



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
BIOQUÍMICAS**

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA MOLECULAR Y BIOPROCESOS

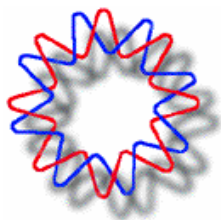
ESTUDIO DE LAS BASES ESTRUCTURALES Y MOLECULARES
ASOCIADAS A LAS PROPIEDADES BIOFÍSICAS Y FIBRILOGÉNICAS
IN VITRO DE LA RV_LAR

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

IBQ. Oscar Daniel Luna Martínez



DIRECTOR DE TESIS: Dr. Baltazar Becerril Luján

Cuernavaca, Morelos. 2009



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.

Vístete que para mí, ya estás desnuda. Lo harás lentamente, de varias maneras, y en diferentes circunstancias sólo con el afán de encontrar tu lado más sensible. Eso me ayudará a entender la razón del cómo tu cuerpo tan endeble guarda un alma vehemente y peligrosa.

No, no eres como tu madre, cuyo cuerpo firme y opulento contrasta con su espíritu desquebrajado, nulo para poder cambiar con el tiempo. Tu madre, inentendible como ella misma, celosa de sus propios secretos que sólo los devela al destrozar su bella apariencia. No eres para nada como ella aunque de ella provienes. Al igual que tú, también la desprecio, aunque no por ello la he de ignorar.

Anda AR, vamos a perdernos en lo más recóndito de esta selva vorágine para que me reveles tus secretos. Dedicaré años de mi vida hacia ti y sólo a ti. Anda, que voy contigo. Brilla como acostumbras, con las luces apagadas. Brilla intensamente que esta noche es bella y la fauna de esta selva descansa dormitando sobre su lecho.

Brilla intensamente hoy por ti misma ya que mañana brillarás con los nuevos adornos que pondré sobre tu nuevo e inquebrantable cuerpo.

Sobre AR, el Sexo y otras Fluorescencias
Oscar DLM

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
Lista de Figuras	iv
Lista de Tablas	v
Lista de Abreviaturas	vi
Agradecimientos	vii
Abstract	x
1. Resumen	1
2. Introducción	
2.1. Enfermedades del Plegamiento Anómalo	2
2.2. Amiloidosis	3
2.3. Características Generales de las Fibras Amiloides	4
2.4. Amiloidosis AL	5
2.5. Cadenas Ligeras de Inmunoglobulinas	6
2.6. Asociación Preferencial del Subgrupo λVI en la Amiloidosis AL	8
2.7. Estabilidad Termodinámica de las Cadenas Ligeras y Fibrilogénesis	9
3. Antecedentes Directos del Proyecto	11
3.1. AR	13
4. Hipótesis y Objetivos	16
5. Materiales y Métodos	
5.1. Oligonucleótidos	17
5.2. Cepas Usadas	18
5.3. PCR recursivo	18
5.4. Digestión Enzimática	19
5.5. Precipitación de las Digestiones	19
5.6. Ligación	20
5.7. Preparación de Células Competentes	21
5.8. Transformación	21
5.9. Análisis de las Construcciones	22
5.10. Expresión en <i>E. coli</i>	23

	Pág.
5.11. Extracción del Contenido Periplásmico	23
5.12. Purificación	24
5.13. Estabilidad Termodinámica	24
5.14. Mediciones Espectroscópicas siguiendo la Exposición del Triptófano	24
5.15. Desnaturalización Química de Dos Estados	25
5.16. Desnaturalización Química de Tres Estados	26
5.17. Desnaturalización Térmica de Dos Estados	27
5.18. Desnaturalización Térmica de Tres Estados	28
5.19. Fibrilogénesis in vitro	29
6. Resultados	
6.1. Construcción de las Mutantes de AR	31
6.2. Expresión Heteróloga de las Mutantes de AR	31
6.3. Purificación	33
6.4. Fluorescencia Intrínseca de AR	36
6.5. Estabilidad Termodinámica y Cinética de Fibrilogénesis de AR	37
6.6. Cinéticas de Fibrilogénesis de AR a Diferentes Temperaturas	39
6.7. Estabilidad Termodinámica	41
6.8. Desnaturalización Química y Térmica de AR	43
6.9. Estabilidad Termodinámica de las Mutantes	46
6.10. Cinética de Fibrilogénesis de las Mutantes	48
7. Discusión	50
8. Conclusiones	59
9. Perspectivas	61
10. Bibliografía	63

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Fig. 1. Niveles de Estructuración	2
Fig. 2. Imágenes de Fibras Amiloides	4
Fig. 3. Inmunoglobulina	6
Fig. 4. Cadena Ligera de Inmunoglobulina	7
Fig. 5. Líneas Germinales	9
Fig. 6. Fibrilogénesis <i>in vitro</i> de rV _L 6aJL2, JTO, WIL y R25G	12
Fig. 7. Alineamiento de las secuencias de rV _L 6 6aJL2, R25G, WIL, JTO y AR	13
Fig. 8. Estructura Tridimensional de AR	14
Fig. 9. Cambios Propuestos de AR	15
Fig. 10. Uso de los Oligos	17
Fig. 11. Esquema de las temperaturas para la reacción de PCR	18
Fig. 12. PCR de colonia	21
Fig. 13. Cinética de Desnaturalización	26
Fig. 14. Cinética de Fibrilogénesis	29
Fig. 15. Expresión de las construcciones	32
Fig. 16. Cromatografías de Exclusión Molecular	34
Fig. 17. Purificación de las rVL	35
Fig. 18. Fluorescencia intrínseca entre 6aJL2 y AR	36
Fig. 19. Fluorescencia intrínseca de AR con respecto a la temperatura	37
Fig. 20. Desnaturalización térmica de AR	38
Fig. 21. Fibrilogénesis <i>in vitro</i> de rV _L 6aJL2, JTO, WIL, R25G y AR	39
Fig. 22. Fibrilogénesis <i>in vitro</i> de rV _L AR a diferentes temperaturas	40
Fig. 22. Desnaturalización Química y Térmica de AR y sus mutantes	41
Fig. 24. Desnaturalización Térmica de AR y p3M	45
Fig. 25. Curvas de Desnaturalización Química	46
Fig. 26. Cinética de Fibrilogénesis de las Mutantes de AR	49
Fig. 27. Interacción de Phe21	52
Fig. 28. Interacciones con Leu73	53
Fig. 29. Interacciones del residuo 104	54

LISTA DE FIGURAS (continuación)

	Pág.
Fig. 30. Conformaciones del CDR1	54
Fig. 31. Motivos anti-agregación en AR	55
Fig. 32. <i>Sheet switch</i>	56
Fig. 33. Mutaciones en AR	57

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Enfermedades relacionadas con el plegamiento proteico	3
Tabla 2. Enfermedades dentro del grupo de la amiloidosis	4
Tabla 3. Eestabilidad termodinámica y cinética de fibrilogénesis de las V _L λ6	11
Tabla 4. Descripción de oligos usados para la mutación sitio-específica	17
Tabla 5. Cepas usadas	18
Tabla 6. Nomenclatura de las mutantes sencillas, dobles y la triple mutante.	31
Tabla 7. Parámetros de Desnaturalización y la cinética de fibrilogénesis	42
Tabla 8. Intermediario Térmico	44

LISTA DE ABREVIATURAS

Amp	Ampicilina
C.B.P.	Cuanto baste para
C_M	Concentración media de desnaturalizante
GndHCl	Cloruro de Guanidinio
ΔG°	Energía libre de Gibbs, Estabilidad termodinámica
ΔH°	Entalpía
ΔC_p	Capacidad calórica
Ig	Inmunoglobulina
Ind	Inducido
kDa	Kilodaltones
kcal	Kilocalorías
mM	Milimolar
pmol	Picomoles
L	Litros
μL	Microlitros
mm	Milímetros
μm	Micrómetros
NMR	Resonancia Magnética Nuclear
PBS	Buffer de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
S/Ind	Sin inducir
Temp.	Temperatura
ThT	Thioflavin T
T_M	Temperatura media de desnaturalización
U	Unidades
V.gr.	Verbi gratia (Por ejemplo)
C_L	Región constante de la cadena ligera
V_L	Región variable de cadena ligera
J_L	Segmento de unión entre C_L y V_L

AGRADECIMIENTOS

Es la primera vez que no sé por quién empezar a agradecer. La primera parte serán los agradecimientos a las instituciones y a quienes apoyaron tanto al proyecto como a su servidor para terminar la tesis.

A mi jefe de maestría y futuro jefe de doctorado, al Dr. Baltazar Becerril. Por creer firmemente que AR es un excelente complemento de 6aJL2. También a su ex alumno el Dr. Luis del Pozo por haber proporcionado las construcciones de AR y G25R y el haber sugerido las mutantes de las posiciones 21 y 104.

A Leopoldo Güereca. Fue difícil descubrir que una mutante puede tener propiedades muy diferentes al de la nativa aun desde el proceso de purificación.

A mi comité tutorial, al Dr. Rafael Vázquez y a la Dra. Adela Rodríguez. Por su creciente interés en el proyecto a medida que se iban generando los resultados.

A mi comité de titulación, Dra. Isabel, Dr. Osuna, Dr. José Luis y a la Dra. Gevorkian. Todos los comentarios hechos sirvieron para pulir grandiosamente este documento.

A CONACYT en cuyo número de registro 205233 y CVU 209577 este alumno de maestría no hubiera podido sobrevivir; a la UNAM y a la beca de Apoyo de Titulación de la DGEP, y al IBT.

Al Dr. Rudiño por haber ayudado a pulir el modelo de AR. Al Dr. Possani por tolerar la disminución del IQ, después de las 4 de la tarde, de quienes nos sentamos frente a la puerta de su oficina

A la Unidad de Síntesis de Oligos. Funcionaron a la primera. Al Dr. Zamudio y al Dr. Olamendi

Segunda parte de los agradecimientos, los que provienen más allá del trabajo rutinario. Realmente no importa el orden de aparición.

A mis amatísimos progenitores, quienes jamás dejaron de apoyarme en todo sentido desde que salí de casa rumbo a Chicago y Cuernavaca. El esfuerzo que han hecho desde siempre y hasta la fecha ha sido incansable. Gracias por todo lo que me han dado. Besos amatísima madre, amatísimo padre.

A mi hermano, por el contraejemplo puesto. ¿Qué esperas para entrar al EGADE?

Hermana, tus ánimos de seguir adelante y el que hayas aprendido a aprender me dejan sorprendido. Tú misma te has hecho tan fuerte que creo que ya te diste cuenta de tus capacidades. Besos Naye.

Le agradezco a mi tutor de licenciatura, David Hernández, por haberme hecho esa apuesta en la que me decidí jugar el futuro. Todavía me acuerdo de la primera vez que me enfrenté al DF para venir a Cuernavaca y hacer el examen de admisión en un instituto que desconocía su existencia. Tenías razón, es más difícil aprender Biotecnología que Economía y Finanzas.

Efrén, amigOso y hermanOso del alma. No sé qué hubiera hecho sin ti; desde tus puntos de vista hasta las tardes en Xochitepec. NES, 411, metrera. Anda, alguien te está esperando fuera de esta ciudad para iniciar una nueva etapa de tu vida.

Más que agradecer en las sugerencias técnicas debo agradecer el que hayamos compartido un mundo libre de amiloidosis y caries. A Miryam y a las interminables sesiones de ortodoncia, sobre la abuela y discusiones triviales sobre artículos amiloidóticos.

¡Cristina! Mi principal comparsa maquiavélica. En esta realidad cambiante has sido testigo fehaciente de los hechos ocurridos dentro y fuera del IBt. Deja que las perras ladren; seguirán siendo titeras arrítmicas queriendo cumplir sus fantasías mentales ahogadas en anhelos de ensueño.

A todos quienes han compartido una parte de sus pensamientos y actividades. A mi equipo de volley (Pancho, Ana, Raunel); a mis compañeros de generación (Mau, Martha Alicia, Mini, Magda, Miriam...); a mi chofer favorito (Adrián).

También a la gente de otros laboratorios como los RVD, Tonah's y anexas; Eliane, William, Lili, Germán, Abraham, Celia...

A la gente de mi laboratorio y a mis secres consentidas (Carmen y Marisoltz). Agradezco especialmente a Umbarila y su serie de esclavos (Citlalli y Gabriel); a Mary, Vero y Rive previos a la posdoc; no olvido la ayuda de Linda y Chano; las sugerencias de Fer Zamudio, la Dra. Gurrola, Rosalba; la secuenciación con Timo; a Fredy, Juan Carlos, Pável, Ernesto, Itzel, Santos, Cinthya, Verna, Omartz, Blanca, italiana (Rita), Ricardo de la Vega y a todas aquellas personas con quien la convivencia diaria era agradable.

Después de varias horas sentado en esta silla, intento escribir una sencilla línea queriendo reflejar que durante el éxtasis y en el abismo vivencial-existencial de estos años no estuve solo. ¿Cómo se puede explicar tan cortamente la existencia y ayuda de Dios y que la imagen del espejo del alma es un reflejo constantemente?

Finalmente he de citar la frase con que cerré los agradecimientos de la tesis de licenciatura. No en afán de aumentar la egolatría o vanidad del escribiente de este trabajo sino a manera de recordar lo mucho o poco que alguien puede cambiar conforme así lo haya decidido. "A mí mismo por ser yo porque sin mí esto no hubiera sido posible".

ABSTRACT

This work lies on a new developing medical area on which misfolded proteins are directly related with diseases. The protein analyzed in this work, whose technical name is AR, is the variable domain of an immunoglobulin light chain. AR developed a pathogenesis in a 67 year-old man who died because of a disease known as AL amyloidosis.

Amyloidosis is a misfolded-protein diseases sub-group whose principal characteristic is the structural change from the native protein state to a fiber rich of β -strands. Although AR has a high propensity to form fibers while being agitated, it remains unknown which residues and regions are prone to this condition because the model protein coding the germ-line of this light chain (6aJL2) has shown to be stable and resistant to amyloid aggregation.

This work focuses on returning some mutated residues of AR to 6aJL2 residues. Chosen AR residues were two mutations affecting hydrophobic core and one mutation located in CDR1 region. Mutants generated as single as in combination were F21I, R25G and V104L; which were thermodynamically analyzed as well as their fibrillogenic kinetics (fiber formation).

Results indicate that F21I single mutant had the most stabilizing effect over the other single mutants. Double mutant V104L/G25R showed little stabilization compared with F21I single mutant but double mutant F21I/V104L was the most stable all over the whole mutant set. Also, thermodynamic stability was directly related with fibrillogenic kinetics since AR was the most unstable and the most fibrillogenic among its mutants and F21I/V104L the most stable and the less fibrillogenic mutant.

According the model of AR, sites 21 and 104 could be interacting directly each other and this supposition is supported with thermodynamic results. Contrasting with the simplicity of previous results, site 25 showed no clear behavior on stabilization or fibrillogenic experiments among its mutants. Crystallographic models are needed in order to elucidate residue interactions which may increase amyloid propensity.

1. RESUMEN

Este trabajo se ubica dentro del marco de las enfermedades derivadas del plegamiento anómalo de las proteínas. La proteína estudiada – AR – es el dominio variable de una cadena ligera de una inmunoglobulina que estuvo involucrado en la patogénesis de un paciente de 67 años que falleció por una enfermedad conocida como amiloidosis AL.

Las amiloidosis son un grupo de estas enfermedades del plegamiento anómalo cuya característica principal es la transformación estructural de una proteína desde la estructura nativa hacia la agregación y formación de fibras conformadas por una estructura predominantemente β . Si bien AR tiene una alta propensión a formar fibras después de un proceso de agitación, se desconoce qué residuos favorecen esta condición. El proyecto consistió en realizar mutaciones puntuales de regreso hacia la línea germinal 6aJL2.

Se identificaron dos cambios dentro del núcleo hidrofóbico y un residuo localizado en el CDR1. Se generaron mutantes de la combinatoria F21I, R25G y V104L; y se caracterizó la estabilidad termodinámica y la propensión a formar fibras.

Los resultados obtenidos indican que la mutación en la posición F21I resultó más estabilizante a diferencia de las otras mutantes sencillas. La doble mutante V104L/G25R mostró un incremento en la estabilidad pero sin llegar a igualar a la mutante sencilla F21I. La doble mutante F21I/V104L fue la más estable de todas. La propensión a formar fibras estuvo relacionada con la estabilidad siendo AR la menos estable y la más proclive a formar fibras mientras que F21I/V104L fue el caso opuesto.

De acuerdo con el modelo tridimensional de AR, los residuos 21 y 104 interactúan entre sí compaginando con los datos obtenidos de las mutantes. A diferencia de estos sitios, los cambios en el residuo 25 no fueron claros con respecto a su contribución con la estabilidad o a la formación de fibra. Es necesario generar modelos cristalográficos para confirmar las interacciones pronosticadas al igual que es necesario conocer el mecanismo por el cual AR se reestructura para dar origen a los agregados amiloides.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Enfermedades del Plegamiento Anómalo

La estructura de una proteína está determinada inicialmente a partir de la secuencia de aminoácidos que la conforma (estructura primaria). Los niveles de estructuración sucesivos van definiéndose con la posición de cada aminoácido y su interacción con otros residuos de la misma cadena (estructura secundaria y terciaria). Finalmente, la estructura cuaternaria la van a presentar algunas proteínas constituidas por más de una cadena polipeptídica y es la estructura en que se van a asociar varias cadenas con estructura terciaria. (1). Por lo que, cualquier error en la estructuración a cualquier nivel pudiera derivar en la pérdida de la funcionalidad (2).

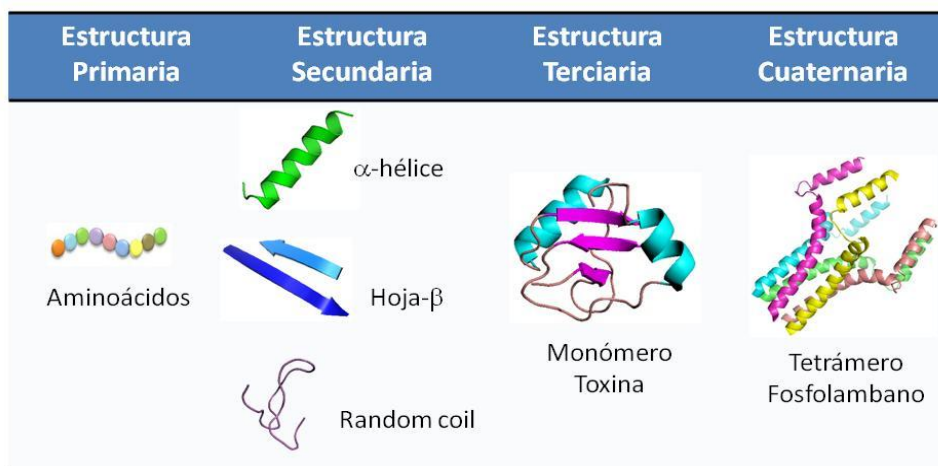


Fig. 1. Niveles de Estructuración. Representación gráfica de las estructuras primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria. Las estructuras terciaria y cuaternaria fueron generadas con el PDB con la clave 1PGA y 1ZLL respectivamente, usando el programa PyMOL®.

En los últimos años, diversas enfermedades han demostrado estar asociadas con errores en el plegamiento de las proteínas. El evento principal es el cambio de estructura secundaria y/o terciaria como consecuencia de cambios en la estructura primaria (3). A nivel celular, estos cambios suelen ser detectados por mecanismos de corrección del plegamiento (v.gr. chaperonas) que ayudan a restituir la estructura nativa. En caso de que estos mecanismos correctivos no puedan cumplir su función, existen otros mecanismos (v.gr. ubiquitinación), cuya función es degradar estas proteínas mal plegadas. Al parecer, las proteínas involucradas en enfermedades del plegamiento anómalo parecen haber escapado a estos mecanismos celulares de corrección y degradación (4, 5).

En este tipo de enfermedades existe una relación entre la disfunción celular y la proteína afectada. En algunos casos, la proteína no logra secretarse en cantidad suficiente como ocurre en la fibrosis quística y la poca cantidad que se secreta de un regulador transmembranal funcional específico para iones cloro. En otros casos, la funcionalidad de la proteína disminuye como ocurre en la fenilcetonuria debido a la fenilalanina hidroxilasa mal plegada. Finalmente, también pudiera aumentar la toxicidad de la proteína mal plegada como en el caso de la huntingtina generando Corea de Huntington (6). En la Tabla 1 se muestran algunos ejemplos en los que se relaciona la enfermedad con la proteína afectada.

Tabla 1. Enfermedades relacionadas con el plegamiento proteico (4.6)

ENFERMEDAD	PROTEÍNA INVOLUCRADA
Dificultad para el plegamiento	
Fibrosis Quística	Regulador transmembranal fibrosis cística
Fenilcetonuria	Fenilalanina hidroxilasa
Cáncer	p53
Anemia	Hemoglobina
Error durante el tráfico celular	
Hipercolesterolemia	Receptor de la lipoproteína de baja densidad
Retinitis pigmentosa	Rodopsina
Plegamiento Tóxico	
Enfermedad de Huntington	Huntingtina
Enfermedad de Alzheimer	Péptido β -amiloide/tau
Enfermedad de Parkinson	α -sinucleína
Amiloidosis AL	Región variable de la cadena ligera de una inmunoglobulina

2.2 Amiloidosis

Dentro del grupo de las enfermedades derivadas por el plegamiento anómalo de las proteínas existe un subgrupo denominado amiloidosis (7). La característica común de este subgrupo es que la proteína no sólo ha perdido su funcionalidad, sino que además, su conformación nativa cambia de tal manera que se favorece la aparición y/o el apilamiento de hojas β hasta la formación de fibras con características definidas.

Cabe mencionar que las proteínas involucradas en la formación de agregados amiloides carecen de alguna secuencia específica o alguna firma estructural que pudiera simplificar la búsqueda de proteínas susceptibles a la formación de fibras. (8, 9). Esta diversidad de proteínas amiloidogénicas llega a afectar a una gran diversidad de tejidos y órganos por lo que el tratamiento médico dependerá no sólo de sanar el sitio afectado sino también de eliminar a la célula, o conjunto de células, que están dando origen a la proteína amiloidogénica. De acuerdo con el tipo de tejido afectado, las amiloidosis pueden agruparse de la siguiente manera (9):

Tabla 2. Enfermedades dentro del grupo de la amiloidosis (9)

ENFERMEDAD	PROTEÍNA INVOLUCRADA
Amiloidosis Neurodegenerativas	
Enfermedad de Alzheimer	APP- Proteína precursora del péptido β amiloide
Enfermedad de Parkinson	α - sinucleína
Encefalopatía Espongiforme	Prion
Amiloidosis No Neuropáticas Localizadas afectando a un solo tejido u órgano exceptuando el cerebro	
Cataratas	γ - cristalina
Amiloidosis corneal asociada con triquiasis	Lactoferrina
Amiloidosis No Neuropáticas Sistémicas afectando múltiples órganos y/o tejidos	
Amiloidosis AL	Región variable de la cadena ligera de una inmunoglobulina
Amiloidosis relacionada con la hemodiálisis	β 2- microglobulina

2.3 Características Generales de las Fibras Amiloides

Las características de la fibra amiloide han sido determinadas empíricamente a partir de métodos como la difracción de rayos X de la fibra, la microscopía electrónica y la tinción química específica (10, 11, 12). La microscopía electrónica muestra que las fibras son rectas, no ramificadas, con diámetros en el orden de los 10 nm y con longitudes entre los 100 nm hasta varios micrones (Fig. 2a) (15). La fibra presenta un color verde manzana bajo luz polarizada después de haber sido teñida con Rojo Congo (Fig. 2b) (16). También se observa un cambio de la fluorescencia al teñir con Thioflavin T (ThT) el cual es el fluoróforo más confiable para la detección de fibras amiloides (17). Y por medio del Dicroísmo Circular se apoya la presencia de un alto contenido de hojas β (18). El patrón de difracción de rayos X indica una estructura β -cruzada con dos señales características: una reflexión aguda de 4.7 Å a lo largo de la dirección de la fibra y una reflexión más difusa entre 10 – 11 Å perpendicular a la dirección de la fibra (Fig. 2c) (18).

