



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

LA VÍA DE PLEGAMIENTO DE 6AJL2

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

Haven Arturo López Sánchez

Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco
Facultad de Medicina, UNAM

Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez
Facultad de Medicina, UNAM

Dr. Andrés Hernández Arana
Departamento de Química, UAM Iztapalapa

Ciudad de México. Noviembre, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos Institucionales

- A la UNAM.
- A la Facultad de Química y al Programa de Maestría y Doctorado en en Ciencias Bioquímicas.
- Al Laboratorio de Fisico Química e Ingeniería de Proteínas.
- Facultad de Medicina, UNAM: a los laboratorios de los doctores Guillermo Mendoza (†) y Leticia Ramírez. Al Dr. León Islas, especialmente a la Dra. Gisela Rangel por la ayuda en la Biología Molecular.
- Insitituto de Fisiología Celular, UNAM: a la Unidad de Biología Molecular y al Dr. Antonio Peña.
- Al laboratorio de la Dra. Rosario Muñoz Clares en el Instituto de Química, UNAM.
- Al Matthews Lab, Umass.
- A los laboratorios del Dr. Daniel Piñero en Instituto de Ecología UNAM y la Dra. Ana Wegier en INIFAP/Jardín Botánico, UNAM.

- A los miembros del comité tutorial: Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez y Dr. Andrés Hernández Arana.
- A los miembros del comité de candidatura: Dr. Enrique García Hernández, Dr. Rogelio Rodríguez Sotres, Dr. Lorenzo Segovia Forcella, Dr. Enrique Rudiño Piñera y Dr. Juan Luis Rendón.
- A los miembros del comité ampliado: Dra. Rosario Muñoz Clares, Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez, Dr. Miguel Costas Basín, Dr. Alejandro Fernández Velasco.
- A los miembros del jurado de tesis: Dra. Rosario Muñoz Clares, Dra. Nina Pastor, Dra. Gloria Saab Rincón, Dr. Rogelio Rodríguez Sotres y Dr. Arturo Rojo.
- Al Conacyt y al PAEP.

Agradecimientos Personales

- A maestr@s e investigador@s. Gracias por compartir su conocimiento. Gracias por hacerlo a cambio de muy poco.
- A los dirigentes del LFQIP por darme un espacio y tiempo en medida de lo posible. Por compartir conocimiento y procurar que en ese espacio se puedan desarrollar proyectos que no siempre tienen producción en tiempo y forma.
- A Aarón, Andrea, Areli, Ernesto(†), Diego Alonso, Diego Granados, Eloy, Fátima, Gisela, Héctor Ceceña, Hector Guzmán, Itzel, Jorge, Julio, Mariana, Sampieri y Renán por compartir la no-siempre-fácil vida dentro del laboratorio. Por compartir su entusiasmo. Por prestarse al experimento del desarrollo profesional dentro de la academia y tomar lo bueno y lo malo. Somos productos no acabados y los caminos no siempre son claros.
- Agradecimiento especial a los miembros del Matthews Lab. A Bob, Osman y Jill por compartir su conocimiento y recursos, por orientar esta investigación en la dirección correcta. Soy gran admirador de su ciencia.
- A los doctores Juan Pablo Pardo y Andrés Hernández Arana, por las valiosas discu-

siones y contribuciones durante las revisiones semestrales del proyecto, y las últimas en “extra-innings”.

- Al Dr. Luis Blancas, por construir los cimientos de esta investigación y no recelar sobre la re-interpretación de la misma. Por seguir con las discusiones sobre este tema después de tantos años.
- Agradecimiento y admiración personal y profesional eterna a Sagar Kathuria, quien se tomó tiempo para compartir su entendimiento y su gusto por el tema. Por abrir las puertas de su hogar a un desconocido que necesitaba su ayuda. Su experiencia y desarrollos son piezas fundamentales en la consecución de resultados de este trabajo.
- A Alejandro, por compartir la línea de investigación y su entusiasmo sobre el plegamiento, por enseñarnos termodinámica y cinética, por conseguir recursos y por tener paciencia infinita con la finalización de éste proyecto.
- A mi familia nuclear y extendida, sus esfuerzos también se ven reflejados en este trabajo.
- A tod@s l@s que ayudaron: quedan algunas cosas por demostrar, pero los resultados de ésta investigación apuntan hacia el establecimiento de un marco sólido para explicar el origen molecular de una enfermedad. Esto no es un avance menor, algún día será conocimiento popular y la solución a dicha enfermedad será puesta en práctica de manera cotidiana. Ustedes son parte de ello.
- A Valeria Alavez, por su incesante apoyo y por creer en mí.

Dedicatoria

A l@s que compartieron el viaje conmigo, especialmente a l@s que no toman atajos ni se abrazan con los patriarc@s/matriarc@s... también a l@s que no flotan ni fluyen como monarcas.

A l@s que no traicionan su discurso.

A quienes leen esta tesis.

A mi familia. Por estar siempre.

A Valeria, ... *Always*.

Manifiesto por la Ciencia Lenta

Somos científicos. No bloqueamos. No tuiteamos. Nos tomamos nuestro tiempo.

No nos malinterpreten –decimos sí a la ciencia acelerada de principios del siglo 21.
Decimos sí al flujo constante de publicaciones revisadas por pares en revistas y a su impacto;
decimos sí a los blogs de ciencia y los medios de relaciones públicas necesarios;
decimos sí a aumentar la especialización y diversificación en todas las disciplinas.
También decimos sí a la retroalimentación de la investigación con la salud y la prosperidad futura.
Todos nosotros estamos también en este juego.

No obstante, mantenemos que esto no puede ser el todo.

La ciencia necesita tiempo para pensar.

La ciencia necesita tiempo para leer, y tiempo para fallar.

La ciencia no siempre sabe en qué anda.

La ciencia se desarrolla inestablemente, con movimientos espasmódicos e impredecibles saltos hacia adelante – pero al mismo tiempo, se arrastra sobre una escala de tiempo muy lenta, para la cual debe haber espacio y a la que se debe hacer justicia.

La ciencia lenta fue por cientos de años la única ciencia concebible;

hoy, sostenemos nosotros, merece ser revivida y necesita protección.

La sociedad debe dar a los científicos el tiempo que necesitan,

pero todavía más importante, los científicos deben tomarse su tiempo.

Necesitamos tiempo para pensar. Necesitamos tiempo para digerir.

Necesitamos tiempo para malinterpretarnos, especialmente mientras se fomenta el diálogo perdido entre las humanidades y las ciencias naturales.

No podemos decirte continuamente qué significa nuestra ciencia; para qué servirá... porque simplemente no lo sabemos aún.

La ciencia necesita tiempo.

– Tengan paciencia con nosotros, mientras pensamos.

Índice general

Agradecimientos Institucionales	I
Agradecimientos Personales	III
Dedicatoria	V
Manifiesto por la Ciencia Lenta	VI
Índice de figuras	XII
Índice de cuadros	XV
Resumen	XVI
Abstract	XVIII
1. Introducción	1
1.1. Amiloidosis.	3
1.2. Hipótesis del cambio conformacional en proteínas amiloidogénicas.	7
1.3. Cadenas variables ligeras y amiloidosis.	8

1.4.	Estructura de anticuerpos IgG y sus cadenas variables ligeras.	11
1.4.1.	Variabilidad y mutaciones en cadenas ligeras.	14
1.5.	El plegamiento y ensamblaje de anticuerpos IgG.	18
1.5.1.	El puente disulfuro en los dominios de anticuerpos.	18
1.5.2.	El papel de las prolinas en el plegamiento de dominios inmunoglobulina.	19
1.5.3.	Formación de hélices pequeñas en dominios inmunoglobulina.	22
1.5.4.	Ensamblaje de anticuerpos.	23
1.6.	Mecanismos de plegamiento en V_L s.	23
1.7.	6aJL2, una proteína modelo.	30
1.8.	Antecedentes.	35
2.	Justificación	37
3.	Hipótesis	39
3.1.	Hipótesis general.	39
3.2.	Hipótesis particulares.	39
4.	Objetivos	41
4.1.	Objetivo general.	41
4.2.	Objetivos particulares.	41
5.	Materiales y Métodos	42
5.1.	Gen, vector de expresión, sobre-expresión y purificación de 6aJL2.	42
5.1.1.	6aJL2.	42

5.1.1.1.	Vector de expresión.	42
5.1.1.2.	Expresión heteróloga (sobre-expresión).	44
5.1.1.3.	Purificación.	45
5.1.2.	Peptidil-prolil cis-trans Isomerasa: Cyp18.	46
5.2.	Experimentos al equilibrio.	46
5.2.1.	Curvas de desnaturalización en urea.	46
5.2.2.	Análisis de experimentos al equilibrio.	47
5.2.2.1.	Análisis de datos obtenidos a una sola longitud de onda.	48
5.2.2.2.	Análisis de datos empleando múltiples longitudes de onda.	49
5.3.	Cinética de plegamiento.	50
5.3.1.	Cinéticas de desnaturalización y renaturalización.	50
5.3.2.	Cinéticas de desnaturalización desde distintas concentraciones iniciales de urea.	51
5.3.3.	Experimentos de dobles salto.	51
5.3.4.	Replegamiento en presencia de Cyp18.	52
6.	Resultados	53
6.0.1.	Análisis empleando sólo una longitud de onda.	53
6.0.1.1.	Dicroísmo circular (DC).	53
6.0.1.2.	Fluorescencia intrínseca (IF).	55
6.0.2.	Ajustes al modelo de dos estados.	58
6.0.3.	Análisis de longitud de onda múltiple.	60
6.0.3.1.	Dicroísmo circular.	60
6.0.3.2.	Fluorescencia intrínseca.	61

6.0.4.	Modelos de tres estados.	63
6.1.	Cinética.	64
6.1.1.	Desnaturalización/ <i>unfolding</i>	64
6.1.2.	Renaturalización/ <i>refolding</i>	65
6.1.3.	Análisis del gráfico de chevron.	66
6.1.4.	Perturbación del estado nativo.	69
6.1.5.	Heterogeneidad en el estado desnaturalizado.	69
6.1.5.1.	Dobles saltos de renaturalización.	71
6.1.5.2.	Replegamiento en presencia de Cyp18.	72
6.1.5.3.	Replegamiento a diferentes concentraciones de 6aJL2.	73
6.2.	Modelo cinético.	75
6.3.	Mutaciones de 6aJL2.	80
6.3.1.	Experimentos al equilibrio.	80
6.3.2.	Cinética.	83
6.4.	Ensayos de fibrilogénesis.	85
7.	Discusión	87
7.1.	Equilibrio.	87
7.2.	Cinética.	91
7.3.	Modelo cinético.	94
7.4.	Mutaciones y fibras amiloides.	97
8.	Conclusiones	105
9.	Epílogo	109

0

Índice general

XI

Bibliografía

117

Índice de figuras

1.1. Depósitos amiloides en tejido cardíaco.	4
1.2. Amiloides funcionales.	6
1.3. Micrografías de depósitos/fibras amiloides.	7
1.5. Evolución de las representaciones de estructuras de fibras amiloides.	10
1.6. Estabilidad y fibrilogénesis de cadenas ligeras.	11
1.7. Anticuerpos IgG y sus cadenas ligeras.	12
1.8. Estructuras de la superfamilia <i>Ig-like</i>	13
1.9. Estructuras de ciclofilina y peptidil-prolil isomerasa.	21
1.10. Dominios constantes y hélices alfa.	22
1.11. Eventos moleculares críticos durante el ensamblaje, plegamiento y secre- ción de anticuerpos.	24
1.12. Cinética de plegamiento de dominios C_L y V_L	26
1.13. Gráficos de chevron en la superfamilia "Ig-like".	27
1.14. ^1H NMR SMA.	28
1.15. Mecanismo de plegamiento de la β -2 microglobulina.	29
1.16. Mecanismo de plegamiento de MAK33.	31

1.17. 6aJL2 y R25G.	32
5.1. Secuencia y predicción de estructura secundaria del segmento 6a.	43
5.2. Vector de expresión <i>pET27b(+)-6aJL2</i>	44
6.1. DC en el UV-lejano, 25°C.	54
6.2. Curvas de desnaturalización de 6aJL2 por DC en el UV-lejano	55
6.3. DC en el UV-cercano.	56
6.4. Curvas de desnaturalización de 6aJL2 por DC en el UV-cercano a 25°C.	56
6.5. Serie espectral y curva de desnaturalización seguidas por IF.	57
6.6. Vectores significativos, DC en el UV-cercano.	61
6.7. Pre y post SVD, DC UV-cercano.	62
6.8. Vectores significativos, IF	63
6.9. Pre y post SVD, IF.	64
6.10. Cinéticas de desnaturalización.	65
6.11. Cinéticas de renaturalización.	66
6.12. Gráfico de chevron y amplitudes asociadas.	67
6.13. Perturbación en la región del nativo.	70
6.14. Dobles saltos.	71
6.15. Renaturalización en presencia de Cyp18.	73
6.16. Renaturalización a diferentes concentraciones de 6aJL2.	74
6.17. V_L MAK33 y su mecanismo de plegamiento.	75
6.18. β 2-microglobulina y su mecanismo de plegamiento.	76
6.19. Mecanismo de plegamiento de 6aJL2 a 25°C.	76

6.20. Gráfico de chevron, 6aJL2 a 25°C.	77
6.21. Gráfico de concentración de especies al equilibrio calculadas desde el modelo cinético.	80
6.22. Desplegamiento de 6aJL2 y dos mutantes a 25°C.	82
6.23. Gráficos de chevron y amplitudes de R25G y D52A.	84
6.24. Fibrillogénesis de 6aJL2, R25G y D52A.	86
7.1. Agarraderas o “clamps” y despliegamiento a 25°C.	99
7.2. Estructura de Fibras Amiloides AL55.	103
7.3. Estructura de Fibras Amiloides LOC.	103
9.1. Comparación estructural: 6aJL2 vs R25G vs D52A.	114

Índice de cuadros

6.1. Parámetros Termodinámicos de la Desnaturalización por Urea, Ajustes Individuales.	59
6.2. Parámetros Termodinámicos de la Desnaturalización por Urea, Ajuste Global.	59
6.3. Parámetros del Ajuste Global de Vectores Significativos, DC UV-cercano e IF.	62
6.4. Parámetros en 0 M urea asociados al mecanismo de plegamiento de 6aJL2 a 25°C.	78
6.5. Ajustes a Dos Estados, Mutantes.	82

Resumen

La amiloidosis es un fenómeno caracterizado por la formación de depósitos amiloides. Los amiloides son un tipo de agregación ordenada de proteínas (y otras moléculas como glicanos) que causan disrupciones potencialmente letales de las funciones celulares y tisulares en humanos. Dicha agregación es favorecida por el “mal plegamiento” de las proteínas involucradas; en varios modelos proteicos se ha descrito la presencia de intermediarios de plegamiento y su relación con la formación de fibras amiloides. 6aJL2 es una proteína modelo recombinante amiloidogénica, representante de la familia $\lambda 6$ de cadenas variables ligeras; dicha familia es conocida por estar presente en muchos casos clínicos a pesar de su baja representación en el repertorio de células B sanguíneas. En estudios previos se describió la presencia de intermediarios de plegamiento a 37°C y tiempos largos de incubación en los ensayos amiloidogénicos; sin embargo, a 25°C y tiempos cortos de incubación el mecanismo de plegamiento fue descrito como un proceso sencillo de dos estados. En este trabajo revisitamos el mecanismo de plegamiento de 6aJL2 a 25°C y describimos una dinámica conformacional compleja, involucrando al menos cinco conformaciones dentro del mecanismo. Se resalta la presencia de intermediarios cinéticos y de una conformación no descrita antes en el ensamble nativo, así como la existencia de una

reacción de isomerización de prolinas en el ensamble desnaturalizado. Dicha dinámica conformacional se asemeja a la de otros modelos amiloidogénicos, y por tanto se sugiere que algunas de las observaciones y conclusiones obtenidas en otros modelos pueden ser válidas para 6aJL2 y la amiloidosis de cadenas ligeras. Específicamente, dada la presencia de un intermediario cinético con características conformacionales distintas al ensamble nativo, se sugiere que dicha especie es un posible precursor del fenómeno de fibrilación amiloide, como ha sido propuesto en otros modelos. Finalmente, se presenta evidencia experimental del efecto termodinámico y cinético de un par de mutaciones: R25G y D52A; la primera es conocida por ser una variante alotípica derivada de un paciente y la segunda es resultante de un análisis estructural. Estas mutantes flanquean a una región ya propuesta como efectora de la fibrilación. Ambas mutantes presentan efectos termodinámicos y fibrilogénicos similares, pero presentan efectos cinéticos cualitativamente diferentes sobre el plegamiento, implicando distintos inicios del fenómeno de agregación amiloide.

Abstract

Amyloidoses are characterized by amyloid deposits formation. Amyloids are a specific type of protein ordered aggregation and they cause potentially lethal interrupted cell and tissue functions in humans. Such aggregation is elicited by protein misfolding; a relation between folding intermediates and amyloid fibril formation has been described in different protein models. 6aJL2 is an amyloidogenic recombinant model that represents the variable chain $\lambda 6$ family; such family is involved in numerous clinical cases in spite of its low representation in the B-cell repertoire. Previous studies have shown the presence of folding intermediates at 37°C and long incubation times in fibril formation assays; however, at 25°C and short incubation times, the reported folding mechanism was described as a simple two-states process. In this work we revised the folding mechanism of 6aJL2 at 25°C describing a previously unnoticed complex dynamics, involving at least five conformations. The presence of a kinetic intermediate, a native-like conformation, as well as a prolyl-isomerization reaction in the unfolded ensemble are highlighted. Such conformational dynamics are similar to that described for other models, suggesting that some observations and conclusions derived for other models are valid for this system and the variable light chain amyloidosis. Specifically, given the presence of a kinetic interme-

diately structurally different to the native ensemble, we suggest that such state is probably the precursor of the fibril formation pathway, as demonstrated for other models. Finally, experimental evidence is presented regarding the thermodynamic and kinetic effects from a couple of mutants: R25G and D52A; the former is a well known allotypic variant from a patient and the latter is product of a structural analysis. These mutants flank a region on the protein already proposed as effector in fibril formation. Both mutants show similar thermodynamic and fibrillogenic effects, but they also present different kinetic effects implying different outsets of the amyloid fibril formation process.

1 | Introducción

La estructura tridimensional de todas las proteínas está íntimamente relacionada con su función biológica. En la actualidad, dicha estructura no se concibe como un ente rígido sino como un ensamble de conformaciones energéticamente equivalentes, *i.e.*, como un conjunto de conformaciones fluctuantes muy similares dentro de una población de una misma proteína [94]. El ensamble de conformaciones tridimensionales funcionales es conocido como estado nativo [38, 77]. El fenómeno de adquisición de estructura tridimensional de una cadena polipeptídica es conocido como **plegamiento**; este proceso está determinado tanto por la secuencia aminoacídica de la cadena polipeptídica como por la interacción de dicha cadena con el medio/ambiente que la rodea [73]. Siendo así, variaciones en la secuencia de la cadena o en las condiciones del medio pueden ser causantes de la pérdida de integridad estructural de una o más moléculas dentro de una población ya plegada, *i.e.*, las condiciones necesarias para que el fenómeno de plegamiento se dé de manera espontánea no son alcanzadas. En términos estadísticos, el ensamble conformacional predominante (estado nativo) en las condiciones originales cambia, dando lugar al establecimiento de otras conformaciones o estructuras que no son funcionales (o que tienen otra función) en el contexto biológico. A esto último se le conoce como “**mal plegamiento**”

(*misfolding*) [4, 14].

Debido a que la dinámica conformacional de una proteína puede dar origen a conformaciones no funcionales, existen diferentes mecanismos celulares encargados de mantener a ciertas proteínas en formas tridimensionales correctas o listas para ser usadas mientras sean necesarias en el ámbito celular. Ejemplos de dichos mecanismos son el **mantenimiento por chaperonas** y la **separación de fases**, respectivamente. También existen mecanismos de respuesta celular para degradar a estas proteínas si no son necesarias (ej: ubiquitinación) [15, 51, 103]. Al fenómeno que engloba al conjunto de mecanismos encargados de mantener el balance celular se le conoce como **proteostasis** [20]. Fallas en estos mecanismos celulares pueden causar una sobrecarga metabólica o **citotoxicidad** causada por la abundante presencia de proteínas mal plegadas, resultando en desórdenes celulares/orgánicos (*e.g.*, fibrosis quística y síndrome de Marfan). Dichos desórdenes pueden tener consecuencias letales para los individuos. Fenómenos como éstos son reconocidos actualmente como **plegopatías**, aquellas enfermedades relacionadas con un “mal plegamiento” de las proteínas involucradas en cada padecimiento [15, 20, 79].

El objetivo final dentro del área de investigación es esclarecer las determinantes fisicoquímicas del proceso de plegamiento, así como esclarecer las relaciones de estas determinantes y sus resultantes en términos estructurales con la capacidad intrínseca de dichas proteínas para formar un tipo de agregados específicos, conocidos como **amiloides** (causantes de la cito-toxicidad mencionada arriba). El tema central de esta tesis/investigación es la exploración y determinación de la **vía o mecanismo de plegamiento** de una proteína particular, representante de una clase estructural conocida como **dominio inmunoglobulina** (Ig). Para ello, se describen aspectos fisicoquímicos relevantes de la proteína en

cuestión, una **cadena variable ligera llamada 6aJL2**, y también para otras en el contexto general de las amiloidosis. Se hace énfasis particular en aspectos termodinámicos y cinéticos previamente estudiados en proteínas estructuralmente similares a 6aJL2. También se contrastan los mecanismos de plegamiento de 6aJL2 y algunas proteínas estructuralmente similares, y se argumenta sobre los posibles efectos de las diferencias encontradas. Finalmente, se presenta evidencia preliminar de los efectos termodinámicos y cinéticos de mutaciones específicas en 6aJL2.

1.1 | Amiloidosis.

A manera de definición actual, las **amiloidosis** son un conjunto heterogéneo de enfermedades dentro de las cuales la combinación de factores bioquímicos o ambientales permiten que una proteína normalmente soluble (correctamente plegada) explore estados parcialmente plegados que pueden llevar a fenómenos de auto-asociación/agregación (estructuración cuaternaria) y posteriormente a depósitos de estos agregados [14, 15, 79, 100]. **Distintos órganos** pueden presentar depósitos amiloides dependiendo del padecimiento: corazón, riñones, hígado, páncreas y los sistemas nerviosos central y periférico (Fig: 1.1, 1.3a). En **amiloidosis localizadas**, los depósitos ocurren sólo en los tejidos del órgano que produce a la proteína precursora. Algunos ejemplos son enfermedades neurodegenerativas como las enfermedades de Alzheimer, Huntington y Parkinson, las dos últimas también presentan depósitos intracelulares. Por su parte, las **amiloidosis sistémicas** son todas extracelulares y se presentan cuando la proteína precursora es expresada y secretada en un órgano diferente al órgano donde se localizan los depósitos; ejemplos de este tipo

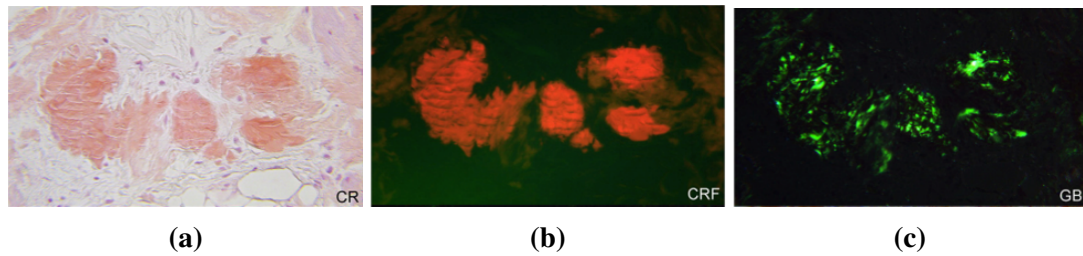


Figura 1.1: Depósitos amiloides en tejido cardiaco. a) Tinción con rojo Congo en luz brillante, los amiloides aparecen teñidos en rojo; b) Tinción con rojo Congo en luz fluorescente, los amiloides aparecen en color rojo brillante; c) Birrefringencia verde en luz polarizada, los amiloides aparecen en color verde fluorescente. Tomada de [100].

son la amiloidosis de cadena ligera (AL; expresión en células sanguíneas, depósitos en corazón, hígado y riñón), poli-neuropatía amiloidótica familiar (ATTR; proteína plasmática, depósito en corazón, hígado, sistema nervioso central) y otras [79, 100].

La **amiloidosis AL** es la amiloidosis sistémica más diagnosticada en el hemisferio occidental (10/1,000,000 personas). Es una enfermedad progresiva letal caracterizada por **depósitos extracelulares de cadenas ligeras** que forman agregados amiloides fibrilares insolubles. La causa de esta enfermedad está relacionada con una **proliferación anormal de células plasmáticas monoclonales que secretan altas cantidades de cadenas ligeras en el torrente sanguíneo** permitiendo el auto-ensamblaje y depósito de fibras amiloides insolubles en distintos órganos; el efecto global de dichos agregados en los tejidos de los órganos afectados es la interrupción de funciones de transporte en los tejidos así como efectos citotóxicos y de estrés metabólico en las células afectadas [26, 79]. Los mecanismos moleculares de la agregación amiloide han sido sujetos de intenso debate e investigación los últimos 20 a 30 años alrededor del mundo; si bien se han logrado esclarecer varios aspectos de dichos mecanismos, como el comportamiento cinético general de la formación de fibras amiloides [109], otros siguen siendo debatidos, como la naturaleza

estructural de los precursores amiloides.

No todos los fenómenos relacionados a amiloidosis implican padecimientos o enfermedades; se ha acuñado el término “**amiloides funcionales**” para describir a aquellos agregados de tipo amiloide con función biológica normal/benéfica en diferentes especies. Los siguientes son algunos ejemplos: distintas bacterias usan amiloides extracelulares para crear una matriz proteica que permite la formación de colonias (biopelículas o *biofilms*, Fig: 1.2a); algunos hongos emplean hidrofobinas para la formación de estructuras de dispersión como esporas y estas mismas hidrofobinas se ensamblan en estructuras ricas en hojas beta en interfaces hidrofílicas-hidrofóbicas (*e.g.*, agua-aire) causando adhesión a superficies como las presentes en organismos hospederos (Fig: 1.2b); las cubiertas de los huevos de algunos insectos están hechas de proteínas originadas en el corion, las cuales forman arreglos lamelares positivos al rojo Congo y muestran patrones de difracción de rayos-X similares a los de amiloides cuyas propiedades mecánicas y estabilidad química les permiten desarrollar una función de protección (Fig: 1.2c). En mamíferos, amiloides de la proteína Pmel17 son importantes para la biosíntesis de melanina en la piel (Fig: 1.2d) [61, 62, 65, 81, 99, 107].

Los **depósitos de agregados de tipo amiloide** son sujetos de intenso estudio en la actualidad, si bien no son comúnmente evaluados en primeras instancias de los padecimientos clínicos a los que están relacionados. Dichos depósitos se dan principalmente en el espacio extracelular de distintos tejidos y se distinguen histológicamente de otros tipos de agregados por formar **fibras** con un patrón de difracción de rayos-X conocido como beta-cruzado [22], también muestran birrefringencia verde cuando son teñidas con rojo Congo y vistas bajo luz polarizada [33, 79, 107] (Fig: 1.1, 1.2c). A la fecha, se han identificado

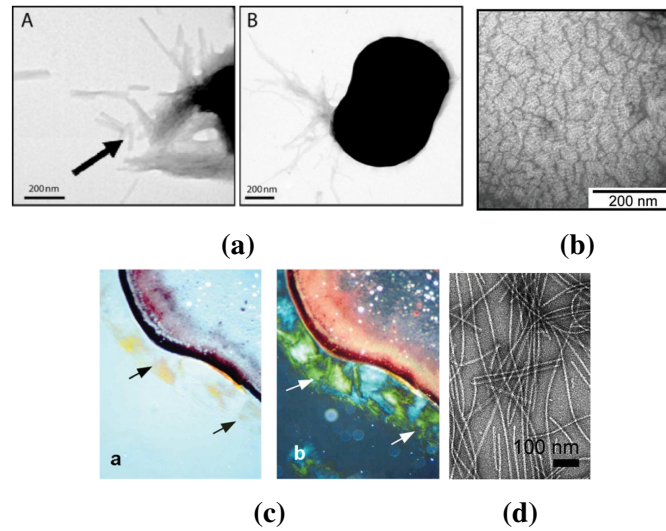


Figura 1.2: Amiloides funcionales. a) Micrografías de amiloides extracelulares de la región N-terminal de la proteína Bap de *Staphylococcus aureus* en pH 4.5, tomada de [61]; b) Micrografía de paletas de la hidrofobina EAS de *Neurospora crassa*, tomada de [81]; c) Preparaciones del corion de huevos de la polilla de seda tratadas con tinción con rojo Congo en iluminación de campo claro y luz polarizada, los amiloides del péptido Bm_1 aparecen señalados con flechas, tomada de [107]; d) Fibras amiloides de la proteína Pmel17 de mamíferos a pH 7.0, tomada de [62].

más de 50 proteínas distintas que pueden formar agregados amiloides en humanos; los casos mejor estudiados incluyen a la β 2-microglobulina ($A\beta$ 2m) en amiloidosis relacionada a diálisis prolongada, la transtirretina (TTR) en amiloidosis familiar (ATTR), el péptido β -amiloide en enfermedad de Alzheimer, la α -sinucleína en enfermedad de Parkinson y cadenas ligeras de inmunoglobulinas en amiloidosis AL y mieloma múltiple [103]. Los agregados amiloides de todas estas proteínas comparten las propiedades estructurales, de tinción y ópticas mencionadas arriba (Figs: 1.3, 1.5) [79, 100, 108].

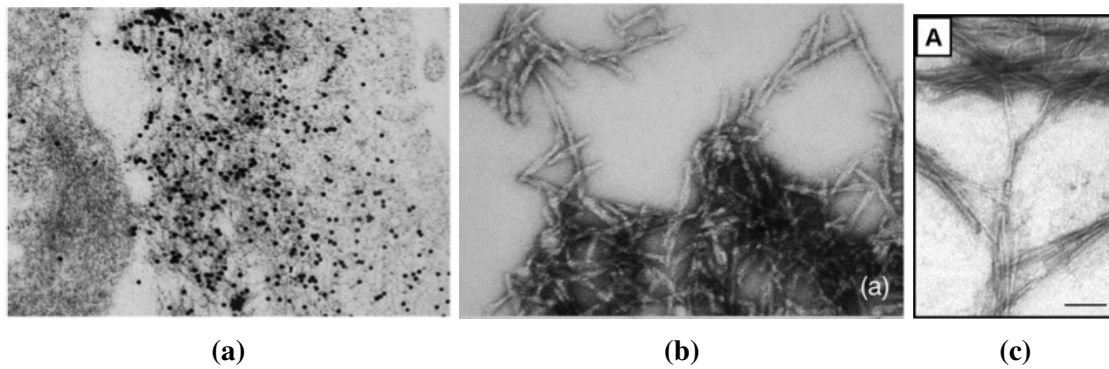


Figura 1.3: Micrografías de depósitos/fibras amiloides. a) Biopsia de tejido renal de un paciente con amiloidosis AA, el tejido fue incubado con anticuerpo anti-AA y visualizado empleando partículas coloidales de oro-proteína-A localizadas directamente sobre las fibras amiloides; b) Fibras amiloides aisladas (*ex-vivo*) de una cadena ligera tipo κ ; c) Fibras amiloides aisladas de una cadena ligera tipo $\lambda 6$ (6aJL2). a y b fueron tomadas de [100], c fue tomada de [33].

1.2 | Hipótesis del cambio conformacional en proteínas amiloidogénicas.

Hace un par de décadas se propuso una hipótesis en la que se sostiene que **cambios conformacionales en proteínas amiloidogénicas llevan a la formación de fibras amiloides**. Esta hipótesis está basada en la observación recurrente de que si bien distintos tipos de proteínas pueden dar origen a fibras amiloides, todas estas fibras comparten una estructura básica o patrón repetitivo beta-cruzado (Fig: 1.5); es decir, a pesar de la baja homología estructural o de secuencia, todas esas proteínas dan origen a fibras con estructuras similares. Por tanto, la similitud entre proteínas amiloidogénicas no puede darse a nivel del estado nativo, es necesario que se presente un **cambio conformacional** para adoptar una conformación amiloidogénica bajo condiciones parcialmente desnaturalizantes *in vivo* que permita el auto-ensamblaje en amiloides [66, 95].

Notablemente, la hipótesis del cambio conformacional está basada en el estudio del mecanismo de formación de amiloides de transtirritina y proteína- β , dos proteínas topológicamente similares a los dominios Ig, *i.e.*, a las cadenas ligeras. La conformación tridimensional de estas proteínas es denominada comúnmente “**sandwich- β** ” (ver sección 1.4, Fig: 1.8) [95].

1.3 | Cadenas variables ligeras y amiloidosis.

Los genes de **cadenas variables ligeras** (V_L) son clasificados en familias génicas o líneas germinales, los miembros de estas familias son secuencias funcionales similares que son combinadas y mutadas para generar diversidad en el repertorio de anticuerpos durante la maduración de las células B de la sangre. Existen dos subtipos de familias o líneas germinales representadas en el repertorio de anticuerpos: κ (V_κ) y λ (V_λ), clasificadas así por pertenecer a dos loci genéticos separados [18, 108].

