



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Estabilidad cinética de γ -cristalinas, y su interacción con iones metálicos implicados en agregación”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Oscar de Jesús Rodríguez Meza

TUTOR PRINCIPAL:

Dr. Miguel Antonio Costas Basín
Facultad de Química, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dra. Liliana Quintanar Vera
Departamento de Química, CINVESTAV
Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco
Facultad de Medicina, UNAM

Ciudad de México. Agosto, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biofísicoquímica del Departamento de Físicoquímica en la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), como un trabajo original de investigación, bajo la supervisión del Dr. Miguel Antonio Costas Basín.

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México y al Laboratorio de Biofísicoquímica que por medio de los proyectos IN220519 en el programa PAPIIT-DGAPA-UNAM, y 5000-9018 en el Programa de Apoyo a la Investigación y el Posgrado (FQ-UNAM) me otorgaron las facilidades para el desarrollo de la presente tesis.

También agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante mis estudios de Maestría, con el número de CVU 894945.

Asimismo agradezco las valiosas sugerencias, correcciones y observaciones al manuscrito, que enriquecieron y mejoraron el presente documento, así como toda ayuda del jurado conformado por:

- Presidente: Dra. Adela Rodríguez Romero
- Vocal: Dra. Laura Domínguez Dueñas
- Vocal: Dr. Ernesto Carrillo Nava
- Vocal: Dra. Norah Yolanda Barba Behrens
- Secretario: Dra. Georgina Regina Garza Ramos Martínez

Parte de este trabajo fue presentando en “VI Latin American Protein Society Meeting” y “VII Congreso de Fisicoquímica, Estructura y Diseño de Proteínas” con el cartel número 88 titulado “Kinetic Stability of human gamma crystallins and their interactions with metal ions” llevado a cabo del 20-23 de Octubre del 2019 en la Ciudad de México. Mención Honorífica.

Parte de este trabajo será publicado en los siguientes dos artículos:

- Quintanar L. et al. Copper-induced aggregation of human lens γ -crystallins: Insights into the bioinorganic chemistry of cataracts disease. Manuscrito en preparación.
- Rodríguez-Meza O. et al. The dual role of mercury ions in stability of human gamma crystallins: a calorimetric study. Manuscrito en preparación.

Durante el desarrollo de este trabajo se participó en la publicación del artículo:

- Aguayo-Ortiz, R., González-Navejas, A., Palomino-Vizcaino, G., Rodriguez-Meza, O., Costas, M., Quintanar, L. y Dominguez, L. (2019). Thermodynamic stability of human γ D-crystallin mutants using alchemical free-energy calculations. *Journal of Physical Chemistry B*, 123 (27), 5671-5677.

El presente trabajo (y todo lo que involucro para que se pudiera llevar a cabo) no hubiera sido posible sin la ayuda y el apoyo de varias personas que en esta sección me permito agradecerles sinceramente.

Al **Dr. Miguel Costas**, quien además de ser tutor principal de este trabajo me brindó su ayuda de diferentes modos. Antes que nada muchas gracias por aceptarme como estudiante en su laboratorio, gracias por sus enseñanzas técnicas y teóricas en el área de la calorimetría de proteínas (y en otras áreas), por su paciencia, por su amistad e incluso por su ayuda en cuestiones fuera de lo académico; y en especial me gustaría agradecerle por darme la oportunidad de tomar decisiones durante el curso del proyecto y así permitirme desarrollar las habilidades de trabajar de manera independiente.

A la **Dra. Liliana Quintanar** por la gran ayuda y asistencia a lo largo del desarrollo del trabajo, al fungir como miembro del Comité Tutor que asesoró el desarrollo de este trabajo, así como también por el apoyo y disponibilidad en la producción de las proteínas, lo que permitió fortalecer la colaboración entre ambos grupos de investigación.

Al **Dr. Alejandro Fernández** por sus valiosas sugerencias y aportaciones en cada sesión de los exámenes tutorales que ayudaron a direccionar, de mejor manera, el rumbo del proyecto.

A la **M.C. Jessica Díaz**, quien con amabilidad me orientó en los detalles técnicos y en el uso correcto de los equipos, además de la ayuda para encontrar los materiales/instrumentos/reactivos los primeros días (semana, meses... bueno hasta la fecha).

Al **Dr. Giovanni Palomino** por su gran ayuda en la producción de las proteínas, así como por tener la amabilidad de enseñarme a realizarlo y por su gran disponibilidad.

A todos y cada uno de los miembros del laboratorio de biofísicoquímica, por sus observaciones en cada seminario, y por las charlas tan amenas en compañía de un buen café.

A mis padres **Oscar Rodríguez** y **Margarita Meza**, por tanto apoyo moral y económico, lo que me ha permitido continuar con mis objetivos y metas propuestas desde hace algunos años. En serio, gracias por ese apoyo *situacional* (no tengo un adjetivo preciso) al ayudarme con el hecho de estar donde yo no puedo estar, y ayudar a quien yo, estando lejos, no puedo ayudar.

A **Lizeth Hernández**, muchas gracias por todo (lo bueno, lo malo, lo grandioso y lo pésimo), ya que cada una de esas cosas han hecho que seamos lo que hoy en día somos. Te amo Lizi.

A **Iker E. Rodríguez**, pequeña gran personita que me ha enseñado incluso más de lo que yo he podido enseñarle. Cada que te veo me recuerdas mucho a mi “yo” de hace varios años, ese niño terco, necio, desobediente y *desmadroso* (acuérdate que es grosería, no la digas), pero muy inteligente, cariñoso, divertido e ingenioso que nunca se da por vencido. Gracias por tratar de comprender el porqué de todos los días que estoy ausente... así que habrá que agradecerle a la Pandemia por permitirnos estar juntos por muchos días. Te amo chaparro.

*Para mi pequeño
Evanny.*

Índice

1 Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1 Antecedentes Generales	3
2.1.1 Cristalinas.....	7
2.1.2 Plegamiento y Estabilidad de proteínas	12
2.2 Antecedentes Específicos	19
2.2.1 Plegamiento, estabilidad y agregación de γ -cristalinas.....	19
2.2.2 Efecto de los iones metálicos sobre la agregación de γ -cristalinas	23
3 Hipótesis y Objetivos	35
3.1 Hipótesis	35
3.2 Objetivo general.....	35
3.3 Objetivos específicos	35
4 Metodología	36
4.1 Expresión y purificación de las proteínas	36
4.2 Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB)	36
4.2.1 Ajuste al modelo de dos estados irreversible	38
4.3 Calorimetría de Titulación Isotérmica (CTI)	40
5 Resultados y Discusión	43
5.1 Estabilidad cinética de γ -cristalinas	43
5.1.1 Estabilidad cinética de cristalinas H γ C, H γ D y H γ S.....	43
5.1.2 Estabilidad cinética de los dominios aislados C- y N-terminal de H γ D	48
5.1.3 Estabilidad cinética de la mutante H γ D H22Q.....	49
5.2 Efecto de los iones Cu ²⁺ sobre la estabilidad cinética de γ -cristalinas y su interacción	51
5.2.1 Efecto de los iones Cu ²⁺ sobre la estabilidad cinética de H γ D y sus dominios aislados, y su interacción.....	51
5.2.2 Efecto de los iones Cu ²⁺ sobre la estabilidad cinética de H γ D H22Q y su interacción	57
5.2.3 Mecanismo de agregación de H γ D inducida por Cu ²⁺	60
5.2.4 Efecto de los iones Cu ²⁺ sobre la estabilidad cinética de H γ C y H γ S, y su interacción	62

5.3 Efecto de los iones Zn^{2+} sobre la estabilidad cinética de γ -cristalinas y su interacción	68
5.3.1 Efecto de los iones Zn^{2+} sobre la estabilidad cinética de H γ D y sus dominios aislados, y su interacción.....	68
5.3.2 Efecto de los iones Zn^{2+} sobre la estabilidad cinética de H γ D H22Q y su interacción	71
5.3.3 Efecto de los iones Zn^{2+} sobre la estabilidad cinética de H γ C y H γ S, y su interacción	73
5.4 Efecto de los iones Hg^{2+} sobre la estabilidad cinética de γ -cristalinas y su interacción	74
5.4.1 Efecto de los iones Hg^{2+} sobre la estabilidad cinética de H γ D y sus dominios aislados, y su interacción.....	74
5.4.2 Efecto de los iones Hg^{2+} sobre la estabilidad cinética de H γ D H22Q y su interacción	79
5.4.3 Efecto de los iones Hg^{2+} sobre la estabilidad cinética de H γ C y H γ S, y su interacción	82
6 Conclusiones y perspectivas.....	89
6.1 Conclusiones	89
6.2 Perspectivas	92
7 Apéndices.....	93
Apéndice A. Figuras Suplementarias.....	93
Ajuste al modelo de dos estados irreversible de los termogramas de CDB de las γ -cristalinas.....	93
Ajuste al modelo de dos estados irreversible de los termogramas de CDB de las γ -cristalinas en presencia de cobre	94
Ajuste al modelo de dos estados irreversible de los termogramas de CDB de las γ -cristalinas en presencia de mercurio.....	96
Experimentos de CTI de γ -cristalinas con iones metálicos.....	97
Apéndice B. Ajuste al modelo doble de dos estados irreversible	100
Apéndice C. Tablas de resultados obtenidos por CDB y CTI	103
8 Referencias	107

Lista de Figuras

Figura 1. Lente en el humano.....	3
Figura 2. Tipos de células en el cristalino.....	4
Figura 3. Variaciones en morfología y distribución de la opacidad de la lente en cataratas congénitas.....	6
Figura 4. Estructura de las subunidades de las cristalinas α : αA y αB	7
Figura 5. Motivo de llave griega en cristalinas.....	8
Figura 6. Cristalinas $\beta\gamma$	9
Figura 7. Cristalinas $H\gamma C$, $H\gamma D$ y $H\gamma S$	11
Figura 8. Proceso de desnaturalización de una proteína.....	14
Figura 9. Curva de estabilidad termodinámica.....	16
Figura 10. Diagrama de energía para el desplegamiento de una proteína.....	17
Figura 11. Plegamiento y desplegamiento al equilibrio de la cristalina $H\gamma D$ con cloruro de guanidinio.....	20
Figura 12. Imágenes de microscopía de fuerza atómica (AFM) en la agregación de $H\gamma D$	21
Figura 13. Mecanismo propuesto para la agregación de $H\gamma D$, a través de intermediarios parcialmente plegados.....	22
Figura 14. Efecto de agregación de γ -cristalinas inducida por cobre.....	24
Figura 15. Efecto de los iones Cu^{2+} sobre la estructura y el desplegamiento térmico de γ -cristalinas.....	25
Figura 16. Efecto de los iones Cu^{2+} en la agregación, estructura y el desplegamiento térmico de los dominios aislados de la cristalina $H\gamma D$	26
Figura 17. Importancia de los residuos de cisteína en la agregación de $H\gamma D$ inducida por cobre.....	28
Figura 18. Efecto de agregación de γ -cristalinas inducida por zinc.....	29
Figura 19. Efecto de los iones Zn^{2+} sobre la estructura y el desplegamiento térmico de $H\gamma D$	30
Figura 20. Ensayos de turbidez sobre el efecto de los iones zinc y cobre en la inducción de agregación de $H\gamma D$ a 37 °C, de manera dependiente del tiempo.....	30
Figura 21. Cambios conformacionales de $H\gamma D$ inducidos por iones metálicos, determinados por RMN.....	31
Figura 22. Residuo His22 en $H\gamma D$	32
Figura 23. Importancia del residuo His22 en la agregación de $H\gamma D$ inducida por zinc.....	32
Figura 24. Efecto de los metales pesados en la inducción de agregación de γ -cristalinas.....	33
Figura 25. Efecto de los iones Hg^{2+} en la estructura y el desplegamiento térmico de $H\gamma C$ y $H\gamma S$	34
Figura 26. Termograma de CDB obtenido para proteínas irreversibles y la dependencia de la T_m con respecto a la velocidad de barrido.....	37
Figura 27. Gráfico de Arrhenius.....	39
Figura 28. Experimento de CTI típico.....	40
Figura 29. Desnaturalización térmica de $H\gamma C$, $H\gamma D$ y $H\gamma S$ por CDB.....	43
Figura 30. Gráfico de Arrhenius de γ -cristalinas.....	44

