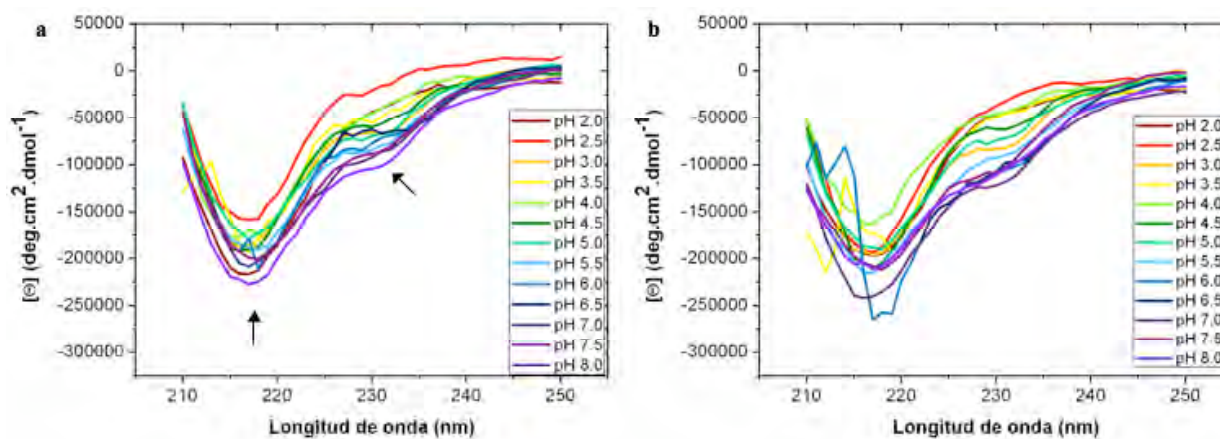


Figura 5.5 Elipticidad molar en el UV lejano a los cinco minutos (a) y 24 horas de incubación (b) en presencia de NaCl. Las flechas indican el mínimo a 217 nm y el hombro a 230 nm.

Prácticamente no se observaron cambios en la elipticidad molar a 217 nm entre las dos escalas temporales (Figura 5.6a). A 230 nm, la elipticidad molar disminuye ligeramente a las 24 horas (Figura 5.6b).

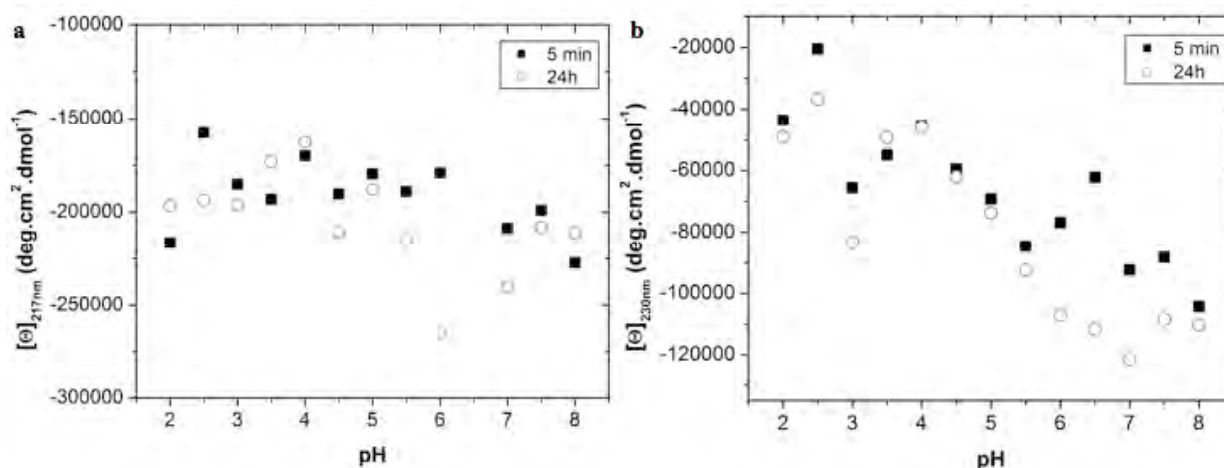


Figura 5.6. Elipticidad molar a 217 nm (a) y 230 nm (b) a los cinco minutos y 24 horas de incubación en presencia de NaCl.

Por otro lado, los espectros de dicroísmo circular de UV cercano muestran dos picos positivos definidos a 296 y 269 nm. El primero corresponde a la señal del triptofano 35 (296 nm), mientras que el segundo al conjunto de tirosinas (269 nm) (seis residuos presentes en 6aJL2). La señal de ambos fue parecida (Figura 5.7a).

A los cinco minutos de incubación, la señal de elipticidad disminuyó un poco al disminuir el pH, sin embargo se mantuvieron los dos picos definidos. A partir del pH 4.5, sólo se observaron pequeños cambios en el máximo a 269nm (Figura 5.7a).

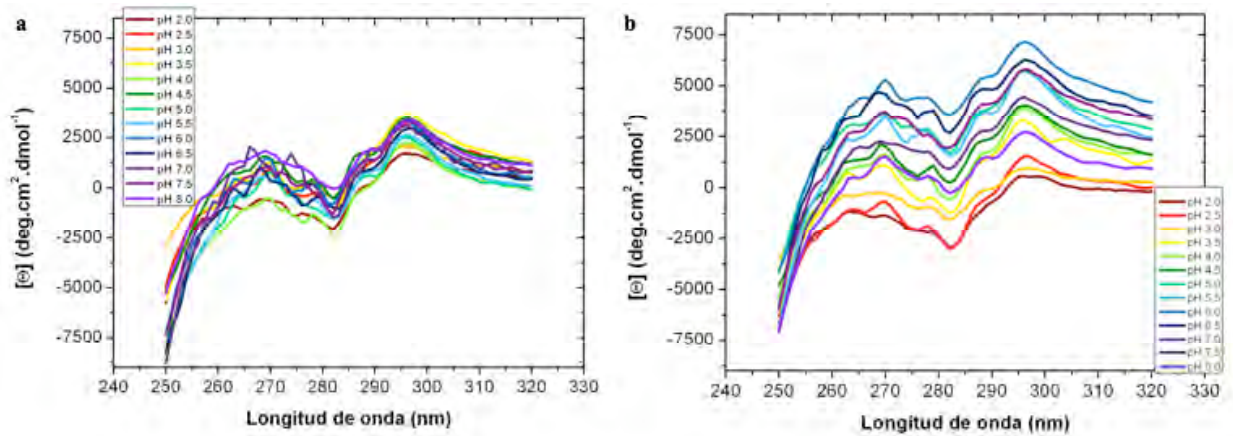


Figura 5.7. Elipticidad molar en el UV cercano a los cinco minutos (a) y 24 horas de incubación (b) en presencia de NaCl.

A las 24 horas de incubación, se observó un aumento de la señal en los valores de pH más cercanos a la neutralidad (pH entre 5.0 y 8.0). La forma de los espectros se mantuvo, sólo ocurrió una translación de los espectros hacia valores de elipticidad mayores (Figura 5.7b). Ya que durante la desnaturalización por urea, ambos picos se pierden (Blancas-Mejía *et al.*, 2009), nuestros resultados indican que la estructura de 6aJL2 se conserva al variar el pH. Al igual que por fluorescencia, se observaron rearrreglos a valores de pH más neutros. Es importante señalar que estos no se observaron a pH 8 (lo que coincide con lo observado previamente) (Figura 5.8).

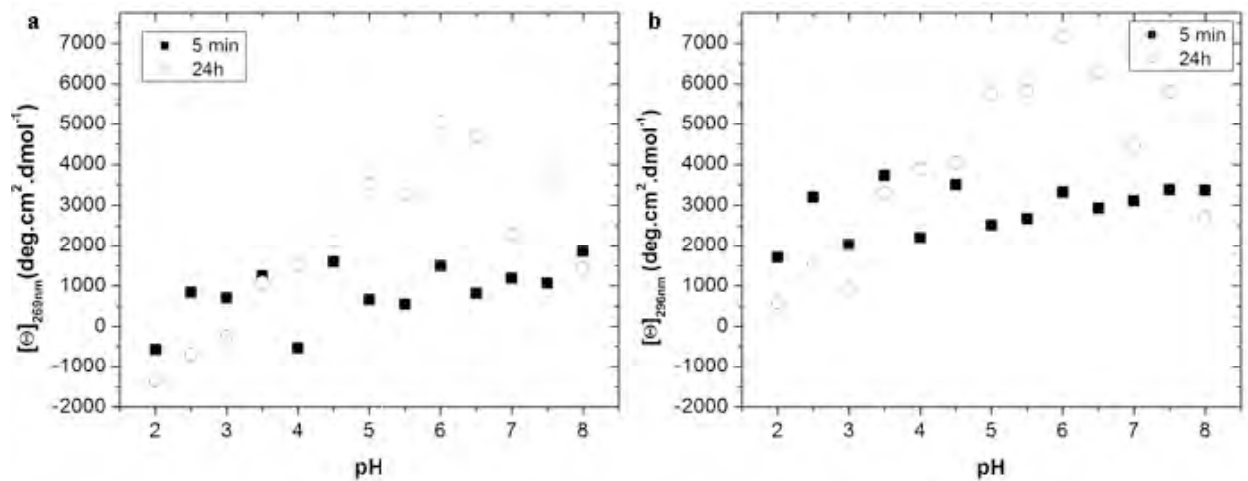


Figura 5.8. Elipticidad molar a 269 nm, el pico correspondiente a la señal de las tirosinas presentes en 6aJL2, (a) y a 296 nm, el pico correspondiente a la señal del único residuo de triptofano (b) a los cinco minutos y 24 horas de incubación en presencia de NaCl.

Los espectros obtenidos a las 24 horas de incubación sugieren que los espectros obtenidos se deben a un un corrimiento de la línea base. En efecto, no debería de haber cambios en la señal a 320 nm. Los espectros se corrigieron por lo tanto restándole un valor constante a todo el espectro para obtener una señal en ausencia de lo que podría ser un corrimiento de la línea base. Como resultado de esta corrección, no se observaron cambios en la elipticidad molar a 269 nm entre las muestras incubadas cinco minutos y 24 horas, ni a 296 nm (Figura 5.9). Esto es, con la corrección no se observaron cambios en los valores de pH cercanos a la neutralidad que reporta por otras técnicas (y en las muestras independientes utilizadas para calcular la estabilidad termodinámica, Figura 5.16). Asimismo, a 269 nm la elipticidad molar de las muestras incubadas a pH 3.0 y 3.5 (≈ 0) es indicativa de una pérdida total de estructura a estos valores de pH, lo cual contrasta con nuestros resultados de estabilidad termodinámica (ver más adelante). Como además el corrimiento observado para las muestras fue mucho mayor que para los blancos (Figura 5.10), nuestros resultados indican que el corrimiento aparente de la señal de dicroísmo no es un artefacto espectral, sino que refleja cambios estructurales.

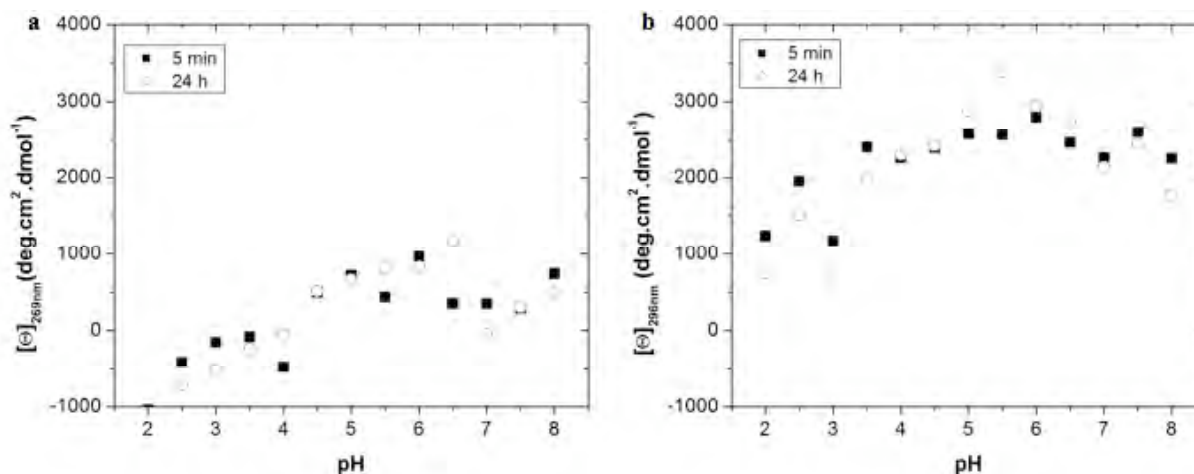


Figura 5.9. Elipticidad molar corregida a 269 nm, el pico correspondiente a la señal de las tirosinas presentes en 6aJL2, (a) y a 296 nm, el pico correspondiente a la señal del único residuo de triptofano (b) a los cinco minutos y 24 horas de incubación en presencia de NaCl.