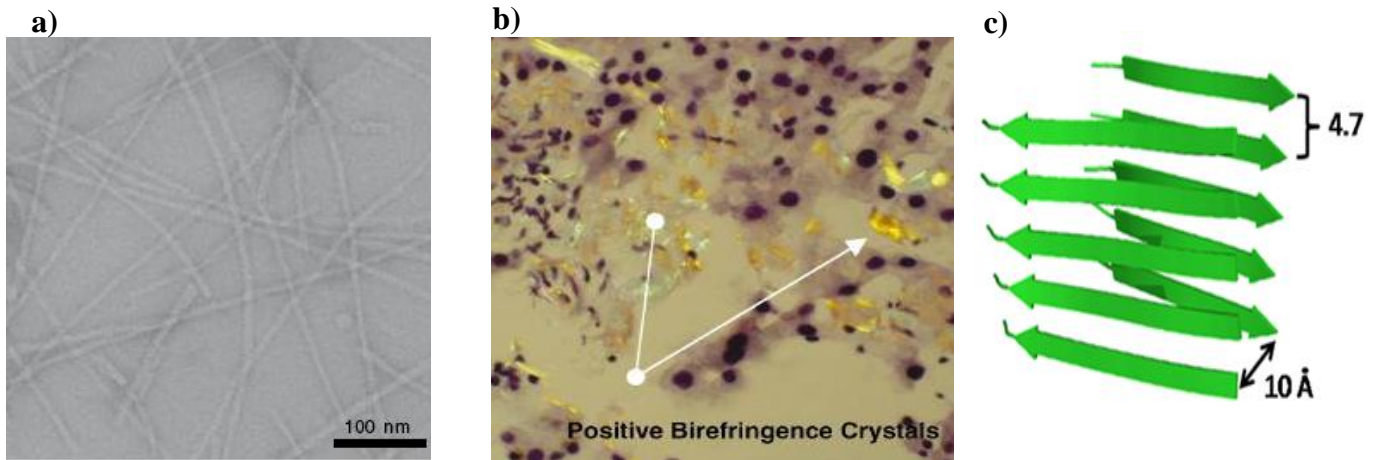


Fig. 2. Imágenes de Fibras Amiloides. a) Microscopía electrónica de fibras amiloides provenientes de la enfermedad de la diabetes tipo II mostrando fibras largas, no ramificadas, de aprox. 100 Å de diámetro (18). b) Birrefringencia color verde manzana de la fibra mediante la tinción diferencial con Rojo Congo bajo luz polarizada (19). c) Patrón β -cruzado del péptido β -amiloide de la enfermedad de Alzheimer generado a partir de PDB 2BEG y editado en PyMOL®.

Se han propuesto diversos modelos para explicar el reacomodo estructural de las proteínas amiloidogénicas para dar inicio a la formación de la fibra. Los cambios estructurales pueden involucrar desde la participación de una región específica de la proteína hasta la completa reestructuración (13, 14), por lo que cada proteína llega a tener su propio mecanismo de reacomodo para la posterior formación de fibra amiloide.

2.4 Amiloidosis AL

La amiloidosis AL es un desorden sistémico propiciado por la deposición de las cadenas ligeras de las inmunoglobulinas, específicamente las regiones variables. Se reportan entre 1,275 a 3,200 nuevos casos cada año en los Estados Unidos (20). La edad media de diagnóstico es alrededor de los 65 años siendo las dos terceras partes de los pacientes hombres y menos del 5% son menores de 40 años. (21).

La enfermedad es una condición progresiva y sistémica donde cerca del 70% de los pacientes presentan 2 ó más órganos dañados siendo los riñones, corazón, hígado, sistema nervioso periférico y sistema nervioso autónomo los más afectados (20). Las manifestaciones clínicas de AL son muy variadas dependiendo del principal órgano afectado además de existir varios síntomas poco específicos como fatiga, edema y pérdida de peso. Otros síntomas más

evidentes incluyen alargamiento de la lengua, púrpura periorbital e infiltración amiloide periarticular, aunque estos sólo ocurren en un 15% de los pacientes (23).

Históricamente la amiloidosis AL ha tenido una pobre prognosis con una supervivencia media de cerca de 13 meses (22), pero datos recientes sugieren un aumento gracias a la técnica de trasplante autólogo de células madre combinada con una quimioterapia efectiva (23). En el grupo de Merlini, ubicado en Italia, ha reportado un incremento de la supervivencia media de hasta 46 meses en 705 pacientes atendidos en sus centros de salud (23).

2.5 Región Variable de las Cadenas Ligeras de Inmunoglobulinas

Las inmunoglobulinas (Ig's) son proteínas producidas por linfocitos B, y cada linfocito B produce sólo un tipo de inmunoglobulina (monoclonal). Las Ig's (Fig. 3) son excretadas por células B maduras y esta excreción es la principal defensa en contra de los patógenos y sus productos tóxicos (24).

La región de la Ig que se une al antígeno varía entre cada inmunoglobulina y es conocida como región variable (V). Esta variabilidad permite asegurar que, prácticamente, cualquier estructura o secuencia pueda ser reconocida. La región conocida como región constante (C) debido a su baja variabilidad, es la que tiene actividad biológica ya que permite eliminar a los patógenos mediante la activación de los mecanismos efectores del sistema inmune (24).

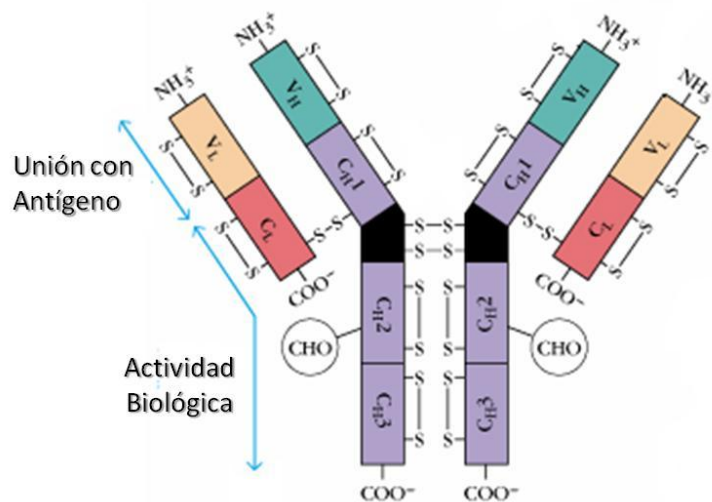


Fig. 3. Inmunoglobulina. Estructura general de una inmunoglobulina IgG (26). En morado se muestran los dominios constantes de las cadenas pesadas (CH1, CH2, CH3) y en naranja el dominio constante de las cadenas ligeras (CL). Los dominios variables de las cadenas ligeras (VL) en color salmón y los dominios variables de las cadenas pesadas (VH) en color verde.

Las cadenas ligeras de inmunoglobulinas están compuestas por 2 dominios separados, el dominio variable (V_L) y el dominio constante (C_L), unidos entre ellos por un segmento (J_L) (Fig. 4a). Los dominios V_L y C_L poseen estructuras terciarias similares, ambas compuestas por dos hojas β y un puente disulfuro. Este puente disulfuro está encerrado en el interior del núcleo hidrofóbico de las hojas β con la mayoría de los residuos no polares. Los enlaces disulfuro de cada dominio llegan a estabilizarlos de manera individual al igual que los enlaces disulfuro externos estabilizan a toda la molécula (25) (Fig. 4b).

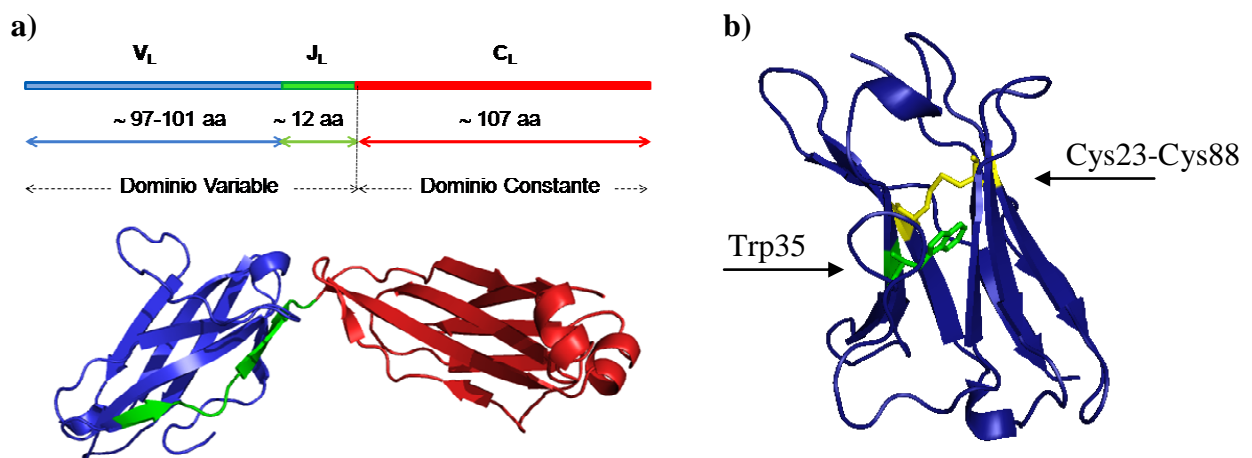


Fig. 4. a) Estructura general de las cadenas ligeras (29). En azul se encuentra representada la parte variable de las cadenas ligeras (V_L); en verde el segmento de unión (J_L) y en rojo la parte constante (C_L). El modelo estructural PDB 7FAB fue editado en PyMOL. **b)** Estructura de la V_L . En verde se ilustra el triptófano mostrando su cercanía con el puente disulfuro mostrado en amarillo.

Existen dos tipos de cadenas ligeras humanas, κ y λ . A pesar de su similitud estructural, las cadenas ligeras κ y λ son productos de genes que difieren en su localización y en el número de genes. Notablemente, la recombinación de los genes de las cadenas ligeras λ ocurre únicamente hasta después del rearrreglo improductivo del alelo κ (26, 27). Cada tipo de cadena ligera tiene un número determinado de genes funcionales ubicados en diferentes cromosomas. Son 40 los genes funcionales que codifican para las 7 subfamilias de las V_L tipo κ y 5 los genes de los segmentos de unión J_κ , todos localizados en el cromosoma 2. Para las V_L λ hay 30 genes funcionales agrupados en 10 subfamilias y 4 genes J_λ ubicados en el cromosoma 22. (26, 27)

La recombinación somática de DNA para formar la región V_L es la que ayuda a generar la diversidad de anticuerpos a partir de los genes de las líneas germinales. Este mecanismo se le conoce como rearrreglo de genes (28). La selección de cada segmento de gen durante la recombinación somática ocurre de manera aleatoria. En los linfocitos B, la región V_L pasa por otra modificación conocida como hipermutación somática. Durante este proceso, la región V_L rearrreglada es sometida a mutaciones puntuales generando así una diversidad adicional en respuesta al antígeno. Esto garantiza que el organismo pueda reconocer una gran cantidad de antígenos en la naturaleza (24, 28)

En el caso de la amiloidosis AL, usualmente V_L junto con un pequeño fragmento de la C_L , es sobre-secretada por una clona de células plasmáticas. Aún se desconocen los mecanismos de regulación que permiten sobre-secretar este dominio de manera individual y en grandes cantidades. La secreción individual parece ser una condición necesaria ya que, hasta la fecha, no se ha reportado algún caso de amiloidosis o agregación de un anticuerpo completo (29 – 32). Aún así no es suficiente la producción excesiva para que la deposición amiloide suceda.

2.6 Asociación Preferencial del Subgrupo λVI en la Amiloidosis AL

La amiloidosis AL comprende la deposición de los dos tipos de cadenas ligeras: κ y λ . Sin embargo, en un análisis de incidencia de amiloidosis de cadenas ligeras λ con respecto a las de tipo κ se observó una alta incidencia de las tipo λ ($3\lambda:1\kappa$); lo cual contrasta con la relación en el uso preferencial de cadenas ligeras en un individuo sano ($1\lambda:2\kappa$) (22). Entonces, una de las preguntas sobre esta enfermedad es el por qué las cadenas ligeras tipo λ tienen una mayor incidencia en la amiloidosis AL.

En varios estudios en series de pacientes se han analizado las líneas germinales que codificaron a las cadenas ligeras tipo λ implicadas en esta patología. Estos estudios revelan que las cadenas ligeras tipo λ derivadas de las familias $\lambda 3$ y $\lambda 6$ se encuentran altamente asociadas con la amiloidosis AL (Fig. 5) (33,34).

Comparando el uso reportado de ambos genes en la amiloidosis AL con respecto a su frecuencia en la población policlonal de células plasmáticas de la médula ósea ($3r$ –22%/8.3% y $6a$ –20%/2.3%), resulta evidente que las cadenas ligeras codificadas por el gen $6a$ muestran una gran tendencia a ser amiloidogénicas a pesar de su bajo nivel de expresión policlonal (Fig. 5) (31, 35).

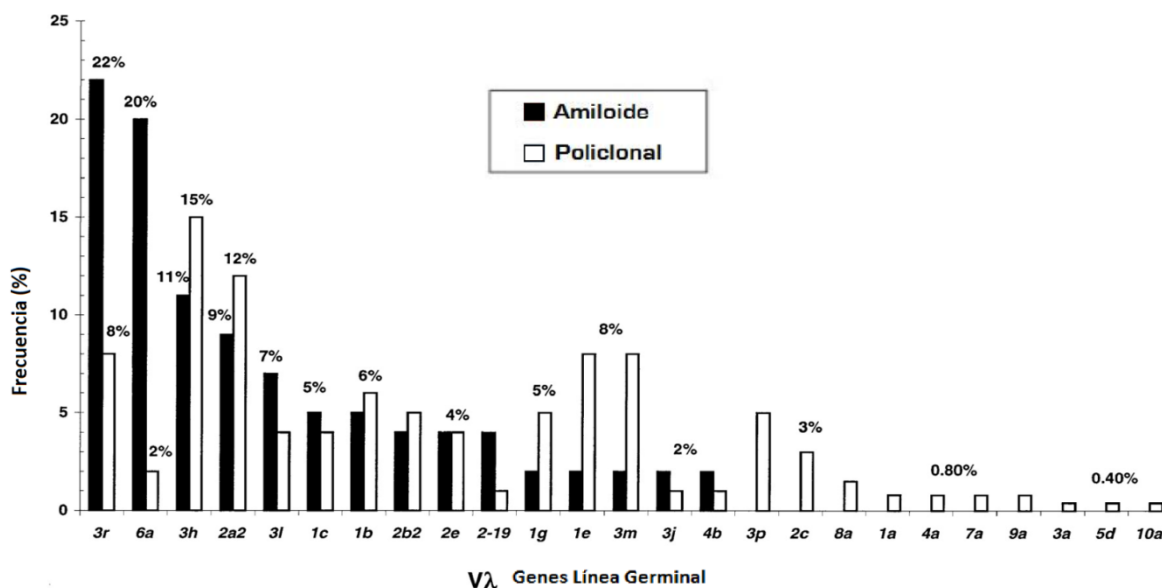


Fig. 5. Líneas Germinales λ . Repertorio de líneas germinales $V\lambda$ en células plasmáticas de amiloidosis primaria y en células policlonales (33).

Por lo que una parte de la investigación sobre la amiloidosis AL es averiguar la razón del por qué las cadenas ligeras tipo λVI tienen una alta incidencia en esta enfermedad.

2.7 Estabilidad Termodinámica de las Cadenas Ligeras y Fibrilogénesis

La dificultad para estudiar las cadenas ligeras es debida a su alta variabilidad en la estructura primaria, la cual es resultado de la hipermutación somática (40). Una de las formas para evaluar el efecto de mutaciones puntuales en una proteína es la medición del impacto que tienen éstas sobre la estabilidad termodinámica con respecto a la proteína nativa (40, 41). Con esta información se podría dilucidar qué sitios de las cadenas ligeras son los más susceptibles al cambio de residuo debido al impacto que tendría alguna mutación sobre la estabilidad termodinámica.

La estabilidad termodinámica de una proteína está referida a la energía libre de Gibbs (ΔG°) entre el estado nativo y el estado desnaturalizado (36). En otras palabras, ΔG° es la energía que se requiere para desnaturalizar una proteína desde su estado nativo. Esta estabilidad está íntimamente relacionada con las interacciones no covalentes de toda la molécula involucrando principalmente la compactación del núcleo hidrofóbico y las interacciones de van der Waals (36, 37). El cambio de interacciones no covalentes de una proteína varía con los cambios de temperatura, concentración de desnaturalizante, o pH. Estos cambios pueden registrarse mediante métodos espectroscópicos como el dicroísmo circular o la fluorescencia intrínseca de algún aminoácido aromático como Trp, Tyr o Phe (37).

En el caso de las cadenas ligeras, la desnaturalización puede seguirse con la exposición del Triptófano (Trp) localizado en el interior del núcleo hidrofóbico, contiguo al puente disulfuro (Fig. 4b), hacia su exposición al solvente. La contigüidad con el puente disulfuro disminuye la fluorescencia del Trp mediante un proceso de apagamiento (“*quenching*”); por lo que en condiciones nativas no llega a detectarse emisión (38). Sin embargo, durante el proceso de desnaturalización, el Trp va alejándose de este puente disulfuro y la exposición hacia el solvente propicia un incremento en la intensidad de la fluorescencia. Esta propiedad se ha usado para detectar cambios en la estructura secundaria y terciaria además de facilitar el cálculo para la estabilidad termodinámica (36, 39).

Se ha demostrado que la estabilidad termodinámica es un factor directamente asociado con la resistencia de una proteína a formar fibras. Una disminución en la estabilidad termodinámica puede conllevar al aumento de la propensión a la formación de fibras amiloides (43, 44, 45). Para simular la formación de agregados fibrilares *in vivo* (amiloidogénesis) se han desarrollado técnicas en las que se propicia la formación *in vitro* (fibrilogénesis) teniendo éstas en común a la agitación como factor potenciador (42, 43).

3. ANTECEDENTES DIRECTOS DEL PROYECTO

Una posible explicación a la fuerte asociación del subgrupo λ VI con la amiloidosis AL podría ser que la secuencia de la línea germinal, específicamente el gen δa , sea intrínsecamente amiloidogénica.

En nuestro grupo se planteó la hipótesis de la amiloidogenicidad intrínseca siendo la tesis de del Pozo (46) donde se analizó esta hipótesis. Se sintetizó el gen de la línea germinal δa denominado 6aJL2 por la adición del segmento J λ 2. Se expresó heterológicamente en *E. coli*, se purificó y se analizó tanto su estabilidad termodinámica (Tabla 3) como su capacidad de formar fibras *in vitro* – fibrilogénesis (Fig. 6) (47). De igual manera, se buscaron posibles variantes alotípicas de la línea germinal al haberse analizado un gran conjunto de secuencias de las V_L λ 6 reportadas amiloidogénicas y del repertorio policlonal (46.) Se encontró que en la posición 25, una Gly ocupa el 25% de las secuencias y el otro 75% una Arg. Esta variación en el sitio 25 parece estar asociada con la posición 43 donde Ser43 acompaña a Gly25 y Ala43 a Arg25. Se sintetizó y analizó la variante de la línea germinal en donde la posición 25 se sustituyó Arg por Gly denominándose R25G.

Los resultados fueron comparados con dos V_L λ VI que han servido como modelo para estudiar el efecto de las mutaciones somáticas sobre el comportamiento amiloidogénico: WIL, clínicamente amiloidogénica; y JTO, clínicamente no amiloidogénica. La sutil diferencia entre éstas dos yace en que el paciente JTO no presentó depósitos amiloides en alguna biopsia aun teniendo la sobreexpresión de la cadena ligera; aunque quizá este exceso de proteína se haya formado en agregados amorfos. A diferencia, el paciente WIL sí presentó depósitos amiloides detectados principalmente en el riñón (44). Es de hacer notar que JTO ha sido la única V_L λ VI reportada que no estuvo implicada en amiloidosis.

Tabla 3. Valores de la estabilidad termodinámica y de la cinética de fibrilogénesis *in vitro* de las V_L λ 6 (47)

rV _L	Desnaturalización Térmica	Fibrilogénesis	
	$\Delta G_{25^\circ C}$ (Kcal/mol)	Lag time (hrs : mins)	(k ⁻¹) (segs)
6aJL2	5.2	13 hrs : 36 mins	7.96E-05
JTO	4.6	3 hrs : 58 mins	3.94E-04
R25G	3.8	1 hr : 20 mins	9.03E-04
WIL	3.0	34 mins	2.00E-03

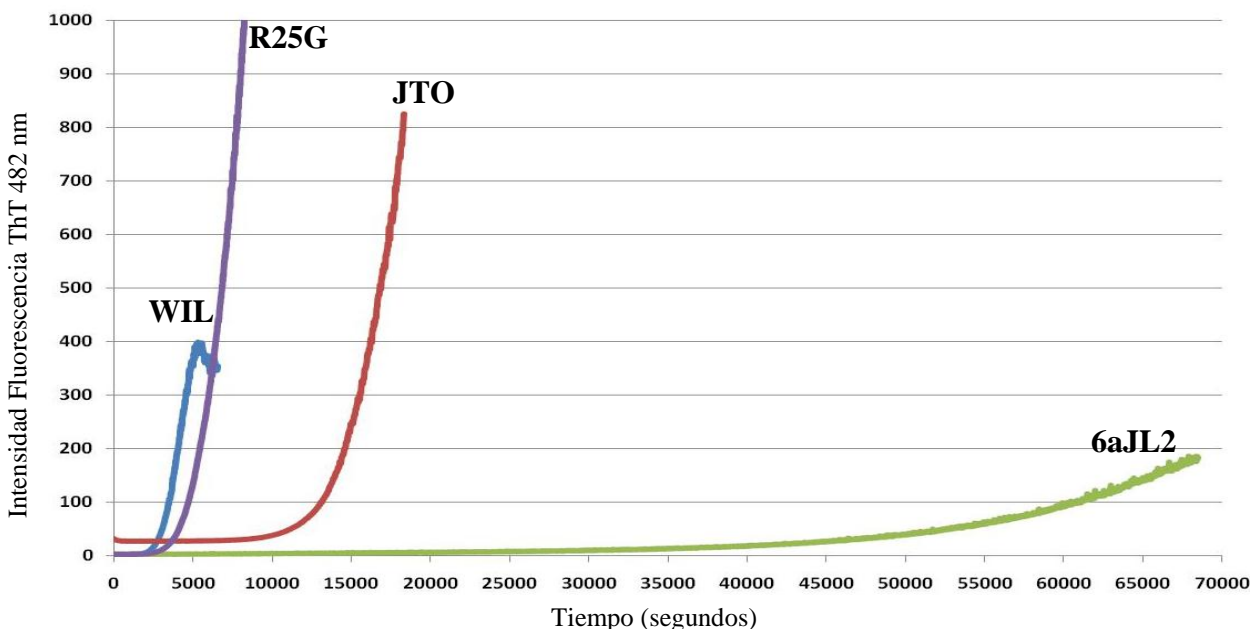


Fig. 6. Fibrillogénesis *in vitro* de rV_L 6aJL2, JTO, WIL y R25G. El experimento se realizó a 37 °C, en un volumen de 3 mL, a una concentración de 100 µg/mL de proteína en PBS 1X y ThT 20µM en agitación constante. Cada curva representa la variación de la intensidad de fluorescencia de ThT a 482nm con respecto al tiempo.

De acuerdo con la Tabla 3 y con la Figura 6, 6aJL2 resultó más estable y menos fibrillogénica que las otras V_L modelo. Por consiguiente, se puede decir que es en el proceso de hipermutación somática, durante la etapa de maduración de la respuesta inmune, cuando se introducen cambios importantes que pueden influir en la estabilidad termodinámica (40).

La hipótesis inicial era que la línea germinal 6a exacerba la propensión de las cadenas ligeras λVI a la agregación amiloide debido a la baja estabilidad termodinámica propia. Sin embargo, los resultados experimentales obtenidos rechazan esta hipótesis (46). Además, otro dato interesante es que los experimentos mostraron que la substitución Arg25Gly disminuyó significativamente la estabilidad del dominio 6aJL2 (Tabla 3).

En trabajos anteriores se ha demostrado que las cadenas ligeras amiloidogénicas poseen una menor estabilidad termodinámica que las cadenas ligeras no amiloidogénicas de su mismo isotipo (45, 48). En este caso, JTO que no fue una cadena ligera amiloidogénica ha sido más estable que las otras cadenas ligeras analizadas involucradas en amiloidosis (49).

3.1 AR

Una de las primeras cadenas ligeras λ VI amiloidogénicas reportadas fue AR. Esta proteína fue extraída del bazo de un paciente con amiloidosis primaria el cual falleció 5 meses después del diagnóstico (50). Es importante hacer notar que AR, en la posición 25, presenta una Gly en lugar de una Arg haciéndola similar a la variante alotípica de 6aJL2 – R25G (Fig. 7). Esta cadena ligera obtenida de un paciente ofrece la clara oportunidad de verificar la importancia del cambio de residuo en la posición 25 dentro de un contexto posterior al proceso de hipermutación somática.