Figura 31. Ejemplos de la relación entre la energía de activación (E_{act}) y la constante de velocidad (k) a 37 °C.....	46
Figura 32. Estabilidad cinética de los dominios aislados N- y C-terminal de H γ D.....	48
Figura 33. Estabilidad cinética de H γ D WT y H γ D H22Q.....	50
Figura 34. Estabilidad cinética de H γ D y sus dominios aislados N- y C-terminal en presencia de cobre	52
Figura 35. Interacción de H γ D y sus dominios aislados con cobre.....	56
Figura 36. Estabilidad cinética de H γ D H22Q en presencia de cobre, y su interacción.	59
Figura 37. El mecanismo de agregación de H γ D inducida por cobre involucra una especie parcialmente plegada.	61
Figura 38. Estabilidad cinética de γ -cristalinas en presencia de cobre.....	63
Figura 39. Interacción de γ -cristalinas con cobre.....	65
Figura 40. Interacción de H γ S con cobre reportada.	67
Figura 41. Estabilidad cinética de H γ D y sus dominios aislados N- y C-terminal en presencia de zinc, y su interacción.	69
Figura 42. Estabilidad cinética de H γ D H22Q en presencia de zinc, y su interacción.	72
Figura 43. Estabilidad cinética de H γ C y H γ S en presencia de zinc, y su interacción.....	73
Figura 44. Estabilidad cinética de H γ D y sus dominios aislados N- y C-terminal en presencia de mercurio.....	75
Figura 45. Interacción de H γ D y sus dominios aislados N- y C-terminal con mercurio.....	78
Figura 46. Estabilidad cinética de H γ D H22Q en presencia de mercurio, y su interacción.	80
Figura 47. Estabilidad cinética de H γ C y H γ S en presencia de mercurio.	84
Figura 48. Interacción de γ -cristalinas con mercurio..	86
Figura 49. Valores termodinámicos obtenidos de la interacción de γ -cristalinas con mercurio.....	88
Figura 50. Estabilidad cinética de γ -cristalinas en ausencia y presencia de cobre y mercurio.....	90
Figura 51. Interacción de γ -cristalinas con iones metálicos.....	91
Figura 52. Papel del residuo His22 de H γ D en la interacción con iones metálicos implicados en agregación	91

Lista de Tablas

Tabla 1. Niveles de proteína soluble e insoluble y de concentraciones de cobre y zinc en lentes normales, con catarata cortical y catarata nuclear.....	23
Tabla 2. Valores de T_m en °C para los dominios aislados N- y C-terminal de H γ D, H γ C y H γ S en presencia de iones Cu ²⁺	27
Tabla 3. Valores obtenidos a partir de los gráficos de Arrhenius de H γ C, H γ D y H γ S.	47
Tabla 4. Valores obtenidos a partir de los gráficos de Arrhenius de H γ C, H γ S, H γ D, H γ D C-terminal (H γ D-CT), H γ D N-terminal (H γ D-NT) y H γ D H22Q.....	50
Tabla 5. Valores obtenidos a partir de los gráficos de Arrhenius de H γ D y sus dominios aislados C- (H γ D-CT) y N-terminal (H γ D-NT) en ausencia y presencia de cobre.....	54
Tabla 6. Resultados obtenidos a partir del ajuste de los experimentos de CTI de H γ D y sus dominios aislados H γ D-CT y H γ D-NT con cobre.....	56
Tabla 7. Valores obtenidos a partir de los gráficos de Arrhenius de H γ D WT y H γ D H22Q en ausencia y presencia de cobre.....	57
Tabla 8. Resultados obtenidos a partir del ajuste de los experimentos de CTI de H γ D WT y H γ D H22Q con cobre.	59
Tabla 9. Valores obtenidos a partir de los gráficos de Arrhenius de H γ C, H γ D y H γ S en ausencia y presencia de cobre.....	64
Tabla 10. Resultados obtenidos a partir del ajuste de los experimentos de CTI de H γ C y H γ S con cobre.....	66
Tabla 11. . Resultados obtenidos a partir del ajuste de los experimentos de CTI de MOPS y H γ D con zinc.	70
Tabla 12. . Resultados obtenidos a partir del ajuste de los experimentos de CTI de H γ D WT y H γ D H22Q con zinc.	72
Tabla 13. Valores obtenidos a partir de los gráficos de Arrhenius de H γ D y sus dominios aislados C- (H γ D-CT) y N-terminal (H γ D-NT) en ausencia y presencia de mercurio..	77
Tabla 14. Resultados obtenidos a partir del ajuste de los experimentos de CTI de H γ D y sus dominios aislados H γ D-CT y H γ D-NT con mercurio.....	79
Tabla 15. Valores obtenidos a partir de los gráficos de Arrhenius de H γ D WT y H γ D H22Q en ausencia y presencia de mercurio.....	81
Tabla 16. Resultados obtenidos a partir del ajuste de los experimentos de CTI de H γ D WT y H γ D H22Q con mercurio.....	82
Tabla 17. Valores obtenidos a partir de los gráficos de Arrhenius de H γ C y H γ S, en ausencia y presencia de cobre y mercurio..	85
Tabla 18. Resultados obtenidos a partir del ajuste de los experimentos de CTI de H γ C y H γ S con mercurio.....	87

Lista de Acrónimos, Abreviaciones y símbolos

A	Absorbencia
AFM	Microscopía de fuerza atómica
c	Concentración
CDB	Calorimetría diferencial de barrido
CO ₂	Dióxido de carbono
C _p	Capacidad calorífica a presión constante
C-terminal	Dominio Carboxilo terminal
CTI	Calorimetría de titulación isotérmica
CuSO ₄	Sulfato de cobre
D	Estado desnaturalizado
DC	Dicroísmo circular
DLS	Dispersión de luz dinámica
E _{act}	Energía de activación
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EPR	Resonancia paramagnética de electrón
ES	Equilibrio estequiométrico
F	Estado final
G	Energía libre de Gibbs
H	Entalpía
HgCl ₂	Cloruro de mercurio
H γ C	Cristalina gamma-C de humano
H γ D	Cristalina gamma-D de humano
H γ D-CT	Dominio C-terminal de H γ D
H γ D-NT	Dominio N-terminal de H γ D
H γ S	Cristalina gamma-S de humano
k	Constante de Boltzmann
k	Constante de velocidad de desplegamiento
K _{eq}	Constante de equilibrio
K	Constante de asociación
l	Paso óptico
M	Metal
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico
N	Estado nativo
N _A	Número de Avogadro
NaCl	Cloruro de sodio
N-terminal	Dominio Amino terminal
P	Proteína
PDB ID	Número de identificación del <i>Protein Data Bank</i>
pH	Potencial de hidrógeno
pK _a	Potencial de disociación
Q	Calor
R	Constante de los gases
R ²	Coefficiente de determinación

RMN	Resonancia Magnética Nuclear
S	Entropía
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poli-acrilamida en condiciones desnaturalizantes
sHsp	Proteína pequeña de choque térmico
SI	Sitios independientes
T	Temperatura
$t_{1/2}$	Tiempo de vida media
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TIM	Triosa fosfato isomerasa
T_m	Temperatura de transición
UV	Ultravioleta
W	Número de estados accesibles
WT, <i>wild type</i>	Proteína silvestre
XAS	Espectroscopía de absorción de rayos-X
ZLO	Zona libre de organelos
ZnSO ₄	Sulfato de zinc
ΔC_p	Cambio en capacidad calorífica a presión constante
ΔG	Cambio en la energía libre de Gibbs
ΔH	Cambio en entalpía
ΔQ	Calor liberado o absorbido
ΔS	Cambio en entropía
ΔT_m	Diferencia en temperatura de transición
ϵ	Coefficiente de extinción molar
σ	Incertidumbre
χ^N	Fracción mol del estado nativo

1 Introducción

Las proteínas poseen diversas funciones esenciales en todos los organismos, desempeñando desde papeles estructurales hasta aquellas actividades especializadas en procesos biológicos complejos (por ejemplo, metabolismo, señalización celular, conversión de energía, etc.). Para llevar a cabo su función, la mayoría de las proteínas debe adoptar una estructura tridimensional específica, y que dicha conformación sea lo suficientemente estable.

En este sentido, la estabilidad de las proteínas puede ser interpretada en términos termodinámicos y cinéticos. Desde el punto de vista termodinámico, el estado nativo de una proteína corresponde a la conformación de mínima energía del sistema. A su vez, la estabilidad cinética comprende el tiempo promedio que una proteína mantiene su estructura y función, y está relacionada con la barrera de energía entre el estado nativo y los estados no funcionales.

En la naturaleza existen proteínas con una estabilidad descomunal y con propiedades fisicoquímicas muy interesantes. En este grupo podemos encontrar a las γ -cristalinas, proteínas presentes en el lente o cristalino de los vertebrados. La función principal de estas proteínas es brindar transparencia y el correcto índice de refracción para un adecuado funcionamiento del cristalino. En el lente del ser humano, podemos encontrar 3 principales tipos de γ -cristalinas la C, D y S (H γ C, H γ D y H γ S). Estas proteínas se encuentran en células carentes de organelos y de recambio proteico, por ello deben permanecer en su estado nativo durante toda la vida del organismo, es decir deben ser muy estables. A la fecha, diferentes grupos de investigación han analizado el carácter termodinámico de su estabilidad, sin embargo, aún no se desconoce su aspecto cinético en condiciones fisiológicas.

A pesar de su gran estabilidad, la constante exposición a agentes perjudiciales, como radiación UV y estrés oxidativo, produce alteraciones estructurales en estas proteínas que pueden causar su inestabilidad, desplegamiento y finalmente agregación. La formación de

complejos macromoleculares de alto peso molecular conlleva a una deficiencia en la agudeza visual, ya que evita el paso y enfoque de la luz en la retina, dando como resultado el desarrollo de cataratas. Este padecimiento afecta a un gran número de personas (principalmente de la tercera edad), siendo la principal causa de ceguera en el mundo. Aunque esta enfermedad puede ser tratada por remoción quirúrgica de todo el lente, este método es invasivo, costoso económicamente y se realiza únicamente en casos severos de cataratas.