Se ha reconocido una **mayor propensión a formar agregados de tipo amiloide** en las cadenas **tipo λ** a partir de muestras aisladas directamente de pacientes, convirtiéndolas en un modelo interesante/obligado para estudiar el fenómeno de amiloidosis AL. Wall *et al.*, reportaron que un subtipo particular de estas V_L s, el subtipo $V_\lambda 6$, está mayormente representado en los casos clínicos de amiloidosis (30% de los casos) a pesar de su baja representación en el repertorio sanguíneo (2% de las células B) [3, 33]. Por ello, se estudiaron las propiedades termodinámicas de algunas V_L s del subtipo $V_\lambda 6$ encontradas en pacientes, llamadas Jto y Wil, cuyos valores de estabilidad termodinámica (ΔG_{H_2O}) resultaron más bajos que los de proteínas de tipo κ . Interesantemente, Jto fue aislada de un

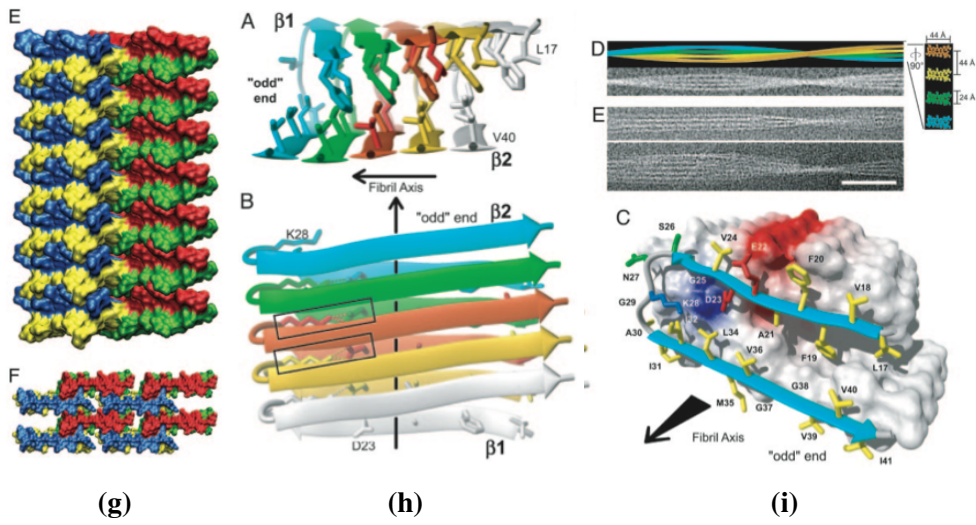
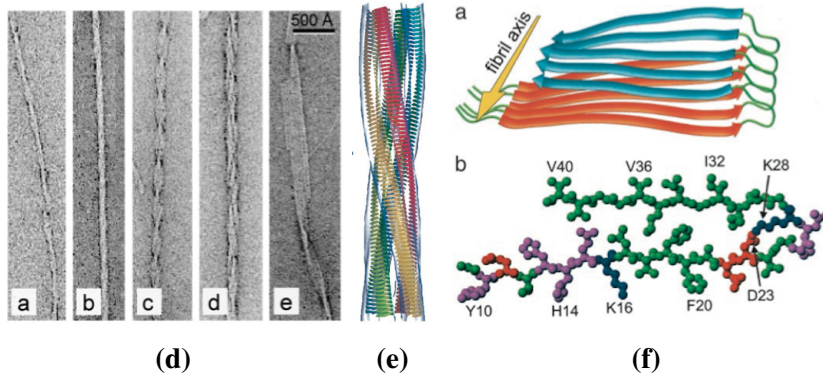
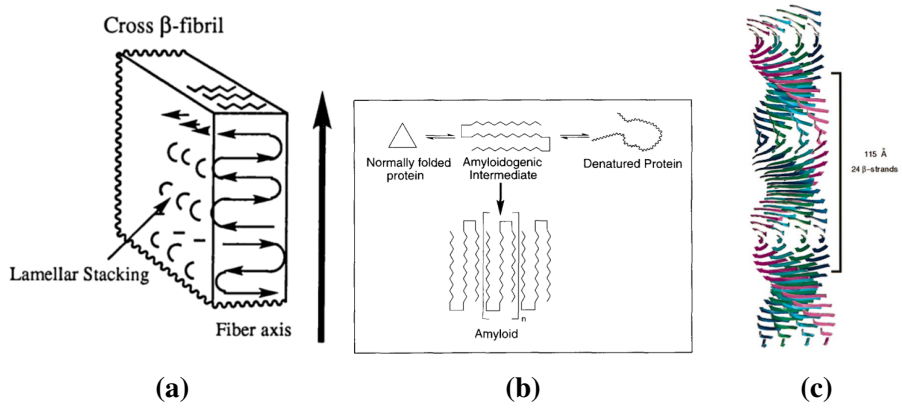


Figura 1.5: Evolución de las representaciones de estructuras de fibras amiloides. En a) se representa una sección transversal de una fibra con estructura β -cruzada destacando un apilamiento de tipo lamelar perpendicular al eje principal de la fibra (1994, tomada de [95]); en b) se representa la competencia entre desnaturalización y fibrillogénesis, se destaca la naturaleza multimérica de las fibras a partir de un intermediario con estructuras β (1996, tomada de [66]); en c) se representa un modelo genérico de una fibra amiloide destacando la orientación perpendicular de las hebras- β respecto al eje principal de la fibra (1997, tomada de [13]); en d) se muestra una galería de fibras (a-d) y un protofilamento (e) de fibras de insulina (2002, tomada de [63]); en e) se muestra un posible modelo de hebras- β basado en la densidad electrónica de las fibras en la figura d, los protofilamentos se distinguen en diferentes colores (2002, tomada de [63]); en f) se representa un modelo estructural para fibras del péptido $A\beta_{1-40}$ basado en RMN de estado sólido; arriba un esquema de una sola capa (doble capa) de la unidad β -cruzada, abajo una molécula minimizada mostrando el empaquetamiento de la región central del péptido vista sobre el eje mayor de la fibra (2002, tomada de [93]); en g) arriba, representación de la superficie del empaquetamiento cristalino de un dodecamero de un péptido que forma amiloides, abajo una vista axial (2004, tomada de [76]); en h e i) la estructura 3D de una fibra del péptido $A\beta_{1-42}$ (2005, tomada de [98]).

paciente con mieloma múltiple que nunca desarrolló AL y Wil fue aislada de un paciente fallecido por AL que no desarrolló mieloma múltiple [3].

A partir de los resultados descritos arriba se postuló una **correlación entre la estabilidad termodinámica y la propensión a formar fibras amiloides** conocida como la **hipótesis termodinámica** (Fig: 1.6). Dicha correlación puede ser explicada de la siguiente manera: las proteínas con ΔG_{H_2O} menores tienden a formar más fibras [3, 11, 33]; no se debe confundir ésta correlación con la “hipótesis” termodinámica del plegamiento de proteínas propuesta por Anfinsen [12]. Vale la pena resaltar que los autores de ese trabajo destacan en varias ocasiones la posibilidad de la presencia de un estado no-nativo que aumenta su importancia en función de la temperatura, lo cual probablemente es un factor más determinante para la formación de fibras amiloides que la correlación descrita [3].

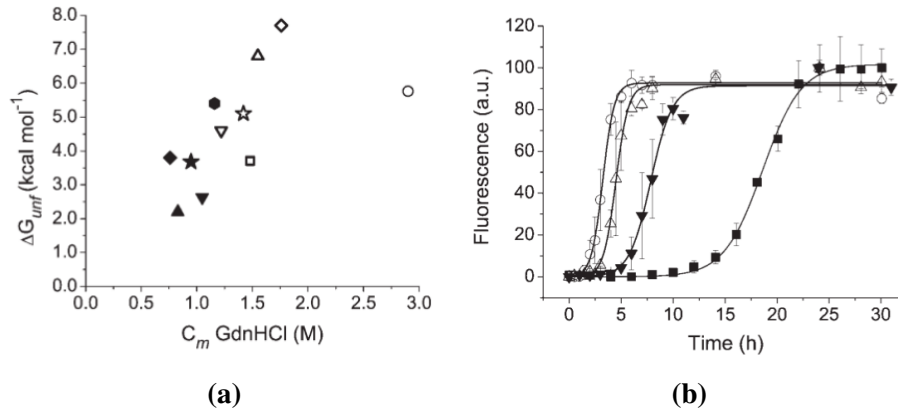


Figura 1.6: Estabilidad y fibrilogénesis de cadenas ligeras. En a) estabilidad termodinámica vs concentración media de GdnHCl. Amiloidogénicas: 6aJL2 (estrella abierta), 6aJL2-R25G (estrella negra), Wil (triángulo negro), Bif ($V_{\kappa 1}$, triángulo invertido negro), Rec ($V_{\kappa 4}$, diamante negro), Sma ($V_{\kappa 4}$, hexágono negro); No-amiloidogénicas: Gal ($V_{\kappa 1}$, cuadrado abierto), Jto ($V_{\lambda 6}$, triángulo invertido abierto), Rei ($V_{\kappa 2}$, triángulo abierto), Len ($V_{\kappa 4}$, diamante abierto), MM ($V_{\kappa 1}$, círculo abierto). En b) Fibrilogénesis de $V_{\lambda 6}$ s: 6aJL2 (cuadrado negro), 6aJL2-R25G (círculo abierto), Wil (triángulo abierto), Jto (triángulo invertido negro). ΔG_{unf} más bajos en a) parecen estar relacionados con una formación de fibras amyloides rápida in vitro, en b). Tomadas de [33].

1.4 | Estructura de anticuerpos IgG y sus cadenas variables ligeras.

Las V_L s se encuentran naturalmente formando **estructuras cuaternarias** o complejos/ensambles en **anticuerpos** (glicoproteínas), comúnmente llamados inmunoglobulinas [53]. Dentro de la gama de anticuerpos presente en humanos (IgA, IgG, IgD, IgE, e IgM), los homo-oligómeros de tipo IgG son los más abundantes en sangre y se caracterizan por tener una forma de “Y”. Estos están formados por cuatro cadenas: dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas, conectadas a las cadenas pesadas a través de puentes disulfuro (hetero-tetrámeros, Fig: 1.7a). Las **cadenas pesadas** (α , δ , ϵ , γ y μ) de-

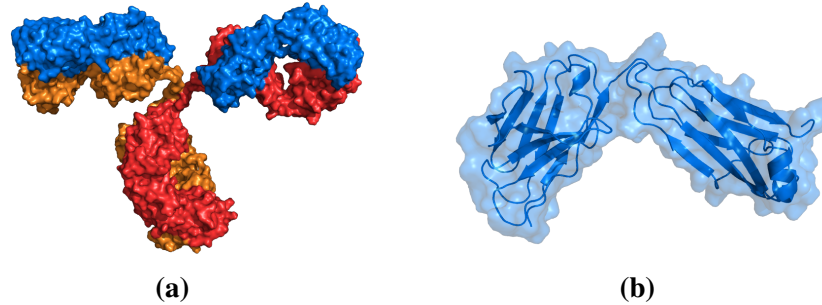


Figura 1.7: Anticuerpos IgG y sus cadenas ligeras. En a) vista superficial de un monómero de un anticuerpo tipo IgG, las cadenas pesadas se muestran en rojo y naranja y las cadenas ligeras en azul (PDB: [1IGT](#)). En b) una cadena ligera completa, dominios constante y variable de izquierda a derecha; la transparencia de la superficie permite observar la estructura de la cadena principal en representación de listón. Figura generada con [PyMOL](#).

finen al tipo de anticuerpo; por ejemplo, los anticuerpos IgG contienen cadenas pesadas del tipo γ . Estas cadenas están formadas a su vez por dos regiones: constante (C_H) y variable (V_H) y poseen funciones efectoras de la respuesta inmune. Las **cadenas ligeras** están formadas también por las regiones constante (C_L) y variable (V_L) (Fig: [1.7b](#)). Todos los dominios son estructuralmente similares, i.e, son todos de tipo Ig; los dominios constantes pertenecen al subtipo “C-set” y los dominios variables al subtipo “V-set” [[54](#)].

La **estructura o topología** de los dominios que conforman a las cadenas ligeras es una de las mejor estudiadas y está representada en muchas proteínas, principalmente en proteínas de la ruta secretora [[54](#)]. A todas las proteínas con dicha topología se les agrupa dentro de la **super-familia estructural *Ig-like*** o tipo **inmunoglobulina**. Las familias dentro de esta superfamilia se distinguen entre sí principalmente por criterios de identidad de secuencia, i.e., de relación evolutiva; ejemplos de estas familias son: inmunoglobulina, fibronectina III y cadherina. Todas ellas comparten los siguientes rasgos: dos hojas β antiparalelas empaquetadas una contra la otra, compuestas por “motivos” tipo llave griega

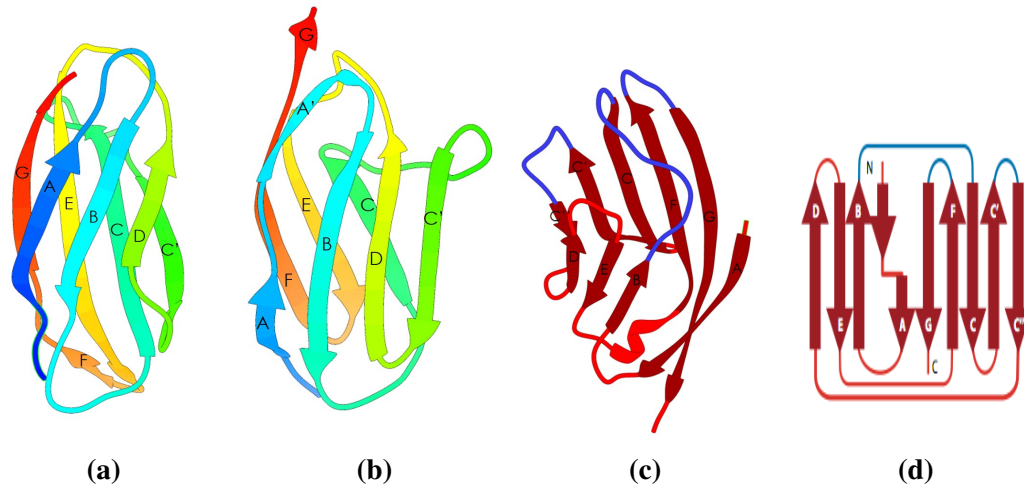


Figura 1.8: Estructuras de la superfamilia Ig-like. En a) representación de listón de la estructura de Tnfn3 (PDB: [1TEN](#)), miembro de la superfamilia Fibronectina tipo III. En b) representación de listón de la titina humana (PDB: [1TIT](#)), miembro de la superfamilia Intermedia (I-set). Se usa la coloración de arcoiris para ayudar a distinguir las hebras, N-terminal (azul) y C-terminal (rojo). En c) representación de listón de la estructura de Cd2d1 (PDB: [1HNG](#)), miembro de la superfamilia Variable V-set. En d) representación en 2D de la topología de canónica de una V_L , tomada de [79]. c) y d) asas de estabilidad en azul. a, b, y c fueron generadas con [ChimeraX](#) y basadas en [106].

y con asas (*loops*) que conectan a las dos hojas; difieren en el número y posición de las hebras periféricas. Las hebras son nombradas con letras (A-G) sin tener una secuencia obligatoria en las hojas, *i.e.*, la cadena principal puede cambiar entre hoja y hoja (causado por los motivos tipo llave griega) provocando una disrupción de la secuencia de letras que nombran a las hebras. Se han reconocido como componentes estructurales de un núcleo a las hebras B, C, E, F y G (al menos para las tres familias mencionadas en este párrafo) [1, 79, 106] (Fig: 1.8).

1.4.1 | Variabilidad y mutaciones en cadenas ligeras.

La literatura disponible sobre los efectos de mutaciones sólo en cadenas ligeras es inabarcable a día de hoy. Muchos estudios registran los **efectos de mutaciones** en distintas regiones de las proteínas sobre parámetros termodinámicos intrínsecos como la estabilidad termodinámica. Se debe resaltar *a priori* que a diferencia de muchos otros tipos de proteínas, **las cadenas ligeras son sintetizadas en aras de la variabilidad**, *i.e.*, para poder hacer frente a la inmensa cantidad de antígenos posibles que un organismo puede encontrar, los anticuerpos deben ser capaces de reconocer las diferentes estructuras de dichos antígenos y para ello se dota de **variabilidad estructural intrínseca a las cadenas ligeras desde su síntesis**.

El **sistema de hipermutación somática** es el responsable de generar dicha variabilidad. Éste se encarga de barajar/permutar los distintos genes que componen a las cadenas ligeras (genes V y J) creando distintas combinaciones de ellos. Durante la recombinación de estos genes se producen (además) uniones imprecisas que generan inserciones (nucleótidos insertados al azar). Por último, se mutan regiones específicas (mutaciones somáticas) de dichas cadenas (como las regiones de complementaridad o CDRs) para producir la variabilidad final que puede otorgar la capacidad de reconocimiento/especificidad/afinidad hacia antígenos diferentes [18, 79]. Es notable que a pesar de que este sistema está encargado de introducir variabilidad, **el repertorio de anticuerpos es finito**. Como ejemplo, el mismo sistema debe asegurarse de no crear anticuerpos con auto-reactividad, característica frecuentemente relacionada a condiciones autoinmunes las cuales pueden ser letales para los individuos [18, 79].

Como consecuencia, el gran número de variaciones en la secuencia de las cadenas ligeras complica el entendimiento de las bases estructurales de la formación de fibras amiloides, a diferencia de otras proteínas en donde las mutaciones casi siempre involucran un fenotipo/efecto específico. Ejemplos de **estudios mutacionales** en diferentes V_L s se resumen a continuación; algunos de ellos con resultados inesperados resaltando el carácter único y la dificultad para relacionar mutaciones con efectos sencillos esperados en otros sistemas.

Chothia *et al.* describen la **relación entre secuencia y estructura de dominios tipo Ig**; analizaron un total de 5300 secuencias/estructuras de V_L s expresadas hasta el año 1998 y describieron la presencia de un **núcleo** formado por 76 residuos ($\approx 70\%$ de la cadena), con la misma conformación de la cadena principal en todas las estructuras. Los residuos se encuentran repartidos en las hebras A, A', B, C, C', D, E, F y G y las uniones interhebras, A'-B, C-C' y E-F. La presencia de este núcleo es evidencia de que no se produce una variabilidad infinita a pesar de la variabilidad deliberadamente creada en la síntesis de cadenas ligeras; aún más, es evidencia de que **se respetan elementos estructurales básicos**. Las regiones con mayor carga de variabilidad son las tres zonas hipervariables, *i.e.*, las uniones de las hebras B-C, C'-C'' y F-G (azules en Fig: 1.8d), y algunas asas de la cadena principal [1].

Los mismos autores también describen y **clasifican a los residuos de este núcleo común** en tres categorías, en función de su frecuencia/conservación. El primer grupo es el invariante (*invariant residues*, IR), cuya característica es que el mismo residuo se presenta en la misma posición en casi todas las secuencias analizadas, ejemplos son el triptófano en posición 35/35 y cisteína en la posición 88/92 (entre un total de nueve residuos). En

el segundo grupo, uno (o algunos) de varios aminoácidos parecidos aparecen en la misma posición (*similar residues*, SR), el ejemplo es la posición 21/20 donde V, L, I o M se encuentran en 99% de las secuencias; las cadenas laterales difieren en forma pero no en su carácter hidrofóbico y ocupan volúmenes similares (son 17 de estos residuos en total). En el tercer grupo las posiciones están ocupadas por residuos con una similitud química más amplia pero los sitios están limitados a ciertas clases de residuos (*residue class*, RC), éste grupo comprende 46 de los residuos del núcleo. La notación m/n denota la relación entre sitios equivalentes en los dominios ligeros y pesados: el número de Kabat del sitio V_L es m y el número de Kabat del sitio V_H es n .

De los procesos generadores de variabilidad mencionados al inicio de esta sección, las **mutaciones somáticas** son las más fáciles de reproducir en el laboratorio. Las mutaciones en cadenas ligeras han sido analizadas bajo distintos marcos teóricos siendo los más investigados aquellos sobre la correlación entre la estabilidad termodinámica y la fibrillogénesis (hipótesis termodinámica) [41, 79, 82, 97]; otros autores han explicado el fenómeno amiloidogénico desde la **solubilidad** de la proteína nativa [50] y algunos otros desde la premisa de la existencia de **fracciones/segmentos pro-amilidogénicos** [74].

Hurle *et al.* [97] analizaron mutantes de la **cadena ligera REI** (tipo κ), basados en la frecuencia de aparición de aminoácidos raros en secuencias de V_L s de tipos κ y λ ; reportaron que aquellos **reemplazos que disminuyen la barrera energética de desplegamiento pueden incrementar la población del estado no-nativo** requerido para la formación de fibras amiloides (hipótesis conformacional). Las seis mutaciones analizadas se localizan en regiones que no son hebras- β (asas E-F y C'-D), ninguna corresponde a las posiciones RI de Chothia *et al.* [1], y 5/6 mutaciones corresponden a posiciones SR ó RC. Estudios de di-

námicas moleculares sobre mutaciones de algunos de estos mismos residuos (y otros más) encontraron efectos sobre la **formación de dímeros y un cambio en el equilibrio entre los estados nativo y monómeros propensos a formar amiloides (*amyloid-like*)** [111].

En el caso de la β 2-microglobulina, una de las proteínas mejor estudiadas en todo aspecto, una mutación puntual en el giro D-E que se pensaba disruptiva en principio por la diferencia de tamaño y de propiedades químicas de los residuos involucrados (W60G, un residuo RC, reducción del tamaño de la cadena lateral), resultó en un sorprendente **incremento de la estabilidad termodinámica y una nula propensión a la agregación amiloide**, mientras que las mutantes W60C y D59P (reducen el tamaño de la cadena lateral y cambian la propiedad química general) resultaron en el fenotipo opuesto, *i.e.*, **menor estabilidad y alta propensión a formar fibras amiloides** (hipótesis termodinámica) [28].

La **alteración de interacciones iónicas** también ha sido probada en V_L s de la línea germinal λ_6 , a través de la perturbación de la interacción D29-R68 en Jto. La mutación D29A (giro B-C) resulta en una fibrilogénesis lenta, mientras que la mutación R68S (giro D-E, residuo RC) presenta una fibrilogénesis rápida. El análisis de los modelos cristalográficos de ambas proteínas no revela un cambio en la conformación de la cadena principal sino cambios en las cadenas laterales de varios aminoácidos, en particular en R68S, resultantes en una mayor exposición al solvente de superficie hidrofóbica, así como en modificaciones electrostáticas de la superficie. Esto implica que la eliminación de la interacción iónica no es la única responsable del efecto amiloidogénico, dado que fue eliminada en ambas mutantes, sino que el efecto se debe al reordenamiento de las cadenas laterales y sus interacciones. Como ejemplos, se describe que el grupo hidroxilo de la Ser68 en R68S no está involucrado en la red de puentes de hidrógeno con otras partes de la proteína y se describe

también la formación de un nuevo puente de hidrógeno entre el oxígeno del carboxilo de Asp29 y el átomo ND1 de Asn31 en la misma mutante [11].

1.5 | El plegamiento y ensamblaje de anticuerpos IgG.

La mayoría de los estudios de plegamiento realizados en dominios tipo Ig se han realizado en los dominios constantes de anticuerpos (C_H y C_L). Empleando aproximaciones mutacionales y cinéticas se ha revelado que los dominios Ig inician su plegamiento en un núcleo compuesto sólo por las hebras B, C, E y F (a diferencia de lo propuesto en [1]), alrededor del cual el plegamiento Ig se forma (Fig: 1.8) [54]. La existencia de dicho **núcleo** de plegamiento es una idea popular cuando se discute el plegamiento de estos dominios y se le atribuye un peso importante dentro de los mecanismos de plegamiento; sin embargo, otras características estructurales también determinan significativamente a tales mecanismos. A continuación se revisan las más importantes.

1.5.1 | El puente disulfuro en los dominios de anticuerpos.

La mayoría de los dominios de los anticuerpos poseen un **enlace disulfuro intramolecular característico**. Dicho enlace presenta una disposición perpendicular entre las dos hojas β de la proteína y juega un papel crucial en la estabilidad de cada dominio *in vitro* e *in vivo*. Tanto en dominios constantes como variables, el puente disulfuro conecta las hebras B y F (parte del núcleo), acelera el plegamiento e inhibe las reacciones de desplegamiento fuera de la vía (“off-pathway”, agregación). Se ha visto que la formación de este puente se da de manera co-traducciona (durante la síntesis misma de la cadena polipeptí-

dica), con la ayuda de disulfuro isomerasas *in vitro* e *in vivo*, ayudadas por una chaperona que extiende la ventana temporal para la catálisis de las disulfuro isomerasas. Dicha chaperona es Hsp70, una residente mayor del retículo endoplásmico (R. E.) involucrada en el ensamblaje y control de anticuerpos en las células [25, 54].

1.5.2 | El papel de las prolinas en el plegamiento de dominios inmunoglobulina.

Los dominios de anticuerpos son ricos en residuos prolina, comprendiendo usualmente entre 5-10% de la secuencia primaria. Dichas prolinas se localizan comúnmente en las asas o giros que conectan a las hebras- β [54]. En ausencia de limitantes estructurales, *e.g.* en el estado desnaturalizado, las prolinas pueden sufrir una reacción espontánea de isomerización $cis \rightleftharpoons trans$ (Fig: 1.11); esto es posible debido a la naturaleza planar del enlace peptídico y a que la conformación *trans* del enlace peptídico precedente a un residuo de prolina está solo ligeramente más favorecida que la conformación *cis* en términos energéticos, a diferencia del resto de enlaces peptídicos (enlaces no-prolina) donde el estado *trans* está fuertemente favorecido (la constante de equilibrio es mayor a 100). Debido a esto, distintos equilibrios de ambas subpoblaciones se pueden presentar dependiendo de las condiciones del medio; se ha estimado que alrededor del 7% de todos los enlaces-prolina (Xaa-Pro) en proteínas plegadas se encuentran en conformación *cis*, mientras que sólo el 0.03% de los enlaces no prolina se encuentran en dicha conformación [48].

Las **reacciones de isomerización de prolinas** a menudo complican el plegamiento y lo enlentecen, tomando entre segundos y minutos para completarse a temperatura am-

biente [43, 80]. Lo anterior se debe a que éstas reacciones involucran la rotación sobre un doble enlace parcial (el enlace peptídico) que requiere una energía de activación alta (≈ 80 kJ/mol ó 19.1 kcal/mol) que se traduce en constantes de velocidad lentas, típicamente en el rango entre 10-100 s a 25 °C [48]. A pesar de lo anterior, la isomerización de prolinas no bloquea el replegamiento de una proteína, *i.e.*, no es un requerimiento que sea el primer paso dentro del plegamiento; distintos isómeros pueden ser acomodados en intermediarios parcialmente plegados y el plegamiento puede continuar mientras algunas prolinas siguen en su estado no-nativo. En los últimos pasos de plegamiento si se requiere que las prolinas alcancen su estado nativo y por tanto a menudo éstas reacciones si están limitadas por isomerización de prolinas y se convierten en un paso limitante del plegamiento (acoplamiento) [48]. La extensión de una estructura parecida a la nativa que se adquiriera antes de la isomerización de prolinas depende tanto de la localización de los isómeros no-nativos de prolinas como de las condiciones de plegamiento. De manera general, los enlaces prolina incorrectos tanto en la superficie como en regiones muy flexibles de una proteína plegada no van a interferir demasiado con el plegamiento, y las condiciones que estabilicen fuertemente a la proteína plegada también estabilizarán a conformaciones parcialmente plegadas con isómeros incorrectos [48, 57].

La célula ha desarrollado una clase de enzimas para acelerar dichas reacciones, se les conoce como **peptidil-prolil isomerasas** (PPIasas). Un nombre alternativo a éstas enzimas es el de **ciclofilinas**, dado que originalmente eran conocidas por ser la proteína con mayor afinidad a la ciclosporina A (CsA, un inmunosupresor que inhibe su actividad) (Fig: 1.9a); la secuenciación de una prolil-isomerasa reveló que se trataba de la misma proteína [42]. Dada su unión a CsA, las ciclofilinas están involucradas directamente en procesos

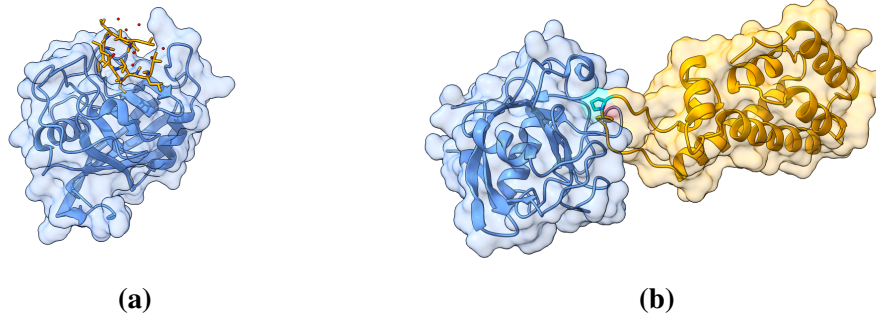
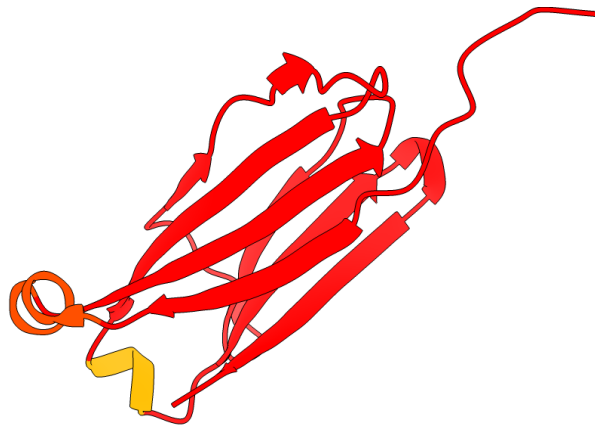


Figura 1.9: Estructuras de ciclofilina y peptidil-prolil isomerasa. En a) CypB (azul) en complejo con ciclosporina (naranja, PDB: 1CYN). En b) CypA en complejo con el dominio N-terminal de la proteína CA (cápside) del VIH; se resalta en cian un residuo prolina en el asa que está en contacto con la prolil-isomerasa (PDB: 1M9Y).

inmunológicos, específicamente algunos relacionados a la activación de células T. El prefijo “ciclo” es indicativo de que están relacionadas con el ciclo celular también, se les conoce participación en procesos como fosforilación, ensamble de cápsides virales (VIH, Fig: 1.9a), alosterismo y regulación de la traducción (“*molecular timers*”) [36, 48, 49]. Se han encontrado en prácticamente en todos los organismos y en sus distintos compartimentos [49]. Un ejemplo es la ciclofilina B (CypB), esta es una PPIasa localizada en el R. E. que juega un papel importante en la producción de anticuerpos y su inhibición conduce a una secreción disminuida de IgGs en humanos (Fig: 1.11) [54, 57]. Se sabe que la actividad de prolil-isomerasa de las ciclofilinas se lleva a cabo sobre porciones plegadas de los polipéptidos según estudios de su actividad sobre la RNAsa T1, para la cual se reportó que presenta extensas regiones plegadas en etapas tempranas de su plegamiento y que la actividad de prolil-isomerasa sobre ella ocurre después [49]. También se ha reportado que las catálisis de la isomerización de prolinas puede darse en ambos sentidos de la reacción y que la eficiencia de la catálisis depende fuertemente de la accesibilidad del residuo de prolina [44, 45].

1.5.3 | Formación de hélices pequeñas en dominios inmunoglobulina.

La mayoría de los dominios constantes poseen dos hélices que conectan a las hebras A-B y E-F (Fig: 1.10). Dichas hélices están conservadas evolutivamente, se forman en los primeros pasos del plegamiento de los dominios C_L y también ayudan a reducir la tendencia al mal-plegamiento (Fig: 1.11). La segunda hélice generalmente contiene un residuo aromático hidrofóbico que participa en el núcleo hidrofóbico del dominio. Otros miembros de la superfamilia Ig, como la $\beta 2$ -microglobulina, también presentan hélices alfa [54, 55]. 6aJL2 es un dominio variable ligero que presenta una hélice entre las hebras B-C (Fig: 1.17).



(a)

Figura 1.10: Dominios constantes y hélices alfa. Dominio constante C1 del receptor inmunoglobulina de tiburón (immunoglobulin new antigen receptor, IgNAR). IgNAR es un anticuerpo basado en un sistema homodimérico formado sólo por cadenas pesadas. En naranja la hélice alfa presente entre las hebras A y B, en amarillo al hélice alfa presente entre las hebras E y F [55].

1.5.4 | Ensamblaje de anticuerpos.

Los anticuerpos son producidos en el R. E. y deben pasar por un proceso de control de calidad antes de ser secretados al medio extracelular a través de vesículas provenientes del aparato de Golgi. Sólo los anticuerpos debidamente plegados y completamente ensamblados son enviados al medio, mientras que las proteínas parcialmente plegadas o ensambladas son devueltas al citosol para ser degradadas por el proteasoma. En el caso de las IgGs, un punto de control principal del ensamblaje es ejercido sobre el primer dominio γ constante (C_H1), éste permanece desplegado y unido establemente a un complejo de chaperonas del R. E. y las chaperonas son desplazadas sólo hasta que se presentan las cadenas ligeras. La unión con las cadenas ligeras da lugar a un fenómeno conocido como plegamiento inducido por ensamblaje del dominio C_H1 . La reacción descrita está limitada por otra reacción, una isomerización de prolinas catalizada por la CypB, y se vuelve irreversible por la formación de enlaces disulfuro intercatenarios (Fig: 1.11) [54, 58].

1.6 | Mecanismos de plegamiento en V_L s.

Desde inicios de la década de los 1970's se han reportado estudios de **plegamiento al equilibrio de cadenas ligeras** de tipos λ y κ (también llamadas proteínas de Bence-Jones [78]); en ellos se describió la presencia de transiciones en dos etapas que implican una independencia estructural de los dominios durante el proceso y también se destacó el carácter de mayor estabilidad del dominio variable (V_L) comparado con el dominio constante (C_L) [101]. Posteriormente, en **estudios cinéticos con cadenas ligeras** de tipo λ , y con los dominios por separado, se reportó que el dominio V_L se pliega antes que el

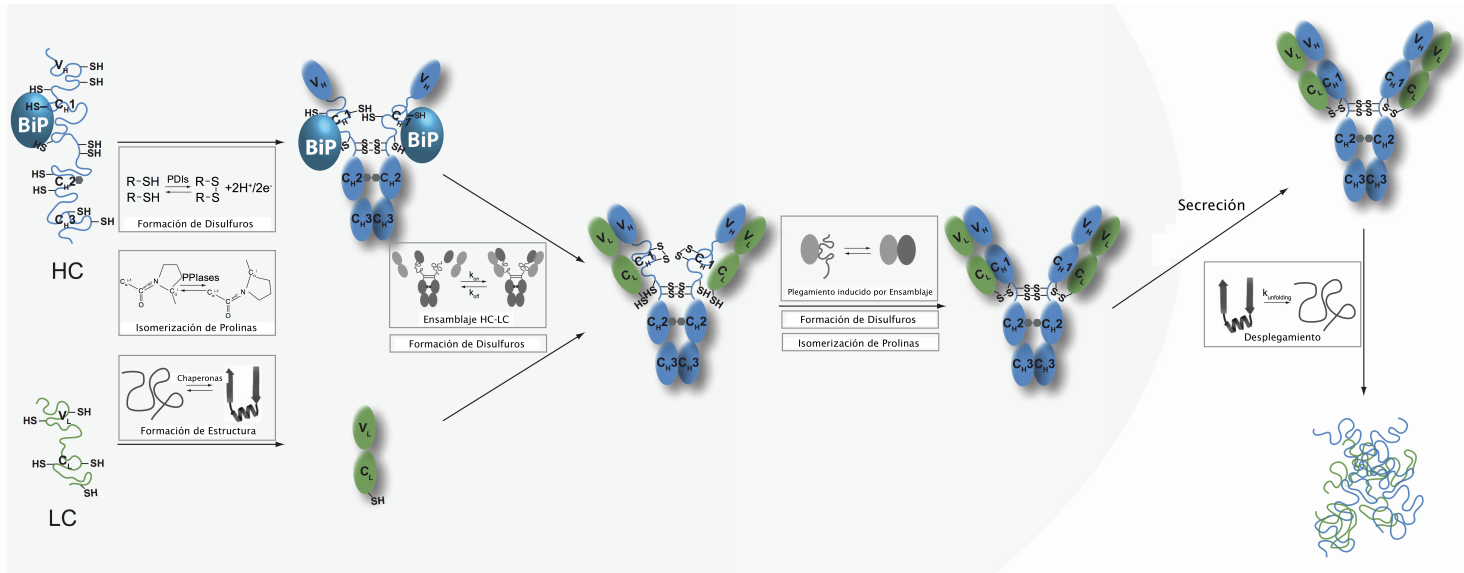


Figura 1.11: Eventos moleculares críticos durante el ensamblaje, plegamiento y secreción de anticuerpos. Los eventos moleculares críticos se resaltan en cajas para cada paso. HC: “heavy chain”, cadena pesada; LC: “light chain”, cadena ligera; BiP: “heavy chain binding protein”, una chaperona del R. E.; PDIs: disulfuro isomerasas; PPIases: peptidil-prolil isomerasas. Tomada y adaptada de [54].

dominio C_L (a pesar de ser topológicamente muy similares) y que una suma simple de las características de los dominios aislados no corresponde con lo observado para la cadena completa, implicando con ello la interacción entre los dominios durante el plegamiento [68]. Resultados similares se han reportado para otra cadena ligera (Oku, tipo κ), para la cual el plegamiento del dominio C_L fue descrito cinéticamente por la presencia de tres especies químicas diferentes mientras que el dominio V_L presentó dos conformaciones distintas en el estado desnaturalizado (Fig: 1.12). Los datos de desplegamiento de la cadena Oku son bien descritos por las contribuciones de los dominios por separado, a diferencia del replegamiento que no mostró esa propiedad [69].