La secuencia de AR difiere en 14 posiciones con respecto a la proteína modelo 6aJL2 (Fig. 7) (26). Nuestro grupo construyó el gen de AR y se analizó de manera similar que las otras estudiadas anteriormente. El análisis termodinámico preliminar determinó que esta V_L λ VI es menos estable y, también de manera preliminar, más fibrilogénica que las otras analizadas (46).

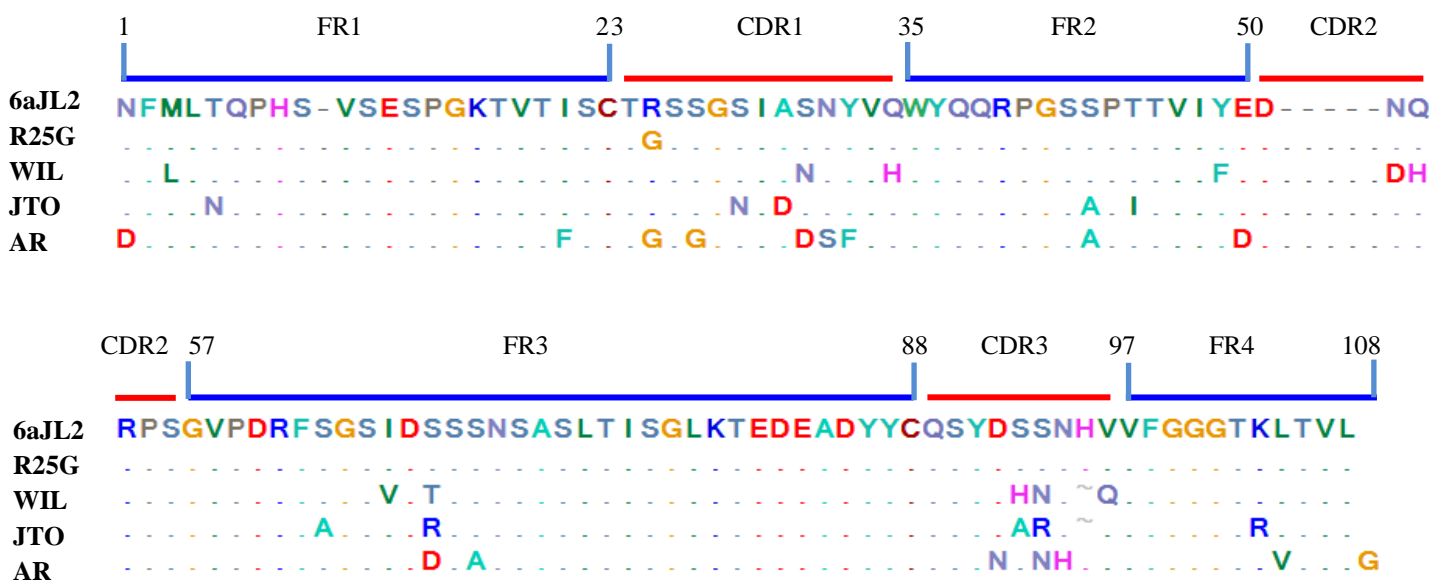


Fig. 7. Alineamiento de las secuencias de rV λ 6 6aJL2, R25G, WIL, JTO y AR. Los residuos que difieren de la línea germinal 6a están indicados y los que coinciden están representados con un punto. El sistema de numeración de las regiones Determinantes de Complementariedad con el Antígeno (CDRs) y las Regiones Marco (FRs) son los propuestos por Kabat et al (51).

El análisis comparativo entre la secuencia y los modelos estructurales de 6aJL2 y AR, permitieron identificar dos cambios en AR, que por su carácter, podrían explicar parte de las propiedades biofísicas de esta proteína. Estos dos cambios son Phe21 y Val104, que sustituyen a la Ile y Leu de la línea germinal respectivamente. Ambos residuos se encuentran espacialmente próximos y forman parte del grupo de los residuos conservados de la región hidrofóbica central (núcleo hidrofóbico) de las cadenas ligeras (52) (Fig. 8).

Los residuos que conforman los núcleos hidrofóbicos de las proteínas se encuentran interaccionando mediante fuerzas de van der Waals las cuales han sido optimizadas evolutivamente. A pesar de que el núcleo hidrofóbico posee un cierto grado de plasticidad (53), los residuos del núcleo son más sensibles a ser sustituidos (54). Por lo que la estabilidad termodinámica de AR podría ser notablemente afectada ya que los cambios 21 y 104 alterarían el núcleo hidrofóbico mediante un aumento de volumen (Phe vs Ile) y el cambio de interacciones con una cadena lateral diferente (Val vs Leu).

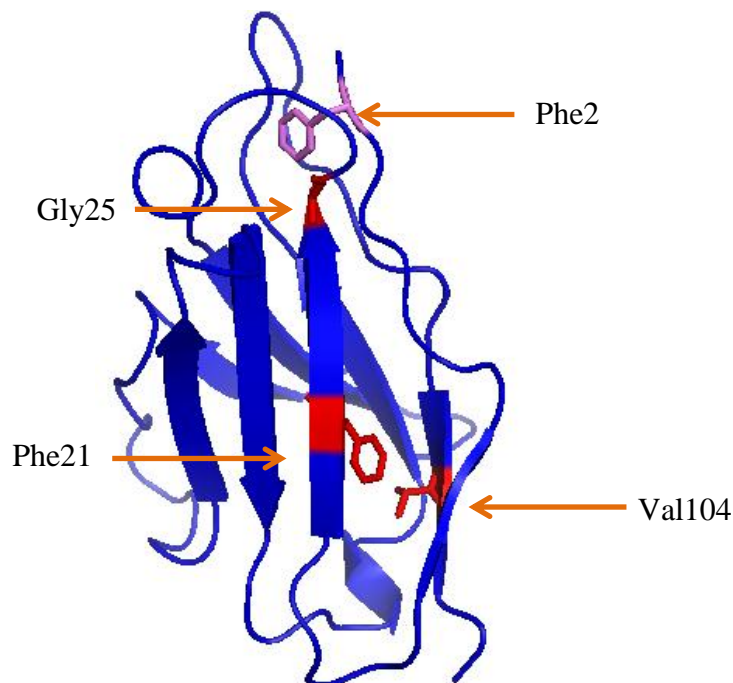


Fig. 8. Modelo Tridimensional de AR. Se señalan las posiciones de los aminoácidos propuestos para la mutagénesis. La Phe2 interactúa con la Gly25; Phe21 y Val104 se encuentran dentro del núcleo hidrofóbico. La estructura fue generada en SwissPDBviewer con el modelo cristalográfico de JTO (1CD0) y editada en PyMol.

Sabiendo que 6aJL2 es más estable y que ésta es una proteína modelo que emula la línea germinal, el retornar la secuencia de AR hacia la línea germinal podría aumentar gradualmente la estabilidad termodinámica. El efecto individual y el efecto combinatorio de estos tres residuos (Phe21Ile, Gly25Arg, Val104Leu) sobre la estabilidad termodinámica y la fibrilogénesis ayudarían a establecer un patrón acerca de qué sitio es más susceptible a la desestabilización termodinámica (Fig. 9).

AR - Secuencia Original

DFMLTQPHSVSESPGKTVTFSCTGSGGSIADSFVQWYQQRPGSAPTTVIYDDNQRPSGVPDRFSG
SIDDSANSASLTISGLKTEDEADYYCQSYNSNHVVVFGGGTKVTVLG

AR - Secuencia con los cambios F21I, G25R, V104L

DFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSGGSIADSFVQWYQQRPGSAPTTVIYDDNQRPSGVPDRFSG
SIDDSANSASLTISGLKTEDEADYYCQSYNSNHVVVFGGGTKLTVLG

Fig. 9. Cambios propuestos de AR. Las letras remarcadas en rojo y subrayado son los residuos que cambiarán. Numeración de los residuos basada en la propuesta por Kabat et al (51).

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS:

La sustitución de los residuos F21, G25 y V104 de la V_L AR por los residuos I21, R25 y L104 propios de la línea germinal 6a aumentará su estabilidad termodinámica disminuyendo la propensión a formar fibras.

OBJETIVOS:

General.

- Estudiar la influencia de las mutaciones anteriormente mencionadas, como mutantes sencillas y dobles mutantes, sobre la estabilidad termodinámica y las propiedades de fibrilogénesis *in vitro* del dominio variable recombinante AR.

Específicos.

- Generar y expresar las variantes propuestas del dominio variable AR.
- Analizar la estabilidad termodinámica de cada variante mediante la desnaturalización química con cloruro de guanidino y la desnaturalización por calor.
- Analizar las propiedades fibrilogénicas *in vitro* de las variantes del dominio AR.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Oligonucleótidos

En la Tabla 4 se detallan los oligos usados y en la Fig. 10 se explica gráficamente el uso para cada oligo.

Tabla 4. Descripción de oligos usados para la mutación sitio-específica*.

Oligo	Secuencia 5' → 3'	Descripción
AR'F21IA	TCGGAGTCTCCGGGGAAGACGGTAACC <u>ATC</u> TCCTGCACCGGCAGCGGTGGC	Introduce la mutación F21I además de respetar la secuencia codificante para G25.
AR'F21IB	GATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTG TGTCGGAGTCTCCGGGGAAG	Completa la secuencia de AR del extremo N-terminal
AR'G25R-F21I	TCGGAGTCTCCGGGGAAGACGGTAACC <u>ATC</u> TCCTGCACCCGTAGCGGTGGC	Introduce la mutación F21I además de respetar la secuencia codificante para R25.
AR'V104L	CCGCTTAGCCTAGGACG GTCAGCTTGGTCCCTCCGCCGAATAC	Introduce la mutación V104L.
AR'NotIComp	GAGTCATTCTCGACTTGCGGCCGCTTAG CCTAGGACGG	Introduce el sitio de restricción <i>NotI</i> sin interferir con el triplete 104.
SfiI-AR	GTCCTCGCAACTGCGGCCAGCCGGCC ATGGCCGATTTTATGCTGACTCAGCCC	Introduce el sitio de restricción <i>SfiI</i> sobre el extremo N-terminal. También fue ocupado para secuenciar de 5' → 3' en plásmido pSyn1.

* En negrita y subrayado se marca el sitio de la mutación puntual. En negrita se marca la posición del sitio 25.

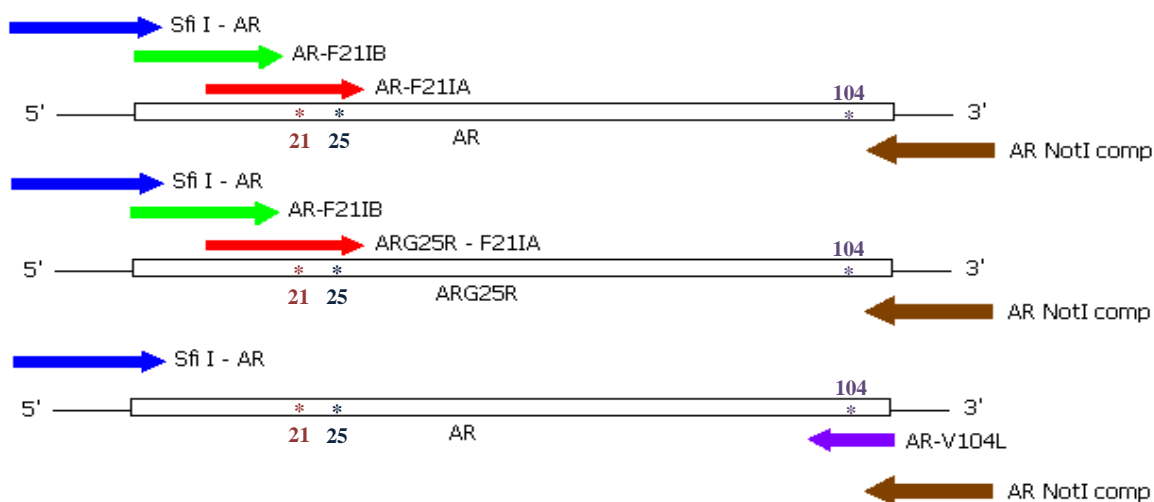


Fig. 10. Uso de los Oligos. Representación esquemática de los oligos y su uso para el PCR.

5.2 Cepas

Tabla 5. Cepas usadas.

Cepa	Genotipo	Referencia
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F' <i>ompT gal [dcm] [lon] hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻ ; una cepa de <i>E. coli</i> B) con DE3, un profago λ conteniendo el gen de la T7 RNA polimerasa	Novagen
<i>E. coli</i> DH5αF'	F' <i>lendA1 hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺) <i>glnV44 thi-1 recA1 gyrA</i> (Nal ^R) <i>relA1 Δ(lacIZYA-argF)U169 deoR(ϕ80dlacΔ(lacZ)M15)</i>	Invitrogen
<i>E. coli</i> W3110	F' λ rph-1 INV(rrnD, rrnE)	Invitrogen
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS	F' <i>ompT gal [dcm] [lon] hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) λ (DE3) pLysS (Cm ^R); pLysS genera resistencia al cloranfenicol y la lisozima del fago T7 atenúa la actividad de la T7 RNA polimerasa.	Invitrogen

5.3 PCR recursivo

Se usó la técnica de PCR recursivo para la introducción de mutaciones sitio-específicas. En la siguiente figura se detalla el ciclo de temperaturas empleada en el termociclador (Fig. 11).

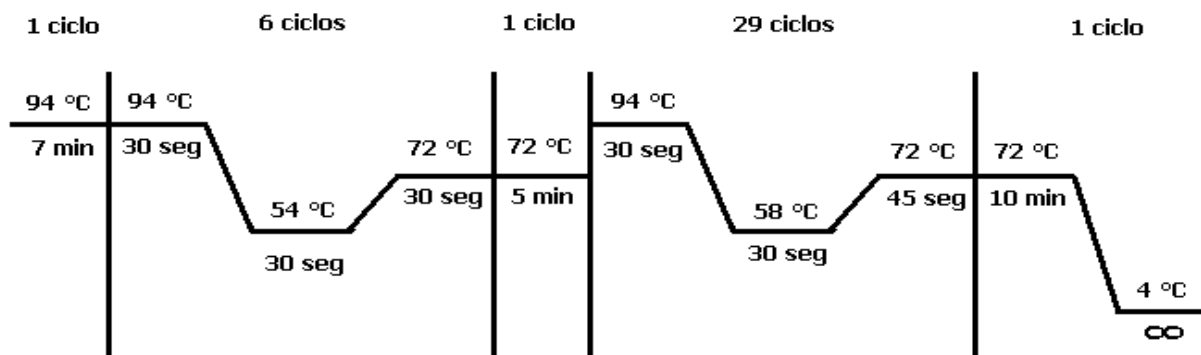


Fig. 11. Esquema de las temperaturas para la reacción de PCR

Amortiguador PCR 10X	10 μL
dNTP's* [5 mM]	4 μL
Oligo Fwd (15 pmol/ μL)	1 μL
Oligo Rvs (15 pmol/ μL)	1 μL
Enzima Vent polimerasa* (2,000 U/μL)	0.5 μL
DNA	~ 100 ng
Agua tetradestilada	c.b.p.100 μL
*New England Biolabs	

Como ya se disponía de la construcción de AR, se llevaron a cabo los PCR recursivos mutagénicos hasta obtener el gen mutante con los sitios de restricción *SfiI* y *NotI*. Posteriormente se llevaron a cabo las digestiones, se ligó el inserto en el vector pSyn1 y se transformó en la cepa *E. coli* DH5α.

El análisis de los productos se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% en amortiguador TAE 1X. La visualización de las bandas de DNA se realizó por tinción con bromuro de etidio bajo luz UV. Los productos de PCR se purificaron mediante electroforesis en gel de agarosa 2% en TAE 1X con el procedimiento *QIAquick Gel Extraction Kit* de QIAGEN.

5.4 Digestión Enzimática

Los genes mutantes de AR se digirieron con las enzimas *SfiI* y *NotI* de la marca *New England Biolabs*. Para cada digestión se utilizaron las condiciones recomendadas por la compañía. El volumen en el que se llevó a cabo cada reacción fue variable, así como la cantidad de enzima y de DNA que se deseaba digerir. El siguiente es un ejemplo de una digestión:

DNA a digerir (~40 ng)	15 µL
Amortiguador 10X	5 µL
Enzima (20,000 U/ µL)	1 µL
Agua	24 µL
BSA 10 X	5 µL
Volumen total de la reacción	50 µL

En el caso de digestiones dobles, primero se digirió con la enzima *SfiI*, se precipitó el DNA. Posteriormente se hizo la digestión con *NotI* y se precipitó el DNA doblemente digerido.

5.5 Precipitación de las Digestiones

Como se mencionó en el párrafo anterior, en algunos casos fue necesario precipitar las digestiones, esto se llevó a cabo de la siguiente manera:

1. A la reacción de digestión se le agregaron 500 µL de butanol al 100%.
2. Durante 30 segundos se mezcló con el "vortex".

3. Se centrifugó a 12,000 r.p.m. durante 5 minutos a temperatura ambiente.
4. Se eliminó el sobrenadante y se agregaron 500 μL de etanol al 70%
5. Se centrifugó a 12,000 r.p.m. durante 5 minutos a temperatura ambiente.
6. Se eliminó el sobrenadante y el DNA se secó a 37 °C durante 30 minutos y se resuspendió en agua estéril en el volumen deseado.

5.6 Ligación

La ligación se realizó con el vector pSyn1 digerido con las enzimas anteriores. El resultado de la digestión se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en amortiguador TAE 1X A continuación se describe un ejemplo de las reacciones de ligación.

DNA inserto (~10 ng)	4 μL
DNA vector (~3 ng)	1 μL
Amortiguador 10X	2 μL
T4 DNA ligasa* (400,000 U/ μL)	0.5 μL
Agua	7.5 μL
Volumen total de la reacción	20 μL
*Promega	

La mezcla de reacción se incubó a 16°C durante toda la noche. Se precipitó la reacción y se transformó en células competentes mediante electroporación.

Para evaluar la presencia de inserto en las construcciones, se inocularon varias colonias y se incubaron en medio YT2X líquido con ampicilina. Se extrajo el plásmido y se realizó PCR con los oligos SfiI-AR y ARNotIcomp. En la Fig. 12 se ejemplifica este paso con las colonias obtenidas para la construcción pV104L esperando una banda próxima a los 400 pares de bases que representa el tamaño del inserto clonado en el vector.

La banda observada en los controles negativos es producto de la complementación inespecífica de los oligos. Las colonias que presentaron el tamaño de inserto adecuado se mandaron secuenciar para confirmar la presencia de las mutaciones en los sitios deseados.

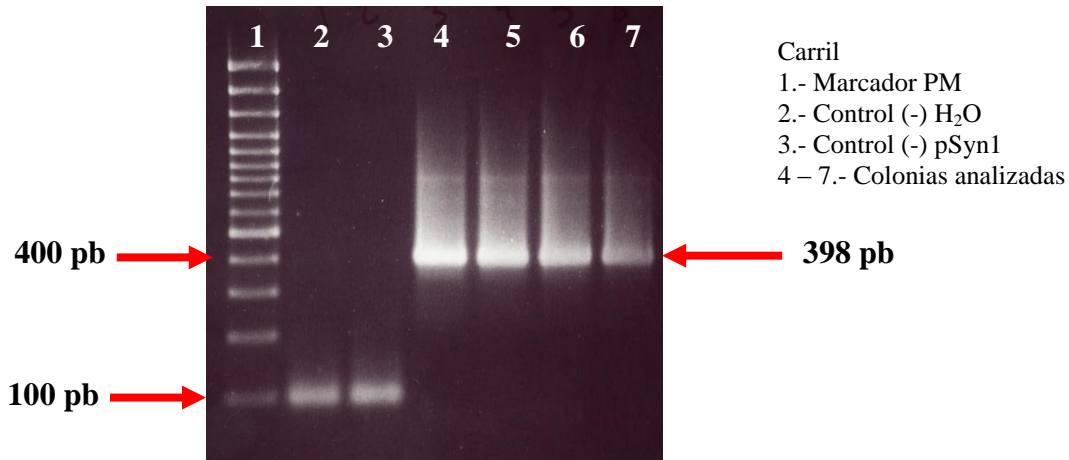


Fig. 12. PCR de colonia. Verificación de la presencia de inserto.

5.7 Preparación de Células Competentes

Para poder llevar a cabo la transformación de ligaciones y plásmidos fue necesario preparar células electrocompetentes. La metodología fue la siguiente:

1. Se inoculó la cepa en antibiótico correspondiente toda la noche en 5 mL medio LB.
2. Se inoculó 1 mL del cultivo anterior en un matraz con 100 mL de medio LB más antibiótico. Se dejó creciendo a 37 °C hasta llegar a una D.O₆₀₀ ~ 0.6
3. El cultivo se dejó en hielo por 10 minutos.
4. Se centrifugó a 5000 r.p.m. por 10 minutos a 4 °C.
5. Las células se resuspendieron en 20 mL de agua Milli-Q estéril fría y se centrifugaron como en el paso anterior. Se repitió 2 veces este procedimiento.
5. Las células se resuspendieron en 10 mL de glicerol al 10 % (v/v) frío y se centrifugó en las condiciones ya mencionadas.
6. Las células se resuspendieron en 300 µL de glicerol al 10% frío.
7. Se prepararon alícuotas de 50 µL en tubos previamente enfriados.

5.8 Transformación

La recuperación de las construcciones se hizo en células *E. coli* DH5α electrocompetentes. La expresión heteróloga se realizó transformando las construcciones en células quimiocompetentes por cloruro de calcio de *E. coli* (DE3) BL21.

Se siguió la siguiente metodología para la transformación en células electrocompetentes:

1. Para 50 μL de células se adicionaron 5 μL de la construcción.
2. La electroporación se realizó en celdas de la marca *Easyjet* con 2 mm de separación entre las placas y el pulso fue de 1800Volts.
3. Las células fueron resuspendidas en 1 mL de medio YT2X e incubadas en agitación por una hora a 37 °C.
4. Se sembraron 100 μL del cultivo sobre cajas de Petri con medio selectivo Agar-YT2X suplementado con ampicilina [100 $\mu\text{g}/\text{mL}$] y fueron incubadas a 37 °C toda la noche.

Para la transformación en células quimiocompetentes:

1. Para 50 μL de células se adicionaron 5 μL de la construcción.
2. La mezcla se mantuvo en hielo durante 1 hora.
3. Se procedió a dar un choque térmico a 40 °C durante 2 minutos.
4. Las células fueron resuspendidas en 1 mL de medio YT2X e incubadas en agitación por una hora a 37 °C.
5. Se extendieron 100 μL del cultivo sobre cajas de Petri con medio selectivo Agar-YT2X suplementado con ampicilina [100 $\mu\text{g}/\text{mL}$] y fueron incubadas a 37 °C toda la noche.

5.9 Análisis de las Construcciones

Para corroborar la presencia de inserto en las colonias obtenidas, éstas se analizaron mediante PCR y así descartar la presencia de falsos positivos (vector religado). Como controles negativos se utilizó agua tetradestilada y vector pSyn1 para descartar cualquier banda que pudiera indicar algún falso positivo. Las colonias positivas fueron incubadas en medio YT2X líquido con ampicilina [100 $\mu\text{g}/\text{mL}$] a 37 °C en agitación toda la noche. El plásmido se extrajo con el kit *High Pure Plasmid Isolation Kit for small scale (mini) preparations* de Roche y se mandaron secuenciar para confirmar la presencia de las mutaciones en los sitios deseados.

5.10 Expresión en *E. coli*

La expresión se realizó en células quimiocompetentes de *E. coli* BL21 (DE3). Se siguió la siguiente metodología para realizar las pruebas de expresión.

- 1.- Se seleccionó una colonia de la caja Petri y se transfirió a un tubo con 5 mL de medio YT2X líquido suplementado con ampicilina a 100 µg/mL.
- 2.- Las células se dejaron crecer toda la noche a 37 °C en agitación a 300 rpm.
3. Se transfirieron los 5 mL de cultivo a 500 mL de medio YT2X líquido suplementado con ampicilina 100 µg/mL
4. El cultivo se mantuvo a 37 °C con agitación a 150 rpm hasta que la $DO_{600} \sim 1.2$.
- 5.- Se adicionó ampicilina hasta una concentración de 100 µg/mL. También se adicionó IPTG hasta concentración de 1 mM para iniciar la inducción.
6. Se continuó la incubación con una agitación de 115 rpm a 20 °C durante 8 – 10 horas y posteriormente se extrajo el contenido periplásmico.