Aunado a esto, se ha comprobado que los iones metálicos Cu^{2+} , Zn^{2+} y Hg^{2+} inducen la agregación de $\text{H}\gamma\text{C}$, $\text{H}\gamma\text{D}$ y $\text{H}\gamma\text{S}$, y así pueden estar involucrados en el desarrollo de cataratas. Sin embargo, no se sabe cómo es que estas cristalinas interactúan con cobre, zinc y mercurio, y de este modo se desconoce cuál es el mecanismo exacto de inducción de la agregación

En este trabajo, se realizó un análisis calorimétrico de las γ -cristalinas de humano en ausencia y presencia de iones metálicos. Empleando la técnica de calorimetría diferencial de barrido (CDB) se buscó determinar la estabilidad cinética de las cristalinas $\text{H}\gamma\text{C}$, $\text{H}\gamma\text{D}$ y $\text{H}\gamma\text{S}$, así como de los dominios aislados N- y C-terminal de $\text{H}\gamma\text{D}$, y de la mutante $\text{H}\gamma\text{D H22Q}$ (se sabe que His22 es responsable, al menos parcialmente, de la agregación de $\text{H}\gamma\text{D}$ inducida por zinc). De igual modo, mediante calorimetría de titulación isotérmica (CTI) se pretendió averiguar cómo ocurre la interacción entre las γ -cristalinas de humano y los iones metálicos implicados en agregación.

2. Antecedentes

2.1 Antecedentes Generales

El lente o cristalino es uno de los principales constituyentes del glóbulo ocular, se encuentra ubicado tras el iris y delante del humor vítreo (**Figura 1A**). Su función principal consiste en permitir el correcto paso de la luz y su enfoque hacia la retina, la cual es de gran importancia para el adecuado funcionamiento del ojo, ya que nos faculta de poder reconocer un sinnúmero de imágenes del mundo que nos rodea. Esto gracias a que el lente posee características únicas como transparencia y flexibilidad, así como la propiedad de ser biconvexo, incoloro y avascular.^{1,2}

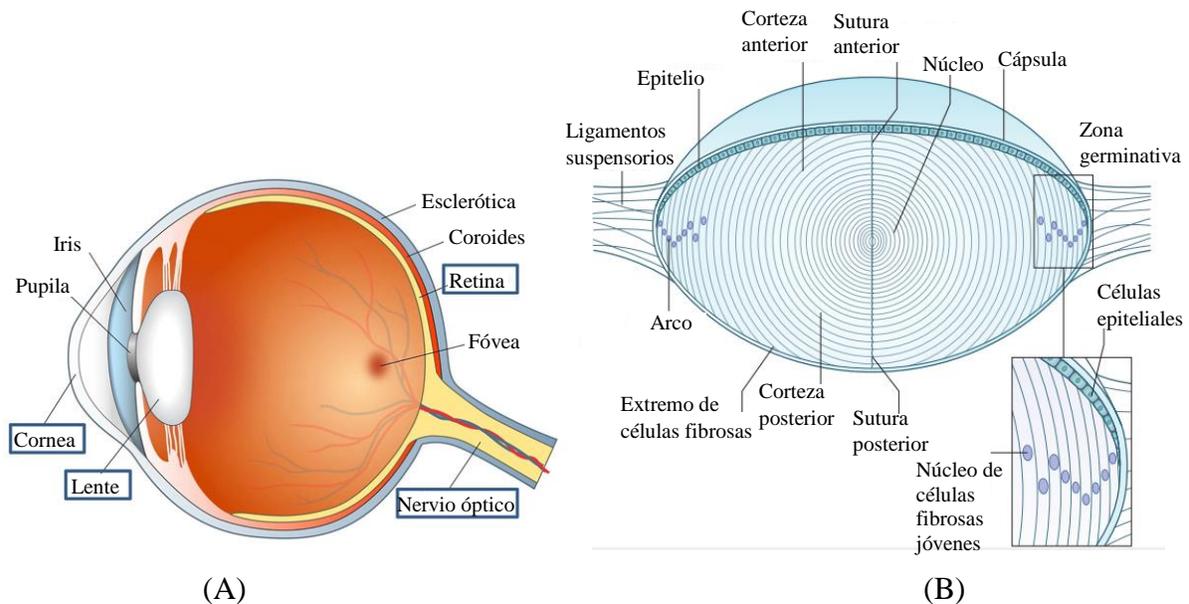


Figura 1. Lente en el humano. Diagrama del glóbulo ocular (A) y el cristalino (B). Modificada de ref. 2.

Para llevar a cabo su función, el cristalino cumple con dos requisitos principales: transparencia y un alto índice de refracción,³ los cuales se consiguen gracias a la morfología y composición de su estructura celular. Dicha composición celular se representa por dos tipos

de células epiteliales especializadas; una población de células cuboides forma una lámina que cubre la parte superficial anterior, mientras que el interior está formado de varias capas concéntricas de células fibrosas alargadas, las cuales degradan sus organelos y se diferencian progresivamente (**Figura 1B y 2**).⁴

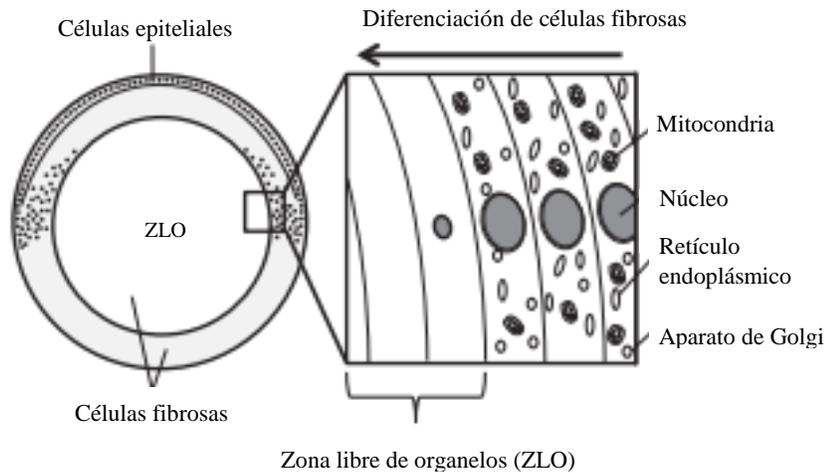


Figura 2. Tipos de células en el cristalino. Modificada de ref. 4.

El citoplasma de dichas células fibrosas alargadas se encuentra compuesto principalmente de agua y de proteínas llamadas cristalinas, las cuales están presentes en una alta concentración (~ 0.32 g/mL, en humano). A causa de una distribución gradual y de las interacciones de corto alcance entre estas proteínas, se consigue la transparencia y el índice de refracción del cristalino.^{3,5} En todos los vertebrados las cristalinas se dividen en dos principales familias: α y $\beta\gamma$, que constituyen el 90% de las proteínas solubles del lente ocular,⁵ con abundancia relativa dependiendo de la especie.⁶

La carencia de organelos, y así de metabolismo en las células fibrosas alargadas, conlleva a que estas cristalinas deban funcionar por el resto de la vida del organismo sin ningún tipo de recambio.⁷ Es por ello que deben ser muy estables y mantenerse solubles a pesar de su alta concentración, y su exposición continua a luz UV y a estrés oxidativo. Sin embargo, no siempre es posible evitar los daños a su estructura, resultado de modificaciones indeseables, que eventualmente pueden causar su inestabilidad, desplegamiento y finalmente agregación. Entre las alteraciones que producen la presencia de estados insolubles de las

cristalinas, las que poseen mayor relevancia son la desamidación de glutamina y asparagina (que introduce una carga negativa y altera la estructura de la proteína), la oxidación de metionina, la ruptura de cadena principal y la formación de puentes disulfuro.⁸ Además, es posible que también se encuentren otras alteraciones, por ejemplo, la modificación de lisinas por carbamilación y glicación, la formación de entrecruzamientos de lisinas y argininas, así como la fosforilación, metilación, acetilación, racemización e isomerización de residuos.^{6,9,10}

A su vez, la formación de complejos macromoleculares, debido a la agregación proteica en el lente, produce una deficiencia en la agudeza visual al impedir el paso y enfoque de la luz en la retina, dando como resultado el desarrollo de cataratas.¹¹

Las cataratas son un padecimiento presente en un gran número de personas (generalmente de la tercera edad) alrededor del mundo; consisten en una opacidad de la lente y se pueden manifestar en diversos fenotipos, dependiendo de la morfología y de la distribución de dicha opacidad (**Figura 3**).¹² Se sabe que las cataratas son la principal causa de ceguera en el mundo, afectando al 45% de la población entre 55-64 años, al 75% de personas entre 65-74 y cerca del 88% en personas mayores a 75 años. Esta enfermedad puede tener diferentes causas, principalmente las mutaciones congénitas en la secuencia de aminoácidos de las cristalinas, y las (anteriormente mencionadas) modificaciones postraduccionales en estas proteínas que incrementan con la edad del individuo.

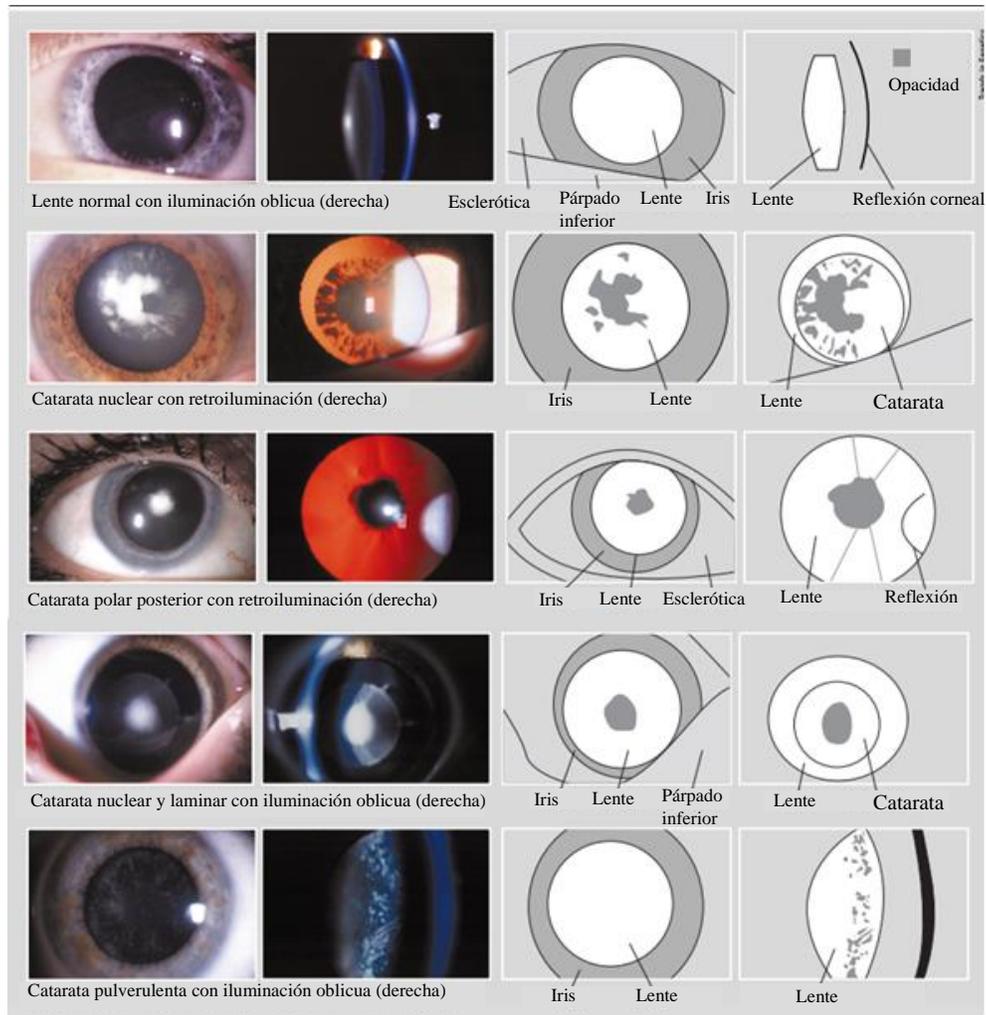


Figura 3. Variaciones en morfología y distribución de la opacidad de la lente en cataratas congénitas. Modificada de ref. 12.