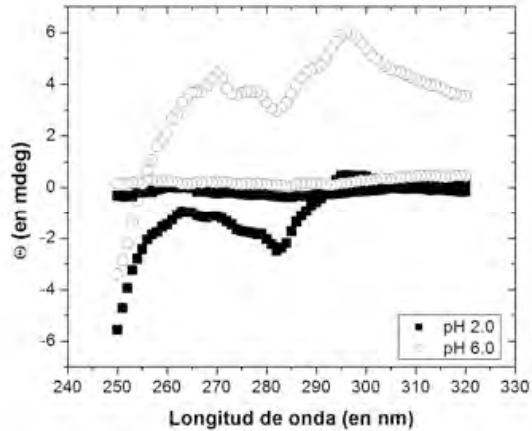


Figura 5.10. Elipticidad obtenida para las muestras con mayor corrimiento y sus respectivos blancos.

2. En ausencia de NaCl

Al igual que en presencia de NaCl, las muestras incubadas a pH entre 2.5 y 4.5 presentaron dispersión al inicio del espectro de intensidad de fluorescencia, desde los cinco minutos. En este caso, tampoco se observó turbidez en las muestras. De igual forma, para las muestras incubadas a un valor de $\text{pH} \geq 5.0$ tampoco se observó dispersión. Sin embargo, se observó un marcado aumento en la intensidad de fluorescencia intrínseca a pH 2.0, lo que indica que la estructura de la proteína se encuentra severamente comprometida (IF máx ≈ 16000 , comparable con la obtenida con urea 6M a pH 2.0 en presencia de NaCl) (Figuras 5.10a y 5.11a).

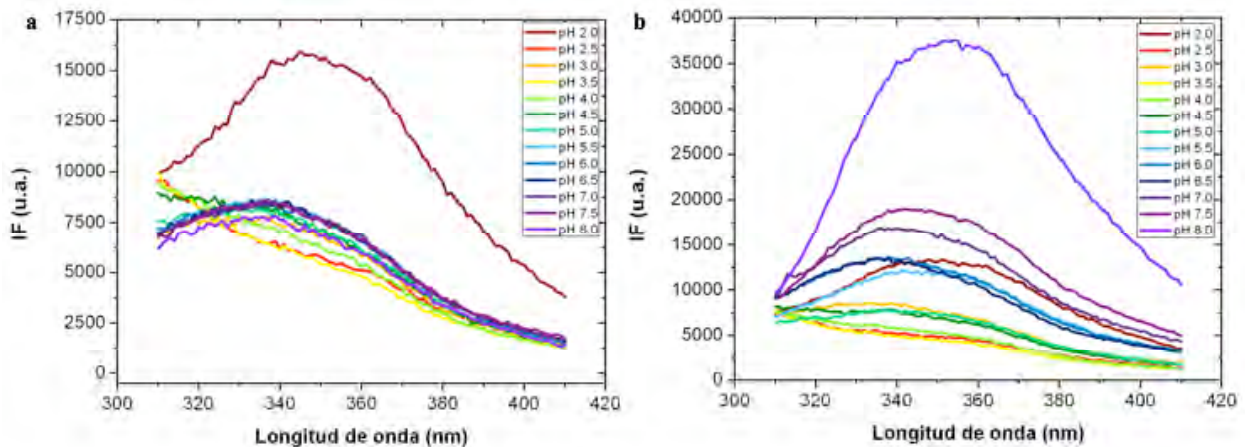


Figura 5.11. Espectros de fluorescencia a los cinco minutos (a) y 24 horas de incubación (b) en ausencia de NaCl.

A las 24 horas de incubación, se observaron cambios importantes: excepto para los valores de pH intermedios, la intensidad de fluorescencia intrínseca aumentó drásticamente. El espectro obtenido indica que tras 24 horas en ausencia de NaCl tanto la muestra incubada a pH 2.0 como la incubada a pH 8.0, se encuentran desnaturalizadas (Figura 5.11b y 5.12a).

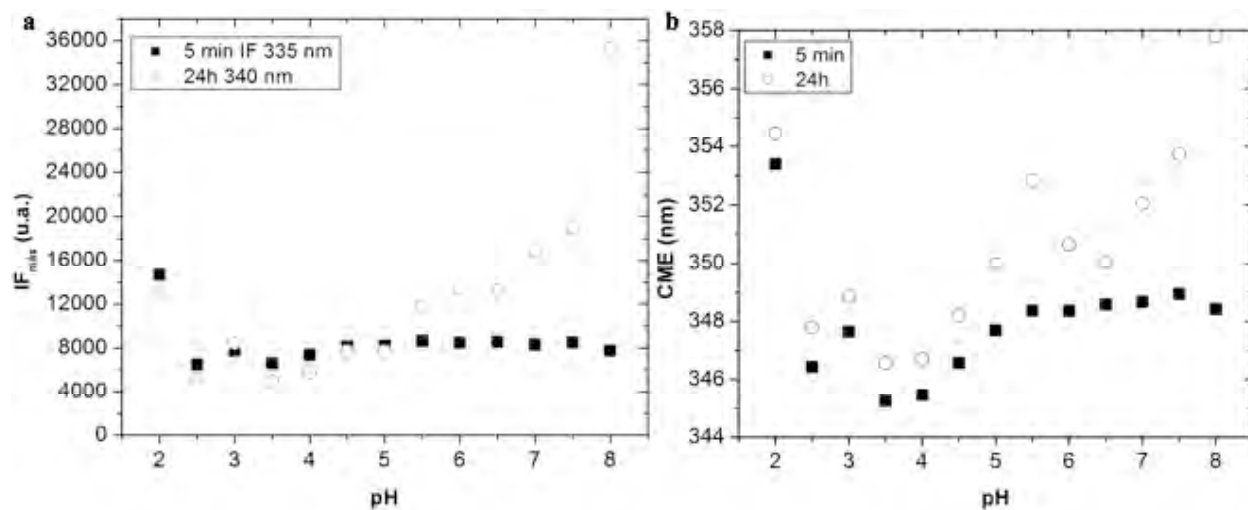


Figura 5.12. Intensidad de fluorescencia máxima en función del pH a los cinco minutos y 24 horas de incubación en ausencia de NaCl(a). CME a los cinco minutos y 24 horas de incubación (b) en ausencia de NaCl.

Las muestras incubadas en ausencia de NaCl (Figura 5.13 y 5.14) presentaron una mayor unión a ANS que las incubadas con NaCl (Figura. 5.3 y 5.4). En las muestras incubadas a valores cercanos a pH neutro o ligeramente alcalinos, se observó una intensidad de fluorescencia de ANS ligeramente mayor en comparación a los blancos sin proteína; la fluorescencia también aumentó en los valores de pH más ácidos (Figura 5.12a). Sin embargo, aún en estas condiciones sólo se observó un muy ligero efecto ipsocrómico (cerca de 4 nm) (Figura 5.14b).

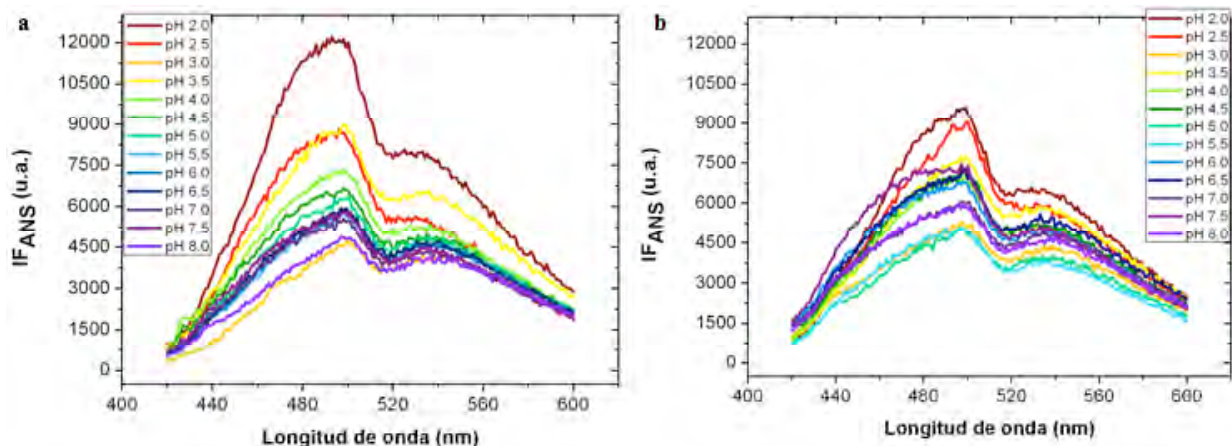


Figura 5.13. Espectros de fluorescencia del ANS a los cinco minutos (a) y 24 horas de incubación (b) en ausencia de NaCl.

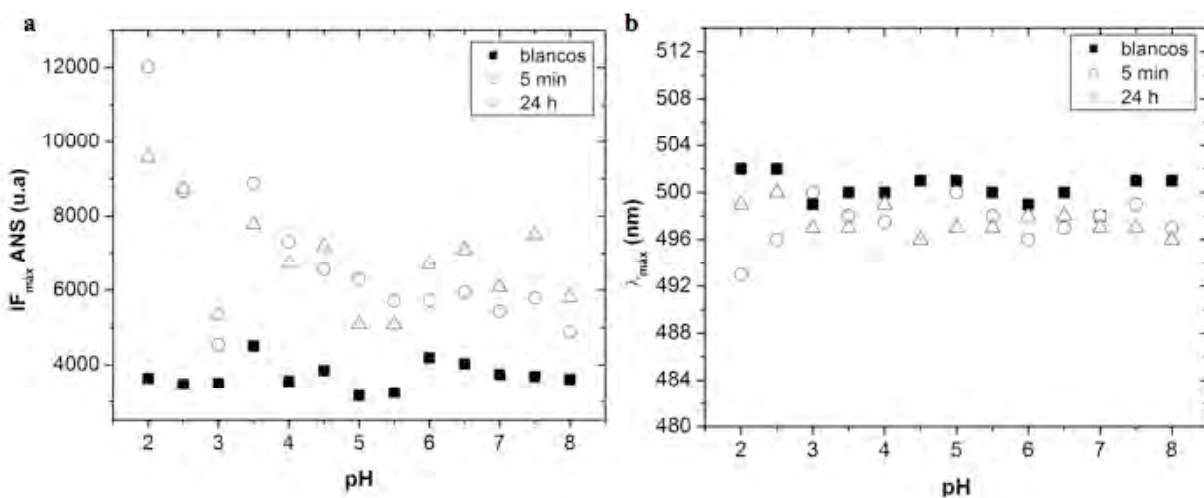


Figura 5.14. Intensidad de fluorescencia del ANS máxima en función del pH (a) y $\lambda_{\text{máx}}$ (b), a los cinco minutos y 24 horas de incubación en ausencia de NaCl.

Por otro lado, los espectros obtenidos por dicroísmo circular en el UV lejano son los esperados para una estructura de hojas- β antiparalelas, con un mínimo característico a 217 nm. El único espectro inusual es el de la muestra incubado a pH 2.0, en donde se observó un corrimiento del mínimo a valores de longitud de onda menores por lo que no se apreció el mínimo. Al igual que en el caso de las muestras incubadas con NaCl, se observa un hombro a 230 nm para las muestras incubadas a valores de $\text{pH} > 4.5$ (Figura 5.15)

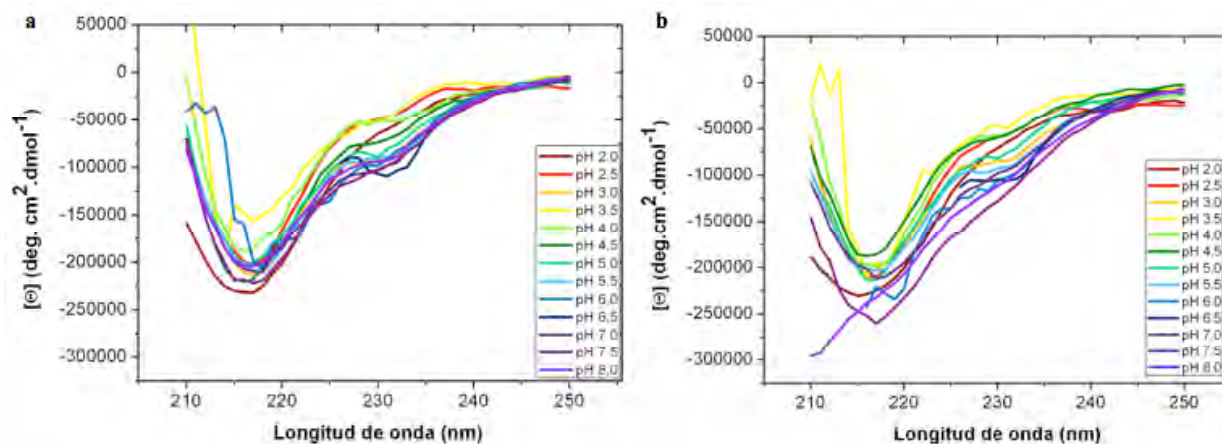


Figura 5.15. Elipticidad molar en el UV lejano a los cinco minutos (a) y 24 horas de incubación (b) en ausencia de NaCl.