También se han hecho esfuerzos por **caracterizar el plegamiento de otras proteínas tipo inmunoglobulina** con miras a encontrar las similitudes mecánicas dentro de la superfamilia. La presencia de **intermediarios cinéticos** fue detectada para proteínas de tipo variable (CD2d1), intermedio (TI I27) y fibronectina tipo III (TNfn3, FNfn10) dada la desviación de los datos cinéticos experimentales comparados con un modelo teórico de dos estados (Fig: 1.13) [106]. Los mismos autores reportan una correlación entre la constante de velocidad aparente del plegamiento de éstas proteínas (a pesar de las desviaciones) y su estabilidad termodinámica (no así para la constante de velocidad aparente del desplegamiento), y en consecuencia con la energía libre de activación del estado de transición, *i.e.*, las interacciones que estabilizan al estado nativo también estabilizan al estado de transición de la reacción. Con base en este razonamiento, concluyen que hay similitudes entre los mecanismos de plegamiento y por tanto puede haber un comportamiento general para la superfamilia. En un trabajo posterior, el mismo grupo propone que el núcleo de plegamiento de TNfn3 (y en consecuencia de proteínas similares) se encuentra en las hebras B,

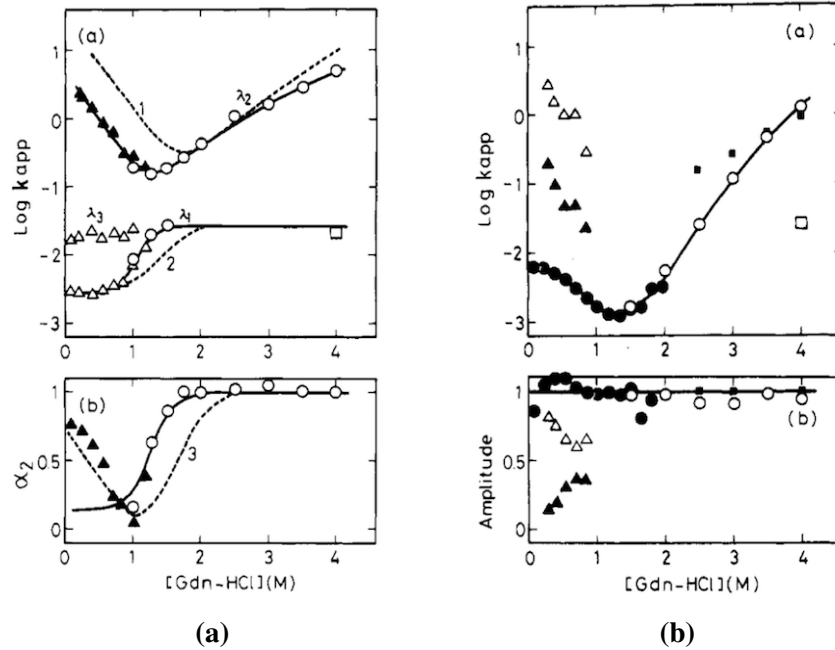


Figura 1.12: Cinética de plegamiento de dominios C_L y V_L . a) Gráfico de chevron (arriba) y amplitudes relativas (abajo) del dominio C_L de la proteína Oku: \circ constantes aparentes desplegamiento (fluorescencia, flujo detenido); \blacktriangle constantes aparentes de replegamiento (fluorescencia, flujo detenido); \triangle constantes aparentes de replegamiento (fluorescencia, mezclado manual); \square constante aparente del proceso de un proceso de isomerización después del desplegamiento (dobles saltos). b) Gráfico de chevron (arriba) y amplitudes relativas (abajo) del dominio V_L de las proteínas Oku (\circ) y Tod (\triangle y \blacksquare): \circ constantes aparentes de desplegamiento (fluorescencia, flujo detenido y mezclado manual); \bullet constantes aparentes replegamiento (fluorescencia, mezclado manual); \blacksquare constantes aparentes de desplegamiento (fluorescencia, flujo detenido); \triangle \blacktriangle constantes aparentes de replegamiento (fluorescencia, flujo detenido); \square constante aparente obtenida por doble salto. Todos los dominios presentan perfiles complejos, ya sea por la presencia de múltiples fases (λ s) o desviaciones de la linealidad. Tomadas de [69].

C, E y F [56, 112].

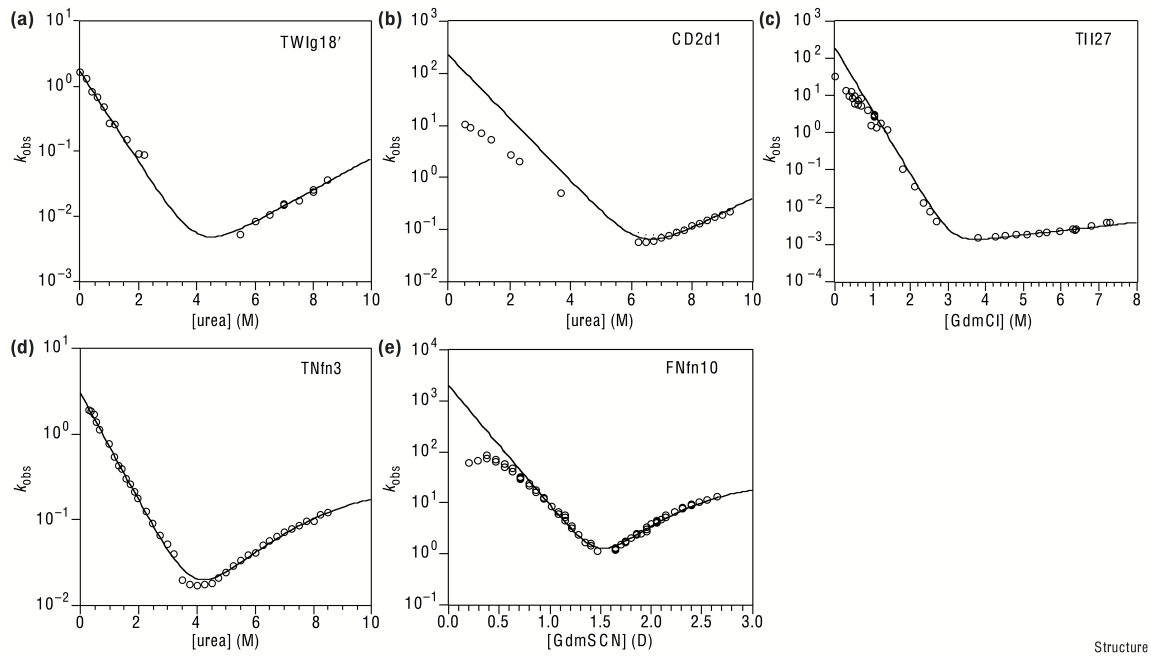


Figura 1.13: Gráficos de chevron en la superfamilia “Ig-like”. Las líneas sólidas muestran el comportamiento esperado para un proceso cinético de dos estados. Las desviaciones de la linealidad implican la presencia de intermediarios cinéticos. Tomada de [106].

Estudios más recientes comparten nociones con los trabajos descritos arriba, teniendo como base implícita la hipótesis conformacional, puesto que el objetivo en el contexto de las amiloidosis es el de encontrar a la especie precursora de las fibras amiloides (posibles estados no nativos). Khurana *et al.* [4] estudiaron un par de V_L s tipo κ (SMA y LEN) bajo diferentes condiciones al equilibrio, encontrando que condiciones medianamente desnaturalizantes (pH bajo y concentraciones bajas de urea) favorecen la presencia de dos estados intermediarios parcialmente plegados (I_N e I_U). El estado I_N mantiene características estructurales similares a las del estado nativo mientras que el estado I_U presenta un grado de desnaturalización mayor (Fig: 1.14). Los autores encuentran una relación entre el estado

I_N y la formación de agregados amorfos, y del estado I_U con la formación de agregados amiloides. En ese mismo trabajo se hace referencia también a la hipótesis termodinámica, dada la correlación entre la baja estabilidad termodinámica de las cadenas y la presencia de intermediarios parcialmente plegados que a su vez correlacionan con la agregación; proponen a la desestabilización diferencial del estado nativo respecto a los intermediarios como pieza clave del fenómeno amiloidogénico [5].

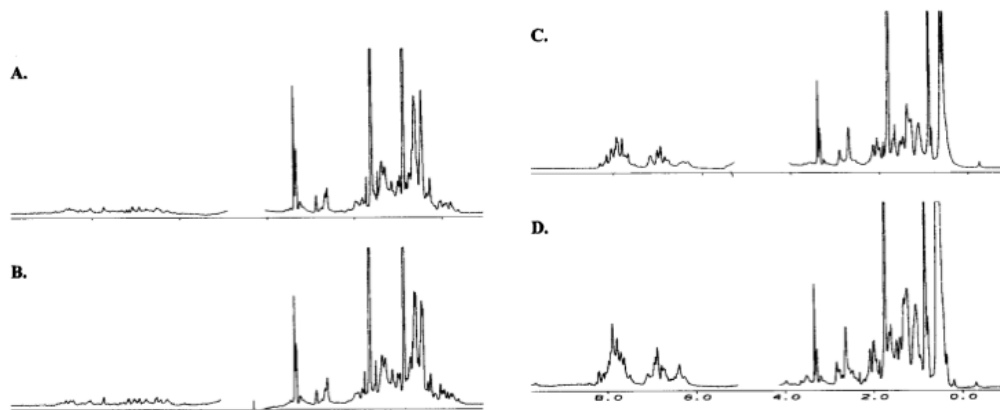


Figura 1.14: 1H NMR SMA. Panel a) pH 7.0; panel b) pH 5.0; panel c) pH 2.0 y panel d) pH 2.0 urea 8.0 M. Cualitativamente, en panel a) en la región de las amidas (izquierda) los picos presentan baja intensidad y alta dispersión, característicos de la presencia de estructura secundaria. En el panel b) la región de los CHs, se observan cambios discretos respecto al panel a, esto indica que se trata de una estructura plegada (I_N). En el panel c) la pérdida de estructura secundaria provoca una homogenización del ambiente químico. En la región de las amidas incrementa la señal de algunos picos y se reduce su dispersión debido a la suma de intensidades de señales con desplazamiento químico similar. En la región de los CHs los picos también se sobrelapan y aumenta la señal debido a la exposición de los grupos C-H al solvente; se conserva estructura secundaria residual. En el panel d) el sobrelapamiento es aún mayor debido al efecto combinado de la urea y el pH. Este es el espectro de la proteína completamente desnaturalizada. Tomada de [4]

Jahn *et al.* [105] presentaron uno de los estudios más sólidos respecto a plegamiento y amiloidosis, usando como modelo a la $\beta 2$ -microglobulina. Los autores reportaron que

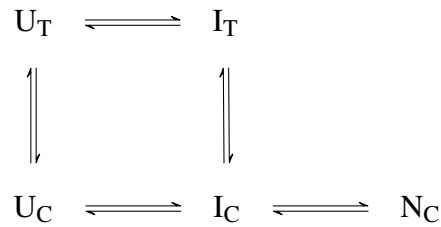


Figura 1.15: Mecanismo de plegamiento de la β -2 microglobulina. La isomerización de la prolina P32 causa la presencia de un canal paralelo ($U_C \leftrightarrow I_C$) al canal principal ($U_T \leftrightarrow I_T$); el subíndice C identifica a las especies con la prolina en configuración cis, el subíndice T identifica a las especies con la prolina en configuración trans. El ciclo cuadrangular es posible dada la interconversión entre los estados desnaturalizados e intermedios. El ciclo está conectado a una conformación nativa con la prolina en configuración cis; pH 7 y 37 °C. Tomado de [105].

la desnaturalización por agentes químicos es simple (como las de proteínas de dos estados) pero la renaturalización es compleja y está caracterizada por la presencia de procesos lentos asociados a isomerización de prolinas y acoplados con reordenamientos conformacionales (acoplamiento cinético). El modelo de plegamiento más simple capaz de explicar dichas observaciones incluye cinco estados (Fig: 1.15), con la presencia de canales paralelos, y a través del cual se estableció que un estado intermediario lento está poblado en condiciones fisiológicas; de esta observación surgió la hipótesis de que dicho estado podría ser el precursor amiloide. Dicha hipótesis se comprobó al eliminar el componente lento de la renaturalización vía mutagénesis dirigida (P32G), la modificación provocó un incremento en la fibrilogénesis y una disminución de la complejidad del mecanismo de plegamiento resultando en un mecanismo de tres estados con un intermediario bastante más poblado que en la proteína silvestre. El aumento en la población del intermediario fue correlacionado con el aumento de fibrilogénesis de esta proteína.

Específicamente en V_L s, Buchner y colaboradores [60] estudiaron un dominio variable tipo κ de ratón llamado MAK33 (subtipo IgG1), describiendo también alta complejidad

en el mecanismo de plegamiento el cual involucra a cuatro especies químicas diferentes en total y dos intermediarios (cinéticos) en distintos canales. Se encontraron también procesos lentos asociados a isomerización de prolinas como en el caso de la $\beta 2$ -microglobulina. Con base en un modelo cinético en donde el estado nativo tiene acceso a los dos diferentes intermediarios (Fig: 1.16), se propone que alguno de éstos puede ser a su vez el punto de entrada al fenómeno amiloidogénico (hipótesis conformacional). En el mismo estudio se detallan también algunas diferencias mecanísticas con otras V_L s. Si bien, en dicho estudio no fue posible desacoplar la reacción de isomerización de la reacción del canal principal de plegamiento, lo cual repercute en la estimación de las constantes de velocidad microscópicas así como de los valores asociados al cambio de área accesible al solvente (valores m) de cada reacción. El efecto de dicha problemática se ve reflejado en la determinación de los parámetros de cada reacción, los cuales presentan magnitudes o errores altos. Interesantemente, MAK33 no es una proteína particularmente fibrilogénica, requiere de condiciones de pH bajo para disparar el fenómeno de amiloidogénesis. Los autores proponen al intermediario I_C como la posible entrada al fenómeno amiloidogénico dado que ésta especie presenta estructuración secundaria pero no terciaria, *i.e.*, un intermediario no nativo.

1.7 | 6aJL2, una proteína modelo.

6aJL2 es una V_L modelo de 111 aminoácidos (12KDa) cuyo gen V está basado en la familia génica $\lambda 6$ y fue unido al segmento JL2 (uno de los más representados en el repertorio de anticuerpos). Como producto de la unión génica, la proteína resultante contiene

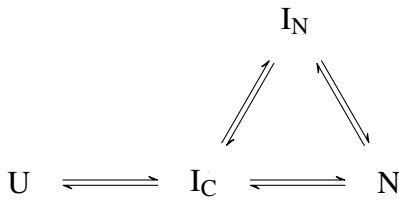


Figura 1.16: Mecanismo de plegamiento de MAK33. Un ciclo triangular formado por una conformación nativa N y dos intermediarias I_N e I_C ; el subíndice N indica que es una conformación intermedia similar a la nativa, el subíndice C indica la existencia de una prolina (P8) en configuración *cis*. La especie intermedia con la prolina en configuración (*cis*) se interconvierte con la(s) conformación(es) desnaturalizada(s). pH 7.4 y 25°C. Tomado de [60].

una histidina extra en la posición 95a (numeración de Kabat [39]; Fig: 1.17a) [33]. Esta proteína se diseñó pensando que el potencial amiloidogénico de esta línea germinal se vería reflejado en una estabilidad termodinámica baja (inestable) y en consecuencia sería un buen modelo para estudiar el origen estructural de la amilidogénesis (hipótesis termodinámica); sorprendentemente, 6aJL2 resultó ser más estable que otras proteínas de la misma línea germinal (Wil y Jto). A pesar de ser una de las cadenas ligeras más estables en la literatura, 6aJL2 es amiloidogénica, pero es más lenta que sus contrapartes $\lambda 6$ [11, 33]. Interesantemente, una mutación alotípica (R25G) reportada para el 25 % de los casos de esta línea génica reduce la estabilidad termodinámica e incrementa su capacidad para formar fibras amiloides de manera que resulta comparable a otros miembros de la línea germinal muy amiloidogénicos (Wil). Esta mutación se localiza en el inicio del giro B-C (CDR1; un residuo RC) (Fig: 1.17d). Al parecer, esta mutación logra desestabilizar a la proteína, dada la remoción de la arginina que forma una interacción cation-pi con la fenilalanina-2, a través de la formación de una cavidad y el debilitamiento de la región 40-60 debido a la menor presencia de puentes de hidrógeno [7, 33].

Debido a observaciones como la anterior, en varios estudios se ha intentado encontrar

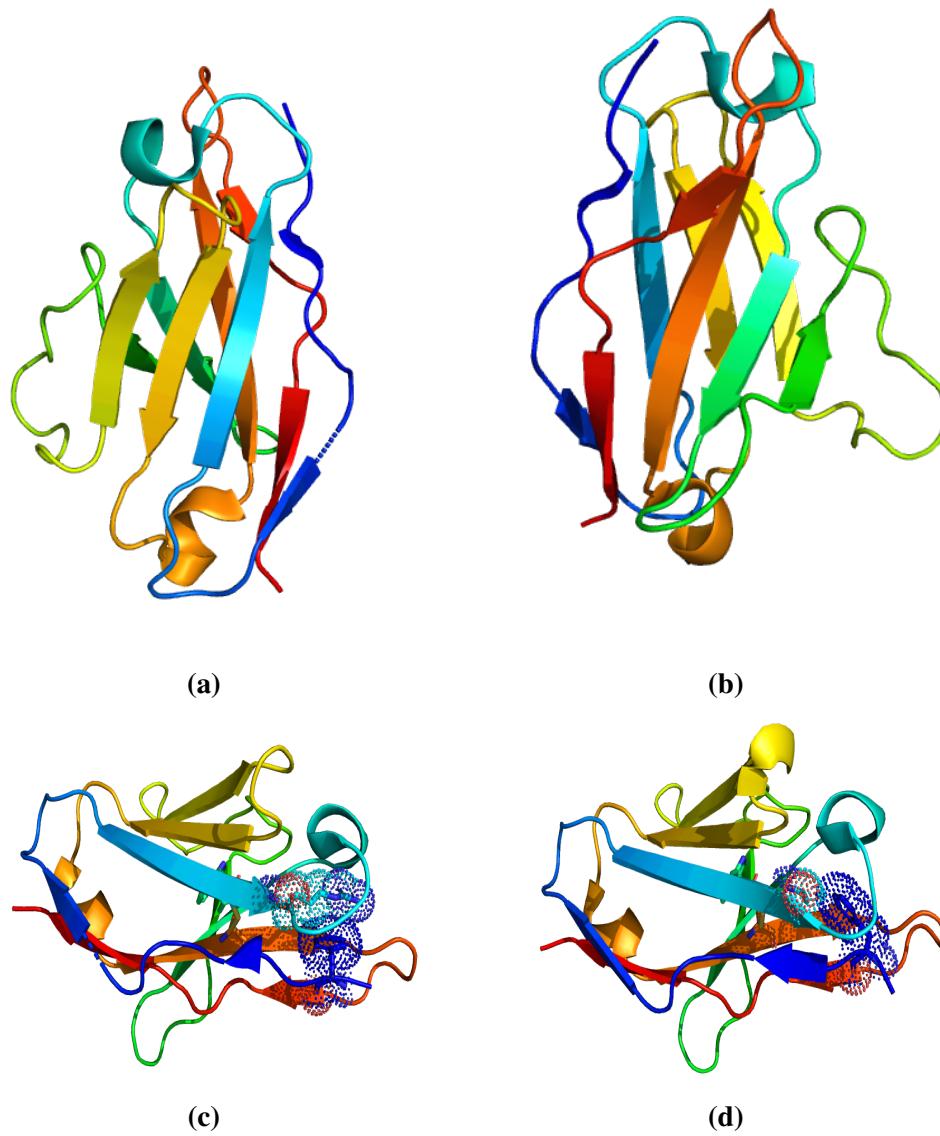


Figura 1.17: *6aJL2* y *R25G*. En a) *6aJL2* cara A (hebras A, A', B, D, E); en b) *6aJL2* cara B (hebras C, C', F, G); en c) se resalta la posición de R24/25 en relación a Phe2 y estos a su vez en relación al único puente disulfuro (C22-C91) y el único triptófano (W35; PDB: [2W0K](#)). En d) estructura de *6aJL2-R25G* (PDB: [5C9K](#)), se resalta el cambio de orientación de Phe2 después de la mutación. Se presentan las figuras en coloración de arcoiris (azul-verde-amarillo-naranja-rojo) para ayudar a descifrar la relación espacial de las hebras β entre las distintas orientaciones, N-terminal en azul y C-terminal en rojo. Figura generada con *PyMOL*.

las bases estructurales de la propensión a la amiloidosis de 6aJL2 empleando la **mutagénesis de distintos residuos**. En [31] se distinguen tres regiones de la proteína que han sido denominadas o clasificadas como motivos anti-agregación, éstas son las regiones amino y carboxilo terminales (β -*bulges*) y la región comprendida entre los residuos 40 a 60. Mutaciones en la región amino terminal en la zona inter A-A' (residuos Pro7, His8) muestran que Pro7 participa en la estabilización de la proteína ya que altera la red de puentes de hidrógeno de esta región que está conectada con el núcleo hidrofóbico y las hebras B y G. La interpretación de los parámetros termodinámicos apoya la hipótesis termodinámica. Sobre la misma región, en [34] se prueban diferentes mutaciones, principalmente probando sustituciones en Phe2, cuyo resultado general es que las mutaciones reducen la estabilidad termodinámica (en concordancia con [31]); sin embargo, no fue posible encontrar una correlación entre la fibrillogénesis y la estabilidad termodinámica de las distintas mutantes. En el mismo estudio se reporta también que F2P y H8P hacen menos fibras, y que en P7S se observa lo contrario. En resumen, la región del amino-terminal parece ser importante tanto para la estabilización de la estructura nativa como para la formación de fibras amiloides.

Complementando los resultados arriba descritos, en [87] la mutación P7S (PDB: 3B5G) es comparada con la variante R25G en estudios *in silico*. Se reportó que cada mutación afecta de manera diferente a la red de contactos pero convergen en afectar dos motivos anti-agregación, apoyando implícitamente a la hipótesis conformacional. P7S interactúa primero con la hebra B y al proceder el desplegamiento lo hace con la hebra G (parte de un motivo anti-agregación) interrumpiendo la red de contactos en el giro C-C' (motivo anti-agregación C'-C''). Los autores proponen a la hebra G como una región protectora

contra la formación de amiloides ya que las alteraciones en ella podrían provocar el desplazamiento del giro C'C''; estas regiones son las mismas que las descritas en el párrafo anterior [31].

En otro estudio se describe a otra V_L , proveniente de un paciente, estructuralmente idéntica a las λ_6 , con estabilidad termodinámica muy reducida en comparación a 6aJL2 y gran potencial amiloidogénico. La proteína AR es la menos estable encontrada de forma natural, presenta la mutación R25G y también otras 14 diferencias respecto a 6aJL2; según los autores, la mitad de la diferencia en estabilidad con 6aJL2 se debe sólo a la presencia de glicina en la posición 25. A pesar de esto, en [7] se revirtió dicha mutación y se encontró que no hay tal efecto sobre la estabilidad, por tanto la diferencia respecto a 6aJL2 no se debe a la pérdida de la interacción que forma ese residuo en la proteína silvestre. De las otras 14 mutaciones, sólo 3 (Phe20 en hebra B, Ala44 giro CC', Val108 hebra G) no caen en la región de los "giros de estabilidad"(N-terminal, BC, C'D, DE, FG), las otras 11 sí (D1, G24, G26, D31, S32, F33, D51, D69, A71, D95, D97 e H98). En general, se reportan pocas interacciones compartidas entre 6aJL2 y AR con base en el análisis de las estructuras cristalográficas e inclusive se reporta una mutación F21I (núcleo, hebra B) que estabiliza a AR [7]. La falta de correspondencia de las interacciones puede parecer lógica dada la menor similitud en secuencia entre ambas proteínas, pero esto a su vez resalta la plasticidad de la topología en general.

1.8 | Antecedentes.

La evidencia descrita en la sección anterior, generada por distintos grupos de investigación sobre diferentes modelos proteicos estructural y evolutivamente relacionados con cadenas ligeras, coincide en que los mecanismos de plegamiento de las cadenas ligeras no son sencillos (dos estados). Estudiando dichos modelos se ha caracterizado recurrentemente la presencia de estados intermediarios y/o estados no-nativos, y en algunos casos se ha demostrado su relación con el potencial amiloidogénico de cada proteína. 6aJL2 no es la excepción.

En [30] se reporta un bajo potencial fibrilogénico en tiempos cortos de incubación y 25°C, y un mayor potencial de fibrilación en 25 y 37°C y tiempos largos de incubación para 6aJL2. Estos resultados indican un efecto importante en la dinámica del proceso de fibrilación debido a estos factores. Sobre los estudios de plegamiento reportados en el mismo trabajo, se concluye a partir de datos espectroscópicos, hidrodinámicos y calorimétricos, que 6aJL2 sigue un patrón de desnaturalización de dos estados en tiempos cortos de incubación y condiciones estándares (25°C y 1 atm. de presión); los parámetros (ΔG_{H_2O} y m) obtenidos por técnicas al equilibrio y cinéticas resultaron congruentes (incluso con otros estudios confirmando las determinaciones sobre 6aJL2 [33]). Sin embargo, en tiempos largos de incubación y temperaturas mayores (37°C) los datos espectroscópicos e hidrodinámicos indican la presencia de un estado parcialmente desplegado en concentraciones de urea cercanas a la concentración media de desnaturalizante (C_m). La tasa de formación de fibras amiloides es mayor en ese mismo intervalo de concentraciones de urea (1.5-3 M urea) con un pico en 2.5M urea. Se concluye que la presencia de dicho estado no-nativo

es posiblemente el responsable de la mayor tasa de fibrilación, si bien no se distingue a un responsable principal entre la temperatura y el tiempo de incubación; en cualquier caso, un efecto de la teoría conformacional es invocada como causal de las observaciones.

Se debe hacer notar que dichas condiciones no son extremas ni sesgadas hacia un estado en donde se conozca que alguna proteína presente desviaciones notables de los comportamientos fisicoquímicos de las demás (mesófilas), *i.e.*, son condiciones estándares, empleadas comúnmente. En dichas condiciones se ha reportado la complejidad mecánica de otros modelos de estudio como en [60]. En 6aJL2, también se ha presentado al pH como fuerza capaz de provocar un cambio conformacional importante, que a su vez correlaciona con un mayor potencial fibrilogénico. Las condiciones de pH (2) son extremas, pero similares a las condiciones donde MAK33 alcanza un mayor potencial fibrilogénico [24].

2 | Justificación

La existencia y participación de más de dos especies conformacionales en los mecanismos de plegamiento ha abierto las puertas a escenarios/contextos teóricos capaces de describir con mayor precisión a las posibles especies precursoras del fenómeno amiloidogénico en varios modelos. Existen múltiples reportes de modelos estructurales similares a las cadenas ligeras, en los que se describe la presencia de más de dos estados conformacionales en condiciones estándar. Dichos estados han podido ser relacionados con el potencial fibrillogénico en algunos de estos modelos. Con el paso del tiempo, se ha generado evidencia experimental que indica que 6aJL2 presenta también una dinámica conformacional compleja; si bien, se ha sugerido que los estados no nativos en 6aJL2 sólo se presentan en condiciones extremas, ya sea de temperatura, pH o incubación (o alguna combinación de los anteriores).

Durante la realización de este trabajo se pretendió abordar de manera sistemática la investigación sobre los múltiples factores que parecen estar implicados en el origen del fenómeno amiloide de 6aJL2. En el desarrollo del mismo, surgió evidencia experimental que cuestionaba observaciones previas, principalmente las relacionadas al carácter de dos estados del mecanismo de plegamiento de 6aJL2 a 25°C y tiempos cortos de incubación.

En dichas condiciones la fibrillogénesis es moderada y el mecanismo de plegamiento previamente reportado es sencillo (dos estados); a diferencia de otras condiciones donde se ha encontrado evidencia de estados intermediarios y la fibrillogénesis es rápida. Por tanto, este trabajo se centra en el estudio del mecanismo de plegamiento de 6aJL2 en las condiciones en donde no se habían reportado la presencia de intermediarios que pudiesen dar origen al fenómeno fibrillogénico.

3 | Hipótesis

3.1 | Hipótesis general.

La hipótesis general de este trabajo es que 6aJL2 presenta una dinámica conformacional compleja tanto en condiciones estándar como en condiciones extremas. Dicha dinámica estaría determinada por la relación termodinámica y cinética entre las conformaciones participantes, *i.e.*, por la capacidad intrínseca de dichas conformaciones para interconvertirse, como se ha comprobado con otros modelos. Se cuestiona, por tanto, que los efectos aislados o combinados de la temperatura e incubación (o las condiciones extremas) sean el origen único del fenómeno de agregación amiloide en 6aJL2.

3.2 | Hipótesis particulares.

1. Existen más de dos conformaciones al equilibrio.
2. El mecanismo de plegamiento de 6aJL2 no es de dos estados.
3. Mutaciones sencillas a lo largo de la secuencia de 6aJL2 tienen efectos diferentes sobre el equilibrio y la cinética de la proteína. Dichos efectos no se observan inme-

diatamente en los parámetros termodinámicos de la reacción de plegamiento.

4 | Objetivos

4.1 | Objetivo general.

El objetivo de este trabajo es establecer un contexto cinética y termodinámicamente sólido para explicar la tendencia particular de 6aJL2 (y por asociación de esta línea germinal) hacia la formación de fibras amiloides a través de modificaciones de la proteína o de las condiciones del medio.

4.2 | Objetivos particulares.

1. Describir el mecanismo de plegamiento de 6aJL2 en condiciones estándares.
2. Establecer la relación entre el plegamiento y la fibrilogénesis en 6aJL2.
3. Explorar el efecto de distintas mutaciones, pertenecientes al núcleo hidrofóbico, en el plegamiento y fibrilogénesis de 6aJL2.
4. Explorar el efecto de distintas condiciones del medio sobre el plegamiento y fibrilogénesis de 6aJL2.

5 | Materiales y Métodos

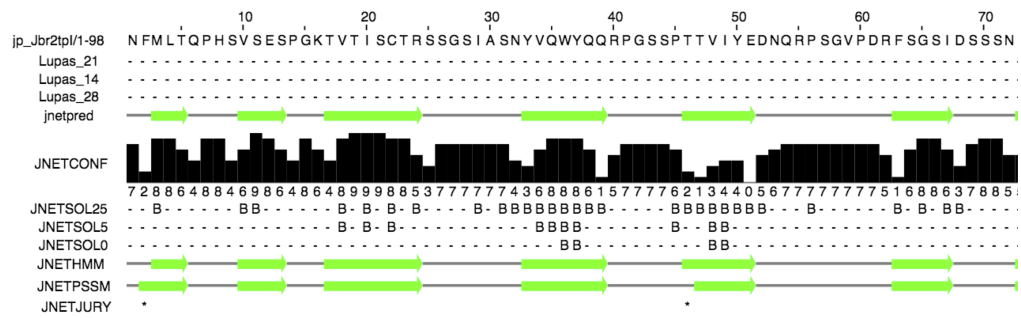
5.1 | Gen, vector de expresión, sobre-expresión y purificación de 6aJL2.

5.1.1 | 6aJL2.

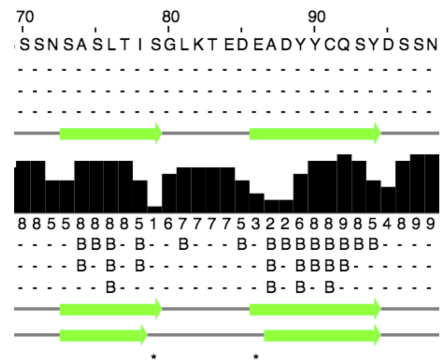
El gen de 6aJL2 fue diseñado de acuerdo a las especificaciones descritas en [33]. El segmento génico $V\lambda$ 6a (residuos 1-95), también llamado V1-22 (PDB: [2W0K](#), UniProtKB: [Q5NV88](#)), está unido al segmento *JL2* (residuos 96-111) con una inserción de un residuo de His (H95a en numeración de Kabat [39]; H99 en numeración secuencial). La secuencia aminoacídica producto de la traducción del gen se presenta a continuación junto con una predicción de estructura secundaria hecha en [Jpred](#) (Fig: [5.1](#)).

5.1.1.1 Vector de expresión.

El vector de expresión *pET27-6aJL2* empleado en este trabajo fue clonado y donado por la Dra. Miryam I. Villalba Velázquez (IBt UNAM). Se resaltan las siguientes caracte-



(a)



(b)

Figura 5.1: Secuencia y predicción de estructura secundaria del segmento 6a. En a) predicción de estructura secundaria generada con Jpred 4 (Jnet version: 2.3.1), residuos 1-70. En b) predicción de estructura secundaria para los residuos 70-98. Las flechas verdes indican hebras- β .

rísticas por su utilidad en el protocolo de expresión descrito adelante: promotor y operador T7 (*T7 promoter*, *T7 terminator*), gen de resistencia a kanamicina (*KanR*), secuencia de exportación a periplasma (*pelB signal sequence*), gen de 6aJL2 con los segmentos 6a y JL2 (Fig: 5.2).

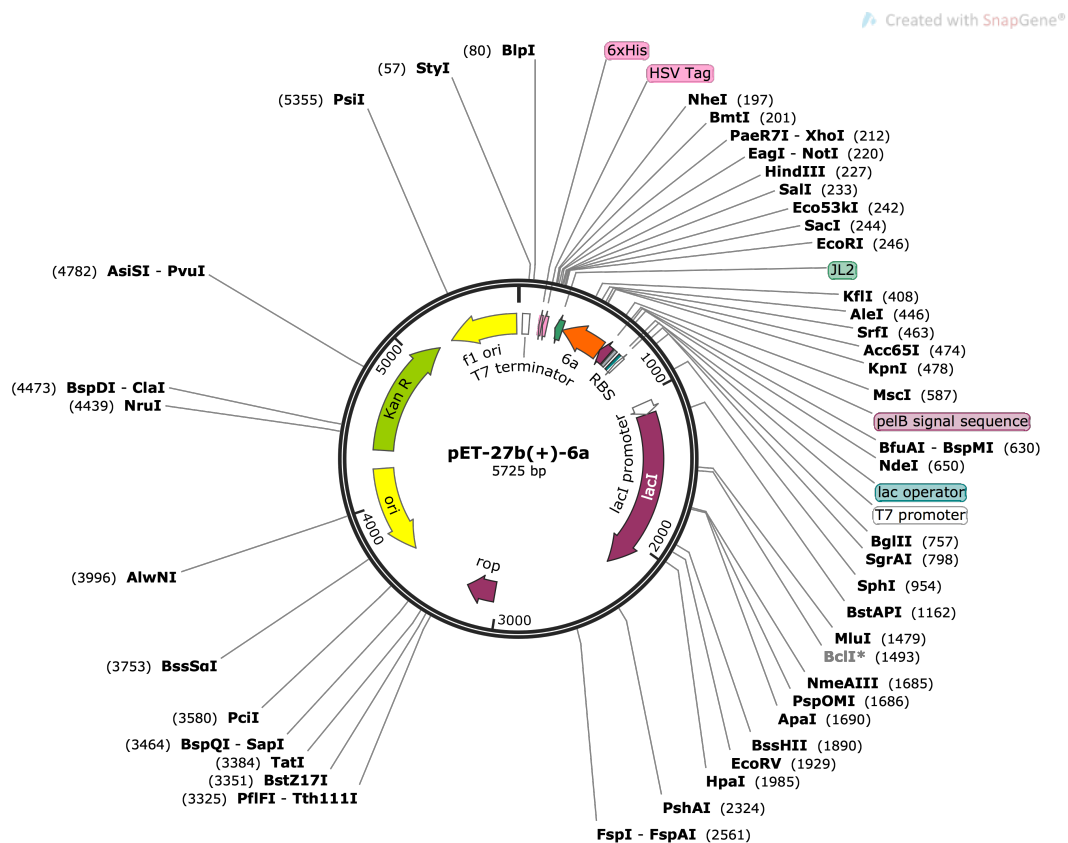


Figura 5.2: Vector de expresión pET27b(+)-6aJL2. Figura generada con *SnapGene*.