En esencia, las cataratas relacionadas al envejecimiento derivan de dos principales rutas: el desplegamiento de proteínas, que resulta en agregación proteica y/o asociación, y la interacción alterada entre cristalinas en estado nativo, resultando en una disminución en su solubilidad.³ Aunque esta enfermedad puede ser tratada por remoción quirúrgica de todo el lente, este método es invasivo, costoso económicamente y se realiza únicamente en casos severos de cataratas.

2.1.1 Cristalinas

2.1.1.1 Cristalinas α

Las cristalinas α comprenden un grupo de oligómeros proteicos, compuestos de dos tipos de subunidades con pesos moleculares de ~ 20 kDa y una estructura predominantemente de hoja β (**Figura 4**), en mamíferos a estas subunidades se les conocen con el nombre de αA y αB .^{3,6,13}

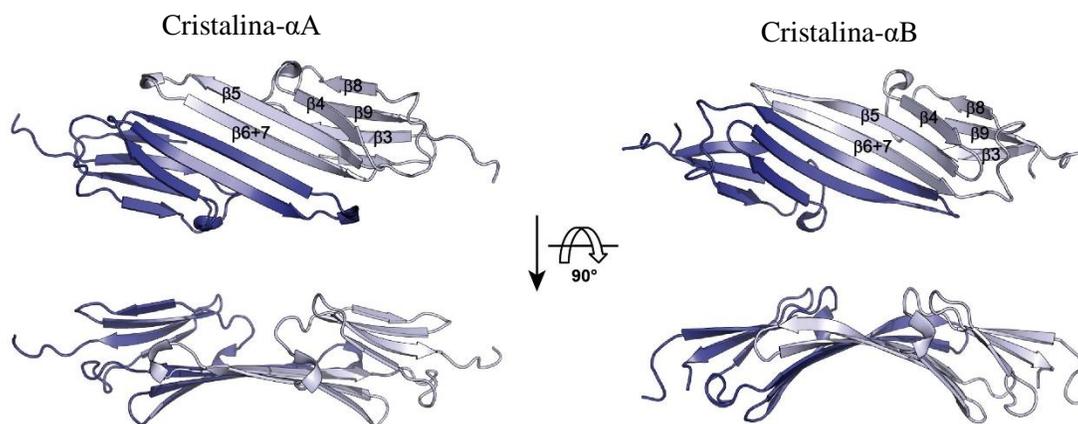


Figura 4. Estructura de las subunidades de las cristalinas α : αA y αB . Modificada de ref. 13

Estas proteínas pertenecen a la familia de proteínas pequeñas de choque térmico (sHsp), y se encuentran tanto en forma de homo- y hetero-oligómeros de diferente estequiometría y propiedades, con un tamaño promedio 800 kDa.^{3,6,13}

En humano, las cristalinas αA y αB poseen una secuencia de 173 y 175 aminoácidos, respectivamente, con un 57% de identidad de secuencia entre ellas. La expresión de αA se da prácticamente sólo en el lente, ya que en otros tejidos su concentración apenas es detectable, mientras que αB también se expresa en diferentes tejidos del organismo, siendo abundante en cerebro, corazón y músculo. Su síntesis es mayor durante la diferenciación de las células epiteliales del lente, pero se siguen sintetizando durante el desarrollo del cristalino hasta posiblemente estar distribuidos homogéneamente en todo el lente.³

Las cristalinas α poseen diversas funciones, tanto estructurales como reguladoras, por ejemplo, se sabe que son importantes para mantener la integridad del citoesqueleto, para prevenir apoptosis, regulación de la diferenciación celular, etc. Pero, en especial se relaciona con una función como chaperonas para prevenir la agregación de las cristalinas β y γ .⁵

2.1.1.2 Cristalinas $\beta\gamma$

Las cristalinas de la familia $\beta\gamma$ comprenden más del 50% de las cristalinas en el lente de los vertebrados.¹⁴ Originalmente se pensó que pertenecían a diferentes familias, pero después (gracias a la secuenciación y determinación de sus estructuras) se agruparon en esta misma familia, ya que comparten una estructura similar. Dicha estructura está descrita por cuatro motivos de llave griega o greca (*Greek key*, **Figura 5A**) que consiste en cuatro hebras beta dispuestas de manera anti-paralela (**Figura 5B**). En las cristalinas $\beta\gamma$ estos motivos están organizados en dos dominios compactos con dos motivos en cada uno (**Figura 5C**), y ambos dominios se conectan por un péptido de 3 a 4 aminoácidos (**Figura 5D**).^{15,16}

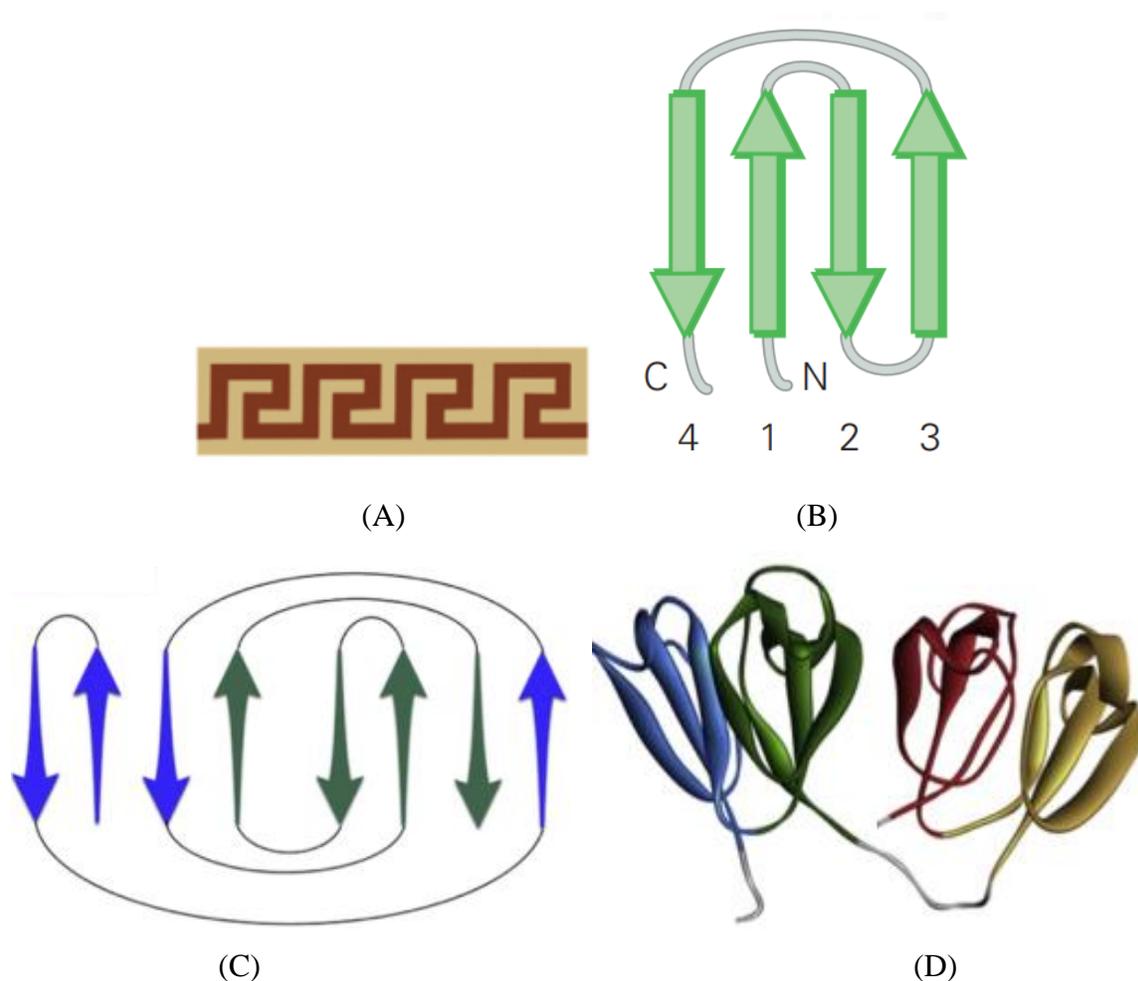


Figura 5. Motivo de llave griega en cristalinas. (A) Representación de la llave griega o greca (*Greek key*). (B) Diagrama de un motivo de llave griega. (C) Diagrama del arreglo de las hojas β en el motivo doble de llave griega en cristalinas. (D) Diagrama de una cristalina, con los motivos en diferentes colores. Modificadas de ref. 16 y 17.

Su secuencia de aminoácidos es inusualmente rica en residuos aromáticos y residuos con azufre. El núcleo de cada dominio es altamente hidrofóbico y con una superficie altamente cargada, pero con un punto isoeléctrico para cristalinas γ cercano al pH neutro.¹⁷ La principal diferencia estructural entre cristalinas β y γ es la presencia de extensiones en los extremos N- y C-terminal, y una cadena ligeramente más larga (1 o 2 aminoácidos) en el péptido conector (*linker*) entre los dominios en las cristalinas β .^{15,18}

En el caso de las cristalinas β , se encuentran generalmente en forma de homo- o heterodímeros (en ocasiones oligómeros que van desde 50 a 200 kDa) y se componen de siete diferentes tipos de subunidades (de 22 a 28 kDa), en mamíferos son $\beta A1$, $\beta A2$, $\beta A3$, $\beta A4$, $\beta B1$, $\beta B2$ y $\beta B3$, donde la B y A indican que son polipéptidos básicos o ácidos, respectivamente (**Figura 6A**).³

Por otro lado, las cristalinas γ , las cuales normalmente no forman agregados, se encuentran como monómeros y existen siete distintos tipos, todas con un peso molecular alrededor de 20 kDa; en mamíferos se nombran como γA , γB , γC , γD , γE , γF y γS , pero su expresión difiere en cada organismo (**Figura 6B**).^{3,6}

Esta diferencia en la estructura supramolecular entre β y γ (dímeros y monómeros) se ha adjudicado a la ligera extensión de los extremos N- y C-terminal en las cristalinas β , ya que esta parece ser la región de unión en la dimerización (**Figura 6A**).