5.11 Extracción del Contenido Periplásmico

El sobrenadante representa la fracción periplásmica donde se encuentra exportada la proteína. El grado de expresión de los genes inducidos se evaluó mediante electroforesis en geles SDS-PAGE al 15% bajo condiciones reductoras.

Se siguió la siguiente metodología para la extracción del contenido periplásmico mediante choque osmótico:

1. Las células provenientes del cultivo inducido fueron colectadas por centrifugación a 6,000 rpm durante 15 min a 4 °C en rotor de ángulo fijo JA-14.
2. La pastilla celular se resuspendió en 20 mL de solución de sacarosa al 20%, Tris-HCl 25 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0 (buffer PPB).
3. Se incubó durante 15 min a temperatura ambiente con agitación ocasional.
4. La suspensión se centrifugó a 7,000 r.p.m. durante 15 min.
5. Se resuspendió la pastilla celular en 20 mL de agua mQ fría.
6. Se incubó durante 15 min en hielo con agitación ocasional.
7. La suspensión se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 min usando freno mínimo para evitar que las células se resuspendieran durante el frenado.

5.12 Purificación

El extracto periplásmico se centrifugó a 7,000 rpm durante 30 minutos a 4 °C para eliminar cualquier resto celular y se dializó en buffer TrisHCl 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5 toda la noche.

Como primer paso se usó cromatografía de exclusión molecular en un sistema FPLC en una columna semi-preparativa de Sephacryl S100 HR y un sistema EKTA-Basic. Se usó para el mismo buffer de diálisis a un flujo de 2.5 mL/min y se colectaron fracciones de 5 mL.

Las fracciones de la exclusión molecular se analizaron en geles SDS-PAGE al 15%. Las fracciones donde se presentó la proteína de interés se concentraron en un filtro Amicon de corte de 5 kDa a 3,500 rpm durante 15 minutos a 4 °C.

Posteriormente se usó la cromatografía por intercambio iónico para eliminar la presencia de proteínas contaminantes que no pudieron separarse con la exclusión molecular. Se usó un sistema FPLC en una columna de Sephadex y un sistema EKTA-Basic. Se usó un gradiente de NaCl de 0 – 0.5 M a un flujo de 2.5 mL/min y se colectaron fracciones de 5 mL.

5.13 Estabilidad Termodinámica

La estabilidad termodinámica de una proteína (ΔG°) es la diferencia que hay entre la energía libre del estado nativo con respecto a la energía libre del estado desnaturalizado. Se evalúan únicamente las interacciones no covalentes que gobiernan la estabilidad global.

5.14 Mediciones Espectroscópicas siguiendo la Exposición del Triptófano.

El grado de desnaturalización se determinó mediante la medición de la fluorescencia intrínseca (Trp35), para lo cual se usó un espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS50B. La muestra fue excitada a 295 nm y se registró la intensidad de fluorescencia en el intervalo de 310nm a 410nm. La solución blanco para restar el ruido de estas mediciones fue el mismo amortiguador con el que se diluyó la proteína. La fluorescencia máxima del Trp ubicado en una región hidrofóbica es de 330 nm; pero cuando éste se halla en una zona expuesta al solvente el máximo de emisión cambia a 355 nm. Se usó este valor para calcular el grado de

exposición del triptófano. El ancho de los slits fue de 2.5 nm para la excitación y 5.0 nm para la emisión.

5.15 Desnaturalización Química de Dos Estados

En este experimento se evalúa el efecto del desnaturalizante sobre la proteína considerando la constante de equilibrio (K) de la reacción de desnaturalización.



Se prepararon soluciones de 50 µg/mL de proteína en amortiguador fosfato monobásico de sodio 20mM pH 7.5, a diferentes concentraciones de desnaturalizante (GndHCl) y se incubaron a 25 °C durante 8-12 horas. El valor de fluorescencia a 355 nm se usó para calcular la K y el ΔG° mediante el método de Santoro y Bolen (55). Para ello se ajustaron los datos de la fluorescencia a la ecuación siguiente usando el programa OriginPro 8 con el método no lineal de mínimos cuadrados de Levenberg-Marquardt (56):

$$F_{\text{Trp}} = \frac{(y_n + m_n [D]) + (y_d + m_d [D]) * e^{-\left(\frac{\Delta G^\circ_{H_2O} + m_g [D]}{RT}\right)}}{1 + e^{-\left(\frac{\Delta G^\circ_{H_2O} + m_g [D]}{RT}\right)}} \quad \text{Ec. 2}$$

Donde [D] es la concentración del desnaturalizante; y_x y m_x corresponden a la intersección en el eje de las abscisas y a la pendiente del ajuste lineal de los datos de fluorescencia de la forma nativa (n) y desnaturalizada (d) de la proteína respectivamente (Fig. 13). $\Delta G^\circ_{H_2O}$ es el cambio de energía libre de la conversión del estado nativo al desnaturalizado en ausencia de desnaturalizante, m_g es la pendiente de la porción lineal de la región de transición, R es la constante universal de los gases y T es la temperatura absoluta en °K.

La C_m representa la concentración de desnaturalizante en la cual hay una relación porcentual 50/50 de proteína desnaturalizada contra proteína nativa y fue calculada dividiendo la $\Delta G^\circ_{H_2O}$ entre la pendiente m_g .

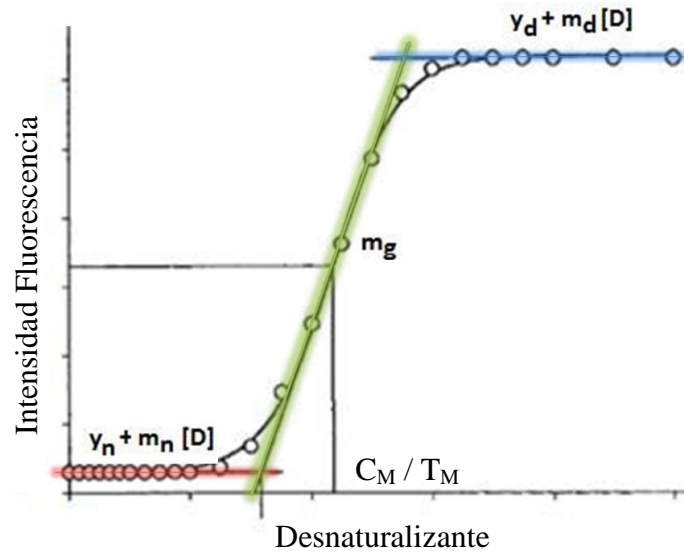
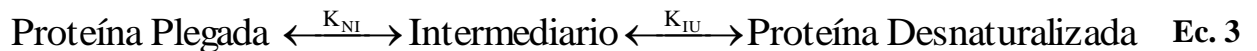


Fig. 13. Cinética de Desnaturalización. Curva tipo de una desnaturalización de dos estados donde la intensidad de la fluorescencia aumenta con respecto al desnaturalizante. Se marcan las tres etapas típicas de la desnaturalización: en rojo la pre-transición, verde la transición y en azul la post-transición. También se indica la parte de la ecuación que representa a cada etapa.

5.16 Desnaturalización Química de Tres Estados

La desnaturalización de dos estados no contempla la existencia de algún intermediario, con lo que se podría subestimar o sobreestimar el valor de la energía libre. La desnaturalización en tres estados contempla la existencia de un intermediario como se muestra a continuación:



Se asumió que la energía libre de Gibbs entre cada estado variaba linealmente con el aumento de la concentración de desnaturalizante. Se ajustaron los datos de la fluorescencia a la ecuación siguiente usando el programa OriginPro 8 con el método no lineal de mínimos cuadrados de Levenberg-Marquardt (56):

$$F_{app} = \frac{e^{-\left(\frac{\Delta G_{NI}^{\circ} + m_{g_{NI}}[D]}{RT}\right)} * e^{-\left(\frac{\Delta G_{IU}^{\circ} + m_{g_{IU}}[D]}{RT}\right)} + z * e^{-\left(\frac{\Delta G_{NI}^{\circ} + m_{g_{NI}}[D]}{RT}\right)}}{1 + e^{-\left(\frac{\Delta G_{NI}^{\circ} + m_{g_{NI}}[D]}{RT}\right)} + e^{-\left(\frac{\Delta G_{NI}^{\circ} + m_{g_{NI}}[D]}{RT}\right)} * e^{-\left(\frac{\Delta G_{IU}^{\circ} + m_{g_{IU}}[D]}{RT}\right)}} \quad \text{Ec. 4}$$

Donde [D] es la concentración del desnaturalizante; F_{app} es la fluorescencia de la fracción aparente de la proteína desnaturalizada obtenida a partir de la ecuación 5; z es el parámetro normalizado que describe el rango durante el cual el intermediario se asemeja al estado desnaturalizado; mg_X y ΔG_X^o corresponden a la pendiente y a la energía libre de Gibbs del equilibrio entre la proteína plegada y el intermediario (NI) y el intermediario y la proteína desnaturalizada (IU) respectivamente (57, 58). La siguiente ecuación describe la manera de obtener los valores de la F_{app} :

$$F_{app} = \frac{y_o - y_n}{y_u - y_n} \quad \text{Ec. 5}$$

Donde y_o es la fluorescencia observada a 355 nm; y_n y y_u son los valores observados de la regresión lineal para la forma nativa y la forma desnaturalizada, respectivamente, a la misma concentración de desnaturalizante.

5.17 Desnaturalización Térmica de Dos Estados

De manera análoga a la desnaturalización química, la temperatura ejerce una fuerza desnaturalizante sobre la proteína obedeciendo a la ecuación 1. De igual manera, se siguió el cambio de la exposición del Trp35 con el cambio de temperatura.

Se prepararon diluciones de 50 $\mu\text{g/mL}$ de proteína en PBS 1X. Para mantener la homogeneidad de temperatura del sistema y evitar pérdidas de calor, las diluciones se mantuvieron dentro del portaceldas del espectrofluorímetro el cual estaba conectado directamente al baño de agua con sistema de recirculación. Se adicionó un micro-agitador para asegurar que toda la dilución se encontrara a la misma temperatura. La temperatura de la solución se midió directamente usando un termistor DigiSense YSI 400. Para cada punto (temperatura), la muestra se incubó el tiempo necesario para asegurar el equilibrio.

Los valores para la temperatura media de desnaturalización (T_m) y para el cambio de entalpía en la T_m (ΔH_m^o) se calcularon usando la regresión no lineal de los datos usando la siguiente ecuación adaptada de Eftink (59):

$$F_{\text{Trp}} = \frac{(y_n + m_n T) + (y_d + m_d T) * e^{\left(\frac{-\Delta H_m}{RT} + \frac{\Delta H_m}{RT_m}\right)}}{1 + e^{\left(\frac{-\Delta H_m}{RT} + \frac{\Delta H_m}{RT_m}\right)}} \quad \text{Ec. 6}$$

El cálculo del cambio de la capacidad calorífica (ΔC_p) asociado al proceso de desnaturalización se calculó acorde a (60). El valor de $\Delta G^{\circ}_{25^{\circ}\text{C}}$ se determinó usando la siguiente ecuación:

$$\Delta G(T) = \Delta H_m * \left(1 - \frac{T}{T_m}\right) - \Delta C_p \left[(T_m - T) + T \ln\left(\frac{T}{T_m}\right) \right] \quad \text{Ec. 7}$$

5.18 Desnaturalización Térmica de Tres Estados

Similar a la desnaturalización química de tres estados, la desnaturalización térmica de tres estados contempla la existencia de un intermediario. Se asumió que la energía libre de Gibbs entre cada reactivo variaba linealmente con respecto a la temperatura. Se ajustaron los datos de la fluorescencia a la ecuación 8 usando las ecuaciones 9 y 10 en el programa OriginPro 8 con el método no lineal de mínimos cuadrados de Levenberg-Marquardt (56):

$$F_{\text{app}} = \frac{K_{\text{NI}} * K_{\text{IU}} + z * K_{\text{NI}}}{1 + K_{\text{NI}} + K_{\text{NI}} * K_{\text{IU}}} \quad \text{Ec. 8}$$

$$K_{\text{IU}} = e^{\left\{ \frac{\Delta H_{\text{mNI}} \left(1 - \frac{T}{T_{\text{mIU}}}\right) - \Delta C_p \left[(T_{\text{mIU}} - T) + T \ln\left(\frac{T}{T_{\text{mIU}}}\right) \right]}{RT} \right\}} \quad \text{Ec. 9}$$

$$K_{\text{NI}} = e^{\left\{ \frac{\Delta H_{\text{mNI}} \left(1 - \frac{T}{T_{\text{mNI}}}\right) - \Delta C_p \left[(T_{\text{mNI}} - T) + T \ln\left(\frac{T}{T_{\text{mNI}}}\right) \right]}{RT} \right\}} \quad \text{Ec. 10}$$

Donde [D] es la concentración del desnaturalizante; F_{app} es la fluorescencia de la fracción aparente de la proteína desnaturalizada usando los datos provenientes de la ecuación 5; z es el parámetro normalizado que describe el rango durante el cual el estado intermediario se asemeja al estado desnaturalizado; K_X , T_{mX} y ΔG°_X corresponden a la constante de equilibrio, temperatura media, y a la energía libre de Gibbs del equilibrio entre la proteína plegada y el intermediario (NI) o el intermediario y la proteína desnaturalizada (IU) respectivamente (57, 58).

5.19 Fibrillogénesis *in vitro*

La cinética de la fibrillogénesis *in vitro* se compone de dos fases principales. La primera se denomina tiempo de inducción o de latencia, durante la cual se forman los núcleos de las fibras amiloides. Una vez formados estos, inicia la segunda fase denominada fase de extensión en la que ocurre un proceso de rápida polimerización que tiene como base a los núcleos previamente formados (Fig. 14). La formación de fibra se detecta mediante el incremento de fluorescencia del ThT debido a que es un fluoróforo específico para la detección de fibras amiloides (58, 59)

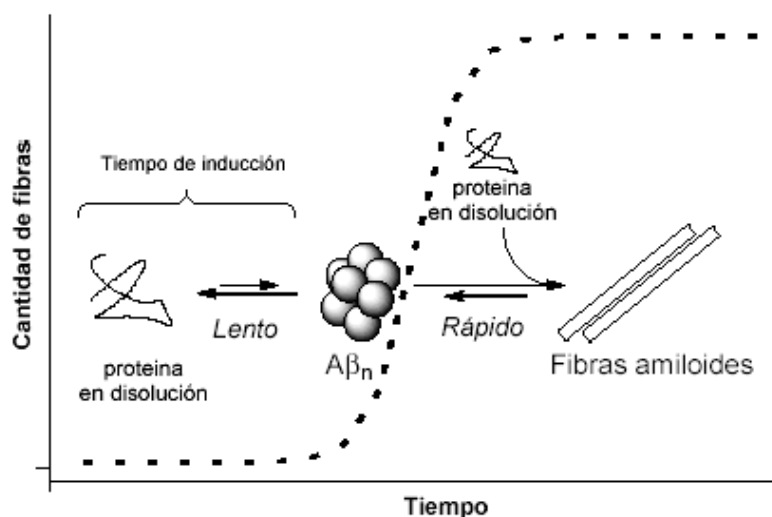


Fig. 14. Cinética de Fibrillogénesis. La cinética describe una sigmoide en donde en la etapa de inducción (tiempo *lag*) se forman los centros de nucleación. La fase exponencial representa la rápida incorporación de los monómeros al centro de nucleación extendiéndose la fibra. En la etapa final la mayor parte de la proteína queda integrada en forma de fibra.

Se prepararon 3 mL de solución de proteína a una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ en PBS 1X, pH 7.5, ThT 10 μM . La solución se filtró por membrana 0.22 μm , se transfirió a una celda plástica para fluorimetría de 1 cm de paso de luz conteniendo una micro-barra magnética de 2 mm x 7 mm, y se calentó previamente a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 10 min. La muestra se colocó en el portaceldas de un espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS50B el cual se mantuvo conectado al sistema de recirculación de un baño de agua termoregulado.

La temperatura de la muestra se midió directamente sumergiendo un termistor DigiSense YSI 400. El ensayo se inició ajustando el agitador magnético del espectrofluorímetro a velocidad baja. La variación de la intensidad de fluorescencia del ThT se registró excitando a 450 nm y registrando la emisión a 482 nm. El ancho de los slits fue de 2.5 nm para la excitación y 5.0 nm para la emisión. La frecuencia de registro fue cada 30 segundos, con un tiempo de integración de 2 segundos. Cada cinética se continuó hasta que el valor de la intensidad de fluorescencia superó las 1,000 unidades.

La cinética de formación de fibra fue analizada en el programa OriginPro 8 con el método no lineal de mínimos cuadrados de Levenberg-Marquardt (56) ajustando el cambio de fluorescencia de ThT con respecto al tiempo en la siguiente ecuación (47):

$$F_{ThT} = \frac{A}{1 + e^{-B(t-t_i)}} \quad \text{Ec. 11}$$

Donde F_{ThT} es la intensidad de la fluorescencia del ThT, A es la intensidad de la fluorescencia del ThT en la etapa de post-transición, t_i (seg) es el punto medio de la región de transición, B (seg^{-1}) es la constante de velocidad de crecimiento de la fibra y t es el tiempo en segundos.

El tiempo lag fue calculado usando la siguiente ecuación obtenida de (63):

$$T_{lag} = t_i - 2\left(\frac{1}{B}\right) \quad \text{Ec. 12}$$

Donde t_i y B son constantes obtenidas del ajuste de la ecuación 11.

6. RESULTADOS

6.1 Construcción de las mutantes de AR

Para analizar el efecto de regresar a la línea germinal los tres residuos propuestos en AR, se generó un conjunto de mutantes de AR basado en la combinatoria de estos tres sitios (Tabla 6). Para cada mutante se analizó su efecto sobre la estabilidad termodinámica y su cinética de fibrillogénesis.

Tabla 6. Nomenclatura de las mutantes sencillas, dobles y la triple mutante.

Construcción	Descripción
pSynAR	Construcción de la r_{VL} AR en el plásmido pSyn1
pG25R	Mutante de AR donde se sustituye la Glicina de la posición 25 por una Arginina
pV104L	Mutante de AR donde se sustituye la Valina de la posición 104 por una Leucina
pF21I	Mutante de AR donde se sustituye la Fenilalanina de la posición 21 por una Isoleucina
pGR/FI	Doble mutante de AR en la posición 21 y en la posición 25
pFI/VL	Doble mutante de AR en la posición 21 y en la posición 104
pGR/VL	Doble mutante de AR en la posición 25 y en la posición 104
p3M	Triple mutante de AR, posiciones 21, 25 y 104.

6.2 Expresión Heteróloga de las Mutantes de AR

Para cada mutante se analizó el nivel de expresión bajo las condiciones previamente descritas (46) (Fig. 15). Como control negativo se usó al plásmido pSyn1 para analizar los cambios de expresión que ocurren al momento de la inducción y como control positivo se utilizó la construcción pSynAR.

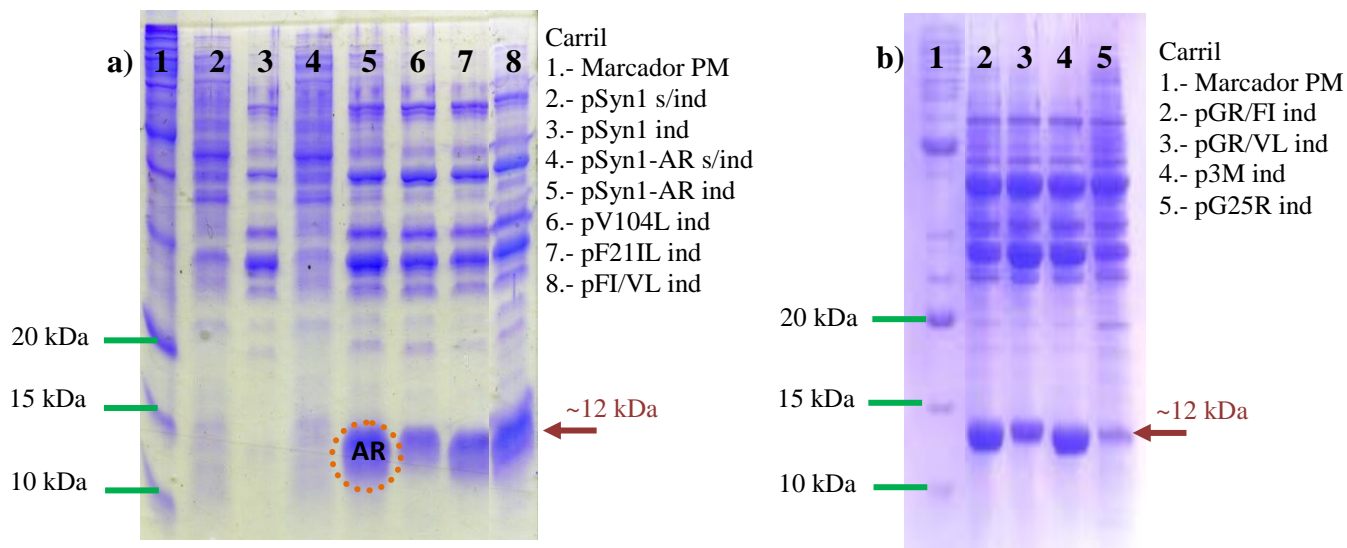


Fig. 15. Expresión de las construcciones. Expresión entre diferentes construcciones transformadas en *E. coli* BL21 (DE3) analizadas en SDS-PAGE al 15%. Para las condiciones de expresión, se dejó crecer a la cepa hasta una $DO_{600\text{ nm}} \sim 1.2$ y se indujo con IPTG a una concentración 1 mM durante 10 horas. La flecha de ~12 kDa indica la ubicación de la proteína de interés.

De la Fig. 15a, en los carriles 2 y 3 se muestra el extracto periplásmico de pSyn1-BL21, sin inducir (s/ind) e inducido (ind) respectivamente. Comparando los carriles 2 y 3, hay proteínas que se sobreexpresan durante el tiempo de inducción. Sin embargo, en el carril 3 no se observan proteínas de peso molecular ~12 kDa, similar al de las proteínas de interés, que pudieran generar un fondo aparentando expresión de las mutantes.

En los carriles 4 y 5 se muestra el extracto periplásmico de pSynAR-BL21, sin inducir e inducido respectivamente. Se aprecia la expresión de AR como una banda ~12 kDa observable sólo hasta después de la inducción. Con esto se prueba que AR es una proteína inducible bajo el sistema pSyn1AR – *E. coli* BL21 y soluble en la fracción del periplasma.

En los carriles 6-8 de la Fig. 15a y en los carriles 2-5 de la Fig. 15b se comparan la expresión de las mutantes. Esto es importante remarcar puesto que la mutación pudiese haber provocado la disminución o la nula expresión de la proteína. La única mutación que provocó una gran reducción en la expresión fue la mutante sencilla en el sitio 25 (pG25R). La cantidad de proteína que se obtuvo de la extracción periplásmica fue la más baja en relación a las demás mutantes.

Se probaron otras dos cepas de *E. coli* [W3110 y BL21 (DE3) pLys] para mejorar la expresión. Ninguna de estas cepas brindó una mejoría en la expresión, e inclusive hubo una mayor dificultad para la extracción de la fracción periplásmica al incrementarse la viscosidad del extracto. Hasta el momento no se ha explorado el subclonar esta mutante en otro vector, modificar condiciones de expresión como la temperatura o concentración de inductor, o usar otro sistema de expresión.

6.3 Purificación

El protocolo anteriormente establecido para la purificación de 6aJL2 (46) contemplaba la precipitación diferencial (*salting out*) con sulfato de amonio al 75%. Se eliminó este paso debido a que se generaban pérdidas sustanciales en la cantidad de proteína tanto para AR como para el conjunto de mutantes.

Después de extraída la fracción periplásmica, ésta se dializó en el buffer descrito en la metodología y se purificó por exclusión molecular usando la misma concentración de proteína total. Ambos extractos provienen de condiciones similares de crecimiento celular, tiempo de inducción, tiempo y buffer de diálisis, por lo que el efecto de la disminución de cantidad de proteína pudiera relacionarse con la disminución de la estabilidad termodinámica. Al comparar los cromatogramas de 6aJL2 y de AR, se puede observar que la cantidad de proteína que se obtiene de cada una de ellas es diferente (Fig. 16a).

Comparando el patrón de expresión de las mutantes sencillas de AR con respecto a la proteína nativa (Fig. 16b), se pueden observar cambios considerables en las cantidades de proteína expresada por cada mutante. En relación a lo sucedido entre 6aJL2 y AR, pudiera esperarse que la mutante Phe21Ile tenga una mayor estabilidad termodinámica que las otras dos mutantes sencillas.