5.1.1.2 Expresión heteróloga (sobre-expresión).

Células competentes de la cepa *E. coli*-BL21(DE3) se transformaron con el vector *pET27-6aJL2* y se recuperaron en 1 mL de medio SOC por una hora a 37°C y agitación a 250 r.p.m. Posteriormente, se creció un cultivo de 10 mL de medio LB en presencia de 1 µL de sulfato kanamicina 1000X hasta la saturación. Estas células se emplearon como inóculo para un cultivo con un volumen de 1 L con medio 2X-YT. Después de la inoculación, se creció el cultivo de 1 L a 37°C y 250 r.p.m. en presencia de kanamicina 1000X (1

mL), hasta una densidad óptica (D. O.) entre 0.6 y 0.8 (600 nm). Se realizó la inducción agregando 1 mL de IPTG 1 mM y se incubó el medio toda la noche a 30°C y 200 r.p.m.

5.1.1.3 Purificación.

Después de la inducción, se centrifugó el volumen total del cultivo a 8000 r.p.m. y 4°C. La pastilla resultante fue sometida a un choque osmótico, resuspendiéndola gentilmente en 50 mL de una solución con sacarosa 20 % (p/v), Tris 0.1 M, EDTA 0.1 mM, pH 8 y se incubó por 20 min. en frío (4°C). La solución se centrifugó en las mismas condiciones que en el paso anterior y la pastilla resultante fue resuspendida gentilmente en 50 mL de agua desionizada fría, incubando por 20 min. en frío de nuevo. Después de la segunda incubación, la solución se centrifugó en las mismas condiciones que en los pasos anteriores y el sobrenadante fue recuperado (fracción periplásmica). La fracción periplásmica se concentró por ultrafiltración con un filtro de 10 kDa. de masa molecular (Amicon, Merck) hasta un volumen \approx 5 mL en frío. Posteriormente, el concentrado se inyectó en una columna de exclusión molecular preparativa Superdex-75 (Amersham Pharmacia/GE) previamente equilibrada con amortiguador Na₂PO₄ 50 mM, NaCl 100 mM, pH 8 y fue eluida a una velocidad de 1 mL/min en un sistema de purificación ÄKTA (GE). Las fracciones resultantes se evaluaron en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) para determinar la pureza y concentración de cada fracción cualitativamente; las fracciones útiles fueron reunidas y la concentración fue determinada usando un coeficiente de extinción molar $\epsilon = 1.2327 \text{ mg}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ mL}$ [30]. Posteriormente se liofilizó la proteína para su almacenamiento [30, 33].

5.1.2 | Peptidil-prolil cis-trans Isomerasa: Cyp18.

La secuencia aminoacídica de Cyp18 fue obtenida del PDB: [1CWL](#)) y reverso-transcrita con optimización de codones para *E. coli*. El gen fue sintetizado ([Epoch](#)) y subclonado en un vector de expresión *pET-22b*. La sobre-expresión y purificación se realizó de acuerdo a la metodología en [19] con modificaciones menores. La actividad (y por tanto la integridad estructural) de la Cyp18 purificada fue evaluada a través de un ensayo acoplado (ensayo rotamasa): 100 μM del péptido [N-succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilido \(Sigma-Aldrich\)](#) fue disuelto en 66% (v/v) dimetil sulfoxido (DMSO) en amortiguador Hepes 35 mM, pH 8. La mezcla se incubó a 10°C y se agregaron 10 μM de [quimotripsina](#) y Cyp18, en un intervalo entre 0 y 96 μM , con agitación manual para iniciar la reacción [19]. La absorbancia se midió a 390 nm cada segundo en un espectrofotómetro Perkin-Elmer A-2 UV. La estabilidad termodinámica se determinó tanto en el amortiguador de purificación como en el amortiguador experimental a través de una curva de desnaturalización en urea; el cambio de amortiguador se realizó a través de diálisis con una membrana con tamaño de poro menor a 10 kDa.

5.2 | Experimentos al equilibrio.

5.2.1 | Curvas de desnaturalización en urea.

La proteína liofilizada se resuspendió en agua y se incubó por al menos 5 min. antes de leer los espectros de emisión. Se preparó una serie de muestras en concentraciones correspondientes de urea (en un intervalo de 0 a 7 M) en amortiguador Na_2PO_4 50 mM, NaCl

100 mM, pH 8, a 25°C. Espectros de emisión de fluorescencia intrínseca del triptófano (IF) fueron registrados cada nanómetro, entre 310 y 410 nm, en un espectrofotómetro Horiba Fluorolog3; la excitación se realizó a 295 nm con rejillas de 5 mm en una celda de cuarzo con de paso de luz de 1 cm. La concentración de la proteína en cada muestra fue de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. En el caso del dicroísmo circular (DC), los espectros fueron registrados en un espectropolarímetro JASCO J-715; para los espectros en el UV-cercano se utilizó una celda de cuarzo 4 mL con una concentración de proteína de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en una ventana de 250 a 320 nm. Los espectros en el UV-lejano se registraron en una celda de cuarzo con 1 mm de paso de luz a una concentración de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en una ventana de 210 a 250 nm. Todos los reactivos empleados fueron grado biología molecular (Sigma-Aldrich) y la temperatura fue regulada con sistemas Peltier. Las concentraciones de urea fueron determinadas empleando su índice de refracción.

5.2.2 | Análisis de experimentos al equilibrio.

Para analizar la desnaturalización química de 6aJL2 al equilibrio se registraron datos con dos técnicas espectrofotométricas principalmente, IF y DC. Tanto la IF (debida a un triptófano único en la posición 35 en 6aJL2), como la absorción por DC en la región de los aromáticos (UV-cercano, 260-300 nm) son comúnmente empleados como monitores del cambio en estructura terciaria de una proteína [72, 75, 90], mientras que la absorción por DC en la región amida (UV-lejano) se emplea como monitor de los cambios en estructura secundaria [90].

Los datos de desnaturalización química tanto de IF como del DC en el UV-cercano fueron analizados a su vez en dos maneras distintas: a) siguiendo una longitud de onda

única de cada espectro, *e.g.*, $\lambda_{max} = 352$ nm para el caso de IF o $\lambda = 295$ nm en el caso del DC UV-cercano; y b) analizando los espectros completos. Los datos de DC en el UV-lejano (190-250 nm) fueron analizados sólo siguiendo una sola longitud de onda debido a que no se obtuvo una buena proporción señal/ruido en longitudes de onda bajas. La pobre relación señal/ruido en longitudes de onda bajas se debe principalmente a la contribución al DC del amortiguador, fenómeno conocido como transparencia reducida [9, 90].

5.2.2.1 Análisis de datos obtenidos a una sola longitud de onda.

Después de restar las señales de los blancos respectivos, los datos de IF en 352 nm y de DC en 272, 280 y 295 nm fueron ajustados individual y globalmente a un modelo de dos estados para obtener los parámetros termodinámicos de la reacción de desplegamiento al equilibrio:

$$y_{obs} = \frac{(y_N + m_N[D]) + (y_U + m_U[D])e^{-(\Delta G_{H_2O}^o + m/RT)}}{1 + e^{-(\Delta G_{H_2O}^o + m/RT)}} \quad (5.1)$$

donde y_{obs} es la señal observada, y_N es la señal de la fracción nativa (0 M urea), m_N es la pendiente de la línea pre-transición, $[D]$ es la concentración de desnaturalizante, y_U es la señal de la fracción desnaturalizada, m_U es la pendiente de la línea post-transición, $\Delta G_{H_2O}^o$ es el cambio en energía libre de Gibbs en condiciones estándar en 0 M de urea o energía libre de plegamiento o estabilidad conformacional, m es la pendiente de la transición, R es al constante universal de los gases y T es la temperatura [85].

También se empleó un modelo de tres estados para evaluar la hipótesis de la presencia

de un intermediario al equilibrio [67] :

$$y_{obs} = \frac{Y_U + y_I e^{-(\Delta G_{UI}/RT)} + Y_N e^{-(\Delta G_{UI} + \Delta G_{IN})/RT}}{1 + e^{-(\Delta G_{UI}/RT)} + e^{-(\Delta G_{UI} + \Delta G_{IN})/RT}} \quad (5.2)$$

donde Y_U , Y_I y Y_N son expresiones lineales sobre la concentración de desnaturalizante del tipo $Y_x = y_x^{H_2O} + m_x[D]$ y y_x es la fracción de la especie en cuestión, m_x es la pendiente respectiva de la dependencia lineal con el desnaturalizante atribuida a la señal espectroscópica [59].

5.2.2.2 Análisis de datos empleando múltiples longitudes de onda.

Los espectros completos de IF fueron integrados después de restar las señales de los blancos y su resultante fue ajustada al modelo de dos estados (Ec. 5.1). Por otro lado, los espectros completos tanto de IF como de DC se analizaron a través de una descomposición de valor singular (SVD):

$$A = U \cdot W \cdot V^T \quad (5.3)$$

donde los vectores base de U representan la dependencia de las amplitudes sobre la dependencia con la concentración inicial de urea, W contienen los pesos de cada vector base y V^T contiene los coeficientes que ajustan a los vectores base en UW a los datos originales. Los vectores significativos resultantes fueron ajustados al modelo de dos estados. Para estos análisis se empleó el software Savuka [96].

5.3 | Cinética de plegamiento.

Todos los experimentos siguiendo el cambio en la emisión de fluorescencia se realizaron en instrumentos de “stopped-flow” de la marca [Applied Photophysics \(SX18 MV y SX20\)](#). El tiempo muerto nominal reportado es de 1 ms. La excitación se realizó a 295 nm y la emisión se registró usando un filtro de luz con corte en 310 nm en una celda con paso de luz de 2 mm. Los datos cinéticos se ajustaron a modelos de sumas de n exponenciales:

$$P_t - P_\infty = \sum_{i=1}^n A_i \cdot e^{-\lambda_i t} \quad (5.4)$$

donde P_t es la intensidad observada al tiempo t , P_∞ es la intensidad en $t \rightarrow \infty$ y A_i son las amplitudes asociadas a las constantes de velocidad observables λ_i . Para este análisis se empleó el software Savuka [96].

5.3.1 | Cinéticas de desnaturalización y renaturalización.

Las cinéticas de desnaturalización y renaturalización simples se realizaron a través de diluciones (1:11). Para el replegamiento, las diluciones se realizaron desde 7 M de urea hasta diferentes concentraciones finales de urea, en un intervalo entre 7 y 0.73 M. La proteína se resuspendió en amortiguador para alcanzar las siguientes condiciones: Na_2PO_4 50 mM , NaCl 100 mM , pH 8 y urea 7 M. Las muestras se incubaron durante la noche previa a las mediciones. Para el desplegamiento, la proteína se resuspendió en agua para alcanzar las siguientes condiciones: Na_2PO_4 50 mM , NaCl 100 mM , pH 8; las diluciones se realizaron en el intervalo entre 0 y 7 M de urea. Los mediciones se realizaron a 25°C

con un sistema de control de temperatura Peltier. La concentración final de proteína en las muestras fue de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, excepto en los experimentos donde se evaluó el efecto de la concentración de 6aJL2 sobre las constantes observables.

5.3.2 | Cinéticas de desnaturalización desde distintas concentraciones iniciales de urea.

Las cinéticas de desnaturalización a partir de distintas concentraciones iniciales de urea se realizaron previo equilibramiento de al menos 5 min. en un intervalo desde 0 hasta 7 M de urea. Posteriormente se realizaron diluciones 1:11 hacia una concentración final de 7 M de urea. Los mediciones se realizaron a 25°C con un sistema de control de temperatura Peltier. La concentración final de proteína en las muestras fue de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$.

5.3.3 | Experimentos de dobles salto.

Las cinéticas de replegamiento por doble salto se realizaron bajo el siguiente esquema: en el primer salto la proteína se desplegó por una dilución 1:20 hasta una concentración final de 7 M de urea, en el segundo salto la proteína fue renaturalizada por una dilución 1:10 para alcanzar una concentración final de urea de 1.57 M. Los tiempos de retraso entre saltos fueron variados en un intervalo entre 0.6 hasta 50 s. Todas las diluciones fueron realizadas en amortiguador Na_2PO_4 50 mM, NaCl 100 mM, pH 8 a 25°C con un sistema de control de temperatura Peltier. La concentración final de la proteína fue de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$.

5.3.4 | Replegamiento en presencia de Cyp18.

Las cinéticas de replegamiento de 6aJL2 en presencia de Cyp18 se realizaron diluyendo 6aJL2 desnaturalizada en 7 M de urea contra amortiguador (Na_2PO_4 50 mM, NaCl 100 mM, pH 8) con diferentes concentraciones de Cyp18 en un intervalo entre 0 y 300 μM . La concentración final de 6aJL2 fue de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y la concentración final de urea fue de 0.73 M. Las cinéticas resultantes fueron ajustadas a modelos exponenciales.

Para todos los análisis se empleó el software Savuka y su rutina de ajuste por regresión no-lineal por mínimos cuadrados basada en el algoritmo de Marquardt-Levenberg [96]. Todas las cinéticas fueron seguidas por al menos 200 s.

6 | Resultados

“All models are wrong, but some are useful.” George Box.

6.0.1 | Análisis empleando sólo una longitud de onda.

6.0.1.1 Dicroísmo circular (DC).

La inspección visual de la serie espectral hace evidente que la proporción señal/ruido por debajo de los 210 nm no es la apropiada para un análisis detallado en esa región [7]; no obstante, las longitudes de onda por arriba de ese límite son susceptibles de analizar y permiten establecer el efecto del desnaturizante sobre la estructura secundaria de 6aJL2. Los espectros muestran la forma clásica del espectro de una proteína con topología tipo *sandwich* – β (Fig. 6.1a) [90]. Específicamente, una intensa banda espectral en 217 nm en el espectro en 0 M se acentúa con la desnaturización (7 M urea); de manera inversa, una banda espectral en 230 nm desaparece con el incremento de desnaturizante (Fig. 6.1b).

Las curvas de desnaturización para las longitudes de onda 217 y 230 nm muestran una dispersión de puntos sin indicios claros de una transición, como las vistas para otras

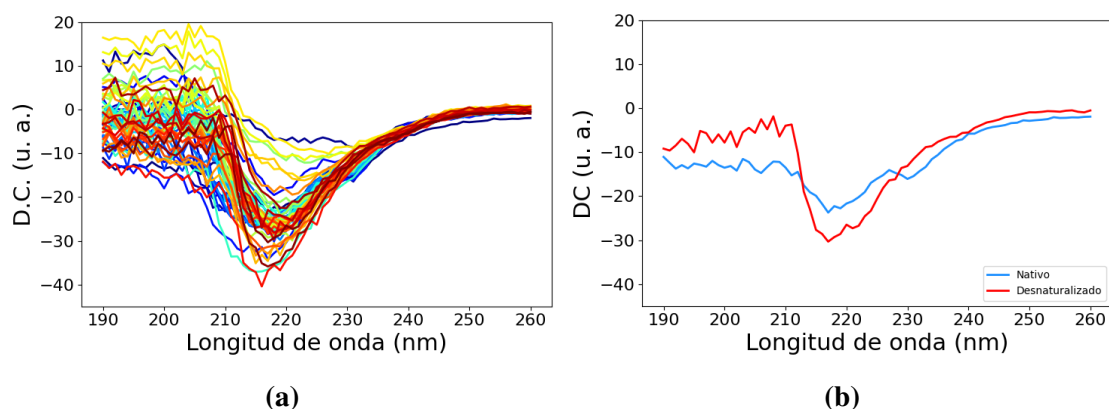


Figura 6.1: DC en el UV-lejano 25°C. a) Serie espectral completa, 0 (azul) a 7 M urea (rojo). Se aprecia gran variación o ruido en la región comprendida entre 190 y 210 nm. b) Espectros en 0 M (nativo) y 7 M urea (desnaturalizado). Se aprecia que no existe una gran diferencia en la señal total de los espectros; la banda espectral en 217 nm aumenta mientras que la banda espectral en 230 nm desaparece con la desnaturalización.

señales (ver adelante) o proteínas [89]. Las claras tendencias ascendentes (a pesar de la dispersión) *i.e.*, tendencias a perder señal con el aumento de desnaturalizante, pueden ser interpretadas como una pérdida de estructura secundaria (mínima) con el aumento de desnaturalizante en el contexto de las señales nativa y desnaturalizada de 6aJL2 (Figs: 6.2, 6.1b). Resultados similares han sido reportados antes para esta proteína o para proteínas estructuralmente similares [7, 30, 70].

Por su parte, los espectros de DC en el UV-cercano presentan una buena relación señal/ruido con buena definición en tres sub-regiones espectrales relevantes para el estudio de la estructura terciaria de 6aJL2 (Fig. 6.3a). Tanto las bandas espectrales asociadas a fenilalaninas (Phe, 270 nm) y tirosinas (Tyr, 280 nm) como la de triptófanos (Trp, 295 nm) se distinguen claramente y se aprecian comportamientos transicionales/sigmoidales en las curvas de desnaturalización en las tres longitudes de onda (Fig. 6.4). Las tres curvas muestran una pérdida de señal positiva, que en los casos de las bandas en 270 y 280

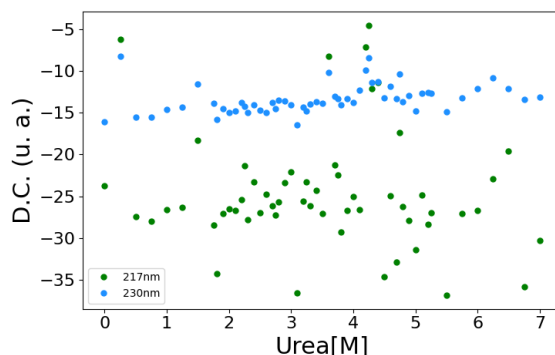


Figura 6.2: Curvas de desnaturalización de 6aJL2 por DC en el UV-lejano. Se aprecian tendencias positivas en el cambio de señal para ambas longitudes de onda, con pendientes cualitativamente semejantes, implicando un cambio en estructura secundaria semejante también. Es evidente una mayor variación en la señal a 230 nm, especialmente a concentraciones altas de urea.

nm es una ganancia de señal negativa. Las transiciones son concomitantes en general, comenzando alrededor de 2 M de urea y terminando alrededor de 4 M. Las regiones pre-transición muestran comportamientos distintos, tanto en 270 como en 280 nm muestran una pendiente negativa reflejando una mayor sensibilidad de esa bandas espectrales a concentraciones bajas de desnaturalizante. En contraste, las regiones post-transición muestran una pendiente nula en los tres casos implicando un efecto nulo del desnaturalizante en altas concentraciones. Datos similares fueron obtenidos previamente en [30].

6.0.1.2 Fluorescencia intrínseca (IF).

La serie espectral seguida por IF muestra un incremento en la intensidad y un desplazamiento al rojo del máximo de fluorescencia con el aumento de desnaturalizante, con una $\lambda_{max} = 352$ nm en 7 M de urea. Ambos fenómenos están asociados a la pérdida de estructura terciaria de 6aJL2 y los datos son coincidentes con datos previamente repor-

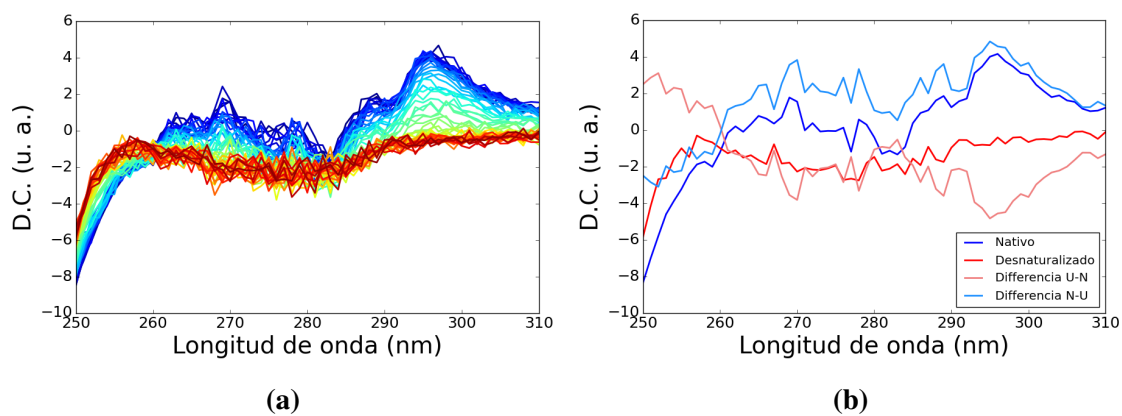


Figura 6.3: DC en el UV-cercano. a) Serie espectral completa en función de urea (0 - 7 M) después de restar los blancos; los colores azules corresponden al espectro de la proteína en concentraciones bajas de desnaturante y los colores rojos a concentraciones altas. b) Se muestran los espectros nativo, desnaturado y de diferencia.

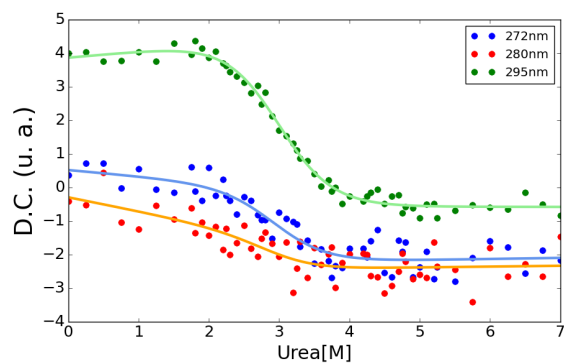


Figura 6.4: Curvas de desnaturación de 6aJL2 por DC en el UV-cercano 25°C. Las líneas representan el mejor ajuste global al modelo de dos estados (Tabla: 6.2).

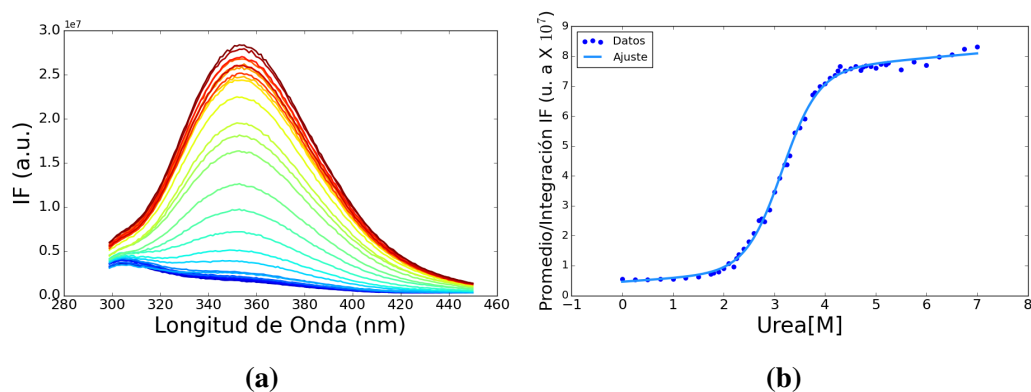


Figura 6.5: Serie espectral y curva de desnaturalización seguidas por IF. a) Serie espectral en función de urea, se aprecia el incremento en intensidad al pasar de concentraciones bajas de urea (azules) a concentraciones altas (rojos). b) se muestra la curva de desnaturalización resultante de integrar y promediar los espectros de dos canales de detección.

tados [30, 33, 75]. El incremento en intensidad de fluorescencia es interpretado como un distanciamiento del puente disulfuro (Cys22-Cys91) respecto al Trp35 y la pérdida del efecto de apagamiento o *quenching* prevalente en el estado nativo ejercida por el puente disulfuro sobre la emisión del triptófano. El desplazamiento al rojo, o *Stoke's shift*, es interpretado como un efecto del cambio de polaridad en el ambiente del triptófano al ser expuesto al solvente durante la desnaturalización (Fig. 6.5a) [2, 30, 33, 75]. El análisis de la curva de desnaturalización muestra que el cambio de intensidad de fluorescencia se da de manera sigmoidal, *i.e.*, con una sola transición como las reportadas para modelos de dos estados, sugiriendo que 6aJL2 se desnaturaliza de manera cooperativa en un solo paso [2, 30, 33]. La transición comienza alrededor de 2 M y termina alrededor de 4 M (Fig. 6.5b), coincidiendo con las observaciones en los datos de DC en el UV-cercano (Fig. 6.4).

6.0.2 | Ajustes al modelo de dos estados.

Las curvas de desnaturalización en urea de 6aJL2 seguidas por DC e IF fueron ajustadas al modelo de dos estados de Santoro y Bollen para obtener los parámetros termodinámicos de la reacción de desplegamiento [85]. Los ajustes individuales, *i.e.*, empleando una sola longitud de onda o conjunto de datos, muestran valores de ΔG_{N-U} alrededor de 5 kcal mol^{-1} , excepto en el caso de DC a 280 nm donde encontramos un valor claramente más bajo pero cercano considerando los errores combinados (Tabla: 6.1); estos valores son coincidentes con los determinados en otros estudios [30, 33]. Los valores de las pendientes de las transiciones oscilan entre 0.55 y 1.87 kcal / mol / [D], considerando los errores combinados son semejantes también. La señal de DC a 280 nm muestra la menor pendiente pero también el mayor error relativo mientras que la señal de DC a 272 nm muestra la mayor pendiente con un error grande también. A partir de estos parámetros se calculó la concentración media de desnaturalizante (C_m o $C_{1/2}$, $\Delta G_{N-U} = 0$) para cada curva mostrando valores que oscilan entre 2.95 y 3.18 M de urea, esto refleja el carácter concomitante de las transiciones y coincide con reportes previos [30, 33].

Los ajustes globales, *i.e.*, empleando todas las longitudes de onda, (Tabla: 6.2) revelan que el $\Delta G_{N-U} = 5.22 \text{ kcal mol}^{-1}$, coincidiendo con reportes anteriores y con el comportamiento general de los ajustes individuales. Las pendientes de las curvas asociadas a cada longitud de onda son similares, implicando cambios similares en el área accesible al solvente. En el caso del UV-cercano a 280 nm la pendiente sugiere un cambio menor (Tabla: 6.2). Se debe notar que los errores asociados a la mayoría de los parámetros parecen grandes, especialmente en los casos de los ajustes del DC UV-cercano, dicho comportamiento

Cuadro 6.1: *Parámetros Termodinámicos de la Desnaturalización por Urea, Ajustes Individuales.*

Parámetro ¹	DC 272 nm	DC 280 nm	DC 295 nm	FI 352 nm
ΔG_{N-U}	5.77 ± 0.26	1.76 ± 3.75	4.65 ± 0.88	5.224 ± 0.25
m_{N-U}	1.87 ± 0.79	0.55 ± 0.69	1.57 ± 0.28	1.65 ± 0.08
Pendiente pre-trans.	-0.29 ± 0.18	-0.23 ± 1.45	0.21 ± 0.23	1943.93 ± 1094.15
Y-Int. pre-trans.	0.59 ± 0.22	-0.06 ± 1.38	3.85 ± 0.23	5264.77 ± 1327.06
Pendiente post-trans.	0.03 ± 0.1	0.29 ± 0.64	-0.02 ± 0.12	2992.81 ± 716.63
Y-Int. post-trans.	-4.19 ± 4.59	-0.29 ± 0.2	-0.48 ± 0.64	$1.12E+05 \pm 3.99E+04$
Temperatura (K)	298.15	298.15	298.15	298.15
$C_{1/2}$ ([D])	3.09 ± 0.42	3.18 ± 2.47	2.96 ± 0.26	3.15 ± 0.07

¹ Unidades de los parámetros y significados de las abreviaturas: ΔG_{N-U} : ΔG de desnaturalización (kcal mol⁻¹); m_{N-U} : pendiente de la transición desnaturalización (kcal/mol/[D]); Pendiente Nat. Base: pendiente de la línea base del nativo o pre-transición (kcal mol⁻¹ M⁻¹); Y-Int. Nat.: Y-intercepto pre-transición (u. a.); Pendiente Unf. Base: pendiente de la línea base del desnaturalizado o post-transición (kcal mol⁻¹ M⁻¹); Y-Int. Unf.: Y-intercepto post-transición (u. a.).

Cuadro 6.2: *Parámetros Termodinámicos de la Desnaturalización por Urea, Ajuste Global.*

Parámetro ¹	DC 272 nm	DC 280 nm	DC 295 nm	IF 352 nm
ΔG_{N-U}	5.22 ± 0.13	5.22 ± 0.13	5.22 ± 0.13	5.22 ± 0.13
m_{N-U}	1.71 ± 288.8	1.25 ± 1027.63	1.75 ± 125.2	1.65 ± 0.04
Pendiente pre-trans.	-0.26 ± 405.9	-0.53 ± 342.1	0.11 ± 404.31	1938.98 ± 543.17
Y-Int. pre-trans.	0.56 ± 622.12	-0.22 ± 587.65	3.9 ± 621.88	5268.1 ± 658.64
Pendiente post-trans.	0.04 ± 273.67	0.19 ± 452.7	-0.05 ± 271.75	2991.07 ± 355.72
Y-Int. post-trans.	-2.34 ± 1436.7	-3.02 ± 2819.85	-0.269 ± 1424.71	$0.11E+06 \pm 0.2E+04$
Temperatura (K)	298.15	298.15	298.15	298.15

¹ Unidades de los parámetros y significados de las abreviaturas: ΔG_{N-U} : ΔG de desnaturalización (kcal mol⁻¹); m_{N-U} : pendiente de la transición desnaturalización (kcal/mol/[D]); Pendiente Nat. Base: pendiente de la línea base del nativo o pre-transición (kcal mol⁻¹ M⁻¹); Y-Int. Nat.: Y-intercepto pre-transición (u. a.); Pendiente Unf. Base: pendiente de la línea base del desnaturalizado o post-transición (kcal mol⁻¹ M⁻¹); Y-Int. Unf.: Y-intercepto post-transición (u. a.).

se debe a la diferencia de magnitud entre las señales de DC e IF. Los errores en el caso de la IF son altos, pero mejores que en los casos individuales, implicando una mejoría en la determinación de los parámetros.

6.0.3 | Análisis de longitud de onda múltiple.

6.0.3.1 Dicroísmo circular.

Los espectros de DC en el UV-cercano fueron analizados por SVD, resultando en sólo dos vectores base significativos, suficientes para reconstruir la serie espectral completa (Fig. 6.6, 6.7). Las amplitudes de ambos vectores están en el mismo orden de magnitud y las transiciones son concomitantes, sugiriendo que se trata del mismo proceso. Estos vectores fueron ajustados globalmente al modelo de dos estados obteniendo los parámetros reportados en la Tabla 6.3 [85]. El ΔG_{N-U} resultante es más bajo por casi una kilo-caloría respecto a los ajustes globales con las longitudes de onda por separado, pero las $C_{1/2}$ son similares (Tabla: 6.2); los valores de las pendientes pre y post transición así como de los interceptos muestran errores muy bajos, menores al 10%, y son indicio de buenos ajustes.

6.0.3.2 Fluorescencia intrínseca.

Los espectros seguidos por IF (Fig. 6.5a) fueron integrados y la curva de desnaturalización resultante fue ajustada al modelo de dos estados también (Fig. 6.5b) [85]; los parámetros obtenidos son: $\Delta G_{N-U} = 5.18 \pm 0.25 \text{ kcal mol}^{-1}$ y $m_{N-U} = 1.64 \pm 0.08 \text{ kcal/mol}/[D]$ con una $C_{1/2} = 3.15 \pm 0.07$ ([D]). Estos valores son coincidentes a los obtenidos por ajustes individuales (Tabla: 6.1) o globales (Tabla: 6.2) y son a su vez coincidentes con los obtenidos en otros reportes [30, 33]. Por otra parte, los mismos datos analizados por SVD producen tres vectores estadísticamente significativos (Fig. 6.8), los cuales son necesarios para reconstruir la serie original (Fig. 6.9). Los resultados del ajuste global de estos vectores (Tabla: 6.3) muestran un $\Delta G_{N-U} = 5.02 \pm 0.1 \text{ kcal mol}^{-1}$ muy similar al ΔG_{N-U} obtenido en el ajuste global (Tabla: 6.2) o en el ajuste individual de las curvas de desnaturalización (Tabla: 6.1). Las $C_{1/2}$ son similares también, excepto en el caso del

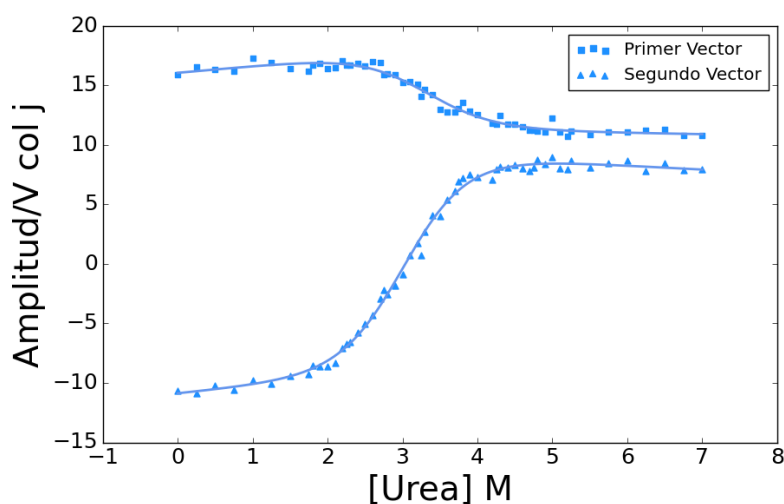


Figura 6.6: Vectores significativos, DC en el UV-cercano. $V \text{ col } j$ son las columnas j de la matriz V . Las líneas representan los mejores ajustes al modelo de dos estados.

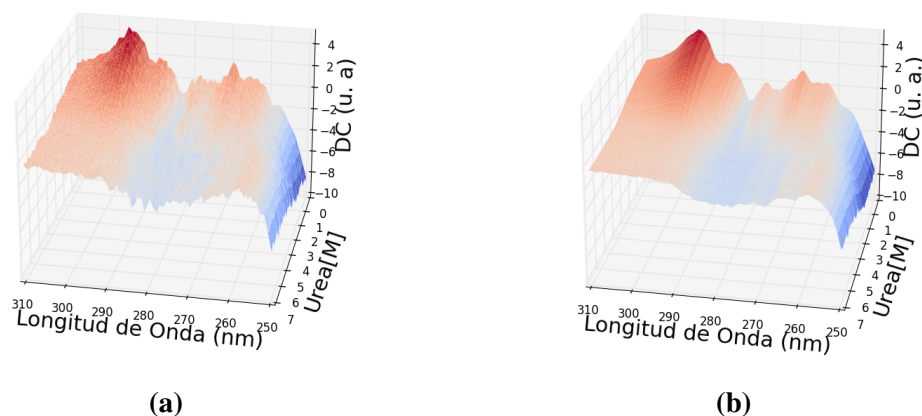


Figura 6.7: Pre y post SVD, DC UV-cercano. a) Serie espectral antes del SVD; b) Reconstrucción de la serie espectral empleando únicamente los dos vectores significativos resultantes del SVD en el DC UV-cercano (Fig. 6.6).

tercer vector. La mayoría de los errores son un orden de magnitud menores al valor del parámetro, implicando que los ajustes son estadísticamente aceptables.

Cuadro 6.3: Parámetros del Ajuste Global de Vectores Significativos, DC UV-cercano e IF.