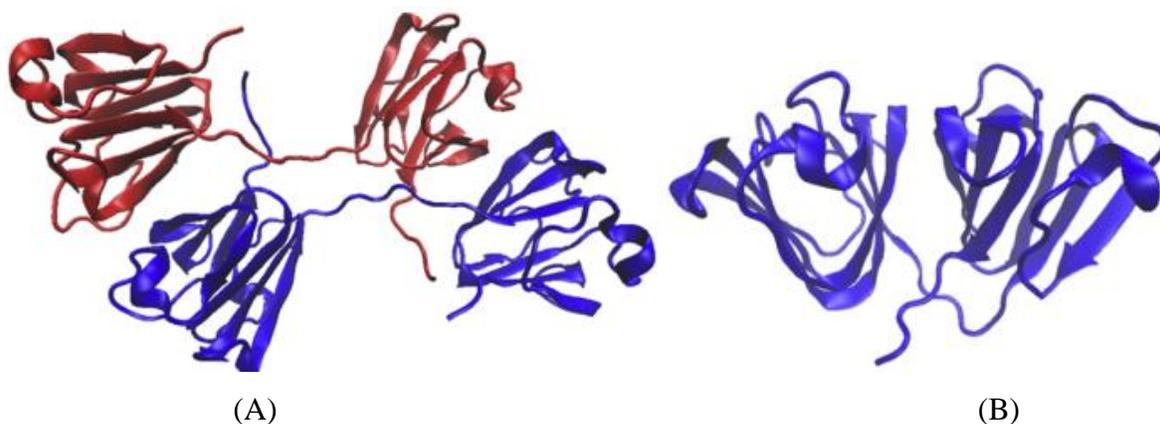


Figura 6. Cristalinas $\beta\gamma$. Estructuras de cristalina H β B2, PDB ID 1ytq (A) y cristalina H γ D, PDB ID 1hk0 (B). Tomada de ref. 17

Los genes de esta familia $\beta\gamma$ son específicos de células fibrosas y su expresión principalmente tiene lugar en estadios tempranos del desarrollo, y llegan a alcanzar altas concentraciones (> 400 mg/mL en mamíferos, y > 1000 mg/mL en algunos peces). El nivel en el que se expresan varía mucho entre especies y se correlaciona inversamente con el contenido de agua en núcleo del cristalino.³ En su mayoría, están en la porción central del lente, y, específicamente, la región nuclear embrionaria es rica en γ cristalinas.¹⁵

2.1.1.2.1 Cristalinias H γ C, H γ D y H γ S

En el lente humano se encuentran presentes las cristalinias H γ C, H γ D y H γ S, no obstante, también dentro del genoma se localizan pseudogenes para γ E y γ F. Las secuencias de aminoácidos de estas tres proteínas homólogas H γ C, H γ D y H γ S son muy similares (**Figura 7A**), entre H γ C y H γ D hay 72% de identidad y 83% similitud, entre H γ D y H γ S existe 50% de identidad y 69% de similitud, mientras que entre H γ C y H γ S hay 53% de identidad y 70% similitud.¹⁹

H γ S posee una relación génica relativamente distante con respecto a las demás cristalinias γ , pese a ello, su relación estructural es alta con las demás cristalinias γ . En la **Figura 7B** se puede observar una superposición de las estructuras tridimensionales de las tres cristalinias H γ C, H γ D y H γ S, donde claramente se aprecia su alto grado de similitud entre ellas.

```

humanCRYGC  ---MGKITFYEDRAFQGRSYETTTDCPNLQPYFSRCNSIRVESGCWMLYERPNYGGQGY 56
humanCRYGD  ---MGKITLYEDRGFQGRHYECSSDHPNLQPYLSRCNSARVDSGCWMLYEQPNYSGLQY 56
humanCRYGS  MSKTGTKITFYEDKNFQGRRYDCCDCADFHTYLSRCNSIKVEGGTWAVYERPNFAGYMY 60

(A) humanCRYGC  LLRRGEYPQWMGLSDSIRSCCL--IPQTVSHRLRLYEREDHKGLMMELSEDCPSIQD 114
humanCRYGD  FLRRGDYADHQWMGLSDSVRSCRL--IPHSGSHRIRLYEREDYRGQMIEFTEDCSCLQD 114
humanCRYGS  ILPQGEYPEQRWMGLNDRLSSCRAVHLPSGGQYKIQIFEKGDFSGQMYETTEDCPSIME 120

humanCRYGC  RFHLSEIRSLHVLEGCWVLYELPNYGRQYLLRPQEYRRCQDWGAMDAKAGSLRRVVDLY 174
humanCRYGD  RFRFNEIHSLNVLEGSWVLYELSNYGRQYLLMPGDYRRYQDWGATNARVGSLRRVVDDFS 174
humanCRYGS  QFHMREIHSCKVLEGVWIFYELPNYGRQYLLDKKEYRKPIDWGAASPAVQSFRRIVE-- 178

```

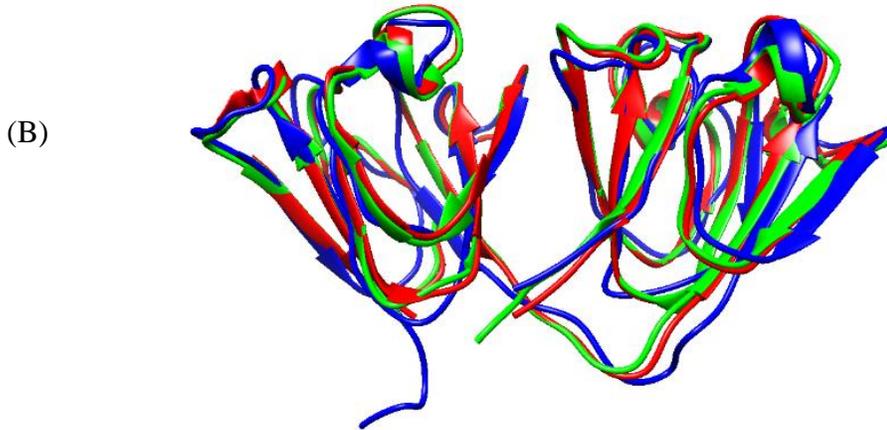


Figura 7. Cristalinas H γ C, H γ D y H γ S. (A) Alineamiento de secuencias de H γ C, H γ D y H γ S. Los 4 motivos de llave griega se muestran en diferentes colores, tomada de ref. 15. (B) Superposición de las estructuras 3D de las cristalinas H γ C (verde, PDB ID 2nbr), H γ D (rojo, PDB ID 1hk0) y H γ S (azul, PDB ID 2m3t).

La cristalina H γ S posee una expresión tardía en el desarrollo (después del nacimiento), y se encuentra de manera abundante en la corteza del lente, mientras que las cristalinas H γ C y H γ D se expresan en etapas tempranas del desarrollo embrionario (como la mayoría de otras cristalinas) y, por ello, principalmente se encuentran en la región nuclear del lente. Esta distribución se correlaciona con una disminución del índice de refracción desde el centro a la corteza, lo que genera un gradiente que permite la correcta función del lente.²⁰⁻²²

2.1.2 Plegamiento y Estabilidad de proteínas

Desde mediados del siglo pasado se ha intentado identificar la manera en la que las proteínas se pliegan para dar una conformación específica, y así poder predecir su estructura tridimensional a partir de una simple secuencia de aminoácidos. Sin embargo, en la actualidad aún no es posible predecir con certeza la conformación espacial de una proteína, y mucho menos la actividad catalítica, a partir de su secuencia de aminoácidos.

Diversos trabajos se han enfocado en este propósito, de los más importantes inicialmente fueron los que llevaron a cabo Christian B. Anfinsen y colaboradores, al comienzo de los años 60's, ellos demostraron que una proteína puede plegarse de manera reversible, lo que implica que la estructura nativa es un estado termodinámicamente estable, y está en un mínimo global de su energía libre.²³ Posteriormente Cyrus Levinthal propuso que si existieran muchas posibilidades conformacionales para una proteína, el tiempo que le tomaría para encontrar su conformación nativa de manera aleatoria sería mucho mayor a la edad del universo.²⁴ Con los años esto fue conocido como la "Paradoja de Levinthal", la cual concluye que debe haber vías de plegamiento específicas.

Con ambos estudios se concluyó que se necesitaba que el plegamiento de una proteína procediera hacia un mínimo global y que además esto ocurriera en tiempos cortos. Ambos enfoques se conocen como control termodinámico y cinético del plegamiento.

2.1.2.1 Plegamiento y desnaturalización de una proteína

La estabilidad de proteínas puede ser definida en términos de la preservación de contactos atómicos en el estado nativo dentro de la conformación tridimensional.¹⁷ Estos contactos se encuentran mediados por diferentes tipos de interacciones no covalentes, de las cuales las más importantes son los puentes de hidrógeno, interacciones de van der Waals e interacciones electrostáticas.

Las interacciones electrostáticas en una proteína se producen entre cargas netas presentes en las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos ácidos y básicos, y en sus extremos C- y N-terminal. Su fuerza está determinada por la ley de Coulomb, y así es inversamente proporcional a la distancia entre las cargas. A pH neutro, cada uno de los residuos de lisina y arginina tiene una carga positiva neta de +1, mientras que los residuos de

aspartato y glutamato son cargados negativamente (-1). En cambio, los residuos de histidina, que tienen un pK_a cercano a 7, pueden estar cargados positivamente o ser neutros, dependiendo de su ambiente y del pH de la solución. Interacciones entre las cadenas laterales de aminoácidos con cargas opuestas son conocidas como interacciones iónicas, y la interacción particularmente favorable es referida como interacción de par iónico.¹⁶ Sin embargo, se ha considerado que estas interacciones juegan un papel menor en el plegamiento de las proteínas, debido a que los aminoácidos responsables de estas interacciones no son muy abundantes en diversas proteínas.

A diferencia de las interacciones electrostáticas de cargas formales, los puentes de hidrógeno y las fuerzas de van der Waals se generan por la presencia de dipolos permanentes y dipolos transitorios, respectivamente.

Lo puentes de hidrógeno son un tipo de interacción dipolo-dipolo, donde dos átomos electronegativos, como oxígeno y nitrógeno, comparte un hidrógeno, denotado comúnmente como $X - H \cdots Y$, indicando que el átomo de hidrógeno se encuentra unido covalentemente a uno de los átomos electronegativos, mientras que por fuerza fundamentalmente electrostática se comparte con otro átomo electronegativo. Aunque esta interacción no es tan fuerte como la interacción electrostática entre dos cargas netas, el gran número de interacciones de este tipo que se pueden dar en las proteínas representa una contribución muy importante en la estabilidad total. Además, una característica relevante es que estos puentes de hidrógeno permiten una orientación adecuada de los residuos proteicos que faculta a la cadena polipeptídica de adoptar una topología específica.²⁵

Finalmente, las fuerzas de van der Waals comprenden varios tipos de interacciones, tanto atractivas como repulsivas, y se diferencian de las demás debido a que se originan por la presencia de fluctuaciones de la densidad electrónica de partículas cercanas, que generan dipolos transitorios que interaccionan entre sí. De importancia en el plegamiento de proteínas son las fuerzas de dispersión de London, que se establecen entre dipolos inducidos temporales. Estas interacciones están presentes entre todos los tipos de átomos y moléculas, incluso las totalmente neutras tal como helio, CO_2 e hidrocarburos.²⁶

Las proteínas pueden ser desnaturalizadas al cambiar las condiciones fisicoquímicas del medio, usualmente al aumentar la temperatura, con un agente químico (como urea o cloruro de guanidinio), cambiando el pH o aplicando presión (**Figura 8**).¹⁶

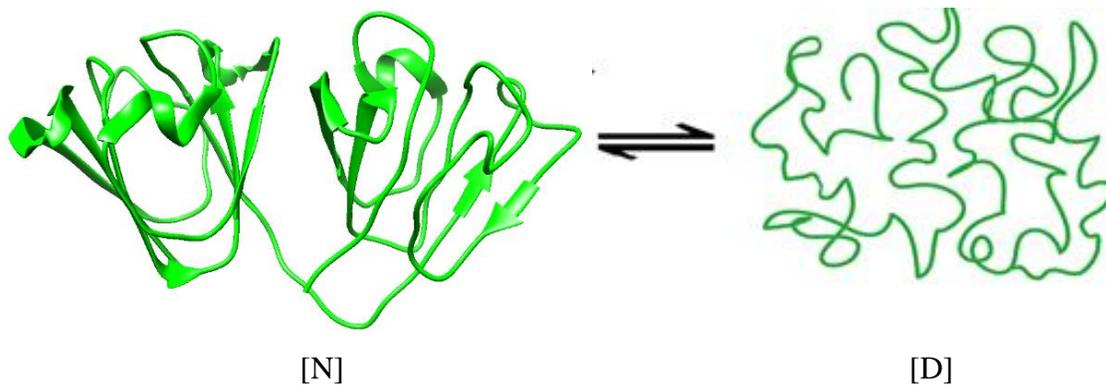


Figura 8. Proceso de desnaturalización de una proteína. N es el estado nativo (en este caso, la cristalina H γ D, PDB ID 1hk0) y D es el estado desnaturalizado (o desplegado). Modificada de ref. 27.