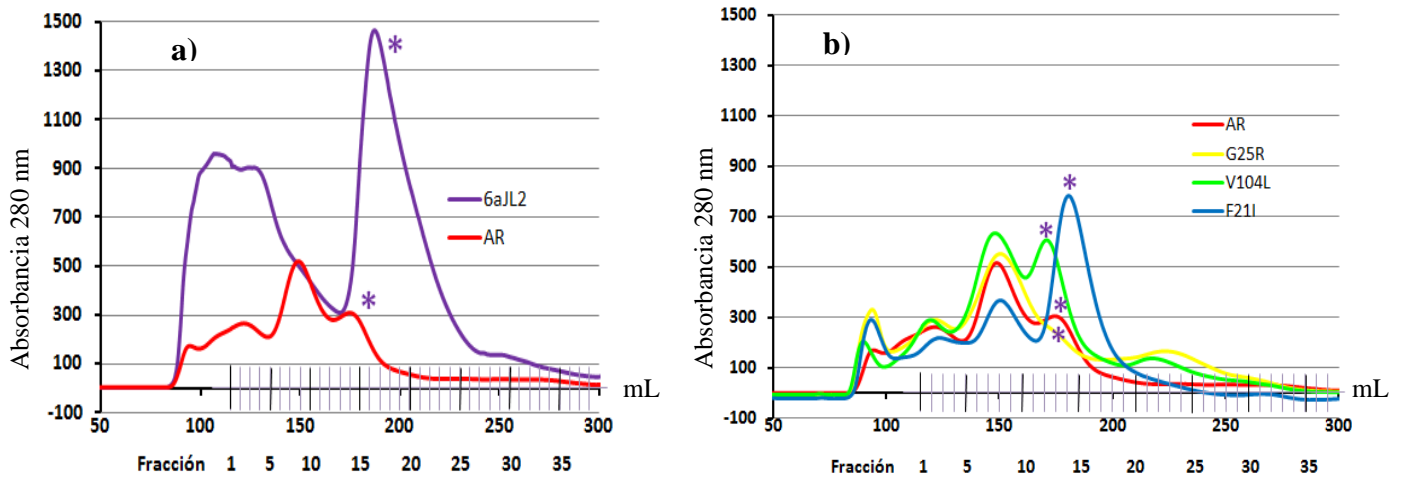


Fig. 16. Cromatografías de Exclusión Molecular. En * se indica el pico donde aparece la proteína de interés. **a)** Cromatogramas de 6aJL2 y AR. **b)** Cromatografías de exclusión molecular de AR y las mutantes sencillas.

Las fracciones de la exclusión molecular en donde se detectó la proteína de interés (Fig. 17a), se mezclaron y se concentraron hasta un volumen de 10 mL. Se analizó la calidad del concentrado en geles SDS-PAGE al 15% y, como se observa en la Fig. 17b, otras proteínas fueron detectables indicando que no se obtenía la suficiente pureza con sólo este paso. Todas las mutantes, incluyendo a AR, tuvieron la misma presencia de otras proteínas consideradas como contaminantes ya que su peso molecular, ~30 kDa y ~40 kDa, no correspondía a la de un posible dímero o trímero de la proteína.

Se usó la cromatografía por intercambio iónico para eliminar la presencia de otras proteínas– Fig. 17c, en un gradiente de 0 – 500 mM de NaCl. En la Fig. 17d se aprecia la separación de las proteínas contaminantes de la proteína de interés.

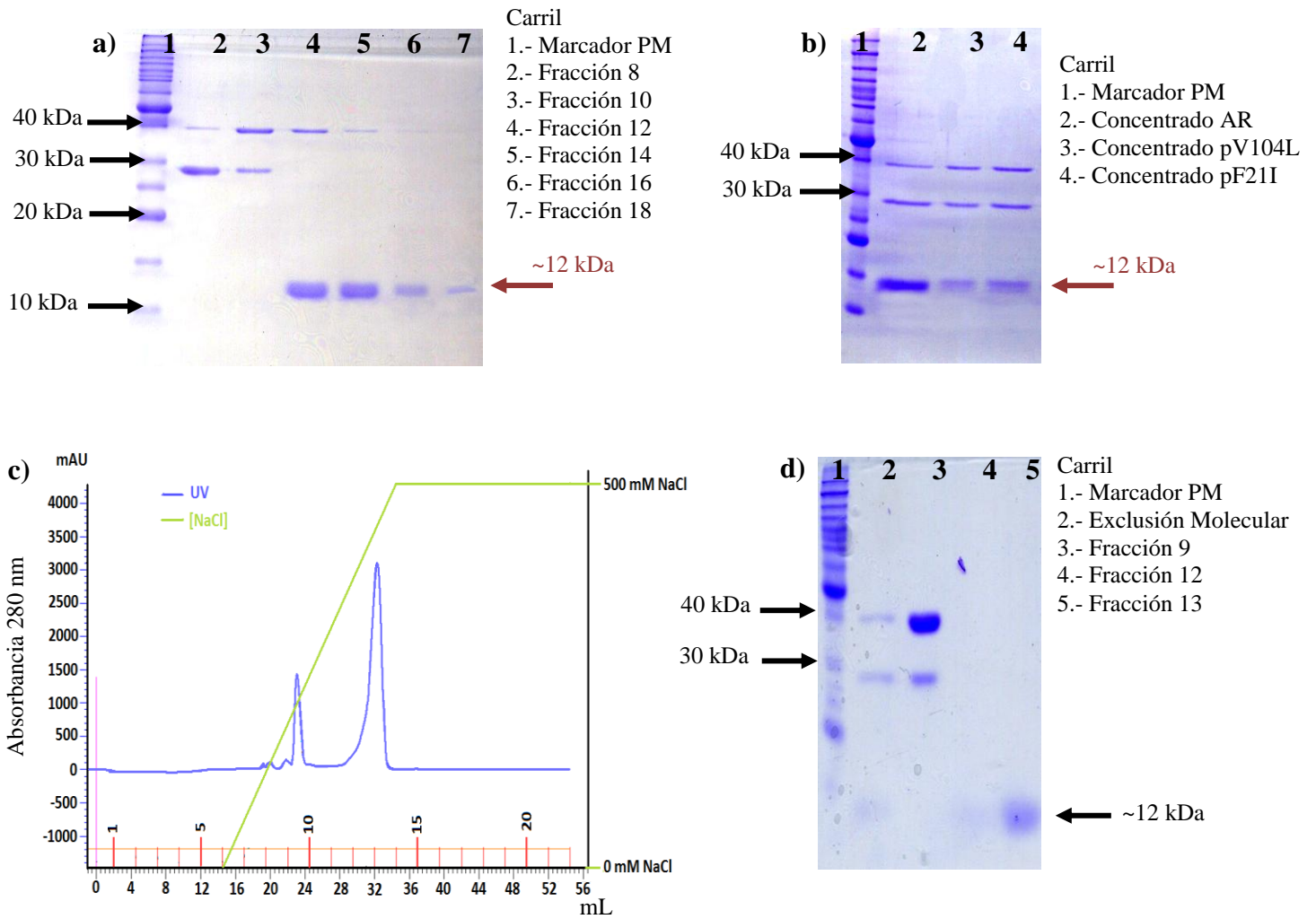


Fig. 17. Purificación de las rVL. a) Fracciones de la cromatografía por exclusión molecular de la construcción pV104L b) Concentrado de las fracciones de la exclusión molecular en filtros Amicon 5 kDa c) Cromatografía por Intercambio Iónico del concentrado de las fracciones de pV104L en gradiente 0 – 500 mM NaCl d) Análisis de las fracciones provenientes del intercambio iónico de la mutante pV104L.

6.4 Fluorescencia Intrínseca de AR

Para comparar la compactación del núcleo hidrofóbico entre AR y 6aJL2 se generaron espectros de fluorescencia en base al Trp35, único Trp presente en ambas proteínas. Desde el punto de vista estructural de las cadenas ligeras, el Trp35 es un aminoácido altamente conservado cuya ubicación espacial le permite interactuar con gran parte del núcleo hidrofóbico de la molécula (51). La cercanía con el puente disulfuro decrementa la fluorescencia del Trp funcionando como un apagador natural de la fluorescencia.

Como puede observarse en la Fig. 18, la alta fluorescencia intrínseca de AR contrasta con la baja fluorescencia de 6aJL2. Esto indica que el núcleo hidrofóbico de AR no se encuentra empaquetado de manera eficiente ya que el Trp35 se encuentra mucho más expuesto y alejado del puente disulfuro que en 6aJL2.

Las interacciones que deberían mantener al Trp35 en el interior de AR han sido, de alguna manera, quebrantadas. Se puede concluir que una de las razones por la cual AR fue identificada como la rV_L más inestable es que la estructura indica una fuerte ruptura en las interacciones intramoleculares remarcadas por el alejamiento del Trp35 del puente disulfuro (Fig. 4b).

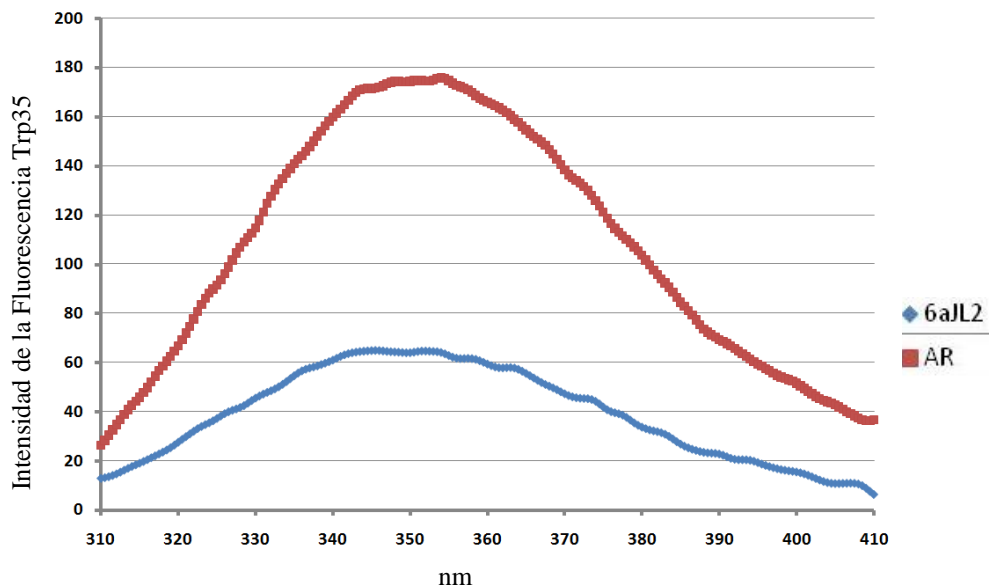


Fig. 18. Fluorescencia intrínseca entre 6aJL2 y AR. El experimento se realizó a 37 °C, excitando a 295 nm, en un volumen de 600 μ L, a una concentración de 50 μ g/mL de proteína diluida en Na₂HPO₄ 20 mM, pH 7.4.

Para saber si la temperatura influía de alguna manera sobre la estructura de AR, se decidió incubar esta molécula a diferentes temperaturas. Como la temperatura está relacionada con la distribución de la energía calorífica de una molécula, el incubar a mayor temperatura permite incrementar la energía cinética molecular aumentando el movimiento de los átomos.

Como puede observarse, la intensidad de la fluorescencia del Trp35 de AR varió directamente con el incremento de la temperatura (Fig. 19). Estos cambios de fluorescencia indican que AR es una molécula sensible a los cambios de temperatura ya que la exposición del Trp35 indica un cambio en la estructura. Por lo que la energía cinética provista con el aumento de temperatura es suficiente para generar cambios estructurales en la molécula.

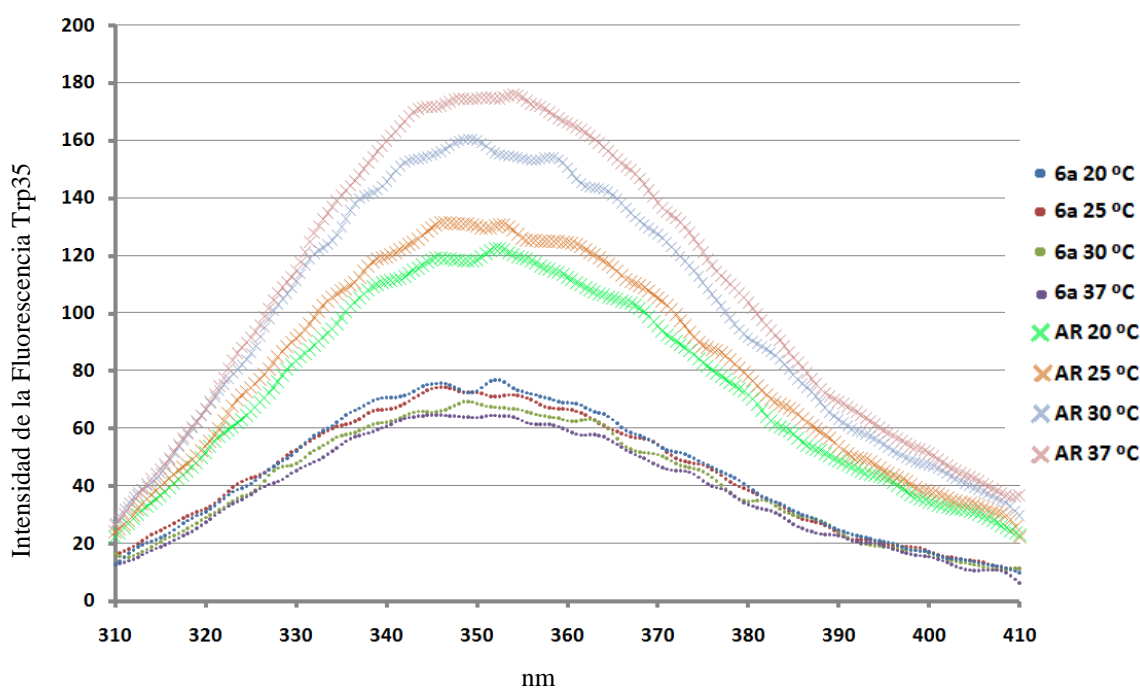


Fig. 19. Fluorescencia intrínseca de AR con respecto a la temperatura. Se incubó a AR durante 2 horas a la temperatura indicada. El experimento se realizó a excitando a 295 nm, en un volumen de 600 μ L, a una concentración de 50 μ g/mL de proteína diluida en Na_2HPO_4 20 mM, pH 7.4.

6.5 Estabilidad Termodinámica y Cinética de Fibrillogénesis de AR

La ΔG° de AR había sido calculada anteriormente dando un valor de 1.4 kcal/mol considerándose así como la rV_L menos estable (46). Sin embargo, el valor calculado de esta ΔG° fue obtenido de manera preliminar ya que la temperatura a la que se inició la cinética desnaturalización fue 25 °C (298 °K) (Fig. 20).

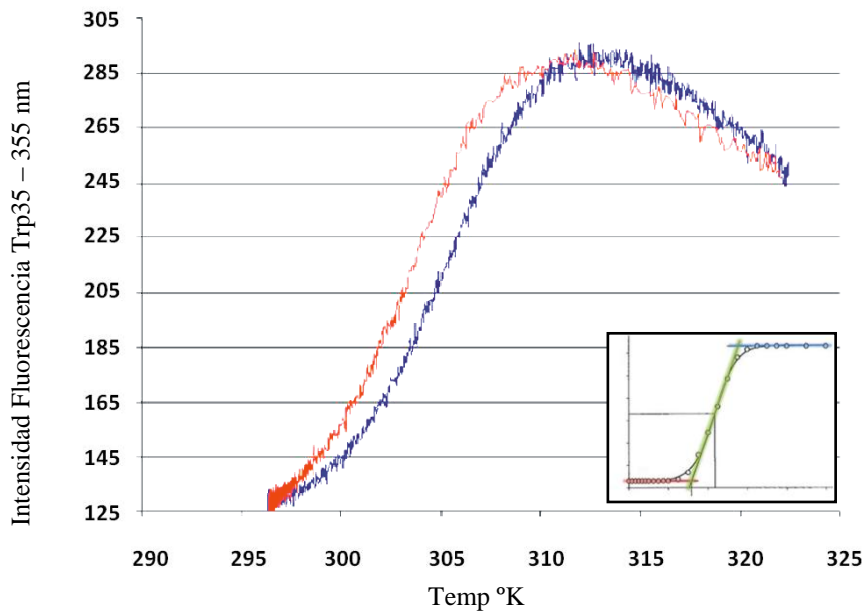


Fig. 20. Desnaturalización Térmica de AR. Figura extraída de Del Pozo (46). La proteína fue diluida a 50 $\mu\text{g/ml}$ en PBS 1X, pH 7.4. En azul se muestra el proceso de desnaturalización y en rojo la renaturalización. Se registró la variación de la intensidad de fluorescencia del Trp a 355 nm con respecto al tiempo. En el recuadro interno se muestran las tres etapas típicas de una curva de desnaturalización.

En la Fig. 20 puede observarse que las cinéticas de desnaturalización y renaturalización térmica no describen una curva típica de tres etapas ya que falta la etapa de pre-transición. Como la temperatura de 25 °C se encuentra dentro de la zona de transición, el cálculo obtenido de ΔG° es una aproximación al valor real. Para el cálculo correcto es necesario haber definido las 3 etapas de la curva de desnaturalización (recuadro interno) para así evitar el sub-estimar o sobre-estimar este valor. Más adelante, en este trabajo, se retoma este experimento.

En la Fig. 21 se muestran la cinética de fibrilogénesis a 37 °C de AR comparada con WIL, JTO, 6aJL2 y R25G (47). Los valores mostrados en la tabla interna fueron recalculados sometiendo las curvas obtenidas anteriormente al análisis con la ecuación 11. AR refleja una alta tendencia a formar fibras al tener el menor tiempo *lag* y una alta velocidad para la extensión de fibra. Como esta proteína estuvo implicada en la patología de un paciente, podría asumirse que el paciente tuvo una rápida formación de fibra que fácilmente pudo haberse acumulado y distribuido sistémicamente. Esto daría una posible explicación por la que el paciente AR falleció 5 meses después de su diagnóstico (50), aun cuando la tasa media de supervivencia para la amiloidosis AL es de 13 meses (22).

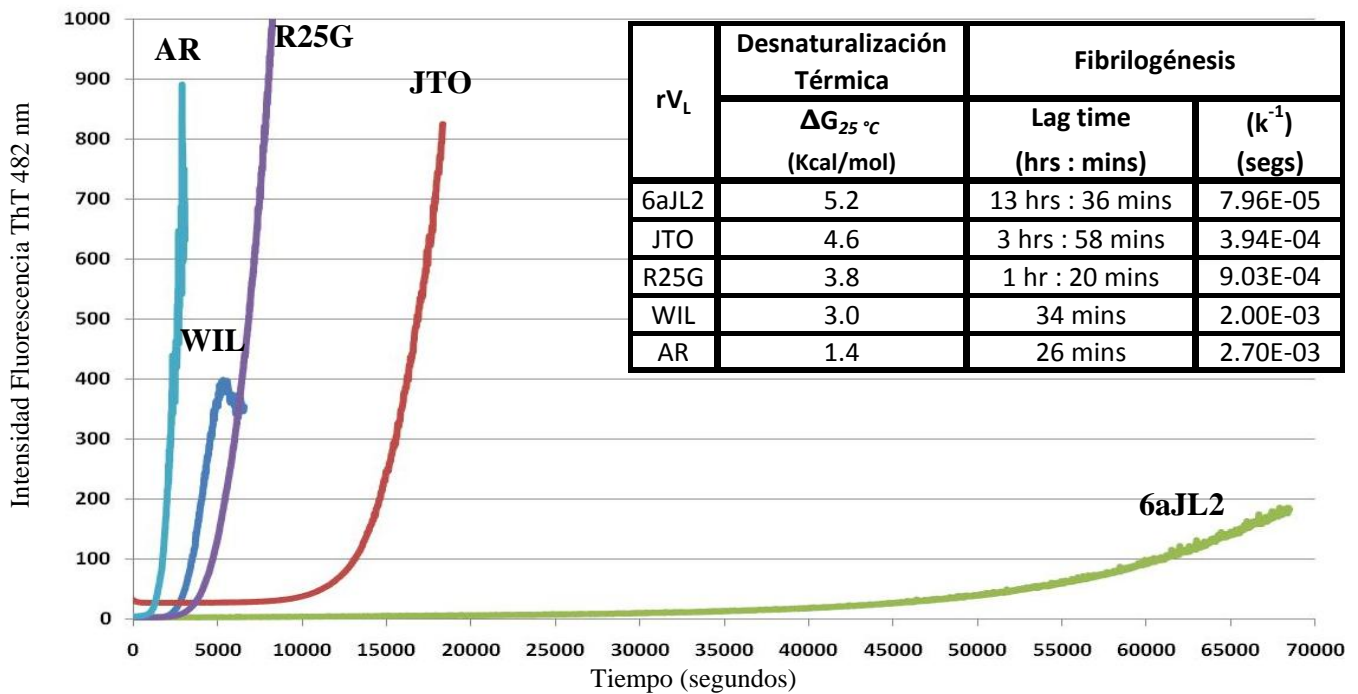


Fig. 21. Fibrillogénesis *in vitro* de rV_L 6aJL2, JTO, WIL, R25G y AR. El experimento se realizó a 37 °C, en un volumen de 3 mL, a una concentración de 100 µg/mL de proteína en PBS 1X y ThT 20 µM en agitación constante. Cada curva representa la variación de la intensidad de fluorescencia de ThT a 482nm con respecto al tiempo. En la tabla interna se muestran la ΔG° , el tiempo lag y la constante de velocidad de las 5 rV_L.

6.6 Cinéticas de Fibrillogénesis de AR a Diferentes Temperaturas

Sabiendo que AR es una molécula cuya estructura es sensible a los cambios de temperatura, se optó por realizar cinéticas de fibrillogénesis a diferentes temperaturas. Similar a lo ocurrido con la exposición del Trp35 al variar la temperatura, se puede esperar que este factor tenga algún impacto sobre la formación de fibra.

Como se observa en la Fig. 22, la constante de velocidad con la que se agrega y se forma la fibra incrementa con el aumento de la temperatura. A diferencia, el tiempo de la fase *lag* incrementa con la disminución de la temperatura. En otras palabras, AR forma fibras con mayor facilidad a temperatura corporal que a menores temperaturas.

Sólo a 20 °C no se pudo registrar una cinética de fibrilogénesis con las fases *lag* y exponencial bien definidas debido al tiempo en el que se siguió el experimento. Cabe la posibilidad de extender el tiempo de lectura para obtener la cinética adecuada a esta temperatura. A excepción de esta temperatura, en todas las demás se pudo obtener el valor de las constantes de la ecuación 11.

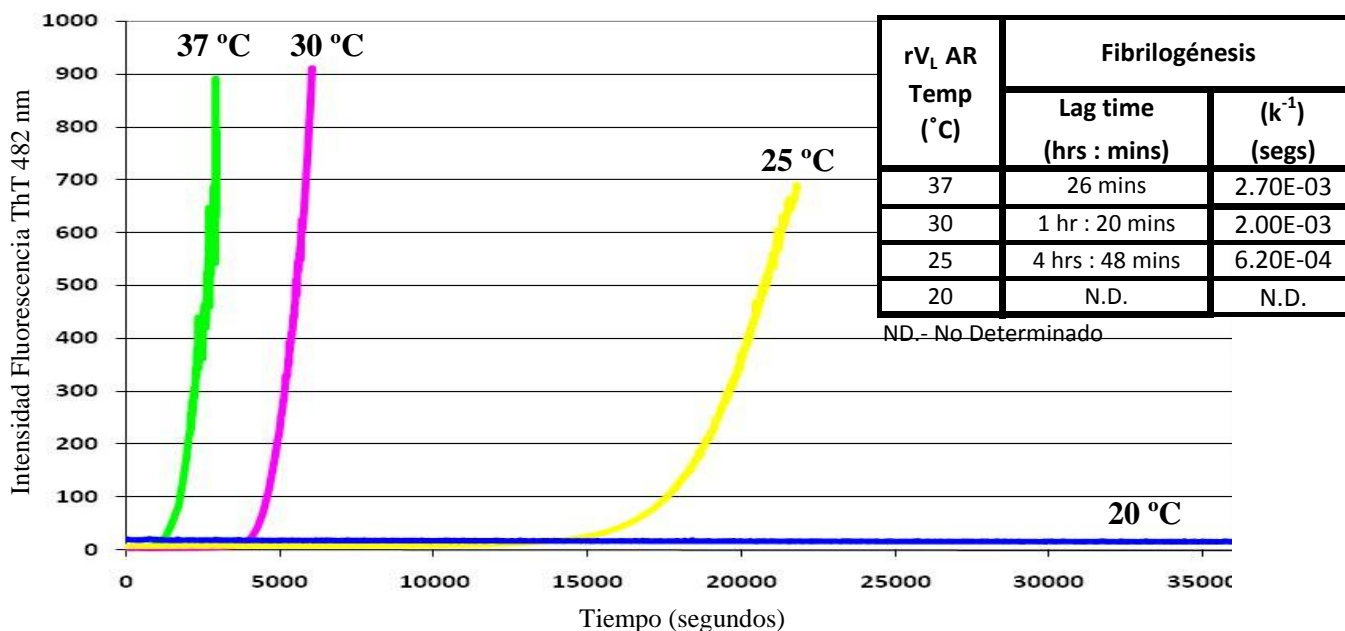


Fig. 22. Fibrilogénesis *in vitro* de rV_L AR a diferentes temperaturas. El experimento se realizó a 20 °C, 25 °C, 30 °C y 37 °C a la concentración de 100µg/mL de proteína en PBS 1Xy ThT 20µM. Se registra el cambio de la intensidad de fluorescencia de ThT a 482 nm con respecto al tiempo. En la tabla interna se muestran los valores del tiempo lag para cada temperatura y la constante de velocidad.