Al igual que en las muestras incubadas en presencia de NaCl, casi no se observaron cambios en el valor de elipticidad molar a 217 nm; de hecho es en donde menos cambios se observaron en función del pH y del tiempo (Figura 5.16a). Sin embargo, a 230 nm, no se observaron cambios en función del tiempo, sólo con el pH, lo cual contrasta con las muestras incubadas en presencia de NaCl en donde se observó una disminución del valor de elipticidad molar a las 24 horas, en especial a $\text{pH} \geq 5.0$ (Figuras 5.6 y 5.16b).

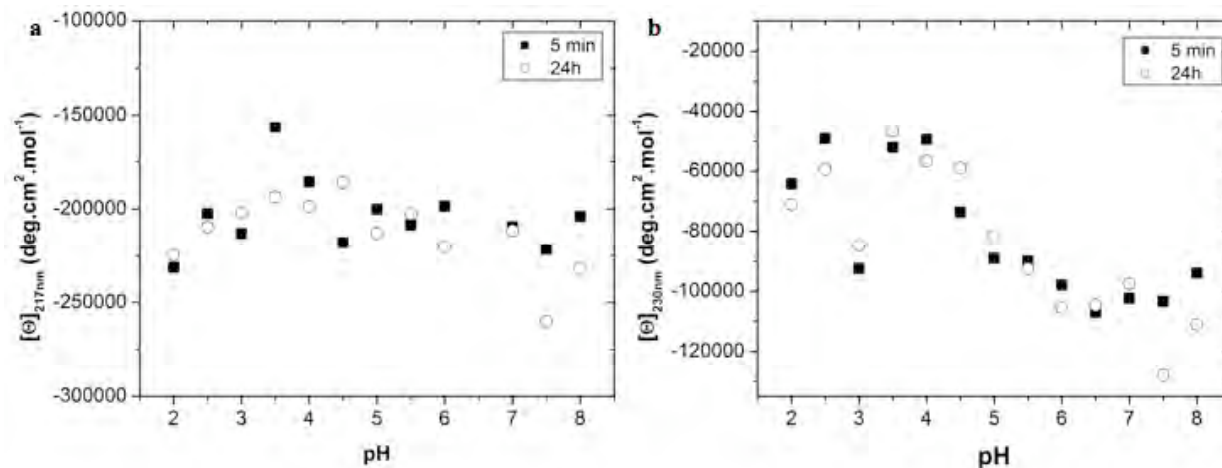


Figura 5.16. Elipticidad molar a 217 nm (a) y 230 nm (b) a los cinco minutos y 24 horas de incubación

Por otro lado, a los cinco minutos de incubación, los espectros de dicroísmo circular de UV cercano mostraron, al igual que las muestras incubadas en presencia de NaCl, dos picos positivos

definidos a 296 y 269 nm (Figura 5.17). 6aJL2 tiene menos señal y por lo tanto menos estructura en ausencia de NaCl que su presencia.

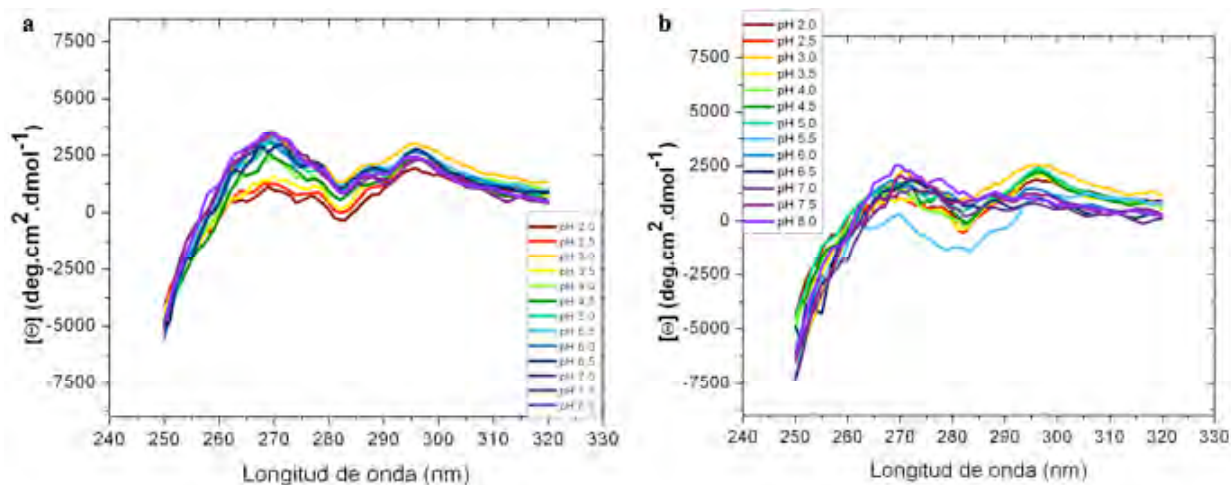


Figura 5.17. Elipticidad molar en el UV cercano a los cinco minutos (a) y 24 horas de incubación (b) en ausencia de NaCl.

A las 24 horas de incubación, se observó una disminución de la elipticidad. A valores de $\text{pH} \geq 4.5$, se modifica la forma del espectro, ya que se pierde el pico positivo a 296 nm (Figura 5.17b y 5.18b) y la depresión entre los dos picos observados (Figura 5.16b). Asimismo, se observa una disminución de la elipticidad a 269 nm, aunque no se pierde por completo el pico (Figura 5.18a). Como se mencionó previamente, esto es lo que ocurre durante la desnaturalización por urea (Blancas-Mejía *et al.*, 2009), por lo que nuestros resultados indican que 6aJL2 se desnaturaliza en ausencia de NaCl en estos valores de pH.

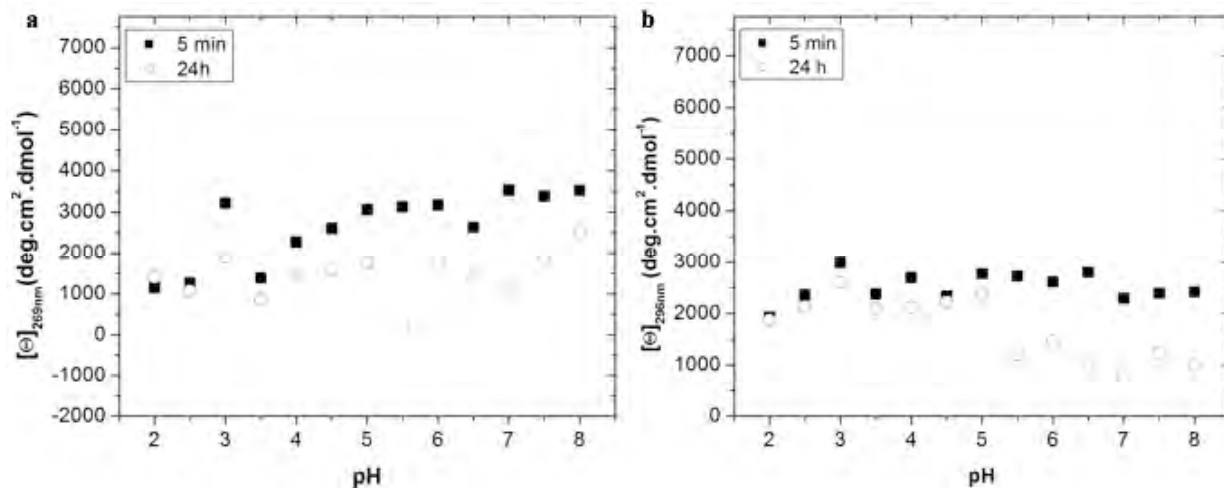


Figura 5.18. Elipticidad molar a 269 nm, el pico correspondiente a la señal de las tirosinas presentes en 6aJL2, (a) y a 296 nm, el pico correspondiente a la señal del único residuo de triptofano (b) a los cinco minutos y 24 horas de incubación en ausencia de NaCl.

B) Estabilidad termodinámica

La estabilidad termodinámica fue monitoreada por el cambio en la intensidad de fluorescencia intrínseca. En todos los casos, a los cinco minutos de incubación se observaron transiciones monofásicas, características de un plegamiento en dos estados. No se observaron indicios de intermediarios estables en ninguno de los valores de pH estudiados (Figura 5.19). Los experimentos de desnaturalización en presencia de urea se realizaron por duplicado.

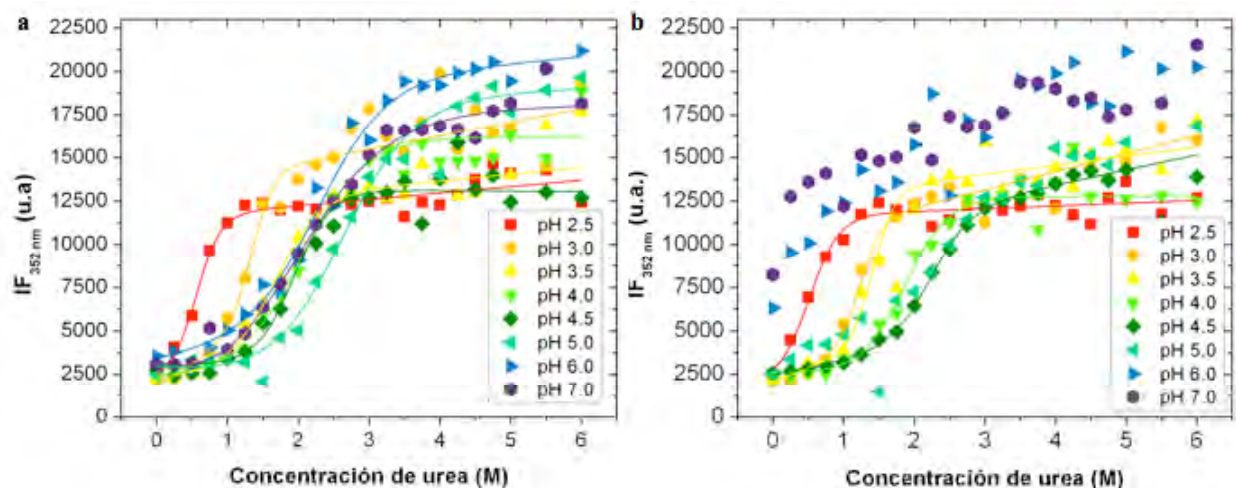


Figura 5.19. Intensidad de fluorescencia a 352 nm en función de la concentración de urea a los cinco minutos de incubación (a) y a las 24 horas de incubación (b) para los valores de pH a los que se estudió la desnaturalización por urea de 6aJL2. Las líneas indican el ajuste realizado al modelo de dos estados. Los colores utilizados son los mismos que para los espectros de fluorescencia y dicroísmo circular

A las 24 horas, los datos a valores de pH 5.0, 6.0 y 7.0 coinciden con lo observado por fluorescencia en ausencia de urea. A tiempos largos ocurren modificaciones en el espectro, en particular un aumento en la intensidad de fluorescencia a bajas concentraciones de urea que arrojan incertidumbre en el valor de la fluorescencia de la pre-transición, lo que imposibilita obtener el valor de ΔG (Figura 5.19). Este comportamiento se confirma con los CME: a las 24 horas se observa además un marcado efecto barocrómico a bajas concentraciones de urea, sobre todo a pH 7.0 (Figura 5.20).