El estado desnaturalizado tiene alto grado de libertad conformacional, es decir, no es una estructura rígida, sino que segmentos individuales de una cadena polipeptídica pueden moverse de manera relativa uno del otro, y los grupos pueden rotar sobre enlaces simples; se puede considerar como una colección de estados de energías muy similares que están en equilibrio unos con otros. El estado desnaturalizado tiene una entropía configuracional inherentemente alta a partir de la fórmula de Boltzmann $S = k \ln W$, donde W es el número de estados accesibles y k es la constante de Boltzmann (R/N_A). En contraste, el estado nativo es conformacionalmente restringido (aunque no rígido), y tiene una entropía menor. Así, al plegarse una proteína pierde entropía, la cual debe ser balanceada por una ganancia de entalpía para que la energía libre favorezca el estado plegado. La entalpía de empaquetamiento de cadenas laterales en el estado nativo es favorable y compensa la pérdida de entropía.²⁸

Sin embargo, no sólo la termodinámica de la cadena polipeptídica *per se* contribuye a los valores observables de ΔH y ΔS , sino también la termodinámica del disolvente: agua, que contribuye con la entropía de la liberación de moléculas de agua durante el plegamiento y a la capacidad calorífica del estado desplegado.²⁸

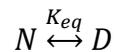
Algunas proteínas pueden presentar reversibilidad a la desnaturalización al volver a plegarse cuando regresan a condiciones favorables, pero hay otras que sufren desnaturalización irreversible, por ejemplo, al desnaturalizarse se pueden agregar y precipitar, lo que imposibilita que se vuelva a plegar al regresar a las condiciones iniciales.

2.1.2.2 Estabilidad

La estabilidad de una proteína tiene tanto aspectos termodinámicos como cinéticos. Desde el punto de vista termodinámico, el estado nativo de una proteína corresponde a la conformación de mínima energía del sistema, estando en equilibrio con los estados parcial y totalmente desplegados, y donde el plegamiento de la proteína cumple con el criterio de espontaneidad. A su vez, la estabilidad cinética puede ser entendida en términos del tiempo promedio que una proteína mantiene su estructura y su función, y está relacionada con la barrera de energía entre el estado nativo y los estados no funcionales.^{27,29}

2.1.2.2.1 Estabilidad Termodinámica

El análisis de la estabilidad termodinámica de una proteína conlleva a determinar las diferencias en las características termodinámicas (energía libre de Gibbs (ΔG), entalpía (ΔH) y entropía (ΔS)) entre el estado nativo y el estado desnaturalizado de una proteína. Para ello, el proceso de desnaturalización debe ser reversible (es decir, al regresar a las condiciones iniciales después de desnaturalizar una proteína, ésta debe de adoptar nuevamente su conformación nativa), lo que involucra que existe un equilibrio termodinámico entre estados (plegado y desplegado). En el caso más simple, los datos pueden ajustarse a un modelo de dos estados al equilibrio:



Donde N es el estado nativo y D es el estado desplegado, y K_{eq} es la constante de equilibrio, la cual se obtiene mediante:

$$K_{eq} = \frac{[D]}{[N]}$$

K_{eq} se relaciona con el cambio en la energía libre de Gibbs [$\Delta G = G(D) - G(N)$] mediante:

$$\Delta G = -RT \cdot \ln K_{eq}$$

El ajuste conduce a ΔG como una función de algún parámetro del medio, como concentración del desnaturalizante químico o la temperatura. La extrapolación a condiciones fisiológicas generalmente conduce a un valor de ΔG de desplegamiento positivo, lo que indica que K_{eq} es menor a 1 y el equilibrio está desplazado hacia el estado nativo, y así la proteína es termodinámicamente estable a esas condiciones.²⁹

Asimismo, mediante la ecuación de Gibbs-Helmholtz es posible determinar la dependencia del ΔG con respecto a la temperatura, dicha ecuación es:

$$\Delta G(T) = \Delta H \left(1 - \frac{T}{T_m}\right) - \Delta C_p \left[T_m - T + T \ln \left(\frac{T}{T_m}\right)\right]$$

Donde ΔC_p es el cambio en capacidad calorífica a presión constante para el proceso de desnaturalización $N \rightarrow D$, y T_m es la temperatura de transición donde la concentración de N y D es la misma (por lo tanto, $\Delta G(T) = 0$ en la T_m). A partir de este análisis se obtiene lo que se conoce como la curva de estabilidad termodinámica de una proteína, la cual posee un comportamiento como el que se muestra en la **Figura 9**.²⁷

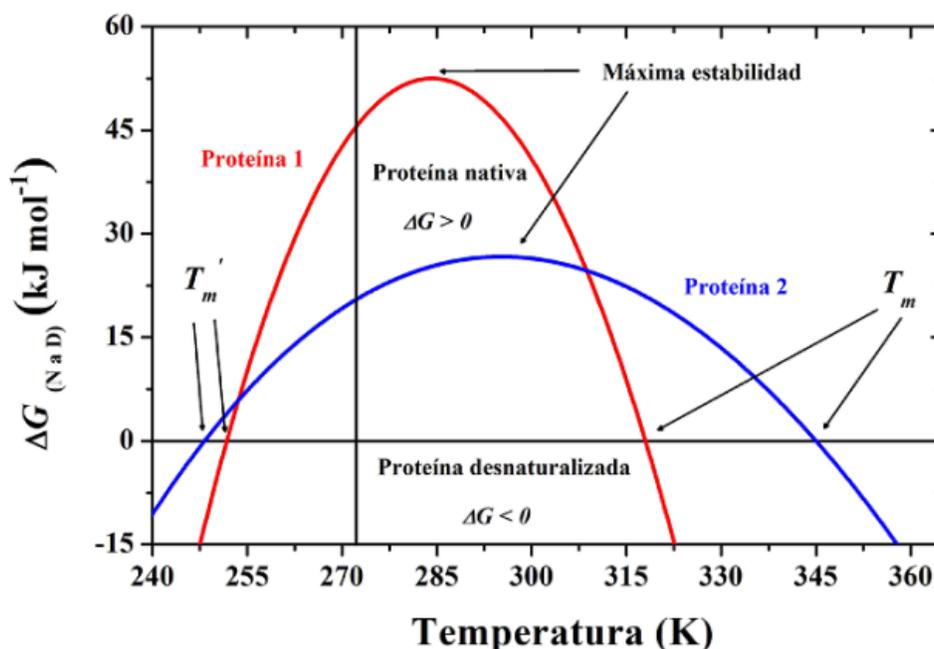


Figura 9. Curva de estabilidad termodinámica. Curva de estabilidad termodinámica para dos proteínas, obtenidas a partir de la ecuación de Gibbs-Helmholtz. El intervalo de temperatura donde el estado nativo es estable es donde el $\Delta G > 0$, mientras que a valores donde el $\Delta G < 0$ es el estado desnaturalizado es favorecido. La temperatura a la cual el valor de ΔG es máximo se conoce como la temperatura de máxima estabilidad. Tomada de ref. 27.

2.1.2.2.2 Estabilidad Cinética

Para que una proteína cumpla su función debe permanecer en su estado nativo durante una escala de tiempo adecuada, por ello, es importante determinar la estabilidad cinética de una proteína. Este análisis se lleva a cabo cuando el proceso de desnaturalización es irreversible (es decir, al regresar a las condiciones iniciales después de desnaturalizar una proteína, ésta es incapaz de adoptar nuevamente su conformación nativa) y así permite conocer las características cinéticas del desplegamiento de una proteína, y estimar su estabilidad con el tiempo. Los parámetros cinéticos que se pueden obtener al desnaturalizar térmicamente una proteína son la constante de velocidad del desplegamiento (k) y el tiempo de vida media ($t_{1/2}$) a determinada temperatura.

La estabilidad cinética se puede interpretar en términos de la energía de activación (E_{act}) entre el estado nativo y estados no funcionales (estados desplegados, parcialmente plegados, así como agregados y lisados).^{29,30} Si esta barrera es lo suficientemente grande, la velocidad de desnaturalización irreversible será muy lenta, y así la proteína permanecerá en el estado nativo durante un tiempo lo suficientemente grande (**Figura 10**).

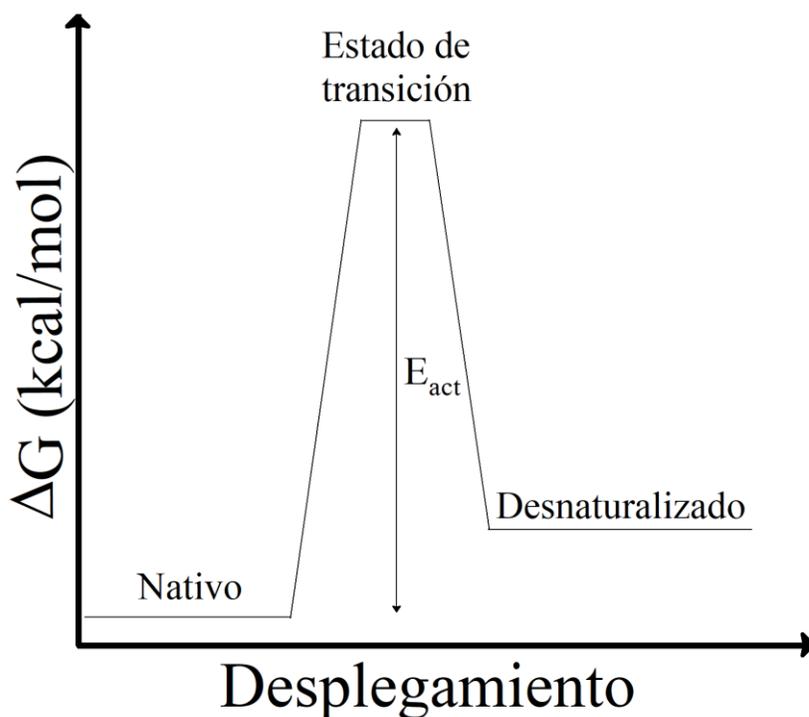
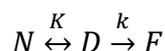


Figura 10. Diagrama de energía para el desplegamiento de una proteína. La energía de activación (E_{act}) es la barrera que separa el estado nativo de los estados no funcionales.