Una de las condiciones necesarias para favorecer la fibrilogénesis *in vitro* es la adición de agitación al sistema. Así como la temperatura a la que se mantiene el sistema se convierte en energía cinética molecular, la agitación es energía cinética mecánica suministrada que permite el choque intermolecular de las moléculas. Sin embargo, esta energía cinética mecánica parece no ser suficiente para que AR cambie su conformación nativa hacia una estructura pro-fibrilogénica ya que la agitación se mantuvo constante en estos experimentos a diferencia de la temperatura.

En el caso de AR, la temperatura genera una mayor vibración intramolecular que permite un reacomodo estructural de la molécula observándose con el aumento de la exposición del Trp35 (Fig. 19). Este aumento de la vibración molecular habilitaría la aparición de algún intermediario pro-fibrilogénico y la agitación permitiría un mayor choque intermolecular incrementado la probabilidad de que se encuentren estos intermediarios. Sin embargo, la agitación vista como energía cinética mecánica no es suficiente para fomentar la aparición del intermediario pro-fibrilogénico.

6.7 Estabilidad Termodinámica

Los datos termodinámicos obtenidos permitieron evaluar las interacciones en tres distintos sitios de AR. En la Fig. 23 se muestran las curvas de desnaturalización mediante el agente químico GndHCl (Fig. 23a) o térmico (Fig. 23b); y en la Tabla 7 se muestran los datos termodinámicos obtenidos a partir de estas curvas al ser analizadas con las ecuaciones 2 y 6 respectivamente. Los valores obtenidos de la desnaturalización química provienen de tres a cinco repeticiones de experimentos; pero de la desnaturalización térmica, los valores provienen de una a dos repeticiones.

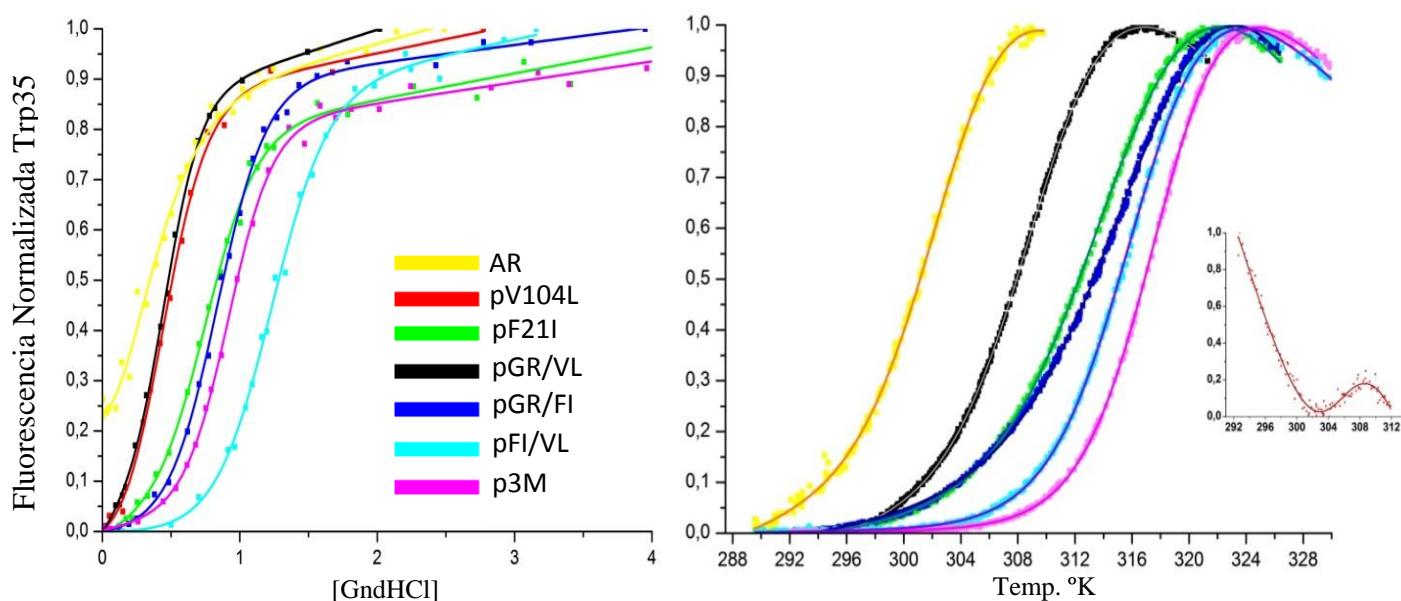


Fig. 23. Desnaturalización Química y Térmica de AR y sus mutantes. En ambos casos se siguió la exposición del Trp35 a una excitación de 295 nm y emisión de 355 nm. **a)** Curvas de desnaturalización química. Se incubaron 50 mg/mL de proteína a 25 °C durante 8 horas a diferentes concentraciones de GndHCl en buffer Na₂HPO₄ 20 mM, pH 7.4. **b)** Curvas de desnaturalización química. Se incubaron 50 mg/mL de proteína a diferentes temperaturas, esperando al equilibrio, en buffer PBS 1X. En la gráfica interna se muestra la desnaturalización térmica de pV104L.

Tabla 7. Parámetros que describen la desnaturalización al equilibrio y la cinética de fibrilogénesis *in vitro* de las proteínas $\lambda 6$.

rV _L	Desnaturalización Térmica ^a				Desnaturalización Química ^b			- $\Delta\Delta G^\circ$ ^c (kcal/mol)
	$\Delta G^\circ_{25^\circ\text{C}}$ (kcal/mol)	T _m (°K)	T _m (°C)	ΔH°_m (kcal/mol)	$\Delta G^\circ_{\text{H}_2\text{O}}$ (kcal/mol)	C _m [M]	- <i>m</i> (kcal/mol)	
AR	1.14	304.29	31.14	56.44	1.60 ± 0.26	0.41 ± 0.08	3.96 ± 0.16	-
AR 16°C	2.81	304.29	31.14	56.44	2.03 ± 0.09	0.53 ± 0.01	3.80 ± 0.15	0.48
pG25R	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
pF21I	2.87	315.66	42.51	51.79	2.59 ± 0.23	0.79 ± 0.05	3.17 ± 0.21	1.51
pV104L	1.76	306.01	32.86	68.66	1.48	0.41	3.61	0
pGR/FI	3.01	318.66	45.51	46.78	2.93 ± 0.52	0.83 ± 0.05	3.50 ± 0.45	1.66
pGR/VL	2.25 ± 0.18	309.26 ± 0.90	36.76 ± 0.90	62.45 ± 0.15	2.10 ± 0.21	0.47 ± 0.02	4.50 ± 0.60	0.24
pFI/VL	3.99	316.65	43.5	68.28	3.78 ± 0.34	1.21 ± 0.07	3.14 ± 0.43	3.17
p3M	3.87	318.14	44.99	77.44	3.48 ± 0.19	0.95 ± 0.05	3.68 ± 0.31	2.14
6aJL2 ^d	5.2	323.05	49.9	86.2	5.1	1.41	3.6	3.96

a. Calculado a partir de la ecuación 6

b. Calculado a partir de la ecuación 2

c. Diferencia de estabilidad relativa a AR calculada a partir de:

$$-\Delta\Delta G^\circ = (m_{AR} * C_M AR) - (m_{AR} * C_M MUT)$$

d. El valor termodinámico fue tomado de la referencia 46

ND. No Determinado

Como puede observarse en la Fig. 23, el aumento de la estabilidad termodinámica va aunado con el aumento de la resistencia a la desnaturalización química y a la desnaturalización térmica. Cabe mencionar que la mayor parte de los valores de ΔG° de la desnaturalización térmica concuerdan con los valores de la desnaturalización química aunque, por falta de repetición de los experimentos térmicos, estos no debieran tomarse como concluyentes.

La única mutante que no tuvo un comportamiento similar al de las demás en la desnaturalización térmica fue pV104L (cuadro interno Fig. 23b). Aunque el Trp35 se oculta conforme aumenta la temperatura, a los 304 °K vuelve a exponerse. El análisis de esta curva genera valores que concuerdan con los de la desnaturalización química.

Debido a que el cálculo de la ΔG° está basado en el valor de la pendiente de la etapa de transición, el número de puntos que abarque la pendiente determinará la confiabilidad del valor de ΔG° . Entre mayor sea el número de determinaciones en toda la curva, mayor exactitud tendrá el cálculo. Para todos los casos se procuró que lo anterior se llevara a cabo.

En contraste con la ΔG° , la $\Delta\Delta G^\circ$ es la diferencia de los valores de ΔG° usando el valor de la concentración media de desnaturalizante (C_M) de la proteína nativa, en este caso fue AR que se usó como punto de referencia del cálculo. La ventaja de usar a la C_M es que es un valor que no depende de algún cálculo previo y cuya variación entre cada experimento es baja. Interpretando los valores de la $\Delta\Delta G^\circ$ de la Tabla 7, un valor positivo indicaría un aumento de la estabilidad, un valor negativo la disminución de la estabilidad, y un valor cercano a cero mostraría que la estabilidad termodinámica es similar al de AR.

6.8 Desnaturalización Química y Térmica de AR

La desnaturalización química de AR se realizó incubando a dos diferentes temperaturas, 16 °C y 25 °C. Se comparó la ΔG° calculada para ambas temperaturas de incubación con la ΔG° de la desnaturalización térmica a las respectivas temperaturas. Como puede observarse en la Tabla 7, hay una gran desviación de los valores para la ΔG° de la desnaturalización térmica y la desnaturalización química de ambas temperaturas. Se ha reportado que la desviación entre la ΔG° química y la ΔG° térmica pudiera ser producto de

algún intermediario cuya presencia no es contemplada en la ecuación de dos estados Nativa → Desnaturalizada... Ecuación 1 (58).

Los datos obtenidos a partir de ambas determinaciones se sometieron a los análisis respectivos derivados de la Ec. 3 descrita en Materiales y Métodos. Del análisis del intermediario químico de AR no se obtuvieron resultados reales y/o interpretables ya que los valores de ΔG° eran superiores a 10^8 (datos no mostrados). Del análisis del intermediario térmico se obtuvieron valores interpretables como se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Intermediario Térmico. Valores obtenidos del ajuste de la Ec. 8.

AR (°C)	ΔG°_{NI} (Kcal/mol)	ΔG°_{IU} (Kcal/mol)	$\Delta G^\circ_{Global}^*$ (Kcal/mol)
25	-0.51	1.18	0.67
16	1.17	2.83	4.00

* Obtenido de la suma de ΔG_{NI} y ΔG_{IU}

Por lo que queda descartada la presencia de algún intermediario dado que los valores calculados para el intermediario térmico no compaginan con los valores de la desnaturalización química.

Se decidió sobreponer las gráficas de las cinéticas de la desnaturalización y renaturalización térmica de AR. Un solapamiento de ambas curvas indicaría la existencia de una sola ruta de plegamiento entre el estado nativo y el estado desnaturalizado de la proteína cumpliendo entonces con la cinética de dos estados (Ec. 1). En caso de no solaparse, podría entonces sospecharse de la existencia de algún intermediario.

En la Fig. 24 se comparan las cinéticas de desnaturalización y renaturalización térmica de AR contra la triple mutante F21I/R25G/V104L - p3M, ya que ésta es más estable. Puede observarse que hay un solapamiento entre las cinéticas de desnaturalización y renaturalización térmica de p3M; a diferencia de AR en donde no se solapan las curvas. Podría volverse a sospechar de la existencia de algún intermediario pero el análisis anterior refuta esta sospecha.

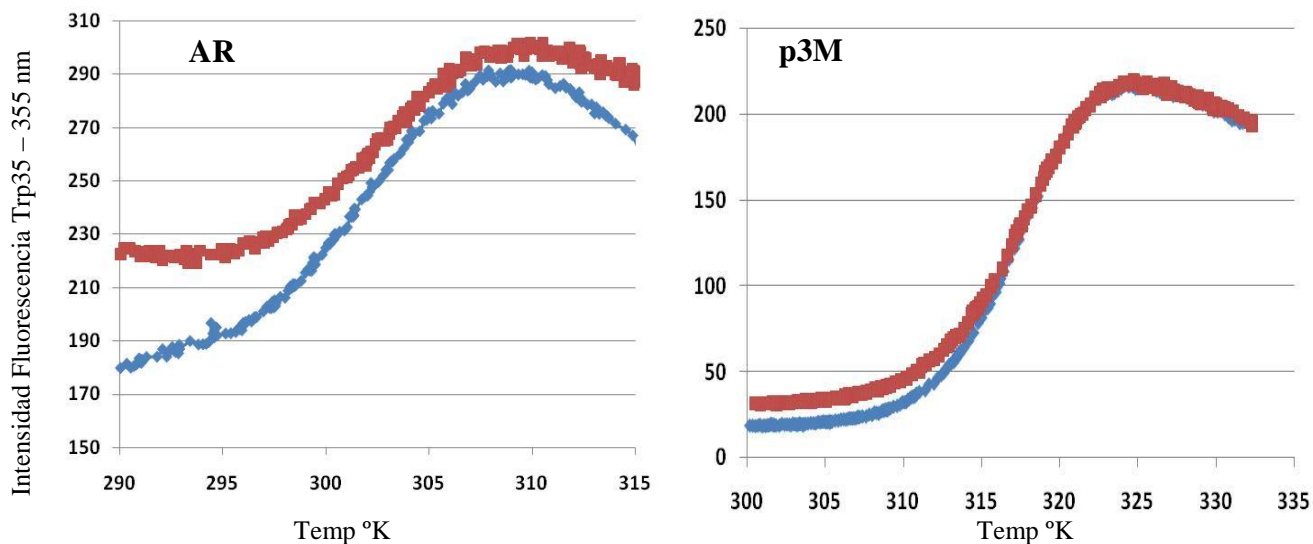


Fig. 24. Desnaturalización Térmica de AR y p3M. La proteína fue diluida a 50 $\mu\text{g/ml}$ en PBS 1X, pH 7.4. En azul se muestra el proceso de desnaturalización y en rojo la renaturalización. Se registró la variación de la intensidad de fluorescencia del Trp a 355 nm con respecto al tiempo.

Al analizar la metodología con que se realiza este experimento, hay que recalcar el uso de la agitación para mantener la solución térmicamente homogénea. Sin embargo, en el caso de AR o de alguna otra proteína con baja estabilidad termodinámica, esta misma agitación estaría propiciando cambios conformacionales que pudieran favorecer la agregación de la proteína. Como la temperatura se incrementa gradualmente, también se incrementa la energía cinética molecular cedida al sistema. Por lo que los cambios observados de la exposición del Trp35 no sólo corresponderían a la desnaturalización térmica sino también a la formación de agregados. Para poder controlar este fenómeno en proteínas con baja estabilidad termodinámica y susceptibles a la fibrilogénesis, tendría que eliminarse el factor de agitación y sustituirlo con un mayor tiempo de incubación entre cada lectura.

Analizando ahora la desnaturalización química de AR a las dos diferentes temperaturas en las que se incubó (Fig. 25), ambas muestran una corta etapa de pre-transición. Se generaron mediciones a concentraciones muy bajas para afianzar la pre-transición. Como puede observarse, a 16 $^{\circ}\text{C}$ presenta una etapa de pre-transición ligeramente más larga que a 25 $^{\circ}\text{C}$. Este fenómeno se ha analizado en otros estudios (63, 64), ya que se ha demostrado que la disminución de la temperatura a la que se realiza la desnaturalización química conlleva a un aumento de la estabilidad termodinámica. En la Fig. 25 también se muestra la desnaturalización química de la mutante más estable, pFI/VL.

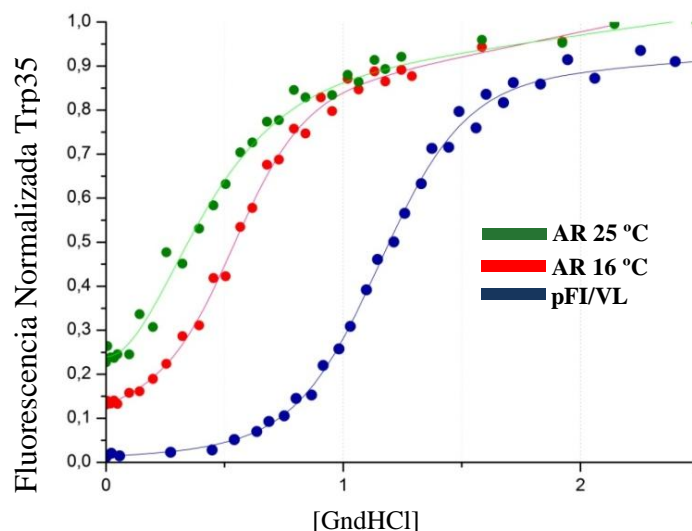


Fig. 25. Curvas de Desnaturalización Química. En círculos se muestra la fluorescencia normalizada del Trp35 a determinada concentración de GndHCl y las líneas son el ajuste de estos datos a la Ec. 7. En verde se muestran la desnaturalización química de AR a 25 °C; en rojo, a 16 °C; y en azul, la de pFI/VL a 25 °C.

La temperatura sigue siendo un factor determinante para la estructura de AR. Aunque también se llevó a cabo una desnaturalización química a 37 °C (datos no mostrados), fue imposible definir una curva de desnaturalización ya que a esta temperatura se tiene mayoritariamente a AR en forma desnaturalizada.

6.9 Estabilidad Termodinámica de las Mutantes

El conjunto de mutantes permitió analizar los efectos de mutaciones puntuales en tres diferentes sitios en la estructura de AR. Aun faltando la repetición de las cinéticas de desnaturalización térmica, los valores obtenidos de ΔG° concuerdan con los de la desnaturalización química. Como se mencionó anteriormente, el dato que permite comparar fehacientemente la estabilidad entre las mutantes es el valor de $\Delta\Delta G^\circ$.

Analizando los datos de la desnaturalización térmica de las mutantes (Tabla7), uno de los valores que acompañan directamente al cambio de estabilidad es la entalpía (ΔH_m°). Este valor aumenta conforme incrementa la estabilidad termodinámica de las mutantes. La ΔH_m° indica la cantidad de calor que se requiere para que se lleve a cabo la desnaturalización de la proteína (63). Este parámetro está relacionado con la estructura de una proteína, específicamente con las cadenas laterales. Por lo que a mayor valor de ΔH_m° corresponde una interacción más favorable de las cadenas laterales expuestas (65).

A pesar de que varias mutantes (pF21I, pGR/FI, pFI/VL, p3M) tienen una T_m similar (~ 318 °K), en la Fig. 23b puede observarse que cada mutante tiene una diferente pendiente de la etapa de transición de la curva de desnaturalización. El valor de esta pendiente es el valor de la ΔH°_m . Las mutantes anteriores tienen en común el cambio en el sitio 21, el cual ha influido de manera importante en la estabilidad del núcleo hidrofóbico. Entonces la T_m podría referirse más como un valor relacionado con la estabilidad del núcleo hidrofóbico. Una vez que éste se encuentra estabilizado son ahora las cadenas laterales expuestas las que definen la estabilidad de la molécula.

Lo anterior puede visualizarse con mayor simplicidad si se comparan la T_m y la ΔH°_m de las mutantes sencillas pF21I y pV104L. Aunque la interacción de las cadenas laterales se encuentra más favorecida en la mutante pV104L ($\Delta H^\circ_M = 68.66$ kcal/mol) que en la mutante pF21I ($\Delta H^\circ_M = 51.59$ kcal/mol), el reajuste del núcleo hidrofóbico tiene una mayor importancia ya que existe una diferencia de 10 °C en la T_m de estas dos mutantes.

Para la desnaturalización química se realizaron suficientes repeticiones en la mayoría de las mutantes resultando en valores más certeros. Únicamente la pV104L no pudo analizarse de manera satisfactoria con este método debido a la poca cantidad de proteína obtenida.

Con respecto a las mutantes sencillas, la mutante pF21I aumentó la estabilidad termodinámica de AR de manera notoria ($\Delta\Delta G^\circ = 1.51$ kcal/mol). De entre las mutantes sencillas, ésta fue la única que estabilizó ya que la mutante pV104L ($\Delta\Delta G^\circ = 0$ kcal/mol) no tuvo un efecto significativo para la estabilización. A pesar de que la mutante pV104L no estabilizó a AR, la doble mutante pFI/VL generó un aumento importante en la estabilidad ($\Delta\Delta G^\circ = 3.17$ kcal/mol). Ésta fue la mutante más estable de todo el conjunto. Quizás la contribución más importante del residuo 104 sea la restitución de una red de interacciones dependiente del tipo de residuo ubicado en el sitio 21.

Combinando los sitios 25 y 104, la doble mutante pGR/VL no incrementa significativamente la estabilidad ($\Delta\Delta G^\circ = 0.24$ kcal/mol) así como la mutante sencilla F21I. Por lo que el cambio en el sitio 21 es importante para aumentar considerablemente la

estabilidad de todo el dominio; o visto de otra manera, la Phe21 es uno de los principales sitios que propician la baja estabilidad de AR.

Contrario al efecto del cambio de Arg25Gly en 6aJL2, el regresar este sitio de AR al residuo de la línea germinal no estabilizó directamente a la molécula como se tenía esperado. Esta mutación en el sitio 25 no contribuyó con la estabilidad de manera significativa y ninguna mutante con este cambio (pG25R, pGR/FI, pGR/VL) mostró el efecto estabilizante de regresar esta posición a la línea germinal a diferencia de todas las mutantes en las posiciones 21 y 104. Inclusive, al insertar este cambio en la mutante más estable (pFI/VL) generando la triple mutante (p3M), disminuye la estabilidad en lugar de aumentarla. Por lo que debe existir otra red de interacciones en este subdominio que dificulte el correcto acomodo de la Arg25.

6.10 Cinética de Fibrilogénesis de las Mutantes

La relación entre la energía libre y la fase de latencia ha mostrado una correlación entre la baja estabilidad termodinámica y la alta propensión a formar fibras. En la Fig. 26 se puede observar que se conserva esta reciprocidad. Sin embargo, debido a la cantidad de proteína que se requiere para este experimento, no pudieron realizarse las repeticiones de las cinéticas para las mutantes de AR.

Otra característica de la Fig. 26 es que la fluorescencia de algunas cinéticas de fibrilogénesis, como pV104L, no llegaron hasta las 1,000 unidades de fluorescencia. Sólo se muestra la fase *lag* y exponencial más representativas ya que posterior a estas etapas, la fluorescencia se comporta de manera errática. Esto podría interpretarse en que el ensamblado de las fibras es diferente en cada mutante ya que la extensión de la misma variaría.

Con la proteína que se obtuvo de la mutante pG25R se realizó una cinética de fibrilogénesis. Resulta sorprendente que esta mutante sea menos fibrilogénica que AR indicando que la baja expresión sea por otros motivos como la agregación en citoplasma o la formación de cuerpos de inclusión y no por la disminución de la estabilidad como anteriormente se había contemplado. Valdría la pena explorar otros sistemas de expresión para producir la cantidad necesaria de proteína y así comprobar su estabilidad termodinámica.