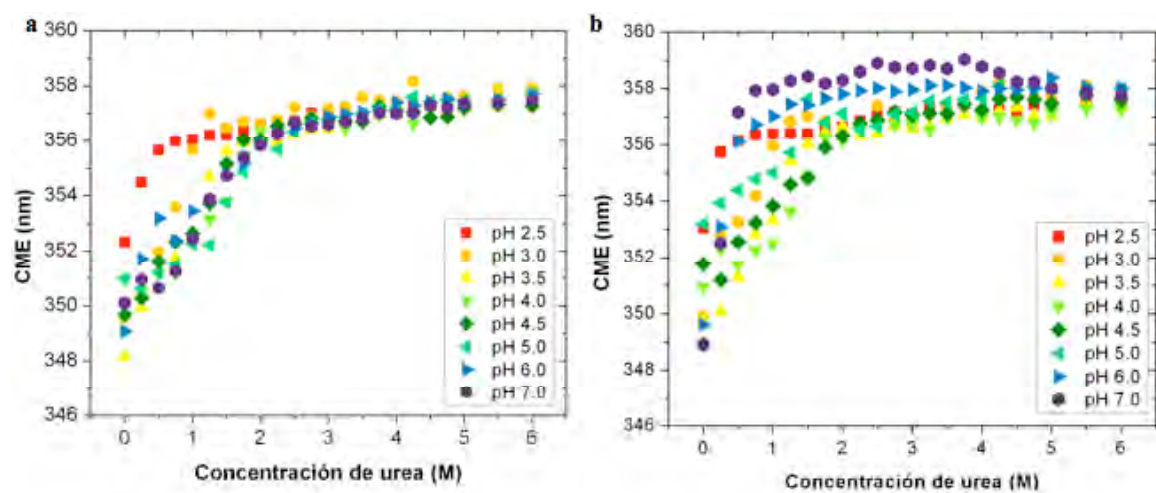


Figura 5.20. CME de 6aJL2 al ser desnaturalizado en urea a diferentes valores de pH a los cinco minutos (a) y 24 horas de incubación (b). Los colores utilizados son los mismos que para los espectros de fluorescencia y dicroísmo circular.

Con el objeto de comparar directamente los resultados obtenidos al modificar el pH, se calculó la fracción de proteína nativa (Figura 5.21). Al variar el pH de 2.5 a 4.0, se observó un aumento gradual en el valor de C_m , mientras que a valores de pH menos ácidos los valores de C_m obtenidos son muy similares (Tabla 5.1).

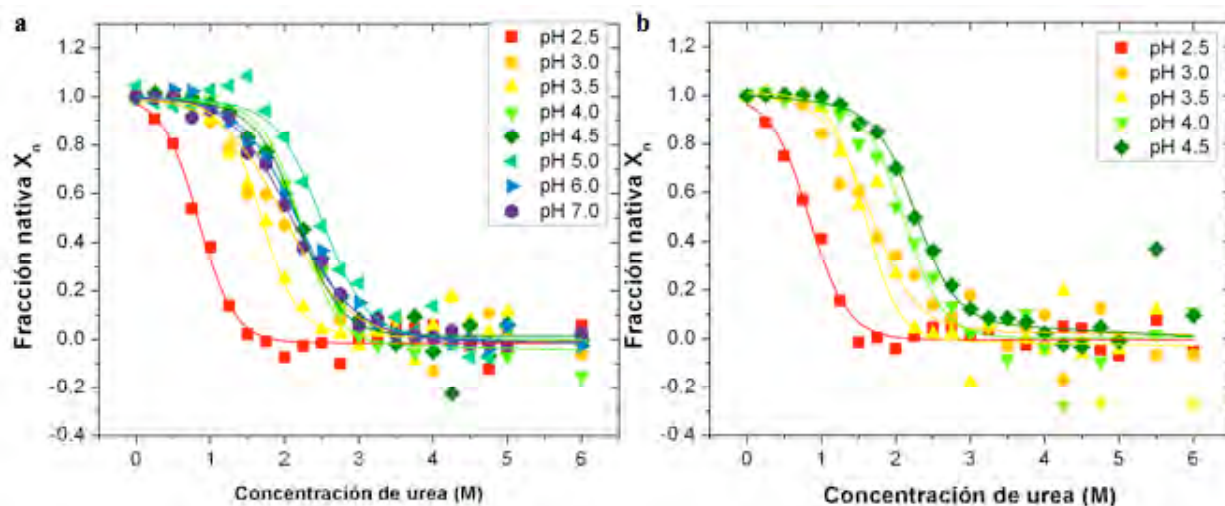


Figura 5.21 Fracción nativa a los cinco minutos (a) y las 24 horas de incubación (b) para los valores de pH a los cuales se estudió la desnaturalización por urea de 6aJL2. Las líneas indican el ajuste realizado al modelo de dos estados. Los colores utilizados son los mismos que para los espectros de fluorescencia y diroísmo circular.

Tabla 5.1. C_m calculada para las muestras incubadas 5 minutos y a las 24 horas.

pH	C_m (M)	
	5 min	24 hrs
2.5	0.84	0.84
3.0	1.8	1.6
3.5	1.7	1.6
4.0	2.2	2.1
4.5	2.2	2.3
5.0	2.5	--
6.0	2.2	--
7.0	2.1	--
8.0 ^a	2.2	--

^aBlancas-Mejía *et al.*, 2009

La post-transición de las curvas de desnaturalización obtenidas presentaron mucho ruido (Figura 5.19), por lo que los errores asociados a la determinación del ΔG son bastante grandes. (Figura 5.20). A pesar de esto, es claro que los valores de ΔG de 6aJL2 se distribuye bajo la forma de una campana invertida. 6aJL2 tiene una mayor estabilidad entre pH 4.0 y 4.5 y una menor estabilidad en los valores extremos (Figura 5.22a). Además la cooperatividad del proceso de desplegamiento se distribuye de la misma manera: es mayor a pH 3.5 y menor en los valores de pH extremo (Figura 5.22b). Por motivos que se explicarán posteriormente (ver discusión), el valor discrepante de cooperatividad a pH 3.0 se adjudica al ajuste y no a una diferencia en la vía de plegamiento. En cuanto a los datos obtenidos tras 24 horas de incubación, los valores de ΔG y m obtenidos (en aquellos casos en los que fue posible calcularlos) son iguales dentro del error experimental a los obtenidos para los cinco minutos de incubación (Figura 5.22)

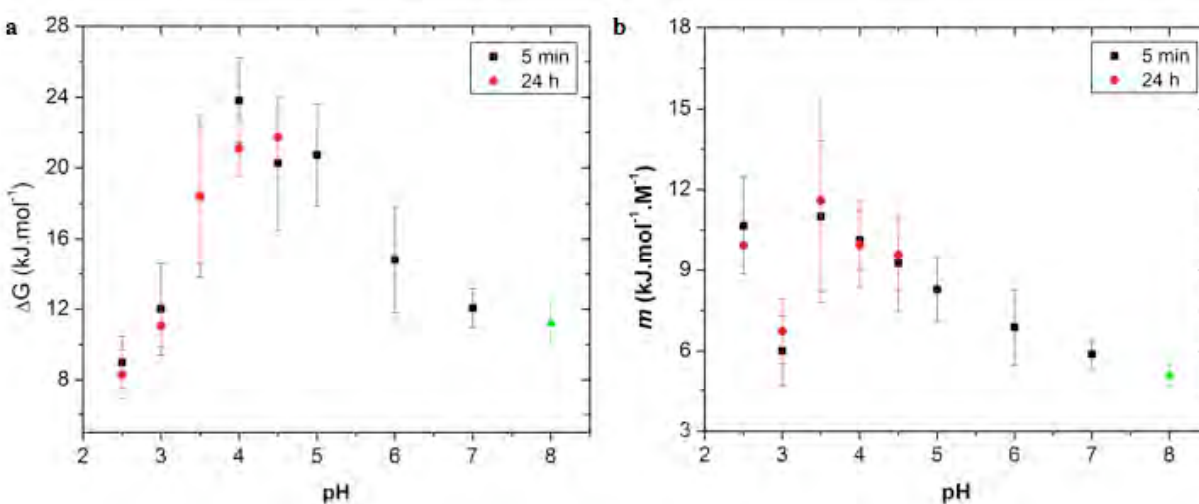


Figura 5.22. Parámetros termodinámicos obtenidos al equilibrio, ΔG_U (a) y m (b). Se muestran en diferentes colores los datos correspondientes a repeticiones diferentes y en verde los valores obtenidos previamente (Blancas-Mejía *et al.*, 2009).

C) Formación de fibrillas

La fibrillogénesis de 6aL2 se estudió a diferentes valores de pH. En las cinco condiciones utilizadas, las cinéticas obtenidas presentaron el comportamiento típico descrito para la formación de fibrillas, es decir una fase de retardo (o fase lag) seguida de una fase de

crecimiento exponencial, aunque sólo en las muestras incubadas a pH 2.0 se alcanzó la meseta correspondiente al final de la cinética (Figura 5.23).

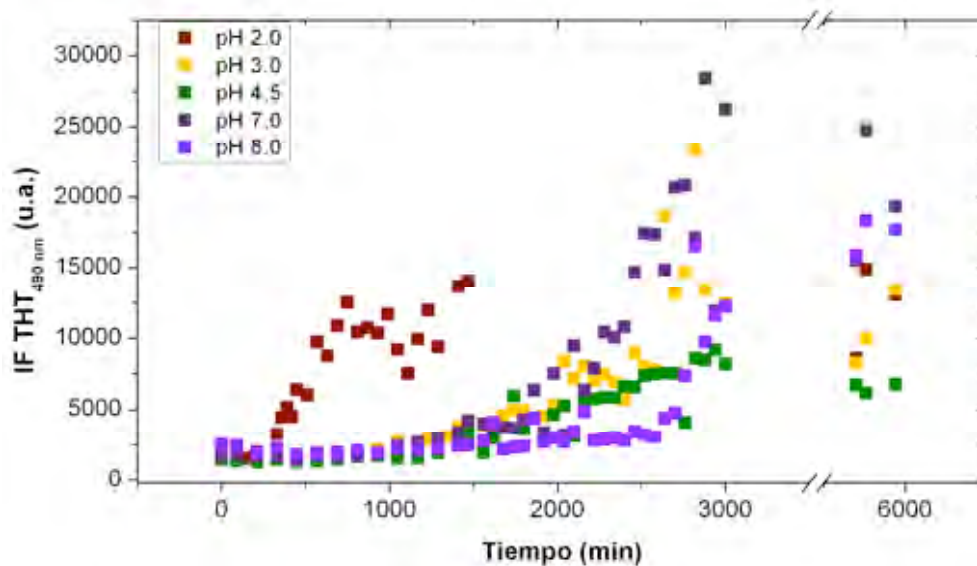


Figura 5.23. Cinética de formación de fibrillas a diferentes valores de pH durante las primeras 50 horas y con las medidas a las 24 horas para evaluar la intensidad de fluorescencia final. Los colores utilizados corresponden a los de los espectros de fluorescencia y de dicroísmo circular en ausencia de agentes caotrópicos.

Se volvió a medir la intensidad de fluorescencia de la ThT 24 horas después de terminar el experimento, ya que se ha descrito que en ciertos casos la fluorescencia disminuye debido a agregación lateral de las fibrillas (Souillac, 2002b). La intensidad de fluorescencia al término del experimento sólo disminuyó a pH 3.0 y muy levemente a pH 4.5. En estas condiciones se mantuvo sin disminución significativa (Figura 5.23).

Cabe señalar que la intensidad de fluorescencia máxima a pH 2.0 fue menor a la alcanzada a los demás valores de pH, sobre todo considerando que en las demás cinéticas de formación de fibras no se alcanzó la meseta final (Figura 5.23). Por el valor final de intensidad de fluorescencia obtenido a las 24 horas, parecería a pH 4.5 también el valor de fluorescencia máxima alcanzada es menor. En todas las demás cinéticas parece que se alcanzó un valor de fluorescencia máxima similar, aunque es difícil asegurarlo puesto que no estaban terminadas al término del tiempo de medición (50 horas).

Los parámetros utilizados para describir las cinéticas de fibrilogénesis son los valores de tiempo lag y de tasa de extensión de fibrillas (k) (Xue *et al.*, 2008). Estos se muestran en la tabla 5.2.

Tabla 5.2. Parámetros de fibrilogénesis obtenidos para las tres repeticiones realizadas a los valores de pH muestreados

pH	Repetición	t_{lag} (min)	K (IF ThT.min ⁻¹)
2.0	1	155.8	10.10±1.2
	2	-410.7	20.17±3.6
	3	196.8	17.53±1.7
3.0	1	1412.8	6.67±0.5
	2	1200.9	7.57±0.8
	3	1429	6.89±1.0
4.5	1	716.9	2.88±0.3
	2	1070.1	3.00±1.2
	3	1257.8	4.30±0.9
7.0	1	1712.7	16.46±2.0
	2	1786.4	10.01±1.2
	3	1795.2	17.69±4.0
8.0	1	2412.2	13.79±2.6
	2	1515.2	10.97±0.8
	3	2508.2	21.28±5.2

La fase de retardo se ha descrito como la fase de acumulación de precursores solubles necesarios para la formación de agregados fibrilares (Chiti y Dobson, 2006). Los valores menores de t_{lag} se encontraron a pH 2.0 y los mayores valores a pH 8.0. El tiempo de retardo (o tiempo lag) correlaciona con el valor de pH ($R^2 = 0.98$; $n = 5$; $p = 0.04$): a valores más ácidos, menor tiempo lag (Figura 5.24). Este resultado confirma que el tiempo lag a pH 8.0 es mayor que al tiempo lag a pH 7.4 (del Pozo-Yauner *et al.*, 2008; Blancas-Mejía *et al.*, 2009).