La desnaturalización irreversible de una proteína involucra al menos dos pasos: el primero es el desplegamiento reversible de la proteína nativa (N) y el segundo es una alteración irreversible del estado desplegado (D) hacia un estado final (F), donde es incapaz de convertirse nuevamente en D o N (ej. agregación). Puede ser expresado mediante el modelo de Lumry-Eyring:



En este modelo se asume que, al aumentar la temperatura, la proteína en estado nativo (N) sufre un cambio conformacional hacia el estado final (F), donde únicamente estos dos estados son poblados significativamente y que la conversión cinética entre ambos estados ($N \rightarrow F$) se describe por una constante de velocidad de primer orden (k):



Que se asume que varía con la temperatura de acuerdo con la ecuación de Arrhenius.

$$k = \exp\left[-\frac{E_{act}}{R}\left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_m}\right)\right]$$

Donde E_{act} es la energía de activación (energía entre el estado nativo y el estado de transición), R es la constante de los gases, y T_m es la temperatura que corresponde al máximo de la transición de desnaturalización y donde la k es igual a 1 min^{-1} . De acuerdo con esta interpretación, el modelo de dos estados irreversible no debe tomar el significado de que el estado nativo sufre la alteración irreversible hacia F , ya que el paso irreversible sigue siendo $D \rightarrow F$, sino que el proceso de desnaturalización térmica completo es muy rápido y ocurre en condiciones donde la cantidad de moléculas en el estado desplegado es muy baja, por ende este término es despreciado.³¹

La existencia de las alteraciones irreversibles disminuye la operatividad de la estabilidad térmica de la proteína, ya que el proceso total de desnaturalización es rápido a temperaturas más bajas que la temperatura de desnaturalización termodinámica (temperatura a la cual el ΔG de desplegamiento es igual a 0). En otras palabras, la estabilidad termodinámica no previene a la proteína de sufrir desnaturalización irreversible en una escala de tiempo dada.³¹

Así, la estabilidad de una proteína puede ser entendida en términos de estabilidad termodinámica y estabilidad cinética.

2.2 Antecedentes Específicos

2.2.1 Plegamiento, estabilidad y agregación de γ -cristalinas

La estabilidad de cristalinas (α , β y γ) ha sido estudiada en diversas condiciones. Para determinar la estabilidad termodinámica se requiere que la desnaturalización sea reversible, lo que normalmente necesitan de la supresión de reacciones de agregación, mientras que en estimaciones de estabilidad cinética, las reacciones de agregación generalmente están presentes, y usualmente son irreversibles.^{17,32}

Las cristalinas γ son muy estables, con una T_m de ~ 80 °C y una gran resistencia a concentraciones altas de urea y de 2-3 M de cloruro de guanidinio. En comparación, las cristalinas β son menos estables termodinámicamente, tanto a la desnaturalización térmica como a la desnaturalización química. Aunque a la fecha, no se sabe exactamente qué es lo que determina esta diferencia en estabilidad entre ambos grupos de proteínas.

La elevada estabilidad de las cristalinas se puede atribuir en gran medida a la presencia de diferentes interacciones en la proteína (puentes de hidrógeno, interacciones de van der Waals, efecto hidrofóbico, interacciones π - π (π -stacking) e interacciones iónicas), así como a la estructura compacta e intercalada del doble motivo estructural.¹⁷

Con respecto al plegamiento de las γ cristalinas, el grupo del Profesor Jonathan A. King ha estudiado profundamente su estabilidad mediante estudios de mutagénesis, en especial para el caso de la cristalina H γ D. Ellos han reportado varias características importantes que contribuyen a la estabilidad de dicha proteína, por ejemplo, han encontrado un efecto estabilizador de los residuos de la región inter-dominio, que incluyen principalmente residuos hidrofóbicos, así como glutamina; además han propuesto un papel importante para los residuos aromáticos como tirosina y triptófano.^{11, 22, 33-35}

En el trabajo de Kosinski-Collins y King en 2003, estudiaron la desnaturalización química de H γ D con cloruro de guanidinio a pH 7 y a 37 °C, donde encontraron que el desplegamiento de esta proteína muestra histéresis, lo que indica que el estado nativo es estable a mayores concentraciones de desnaturalizante que la concentración a la cual el estado desplegado es capaz de plegarse nuevamente. Este fenómeno fue evidente al realizar el desplegamiento a una temperatura menor, 25 °C, como se observa en la **Figura 11**.³⁶

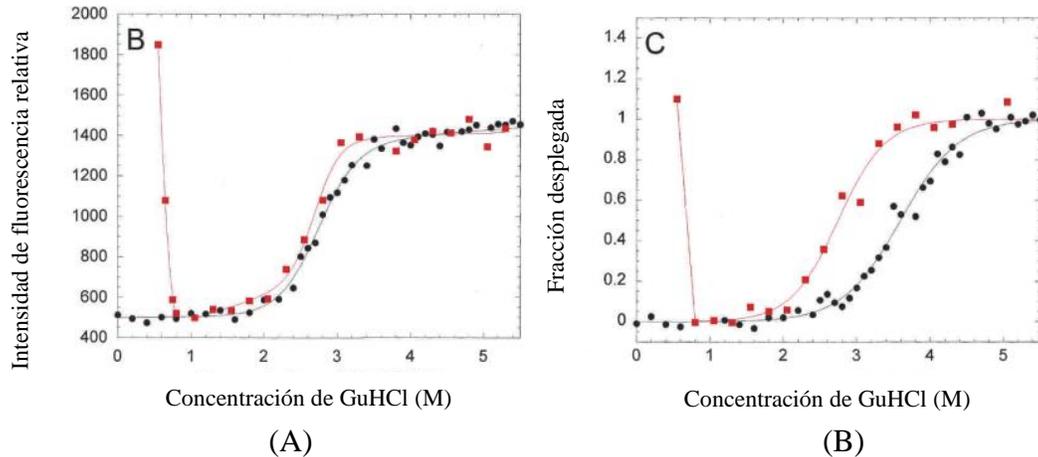


Figura 11. Plegamiento y desplegamiento al equilibrio de la cristalina H γ D con cloruro de guanidinio. (A) Cambios en intensidad de fluorescencia relativa del desplegamiento (círculos negros) y plegamiento (cuadrados rojos) a 350 nm a 37 °C. (B) Fracción de proteína desplegada en desplegamiento (círculos negros) y plegamiento (cuadrados rojos), determinada por intensidad de fluorescencia a 350 nm a 25 °C. Modificada de ref. 36.

La presencia de histéresis representa una barrera cinética para la iniciación del desplegamiento. Sin embargo, este efecto no está presente en los dominios aislados de la proteína,¹⁹ lo que sugiere que se debe a interacciones entre ambos dominios. Esta idea es respaldada por el trabajo de Roberts et al.³⁷ donde a través del diseño computacional de mutantes puntuales, demuestran que la estabilización de la región inter-dominio conduce a un incremento en la histéresis, mientras la desestabilización del dominio C-terminal la disminuye. Por ello, la estabilidad cinética, es una estrategia útil para preservar el estado nativo de estas cristalinas por mucho más tiempo, en lugar de sólo lo que la estabilidad termodinámica podría permitir.¹⁷

En contraste, el desplegamiento de la cristalina H γ S es altamente cooperativo y no exhibe el fenómeno de histéresis,¹⁹ sugiriendo la ausencia de una fuerte interacción entre dominios, atribuido a una mayor extensión del péptido de unión (*linker*) entre ambos dominios.

Aunado a esto, en el mismo trabajo del Profesor King,³⁶ analizaron la estructura de los agregados de H γ D y el mecanismo subyacente por microscopía de fuerza atómica (AFM), al minuto de replegamiento encontraron estructuras globulares pequeñas que después de 5 minutos pasaron a ser protofibrillas. Luego de una hora, todas las protofibrillas habían desaparecido y ahora formaban parte de un manojo de fibras de 50 nm de grosor y 5 nm de

altura, que después de varias horas se transformaban en grandes masas de agregados, detectables a simple vista (**Figura 12**). Posteriormente, la caracterización de estos agregados la continuaron con bisANS, el cual se unió de mejor manera que con el estado nativo y desplegado, indicando que los agregados (en esas condiciones) tenían regiones de residuos hidrofóbicos expuestos.

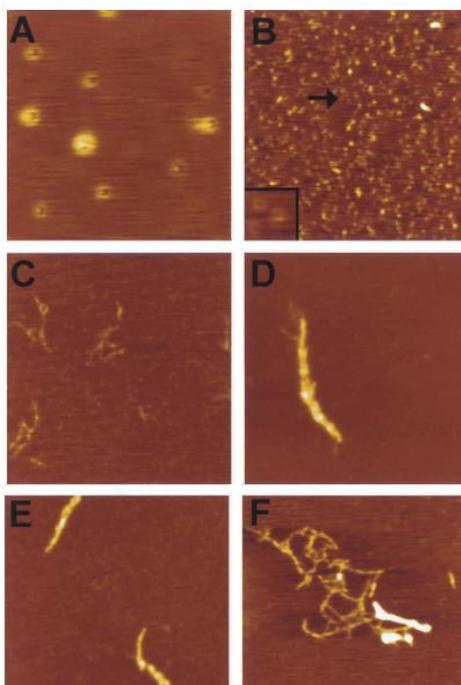


Figura 12. Imágenes de microscopía de fuerza atómica (AFM) en la agregación de H γ D. Nativa (A) 1 min (B), 5 min (C), 24 min (D), 1 h (E), 2 h (F). Tomada de ref. 36.

Con los resultados mencionados anteriormente, y dado que las especies parcialmente plegadas están frecuentemente involucradas en vías de agregación de proteínas, una posible explicación del proceso de agregación de H γ D es que las especies intermediaras parcialmente plegadas (donde el dominio C-terminal se encuentra plegado y dominio N-terminal está desplegado) son las responsables del estado final agregado de esta proteína (**Figura 13**).³³

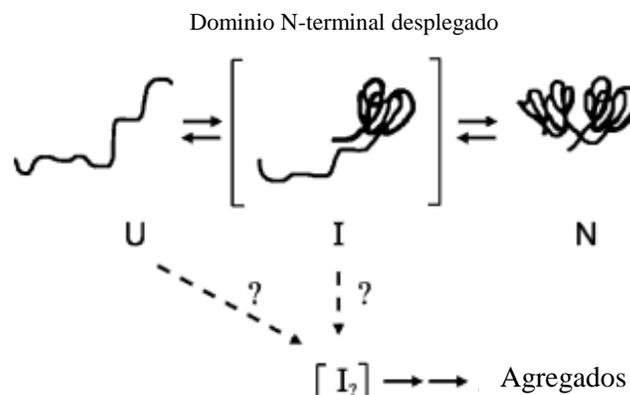


Figura 13. Mecanismo propuesto para la agregación de H γ D, a través de intermediarios parcialmente plegados. Modificada de ref. 33.