Hay otras 2 mutantes que marcan un tiempo *lag* y una velocidad de fibrilogénesis similar a la mutante pG25R y son las mutantes pV104L y pGR/VL. Puede esperarse entonces que estas tres mutantes posean ΔG° 's similares, aunque, por los datos de la desnaturalización térmica, tengan una diferente interacción de sus cadenas laterales (ΔH_m°)

De las mutantes pFI/VL y p3M no pudieron generarse cinéticas de fibrilogénesis adecuadas e interpretables. Aparentemente, la doble mutante más estable de todas pFI/VL, podría tener una cinética de fibrilogénesis similar a la de 6aJL2.

Al compararse las velocidades de formación de fibra y los tiempos *lag* obtenidos, puede notarse la relación inversa entre estos valores. A mayor velocidad (k^{-1}), menor tiempo lag y viceversa. Sin embargo, ambos valores representan diferentes eventos en la formación de fibra. El tiempo lag representa el evento crítico de la formación de núcleos donde posteriormente se llevará a cabo la extensión de la fibra a una determinada velocidad.

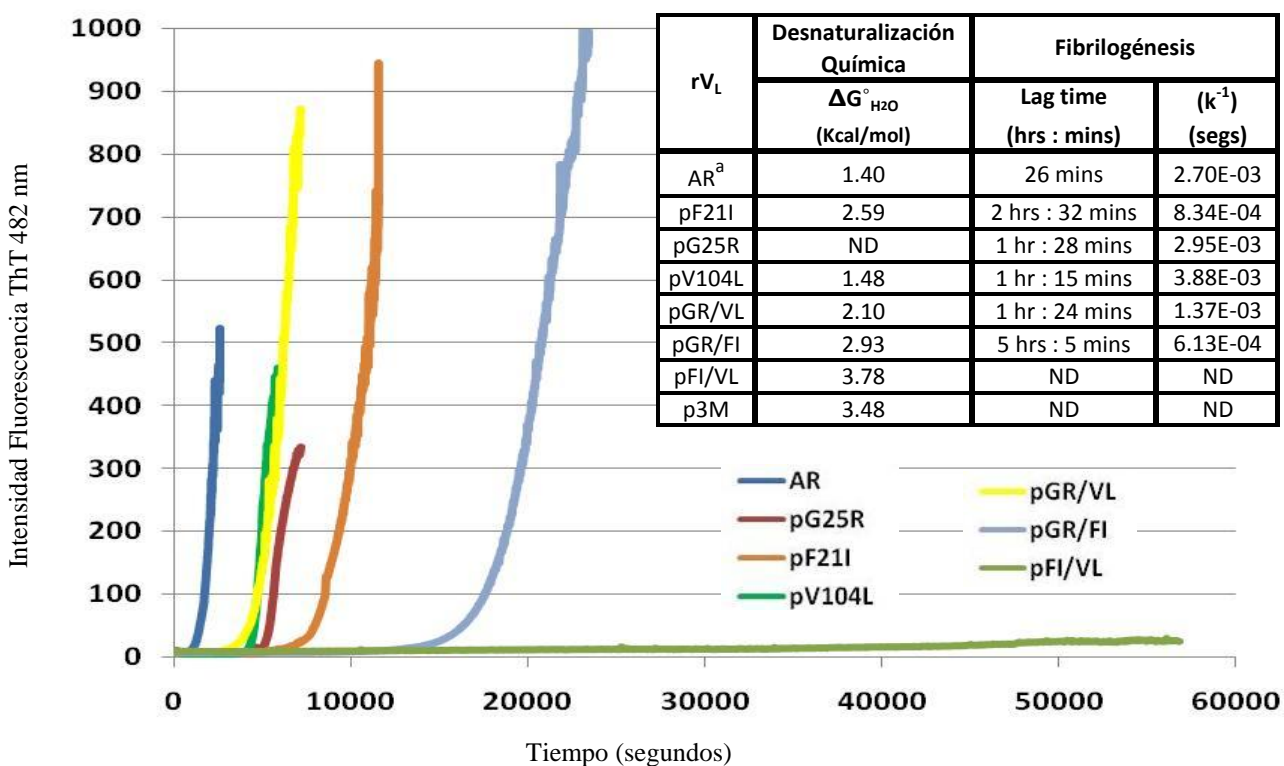


Fig. 26. Cinética de Fibrilogénesis de las Mutantes de AR. El experimento se realizó a 37 °C, en un volumen de 3 mL, a una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ de proteína en PBS 1X y ThT 20 μM en agitación constante. Cada curva representa la variación de la intensidad de fluorescencia de ThT a 482nm con respecto al tiempo. En la tabla interna se muestran la ΔG° , el tiempo *lag* y la constante de velocidad de las 5 r_{V_L}.

7. DISCUSIÓN

En el trabajo de tesis de Del Pozo (46) se sintetizó el gen que codifica para la proteína modelo de la línea germinal 6a (6aJL2), se analizó su estabilidad termodinámica y su cinética de fibrilogénesis. Además, se generaron mutantes para analizar qué sitios eran más susceptibles a la desestabilización termodinámica como en Phe2, Pro7, His8, Gly100, Lys103 y Thr105. Sin embargo, para averiguar no sólo qué sitios sino también qué residuos en esas posiciones pudieran estar afectando la estructura y la estabilidad de una proteína de 111 residuos, se tendrían que generar un número superior a 10^{100} de mutantes.

A diferencia del trabajo anterior, el enfoque de este trabajo se basó en averiguar qué residuos contribuyeron con la disminución de la estabilidad termodinámica de AR tomando como punto de comparación a 6aJL2. Este cambio de enfoque permitió comparar a AR, una cadena ligera proveniente de la hipermutación somática e involucrada en la patogénesis de un paciente, con respecto a la línea germinal.

Las mutantes de AR consistieron en regresar a la línea germinal los residuos que pudieran estar alterando la estructura, principalmente los situados en el núcleo hidrofóbico. Dos residuos fueron identificados dentro de este núcleo, F21 y V104L, y también se identificó un tercer residuo localizado en el CDR1, G25, de acuerdo al análisis de Del Pozo (46,47). Los residuos mutados de AR hacia 6aJL2 fueron F21I, G25R y V104L. En total se generaron siete mutantes de AR resultado de la combinatoria de estos tres residuos.

Condensando los resultados de este trabajo, se puede decir que la estabilización de AR no ocurrió como se esperaba. Inicialmente se consideraba al cambio G25R como uno de los cambios que estabilizaría de manera importante a AR y que los otros dos sitios sólo complementarían la estabilidad. Esto fue considerado ya que, en el contexto molecular de 6aJL2, la mutación R25G provocó la pérdida 1.4 kcal/mol sobre la estabilidad termodinámica; y considerando este efecto, la mutación G25R en AR tendría que haber estabilizado en un valor similar a este dominio.

No obstante, los datos termodinámicos indican todo lo contrario. El cambio F21I fue estabilizante como mutante sencilla, y junto con el cambio V104L fue la combinatoria más estable de todo el conjunto. El cambio G25R no mostró el comportamiento estabilizante esperado por lo que deben existir otras interacciones que impidan el correcto acomodo de Arg25.

En base a los datos termodinámicos de las mutantes, la principal pregunta es: ¿qué interacciones tiene el sitio 21 que estabilizaron de manera importante a AR? La siguiente cuestión consiste acerca del cambio en el sitio 104 y las características del tipo de residuo para restituir la red de interacciones. Y finalmente tratar de explicar la razón por la que el sitio 25 no contribuyó con el incremento de la estabilidad.

El modelo estructural de AR se realizó usando la estructura cristalográfica de JTO (1CD0) como base en el programa SwissPDBViewer y el modelo obtenido fue refinado en el servidor CBS (<http://www.cbs.dtu.dk/services>). En este modelo se analizaron los residuos con los que Phe21 hace contacto en un radio de 4 Å, distancia de acercamiento considerando que un enlace sencillo C-C es de 1.6 Å (Fig. 27). Dentro del conjunto de los residuos con que hace contacto, hay que recalcar 3 residuos que son Trp35, Leu73 y Val104. Todos estos yacen en la región hidrofóbica central del dominio y cabe destacar que el Trp35 es el residuo que posee el mayor número de interacciones dentro de la molécula.

El cambio de volumen de una Ile propia de la línea germinal por una Phe presente en AR no sólo cambiaría completamente la compactación del núcleo hidrofóbico sino también las interacciones del interior. Analizando con mayor cercanía a Phe21, se hace notar la proximidad de la interacción con el anillo fenólico de Tyr86. Lo que pudiera estar ocurriendo en AR es que Phe21 se encuentre interactuando con Tyr86 mediante un apilamiento de anillos aromáticos (*stacking*). Este apilamiento desacomodaría las cadenas laterales a su alrededor desestabilizando el interior de la molécula.

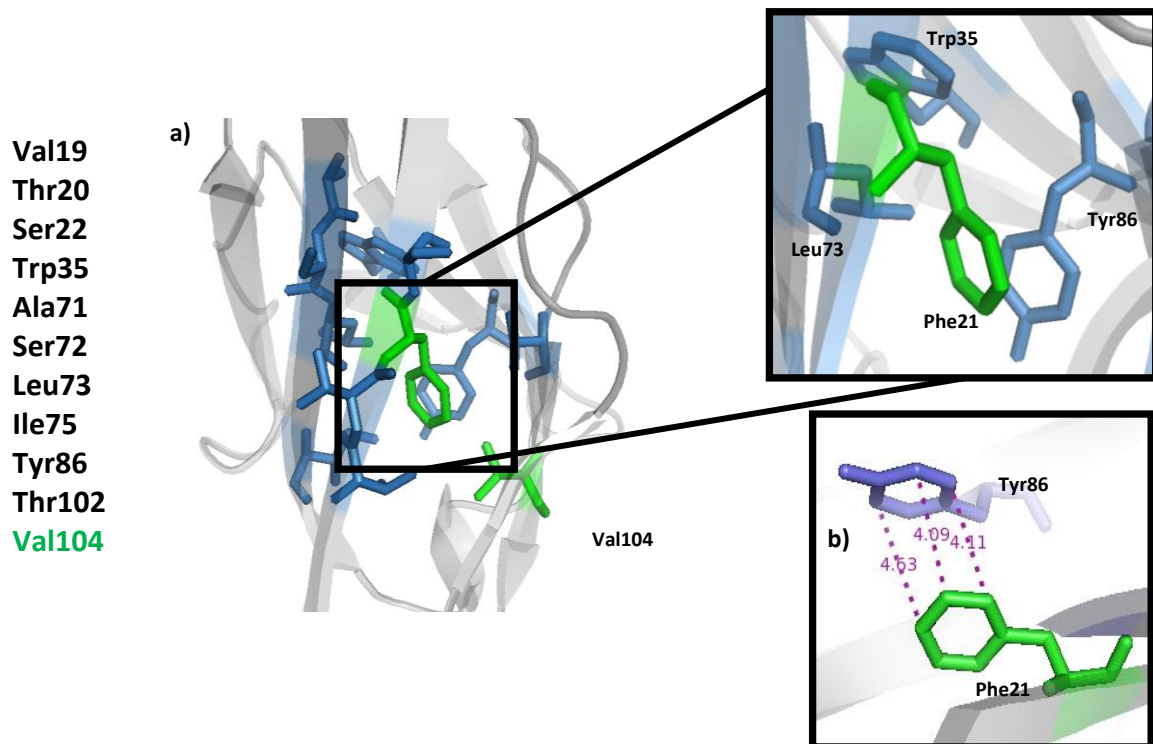


Fig. 27. Interacción de Phe21. En verde se encuentran remarcados Phe21 y Val104; en azul los residuos cercanos a Phe21. a) Distribución interna de los residuos con que hace interacción Phe21 cercanos a 4 Å de distancia. b) Distancias más cercanas de los anillos aromáticos entre Phe21 - Tyr86. La estructura de AR fue generada en SwissPDBviewer con el modelo cristalográfico de JTO (1CD0), corregida en el servidor CBS y editada en PyMol.

Ahora, ¿cuáles son los residuos que ocupan comúnmente el sitio 21? En el trabajo de Chothia et al (51) se analizaron 5,300 secuencias de dominios variables y de las líneas germinales codificantes de todas las familias con el fin de encontrar residuos importantes para la estructura de estos dominios. De acuerdo el trabajo de Chothia (51), la posición 21 es ocupada preferentemente por cuatro residuos hidrofóbicos (Val, Leu, Ile y Met). Sólo 34 secuencias de las 5,300 tienen Phe21, pero dada la variedad de familias de cadenas ligeras analizadas, esto pudiera no ser descriptivo para el caso de la familia λ VI. En el trabajo de tesis de Del Pozo (46), se reunieron secuencias λ VI tanto de células B policlonales como amiloidogénicas y puede observarse que el sitio 21 es ocupado principalmente por Ile siendo AR la única V_L con Phe en esta posición. Como este sitio se encuentra en el FR1, donde la tasa de mutación es prácticamente nula, Phe21 es una mutación inusual que resultó destabilizante pero que de alguna manera permitió la posterior maduración de la cadena ligera.

En la mutante pF21I, Ile21 estaría interactuando directamente con Leu73 por medio de sus cadenas laterales al igual que entre los átomos del enlace carbonilo y amida por efecto de su momento dipolar (Fig. 28). La cercanía de Leu73 con Trp35 le permite interactuar directamente en distancias próximas a 4 Å por lo que cualquier disrupción de esta interacción propiciaría una pérdida en la estabilidad de la molécula.

Analizando la mutante pV104L, notamos que este cambio sencillo no ofrece algún efecto estabilizante en AR. Sin embargo, es hasta que se encuentra interactuando con la mutación Ile21 cuando coopera en el incremento de la estabilidad. Probablemente este cambio permite restituir la red de interacciones de la región inferior de la molécula. Analizando el trabajo de Chothia (52), se reporta el uso preferencial de dos residuos hidrofóbicos (Val y Leu) pero en el análisis de Del Pozo (46) se remarca el uso preferencial de Leu para λ VI.

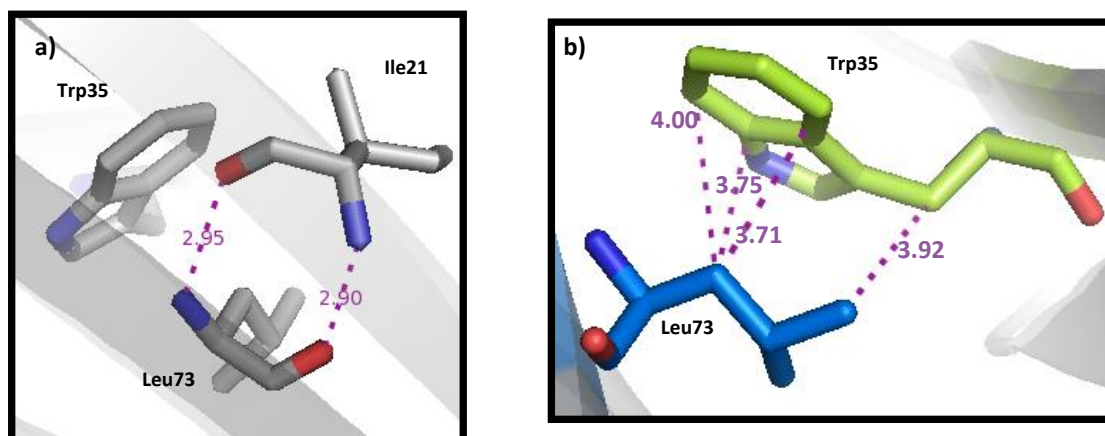


Fig. 28. Interacciones con Leu73. a) Interacción polar entre Ile21 – Leu73 **b)** Distancias entre Leu73 – Trp35. La estructura de AR fue generada en SwissPDBviewer con el modelo cristalográfico de JTO (1CD0), corregida en CBS y editada en PyMol.

En la estructura de las cadenas ligeras derivadas de λ VI, Leu resulta importante para mantener las interacciones de la región. Si se comparan las interacciones en el modelo de AR se puede observar que Leu104 tiene más interacciones que Val104 (Fig. 29). Por lo que la restitución de la Leu104, aunque débil de manera termodinámica, aumentaría el número de fuerzas de van der Waals en el interior de la molécula.

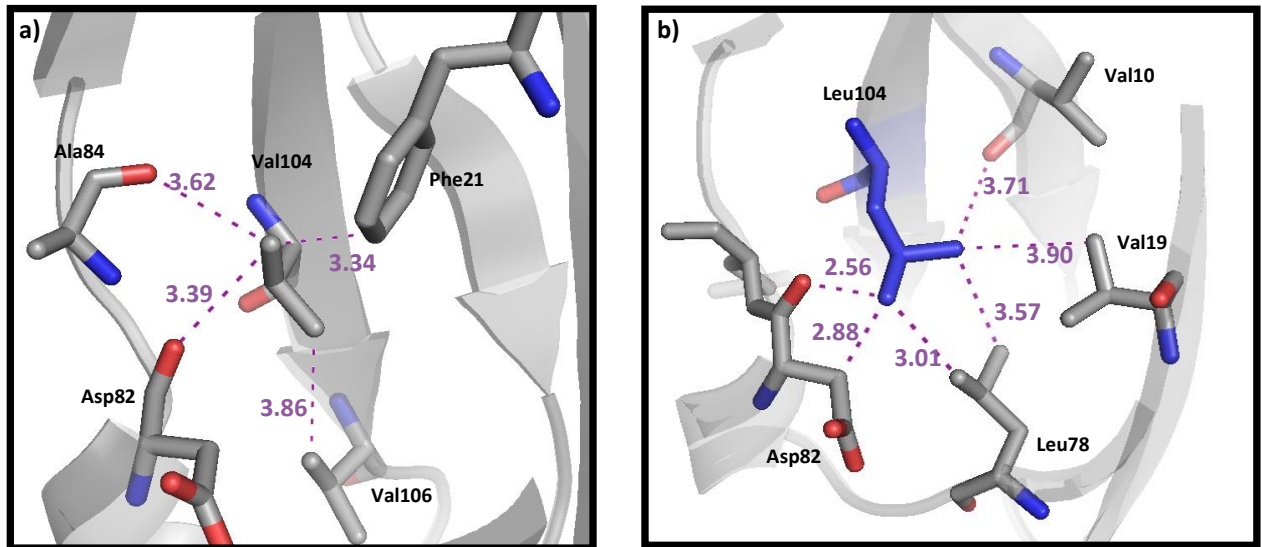


Fig. 29. Interacciones del residuo 104. a) Distancias de los residuos cercanos a 4 Å de distancia con Val104 b) Distancias de los residuos cercanos a 4 Å de distancia con Leu104. La estructura de AR fue generada en SwissPDBviewer con el modelo cristalográfico de JTO (1CD0), corregida en CBS y editada en PyMol.

Por último, las mutantes de la posición 25 carecen de una relación directa con la contribución de la estabilidad termodinámica. La estructura cristalográfica sobre la cual se generó AR fue JTO, cuya estructura primaria tiene una Arg en la posición 25. Se ha postulado que el cambio de Arg por Gly en la posición 25 podría influir en la conformación del CDR1 de una estructura tipo helicoidal a una tipo rizo, respectivamente, para las cadenas ligeras λ VI (Fig. 30) (63).

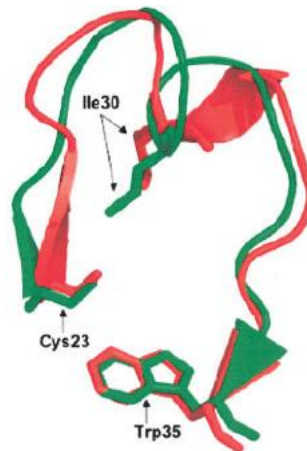


Fig. 30. Conformaciones del CDR1. En verde se muestra la conformación rizada debido Gly25 y en rojo la estructura helicoidal en presencia de Arg25 (66).

El cambio de conformación del CDR1 sería dependiente de la interacción entre el residuo 2 y el residuo 25. Además, la interacción de Arg25 con Phe2 en 6aJL2 está involucrada en el inicio de un motivo conocido como cambio de hoja (*sheet switch*) (Fig. 31a). Otro motivo de anti-agregación usado por estos dominios variables, ubicado en el extremo opuesto de cambio de hoja, es el motivo conocido como cierre de prolina (Fig. 31b).

El cambio de hoja es uno de los motivos anti-agregación usados en las proteínas tipo β -sándwich como lo son los dominios variables de las inmunoglobulinas (67). Los primeros 7 residuos del extremo N-terminal interactúan con los residuos de la hebra B y los siguientes 7 residuos interactúan con los últimos 8 residuos de la hebra G del extremo C-terminal (Fig. 31a). A pesar de que gran parte de los residuos se encuentran conservados en este motivo entre 6aJL2 y AR, las cadenas laterales del CDR1 y del CDR3 pudieran estar determinando la fuerza de interacción del cambio de hoja (Fig. 31c).

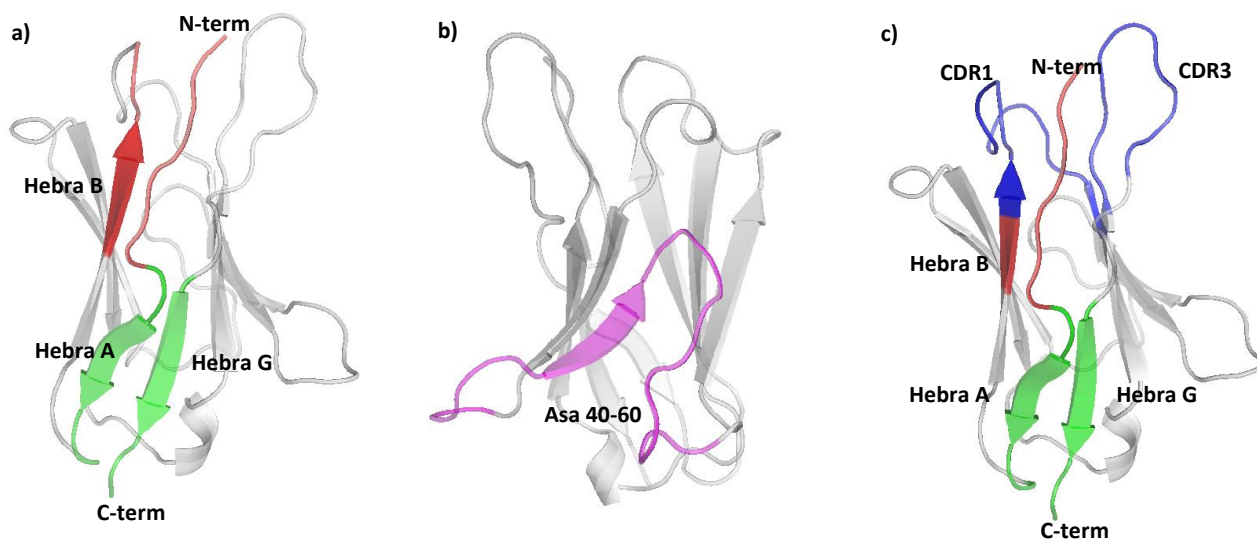


Fig. 31. Motivos anti-agregación en AR. En rojo se encuentra la interacción entre el extremo N-terminal y la hebra B; en verde la interacción entre la hebra A y la hebra G del extremo C-terminal. **a)** Cambio de hoja entre el extremo N-terminal y C-terminal. **b)** Cierre de prolina entre los residuos del asa 40- 60. **c)** En azul se encuentran marcados los CDR's que pudieran estar afectando la posición del extremo N-terminal. La estructura de AR fue generada en SwissPDBviewer con el modelo cristalográfico de JTO (1CD0), corregida en CBS y editada en PyMol.

A pesar de haber regresado el residuo 25 de AR a la línea germinal, quizás existan otras interacciones que pudieran estar interrumpiendo el acomodo del motivo de anti-agregación. Una mutación que pudiera impedir el correcto acomodo de la interacción 2-25 pudiera ser Asn92 (Fig. 32a). El residuo Asn92 es una mutación en el CDR3 cuyo O del enlace éster de la cadena lateral podría estar interactuando con el extremo N-terminal de Asp1 (Fig. 32b). Esto podría estar afectando indirectamente la interacción planar 2-25 ya que la atracción entre Asp1-Asn92 estaría perturbando el inicio del motivo de anti-agregación e inclusive, Asn92 podría estar interactuando con el anillo aromático de Phe2 de forma ion- π .