Parámetro ¹	Primer Vec. DC	Segundo Vec. DC	Primer Vec. IF	Segundo Vec. IF	Tercer Vec. IF
ΔG_{N-U}	4.27 ± 0.25	4.27 ± 0.25	5.02 ± 0.1	5.02 ± 0.1	5.02 ± 0.1
m_{N-U}	1.31 ± 0.08	1.4 ± 0.08	1.54 ± 0.03	1.54 ± 0.05	1.78 ± 0.32
Pendiente pre-trans.	0.57 ± 0.16	0.63 ± 0.26	$-0.35E+07 \pm 0.14E+07$	$0.11E+07 \pm 0.92E+06$	$-0.53E+06 \pm 0.13E+07$
Y-Int. pre-trans.	16.06 ± 0.23	-10.89 ± 0.26	$-0.39E+08 \pm 0.17E+07$	$0.3E+08 \pm 0.15E+07$	$-0.5E+06 \pm 0.16E+07$
Pendiente post-trans.	-0.11 ± 0.15	-0.33 ± 0.14	$-0.25E+08 \pm 0.11E+07$	$-0.16E+07 \pm 0.91E+06$	$-0.18E+07 \pm 0.67E+06$
Y-Int. post-trans.	11.67 ± 0.85	10.24 ± 0.8	$-0.31E+09 \pm 0.60E+07$	$-0.13E+07 \pm 0.49E+07$	$0.86E+07 \pm 0.33E+07$
Temperatura (K)	298.15	298.15	298.15	298.15	298.15
$C_{1/2}$ ([D])	3.25 ± 0.09	3.05 ± 0.08	3.25 ± 0.03	3.25 ± 0.04	2.82 ± 0.21

¹ Unidades de los parámetros y significados de las abreviaturas: ΔG_{N-U} : ΔG de desnaturalización (kcal mol^{-1}); m_{N-U} : pendiente de la transición desnaturalización ($\text{kcal/mol}/[\text{D}]$); Pendiente Nat. Base: pendiente de la línea base del nativo o pre-transición ($\text{kcal mol}^{-1} \text{M}^{-1}$); Y-Int. Nat.: Y-intercepto pre-transición (u. a.); Pendiente Unf. Base: pendiente de la línea base del desnaturalizado o post-transición ($\text{kcal mol}^{-1} \text{M}^{-1}$); Y-Int. Unf.: Y-intercepto post-transición (u. a.).

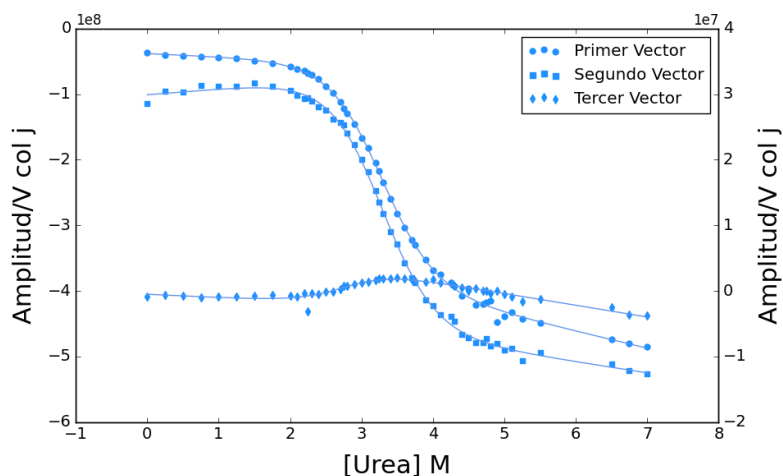


Figura 6.8: Vectores significativos, IF. Las líneas representan los mejores ajustes al modelo de dos estados. Los primeros dos vectores muestran comportamientos concomitantes (asociados al eje “y” primario) mientras que el tercer vector, el de menor magnitud, muestra una transición corta comparada a las de los otros vectores (asociado al eje “y” secundario).

6.0.4 | Modelos de tres estados.

Los resultados del análisis por SVD sugieren la presencia de un tercer estado (Fig. 6.8). Ajustes de la curva de desnaturalización a modelos de tres estados al equilibrio producen resultados muy diferentes a los reportados para el modelo de dos estados. El modelo lineal (ej: $N \rightleftharpoons I \rightleftharpoons U$; Ec. 5.2) resulta en un $\Delta G = 5.2 \text{ kcal mol}^{-1}$ y un $\Delta G = 2.1 \text{ kcal mol}^{-1}$ que podrían ser asociados a cualquiera de las transiciones (N-I ó I-U); las pendientes respectivas son $2.1 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$ y $0.9 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$. Por su parte, el ajuste individual de los vectores significativos resultantes del SVD resulta en un $\Delta G = 7.3 \text{ kcal mol}^{-1}$ para la primera transición (reportado por el tercer vector) y un $\Delta G = 5.1 \text{ kcal mol}^{-1}$ para la segunda transición (reportado por los primeros dos vectores); la resultante es un $\Delta G = 12.5 \text{ kcal mol}^{-1}$ y un valor $m = 4.1 \text{ kcal mol}^{-1} [\text{D}]^{-1}$. Tanto la estabilidad total como el área

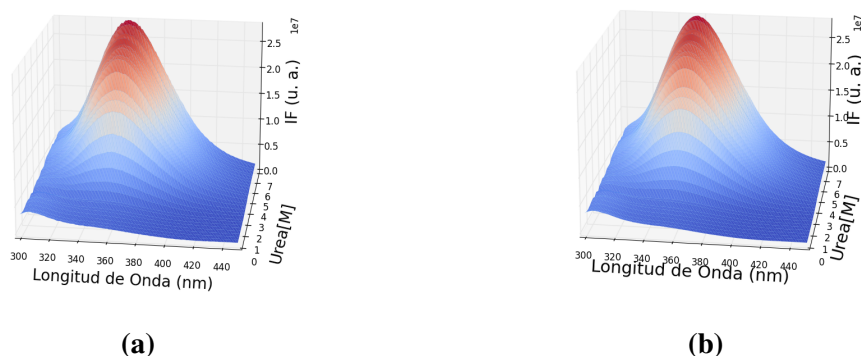


Figura 6.9: Pre y post SVD, IF. a) Serie espectral antes del SVD. b) Reconstrucción de la serie espectral empleando los tres vectores significativos mostrados en la Fig. 6.8.

accesible al solvente, para ambos casos, son mayores a lo reportado consistentemente para el modelo de dos estados, y también son mayores que lo reportado para otras proteínas similares [64].

6.1 | Cinética.

Los datos cinéticos fueron registrados principalmente a través de la IF de 6aJL2. Los registros hechos a través de DC o absorbancia mostraron una proporción señal/ruido baja, razón por la cual fueron excluidos de los experimentos y análisis posteriores.

6.1.1 | Desnaturalización/*unfolding*.

El análisis de las cinéticas de desnaturalización de 6aJL2 revela un comportamiento bi-exponencial para casi todas las concentraciones de desnaturalizante susceptibles a los ajustes, *i.e.*, las cinéticas en concentraciones en el intervalo entre 2.75 y 7 M de urea

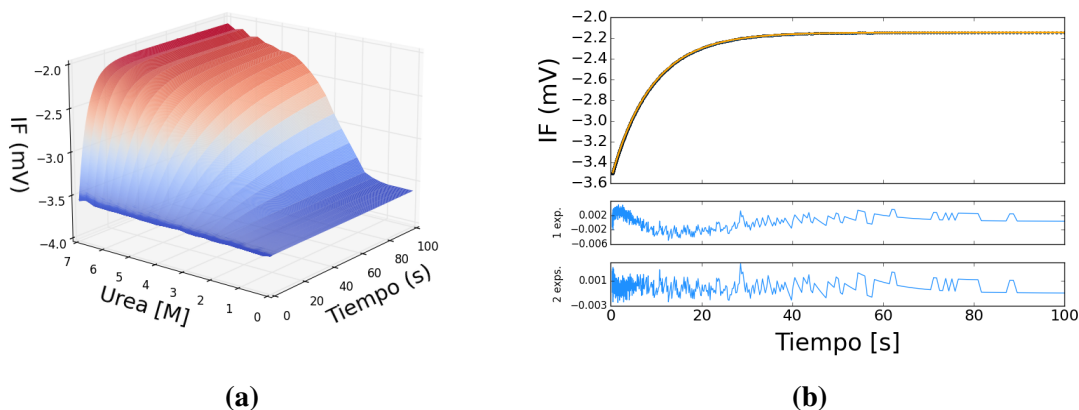


Figura 6.10: Cinéticas de desnaturalización. En el panel a) se muestran las cinéticas de desnaturalización en todo el intervalo de concentraciones de urea (0 a 7 M). En el panel b) se muestra el ajuste a un modelo bi-exponencial en 6.25 M de urea y los residuales para los modelos de dos y tres exponenciales; se aprecia menor tendencia en los residuales al ajuste de tres exponenciales.

(Fig. 6.10a). Estos ajustes son mejores que los ajustes a modelos de una sola exponencial, visto desde los criterios de bondad del ajuste (Fig. 6.10b). Notablemente, las cinéticas de desnaturalización no presentan indicios de pérdidas significativas de amplitud debida a tiempos muertos del instrumento y presentan estabilidad a tiempos largos asegurando una toma de datos correcta.

6.1.2 | Renaturalización/*refolding*.

El análisis de las cinéticas de renaturalización de 6aJL2 revela un comportamiento más complejo que el de desnaturalización. La inspección visual de los datos revela una ausencia de amplitud en los tiempos iniciales en las cinéticas más rápidas (Fig. 6.11a). Se encontraron al menos dos regímenes basados en el número de exponenciales que describen mejor a las cinéticas; en el intervalo entre 0.73 y 2.25 M de urea las cinéticas son

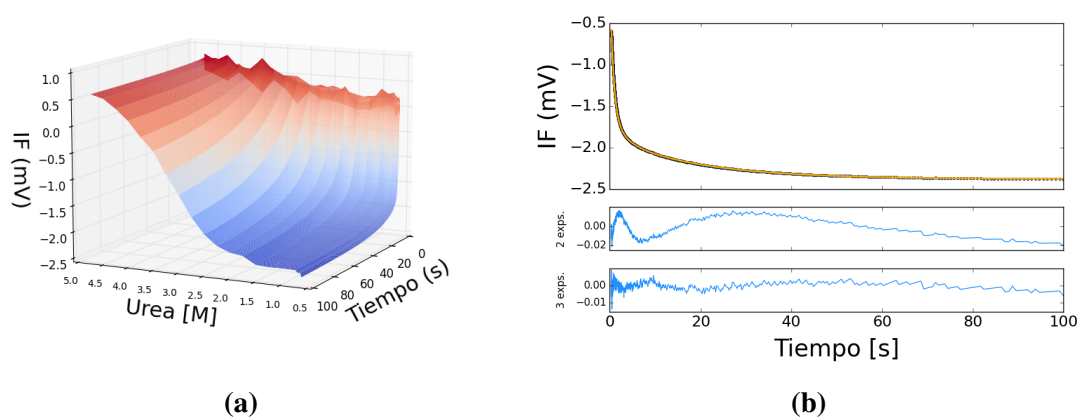


Figura 6.11: *Cinéticas de renaturalización. En el panel a) se muestran las cinéticas de renaturalización en el intervalo de concentraciones de urea 0.63 a 5 M. En el panel b) se muestra el ajuste a un modelo tri-exponencial de en 0.63 M de urea y los residuos para los modelos de dos y tres exponenciales respectivamente.*

descritas por modelos tri-exponenciales, mientras que en el intervalo entre 2.5 y 3.75 M son descritas por modelos bi-exponenciales. El criterio de los residuos muestra que es posible ajustar algunas de las cinéticas a modelos con mayor número de exponenciales del reportado aquí, pero se corre el riesgo de incurrir en prácticas de sobre-ajuste de los datos (Fig. 6.11b).

6.1.3 | Análisis del gráfico de chevron.

Las constantes de velocidad observables obtenidas de los ajustes de las cinéticas de desnaturalización y renaturalización se graficaron como función de la concentración de urea en un gráfico de chevron en el que se aprecia la complejidad del proceso (Fig. 6.12a). La región del replegamiento/refolding muestra sub-regiones de tres y dos constantes de velocidad observables, o ramas/brazos, mientras que en la región del desplegamiento se

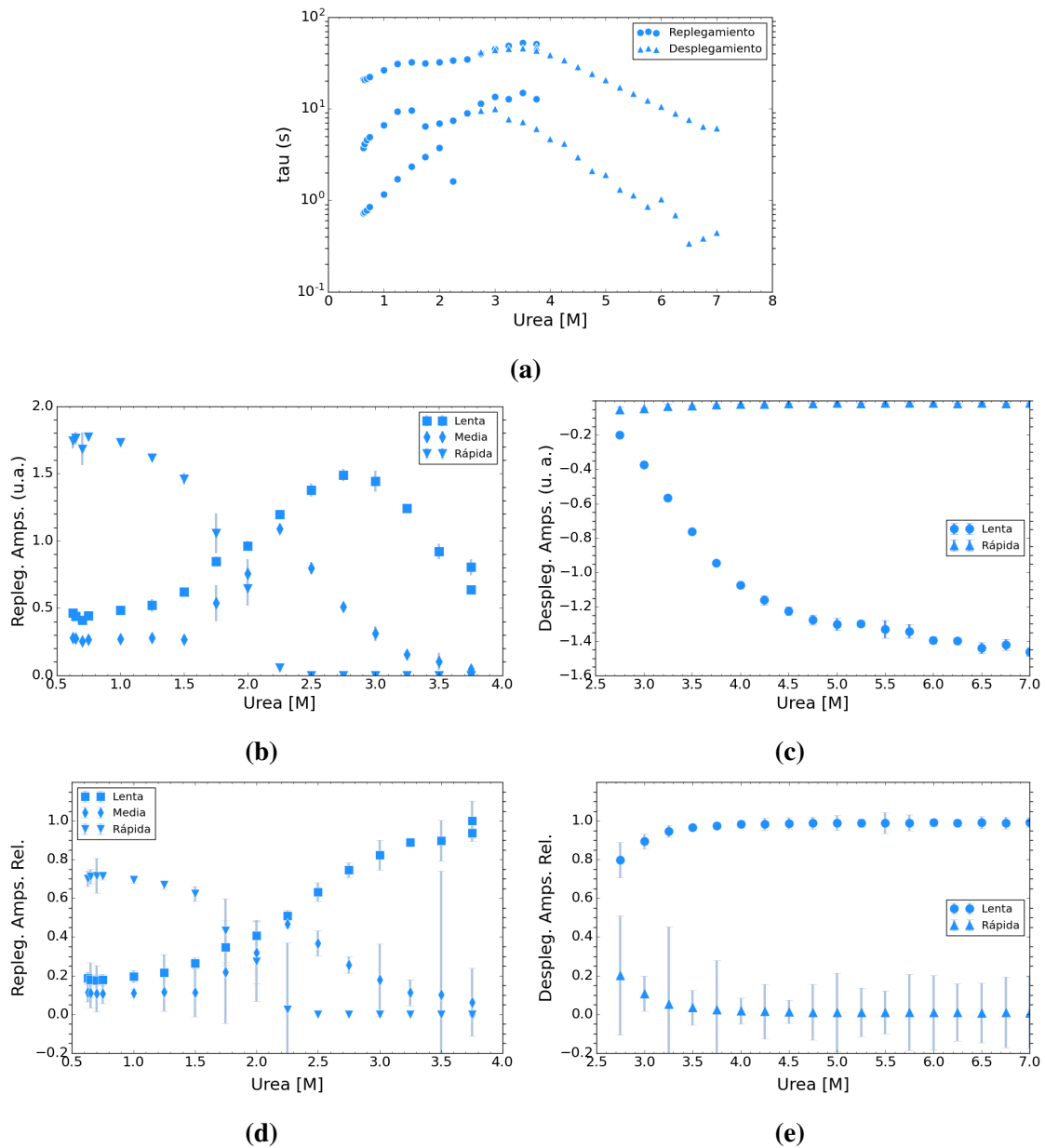


Figura 6.12: Gráfico de chevron y amplitudes asociadas. a) Gráfico de chevron a 25°C. Se aprecian tres ramas de replegamiento y dos ramas de desplegamiento. Las desviaciones de la linealidad son evidentes en las ramas intermedia y lenta del replegamiento. b) Amplitudes totales asociadas a las distintas fases del replegamiento. c) Amplitudes totales asociadas a las distintas fases del desplegamiento. d) Amplitudes relativas asociadas a las distintas fases del replegamiento. e) Amplitudes relativas asociadas a las distintas fases del desplegamiento.

aprecian dos ramas. La coincidencia de las ramas de desnaturalización y renaturalización en concentraciones intermedias de desnaturalizante es notable, *i.e.*, las constantes de velocidad de las ramas lentas y rápidas de cada proceso coinciden en magnitud en concentraciones intermedias de desnaturalizante, esto es tomado como indicio de una buena determinación de los parámetros cinéticos y de la reversibilidad del sistema.

Del lado del desplegamiento, la presencia de dos ramas permite distinguir entre un proceso lento y otro rápido, los cuales presentan dependencias lineales de la concentración de urea. La pendiente de la rama rápida es un poco mayor que la de la rama lenta. Ambas ramas presentan un poco de desviación de la linearidad en el extremo de altas concentraciones de desnaturalizante (*rollover*) (Fig. 6.12a). Del lado del replegamiento son distinguibles tres ramas a concentraciones bajas de urea y es notoria la fusión de las ramas rápida e intermedia alrededor de 2.25 M de urea; sólo la rama más rápida mantiene una dependencia lineal con el desnaturalizante y dicha dependencia se mantiene tras la fusión con la rama intermedia; las ramas intermedia (a bajas concentraciones de urea) y lenta presentan claras desviaciones de la linearidad (Fig. 6.12b).

El análisis de las amplitudes relativas asociadas a las constantes de velocidad observables revela que todas las ramas comparten importancia en el proceso. Del lado de la desnaturalización, la rama rápida está asociada a amplitudes menores mientras que la rama lenta está asociada a las amplitudes mayores; las amplitudes de la rama rápida disminuyen marcadamente en función del aumento de desnaturalizante pero se mantienen a lo largo del intervalo del mismo (Fig. 6.12c). Del lado de la renaturalización, a concentraciones bajas la rama rápida está asociada a mayores amplitudes las cuales decrecen en función del aumento desnaturalizante para dar paso a un aumento en las amplitudes de las ramas

intermedia y lenta, siendo esta última la de mayor importancia a partir de 2 M; la rama intermedia alcanza un pico en 2.25 M que no llega a ser más importante que la rama lenta, pero si comparable (Fig. 6.12b).

6.1.4 | Perturbación del estado nativo.

Las cinéticas de desnaturalización desde diferentes concentraciones iniciales de urea en la región del nativo son ajustadas exitosamente a modelos bi-exponenciales hasta 3.5 M, a partir de esta concentración sólo la constante de velocidad “lenta” es observada. Las constantes de tiempo observables rondan valores alrededor de uno y diez segundos para la fase rápida y de alrededor de 16 s para la fase lenta (Fig. 6.13a). Las variaciones en las constantes observables son atribuidas a las pequeñas amplitudes asociadas a ellas, *i.e.*, valores pequeños dificultan la determinación de los parámetros en los ajustes (Fig. 6.13b). La fase lenta está siempre asociada a la mayor amplitud, la cual muestra un incremento en condiciones nativas (0 a 1.25 M) y un posterior decremento en concentraciones de urea pertenecientes a la región de la transición en la curva de desnaturalización al equilibrio (Fig. 6.13b). El análisis de las amplitudes relativas apoya la noción de que la fase lenta está asociada a una mayor amplitud y que la fase rápida desaparece alrededor de 3.5 M de urea (Fig. 6.13c).

6.1.5 | Heterogeneidad en el estado desnaturalizado.

La complejidad observada en la región del replegamiento del gráfico de chevron (Fig. 6.12a) hace necesario explorar sus posibles causas. A estas se les conoce en conjunto

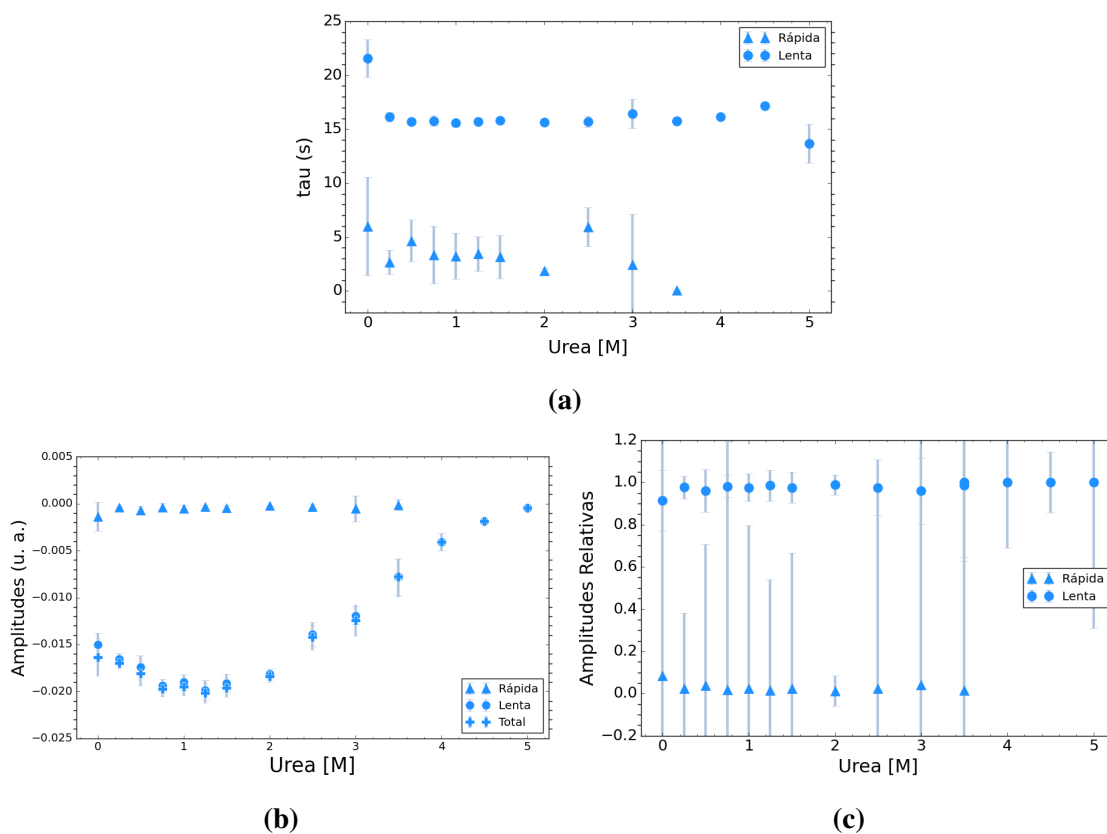


Figura 6.13: Perturbación en la región del nativo. a) Constantes de velocidad observables como función de la concentración inicial de urea. b) Amplitudes totales asociadas a las constantes de velocidad observables en el panel a). c) Amplitudes relativas. La concentración final de urea fue de 7 M.

como heterogeneidad en el estado desnaturalizado, *i.e.*, procesos intra e inter-moleculares responsables de las desviaciones de la linealidad en los brazos del gráfico de chevron así como de la presencia de múltiples constantes de velocidad observables y por tanto de las múltiples ramas. A continuación se describen los resultados de diferentes experimentos que intentan dar claridad sobre los posibles procesos involucrados.

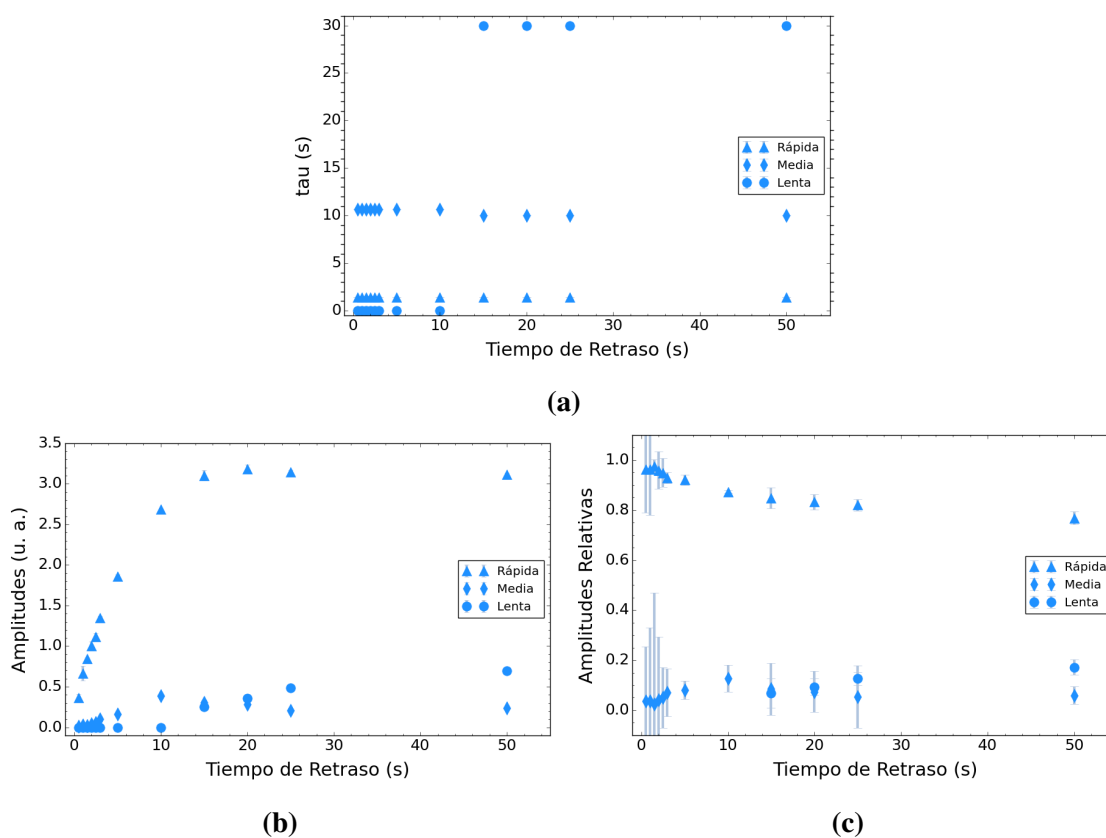


Figura 6.14: Dobles saltos. Primer salto (desplegamiento): $0 \rightarrow 7 M$ urea; segundo salto (replegamiento): $7 \rightarrow 1.57 M$. En el panel a) se muestran las constantes de velocidad observables como función del tiempo de retraso o incubación. En el panel b) se muestran las amplitudes totales asociadas a las constantes de velocidad observables en el panel a). En el panel c) se muestran las amplitudes relativas.

6.1.5.1 Dobles saltos de renaturalización.

Las cinéticas de renaturalización resultantes después de incubar la proteína por diferentes tiempos (en el intervalo de 0 a 50 s) en condiciones desnaturizantes son bien descritas por modelos tri y bi-exponenciales. Antes de los 15 s de retraso, o incubación en condiciones desnaturizantes, las cinéticas son bien descritas por modelos bi-exponenciales mien-

tras que en tiempos más largos son bien descritas por modelos tri-exponenciales, siendo la constante más lenta la que aparece en tiempos de retraso mayores a 15 s (Fig. 6.14a). Las amplitudes asociadas muestran que la fase rápida está asociada a la amplitud mayor y la fase intermedia crece (lentamente comparada a la fase rápida) hasta los 15 s. En ese punto se da el aparición de la fase más lenta y a partir del mismo la fase lenta se vuelve más importante que la fase intermedia (Fig. 6.14b). El análisis de las amplitudes relativas confirma que la fase lenta gana importancia después de su aparición y que la fase rápida siempre es la más importante; notablemente, la amplitud relativa de la fase rápida decrece en función del tiempo de retraso (Fig. 6.14c).

6.1.5.2 Replegamiento en presencia de Cyp18.

Las cinéticas de renaturalización en presencia de distintas concentraciones de Cyp18 (0 a 300 μM) son bien descritas por modelos tri y bi-exponenciales. A concentraciones bajas, hasta 50 μM de Cyp18, es posible recuperar tres constantes de velocidad observables y a partir de esa concentración sólo dos constantes son recuperables; las fases lenta e intermedia son las afectadas, siendo la fase lenta la que se pierde con el incremento en la concentración de Cyp18 (Fig. 6.15a). El análisis de las amplitudes en concentraciones de Cyp18 menores a 50 μM revela que la fase rápida está asociada a las amplitudes mayores, con una tendencia negativa aparente; las amplitudes asociadas a la fase intermedia parecen ganar importancia y aquellas de la fase lenta parecen desaparecer. Por arriba de 50 μM se presenta el régimen bi-exponencial y las amplitudes asociadas a la fase rápida recuperan importancia y aquellas de la fase intermedia disminuyen (Fig. 6.15b). Las mismas amplitudes vistas de manera relativa confirman la última observación (Fig. 6.15c).

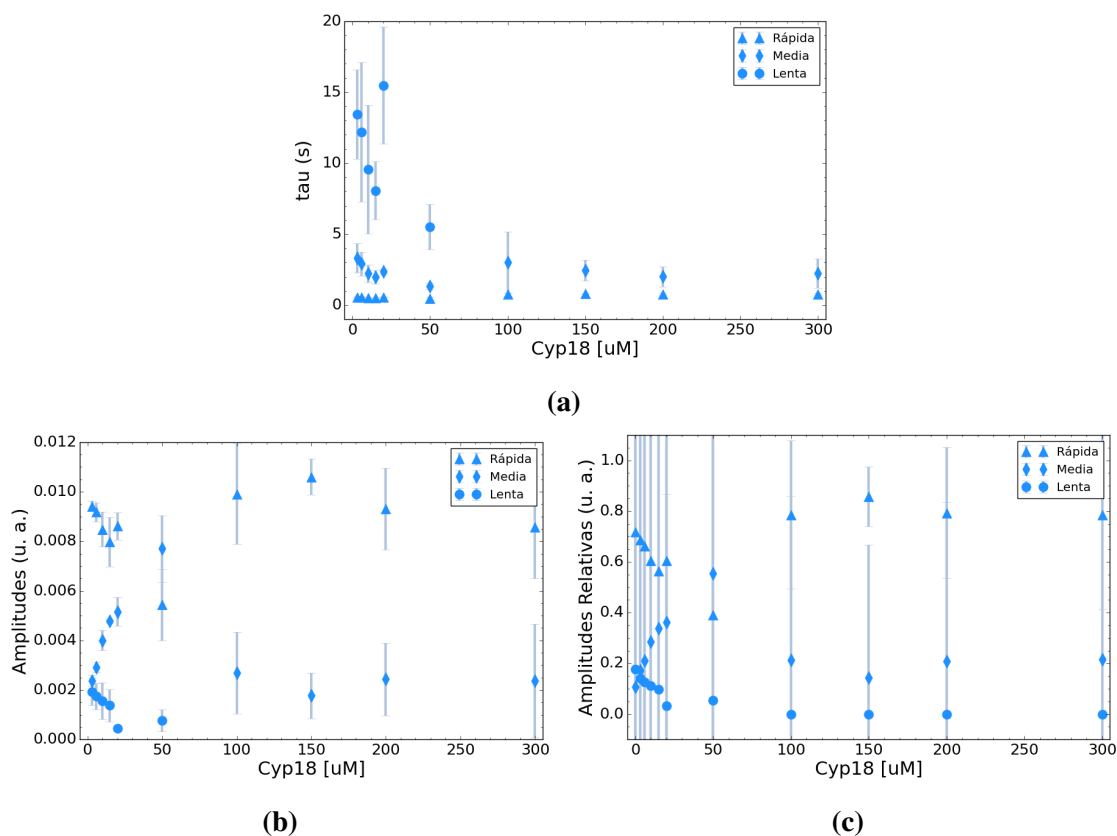


Figura 6.15: Renaturalización en presencia de Cyp18. En el panel a) se muestran las constantes de velocidad observables como función de la concentración de Cyp18. En el panel b) se muestran las amplitudes totales asociadas a las constantes de velocidad observables en el panel a). En el panel c) se muestran las amplitudes relativas. La concentración final de urea es 1.57 M.

6.1.5.3 Replegamiento a diferentes concentraciones de 6aJL2.

Las cinéticas de renaturalización a varias concentraciones iniciales de 6aJL2 son bien descritas por modelos tri-exponenciales con constantes de velocidad observables bien definidas: constante rápida ≈ 2 s, constante intermedia ≈ 11 s y la constante lenta ≈ 33 s (Fig. 6.16a). El aumento en concentración de proteína se traduce invariablemente en un aumento de señal de fluorescencia y por tanto en un aumento de las amplitudes asociadas

a cada fase. El gráfico de las amplitudes totales contra la concentración de 6aJL2 revela una tendencia positiva para las amplitudes en función de la concentración de proteína (Fig. 6.16b). Por su parte, el análisis de las amplitudes relativas muestra que no hay variación estadísticamente significativa y que las distintas fases mantienen su importancia relativa en todo el intervalo de concentraciones de 6aJL2; si bien los errores asociados son grandes, éstos se deben a la amplificación del error al operar con números decimales (Fig. 6.16c).

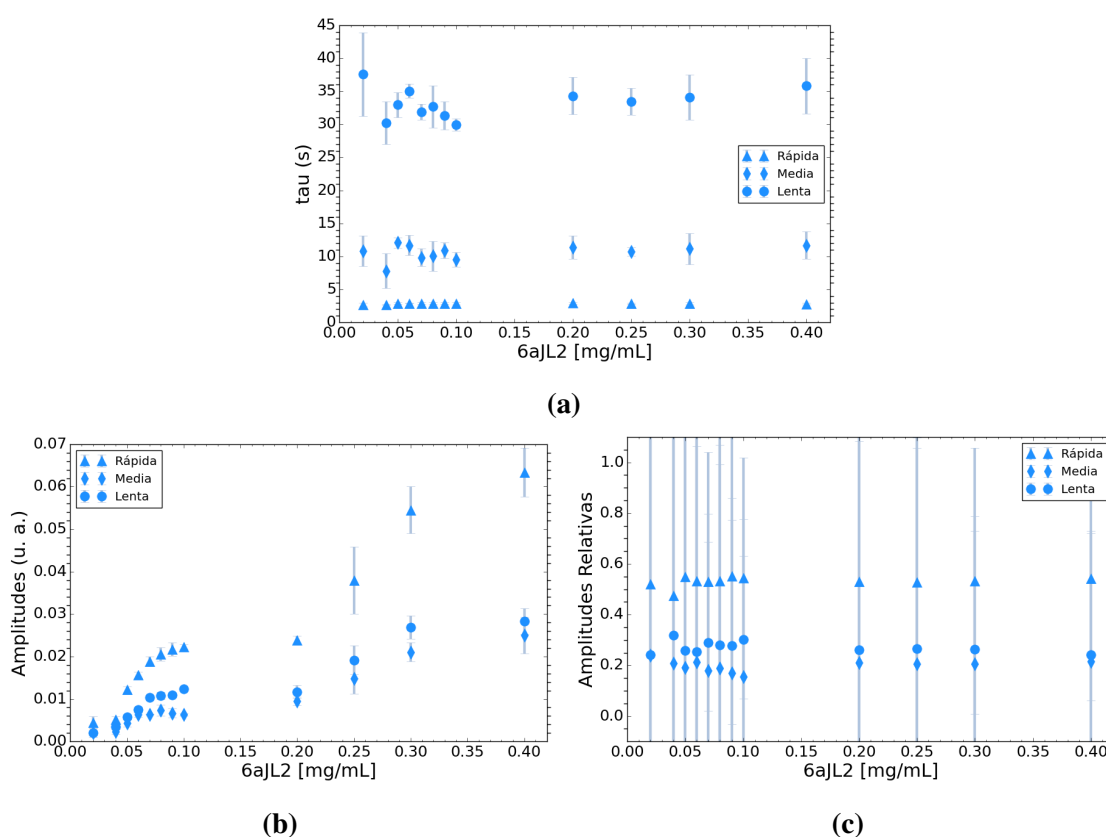


Figura 6.16: Renaturalización a diferentes concentraciones de 6aJL2. En el panel a) se muestran las constantes de velocidad observables en cada concentración de 6aJL2. En el panel b) se muestran las amplitudes totales asociadas a las constantes de velocidad observables en el panel a). En el panel c) se muestran las amplitudes relativas.