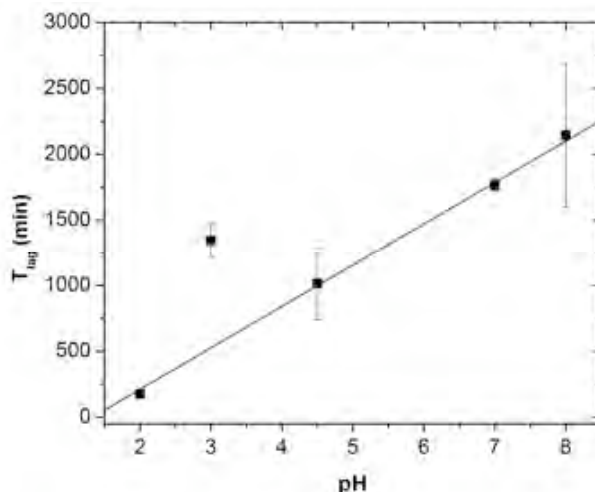


Figura 5.24 Tiempo de retardo en la formación de fibrillas en función del pH. Se muestran las tres repeticiones.

Por otro lado, la tasa de crecimiento de las fibrillas, correspondiente a la fase de aumento de la intensidad de fluorescencia de la ThT observada en las cinéticas, se ha relacionado directamente con la velocidad de extensión de las fibrillas mediante la incorporación de especies solubles. Sorprendentemente, las tasas observadas se distribuyen en una campana invertida: es mucho más lenta a valores intermedios de pH y aumenta drásticamente en los valores extremos (Figura 5. 25).

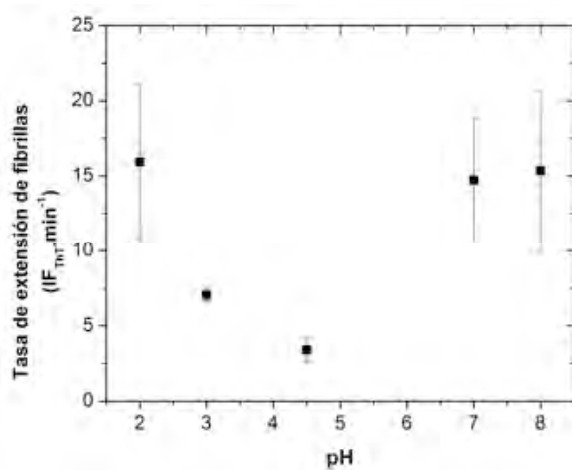


Figura 5.25. Tasa de extensión de las fibrillas en función del pH. Se muestran las tres repeticiones

No existe por lo tanto una correlación entre el tiempo de retardo y la velocidad de extensión de fibrillas a diferencia de los que se ha reportado en presencia de urea (Blancas-Mejía, 2009) o para otros dominios variables (Khurana *et al.*, 2001; Qin *et al.*, 2007).

VII. DISCUSIÓN

Los datos obtenidos por espectroscopía señalan que, contrariamente a lo que sucede con otros dominios variables (Khurana *et al.*, 2001) o a lo que se había reportado anteriormente (Mishima *et al.*, 2009), 6aJL2 no se despliega al disminuir el pH, en presencia de NaCl, en la escala temporal estudiada. En particular, los espectros obtenidos por dicroísmo circular en el UV lejano indican que el contenido de hojas β antiparalelas se mantiene, aún a valores de pH muy ácidos y los espectros obtenidos por dicroísmo en el UV cercano indican que la estructura terciaria se mantiene en general. En efecto, debido a que 6aJL2 contiene un único residuo de triptofano, el pico observado a 296 nm es muy sensible y se pierde al desnaturalizarse, como sucede con urea 6M (Blancas-Mejía *et al.*, 2009) o en ausencia de NaCl a las 24 horas.

El hombro observado a 230 nm en el DC se ha atribuido a las interacciones aromáticas, en particular a la contribución de los residuos de tirosina. Sin embargo es importante señalar que, los espectros de UV cercano indican que la estructuración de los sitios aromáticos se mantiene al disminuir el pH. Por lo que la disminución del hombro a 230 nm probablemente indique algo más. Lo curioso es que este hombro que desaparece a $\text{pH} < 4.5$, también lo hace en presencia de urea (Blancas-Mejía *et al.*, 2009).

Por otro lado, el ANS se utiliza como una sonda de parches de residuos hidrofóbicos expuestos (Chávez-Cárdenas, 1998; Souillac *et al.*, 2002a; Souillac *et al.*, 2002b). La unión no covalente del ANS a estos sitios produce un aumento en su intensidad de fluorescencia y un corrimiento hacia el azul. Sin embargo, a la fecha no se conoce bien el mecanismo por el cual actúa. La fluorescencia de las moléculas de ANS depende del grado de exposición al agua puesto que ésta apaga la fluorescencia (Matulis *et al.*, 1998).

En el caso de 6aJL2, no se observó el efecto ipsocrómico característico de la unión de ANS a regiones hidrofóbicas. En conjunto con los demás datos espectroscópicos obtenidos, creemos que el ligero aumento de la fluorescencia observada a valores de pH más ácidos refleja la posible unión del colorante a regiones expuestas al solvente y por lo tanto la existencia de rearreglos únicamente locales.

En general, se observaron dos patrones de comportamiento para la incubación de 6aJL2 a diferentes valores de pH en ausencia de agentes caotrópicos. A valores de $\text{pH} < 4.5$, las muestras incubadas alcanzaron muy rápidamente el estado de equilibrio, los espectros de fluorescencia presentaron un poco de dispersión, se observa una ligera unión de ANS y los espectros de DC en el UV lejano sólo presentan un mínimo definido a 217 nm. Por otro lado, las muestras incubadas a valores de $\text{pH} \geq 5.0$ no presentan dispersión, alcanzan un primer equilibrio rápido a los 5 minutos de incubación pero pasan por un segundo cambio conformacional a escalas temporales mayores, su unión a ANS es despreciable y los espectros de DC en el UV lejano presentan además un hombro a 230 nm. Los espectros obtenidos a $\text{pH} 4.5$ presentan características intermedias.

La frontera entre los dos comportamientos antes descritos coincide con el punto isoeléctrico de la 6aJL2. En efecto, el punto isoeléctrico experimental es de 4.5 (del Pozo-Yauner, 2008). Nuestros resultados parecen indicar que las muestras cargadas positivamente sólo responden a un equilibrio termodinámico rápido, mientras que para aquellas cargadas negativamente se observa además un proceso cinético lento.

En este sentido, el ligero aumento observado en la fluorescencia del ANS a valores de pH más ácidos también se puede atribuir a una mayor interacción electrostática debida a la presencia de carga positivas con el sulfonato presente en el ANS. En efecto, se ha descrito que la interacción del ANS con proteínas está mediada por interacciones electrostáticas (Matulis y Lovrien, 1998) y no es exclusiva de los parches formados por residuos hidrofóbicos (Schönbrunn *et al.*, 2000).

Como se mencionó, la dispersión de luz observada en los espectros de las muestras cargadas positivamente ($\text{pH} < 4.5$) sugiere la presencia de especies oligoméricas en solución. Sería interesante caracterizarlas con detalle, ya sea mediante cromatografía de exclusión molecular analítica o por dispersión de luz, ya que existe al menos el caso de un dominio variable fibrilogénico que puede dar origen a agregados amorfos o fibrilares dependiendo de las características del ambiente en el que se encuentre (Khurana *et al.*, 2001). A la fecha, en el caso de 6aJL2, no se tienen evidencias de la formación de agregados amorfos.

Respecto al cambio conformacional que ocurre a las 24 horas de incubación, aparente principalmente en las muestras incubadas a $\text{pH} \geq 5.0$, nuestros resultados, en particular el CME, indican que se trata de una desestabilización. Este cambio a una escala temporal larga se había detectado previamente, en presencia de urea, por fluorescencia intrínseca y dicroísmo circular (Figura 4b de Blancas-Mejía *et al.*, 2009). Este fenómeno se observa a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, pero no a temperaturas menores.

Por otro lado, el efecto del cloruro de sodio, así como de otras sales, sobre 6aJL2 deberá investigarse con más profundidad en un futuro. En efecto, en inmunoglobulinas, tanto en anticuerpos enteros como en fragmentos o en los dominios independientes, se ha observado un estado conformacional de plegamiento alternativo estabilizado por la presencia de aniones, en particular por el ión cloruro cuyas cargas negativas enmascaran las cargas positivas de las proteínas en las que se ha observado, permitiendo que se pliegue (Goto *et al.*, 1990a; Goto *et al.*, 1990b; Buchner *et al.*, 1991; Thies *et al.*, 1991; Welfie *et al.*, 1998). Este estado se caracteriza por ser compacto pero con poca estructura terciaria (Buchner *et al.*, 1991; Thies *et al.*, 1991; Welfie *et al.*, 1998). Al eliminar el NaCl de nuestros amortiguadores esperábamos encontrar evidencia de este estado a valores de pH ácidos. Sin embargo, aunque 6aJL2 se estabiliza en presencia de NaCl, nuestros resultados no apoyan que dicho estado conformacional se presente en 6aJL2. En efecto, la mayoría de diferencias observadas entre las muestras incubadas en presencia y en ausencia de NaCl se observaron en aquellas muestras incubadas a valores de pH neutros o ligeramente alcalinos, en los cuales 6aJL2 está cargado negativamente (ver más adelante). Por lo tanto, no podemos atribuir los estados observados a pH ácidos a un estado estabilizado por cargas negativas presentes en el solvente. La ironía de este hecho resulta en que si bien logramos eliminar el cloruro de nuestras muestras, la mayoría de los amortiguadores tienen sodio y no se observan cambios drásticos en las únicas muestras que realmente no tiene sodio (muestras incubadas en BIS-TRIS). Tal vez el efecto observado se deba a los cambios de fuerza iónica que se dan en ausencia de cloruro de sodio, más que a la naturaleza de los iones en sí. Las diferencias más sobresalientes entre la proteína incubada en presencia de NaCl y en su ausencia se muestra en la figura 7.1.

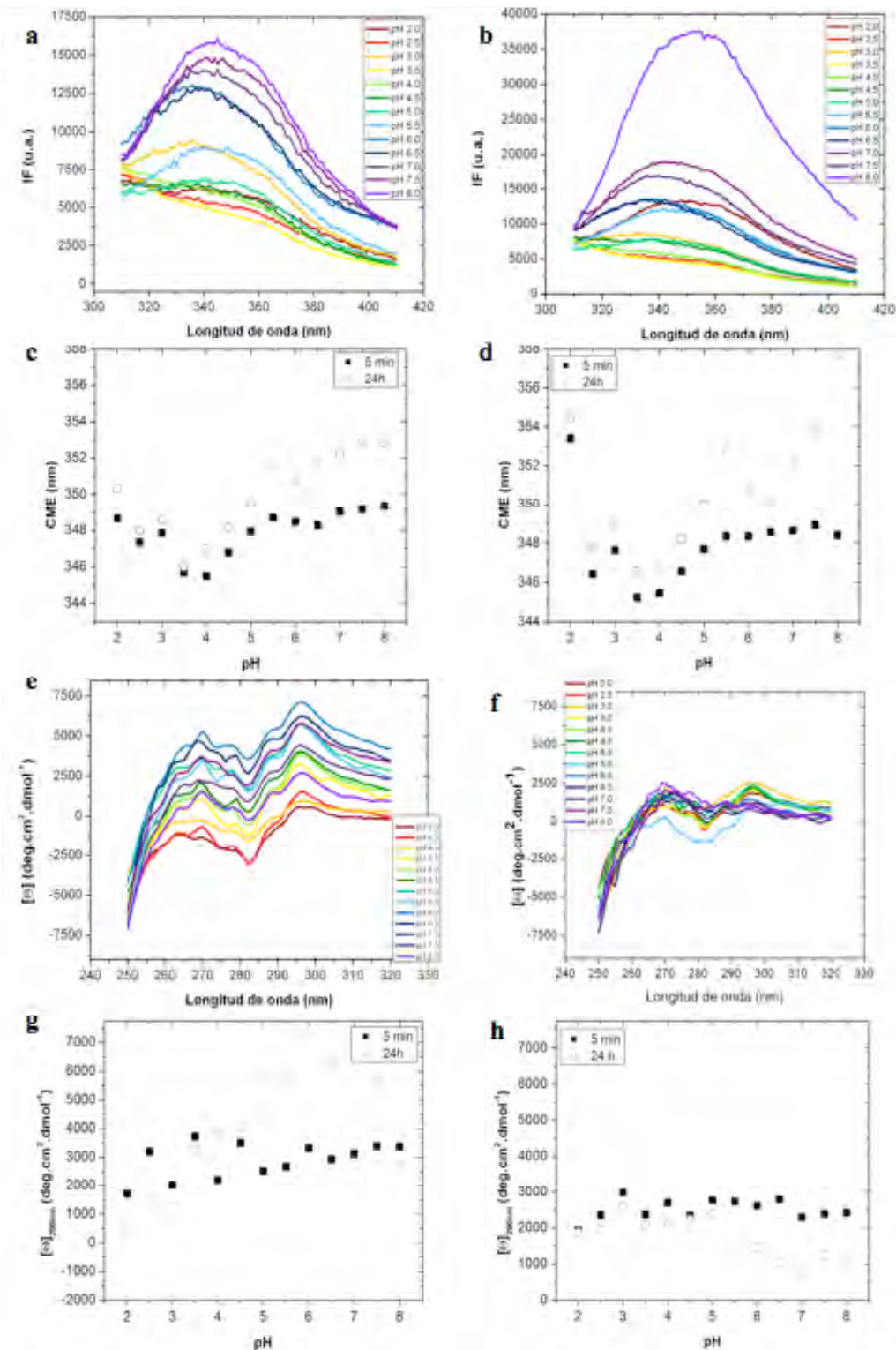


Figura 7.1. Comparación de las propiedades espectroscópicas distintivas entre las muestras incubadas en presencia de NaCl (columna de la izquierda, a; c; e y g) y sin NaCl (columna derecha, b; d; f; y h). A las 24 horas de incubación, los espectros de fluorescencia (a y b), así como de dicroísmo circular en el UV cercano (e y f) indican cambios acentuados en las muestras incubadas sin sal, en particular una pérdida de la estructura en las muestras sin sal. El CME (c y d) muestra que la desestabilización en las muestras a $\text{pH} > 4.5$ ocurre en ambos casos, pero con una mayor magnitud en las muestras incubadas sin sal. Finalmente el valor de la elipticidad molar a 269 nm, demuestra que la pérdida de estructura en las muestras sin sal comienza desde los cinco minutos de incubación (g y h).