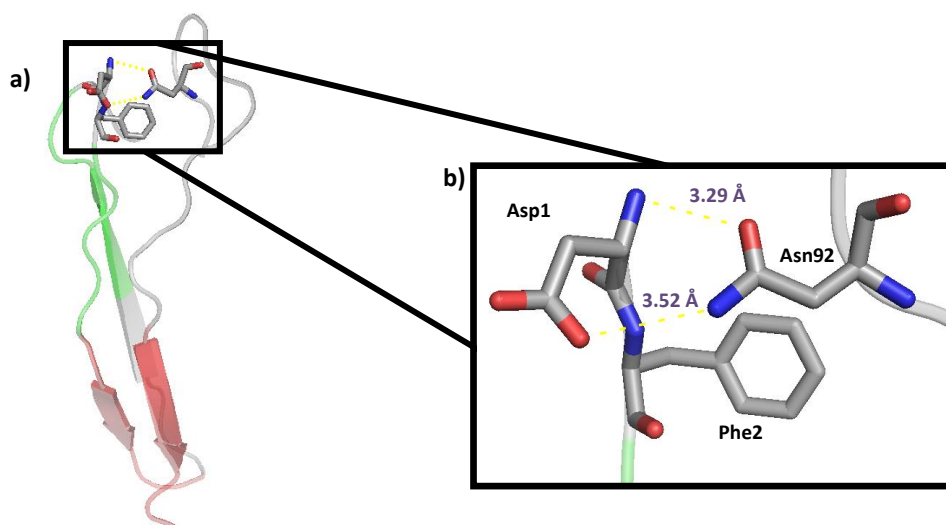


Fig. 32. Sheet-switch. En verde está marcada la primera parte con que interactúa el extremo N- terminal y en rojo la segunda parte. Los átomos en color azul representan a los Nitrógenos y en rojo a los Oxígenos. En el acercamiento se aprecia la interacción electrostática entre Asp1 – Asn92. La estructura de AR fue generada en SwissPDBviewer con el modelo cristalográfico de JTO (1CD0), corregida en CBS y editada en PyMol.

Otro cambio que resultaría interesante analizar sería la mutante Ala43Ser. La variante alélica de la línea germinal 6aJL2 es justamente Gly25 – Ala43, ambas presentes en AR. Desafortunadamente no se cuenta con datos termodinámicos sobre la influencia del sitio 43 sobre la estabilidad de 6aJL2. Para corroborar la influencia sobre el sitio 43 en AR también se tendría que analizar la influencia de este sitio en 6aJL2.

Además de los cambios anteriores, otros cambios a analizar serían los ocurridos en los FR's. Se sabe que los FR's son el andamiaje estructural que dan origen a la conformación del dominio. Por lo que otros residuos que habría que analizar su efecto serían los cambios situados en los FR's en AR con respecto a 6aJL2, como Asp1Gln, Ala43Ser, Asp50Glu, Asp68Ser, Ala68bSer, Asn92Asp y Asn94Ser (Fig. 33).

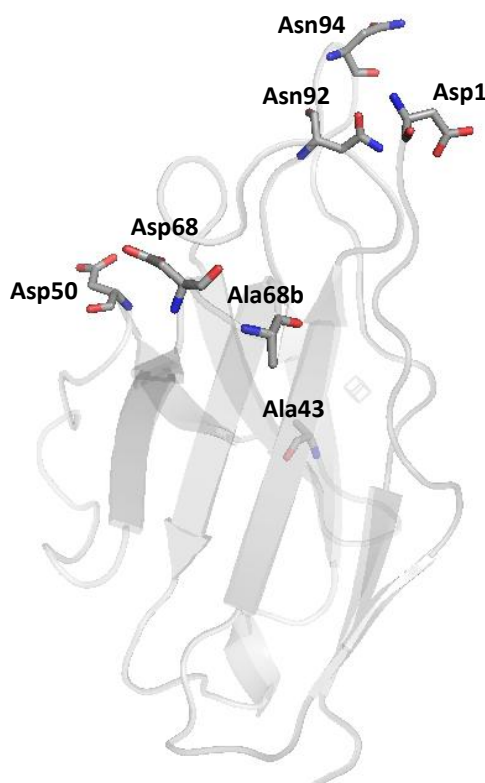


Fig. 33. Mutaciones en AR. Se muestran los residuos que cambiaron en AR con respecto a la línea germinal, específicamente en los FR's. Los átomos en color azul representan a los Nitrógenos y en rojo a los Oxígenos. La estructura de AR fue generada en SwissPDBviewer con el modelo cristalográfico de JTO (1CD0), corregida en CBS y editada en PyMol.

Aunque la relación entre la estabilidad termodinámica y la fibrillogénesis es en lo general directa, también cabría analizar los cambios que estuvieran ocurriendo en los extremos N-terminal y C-terminal. El rearrreglo estructural que favorece la formación de núcleos y su posterior extensión como fibra es aún incierto por lo que sigue sin estar claro este mecanismo.

El uso de la fluorescencia del Trp35 como seguimiento de la desestabilización termodinámica y estructural limita el análisis a sólo registrar la alteración de una porción de la estructura. Se desconoce si otros sub-dominios siguen manteniendo su conformación o si estos

están adoptando nuevas estructuras (68). Como puede apreciarse de los resultados de los experimentos, la disminución de la exposición del Trp35 estuvo acoplada a la estabilización de la zona hidrofóbica inferior. Sin embargo se desconoce cómo se están reacomodando otras regiones de la molécula para que se lleve a cabo la fibrilogénesis. Esto se podría resolver mediante la incorporación de fluoróforos en diferentes regiones de la molécula, el uso de otras técnicas espectroscópicas como el uso de infrarrojo o anisotropía (8), o el uso de Resonancia Magnética Nuclear (NMR) o difracción de rayos X (9).

Falta también hacer el análisis microscópico de las fibras formadas. Esto ayudaría a interpretar las cinéticas de fibrilogénesis a nivel macroscópico ya que la morfología de la fibra podría ser diferente entre cada mutante. Además, la interacción con otras macromoléculas como carbohidratos (69), membranas lipídicas (70) o iones metálicos (70), ayudaría a interpretar los eventos ocurridos *in vivo*. Asimismo, sabiendo que AR estuvo involucrada en la nefropatía del paciente, la interacción con células mesangiales (71) permitiría dilucidar los eventos primarios para la amiloidosis. Se podrían analizar las rutas de degradación del dominio variable previa a la formación de fibra y así poder dirigir de manera efectiva alguna cura para la discrasia celular de linfocitos B denominada amiloidosis AL.

8. CONCLUSIONES

A diferencia de otros trabajos (40, 41, 46), la visión que se usó en este trabajo fue el dirigir las mutaciones de AR hacia la línea germinal (6aJL2) y analizar su efecto en la estabilidad termodinámica. Aunque es una perspectiva sencilla, fue una investigación que no requirió realizar la combinatoria de los veinte residuos de aminoácidos en cada sitio propuesto para averiguar cuál podría contribuir con el cambio de la estabilidad.

Debido a la baja estabilidad termodinámica de AR, cualquier adición de energía mecánica o molecular es suficiente como para modificar la estructura. La energía cinética molecular provista por el aumento de la temperatura aunada con la energía cinética mecánica proveniente de la agitación muestran lo susceptible que es la estructura de AR reflejándose en los cambios de la exposición del triptófano y el tiempo *lag* de las cinéticas de fibrilogénesis.

Del modelo generado de AR, Phe21 estaría interactuando con Tyr86 mediante el apilamiento de los anillos bencénicos pudiendo explicar el efecto de este residuo sobre la disminución de la estabilidad. Las interacciones hidrofóbicas al interior de la molécula no podrían empaquetarse adecuadamente hasta que el residuo 21 sea sustituido por Ile, propio de la línea germinal.

Como Leu73 se encuentra adyacente al sitio 21 e interactuando directamente con Trp35, la alta fluorescencia del AR a partir del Trp35 podría explicarse debido al mal acomodamiento de las cadenas laterales entre Phe21 y Leu73 propiciando el alejamiento de Trp35 del puente disulfuro.

El cambio de longitud de la cadena lateral en el sitio 104 no es determinante para el incremento de la estabilidad termodinámica de AR. Sólo hasta que el sitio 21 es ocupado por Ile, el cambio en el sitio 104 participa en el incremento de la estabilidad. Lo más probable es que se haya restituido la red de interacciones de las cadenas laterales al interior de la molécula

Aunque en 6aJL2 la mutación Arg25Gly haya disminuido la estabilidad termodinámica, la mutación Gly25Arg en AR no incrementó sustancialmente la estabilidad. Si bien se esperaba un efecto estabilizante, otros residuos podrían estar afectando la red de interacciones de esta región de la molécula que pudieran dificultar el reacomodamiento del residuo. El contexto molecular de AR, referido a su red de interacciones polares y no polares, podría ser diferente al de 6aJL2 en diferentes regiones de la molécula.

Esto llama la atención ya que no es sólo un residuo o una sola región los responsables de la desestabilización de la molécula; sino que es la complejidad y la fuerza de las interacciones entre las cadenas laterales de los residuos, internas y externas, quienes van definiendo qué tan estable y qué tan fibrilogénica sería una proteína.

9. PERSPECTIVAS

Si bien se obtuvieron datos importantes en este trabajo, el realizar las repeticiones de la desnaturalización térmica y las cinéticas de fibrilogénesis de las mutantes generaría una mayor certidumbre y confiabilidad de los datos analizados. Para relacionar los efectos termodinámicos entre cada mutante, la estructura molecular de AR y algunas de sus mutantes ayudaría a la correcta interpretación de los datos termodinámicos de este trabajo.

Además, sería interesante generar y analizar mutantes de otros sitios como los ubicados en los FR's. Se evaluaría su estabilidad termodinámica y su cinética de fibrilogénesis pero los resultados confirmarían el efecto estabilizante que otros sitios podrían tener sobre AR. No obstante, el regresar los cambios de AR hacia la línea germinal no debiera centrarse únicamente en los FR's sino también en los CDR's ya que el acomodamiento de estas regiones podría influir en el resto de la molécula.

Otra perspectiva sería el evaluar la interacción de AR con células mesangiales y dilucidar las rutas de embebimiento celular y sus posibles efectos apoptóticos. Aunque se han caracterizado diversas fases de la interacción de cadenas ligeras amiloidogénicas con diferentes líneas celulares, no se cuenta con información acerca de alguna línea germinal en específico ya que las investigaciones se han referido a sólo el isotipo de la cadena ligera.

Aunado a lo anterior, el analizar la interacción de AR con otras moléculas orgánicas, como membranas lipídicas o carbohidratos, podría determinar la preferencia que tendrían ciertas cadenas ligeras sobre la constitución de una membrana celular.

Uno de los mecanismos que se desconocen hasta el momento es el proceso en que una cadena ligera amiloidogénica se re-estructura para dar paso a la formación de fibra. Entonces el seguimiento de la reestructuración de AR mediante fluoróforos específicos en sitios determinados para establecer un posible mecanismo para la formación de la fibra brindaría información novedosa acerca de este proceso.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. **Voet D, Voet J** (1995) Biochemistry 2nd edition *John Wiley & Sons Inc.*
2. **Dobson CM** (2001) The structural basis of protein folding and its links with human disease *Phil Trans R Soc Lond B* **356**: 133 – 145
3. **Soto C.** (2001) Protein misfolding and disease; protein refolding and therapy *FEBS Letters* **498**: 204 – 207
4. **Thomas PJ, Qu BH, Pedersen PL** (1995) Defective protein folding as a basis of human disease *Trends Biochem Sci* **20**: 456-9
5. **Dobson CM** (2004) Principles of protein holding, misfolding and aggregation *Semin Cell Dev Biol* **15**: 3 - 16
6. **Gregersen N** (2006) Protein misfolding disorders: Pathogenesis and intervention *J Inherit Metab Dis* **29**: 456 – 470
7. **Dobson CM** (1999) Protein misfolding, evolution and disease *TIBS* **24**: 329–332
8. **Munishkina LA, Fink AL.** (2007) Fluorescence as a method to reveal structures and membrane-interactions of amyloidogenic proteins *Biochim Biophys Acta* **768**:1862-85
9. **Chiti F, Dobson CM** (2006) Protein Misfolding, Functional Amyloid and Human Disease *Annu Rev Biochem* **75**: 333 – 366
10. **Eanes, E.D. & Glenner, G.G.** (1968) X-ray diffraction studies on amyloid filaments *J Histochem Cytochem* **16**: 673 – 677
11. **Cohen AS, Shirahama T & Skinner M** (1982) Electron microscopy of amyloid in *Electron Microscopy of Protein* (Harris I, ed.), pp. 165–205. *Academic Press*, London, UK.
12. **Sipe JD., Cohen AS.** (2000) Review: History of the Amyloid Fibril *J Struct Biol* **130**: 88 - 98
13. **Zerovnik E.** (2002) Amyloid-fibril formation Proposed mechanisms and relevance to conformational disease *Eur J Biochem* **269**: 3362 - 3371
14. **Nelson R., Eisenberg D.** (2006) Recent atomic models of amyloid fibril structure *Curr Opin Struct Biol* **16**: 260 - 265
15. **Tycko R** (2006) Molecular structure of amyloid fibrils: insights from solid-state NMR *Quarterly Reviews of Biophysics* Cambridge University Press
16. **Puchtler H & Sweat F** (1965) Congo red as a stain for fluorescence microscopy of amyloid *J Histochem Cytochem* **13**: 693–694
17. **LeVine H III** (1993) Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution *Protein Sci* **2**: 404–410.
18. **Makin, O.S. & Serpell, L.C.** (2005) Structures for amyloid fibrils *FEBS Journal* **272**: 5950 – 5961

19. **Rodriguez-Luna H, Vargas HE, Williams J, De Petris G, Rakela J & Douglas DD** (2004) Primary Biliary Cirrhosis and Systemic Amyloidosis, a New Association *Digestive Disease and Sciences* **49**: 1196 - 1200
20. **Gertz MA, Lacy MQ, Dispenzieri A** (1999) Amyloidosis – Monoclonal Gammopathies and Related Disorders *Hemat Oncol Clin North Am* **13**: 1211 – 1233
21. **Müller AMS, Geibel A, Neumann HPH, Kühnemund A, Schmitt-Gräff A, Böhm J & Engelhardt M** (2006) Primary (AL) Amyloidosis in Plasma Cell Disorders *The Oncologist* **11**: 824 – 830
22. **Abraham RS, Geyer SM, Price-Troska TL, Allmer C, Kile RA, Gertz MA & Fonseca R.** (2003) Immunoglobulin light chain variable (V) region genes influence clinical presentation and outcome in light chain-associated amyloidosis (AL) *Blood* **101**: 3801 – 3808
23. **Merlini G & Stones MJ** (2006) Dangerous small B-cell clones *Blood* **108**: 2520 – 2530
24. **Janeway CH., Travers P., Walport M. & Shlomchik M.** (2001) Immunobiology The immune System in Health and Disease 5th Edition Garland Publishing
25. **Poljak RJ, Amzel LM, Avey HP, Chen BL, Phizackerley RP, Saul F.** (1973) Three-dimensional structure of the Fab' fragment of a human immunoglobulin at 2,8-Å resolution *PNAS* **70**: 3305 – 3310
26. **Lefranc MP** (2001) Nomenclature of the Human Immunoglobulin Kappa (IGK) genes *Exp Clin Immun* **18**: 161 - 174
27. **Lefranc MP** (2001) Nomenclature of the Human Immunoglobulin Lambda (IGL) genes *Exp Clin Immun* **18**: 242 – 254
28. **Benjamini E, Coico R, Sunshine G** (2000) Immunology A Short Course 4th Edition John Wiley & Sons Inc
29. **Glenner GG, Harbaugh J, Ohms JJ, Harada M, Cuatrecasas P** (1970) An amyloid protein: the amino-terminal variable fragment of an immunoglobulin light chain *Biochem Biophys Res Comm* **41**: 1287 – 1289
30. **Obici L, Perfetti V, Palladini, Morati R, Merlini G** (2005) Clinical aspects of systemic amyloid diseases *Biochim Biophys Acta* **1753**: 11 – 22
31. **Solomon A** (1986) Clinical implications of monoclonal light chains *Seminars in Oncology* **13**: 341 – 349
32. **Buxbaum JN** (1992) Mechanisms of disease: monoclonal immunoglobulin deposition, amyloidosis, light chain deposition disease, and light and heavy chain deposition disease *Hemat Oncol Clin North Am* **6**: 323 – 324
33. **Perfetti, V., Casarini, S., Palladini, G., Vignarelli, M. C., Klersy, C., Diegoli, M., Ascari, E., Merlini, G.** (2002) Analysis of V λ -J λ expression in plasma cells from primary (AL) amyloidosis and normal bone marrow identifies 3r (λ III) as a new amyloid-associated germline gene segment *Blood* **100**: 948-953.

34. **Comenzo R. L., Zhang, Y., Martinez, C., Osma, K., Herrera, G.** (2001) The tropism of organ involvement primary systemic amyloidosis: contributions of Ig VL germ line gene use and clonal plasma cell burden. *Blood* **98**: 714-720.
35. **Solomon, A., Frangione, B., Franklin, E. C.** (1982) Preferential Association Of The V λ VI Subgroup Of Human Light Chains UIT Amyloidosis AL *J of Clin Invest* **70**: 453-460.
36. **Bowler BE** (2007) Thermodynamics of protein denatured states *Molecular BioSystems* **3**: 88 – 99
37. **Pace CN** (1986) Determination and Analysis of Urea and Guanidine Hydrochloride Denaturation Curves *Methods in Enzymology* **131**: 266 – 280
38. **Gonelli M. & Strambini GB.** (2005) Intremolecular Quenching of Typtophan Phosphorescence in Short Peptides and Proteins *Photochemistry and Photobiology* **81**: 614 - 622
39. **Ewert S, Huber T, Honegger & Plückthun A.** (2003) Biophysical Properties of Human Antibody Variable Domain *J Mol Biol* **325**: 531 - 553
40. **Hurle, M. R., Helms, L. R., Li, L., Chan, W., Wetzel, R.** (1994). A role for destabilizing amino acid replacements in light chain amyloidosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 5446 – 5450
41. **Raffen. R. M., Dieckman L. J., Szpunar, M., Wunschl, C., Pokkuluri, P. R., Daves, P., Stevens, P. W., Cai, X., Schiffer, M., Stevens, F. J.** (1999) Physicochemical consequences of amino acid variations that contribute to fibril formation by immunoglobulin light chain *Prot Science* **6**: 509 – 517.
42. **Solomon, A., Weiss, D. T., Murphy, C. L., Hrcic, R., Wall, J. S., and Schell, M.** (1998) Light chain-associated amyloid deposits comprised of a novel k constant domain *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 9547-9551
43. **Chiti F., Webster P., Taddei N., Clark A., Stefani M., Ramponi G. & Dobson CM.** (1999) Designing conditions for in vitro formation of amyloid protofilaments and fibrils *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 3590 - 3594
44. **Wall J, Murphy CL, Solomon A.** (1999) In vitro immunoglobulin light chain fibrillogenesis *Methods in Enzymology* **309**: 204 – 217
45. **Souillac PO, Uversky VN, Millett IS, Khurana R, Doniach S, Fink AL.** (2002) Effect of association state and conformational stability on the kinetics of immunoglobulin light chain amyloid fibril formation at physiological pH *Journal of Biological Chemistry* **277**: 12657 - 65
46. **Del Pozo-Yauner L** (2008) Tesis de Doctorado – Influencia de la línea germinal 6a en la tendencia de las cadenas ligeras λ 6 a la agregación amiloide IBT - UNAM
47. **Del Pozo-Yauner L. Ortiz,E. Sanchez,R. Sanchez-Lopez,R. Guereca,L. Murphy,C.L. Allen,A. Wall,J.S. Fernandez-Velasco,D.A. Solomon,A. Becerril,B.** (2008) Influence of the germline sequence on the thermodynamic stability and fibrillogenicity of human lambda 6 light chains *Proteins* **72**: 684-692.

48. **Chung CM, Chi JD, Connors LW, Gursky O, Lim A, Dykstra AB, Liepnieks J, Benson MD, Costello CE, Skinner M & Walsh MT** (2005) Thermodynamic Stability of a κ I immunoglobulin Light Chain: Relevance to Multiple Myeloma *Biophys J* **88**: 4232 – 4242
49. **Wall, J., Schell, M., Murphy, C., Hrcic, R., Stevens, F. J., Solomon, A.** (1999) Thermodynamic instability of human λ 6 light chain: correlation with fibrillogenicity. *Biochemistry* **38**(42):14101 – 14108.
50. **Sletten K, Natvig JB, Husby G & Juul J** (1981) The complete amino acid sequence of a prototype immunoglobulin- λ light-chain-type amyloid-fibril protein AR *Biochem J* **195**: 561 – 572
51. **Wu, T. T., Kabat, E A.** (1970) An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity *J. Exp. Med* **132**: 211-250.
52. **Chothia C., Gelfand., Kister A.** (1998) Structural Determinants in the Sequences of Immunoglobulin Variable Domain *J Mol Biol* **278**: 457 - 479
53. **Kocher JP., Prévost M., Wodak SH. & Lee B.** (1996) Properties of the protein matrix revealed by the free energy of cavity formation *Structure* **4**: 1517 - 1529
54. **Santoro, M. M. & D. W. Bolen.** (1988). Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 1. Unfolding of Phenyl-methanesulfonyl α -chymotrypsin using different denaturants *Biochemistry* **27**: 8063 - 8074
55. **Holder JB., Bennett AF., Chen J., Spencer DS., Byrne MP. & Stites** (2001) Energetics of side chain packing in staphylococcal nuclease assessed by exchange of valines, isoleucines, and leucines *Biochemistry* **40**: 13998 - 14003
56. **D. Marquardt** (1963) An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters *SIAM J Appl Math* **11**: 431–441.
57. **Luo J., Iwakura M. & Matthews R.** (1995) Detection of a Stable Intermediate in the Thermal Unfolding of a Cysteine-Free Form of Dihydrofolate Reductase from *Escherichia coli* *Biochemistry* **34**: 10669 - 10675
58. **Gloss LM., Matthews R.** (1997) Urea and Thermal Equilibrium Denaturation Studies on the Dimerization Domain of *Escherichia coli* Trp Repressor *Biochemistry* **36**: 5612 - 5623
59. **Eftink MR.** (1995) Use of Multiple Spectroscopic Methods to Monitor Equilibrium Unfolding of Proteins *Methods in Enzymology* **259**: 487 - 512
60. **Milardi D., la Rosa C., Fasone S., Grasso D.** (1997) An alternative approach in the structure-based predictions on the thermodynamic of protein unfolding *Biophys Chem* **69**: 43 - 51
61. **Khurana R., Coleman C., Ionescu-Zanetti C., Cartes SA., Krishna V., Grover RK., Roy R. & Singh S.** (2005) Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils *J Struct Biol* **151**: 229 - 238
62. **Krebs MRH., Bromley EHC., & Donald AM** (2005) The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: localization and implications *J Struct Biol* **149**: 30 - 37

63. **Thomson JA., Shirley BA., Grimsley GR. & Pace N.** (1989) Conformational Stability and Mechanism of Folding of Ribonuclease T1 *J Biol Chem* **264**: 11614 – 11620
64. **Nielsen L., Khurana R., Coats A., Frokjaer S., Brange J., Vyas S., Uversky VN. & Fink AL.** (2001) Effect of Environmental Factors on the Kinetics of Insulin Fibril Formation: Elucidation of the Molecular Mechanism *Biochemistry* **40**: 6036 - 6046
65. **Shikari K., Nishikori S., Fujiwara S., Hashimoto H., Kai Y., Takagi M. & Imanaka T** (2001) Comparative analyses of the conformational stability of a hyperthermophilic protein and its mesophilic counterpart *Eur J Biochem* **268**: 4144 - 4150
66. **Del Pozo Yauner L., Ortiz E., Becerril B.** (2006) The CDR1 of the human λ VI light chain adopts a new canonical structure *Proteins* **62**: 122 - 129
67. **Richardson, J. S. and Richardson D. C.** (2002) Natural b-sheet proteins use negative design to avoid edge-to edge aggregation *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 2754-2759.
68. **Kuwajima, K.** (1995) Protein Stability & Folding: Theory & Practice *Methods in Molecular Biology* **40**: pp 115-135, Humana Press Inc., Totowa, NJ
69. **McLaughlin RW, De Stigter JK, Sikkink LA, Baden EM, Ramirez-Alvarado M.** (2006) The effects of sodium sulfate, glycosaminoglycans, and Congo red on the structure, stability, and amyloid formation of an immunoglobulin light-chain protein *Protein Sci* **15**:1710-22
70. **Meng X, Fink AL, Uversky VN.** (2008) The effect of membranes on the in vitro fibrillation of an amyloidogenic light-chain variable-domain SMA *J Mol Biol.* **381**: 989-99
71. **Keeling J, Teng J, Herrera GA.** (2004) AL-amyloidosis and light-chain deposition disease light chains induce divergent phenotypic transformations of human mesangial cells *Lab Invest* **84**: 1322 - 1338.