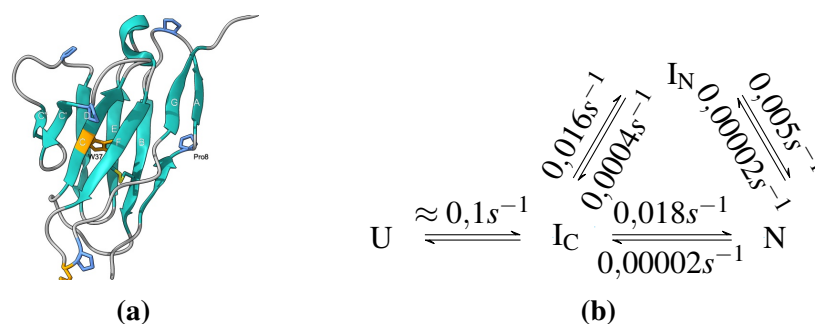
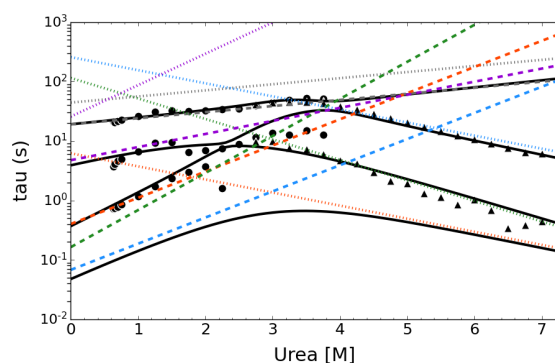


Figura 6.17: V_L MAK33 y su mecanismo de plegamiento. a) Representación de listón de la cadena principal de V_L MAK33 [27]. Se destacan el puente disulfuro (amarillo y gris), triptófanos (37 y 96) y prolinas (azul), particularmente Pro8 (cis) por su importancia en el mecanismo descrito en [60]. b) Mecanismo de plegamiento de V_L MAK33, se presentan las constantes microscópicas asociadas en ausencia de desnaturalizante a pH 7.4 y 25°C [60].

6.2 | Modelo cinético.

Tanto el análisis por SVD de los datos al equilibrio como los resultados cinéticos sugieren la presencia de más de dos especies/conformaciones en el plegamiento de 6aJL2. En este contexto se deben considerar modelos cinéticos con tres especies como mínimo (e.g., $N \rightleftharpoons I \rightleftharpoons U$) para tratar de explicar las observaciones experimentales. Dichos modelos son incapaces de reproducir los datos experimentales observados para 6aJL2. Así mismo, los modelos con cuatro especies también son insuficientes, incluyendo uno presentado para el dominio V_L de la proteína MAK33 (Fig: 6.17, [60]). Incrementando la complejidad, se consideró el mecanismo de plegamiento reportado para la β 2-microglobulina, un modelo estructural (y fibrilogénico) similar (Fig: 6.18); dicho mecanismo describe la presencia de cinco especies/conformaciones y tampoco es capaz de reproducir los datos experimentales de 6aJL2 cuando se emplean las constantes cinéticas en 0 M de urea reportadas en [105].

Basados en la evidencia experimental y los resultados de los análisis con los meca-



(a)

Figura 6.20: Gráfico de chevron, 6aJL2 a 25°C. Constantes aparentes de replegamiento (círculos negros); constantes aparentes de desplegamiento (triángulos negros); constantes aparentes del modelo de plegamiento (líneas negras). Constantes microscópicas de replegamiento (líneas discontinuas) y desplegamiento (líneas punteadas): $U_c \rightleftharpoons U_t$ (gris), $U_t \rightleftharpoons I$ (naranja), $I \rightleftharpoons N^*$ (verde), $I \rightleftharpoons N$ (azul), $N^* \rightleftharpoons N$ (violeta).

Notablemente, este modelo fue incapaz de reproducir los datos observados para 6aJL2 cuando se consideró el $\Delta G_{U-N} = 5.22 \text{ kcal mol}^{-1}$ reportado por los ajustes al modelo de dos estados (tabla: 6.2). Una buena descripción de los datos experimentales es alcanzada si el ΔG_{U-N} es llevado hasta $\approx 7 \text{ kcal mol}^{-1}$, similar al obtenido al ajustar la curva de desnaturalización al equilibrio a un modelo de tres estados ($N \rightleftharpoons I \rightleftharpoons U$); ver sección Modelos de tres estados). El ajuste fue hecho de manera visual ajustando los parámetros de manera interactiva hasta lograr la descripción de las constantes aparentes mostradas en el gráfico de chevron en la Fig: 6.20. La descripción de los datos experimentales es notable dada la complejidad de los mismos.

A partir del ajuste de las constantes observables de plegamiento y replegamiento se obtuvieron las constantes microscópicas y las dependencias con la concentración de desnaturalizante (Fig: 6.20). En general, las reacciones de replegamiento presentan pendientes positivas y las reacciones de desplegamiento presentan pendientes negativas en función del

desnaturalizante, excepto para las reacciones $U_C \leftarrow U_I$ y $N^* \leftarrow N$ donde la pendiente es positiva a pesar de ser reacciones de replegamiento. Además, un chevron rápido es resultante del modelo teórico en tiempos menores a un segundo; dicho chevron no coincide con los datos experimentales y parece estar dominado por las reacciones $I \rightarrow N$ y $U_I \leftarrow I$, sugiriendo la presencia de procesos rápidos no accesibles experimentalmente (Fig: 6.20) [102].

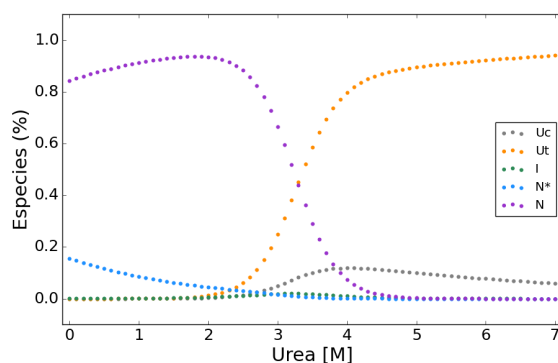
De las extrapolaciones de las constantes microscópicas se obtuvieron los parámetros en 0 M de urea (Tabla: 6.4). Las reacciones más lentas están en el orden de los cientos de segundos (e.g., $I \leftarrow N^*$ y $I \leftarrow N$) y las más rápidas en el orden de las decenas de milisegundos (ej: $I \rightarrow N$). La reacción de isomerización en el estado desnaturalizado ($U_C \rightleftharpoons U_T$) es lenta en ambos sentidos pero no es tan lenta como las reacciones de desplegamiento desde las especies nativas hacia el intermediario ($I \leftarrow N^*$ y $I \leftarrow N$). La reacción $N \rightleftharpoons N^*$ favorece la formación de la especie N y la formación de la especie N^* desde N (reacción reversa) es más rápida que la conversión a intermediario.

Cuadro 6.4: Parámetros en 0 M urea asociados al mecanismo de plegamiento de 6aJL2 a 25°C.

Reacción	k (s ⁻¹)	m (kcal mol ⁻¹ M ⁻¹)	ΔG (kcal mol ⁻¹)
$U_C \rightarrow U_T$	5.3E-02	0.15	-0.51
$U_C \leftarrow U_T$	2.48E-02	0.32	
$U_T \rightarrow I$	2.7	0.76	-1.67
$U_T \leftarrow I$	0.16	-0.31	
$I \rightarrow N^*$	6.1	0.86	-3.88
$I \leftarrow N^*$	8.7E-03	-0.46	
$I \rightarrow N$	14.73	0.6	-4.88
$I \leftarrow N$	3.9E-03	-0.32	
$N \rightarrow N^*$	0.21	0.3	-0.99
$N \leftarrow N^*$	3.89E-02	0.7	

Los valores m negativos, como los obtenidos para las reacciones $U_T \leftarrow I$, $I \leftarrow N^*$ e $I \leftarrow N$ en 0 M de urea, representan desplegamientos o exposición de área accesible al solvente. La reacción $U_C \leftarrow U_T$ presenta un valor m positivo, y mayor al de la reacción inversa, implicando un plegamiento o escondimiento de área accesible al solvente en esa reacción; así mismo, la reacción $N \leftarrow N^*$ presenta la misma situación, implicando que el estado N^* es más compacto. Los ΔG son todos favorables en dirección hacia las especies nativas (Tabla: 6.4).

Las concentraciones relativas de las especies al equilibrio se obtuvieron a partir del modelo cinético (Fig: 6.21). En condiciones nativas las dos conformaciones nativas están pobladas, N es la especie predominante (arriba del 80 %) y N^* ocupa el porcentaje restante. N^* disminuye en concentraciones mayores de urea y desaparece completamente en 4 M de urea, mientras que N alcanza un máximo alrededor de 2 M de urea ($\approx 95\%$) y decrece hasta desaparecer en 5 M de urea; este comportamiento es consistente con el incremento en la señal de fluorescencia observado en el experimento presentado en la figura 6.14. La conformación U_t empieza a ser poblada en 2 M de urea y es la especie más abundante en condiciones desnaturalizantes, después de 5 M. La ganancia en U_t después de 5 M de urea es concomitante con la disminución de la población de U_c , la cual está poblada en 2 M de urea y concentraciones mayores alcanzando un pico alrededor de 4 M de urea ($\approx 18\%$). El intermediario alcanza un máximo (2%) alrededor de 3.25 M de urea.



(a)

Figura 6.21: Gráfico de concentración de especies al equilibrio calculadas desde el modelo cinético.

6.3 | Mutaciones de 6aJL2.

Un conjunto de aminoácidos que definen al núcleo hidrofóbico de 6aJL2 fueron seleccionados para ser estudiados a través de una estrategia mutacional. Con base en sus efectos termodinámicos, cinéticos o fibrilogénicos, los resultados de algunas de las mutantes se mencionan a continuación. Como era esperado, las mutantes sencillas de cisteína por alanina, C22A y C91A, así como la doble mutante C22A/C91A, no dieron resultados positivos a nivel de sobre-expresión, *i.e.*, las mutaciones causaron lisis celular en los cultivos y se registró la presencia de agregados proteicos en las distintas fracciones (medio y amortiguadores) del protocolo de purificación.

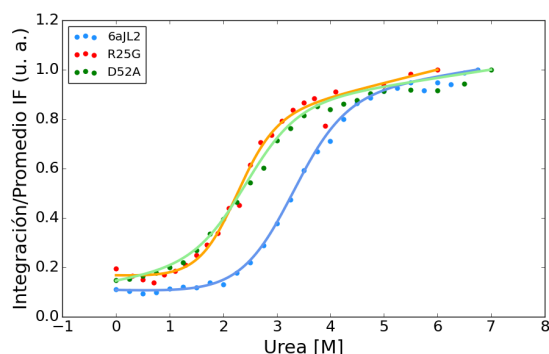
6.3.1 | Experimentos al equilibrio.

Basados en su relevancia y en su efecto amiloidogénico, la mutante R25G (Fig: 1.6, 7.1a) también fue seleccionada y estudiada. Los análisis de la curva de desnaturalización

por urea empleando IF resultan en parámetros consistentes con los reportados previamente en otros estudios, inclusive cuando se emplearon desnaturalizantes diferentes [7, 33, 88]. La curva muestra una sola transición que comienza alrededor de 1 M y finaliza alrededor de 3.5 M de urea. La región pre-transición presenta una pendiente baja mientras que la región post-transición presenta una pendiente pronunciada. La curva se encuentra desplazada hacia la izquierda respecto a la de 6aJL2 y la pendiente de la transición es comparable con la de la curva de 6aJL2; la C_m resultante es menor, implicando una menor estabilidad termodinámica (Fig: 6.22a, Tabla: 6.5).

Otra mutación con efectos similares a los de R25G es D52A. Ambos residuos se encuentran en la misma región, pero en distintas asas (Fig: 7.1). La curva de desnaturalización muestra que D52A también posee una estabilidad disminuída comparada con la de 6aJL2 (Fig: 6.22a), y es inclusive menos estable que R25G (Tabla: 6.5). La curva también muestra una sola transición, cuya pendiente es menor que las de 6aJL2 y R25G y por tanto su C_m es mayor que la de R25G. La región pre-transición muestra una pendiente pronunciada comparada con las otras dos proteínas, indicando una menor estabilidad, o al menos que el proceso de desnaturalización es evidente desde concentraciones de urea muy bajas. La región post-transición comienza alrededor de 3.75 M.

El análisis por SVD revela la presencia de un tercer vector significativo necesario para reconstruir la serie espectral en ambas mutantes. De la misma manera que en la proteína silvestre, los tres vectores son bien descritos por el modelo de dos estados y la consideración de los mismos implica la consideración de un ΔG_{N-U} mayor (datos no presentados).



(a)

Figura 6.22: Despliegamiento de 6aJL2 y dos mutantes a 25°C. Curvas de desnaturalización en urea de 6aJL2, R25G y D52A. Las curvas de desnaturalización de las mutantes están desplazadas a la izquierda respecto a la de 6aJL2, implicando una menor estabilidad termodinámica. Las pendientes en la región de la pre-transición son distintas; D52A muestra indicios de desestabilización a concentraciones muy bajas de urea.

Cuadro 6.5: Ajustes a Dos Estados, Mutantes.

Parámetros ¹	6aJL2	R25G	D52A
ΔG_{N-U}	5.18 ± 0.12	3.6 ± 0.85	2.94 ± 0.4
m_{N-U}	1.64 ± 0.04	1.63 ± 0.34	1.21 ± 0.04
Pendiente Nat. Base.	$0.11E+06 \pm 0.32E+05$	$-0.73E+05 \pm 0.52E+06$	$0.15E+06 \pm 0.11E+06$
Y-Int. Nat.	$0.46E+06 \pm 0.39E+05$	$0.19E+07 \pm 0.29E+06$	$0.6E+06 \pm 0.46E+05$
Pendiente Unf. Base.	$0.15E+06 \pm 0.21E+05$	$0.61E+06 \pm 0.19E+06$	$0.14E+06 \pm 0.28E+05$
Y-Int. Unf.	$0.7E+07 \pm 0.12E+06$	$0.76E+07 \pm 0.92E+06$	$0.32E+07 \pm 0.16E+06$
Temperatura (K)	298.15	298.15	298.15
$C_{1/2}$ ([D])	3.15	2.21	2.42

¹ Unidades de los parámetros y significados de las abreviaturas: ΔG_{N-U} : ΔG de desnaturalización (kcal mol^{-1}); m_{N-U} : pendiente de la transición desnaturalización ($\text{kcal/mol}/[\text{D}]$); Pendiente Nat. Base: pendiente de la línea base del nativo o pre-transición ($\text{kcal mol}^{-1} \text{M}^{-1}$); Y-Int. Nat.: Y-intercepto pre-transición (u. a.); Pendiente Unf. Base: pendiente de la línea base del desnaturalizado o post-transición ($\text{kcal mol}^{-1} \text{M}^{-1}$); Y-Int. Unf.: Y-intercepto post-transición (u. a.).

6.3.2 | Cinética.

Las cinéticas de re/des-plegamiento revelan comportamientos complejos en ambas mutantes con similitudes generales a la proteína silvestre, si bien se presentan diferencias notorias entre las tres proteínas. Para R25G, se recuperaron dos fases en el desplegamiento en el intervalo entre 1.75 y 3.75 M de urea y una sola fase a partir de 4 hasta 7 M (Fig. 6.23a). Del lado de la renaturalización se recuperan tres fases en el intervalo entre 0.75 y 2 M de urea, las fases rápida y media se fusionan entre 1.75 y 2 M y a partir de allí sólo dos fases son recuperadas hasta 4 M de urea (Fig. 6.23e). La sobreposición de las constantes observables de renaturalización de la fase intermedia y la fase rápida de desnaturalización en el intervalo entre 0.75 y 4 M es notable; las fases lentas de desnaturalización y renaturalización muestran el mismo comportamiento. Destaca la pendiente invertida de la rama lenta de renaturalización, *i.e.*, una pendiente propia de una desnaturalización en la región de renaturalización. Las amplitudes asociadas de las rama de renaturalización muestran un decremento de la fase rápida perdiéndola en 2 M de urea, misma concentración donde la fase media alcanza un pico convirtiéndose en la más importante, mientras que la fase lenta crece monótonicamente hasta volverse la más importante en 2.75 M y termina siendo la única fase presente a partir de 3.25 M en adelante (Fig. 6.23c).

En el caso de D52A, la desnaturalización es bien descrita por dos fases, como pasa con 6aJL2, mientras que la renaturalización es descrita por tres fases. La sobreposición de los datos de renaturalización y desnaturalización no es tan buena como en el caso de R25G; notoriamente, las pendientes de ambas ramas de desnaturalización son menores a las vistas para 6aJL2 y R25G (Fig. 6.23b). Las ramas de renaturalización muestran un

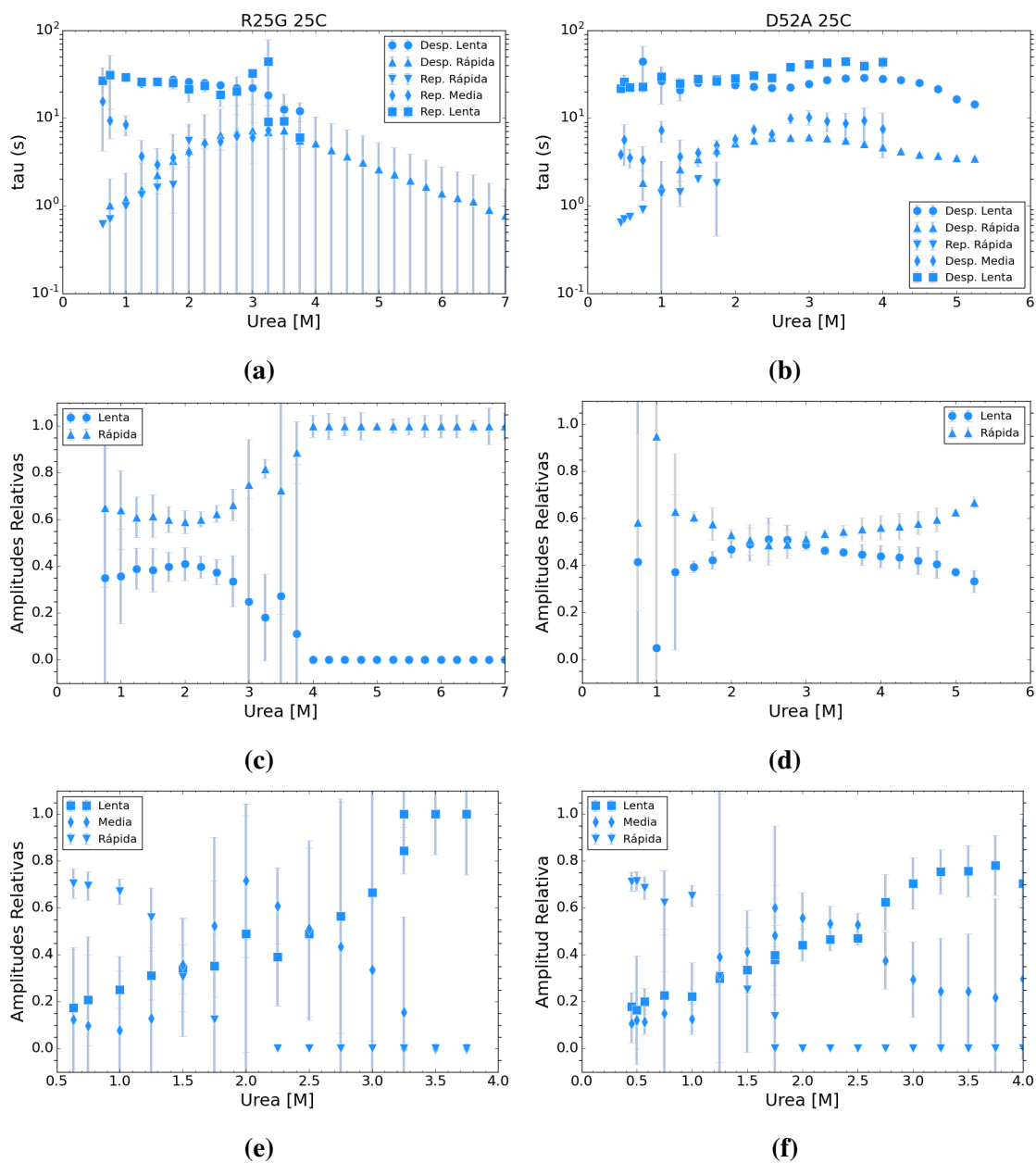


Figura 6.23: Gráficos de chevron y amplitudes de R25G (izquierda) y D52A (derecha). a) y b) son gráficos de chevron; un gráfico de chevron similar al de R25G fue reportado y analizado para la $\beta 2$ -microglobulina [86]. c) y d) son las amplitudes relativas en el replegamiento respectivamente. e) y f) son las amplitudes relativas en el desplegamiento. Las barras de error grandes hacia tiempos rápidos en a) son resultantes de la escala logarítmica y la propagación del error al trabajar con amplitudes pequeñas.

comportamiento general similar al de 6aJL2 y R25G con una fusión de las fases rápida y media alrededor de 1.5 M de urea y una rama lenta con claras desviaciones de la linealidad así como una pendiente baja, *i.e.*, independencia del desnaturalizante. Las amplitudes relativas asociadas muestran que inicialmente la fase rápida es la más importante pero decrece hasta perderse en 1.75 M de urea dando paso a las fases media y lenta. La fase media se vuelve la más importante en 2.00 M de urea y decrece después mientras que la fase lenta crece monótonamente hasta volverse la más importante en 2.5 M de urea. A diferencia de R25G, la fase media no desaparece al entrar al régimen de desnaturalización (Fig. 6.23d) y a diferencia tanto de 6aJL2 como de R25G la fase lenta es la que lleva una amplitud asociada mayor (Fig. 6.23f).

6.4 | Ensayos de fibrilogénesis.

Las cinéticas de formación de fibras amiloides de 6aJL2, R25G y D52A fueron ajustadas empleando AmyloFit [110]. Las vidas medias ($t_{1/2}$) son: 10.96, 4.04 y 4.04 hrs. respectivamente; los comportamientos de 6aJL2 y R25G son consistentes con los de reportes previos [30, 33] y se encontró que D52A pertenece al grupo de proteínas con gran tendencia a la agregación amiloide basados en este parámetro aparente (Fig. 6.24).

Si bien R25G y D52A muestran perfiles de formación de fibras amiloides muy similares, las pendientes en la región de la transición de ambas curvas parecen ser distintas; R25G parece comenzar un poco antes pero D52A muestra una velocidad mayor una vez que el proceso ha comenzado, sugiriendo mecanismos posiblemente distintos.

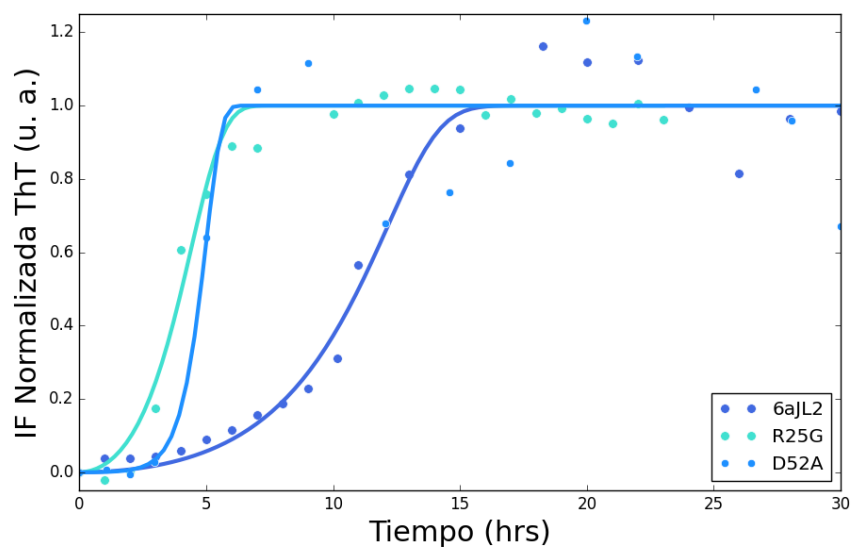


Figura 6.24: Fibrillogénesis de 6aJL2, R25G y D52A. Las líneas sólidas representan los mejores ajustes empleando un modelo de saturación-elongación-fragmentación seleccionado a través del criterio de error relativo promedio (MRE por sus siglas en inglés) en AmyloFit. 25°C, 100 mg/mL.

7 | Discusión

7.1 | Equilibrio.

La determinación de los parámetros fisicoquímicos de la reacción de plegamiento o desplegamiento es actualmente un proceso casi automático, sin mucho lugar a la discusión más allá de la interpretación física de los resultados. La mayoría de los laboratorios emplea el método ofrecido por Santoro y Bollen usando un ajuste no lineal por mínimos cuadrados a un modelo de dos estados [85]. Dicho método es una mejora al método previamente existente, conocido como método de extrapolación lineal, en el cual el proceso de extrapolación desde la región post-transición de una curva de desnaturalización acarrea incertidumbre [64]. En cualquiera de los casos, una práctica común en los laboratorios donde se practica la fisicoquímica de proteínas es no cuestionar los resultados obtenidos desde la perspectiva del método empleado para la determinación de parámetros, si acaso se busca una coincidencia entre ellos para justificar dichos resultados; en caso de obtener una diferencia significativa entre ambos métodos, la recomendación segura será repetir las determinaciones o caer en la mala práctica de obviar o excluir datos “problemáticos”.

Una estrategia común para dar mayor certeza en la determinación de los parámetros

termodinámicos de la reacción de desnaturalización es seguir un criterio de coincidencia en la determinación de los parámetros obtenidos a través de diferentes técnicas. Este criterio está fundamentado en la noción de que la coincidencia implica la convergencia de distintos formalismos matemáticos (correspondientes a las distintas técnicas) y por ende los resultados se toman con mayor confianza. Como ejemplo, en [30] se determinó el valor de ΔG_{N-U} por tres técnicas distintas: ajustando la curva de desnaturalización obtenida por IF y DC UV-cercano al modelo de dos estados de Santoro y Bolen [85] y ajustando los datos de desnaturalización térmica obtenidos por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC, por sus siglas en inglés) también a un modelo de dos estados. La coincidencia de los valores de ΔG_{N-U} resultantes fue tomada como argumento para apoyar la conclusión de que la desnaturalización de 6aJL2 a 25°C es bien descrita como un sistema de dos estados al equilibrio [30, 33].

En este trabajo analizamos los datos de IF tanto por longitud de onda única ($\lambda_{max} = 352 \text{ nm}$) como integrados, mostrando transiciones como las esperadas para un proceso de dos estados, con parámetros coincidentes con los previamente reportados (Tabla: 6.2) [7, 30, 33]. Comparando con otras técnicas, las tres longitudes de onda seleccionadas en el DC UV-cercano (272, 280 y 290 nm) muestran también una sola transición en las curvas de desnaturalización, las cuales parecen ser concomitantes (valores de $C_{1/2}$). Los ajustes individuales de estas curvas resultan en parámetros termodinámicos distintos para cada curva, particularmente para la de 280 nm en donde el ΔG_{N-U} , la m_{N-U} y la $C_{1/2}$ son bajos comparados con las otras dos longitudes de onda, aunque es posible reconciliarlas considerando los errores (Tabla: 6.1). Aún más, es posible reconciliar los parámetros obtenidos por IF y DC En apoyo a la interpretación de dos estados, resalta el hecho de que el

valor de la pendiente de la transición obtenida para la desnaturalización de 6aJL2 por IF a 25°C (Tabla: 6.2, m_{N-U}) se ajusta perfectamente dentro de la correlación entre la cantidad de superficie expuesta al solvente en la desnaturalización y el número de aminoácidos para muchas proteínas globulares reportada en [64].

Los casos en los que un modelo de dos estados no es empleado como primer recurso en un análisis de curvas de desnaturalización tienen que ser muy obvios, usualmente la presencia de más de dos estados al equilibrio resulta en curvas de desnaturalización con más de una transición [2, 89]. Desde la perspectiva estadística, los resultados obtenidos a través del empleo del modelo de dos estados deben ser comparados contra los resultados obtenidos empleando otros modelos. A pesar de no haber indicios obvios de la presencia de más estados en las curvas de desnaturalización de 6aJL2, en este trabajo ajustamos los datos (fluorescencia) a modelos de tres estados siguiendo este principio. Los ajustes a tres estados no mejoran lo obtenido con el modelo de dos estados y algunos de los resultados implican magnitudes en el ΔG_{U-N} que no son vistos o han sido reportados para proteínas del mismo tamaño ($\approx 12.0 \text{ kcal mol}^{-1}$) [64]. Sin embargo, uno de los ajustes al modelo $N \rightleftharpoons I \rightleftharpoons U$ arrojó un $\Delta G_{U-N} = 7.3 \text{ kcal mol}^{-1}$, con 5.1 y 2.2 kcal mol^{-1} asociados a la primera y segunda transición respectivamente; esto implicaría tener dos procesos de desplegamiento, el segundo a partir de una especie con menor estabilidad termodinámica como se espera para un intermediario. El valor total está fuera del rango de valores observados para dominios V_L amiloidogénicos (≈ 3.5 a 5 kcal mol^{-1}), pero está dentro del rango de valores observado para los dominios V_L en general (≈ 6 a 9 kcal mol^{-1}) [60]. Este resultado no fue descartado y resultó ser fundamental en la consecución de un modelo cinético adecuado.

Los análisis empleando modelos matemáticos como los de dos y tres estados permiten determinar con mayor o menor precisión los parámetros físicos considerados en ellos, pero imponen al mismo tiempo al conjunto de parámetros y al modelo del que se derivan. El criterio de bondad de ajuste del modelo permite solamente evaluar si el ajuste es bueno o no, y es necesario comparar con otros modelos para evaluar cuál de ellos es mejor (como se describió arriba). En diversos trabajos se han empleado análisis alternativos, libres de modelo, cuya ventaja reside precisamente en que no se busca imponer un modelo y se recuperan datos que pueden sugerir cuál modelo podría ser más conveniente. En este trabajo empleamos al SVD bajo tales consideraciones.

En el caso de la IF, el análisis por SVD resulta en tres vectores significativos. Los tres vectores son necesarios para reconstruir la serie original, *i.e.*, con sólo dos vectores no es suficiente, implicando que el tercer vector refleja un componente propio del sistema y no un artefacto (Fig. 6.8). En el caso del DC UV-cercano, los vectores significativos son sólo dos. Los ΔG_{N-U} y las pendientes de las transiciones de cada vector son concordantes en cada experimento, pero no entre experimentos, implicando distintas exposiciones de área accesible al solvente en cada técnica (Tabla: 6.3). La presencia de un tercer vector resultante del SVD en los datos de IF abre la puerta a la posibilidad de que se trate de un sistema de tres estados al equilibrio, lo cual implicaría a su vez un aumento en el ΔG_{N-U} que no había sido considerado antes, excepto en los ajustes a los modelos de tres estados mencionados arriba.

7.2 | Cinética.

Tanto las cinéticas de desnaturalización como las de renaturalización probaron ser multifásicas. Para llegar a tales resultados es necesario contrastar distintas metodologías en el análisis de los ajustes no lineales. Existe una variedad de software comercial capaz de ayudar en estas tareas, pero es importante no emplear cualquier software sin estar al tanto de sus capacidades específicas al ejecutar una rutina dada. Usualmente los softwares comerciales están orientados a atender una alta diversidad de procedimientos estadísticos y/o de cálculo, sacrificando especificidad en ciertas áreas. En este trabajo empleamos el software Savuka, diseñado específicamente para actividades de ajustes no lineales en el área fisicoquímica. Dicho software permite ejecutar el algoritmo de Marquardt-Levenberg (como otros) con la ventaja de que permite interactividad e iteratividad para mejorar los ajustes a través del seguimiento estadístico de los mismos, particularmente del seguimiento de la superficie de error del ajuste. Otra ventaja del empleo de este software es que permite abordar las rutinas de ajuste desde la perspectiva del análisis global, lo cual ayuda a una mejor determinación de parámetros. Aún con las ventajas otorgadas por Savuka en el análisis de los ajustes, el conjunto de datos cinéticos de 6aJL2 demostró ser un reto precisamente por su naturaleza multifásica, particularmente en la renaturalización en donde la presencia de distintos regímenes (tri y bifásicos) no permite el análisis de manera global en todo el rango de concentraciones de urea [96].

Como resultado de la naturaleza multifásica de las cinéticas de plegamiento y desplegamiento de 6aJL2, el gráfico de chevron muestra una dispersión de puntos que tuvo que ser analizada y contrastada contra experimentos que dieran luz sobre la naturaleza de cada

una de las componentes o ramas en dicho gráfico. Los puntos corresponden a las constantes de velocidad observables de los trazos cinéticos, y son presentados en su versión logarítmica en un esfuerzo por linearizar tendencias a todas luces no lineales en el caso de 6aJL2. En casos más sencillos, dichas tendencias sí presentan un comportamiento lineal en el gráfico de chevron [56].

En cuanto al desplegamiento, tanto la presencia de dos ramas en el gráfico de chevron como la rápida desaparición de la amplitud asociada a la fase rápida en función de la urea sugieren la presencia de un intermediario cinético. Para comprobar esto se realizaron desnaturalizaciones variando la cantidad de urea inicial, esperando que la presencia del intermediario se revelara al observar la desaparición de una de las fases en función de la urea dada la menor estabilidad termodinámica de un intermediario comparada con aquella del estado nativo [17, 47]. Los resultados fueron parcialmente diferentes a lo esperado ya que no se observó la desaparición completa de una de las fases hasta concentraciones altas de urea (Fig: 6.14). Se observó la pérdida de amplitud de la fase rápida y su desaparición sólo hasta concentraciones altas de urea junto con el aumento en amplitud de la fase lenta (principal) en la región del nativo (0 - 2 M), lo cual sugiere la existencia de una población pequeña pero significativa de una especie no-nativa en condiciones nativas que desaparece en altas concentraciones de urea (como un intermediario). En cuanto a las dos constantes de velocidad resultantes, éstas fueron concordantes entre todas las concentraciones iniciales de urea, y con las cinéticas de desplegamiento sencillas, implicando que el sistema se comporta como se esperaba dado que las constantes de velocidad no dependen de la concentración inicial de desnaturalizante. Los dos puntos anteriores sugieren que se trata de un mecanismo secuencial dado que un mecanismo paralelo implicaría la disminución

de las amplitudes de ambas fases de manera concomitante [17]. El inesperado aumento de amplitud de la fase lenta sugiere que un desplazamiento o cambio en la vía de desplegamiento se está presentando dado que hay una contribución a esta fase no contemplada previamente (Fig: 6.14).

En términos del replegamiento, la presencia de múltiples fases también obliga a esclarecer el origen de las mismas. La presencia de ramas lentas (10 - 100 s a 25°C) en el replegamiento ha sido asociada a fenómenos de heterogeneidad en el estado desnaturalizado en múltiples publicaciones, particularmente con isomerización de prolina; si bien, el diagnóstico completo incluye una dependencia casi nula de dicha rama con el desnaturalizante en los ejemplos canónicos. En el caso de 6aJL2, el criterio temporal se cumple a cabalidad, a diferencia del criterio de dependencia del desnaturalizante. No obstante, los experimentos de doble salto y empleando prolil-isomerasa (Cyp18) confirman que dicha reacción está presente en el replegamiento de 6aJL2. Esto resultó particularmente interesante ya que la estructura cristalográfica no muestra ninguna de las prolinas en configuración *cis* ($\sigma = 2.0$). Con esto en consideración, el único origen posible para dicha isomerización yace en el ensamble desnaturalizado, en específico durante la incubación en altas cantidades de urea necesaria para realizar los experimentos de renaturalización. Este fenómeno no ha sido reportado muchas veces en la literatura, si bien es conocido y físico-químicamente factible [37]. La desviación del comportamiento clásicamente reportado para la isomerización de prolinas observado en el gráfico de chevron de 6aJL2, y el análisis de las amplitudes asociadas, hace evidente que dicho fenómeno no involucra a la mayoría de las moléculas de la población.