En todo caso, nuestros resultados indican que el NaCl estabiliza la estructura de 6aJL2 y que su presencia retarda la desestabilización que ocurre a $\text{pH} \geq 5.0$; puesto que en su ausencia las muestras incubadas a estos valores de pH se desnaturalizan.

Esto es importante considerando el trabajo de Mishima y colaboradores (2009), en el cual se había observado que proteínas $\lambda 6$ (incluyendo una proteína recombinante construida a partir de la secuencia de 6aJL2 reportada por del Pozo-Yauner) se encuentran altamente desplegadas a pH 2.0. Además, los autores reportaron un tiempo de retardo para la cinética de formación de fibrillas de Jto mayor al de Wil, lo que contrasta con resultados obtenidos previamente por grupos independientes (Wall *et al.*, 1999b; del Pozo-Yauner *et al.*, 2008). La diferencia fundamental entre sus experimentos y los demás es que usaron amortiguadores sin sal. Nuestros resultados muestran que 6aJL2 se encuentra desnaturalizada en ausencia de NaCl a pH 2.0, más no en su presencia. Por lo tanto, sus resultados no son comparables a los de estudios previos, puesto que se trata de condiciones diferentes. Considerando nuestros resultados, sería interesante investigar la presencia de estructura residual en presencia de NaCl, sobre todo porque se trata de un soluto fisiológico. Asimismo, podría ser que los resultados encontrados respecto a la fibrilogénesis de Wil, Jto y la proteína construida con la secuencia de 6aJL2 estén sesgados por la ausencia de NaCl. En efecto, se ha visto que las sales pueden estabilizar tanto al estado nativo como al estado fibrilar (Sikkink y Ramírez-Alvarado, 2008).

Por otro lado, el servidor *EMBL WWW Gateway to isoelectric point*¹ permite conocer la distribución de cargas teóricas a diferentes valores de pH, a partir del punto isoeléctrico calculado a partir de la secuencia. A pH 2.0, 6aJL2 tiene una carga neta de +9.0, mientras que a pH 8.0 su carga neta es de -3.0. En ambos casos, la distribución de cargas es asimétrica (N. Pastor-Colón, comunicación personal). A pH ácido, la estructura de 6aJL2 tiene por lo tanto mayor flexibilidad, para acomodar el mayor número de cargas que se repelen entre sí (Figura 7.2).

¹ <http://www3.embl.de/cgi/pi-wrapper.pl>

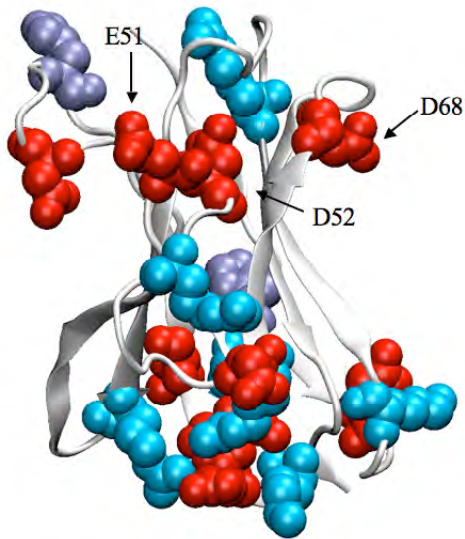


Figura 7.2. Distribución de cargas en 6aJL2. Se señalan en rojo los aminoácidos que pueden tener carga neta negativa (aspartato y glutamato), en azul los aminoácidos positivos (arginina y lisina) y en morado las histidinas. A pH 2.0, todos estos aminoácidos se encuentran protonados y la carga neta + 9.0 se debe a la protonación de las lisinas y argininas. A pH 8.0, la carga neta se debe al E51, E52 y D68 que no están involucrados en puentes de sal. Figura donada por la Dra. Nina Pastor.

Independientemente de la presencia o ausencia de sal, los datos espectroscópicos evidencian que los cambios observados en muestras incubadas a valores de pH casi neutros o ligeramente alcalinos son mayores que los observados a pH ácido. Es claro que los cambios observados a las 24 horas son independientes del equilibrio rápido $N \leftrightarrow D$ observado a tiempos cortos. Puesto que la agregación es un proceso cinéticamente controlado, probablemente el proceso cinético observado a valores de pH cercanos a la neutralidad o ligeramente alcalinos a tiempos largos podría estar involucrado en la formación de fibras.

Los valores de estabilidad termodinámica obtenidos coinciden con los reportados a la fecha para cadenas ligeras amiloidogénicas. 6aJL2 es más estable a pH 4.0. En el caso de 6aJL2, la máxima estabilidad del plegamiento no se observa en condiciones fisiológicas. La mayor estabilidad de 6aJL2 parece corresponder a su forma eléctricamente neutra, observada alrededor de pH 4.5. Existen además dos conjuntos de conformeros cercanos a la estructura nativa, que parecen estar separados de este estado por una barrera energética relativamente pequeña³. El

³ La barrera energética parece ser pequeña puesto que al incubar a pH ácido 6aJL2, purificada a pH 8.0, se observa el conjunto ácido a los cinco minutos de incubación. Sin embargo, se requeriría de experimentos cinéticos para confirmarlo.

primer conjunto se observa a valores de pH ácido, mientras que el segundo se observa a valores de pH cercanos a la neutralidad o ligeramente alcalinos. Dentro de estos conjuntos, los valores extremos ocasionan una desestabilización de 6aJL2, aunque la desestabilización a pH muy ácido es por un mecanismo diferente a la que ocurre a pH alcalino. Además, el número de cargas presentes y su distribución en ambos conjuntos, así como los datos de unión a ANS, sugieren que la estructura de 6aJL2 tenga mayor flexibilidad a pH ácido. Sin embargo se requieren estudios posteriores para confirmarlo.

Es interesante que el valor de cooperatividad más alto corresponde a pH 3.5. La cooperatividad está ligada con el cambio en el área accesible al solvente (a mayor cooperatividad, mayor cambio en el área expuesta al solvente), por lo que sería interesante estudiar si esta diferencia es atribuible a cambios de área expuesta en la estructura nativa o en la estructura desnaturalizada.

Por otro lado, la ausencia de intermediarios de plegamiento en el caso de 6aJL2 contrasta con lo que se ha descrito en las cadenas ligeras κ al disminuir el pH (Khurana *et al.*, 2001). Sin embargo, no se descarta su existencia a valores de pH ácido (en particular a pH 3.0 y 3.5), puesto que en estas condiciones, los datos se ajustan mal a una ecuación de dos estados (el error experimental es mucho mayor a pH ácido). De hecho, consideramos que tanto el valor de ΔG , como el de m , a pH 3.0 representan una subestimación de los valores reales puesto que el ajuste no coincide completamente con los puntos experimentales. Se requiere por lo tanto seguir simultáneamente la desnaturalización por urea por dos técnicas diferentes, por ejemplo dicroísmo circular y fluorescencia intrínseca.

En todo caso, la presencia o ausencia de intermediarios de plegamiento parecería ser independiente de la formación de fibras amiloides. A la fecha, no se sabe en dónde ocurre la desestabilización de las cadenas ligeras y la formación del núcleo crítico, ya sea en el plasma, a pH 7.4 (Ganong, 2004), o en el riñón, a pH entre 4.5 y 7.4 (Patton *et al.*, 1989; Ganong, 2004). Considerando esto, 6aJL2 no se encuentra en su mínimo de energía en condiciones fisiológicas y la barrera energética hacia el estado de agregación es podría ser menor. Las fluctuaciones de pH en estas condiciones, a las cuales están sometidas las proteínas $\lambda 6$ permiten que éstas oscilen

entre diferentes estados alejados del mínimo de energía. Por lo tanto, parecería que la agregación de las proteínas $\lambda 6$ se da a partir de una forma tipo nativa accesible dentro de las fluctuaciones que ocurren en condiciones fisiológicas, más que de un intermediario en la vía de plegamiento (Chiti y Dobson, 2009). Asimismo, es interesante que la forma que se encuentra en condiciones fisiológicas sea una especie con carga eléctrica puesto que se ha descrito un papel de las interacciones electrostáticas en la formación de fibras amiloides (Kaplan *et al.*, 2005).

Como se mencionó previamente, el ensamblado de fibras amiloides está precedida por una fase de ensamblado de núcleos para la formación de fibras maduras. Dicha fase, conocida como fase de retardo, se puede eliminar si se adicionan semillas (Chiti y Dobson, 2006). Creemos que eso fue lo que sucedió en la cinética fibrillogénesis a pH 2.0 para la cual se obtuvo un t_{lag} negativo: las moscas utilizadas para agitar los viales han sido utilizadas para estudiar la fibrillogénesis de una mutante de 6aJL2. A pesar de que se lavaron varias veces y se incubaron en proteasas durante una semana, las fibras amiloides son resistentes a la degradación, por lo que creemos que restos de fibra de dicha mutante sirvieron como semilla. Esto explica la ausencia de una fase de retardo.

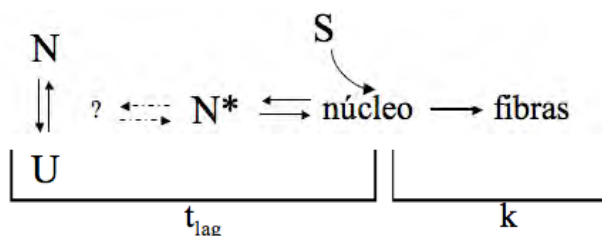
La formación de fibrillas amiloides es un proceso lento que se lleva a cabo en una escala temporal larga comparada con la escala en la que se alcanza el equilibrio entre el estado nativo y desnaturalizado de la proteína en presencia de un agente caotrópico. Los resultados son sorprendentes a primera vista, ya que no existe una correlación entre el tiempo de retardo y la velocidad de extensión de fibras como se ha reportado en presencia de urea (Blancas-Mejía, 2009) o para otros dominios variables (Khurana *et al.*, 2001; Qin *et al.*, 2007). Sin embargo, los mecanismos de acción del pH y de los agentes caotrópicos son diferentes por lo que en el fondo no tendría por qué haberla.

Esta ausencia de correlación evidencia que la formación del núcleo a partir del cual se extienden las fibras es independiente de la extensión de las fibras en sí. Nuestros resultados indican que cualquiera de los procesos puede ser el paso limitante en la cinética de formación de fibras. En efecto, en el momento en el que se dio por concluido el experimento de fibrillogénesis *in vitro*, las cinéticas de las muestras incubadas a pH 8.0 estaban cerca de alcanzar la meseta,

mientras que las cinéticas a pH 4.5 no lo estaban. Sin embargo, se observó una diferencia significativa entre el tiempo de retardo a los dos valores de pH.