Otro posible origen de la heterogeneidad en el estado desnaturalizado es un efecto de

concentración. Típicamente, las inmunoglobulinas forman parte de complejos llamados anticuerpos, por tanto los fenómenos de asociación están codificados en la estructura y la secuencia de estas proteínas. Como ejemplo, se debe considerar que estas proteínas tienen una tendencia intrínseca a la agregación y esto debe ser controlado cuidadosamente durante la realización de los experimentos. En el caso de 6aJL2 no detectamos evidencia de asociación debida a la concentración. Por tanto, la presencia de múltiples fases así como las desviaciones de la linealidad de las ramas de renaturalización en el gráfico de chevron de 6aJL2 pueden ser explicadas por la presencia de intermediarios cinéticos y una reacción de isomerización de prolinas en el estado desnaturalizado. Un tercer posible origen de la heterogeneidad y lentitud del replegamiento puede estar sustentado en la presencia del puente disulfuro formado, ya que no se rompió durante el desplegamiento con urea. La presencia de esta interacción en el estado desnaturalizado equivale a la formación prematura de interacciones terciarias similares a las nativas y a la reducción de la flexibilidad de la cadena previo a la isomerización de prolinas; esto fue sido asociado a un desfavorecimiento o desaceleración del plegamiento de la ribonucleasa T1 [46]. En el caso de 6aJL2, la mutagénesis de las cisteínas que forman el puente disulfuro resultó en una expresión nula. El rompimiento del enlace disulfuro por métodos químicos y su efecto en el plegamiento no fueron investigados en este trabajo.

7.3 | Modelo cinético.

La obtención de un modelo cinético capaz de explicar las observaciones hechas arriba no es un trabajo trivial, se requiere de múltiples rondas de comparación de múltiples mo-

delos con los datos experimentales y de refinamiento del modelo. Se debe tener en cuenta que cada nueva reacción considerada en el modelo implica el alejamiento de la obtención de una solución analítica para dicho modelo. Una de las mayores complicaciones es encontrar la relación adecuada de las constantes de velocidad microscópicas que dan origen a las constantes de velocidad observables. Aún más, se debe tener en cuenta que los métodos cinéticos empleados para caracterizar reacciones químicas nunca pueden demostrar un mecanismo, sólo son capaces de de excluir mecanismos que no son consistentes con las observaciones experimentales [17].

Para la obtención del modelo presentado en este trabajo empleamos una aproximación, guiada por los principios del análisis global, *i.e.*, se trató de considerar toda la información tanto termodinámica como cinética disponible. Comparamos modelos a partir de tres especies en adelante con los datos experimentales. Si bien, los resultados mismos excluyen a los modelos de tres estados como modelos capaces de reproducir las observaciones experimentales, esto último se debe a que los fenómenos que explican la presencia de las múltiples ramas en el gráfico de chevron implican la presencia de al menos cuatro especies o conformaciones (a decir: N, I, U_c, U_t).

También se consideraron los modelos reportados para la $\beta 2$ -microglobulina y para el dominio variable de MAK33 [60, 105] como posibles soluciones. Ambos modelos son más complejos que los modelos de cuatro estados ya que consideran a cinco especies/conformaciones, pero la naturaleza y las relaciones entre ellas difiere (Figs: 1.15, 6.17b). Ninguno de los dos modelos fue capaz de describir las observaciones experimentales de 6aJL2; sin embargo, el modelo resultante contiene secciones similares a ambos modelos, *i.e.*, es una mezcla de ellos. Notablemente, el modelo de cinco especies capaz

de describir los datos experimentales de 6aJL2 (Fig: 6.19) logra una mayor precisión en la determinación de los parámetros cinéticos (constantes microscópicas) en virtud de la ausencia de isomerización de prolinas proveniente del estado nativo (Tabla: 6.4). Esta última característica evita una determinación precisa de los parámetros cinéticos de un par de reacciones en el modelo reportado para MAK33, una cadena ligera también [60]. Para lograr que el modelo resultante fuese capaz de describir los datos experimentales fue necesario considerar un ΔG_{U-N} mayor al comúnmente reportado para la desnaturalización de 6aJL2, dicho ΔG_{U-N} fue considerado a partir de los resultados de los ajustes a modelos de tres estados de la curva de desnaturalización (Fig: 6.20).

En el modelo resultante resalta la presencia de una especie nativa alterna (N^* o N^s), así como su relación con el estado nativo clásico, inferida a través de los análisis de las cinéticas de desnaturalización de 6aJL2. Dicha conformación resulta ser más compacta que la del estado nativo mayoritario, como se deduce del valor m de dicha reacción, y difiere en alrededor de 1 kcalmol^{-1} en estabilidad, implicando la formación y rompimiento de varias interacciones en ese proceso. Así mismo resalta el componente de isomerización en el estado desnaturalizado, que como ya se apuntó, no ha sido comúnmente reportada en la literatura. El último elemento a resaltar en dicho modelo es la presencia de un intermediario, que relaciona a las dinámicas presentadas en el estado nativo y en el estado desnaturalizado. Dicho intermediario además presenta las características de un estado no-nativo, como se infiere de los valores m de las reacciones en las que participa. Esta característica del intermediario es una diferencia importante al comparar con las especies intermedias reportadas para MAK33, en donde al menos una de ellas posee características nativas (compacto o plegado; Tabla: 6.4).

7.4 | Mutaciones y fibras amiloides.

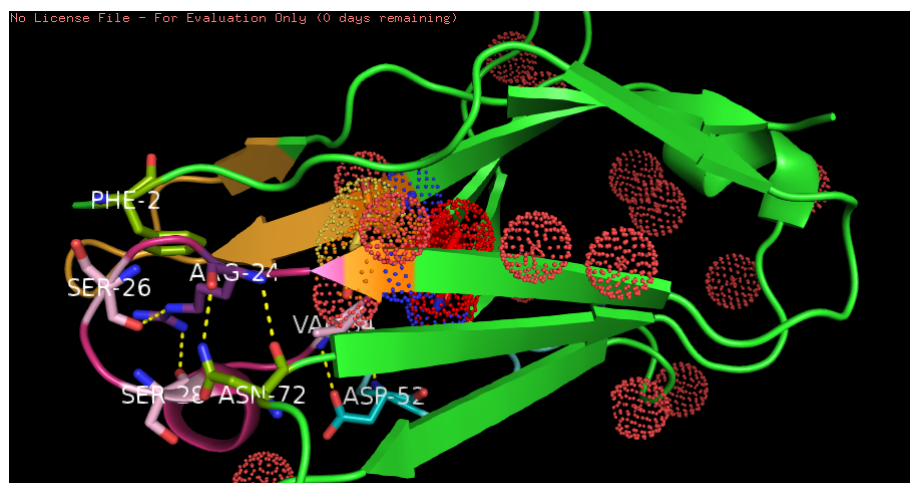
En la realización de este trabajo no pasó desapercibido que muchas de las mutaciones reportadas para 6aJL2 o sus variantes corresponden a mutaciones en la región de los “giros de estabilidad”, las mutaciones reportadas aquí también pertenecen a esas regiones. En los estudios relacionados a mutaciones en otros modelos, descritos en la introducción, los criterios para seleccionar a las mutaciones están orientados en general a modificar la estabilidad termodinámica, ya sea en los “motivos de protección” o en la región de giros BC, C’C”, FG, DE [31, 87]. En esa región de 6aJL2 destacan la presencia del amino-terminal y el CDR1, esta última subregión por contener la posición R25 y la anterior por contener al residuo Phe2. Se ha propuesto que la modificación de la interacción de esa pareja de residuos es responsable del potencial fibrilogénico de R25G [33]. La región en general contiene 11 de las 14 diferencias con la proteína AR, otra cadena ligera altamente amiloidogénica [7].

Las regiones hipervariables no han sido consideradas históricamente como sitios a explorar en términos mutagénicos, debido precisamente a su naturaleza variable, se considera que son capaces de acomodar una cantidad importante de cambios sin afectaciones ya sea a la estabilidad o a la fibrilogénesis. Sin embargo, Dealwis *et al.* [52] describieron que los dominios V_L son vulnerables a desestabilización en distintos sitios, incluyendo los CDRs, y otros trabajos apuntan a cómo mutaciones en otras regiones pueden afectar a las regiones hipervariables. En [87] se propone que las afectaciones en la hebra G podrían dar origen a afectaciones del giro C’-C” ya que la hebra G está altamente conectada con el giro D-E, y éste a su vez con el CDR1, involucrando a toda la región de giros de estabilidad de la

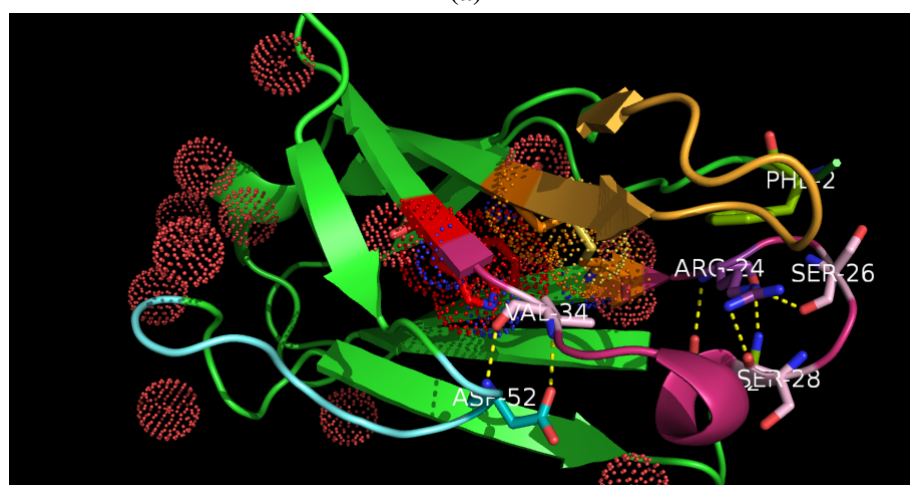
proteína. Tanto el CDR1 como la hebra C han sido propuestas también como “hotspots” de fibrilogenicidad en función de análisis bioinformáticos, de experimentos de proteólisis y de análisis de dinámicas moleculares [10, 29, 91]. Otras posiciones a explotar son los residuos hidrofóbicos expuesto en la superficie ya que pueden contribuir a una solubilidad disminuida o a una propensidad a la agregación [52].

La mutación D52A fue considerada en este trabajo por cumplir con distintos criterios que tratan de englobar las observaciones hechas arriba: se localiza en otra de las regiones hipervariables, el CDR2 (giro C'-C''); se encuentra cerca de una región en donde se encuentran cambios naturales en la línea germinal (caso de la proteína AR, giro C''-D); su cadena lateral no está expuesta al solvente en 6aJL2, y funciona como “agarradera” en la región estabilizando a la región del CDR1 (Fig: 7.1b).

A pesar de la distancia en secuencia y de la distancia estructural, las posiciones R25 y D52 están relacionadas. Las cadenas laterales de ambos residuos se conectan a través de una red de puentes de hidrógeno con los residuos Asn32 e Ile29 y dos moléculas de agua estructurales. Asn32 e Ile29 se localizan en el giro B-C y son parte de una pequeña hélice alfa (CDR1), mientras que R25 se localiza al inicio del giro B-C o final de la hebra B. En la mutante R25G dicha red de puentes de hidrógeno se interrumpe del lado donde debía estar la arginina; este residuo contribuye con tres puentes de hidrógeno en la proteína silvestre: un puente que conecta con el giro B-C, otro con la cadena lateral de Asn32 y el último con la cadena principal de Asn32 a través de un agua estructural. La formación de una pequeña cavidad también es resultado de la mutación, así como una reorientación sutil del giro F-G completo. Por su parte, D52 conecta también con la cadena principal de Asn32 a través de una molécula de agua estructural y con la cadena principal de Val34. La hélice alfa del



(a)



(b)

Figura 7.1: Agarraderas o “clamps” y desplegamiento a 25°C. a) y b) “Giros de estabilidad” en primer plano, rotación de 180° en el plano X, Trp35 (rojo) y puente disulfuro (naranja o amarillo) como referencia. En naranja el CDR3. a) Interacciones de R24. En violeta la región CDR1, en rosa los residuos del CDR1 que interactúan polarmente con la cadena lateral de R24; en amarillo limón Phe2 y Asn72. b) Interacciones de D52. En azul el CDR2, conteniendo a D52, en rosa V34 (CDR1).

giro B-C interactúa directamente con el giro D-E a través del residuo Asn72 y con el giro C'-D vía el residuo D52, a través de una molécula de agua estructural. D52 conecta con la cadena principal de Ile29 a través de un agua estructural. La cadena principal de Ile29 forma un puente de hidrógeno con el agua estructural que conecta la cadena lateral de R25 con la cadena principal de Asn32 (Figs: 7.1a, 7.1b). Como consecuencia de la mutación (R25G), la cadena lateral de Ser31 rota hacia dentro de la cavidad evitando la formación de un puente de hidrógeno con Ser28 al inicio de la hélice alfa en el giro B-C, y la cadena principal de Asn32 forma un nuevo puente de hidrógeno con la cadena lateral de Ser93 a través de un agua estructural. También se pierde el puente de hidrógeno entre las cadenas laterales de Arg24 y Asn32. La Phe2 ocupa parte del espacio dejado por la cadena lateral de R25 (PDBs: 2W0K -cadena A-, 5JPJ) [7, 10, 87, 91].

Los resultados de las mediciones termodinámicas y cinéticas indican que la mutación D52A provoca un efecto muy parecido al de R25G, tanto en términos de estabilidad como de fibrillogénesis (Figs: 6.22a, 6.24, Tabla: 6.5). Las cinéticas de plegamiento coinciden con las de 6aJL2 en mostrar comportamientos complejos, especialmente en el replegamiento. D52A muestra un patrón similar general al de 6aJL2, con tres ramas de replegamiento y dos ramas de desplegamiento, pero la pérdida de pendiente de algunas ramas en función del desnaturalizante sugiere que las conformaciones involucradas son más parecidas que en el caso de 6aJL2. En el caso de R25G el gráfico de chevron muestra una rama de renaturalización con pendiente negativa, implicando un proceso de desplegamiento en condiciones nativas. El mismo gráfico muestra que el desplegamiento es bien descrito por una sola rama, implicando la posible ausencia de especies nativas extra o intermedias. Ambos casos deben ser analizados cuidadosamente para extraer información sobre el efecto preci-

so de las mutaciones en el mecanismo de plegamiento en relación al mecanismo de 6aJL2. Notablemente, el análisis de las amplitudes asociadas a las cinéticas de replegamiento de ambas mutantes coinciden en una observación importante, en ambas proteínas se aprecia una cantidad de intermediario mayor en el rango de concentraciones donde anteriormente se describió la presencia de un intermediario en 6aJL2 (Fig: 6.23) [30].

En conjunto, la evidencia recolectada hasta ahora sobre ambas mutaciones parece apuntar a una afectación en la zona de los giros de estabilidad o “hotspots”. R25 y D52 parecen funcionar como “agarraderas” de la alfa hélice contenida en el CDR1, interactuando con el final y el inicio de la hélice respectivamente. Dicha hélice interactúa con los otros giros presentes en la región, por lo cual su desestabilización puede extenderse a otras regiones, por ejemplo, en el caso del cristal de R25G se observan modificaciones de la red de puentes de hidrógeno y de varias cadenas laterales que tratan de compensar la pérdida de la cadena lateral de la arginina como se describe arriba. Del otro lado, en el caso de la mutación D52A (sin estructura cristalográfica a la fecha), el reemplazo por alanina puede causar la pérdida de dos o tres puentes de hidrógeno que relacionan al giro C'-D con el CDR1 y la hebra C, como se sugiere en [29]. Un efecto compensatorio podría venir sólo de la hebra D o del giro D-E, dada su proximidad física; sin embargo, el residuo más cercano que podría ocupar un espacio es Ile67, un aminoácido hidrofóbico incapaz de formar puentes de hidrógeno con su cadena lateral. La introducción de una alanina en la posición 52, terminaría por formar una zona completamente hidrofóbica junto con Ile29, Ala30 e Ile67, provisto que las distancias se reduzcan lo necesario. Glu51 y Asn53 podrían también ocupar el sitio dejado por D52, esto requeriría un desplazamiento significativo del giro C'-D (PDBs: 2W0K, 5JPJ).

En términos de fibras amiloides, recientemente se determinó la estructura a nivel atómico de fibras amiloides provenientes de cadenas ligeras derivadas de pacientes a través de crió-microscopía electrónica (CRYO-EM), una de dichas estructuras a partir de muestras *ex-vivo* (Fig: 7.2) [83, 84]. Basados en las estructuras de éstas y otras fibras se empieza a reconocer una tendencia en la que la variabilidad de estructuras de las fibras puede ser alta (polimorfismo) y esto puede dificultar la identificación de patrones generales [104]. A pesar de ello, consideramos que es válido especular con que la posible estructura de las fibras amiloides de 6aJL2 (sin estructura fibrilar a alta resolución reportada a la fecha) será un caso similar al de los modelos ya resueltos [83, 84]; esto debido a que uno de los modelos de fibras proviene de una cadena ligera tipo $\lambda 1$ (LOC, Fig: 7.3) y el otro de una cadena ligera $\lambda 6$ (AL55). Estas cadenas presentan un 61 y 88 % de identidad de secuencia con 6aJL2, respectivamente. En cuanto a la similitud estructural de los dominios plegados, la superposición de los modelos 2W0K (cadena B, 6aJL2) y 1BJM (LOC) resulta en un RMSD de 0.76 Å para 91 pares de residuos y asciende a 2.07 Å para 109 pares; la mayor variabilidad se observa en las regiones de los giros. AL55 no tiene estructura reportada. Particularmente, las fibras de 6aJL2 pueden ser parecidas a las de AL55 dado que en [32] se reporta un cambio extensivo para R25G y en [34] se encontró que el amino terminal de 6aJL2 está protegido o escondido en el estado fibrilar, característica distintiva en las fibras de AL55 (Fig: 7.2).

Es evidente que los cambios estructurales a partir del estado nativo son extensivos, para todos los modelos mencionados, mostrando una conformación mucho más abierta sin llegar a ser desordenada completamente, de hecho se preservan secciones con hebras beta (Figs: 7.2c, 7.3a). Basados en la topología general de las fibras reportadas hasta ahora,

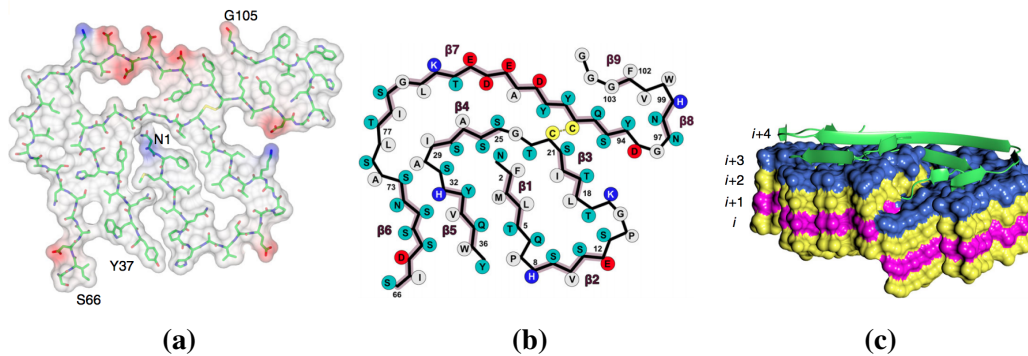


Figura 7.2: Estructura de Fibras Amiloides AL55. a) Representación de palos con superficie electrostática traslúcida. Se distinguen amplias regiones neutras y el amino terminal en el centro de la fibra. b) Representación esquemática del empaquetamiento de la fibra. Gris: hidrofóbicos, Rojo: ácidos, Azul: básicos, Turquesa: polares. c) Representación del apilamiento de unidades. se distingue una protuberancia al centro. La unidad $i+4$ está representada como listón y muestra las regiones β en la fibra. Tomadas de [84].

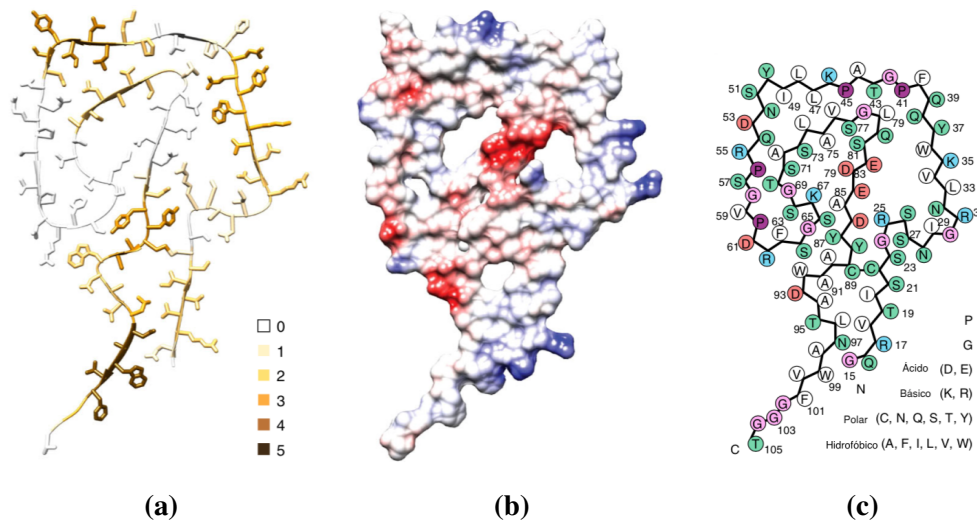


Figura 7.3: Estructura de Fibras Amiloides LOC. a) Representación de listón y palos en una escala de agregación (0-5). Se distinguen regiones β . b) Representación electrostática de la superficie de la fibra. c) Representación esquemática del empaquetamiento de la fibra. Tomadas de [83].

se le empieza a llamar “forma de concha de caracol” o “cabeza de carnero” en general porque una sección de la proteína está envuelta en otra(s). Destacan la presencia de regiones hidrofóbicas, *i.e.*, secciones con residuos hidrofóbicos que se encuentran frente a frente, así como la disposición externa de la mayoría de los residuos cargados. Algunas secciones hidrofóbicas están encontradas con secciones polares también. Algunos de los residuos cargados o polares en las regiones internas parecen ser responsables de generar los espacios vacíos que se aprecian en los distintos modelos. En todos los casos, el puente disulfuro está intacto, si bien se reporta una isomerización del mismo en el caso de las fibras de la cadena tipo $\lambda 1$. Las posiciones R25 y D52 parecen no ser relevantes para las fibras de ningún modelo, su importancia radicaría en estabilizar al CDR1 en el estado nativo de 6aJL2. Aún más, en el caso de las fibras de AL55 ($V_L\lambda 6$) la sección que contiene a la posición D52 no está resuelta, lo cual no altera la integridad del resto de la fibra (Figs: 7.2, 7.3). La última característica de los agregados fibrilares es el apilamiento, si bien las representaciones ofrecidas parecen mostrar apilamientos altamente simétricos, en la extensión de los mismos a través de software especializado, la resultante son largas elongaciones con giros como los observados en micrografías electrónicas. Sólo el modelo proveniente de AL55 ha resaltado la naturaleza no-planar de dicho apilamiento (Fig: 7.2c) [84].

Con esta evidencia en mente, cabe recordar que el intermediario encontrado para el mecanismo de plegamiento de 6aJL2 posee características de conformaciones abiertas, lo cual abre la oportunidad para que el mismo sea un paso obligado entre el estado nativo y el estado fibrilar.

8 | Conclusiones

1. Como resultado principal de ésta investigación se obtuvo un mecanismo de plegamiento para 6aJL2 a 25°C, el cual revela que ésta proteína presenta una dinámica conformacional compleja en condiciones estándares y tiempos cortos de incubación. En dicho mecanismo destaca lo siguiente: a) el mecanismo involucra al menos cinco conformaciones distintas; b) existe una reacción de isomerización de prolina acompañada de un cambio conformacional en el estado desnaturalizado; c) existe una especie o conformación intermediaria mas “abierta” que las del ensamble nativo; d) el ensamble nativo contiene al menos dos conformaciones, la segunda conformación reportada en éste trabajo es similar a la que se concebía como nativa, pero más compacta.

Los resultados de los ajustes de las desnaturalizaciones químicas al equilibrio considerando una tercera especie o conformación apoyan a los resultados cinéticos. Aún cuando el ajuste de los datos de desplegamiento y replegamiento a modelo de dos estados ($N \rightleftharpoons U$) son estadísticamente equivalentes a los ajustes al modelo de tres estados ($N \rightleftharpoons I \rightleftharpoons U$) y el principio de parsimonia simple sugiere considerar el modelo más simple como válido, la evidencia es insuficiente para descartar el modelo de tres

estados. El ΔG obtenido a través del ajuste al modelo de tres estados concuerda con el ΔG necesario para que el modelo cinético describa bien los datos experimentales. El modelo cinético presentado aquí es el modelo mas sencillo encontrado por los autores que es capaz de describir bien los datos.

2. La presencia de un intermediario cinético con características “abiertas” o desplegadas abre la posibilidad de que dicho estado sea un eslabón entre el plegamiento y la formación de fibras amiloides, como se ha comprobado con otros modelos.
3. La mutagénesis individual o conjunta de los residuos que forman el único puente disulfuro de la proteína (Cys22 y Cys91) resulta en agregación inespecifica (formación de cuerpos de inclusión) durante la expresión de la proteína, dificultando su posterior estudio. Esto implica que el puente disulfuro es necesario para mantener la integridad estructural del estado nativo de 6aJL2. Por otra parte, se encontró que las mutaciones R25G y D52A tienen un impacto negativo en la estabilidad termodinámica de la proteína y se encontró que elevan ta tasa de formación de fibras amiloides, aunque, notablemente, su impacto no es equivalente, lo que supone un papel adicional y distinto para cada uno en el proceso de agregación. Esto último se debe posiblemente a las afectaciones sobre las posiciones donde se encuentran los residuos R25 y D52, que establecen contactos con la región del CDR1 en la estructura nativa, una región propuesta como pro-amiloidogénica. Siendo así, la importancia de dichos residuos radicaría en estabilizar a la conformación nativa.
4. A pesar de que ambas mutaciones reportadas aquí, R25G y D52A, presentan tanto una estabilidad termodinámica reducida así como una tasa de formación de fibras

amiloides mayor en comparación con la proteína “silvestre”, se concluye que la hipótesis termodinámica no explica la mayor propensión a formar fibras amiloides en cadenas ligeras. Dicha hipótesis plantea que las proteínas de menor estabilidad termodinámica son más propensas a la formación de fibras amiloides. Desaconsejamos el empleo del ΔG de la reacción de plegamiento como parámetro de la propensión de una proteína a la formación de fibras amiloides, dado que existen varios reportes de lo contrario. Se recomienda hacer una disección de las distintas contribuciones al ΔG , particularmente desde la perspectiva cinética, i.e., tratando de encontrar a todas las posibles conformaciones participantes en los procesos así como las relaciones entre ellas. A partir de dichos datos es posible evaluar la importancia de cada especie en sus respectivos procesos y al variar las condiciones se pueden establecer las relaciones con la formación de fibras amiloides. Las especies intermedias son particularmente importantes ya que son reportadas habitualmente en los mecanismos de plegamiento de proteínas amiloidogénicas; dichas especies poseen características estructurales (contenido de estructura secundaria) que se conservan en las estructuras de fibras amiloides reportadas recientemente.

5. Es necesario continuar con los estudios mutacionales sobre 6aJL2 para poder establecer una relación mas clara y amplia del plegamiento con el fenómeno amiloide. Así mismo, es necesario continuar con los estudios sobre las variaciones de las condiciones de medio y sus efectos sobre el plegamiento de 6aJL2, principalmente con los estudios donde se varía la temperatura para poder describir el fenómeno en condiciones más cercanas a las condiciones fisiológicas. Como parte de este trabajo se realizaron estudios preliminares en ambos sentidos, los resultados de los mismos

arrojan una diversidad y complejidad que invitan a ser cuidadosos con los análisis y sus interpretaciones. El esfuerzo experimental requerido para lograr tal objetivo es considerable, además es imperativo tener acceso a otras técnicas como dispersión de rayos-X de ángulo pequeño (SAXS) o NMR para poder aportar mayor evidencia sobre las conformaciones participantes.

9 | Epílogo

Recientemente, una empresa dependiente de Google llamada Deepmind ha publicado un algoritmo capaz de predecir las estructuras de proteínas a partir sólo de la secuencia de aminoácidos con niveles de precisión superiores al 90%. Dicho algoritmo se conoce como AlphaFold2 [21]. El Baker Lab en la Universidad de Washington lanzó casi simultáneamente otro algoritmo con capacidades similares, conocido como RoseTTAfold [113]. Ambos desarrollos serán las piedras angulares de la biología estructural en los años por venir, incluso se han publicado varios trabajos alrededor de dichos algoritmos ya, e inmediatamente se han acuñado términos *ad hoc* para el estudio de los resultados y el comportamiento de dichos algoritmos, e.g., “alphafolding”.

El avance científico es mayúsculo, obteniendo distinciones y reconocimientos por parte de la comunidad científica de manera inmediata. El lanzamiento de Alphafold2 se realizó sólo dos años después de su primera aparición en el concurso CASP y se hizo a través de una campaña mediática que aseguraba que “el problema del plegamiento de proteínas estaba resuelto” (ver [Deepmind](#)). Las discusiones en foros y redes sociales sobre dicha proclama han sido interesantes de sobre manera dado que no es la primera vez que alguien o algún grupo hace reclamos similares y no se ha llegado a un consenso en tales ocasiones.

Por tanto, la duda con AlphaFold2 estaba justificada desde antes del lanzamiento.

Dado que tanto el plegamiento de una proteína específica como la relación de este proceso con el origen de una enfermedad son los temas centrales de esta tesis, la participación en la discusión de que si efectivamente se ha resuelto el plegamiento de proteínas resulta obligada. Nuestra opinión es que no se ha resuelto dicho problema. A continuación se plantean algunas ideas y argumentos de los que estamos al tanto y que nos llevan a mantener dicha posición.

Una parte medular de la discusión ha discurrido en la semántica, en particular en la enunciación del problema del plegamiento de las proteínas. Se atribuye a Christian Anfinsen y colaboradores el planteamiento del problema en una serie de artículos a finales de los 1950s y principios de los 60s. Dicha investigación fue reconocida con el premio Nobel en 1972. Recientemente, David Eisenberg recuperó una historia sobre Lisa Steiner y su asesor Frederic Richards, quienes realizaron experimentos similares alcanzando conclusiones también similares un par de años antes, pero admiten no haber reconocido la importancia de tales conclusiones en aquella época dejando dichos datos en la tesis de Steiner [35]. Según Eisenberg, no haber reconocido la importancia de sus resultados tiene como origen la falta de contexto, y hace énfasis particular en que la pregunta ni siquiera había sido planteada en tal momento. Siendo así, el planteamiento atribuido a Anfinsen dicta que toda la información requerida para alcanzar una estructura nativa está contenida en la secuencia del polipéptido. Se conoce a esto como la vertiente o hipótesis termodinámica del problema, dado que la estructura nativa está definida en términos de la energía libre de Gibbs, *i.e.*, en términos termodinámicos. Es sobre esta vertiente que se desarrolló la idea de predecir la estructura nativa a partir de la estructura primaria o secuencia, y

este es el logro alcanzado por AlphaFold2 y RoseTTAfold; insistimos que no es un logro menor y se ha reconocido como “logro del año” por la revista Science, superando inclusive los desarrollos de vacunas para paliar la pandemia en curso de Covid-19 (ver [Science Breakthrough, 2021](#)) [40].

Para llegar a tal logro, fue necesario el desarrollo y crecimiento de la base de datos de proteínas conocida como PDB (Protein Data Bank) . La acumulación de información y crecimiento de dicha base ha tomado alrededor de 50 años y una inversión estimada de 10 billones de dólares, con participación de un sin fin de científicos alrededor del mundo que han determinado las estructuras atómicas de decenas de miles de proteínas [6, 8]. De esta base de datos es que se nutren ambos algoritmos, para después transformar información evolutiva en forma de alineamientos múltiples de secuencias así como la información estructural y reconocer los patrones que originan a los distintos segmentos de una proteína y a las cadenas completas [21, 113]. Notablemente, una nota precautoria en las pautas de uso de AlphaFold2 pide tener cuidado con los resultados obtenidos empleando dicho algoritmo, dado que las cadenas principales parecen ser aproximadas exitosamente, en contraste con las posiciones de algunas de las cadenas laterales de los aminoácidos que no son bien aproximadas, especialmente cuando se modelan mutaciones ([FAQ Alphafold](#)) [71].

John Jumper, autor principal del artículo de AlphaFold2, presentó el algoritmo en el simposio #35 de la Protein Society celebrado en 2021 (al igual que en otros eventos), destacando el alcance del mismo. Lo han empleado en un par de trabajos subsecuentes para reportar las estructuras tridimensionales de los proteomas completos de humano [23] y otros organismos (de nuevo, un trabajo excepcional). Sin embargo, el mismo autor reconoció en dicho evento que AlphaFold2 no atiende, ni tiene intenciones de hacerlo, a la

segunda vertiente mayor del problema del plegamiento de proteínas.

La segunda gran vertiente está relacionada a la otra máxima del problema, enunciada por Cyrus Levinthal, en la que se plantea que el plegamiento de una proteína no puede ser una búsqueda al azar dado que tomaría tiempos astronómicos para completarse, y claramente eso entra en conflicto con el fenómeno biológico observado en los seres vivos. Por tanto, debe haber “guías o conformaciones” favorecidas así como fuerzas predominantes en los procesos que dirigen la compactación del polipéptido. Esto abrió la puerta a la concepción moderna del problema al considerar la existencia de entidades como los intermediarios de plegamiento y barreras energéticas. A esta vertiente se le puede considerar como la vertiente dinámica o cinética del problema.

Ambas vertientes del problema han sido conceptualizadas y estudiadas como reacciones químicas (como se ha hecho en este trabajo). Se dice que el estudio de procesos desde la perspectiva termodinámica sólo atiende a estados finales, como la secuencia primaria y la estructura tridimensional (lo que resuelve AlphaFold2), mientras que el estudio de los procesos desde la perspectiva cinética o dinámica (específicamente reacciones) involucra el esclarecimiento de mecanismos, o lo que es lo mismo, involucra describir como ocurren las reacciones. Ambas áreas han sido estudiadas y expandidas notablemente desde que se planteó el problema. Si bien, un sector de los investigadores concentrados en la vertiente cinética ha profundizado en la concepción del problema hasta plantear que el objetivo final es lograr una descripción detallada de los mecanismos (por que se reconoce que no hay un mecanismo universal) lo cual implica la determinación tanto de el número y naturaleza de las reacciones involucradas así como su relación y las constantes cinéticas asociadas, alcanzando a los parámetros derivados de las mismas constantes como las barreras energé-

ticas y las energías libres de cada reacción, se incluye a los estados de transición también y sus posibles estructuras. Los conceptos modernos derivados de los estudios de FRET incluyen también a las llamadas “transition paths” [17, 114]. Con respecto a esto último, ni AlphaFold2 ni RosettaFold ofrecen información alguna en sus resultados.

Por tanto, y bajo los preceptos actuales de la versión dinámica o cinética del problema, el problema del plegamiento de proteínas no está resuelto, dado que no se ofrece información mecanística detallada al correr los algoritmos. Aún más, dados los problemas existentes de la versión actual de AlphaFold2 con la determinación de las posiciones de las cadenas laterales, la herramienta no mejora lo logrado con técnicas experimentales como cristalografía de rayos X o NMR, excepto en el tiempo requerido para tener una buena aproximación o modelo estructural (por mucho). Existen al menos un par de escritos en revisión en los que se intenta ayudar a los algoritmos empleando información experimental [92].