Asimismo, nuestros resultados reflejan que la especie precursora del núcleo es diferente a la especie que participa en la elongación de las fibras. Como se mencionó previamente, la fibrilogénesis generalmente se asocia a un evento de desplegamiento (Kelly, 1996; Helms y Wetzel, 1996; Guijarro *et al.*, 1998; Ferrão-Gonzales *et al.*, 2000; Chiti y Dobson 2006). Por un lado, la fase de nucleación, y por lo tanto el tiempo de retardo, se asocia al número de interacciones no nativas. En parte, esto explica que el proceso de fibrilogénesis *in vitro* es altamente sensible al tipo de agitación utilizada en el ensayo tanto en el caso de 6aJL2 (Blancas-Mejía *et al.*, 2009) como de otros dominios variables (Souillac *et al.*, 200; Khurana *et al.*, 2001). En el caso de 6aJL2, posiblemente la presencia inferida de especies oligoméricas a pH más ácido juegue un papel en el proceso de nucleación. Además este proceso de nucleación se vio favorecido por la especie presente a valores de pH muy ácidos, más no por la especie presente a pH alcalino. Por lo tanto la nucleación fue favorecida únicamente por especies cargadas positivamente. Por otro lado, la extensión de fibrillas se vio favorecida en los valores extremos de pH estudiados, por lo que la presencia de cargas, sin importar si son negativas o positivas favorecen la extensión de las fibras. Considerando lo anterior, podría ser que sea en realidad la flexibilidad de la estructura a pH ácido la que favorece las interacciones no nativas especie precursora; en el caso de la extensión de las fibras, las interacciones electrostáticas podrían jugar un papel en la elongación.

A partir del mecanismo de crecimiento nucleado para la formación de fibras y de nuestras observaciones, esta se puede describir bajo el siguiente esquema:



En donde N* corresponde a la forma precursora, la cual sugerimos tiene una estructura similar a la nativa. A la fecha no se conoce el origen de la especie N* o en cuanto a sus características. En

campana invertida y que parecería que la estabilidad termodinámica de 6aJL2 se distribuye en forma de campana, se pensó originalmente que la estabilidad termodinámica podría correlacionarse inversamente con la velocidad de extensión fibrilar al modificar el pH. Sin embargo, no hay tal correlación.

Fisiológicamente, nuestros resultados parecen coincidir con las manifestaciones clínicas de la amiloidosis AL: es una enfermedad que se manifiesta a una edad avanzada, y que tiene una progresión muy rápida. Considerando que entre pH 7.0 y pH 8.0 se obtuvieron los mayores tiempos de retardo, pero también tasas de extensión de fibrillas elevadas, podría ser que *in vivo* el desencadenamiento de la enfermedad a una edad avanzada refleje la dificultad en la formación del núcleo crítico. Asimismo, una vez que se haya alcanzado éste, la extensión de fibras podría ser demasiado rápida para que los sistemas de control de calidad puedan lidiar con las especies que se adicionan a los agregados (puesto que las chaperonas extracelulares no interactúan con la forma agregada), sobre todo considerando que a la edad a la que se manifiesta la AL dichos sistemas empiezan a decaer (Wilson *et al.*, 2008).

Desde el punto de vista de la caracterización *in vitro* de 6aJL2, la menor intensidad de fluorescencia de ThT observada a pH 2.0 y a pH 4.5 tiene dos explicaciones posibles. Si se parte del supuesto de que, sin importar la condición de incubación de 6aJL2, las fibras obtenidas tienen la misma morfología, entonces se formaron menos fibras a pH 2.0 y a pH 4.5. En los dominios variables SMA y LEN, una menor formación de fibras se correlacionó con la formación de agregados amorfos, los cuales secuestran la proteína disponible para la elongación de fibras (Souillac *et al.*, 200; Khurana *et al.*, 2001). Si no se parte de ese supuesto, entonces puede ser que las fibras obtenidas a diferentes valores de pH tengan diferentes características morfológicas. Cualquiera que sea el caso, resulta por lo tanto indispensable la caracterización morfológica de los agregados obtenidos.

6aJL2 es termodinámicamente más estable que todas los dominios variables $\lambda 6$ amiloidogénicos para los cuales se tenían datos de estabilidad reportados en el momento en el que se realizó el estudio de del Pozo-Yauner y colaboradores (2008), por lo que clínicamente no se consideraría una proteína amiloidogénica. Sin embargo, *in vivo* entran en juego una gran

cantidad de factores que podrían explicar la formación de fibras amiloides por las proteínas $\lambda 6$. En primer lugar, 6aJL2 es mucho menos estable a 37 °C que a 25 °C (Blancas-Mejía *et al.*, 2009). Además, nuestro estudio presenta evidencia que la forma circulante en la sangre (a pH 7.4) no se encuentra en las condiciones en donde sería más estable y que en estos valores de pH 6aJL2 sufre una desestabilización y se altera el equilibrio. Asimismo, a esos valores de pH la extensión de fibras es muy rápida una vez que se forma el núcleo crítico. Al mismo tiempo, la presencia de urea en el riñón puede favorecer la presencia de un intermediario, el cual parece favorecer la formación del núcleo crítico. Considerando que las cadenas ligeras $\lambda 6$ sufren además un proceso de hipermutación somática y que se ha documentado que muchas de éstas son desestabilizantes, parecería que al final la relación documentada entre las proteínas $\lambda 6$ y la amiloidosis de cadenas ligeras termina siendo la suma de pequeños factores desestabilizantes.

VIII. CONCLUSIONES

- 6aJL2 es más estable a valores de pH cercanos a su punto isoelectrico.
- Existen dos conjuntos de conformeros de 6aJL2, uno a valores de pH menores a su punto isoelectrico y otro a valores menos ácidos. En ambos casos, la integridad de la estructura de hojas β antiparalelas se mantiene.
- No encontramos una correlación entre el tiempo de retardo y la tasa de extensión fibrilar en las cinéticas de fibrilogénesis al variar el pH.

IX. REFERENCIAS

- Abraham, R.S., Geyer, S.M, Price-Troska, T. L., Allmer, C., Kyle, R.A., Gertz, M.A y R. Fonseca. 2003. Immunoglobulin light-chain variable (V) region genes influence clinical presentation and outcome in light-chain associated amyloidosis (AL). *Blood*, **101** (10): 3801-3808
- Abraham, R.S., Geyer, S.M., Ramírez-Alvarado, M, Price-Troska, T. L., Gertz, M.A, y R. Fonseca. 2004. Analysis of somatic hypermutation antigenic selection in the clonal B cell in immunoglobulin light chain amyloidosis (AL), *J. Clin. Immunol.*, **24** (4): 340-353
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J. Raff, M., Roberts, K. y P. Walter. 2002. *Molecular biology of the cell*, Garland Science, Nueva York, 1463 pp.
- Anfinsen, C.B. 1973. Principles that govern the folding of protein chains, *Science*, **181** (96): 223-30
- Batuman, V. y S. Guan. 1997. Receptor-mediated endocytosis of immunoglobulin light chains by proximal tubule cells, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **272** (4): F521-F530
- Belloti V. y G. Merlini. 1996. Towards understanding the molecular pathogenesis of monoclonal immunoglobulin light-chain deposition, *Nephrol. Dial. Transplant.*, **1** (9): 1708-1711
- Belloti, V., Mangione, P y G. Merlini. 2000. Immunoglobulin light-chain amyloidosis-The archetype of structural and pathogenic variability, *J. Struct. Biol.*, **130** (2-3): 280-289
- Blancas-Mejía, L.M., Tellez, L.A., del Pozo-Yauner, L., Becerril, B., Sanchez-Ruiz, J.M., y D.A. Fernández-Velasco. 2009. Thermodynamic and kinetic characterization of a germ line human $\lambda 6$ protein: the relation between unfolding and fibrillogenesis. *J. Mol. Biol.*, **386** (4): 1153-1166.
- Bolen, D.W. y M. M. Santoro. 1988. Unfolding free energy changes by the linear extrapolation method. 2. Incorporation of ΔG°_{N-U} in a thermodynamic cycle, *Biochemistry*, **27** (21): 8069-8074
- Buchner, J., Renner, M., Lilie, H., Hinz H.-J., y R. Jaenicke. 1991. Alternatively folded states of an immunoglobulin, *Biochemistry*, **30** (28): 6922-6929
- Chávez-Cárdenas, M.E. 1998. El uso de 1-anilino-8-naftalenosulfonato (ANS), para la identificación de intermediarias en la ruta de plegamiento de proteínas globulares, *Boletín de Educación Bioquímica*, **17** (1): 11-17

- Cherny, I. y E. Gazit. 2008. Amyloids: not only pathological agents but also ordered nanomaterials, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **47** (22): 4062-4069
- Chernoff, Y.O. 2004. Amyloidogenic domains, prions and structural inheritance: rudiments of early life or recent acquisition?, *Curr. Opin. Chem. Bio.*, **8** (6): 665-671
- Chiti, F., Bucciantini, M., Capanni, C., Taddei, N., Dobson, C.M. y M. Stefani. 2001. Solution conditions can promote formation of either amyloid protofilaments or mature fibrils from the HypF N-terminal domain, *Protein Sci.*, **10** (12): 2541-2547
- Chiti, F., y C.M. Dobson. 2006. Protein misfolding, functional amyloid and human disease, *Ann. Rev. Biochem.*, **75**: 333-366
- Chiti, F., y C.M. Dobson. 2009. Amyloid formation by globular proteins under native conditions, *Nat. Chem. Biol.*, **5**(1): 15-22
- Chotia, C., Gelfand, I. y A. Kister. 1998. Structural determinants in the sequences of immunoglobulin variable domain, *J. Mol. Biol.*, **278** (2): 457-479
- Comenzo R.L., Zhang, Y., Osman, K. y G.A. Herrera. 2001, The tropism of organ involvement in primary systemic amyloidosis: contributions of Ig V_L germ line gene use and clonal plasma cell burden, *Blood*, **98** (3): 714-720
- Cooper, A. 1999. Thermodynamics of protein folding and stability. Pp: 217-270. In: A. Geoffrey (ed.) *Protein*, volume 2, Elsevier Science, Stamford, 328 pp.
- Dill, K.A, Ozkan, S.B., Shell, M.B y T.R. Weikl. 2008. The protein folding problem, *Annu. Rev. Biophys.*, **37**: 289-316
- Esteras-Chopo, A., Serrano, L. y M. López de la Paz. 2005. The amyloid stretch hypothesis: recruiting proteins toward the dark side? *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **102** (46): 16672-16677
- Fändrich, M., Fletcher, M.A, y C. M. Dobson. 2001. Amyloid fibrils from muscle myoglobin, *Nature*, **410**: 165-166
- Fändrich, M., Forge, V., Buder, K., Kittler, M., Dobson, M.C. y S. Diekmann. 2003. Myoglobin forms amyloid fibrils by association of unfolded polypeptide segments. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **100** (23): 15463-15468
- Ferrão-Gonzales, A.D., Souto, S.O, Silva, J. L y D. Foguel. 2000. The preaggregated state of an amyloidogenic protein: Hydrostatic pressure converts native transthyretin into the amyloidogenic state, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **97** (12): 6445-6450

- Ferguson, N., Becker, J., Tidow, H., Tremmel, S., Sharpe, T.D., Krause, G., Flinders, J., Petrovich, M., Berriman, J., Oschkinat, H., y A.R. Fersht. 2006. General structural motifs of amyloid protofilaments, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **103** (44): 16248-16253
- De Filippis, V., Vassilev, V.B., Beltramini, M., Fontana, A., Salvato, B. y V.S. Gaitskhoki. 1996. Evidence for the molten globule state of human apo-ceruplasmin, *Biochim. Biophys. Acta*, **1297** (2): 119-123
- Fink, A.L. 2005. Natively unfolded proteins, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **15** (1): 35-41
- Fowler, D.M., Koulov, A.V., Balch, W.E., y J. W. Nelly, 2007, Functional amyloids –from bacteria to humans, *Trends Biochem. Sci.*, **32** (5): 217-224
- Ganong, W.F. 2004. *Fisiología médica*, Manual Moderno, Ciudad de México, 914 pp.
- Gazit, E., 2002a, The “correctly folded” state of proteins: is it a metastable state?, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **41**(2): 257-259
- Gazit, E. 2002b. A possible role for π -stacking in the self-assembly of amyloid fibrils, *The FASEB Journal*, **16**(1): 77-83
- Ghose, A.C. y B. Jirgensons. 1971. Circular dichroism studies on the variable and constant halves of kappa-type Bence Jones proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, **251** (1): 14-20
- Goldschmidt, L., Teng, P.K., Riek, R. y D. Eisenberg. 2010. Identifying the amyloids, proteins capable of forming amyloid like-fibrils, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **107** (8): 3487-3492
- Goto, Y., Calciano, L.J y A. L. Fink. 1990a. Acid-induced folding of proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **87** (2): 572-577
- Goto Y., Takahashi, N. y A. L. Fink. 1990b. Mechanism of acid-induced folding of proteins, *Biochemistry*, **29** (14): 3480-3488
- Guijarro, J.I., Sunde, M., Jones, J.A., Campbell I.D y C.M. Dobson. 1998. Amyloid fibril formation by a SH3 domain, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **95** (8): 4224-4228
- Helms, L.R. y R. Wetzel. 1996. Specificity of abnormal assembly in immunoglobulin light chain deposition disease and amyloidosis, *J. Mol. Biol.*, **257** (1): 77-86
- Hernández-Santoyo, A., del Pozo-Yauner, L., Fuentes-Silva, D., Ortiz, E., Rudiño-Piñera, E., Sánchez-López, R., Horjales, E., Becerril, B. y A. Rodríguez-Romero. 2010. A single mutation at the sheet switch region results in conformational changes favoring $\lambda 6$ light-chain fibrillogenesis, *J. Mol. Biol.*, **396** (2): 280-292

- Hurle, M.R., Helms, L.R., Li, L., Chan, W. y R. Wetzel. 1994. A role for destabilizing amino acid replacements in light-chain amyloidosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **91** (12): 5446-5450
- Ionescu-Zanetti, C., Khurana, R., Gillespie, J.R., Petrick, J.S., Trabachino, L.C., Minert, L.J., Carter, S.A. y A.L. Fink. 1999. Monitoring the assembly of Ig light-chain amyloid fibrils by atomic force microscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **96** (23): 13175-13179
- Jackson, S.E. 1998. How do small single-domain proteins fold? *Fold. Des.*, **3** (4): R81-R91
- Joss, N. y M. Boulton-Jones. 2005. The patient with amyloid or immunotactoid glomerulopathy. Pp: 679-. *In*: Davidson, A.M., Cameron, J.S., Grünfed, J.P. Porticelli, C., Ritz, E., Winearls, C.F, y C. van Ypersele, (eds.) *Oxford Textbook of Clinical Nephrology*, Oxford University Press, Oxford. 3048 pp.
- Kaplan, B., Linvch, A. y G. Gallo. 2007. Charge differences between *in vivo* deposits in immunoglobulin light-chain amyloidosis and non-amyloid light chain deposition, *Br J Haematol*, **136** (5): 723-728
- Keeling, J., Teng, J. y G.A. Herrera. 2004. AL-amyloidosis and light-chain deposition disease light chains induce divergent phenotypic transformations of human mesangial cells, *Lab. Invest.*, **84** (10): 1322-1338
- Kelly, J. W. 1996. Alternative conformations of amyloidogenic proteins govern their behavior, *Curr. Op. Struct. Biol.*, **6**(1): 11-17
- Khurana, R., Uversky, V.N, Nielsen, L y A.L. Fink. 2001. Is Congo red an amyloid-specific dye?, *J. Biol. Chem.*, **276** (25): 22715-22721
- Khurana, R., Gillespie, J.R., Talapatra, A., Minert, L.J., Ionescu-Zanetti, C., Millett, I. y A.L. Fink. 2001. Partially folded intermediates as critical precursors of light-chain amyloid fibrils and amorphous aggregates, *Biochemistry*, **40** (12): 3525-3535
- Kindt, T.J., Goldsby, R.A. y B. A. Osborne. 2007 *Kuby Immunology*, W.H. Freeman and Company, Nueva York. 574pp.
- Krebs M.R.H, Bromley E.H.C, y A.M. Donald. 2004. The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: localisation and implications, *J. Struct. Biol.*, **149** (1): 30-37
- Lai, Z., Colón, W y J.W Nelly. 1996. The acid-mediated denaturation pathway of transthyretin yields a conformational intermediate that can self-assemble into amyloid, *Biochemistry*, **35** (20): 6470-6482

- Lashuel, H.A., Wurth, C., Woo, L. y J.W. Kelly. 1999. The most pathogenic transthyretin variant, L55P, forms amyloid fibrils under acidic conditions and protofilaments under physiological conditions, *Biochemistry*, **38**(41): 13560-13573
- Levinthal, C. 1968. Are there pathways for protein folding? *J. Chem. Phys.*, **65**: 44-45
- LeVine III, H. 1999. Quantification of β -sheet amyloid fibril structures with ThioflavinT, *Methods Enzymol*, **309**: 274-284
- Lorenzo, A. y B.A. Yankner.1994. β -Amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by Congo red, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **91** (25): 12243-12247
- Lührs,T., Ritter,C., Adrian, M., Riek-Loher, D., Bohrmann, B., Döbeli, H., Schubert, D., R. Riek. 2005, 3D structure of Alzheimer's amyloid- β (1-42) fibrils, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **102** (48): 17432-17347
- Maji,S. K., Perrin, M.H., Sawaya, M. R., Jesseberger, S., Vadodaria, K., Rissman, R.A, Singru, P.S., Nilsson, K.P.R., Simon, R., Schubert, D., Eisenberg, D., Rivier, J., Sawchenko, P., Vale, W. y R. Riek. 2009. Functional amyloids as natural storage of peptide hormones in pituitary secretory granules, *Science*, **325**: 328- 332
- Matulis, D., Baumann. C.G., Bloomfield, V.A. y R.E Lovrien.1998. 1-Anilo-8-naphtalene sulphonate as a protein conformational tightening agent, *Biopolymers*, **49** (6): 451-458
- Matulis, D. y R.E. Lovrien. 1998. 1-Anilo-8-naphtalene sulphonate-protein binding depends primarily on ion pair formation, *Biophys. J.*, **74** (1): 422-429
- Maury, C.P.J. 2009. The emerging concept of functional functional amyloid, *J. Intern. Med.*, **265** (3): 329-334
- McParland, V.J, Kad, N.M., Kalverda, A.P., Brown, A. Kirwin-Jones, P., Hunter, M.G., Sunde, M. y S.E Radford. 2000. Partially unfolded states of beta(2)- microglobulin and amyloid formation *in vitro*, *Biochemistry*, **39** (30): 8735-8746
- Mishima, T., Ohkuri, T., Monji, A., Kanemaru, T., Abe, Y. y T. Ueda. 2009. Residual structure in the acid-unfolded states of λ 6 proteins affect amyloid fibrillation, *J. Mol. Biol.*, **392** (4): 1033-1043
- Monsellier, E. y F. Chiti. 2007. Prevention of amyloid-like aggregation as a driving force of protein evolution, *EMBO reports*, **8** (8): 737-742
- Nelson, R., Sawaya, M.R., Balbirnie, M., Madsen, A. Ø., Riek, C., Grothe, R. y D. Eisenberg. 2005. Structure of the cross- β spine of amyloid-like fibrils, *Nature*, **435**: 773-778

- Nelson, D.L. y M.M. Cox. 2008. *Lehninger Principles of biochemistry*, W.H. Freeman and Company, Nueva York, 1158pp.
- Nielsen, L. Khurana, R., Coats, A., Frokjaer, S., Brage, J., Vyas, S., Uversky, V. y A.L. Fink. 2001. Effect of environmental factors on the kinetics of insulin fibril formation: elucidation of the molecular mechanism, *Biochemistry*, **40** (20): 6036-6046
- Obici, L., Perfetti, V., Palladini, G., Moratti, R. y G. Merlini. 2005. Clinical aspects of systemic amyloid diseases, *Biochim. Biophys. Acta*, **1753** (1): 11-22
- Patton, H.D., Fuchs, A.F., Hille, B., Scher, A.M. y R. Steiner. 1989. *Textbook of physiology. Respiration, body fluids, metabolism and endocrinology*, W.B. Saunders Company, Filadelfia, 1596 pp.
- del Pozo-Yauner, L. 2008. Influencia de la línea germinal 6a en la tendencia de las cadenas ligeras $\lambda 6$ a la agregación amiloide, Tesis de doctorado, UNAM, 131 pp
- del Pozo-Yauner, L., Ortiz, E., Sánchez, R., Sánchez-López, R., Güereca, L., Murphy, C.L., Allen, A., Wall, J.S., Fernández-Velasco, D.A., Solomon, A. y B. Becerril. 2008. Influence of the germline sequence on the thermodynamic stability and fibrillogenicity of human lambda 6 light chains, *Proteins*, **72** (2):684-692
- del Pozo-Yauner, L., Ortiz, E. y B. Becerril. 2008b. Diseases related to protein misfolding. Pp: 469-501. *In: Garcia-Hernández, E. y D.A. Fernández-Velasco (eds.) Advances in protein physical chemistry*, Transworld Research Network, Kerala, India, 501 pp.
- Qin, Z., Hu, D., Zhu, M. y A.L. Fink. 2007. Structural characterization of the partially folded intermediates of an immunoglobulin light chain leading to amyloid fibrillation and amorphous aggregation, *Biochemistry*, **46** (11): 3521-3531.
- Santoro, M. M. y D. W. Bolen. 1988. Unfolding free energy changes by the linear extrapolation method. 1. Unfolding of phenylmethanesulfonyl α -chymotrypsin using different denaturant, *Biochemistry*, **27** (21): 8063-8068
- Schönbrunn, E., Eschenburg, S., Luger, K., Kabsch, W. y N. Amrhein. 2000, Structural basis for the interaction of the fluorescence probe 1-Anilo-8-naphtalene sulphonate (ANS) with the antibiotic target MurA, *Proc. Natl. Acad. Sci*, **97** (12):6345-6349
- Sikkink L. A. y M. Ramírez-Alvarado. 2008. Salts enhance both protein stability and amyloid formation of an immunoglobulin light chain, *Biophys. Chem.*, **135** (1-3): 25-31
- Sipe D. J y A. S. Cohen. 2000. The history of the amyloid fibril, *J. Struct. Biol.*, **130** (2-3): 88-98

- Streit, W.J. 2006. Microglial senescence: does the brain's immune system have an expiration date? *Trends Neurosci.*, **29** (9): 506-510
- Solomon, A., Frangione, b. y E.C. Franklin. 1982. Bence Jones proteins and light chains of immunoglobulins. Preferential association of the V_{λVI} subgroup of human light chains with amyloidosis AL (λ), *J. Clin. Invest.*, **70** (2): 453-460
- Souillac, P.O., Uversky, V.N, Millett, I.S., Khurana, R., Doniach, S. y A.L. Fink. 2002a. Effect of association state and conformational stability on the kinetics of immunoglobulin light chain amyloid fibril formation at physiological pH, *J. Biol. Chem.*, **277** (15): 12657-12665
- Souillac, P.O., Uversky, V.N, Millett, I.S., Khurana, R., Doniach, S. y A.L. Fink. 2002b. Elucidation of the molecular mechanism during the early events in immunoglobulin Light chain amyloid fibrillation. Evidence for an off-pathway oligomer at acidic pH, *J. Biol. Chem.*, **277** (15): 12666-12679
- Stevens, F. J. y R. Kisilevsky. 2000. Immunoglobulin light chains, glycosaminoglycans, and amyloid, *Cell. Mol. Life Sci.*, **57** (3): 441-449
- Teng, J., Russell, W.J., Gu, X., Cardelli, J., Jones, M.L, y G.A. Herrera. 2004. Different types of glomerulopathic light chains interact with mesangial cells using a common receptor but exhibit different intracellular trafficking patterns, *Lab. Invest.*, **84** (4):440-451
- Thies, M.J.W., Kammermeier, R., Ritcher, K. y J. Buchner. 1991. The alternatively folded state of the antibody C_{H3} domain, *J. Mol. Biol.*, **309** (5): 1077-1085
- Touchette, J.C, Willliams, L.L., Ajit, D., Gallazi, F. y M. R. Nichols. 2010. Probing the amyloid-β (1-40) fibril environment with substituted tryptophan residues, *Arch. Biochem. Biophys.*, **494** (2): 192-197
- Xue, W.-F., Homans, S.W y S.E. Radford, 2008. Systematic analysis of nucleation-dependent polymerization reveals new insights into the mechanism of amyloid self-assembly, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **105** (26): 8926-8931
- Wall, J., Murphy, C.L. y A. Solomon. 1999a. *In vitro* light-chain fibrillogenesis, *Methods Enzimol.*, **309**: 204-217
- Wall, J., Schell, M., Murphy, C., Hrcic, R., Stevens, F.J. y A. Solomon. 1999b. Thermodynamic instability of human λ6 light chains: correlation with fibrillogenicity, *Biochemistry*, **38** (42):14101-14108

- Westermarck, G.T, Johnson, K.H y P. Westermarck. 1999. Staining methods for identification of amyloid in tissue, *Methods Enzimol.*, **309**: 3-25
- Welfle, K., Misselwitz, R., Hausdorf, g., Höhne, W y H. Welfle. 1998. Conformation, pH-induced conformational changes, and thermal unfolding of anti-p24 (HIV-1) antibody CB4-1 and its Fab and Fc fragments, *Biochim. Biophys. Acta*, **1431** (1): 120-131
- Wilson, M.R., Yerbury J.J.y S. Poon. 2008. Potential roles of abundant extracellular chaperones in the control of amyloid formation and toxicity, *Mol. BioSyst.*, **4** (1): 42-52