Los fallos actuales de los algoritmos en la determinación de las cadenas laterales resultan muy relevantes para nuestra investigación, y muchas otras, donde se trata de explotar la ingeniería de proteínas al hacer mutaciones puntuales para reemplazar residuos específicos. El caso más claro presentado en esta tesis es el de la mutante D52A, para la cual no existe un modelo atómico a la fecha y los resultados de AlphaFold2 arrojan una estructura terciaria idéntica a la de la proteína parental (Fig: 9.1). Estos resultados no nos ofrecen pista alguna sobre los posibles efectos de la mutación sobre la estructura tridimensional y mucho menos sobre el mecanismo de plegamiento. Sabemos de facto, a través de evidencia espectroscópica, que existen diferencias con la proteína parental.

Así pues, consideramos que existe trabajo por hacer para refinar los resultados de los

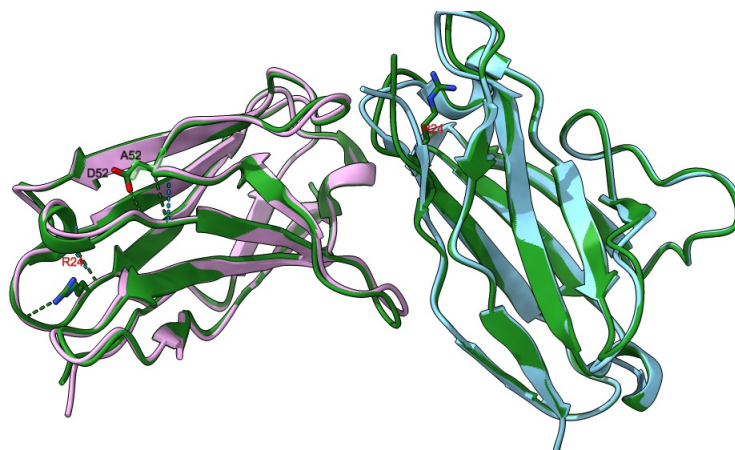


Figura 9.1: Comparación estructural: 6aJL2 vs R25G vs D52A. 6aJL2 en verde (2W0K), R25G en azul (5C9K) y D52A en rosa predicha con AlphaFold2. La predicción de D52A con AlphaFold2 arroja un modelo estructural idéntico a nivel de cadena principal comparado con el de la proteína original (verde vs rosa). Solo se aprecian ligeras diferencias entre 6aJL2 y R25G en la región de las asas donde se encuentra la posición R25 (verde vs azul). Se resaltan los residuos R24 para 6aJL2 y A52 para D52A como referencias. G25 en R25G no se aprecia debido al tamaño reducido de la cadena lateral y a su orientación interna.

algoritmos mencionados. Aún más, consideramos que se debe trabajar para poder pensar en una posible solución automatizada que arroje información sobre los mecanismos de plegamiento a partir de información básica como la secuencia de la proteína. Por ejemplo, las versiones actuales de AlphaFold2 y RosettaFold se lograron a través del empleo de redes neuronales hiperparametrizadas y algoritmos capaces de “aprender” a partir de un conjunto de datos (PDB), pero en términos de los mecanismos se está lejos de tener una base de datos detallada sobre la mayoría de las proteínas para poder pensar en una solución similar [16].

Dicha solución se antoja difícil dado que actualmente el área no goza de tanta atención de la comunidad científica, si bien distintos sectores hacen proclamas al respecto de tanto en tanto (como se describe arriba). Además, las dificultades en la determinación de

los mecanismos de plegamiento surgen apenas se modifica alguna condición, ya sea una mutación o un cambio en el medio, y como se muestra en este trabajo las conformaciones participantes no siempre son evidentes. Otra fuente de dificultad se presenta a nivel de la instrumentación necesaria para cubrir todas las escalas temporales que puede ocupar una reacción de plegamiento (desde pico hasta cientos de segundos). Esto último es un reto que actualmente enfrenta el área conocida como dinámica molecular, cuyos cálculos exhaustivos de las posiciones atómicas en una reacción de plegamiento alcanzan apenas los microsegundos; para algunos modelos proteicos esto es suficiente. Conectar las distintas observaciones en los distintos regímenes temporales no siempre es inmediato y tampoco existen protocolos experimentales estándar dado que las investigaciones sobre plegamiento tienen un carácter iterativo; esto es, se plantean nuevos experimentos en función de observaciones anteriores para ampliar o refutar las conclusiones alcanzadas previamente, y se deben comparar tales resultados con soluciones “analíticas” de los posibles modelos. En caso de falla obvia, se debe ajustar y repetir el proceso. En nuestra experiencia, dicho proceso es guiado por un pensamiento de tipo inferencial y desconocemos como se puede proveer de dicho componente a un proceso de aprendizaje automático.

1 The Folding Pathway of 6aJL2

2 Haven A. López Sánchez, Sagar V. Kathuria, and D. Alejandro Fernández Velasco*



Cite This: <https://dx.doi.org/10.1021/acs.jpcb.0c08534>



Read Online

ACCESS |



Metrics & More

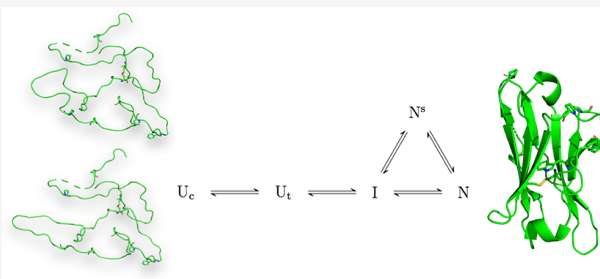


Article Recommendations



Supporting Information

3 **ABSTRACT:** One-third of the reported cases of light chain
 4 amyloidosis are related to the germ line $\lambda 6$ family; remarkably,
 5 healthy individuals express this type of protein in just 2% of the
 6 peripheral blood and bone marrow B-cells. The appearance of the
 7 disease has been related to the inherent properties of this protein
 8 family. A recombinant representative model for $\lambda 6$ proteins called
 9 6aJL2 containing the amino acid sequence encoded by the 6a and
 10 JL2 germ line genes was previously designed and synthesized to
 11 study the properties of this family. Previous work on 6aJL2
 12 suggested a simple two-state folding model at 25 °C; no
 13 intermediate could be identified either by kinetics or by
 14 fluorescence and circular dichroism equilibrium studies, although the presence of an intermediate that is populated at ~ 2.4 M
 15 urea was suggested by size exclusion chromatography. In this study we employed classic equilibrium and kinetic experiments and
 16 analysis to elucidate the detailed folding mechanism of this protein. We identify species that are kinetically accessible and/or are
 17 populated at equilibrium. We describe the presence of intermediate and native-like species and propose a five-species folding
 18 mechanism at 25 °C at short incubation times, similar to and consistent with those observed in other proteins of this fold. The
 19 formation of intermediates in the mechanism of 6aJL2 is faster than that proposed for a V_{κ} light chain, which could be an important
 20 distinction in the amyloidogenic potential of both germ lines.



Bibliografía

- [1] Chothia C.; Gelfand I.; Kister A. Structural determinants in the sequences of immunoglobulin variable domain. *Journal of Molecular Biology*, 278:457–479, 1998.
- [2] Royer Catherine A. *Fluorescence Spectroscopy in Methods in Molecular Biology. Protein Stability and Folding: Theory and Practice*, volume 40 of *Methods in Molecular Biology*, chapter 3, pages 115–135. Humana Press, 999 Riverview Drive, Suite 208, Totowa, New Jersey 07512, 1st edition, 1995.
- [3] Wall J.; Schell M.; Murphy C.; Hrcic R.; Stevens F.J.; Solomon A. Thermodynamic instability of human $\lambda 6$ light chains: correlation with fibrillogenicity. *Biochemistry*, 38:14101–14108, 1999.
- [4] Khurana R.; Gillespie J.R.; Talapatra A.; Minert L.J.; Ionescu-Zanetti C.; Millett I.; Fink A.L. Partially folded intermediates as critical precursors of light chain amyloid fibrils and amorphous aggregates. *Biochemistry*, 40:3525–3535, 2001.
- [5] Qin Z.; Hu D.; Zhu M.; Fink A.L. Structural characterization of the partially folded intermediates of an immunoglobulin light chain leading to amyloid fibrillation and amorphous aggregation. *Biochemistry*, 46:3521–3531, 2007.

- [6] Bonvin A.M. 50 years of pdb: a catalyst in structural biology. *Nature Methods*, 18:448–449, 2021.
- [7] Luna-Martínez O.D.; Hernández-Santoyo A.; Villalba-Velázquez M.I.; Sánchez-Alcalá R.; Fernández-Velasco D.A.; Becerril B. Stabilizing an amyloidogenic λ_6 light chain variable domain. *FEBS Journal*, 284:3702–3717, 2017.
- [8] Burley S.K.; Bhikadiya C.; Bi C.; Bittrich S.; Chen L.; Crichlow G.V.; Duarte J.M.; Dutta S.; Fayazi M.; Feng Z.; Flatt J.W.; Ganesan S.J.; Goodsell D.S.; Ghosh S.; Kramer Green R.; Guranovic V.; Henry J.; Hudson B.P.; Lawson C.L.; Liang Y.; Lowe R.; Peisach E.; Persikova I.; Piehl D.W.; Rose Y.; Sali A.; Segura J.; Sekharan M.; Shao C.; Vallat B.; Voigt M.; Westbrook J.D.; Whetstone S.; Young J.Y.; Zardecki C. Rcsb protein data bank: Celebrating 50 years of the pdb with new tools for understanding and visualizing biological macromolecules in 3d. *Protein Science*, 31:187–208, 2022.
- [9] Johnson W. C. Protein secondary structure and circular dichroism: A practical guide. *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics*, 7:205–214, 1990.
- [10] Maya-Martínez R.; French-Pacheco L.; Valdés-García G.; Pastor N.; Amero C. Different dynamics in 6ajl2 proteins associated with al amyloidosis, a conformational disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 20:17, 2019.
- [11] Wall J.S.; Gupta V.; Wilkerson M.; Schell M.; Loris R.; Adams P.; Solomon A.; Stevens F.; Dealwis C. Structural basis of light chain amyloidogenicity: comparison of the thermodynamic properties, fibrillogenic potential and tertiary structural features of four v_{λ_6} proteins. *Journal of Molecular Recognition*, 17:323–331, 2004.

- [12] Anfinsen C.B. Principles that govern the folding of protein chains. *Science*, 181:223–230, 1973.
- [13] Sunde M.; Serpell L.C.; Bartlam M.; Fraser P.E.; Pepys M.B.; Blake C.C.F. Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron x-ray diffraction. *Journal of Molecular Biology*, 273:729–739, 1997.
- [14] Chiti F.; Dobson C.M. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annual Review of Biochemistry*, 75:333–66, 2006.
- [15] Dobson C.M. Principles of protein folding, misfolding and aggregation. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 15:3–16, 2004.
- [16] Outeiral C.; Nissley D.A.; Deane C.M. Current structure predictors are not learning the physics of protein folding. *Bioinformatics*, pages 1–7, 2022.
- [17] Wallace L.A.; Matthews C.R. Sequential vs. parallel protein-folding mechanisms: experimental tests for complex folding reactions. *Biophysical Chemistry*, 101-102:113–131, 2002.
- [18] Collins A.M.; Watson C.T. Immunoglobulin light chain gene rearrangements, receptor editing and the development of a self-tolerant antibody repertoire. *Frontiers in Immunology*, 9:2249:1–12, 2018.
- [19] Liu J.; Albers M.W.; Chen C.; Schreiber S.L.; Walsh C.T. Cloning, expression, and purification of human cyclophilin in *Escherichia coli* and assessment of the catalytic role of cysteines by site-directed mutagenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87:2304–2308, 1990.

- [20] Cicardi M. E.; Marrone L.; Azzouz M.; Trotti D. Proteostatic imbalance and protein spreading in amyotrophic lateral sclerosis. *The EMBO Journal*, page e106389, 2021.
- [21] Jumper J.; Evans R.; Pritzel A.; Green T.; Figurnov M.; Ronneberger O.; Tunyasuvunakool K.; Bates R.; Zidek A.; Potapenko A.; Bridgland A.; Meyer C.; Kohl S.A.A.; Ballard A.J.; Cowie A.J.; Romera-Paredes B.; Nikolov S.; Jain R.; Adler J.; Back T.; Petersen S.; Reiman D.; Clancy E.; Zielinski M.; Steinegger M.; Pacholska M.; Berghammer T.; Bodenstein S.; Silver D.; Vinyals O.; Senior A.W.; Kavukcuoglu K.; Kohli P.; Hassabis D. Highly accurate protein structure prediction with alphafold. *Nature*, 596:583–589, 2021.
- [22] Nelson R.; Eisenberg D. Structural models of amyloid like fibrils. *Advances in Protein Chemistry*, 73:2138–2148, 2006.
- [23] Tunyasuvunakool K.; Adler J.; Wu Z.; Green T.; Zielinski M.; Zidek A.; Bridgland A.; Cowie A.; Meyer C.; Laydon A.; Velankar S.; Kleywegt G.J.; Bateman A.; Evans R.; Pritzel A.; Figurnov M.; Ronneberger O.; Bates R.; Kohl S.A.A.; Potapenko A.; Ballard A.J.; Romera-Paredes B.; Nikolov S.; Jain R.; Clancy E.; Reiman D.; Petersen S.; Senior A.W.; Kavukcuoglu K.; Birney E.; Kohli P.; Jumper J.; Hassabis D. Highly accurate protein structure prediction for the human proteome. *Nature*, 596:590–596, 2021.
- [24] Velázquez López I.; Valdés-García G.; Romero Romero S.; Maya Martínez R.; Leal-Cervantes A.I.; Costas M.; Sánchez-López R.; Amero C.; Pastor N.; Fernández Velasco D.A.;. Localized conformational changes trigger the ph-induced fibri-

- llogenesis of an amyloidogenic λ light chain protein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 2018.
- [25] Wang R.Y.; Noddings C.M.; Kirschke E.; Myasnikov A.G.; Johnson J.L.; Agard D.A. Structure of hsp90-hsp70-hop-gr reveals the hsp90 client-loading mechanism. *Nature*, 2021.
- [26] Villar-Pique A.; de Groot N.S.; Sabaté R.; Acebrón S.P.; Celaya G.; Fernández-Busquets X.; Muga A.; Ventura S. The effect of amyloidogenic peptides on bacterial aging correlates with their intrinsic aggregation propensity. *Journal of Molecular Biology*, 421:270–281, 2012.
- [27] Augustine J.G.; de la Calle A.; Knarr G.; Buchner J.; Frederick C.A. The crystal structure of the fab fragment of the monoclonal antibody mak33. *The Journal of Biological Chemistry*, 276:3287–3294, 2001.
- [28] Ricagno S.; Colombo M.; de Rosa M.; Sangiovanni E.; Giorgetti S.; Raimondi S.; Bellotti V.; Bolognesi M. De loop mutations affect β 2-microglobulin stability and amyloid aggregation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 377:146–150, 2008.
- [29] Ruiz-Zamora R. A.; Guillaumé S.; Al-Hilaly Y. K.; Al-Garawi Z.; Rodríguez-Alvarez F. J.; Zavala-Padilla G.; Pérez-Carreón J. I.; Rodríguez-Ambriz S. L.; Herrera G. A.; Becerril-Luján B.; Ochoa-Leyva A.; Melendez-Zajgla J.; Serpell L.; del Pozo-Yauner L. The cdr1 and other regions of immunoglobulin light chains are hot spots for amyloid aggregation. *Scientific Reports*, 9:3123, 2019.

- [30] Blancas-Mejía L.M.; Téllez L.A.; del Pozo-Yauner L.; Becerril B.; Sánchez-Ruíz J.M.; Fernández-Velasco D.A. Thermodynamic and kinetic characterization of a germ line human $\lambda 6$ light-chain protein: the relation between unfolding and fibrillogenesis. *Journal of Molecular Biology*, 386:1156–1166, 2009.
- [31] Hernández-Santoyo A.; del Pozo-Yauner L.; Fuentes-Silva D.; Ortiz E.; Rudiño-Piñera E.; Sánchez-López R.; Horjales E.; Becerril B.; Rodríguez-Romero A. A single mutation at the sheet switch region results in conformational changes favoring $\lambda 6$ light-chain fibrillogenesis. *Journal of Molecular Biology*, 396:280 – 292, 2010.
- [32] Lecoq L.; Wiegand T.; Rodriguez-Alvarez F. J.; Cadalbert R.; Herrera G. A.; del Pozo-Yauner L.; Meier B. H.; Böckmann A. A substantial structural conversion of the native monomer leads to in register parallel amyloid fibril formation in light chain amyloidosis. *ChemBioChem*, 12:601–609, 2018.
- [33] del Pozo-Yauner L.; Ortíz E.; Sánchez R.; Sánchez-Lopez R.; Güereca L.; Murphy C.L.; Allen A.; Wall J.S.; Fernández-Velasco D.A.; Solomon A.; Becerril B. Influence of the germline sequence on the thermodynamic stability and fibrillogenicity of human lambda 6 light chains. *Proteins; Structure, Function and Bioinformatics*, 72:684–692, 2008.
- [34] del Pozo-Yauner L.; Wall J.S.; González-Andrade M.; Sánchez-López R.; Rodríguez-Ambríz S.L.; Pérez-Carreón J.I.; Ochoa-Leyva A.; Fernández-Velasco D.A. The n-terminal strand modulates immunoglobulin light chain fibrillo-

- genesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 443:495 – 499, 2014.
- [35] Eisenberg D.S. How hard it is seeing what is in front of your eyes. *Cell*, 271:8–11, 2018.
- [36] Handschumacher R.E.; Harding M.W.; Rice J.; Drugge R.J.; Speicher D.W. Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin a. *Science*, 226:544–547, 1984.
- [37] Russo A.T.; Rösgen J.; Bolen D.W. Osmolyte effects on kinetics of fkbp12 c22a folding coupled with prolyl isomerization. *Journal of Molecular Biology*, 330:851–866, 2003.
- [38] Cremades N.; Sancho J.; Freire E. The native-state ensemble of proteins provides clues for folding, misfolding and function. *Trends in Biochemical Sciences*, 31:494–496, 2006.
- [39] Kabat E.A. Sequences of proteins of immunological interest. Vol. 5. Bethesda, MD: National Institute of Health, 1991.
- [40] Editorial. Method of the year 2021: Protein structure prediction. *Nature Methods* 1, 2022.
- [41] Raffin R.; Dieckmann L.J.; Szpunar M.; Wunschl C.; Pokkuluri P.R.; Dave P.; Wilkins Stevens P.; Cai X.; Schiffer M.; Stevens F.J. Physicochemical consequences of amino acid variations that contribute to fibril formation by immunoglobulin light chains. *Protein Science*, 8:509–517, 1999.

- [42] Fischer G.; Wittmann-Liebold B.; Lang K.; Kiefhaber T.; Schmid F.X. Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins. *Nature*, 337:476–478, 1989.
- [43] Kiefhaber T.; Kohler H.H.; Schmid F.X. Kinetic coupling between protein folding and prolyl isomerization. i. theoretical models. *Journal of Molecular Biology*, 224:217–229, 1992.
- [44] Kiefhaber T.; Quaas R.; Hahn U.; Schmid F.X. Folding of ribonuclease t1. 1. existence of multiple unfolded states created by proline isomerization. *Biochemistry*, 29:3061–3070, 1990.
- [45] Mücke M.; Schmid F.X. Enzymatic catalysis of prolyl isomerization in an unfolding protein. *Biochemistry*, 31:7848–7854, 1992.
- [46] Mücke M.; Schmid F.X. Intact disulfide bonds decelerate the folding of ribonuclease t1. *Journal of Molecular Biology*, 230:713–725, 1994.
- [47] Mücke M.; Schmid F.X. A kinetic method to evaluate the two-state character of solvent-induced protein denaturation. *Biochemistry*, 33:12930–5, 1994.
- [48] Schmidpeter P.A.M.; Schmid F.X. Prolyl isomerization and its catalysis in protein folding and protein function. *Journal of Molecular Biology*, 427:1609–1631, 2015.
- [49] Schönbrunner E.R.; Mayer S.; Tropschug M.; Fischer G.; Takahashi N.; Schmid F.X. Catalysis of protein folding by cyclophilins from different species. *The Journal of Biological Chemistry*, 266:3630–3635, 1991.

- [50] Agostini F.; Vendruscolo M.; Gaetano Tartaglia G. Sequence-based prediction of protein solubility. *Journal of Molecular Biology*, 421:237–241, 2012.
- [51] Forman-Kay J.D.; Kriwacki R.W.; Seydoux G. Phase separation in biology and disease. *Journal of Molecular Biology*, 430: 6:4603–460, 2018.
- [52] Dealwis C.; Wall J. Towards understanding the structure-function relationship of human amyloid disease. *Current Drug Targets*, 5:159–171, 2004.
- [53] Feige M. J.; Simpson E.R.; Herold E.M; Bepperling A.; Heger K.; Buchner J. Dissecting the alternatively folded state of the antibody fab fragment. *Journal of Molecular Biology*, 399:719–730, 2010.
- [54] Feige M.J.; Buchner J. Principles and engineering of antibody folding and assembly. *Biochimica et Biophysica Acta*, 15, 2014.
- [55] Feige M.J.; Grawert M.A.; Marcinowski M.; Hennig J.; Behnke J.; Auslander D.; Herold E.M.; Peschek J.; Castro C.D.; Flajnik M.; Hendershot L.M.; Sattler M.; Groll M.; Buchner J. The structural analysis of shark ignar antibodies reveals evolutionary principles of immunoglobulins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111:8155–8160, 2014.
- [56] Hamill S.J.; Steward A.; Clarke J. The folding of an immunoglobulin-like greek key protein is defined by a common-core nucleus and regions constrained by topology. *Journal of Molecular Biology*, 297:165–178, 2000.
- [57] Lilie H.; Lang K.; Rudolph R.; Buchner J. Prolyl isomerases catalyze antibody folding in vitro. *Protein Science*, 2:1490–1496, 1993.

- [58] Lilie H.; Rudolph R.; Buchner J. Association of antibody chains at different stages of folding: prolyl isomerization occurs after formation of quaternary structure. *Journal of Molecular Biology*, 248:190–201, 1995.
- [59] Sancho J. The stability of 2-state, 3-state and more-state proteins from simple spectroscopic techniques... plus the structure of the equilibrium intermediates at the same time. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 531:4–13, 2013.
- [60] Simpson E. R.; Herold E. M.; Buchner J. The folding pathway of the antibody v1 domain. *Journal of Molecular Biology*, 392:1326–1338, 2009.
- [61] Taglialegna A.; Lasa I.; Valle J. Amyloid structures as biofilm matrix scaffolds. *Journal of Bacteriology*, 198:2579–2588, 2016.
- [62] McGlinchey R.P.; Lee J.C. Why study functional amyloids? lessons from the repeat domain of pmel17. *Journal of Molecular Biology*, 430(20):3696–3706, 2018.
- [63] Robinson C.V.; Dobson C.M.; Saibil H.R. Jiménez J.L.; Nettleton E.J.; Bouchard M.;. The protofilament structure of insulin amyloid fibrils. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99:14:9196–9201, 2002.
- [64] Myers J.K.; Pace C.N.; Scholtz J.M. Denaturant m values and heat capacity changes: Relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding. *Protein Science*, 4:2138–2148, 1995.
- [65] Fowler D.M.; Koulov A.V.; Balch W.E.; Kelly J.W. Functional amyloid - from bacteria to humans. *TRENDS in Biochemical Sciences*, 32: 5:217–224, 2018.

- [66] Kelly J.W. Alternative conformations of amyloidogenic proteins govern their behavior. *Current Opinion in Structural Biology*, 6:11–17, 1996.
- [67] Chaudhuri T.K.; Arai M.; Terada T.P.; Ikura T.; Kuwajima K. Equilibrium and kinetic studies on folding of the authentic and recombinant forms of human α -lactalbumin by circular dichroism spectroscopy. *Biochemistry*, 39:15643–15651, 2000.
- [68] Goto Y.; Azuma T.; Hamaguchi K. Refolding of the immunoglobulin light chain. *The Journal of Biochemistry*, 85:1427–1438, 1979.
- [69] Tsunenaga M.; Goto Y.; Kawata Y.; Hamaguchi K. Unfolding and refolding of a type κ immunoglobulin light chain and its variable and constant fragments. *Biochemistry*, 26:6044–6051, 1987.
- [70] Tsunenaga M.; Goto Y.; Kawata Y.; Hamaguchi K. Unfolding and refolding of a type κ immunoglobulin light chain and its variable and constant fragments. *Biochemistry*, 26:6044–605, 1987.
- [71] Buel G.R.; Walters K.J. Can alphafold2 predict the impact of missense mutations on structure? *Nature Structural Molecular Biology*, 29:1–22, 2022.
- [72] Kuwajima Kunihiro. *Circular Dichroism in Methods in Molecular Biology. Protein Stability and Folding: Theory and Practice*, volume 40 of *Methods in Molecular Biology*, chapter 5, pages 115–135. Humana Press, 999 Riverview Drive, Suite 208, Totowa, New Jersey 07512, 1st edition, 1995.

- [73] Baldwin Robert L. *Protein Folding Handbook*, volume 1, chapter 1, pages 3–21. WILEY-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA, 1 edition, 2005.
- [74] Fernandez-Escamilla A.M.; Rousseau F.; Schymkowitz J.; Serrano L. Prediction of sequence-dependent and mutational effects on the aggregation of peptides and proteins. *Nature Biotechnology*, 22:10:1302–1306, 2004.
- [75] Joseph R. Lakowicz. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, chapter 16, pages 530–573. Springer, 233 Spring Street, New York, NY 10013, USA, 3rd edition, 2006.
- [76] Makin O.S.; Atkins E.; Sikorski P.; Johansson J.; Serpell L.C. Molecular basis for amyloid fibril formation and stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102: 2:315–320, 2005.
- [77] Best R.B.; Lindorff-Larsen K.; DePristo M.A.; Vendruscolo M. Relation between native ensembles and experimental structures of proteins. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences*, 103:10901–10906, 2018.
- [78] Blancas-Mejía L.M.; Martin E.B.; Williams A; Wall J. S. ; Ramírez-Alvarado M. Kinetic stability and sequence/structure studies of urine-derived bence-jones proteins from multiple myeloma and light chain amyloidosis patients. *Biophysical Chemistry*, 2017.
- [79] Blancas-Mejía L.M.; Ramirez-Alvarado M. Systemic amyloidoses. *Annual Review of Biochemistry*, 82:745–774, 2013.

- [80] Brandts J.F.; Halvorson H.R.; Brennan M. Consideration of the possibility that the slow step in protein denaturation reactions is due to cis-trans isomerism of proline residues. *Biochemistry*, 14:4953–4963, 1975.
- [81] Macindoe I.; Kwan A.H.; Ren Q.; Morris V.K.; Yang W.; Mackay J.P.; Sunde M. Self-assembly of functional, amphipathic amyloid monolayers by the fungal hydrophobin eas. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109:E804–E811, 2012.
- [82] Marin-Argany M.; Güell-Bosch J.; Blancas-Mejía L.M.; Villegas S.; Ramirez-Alvarado M. Mutations can cause light chains to be too stable or too unstable to form amyloid fibrils. *Protein Science*, 24:1829–1840, 2015.
- [83] Radamaker L.; Lin Y-H.; Annamalai K.; Huhn S.; Hegenbart U.; Schönland S.O.; Fritz G.; Schmidt M.; Fändrich M. Cryo-em structure of a light chain-derived amyloid fibril from a patient with systemic al amyloidosis. *Nature Communications*, 10:1103, 2019.
- [84] Swuec P.; Lavatelli F.; Tasaki M.; Paissoni C.; Rognoni P.; Maritan M.; Brambilla F.; Milani P.; Mauri P.; Camilloni C.; Palladini G.; Merlini G.; Ricagno S.; Bolognesi M. Cryo-em structure of cardiac amyloid fibrils from an immunoglobulin light chain al amyloidosis patient. *Nature Communications*, 10:1269, 2019.
- [85] Bolen D.W.; Santoro M.M. Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. unfolding of phenylmethane-sulfonyl alpha-chymotrypsin using different denaturants. *Biochemistry*, 27:8063–8068, 1988.

- [86] Chiti F.; Mangione P.; Andreola A.; Giorgetti S.; Stefani M.; Dobson C.M.; Bellotti V.; Taddei N. Detection of two partially structured species in the folding process of the amyloidogenic protein β 2-microglobulin. *Journal of Molecular Biology*, 307:379–391, 2001.
- [87] Valdés-García G.; Millan-Pacheco C.; Pastor N. Convergent mechanisms favor fast amyloid formation in two lambda 6a ig light chain mutants. *Biopolymers*, 4:2138–2148, 2014.
- [88] González-Andrade M.; Becerril-Luján B.; Sánchez-López R.; Ceceña-Álvarez H.; Pérez-Carreón J. I.; Ortiz-Surí E.; Fernández-Velasco D. A.; del Pozo-Yauner L. Mutational and genetic determinants of λ 6 light chain. *FEBS Journal*, 280:6173–6183, 2013.
- [89] Aaron Cruz Navarrete. Caracterización fisicoquímica de la función y el plegamiento de Artj e Hisj, dos proteínas de unión a aminoácidos básicos. Master's thesis, Facultad de Medicina, UNAM, CDMX, 2015.
- [90] Kelly S.M.; Jess T.J.; Price N.C. How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1751:119–139, 2005.
- [91] Rudiño-Piñera E.; Peláez-Aguilar A. E.; Amero C.; Díaz-Vilchis A. Crystal structure of 6ajl2-r24g light chain variable domain: Does crystal packing explain amyloid fibril formation? *Biochemistry and Biophysics Reports*, 20:100682, 2019.

- [92] Terwilliger T.C.; Poon B.K.; Afonine P.V.; Schlicksup C.J.; Croll T.I.; Millán C. Richardson J.; Read R.J.; Adams P.D. Improving alphafold modeling using implicit information from experimental density maps. pages 331–345, 2022.
- [93] Antzutkin O.N.; Leapman R.D.; Delaglio F.; Tycko R. Petkova A.T.; Ishii Y.; Balbach J.J.;. A structural model for alzheimer's β -amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state nmr. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99: 26:16742?16747, 2002.
- [94] Bryngelson J.D.; Onuchic J.N.; Socci N.D.; Wolynes P.G. Funnels, pathways, and the energy landscape of protein folding: A synthesis. *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics*, 21:167–195, 1995.
- [95] Kelly J.K.; Lansbury P.T. A chemical approach to elucidate the mechanism of transthyretin and β -protein amyloid fibril formation. *Amyloid: the International Journal of Experimental and Clinical Investigation*, 1:186–205, 1994.
- [96] Bilsel O.; Zitzewitz J. A.; Bowers K. E.; Matthews C. R. Folding mechanism of the α -subunit of tryptophan synthase, an α/β barrel protein: Global analysis highlights the interconversion of multiple native, intermediate, and unfolded forms through parallel channels. *Biochemistry*, 38:1018–1029, 1999.
- [97] Hurle M.R.; Helms L.R.; Li L.; Chan W.; Wetzel R. A role for destabilizing amino acid replacements in light-chainamyloidosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91:5446–5450, 1994.

- [98] Lührs T.; Ritter C.; Adrian M.; Riek-Loher D.; Bohrmann B.; Döbeli H.; Schubert D.; Riek R. 3d structure of alzheimer's amyloid- β (1-42) fibrils. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102: 48:17342–17347, 2005.
- [99] Maji S.K.; Perrin M.H.; Sawaya M.R.; Jessberger 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.; Riek R. Functional amyloids as natural storage of peptide hormones in pituitary secretory granules. *Science*, 325 (5938):328–332, 2009.
- [100] Buxbaum J.N.; Linke R.P. A molecular history of the amyloidoses. *Journal of Molecular Biology*, 421:142–159, 2012.
- [101] Azuma T.; Hamaguchi K.; Migita S. Denaturation of bence jones proteins by guanidine hydrochloride. *The Journal of Biochemistry*, 72:1457–1467, 1972.
- [102] Capaldi A.P.; Kleanthous C.; Radford S.E. Im7 folding mechanism: misfolding on a path to the native state. *Nature Structural Biology*, 9:209–216, 2002.
- [103] Iadanza M.G.; Jackson M.P.; Hewitt E.W.; Ranson N.A.; Radford S.E. A new era for understanding amyloid structures and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(12):755–773, 2018.
- [104] Iadanza M.G.; Silvers R.; Boardman J.; Smith H.I.; Karamanos T. K.; Debelouchina G.T.; Su Y.; Griffin R.G.; Ranson N.A.; Radford S.E. The structure of a β 2-microglobulin fibril suggests a molecular basis for its amyloid polymorphism. *Nature Communications*, 9:4517, 2018.

- [105] Jahn T.R.; Parker M.J.; Homans S.W.; Radford S.E. Amyloid formation under physiological conditions proceeds via a native-like folding intermediate. *Nature Structural and Molecular Biology*, 13:3:195–201, 2006.
- [106] Clarke J.; Cota E.; Fowler S.B.; Hamill S.J. Folding studies of immunoglobulin-like β -sandwich proteins suggest that they share a common folding pathway. *Structure*, 7:1145–1153, 1999.
- [107] Iconomidou V.A.; Cordopatis P.; Hoenger A.; Hamodrakas S.J. The silkworm eggshell as a natural amyloid shield for the safe development of insect oocyte and embryo: Insights from studies of development of insect oocyte and embryo: Insights from studies of silkworm chorion protein peptide-analogues of the β family. *Peptide Science*, 96(6):723–733, 2011.
- [108] Kiyoi H.; Naito K.; Ohno R.; Saito H.; Naoe T. Characterization of the immunoglobulin light chain variable region gene expressed in multiple myeloma. *Leukemia*, 12:601–609, 1998.
- [109] Cohen S.I.A.; Vendruscolo M.; Dobson C.M.; Knowles T.P.J. From macroscopic measurements to microscopic mechanisms of protein aggregation. *Journal of Molecular Biology*, 421:160–171, 2012.
- [110] Meisl G.; Kirkegaard J.B.; Arosio P.; Michaels T.C.T.; Vendruscolo M.; Dobson C.M.; Linse S.; Knowles T.P.J. Molecular mechanisms of protein aggregation from global fitting of kinetic models. *Nature Protocols*, 11:2:252–272, 2016.

- [111] Bhavaraju M.; Hansmann U.H.E. Effect of single point mutations in a form of systemic amyloidosis. *Protein Science*, 24:1451–1462, 2015.
- [112] Toofanny R.D.; Calhoun S.; Jonsson A.L.; Daggett V. Shared unfolding pathways of unrelated immunoglobulin-like β -sandwich proteins. *Protein Engineering, Design and Selection*, 32:331–345, 2019.
- [113] Baek M.; DiMaio F.; Anishchenko I.; Dauparas J.; Ovchinnikov S.; Lee G.R.; Wang J.; Cong J.; Kinch L.N.; Schaeffer R.D.; Millán C.; Park H.; Adams C.; Glassman C.R.; DeGiovanni A.; Pereira J.H.; Rodrigues A.V.; van Dijk A.A.; Ebrecht A.C.; Opperman D.J.; Sagmeister T.; Buhlheller C.; Pavkov-Keller T.; Rathinaswamy M.J.; Dalwadi U.; Yip C.K.; Burke J.E.; Garcia K.C.; Grishin N.V.; Adams P.D.; Read R.J.; Baker D. Accurate prediction of protein structures and interactions using a three-track neural network. *Science*, 373:871–876, 2021.
- [114] Eaton W.A. Modern kinetics and mechanism of protein folding: A retrospective. *The Journal of Physical Chemistry B*, 125:3452–3467, 2021.
- [115] Sakata M.; Chatani E.; Kameda A.; Sakurai K.; Naiki H.; Goto Y. Kinetic coupling of folding and prolyl isomerization of β 2-microglobulin studied by mutational analysis. *Journal of Molecular Biology*, 382:1242–1255, 2008.