Recientemente, Mills-Henry I.A. et al.³⁸ determinaron la estabilidad cinética de H γ D y H γ S, y la de sus dominios aislados, mediante desnaturalización química a 18 °C, monitoreada por espectroscopia de fluorescencia. Ellos aplicaron un modelo de tres estados para describir los datos, de este modo obtuvieron dos constantes de velocidad. Para H γ D, los resultados extrapolados a 0 M de desnaturalizante dieron un tiempo de vida media (a 18 °C) de 19 años para la primera transición y de 129 días para la segunda transición, mientras que este parámetro fue de 14.9 años y 2.95 horas para los dominios aislados C- y N-terminal, respectivamente. En el caso de H γ S, el tiempo de vida media fue de 1.62 años para la primera transición y de 2.04 días para la segunda, en cambio, para sus dominios aislados se obtuvo un valor de 3 días para el C-terminal y de 1.3 y 26.6 min para el dominio N-terminal (tres estados para este dominio). Estos resultados son consistentes con el tiempo necesario para que estas proteínas permanezcan en estado nativo en el organismo, sin embargo, dado que los experimentos fueron realizados a 18 °C, los valores pueden diferir con los mostrados a 37 °C. Además, es importante mencionar que los autores sugieren que la gran diferencia en los tiempos de vida media (y así de su estabilidad cinética) entre la proteína completa y sus dominios aislados se debe al factor estabilizador de la región inter-dominio, lo cual ya se ha comprobado que contribuye a la estabilidad termodinámica.³⁸

2.2.2 Efecto de los iones metálicos sobre la agregación de γ -cristalinas

Diversos estudios han puesto de manifiesto que los metales poseen una importante implicación en el desarrollo de varias enfermedades crónico degenerativas como Parkinson³⁹ y Alzheimer.^{40,41} Asimismo, se ha propuesto que los metales juegan un papel importante en el desarrollo de cataratas, ya que en lentes de pacientes con este padecimiento se ha encontrado una elevada concentración de cobre y zinc, comparado con lentes sanos.^{42,43} En la **Tabla 1** se muestran los resultados obtenidos por Srivastava V.K. et al. donde es evidente que existen un aumento en la concentración de iones Cu^{2+} y Zn^{2+} en lentes con cataratas tanto nuclear como cortical, siendo del doble para Zn^{2+} y hasta más de 10 veces para Cu^{2+} .⁴²

Tabla 1. Niveles de proteína soluble e insoluble y de concentraciones de cobre y zinc en lentes normales, con catarata cortical y catarata nuclear. Modificada de ref. 42

	Lente normal	Catarata cortical	Catarata nuclear
Proteína soluble %	89.0 ± 2.8	46.3 ± 1.9	36.4 ± 2.2
Proteína insoluble %	11.0 ± 1.2	52.7 ± 3.4	63.6 ± 3.0
Cobre ($\mu\text{g}/\text{mg}$ peso seco)	0.25 ± 0.06	2.72 ± 0.27	3.35 ± 0.41
Zinc ($\mu\text{g}/\text{mg}$ peso seco)	12.8 ± 2.6	23.6 ± 5.0	30.9 ± 10.2

El grupo de Quintanar L.^{44,45} ha reportado el efecto de agregación de las cristalinas $\text{H}\gamma\text{C}$, $\text{H}\gamma\text{D}$ y $\text{H}\gamma\text{S}$ inducida por Cu^{2+} . Como se observa en la **Figura 14**, en ensayos de turbidez (donde un incremento en turbidez representa la formación de partículas dispersoras de luz, es decir, agregados) los iones Cu^{2+} producen un aumento en la señal detectada después de cierto tiempo y en diferente magnitud, dependiendo de la proteína y del número de equivalentes de cobre, indicando que su presencia es un claro inductor de agregación de las tres cristalinas. Para $\text{H}\gamma\text{D}$ se observa un drástico incremento a partir de 3.5 equivalentes (**Figura 14A**), mientras que para $\text{H}\gamma\text{S}$ el efecto presenta un umbral alrededor de 3 equivalentes, desde donde aumenta gradualmente (**Figura 14C**). Por el contrario, $\text{H}\gamma\text{C}$ presenta una mayor sensibilidad a la agregación inducida por cobre, mostrado por una mayor turbidez a pocos equivalentes de Cu^{2+} (**Figura 14B**).

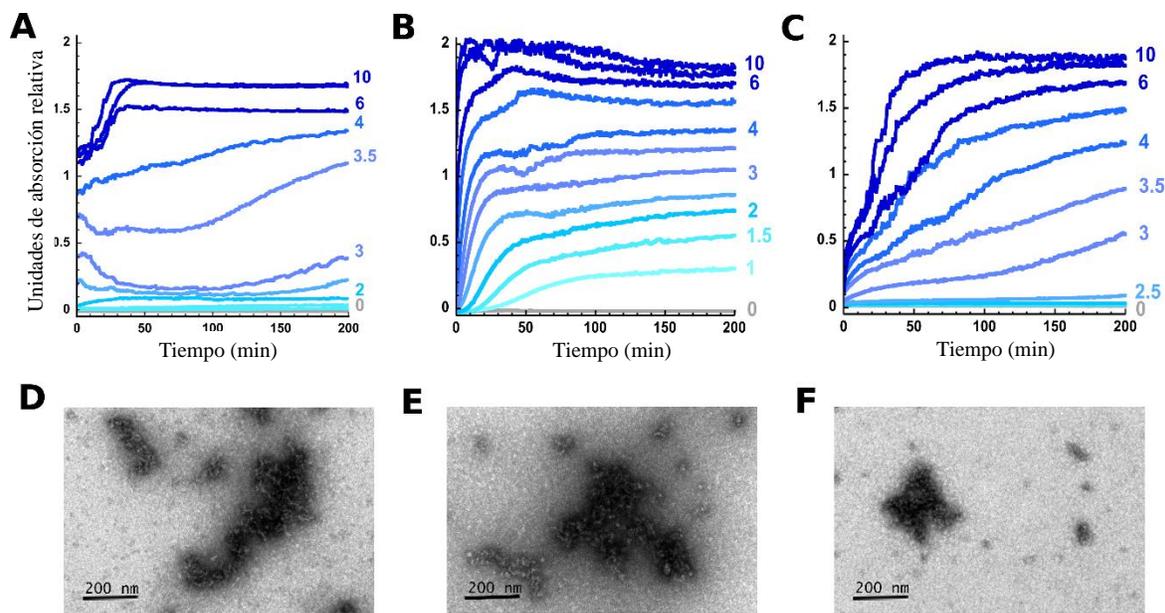


Figura 14. Efecto de agregación de γ -cristalinas inducida por cobre. Ensayos de turbidez de cristalinas H γ D (A), H γ C (B) y H γ S (C) a 50 μ M en ausencia o presencia de diferentes equivalentes de Cu²⁺. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de los agregados de H γ D (D), H γ C (E) y H γ S (F) con 4 equivalentes de Cu²⁺. Modificada de ref. 44.

Posteriormente las muestras en presencia de 4 equivalentes de cobre fueron analizadas por microscopía electrónica de transmisión (TEM) (**Figura 14D, 14E y 14F**, para H γ D, H γ C y H γ S, respectivamente), donde claramente se observa la presencia de agregados de tipo no amiloide.^{44,45}

Asimismo, se estudió el efecto de estos iones en el plegado de las proteínas y en el proceso de desnaturalización térmica. Las proteínas fueron tituladas con diferentes concentraciones de cobre a 37 °C y su espectro de Dicroísmo Circular (DC) fue obtenido en la región del UV lejano (**Figura 15**).^{44,45} Al ir adicionando cobre, se observa un decremento en la intensidad de la señal en 218 nm, indicativo de una pérdida en estructura secundaria β . El efecto es más pronunciado para la cristalina H γ C, lo que demuestra una mayor sensibilidad hacia el desplegamiento debido al cobre (**Figura 15B**), seguido de H γ D (**Figura 15A**) y finalmente H γ S (**Figura 15C**).

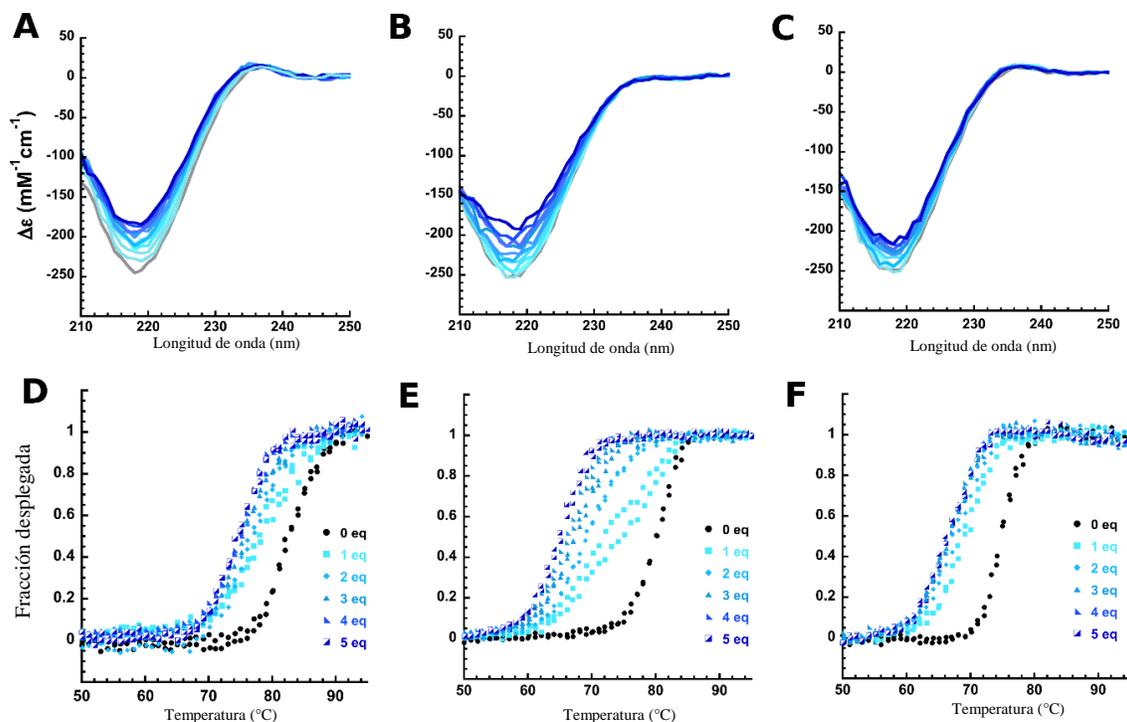


Figura 15. Efecto de los iones Cu^{2+} sobre la estructura y el desplegamiento térmico de γ -cristalinas. Titulaciones de HyD (A), HyC (B) y HyS (C) ($2 \mu\text{M}$) en ausencia o con diferentes equivalentes de Cu^{2+} , medidas por DC a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Desnaturalización térmica de HyD (D), HyC (E) y HyS (F) monitoreada por DC en presencia de 0 a 5 equivalentes de Cu^{2+} . Modificada de ref. 44.

La desnaturalización térmica de las tres proteínas a diferentes relaciones de proteína:metal fue monitoreada por DC a 218 nm . HyD en ausencia de metal presenta una curva sigmoidea con una T_m alrededor de $82.91 \pm 0.3 \text{ }^\circ\text{C}$, lo que es congruente con otros reportes.¹¹ Sin embargo, cuando la desnaturalización se llevó a cabo en presencia de 1 equivalente de cobre, la T_m se desplazó casi cinco grados ($78.06 \pm 0.28 \text{ }^\circ\text{C}$), efecto que se vio potenciado al ir agregando un mayor número de equivalentes, ya que sufrió un desplazamiento hasta un valor de $74.55 \pm 0.01 \text{ }^\circ\text{C}$ en presencia de 5 equivalentes de Cu^{2+} , lo que representa una disminución total de $\sim 8 \text{ }^\circ\text{C}$ (**Figura 15D**).^{44,45}

Algo similar ocurre con las cristalinas HyC y HyS, aunque en diferente magnitud. HyS posee una T_m de $74.45 \pm 0.15 \text{ }^\circ\text{C}$ en ausencia de metal, la cual disminuye hasta $66.35 \pm 0.2 \text{ }^\circ\text{C}$ (disminución de $\sim 8 \text{ }^\circ\text{C}$) al agregar 5 equivalentes de Cu^{2+} (**Figura 15F**). A su vez, HyC presenta una T_m de $80.04 \pm 0.01 \text{ }^\circ\text{C}$ en ausencia de metal, pero ésta disminuye conforme se van agregando varios equivalentes de Cu^{2+} , hasta llegar a disminuir $\sim 15 \text{ }^\circ\text{C}$ en presencia de 5 equivalentes de Cu^{2+} . Además, para esta cristalina HyC se observa un comportamiento

bifásico (2 transiciones en presencia de 1 y 2 equivalentes de Cu^{2+}), lo que sugiere que la unión de cobre a H γ C impacta más a uno de los dominios que al otro (**Figura 15E**).⁴⁴

El mismo análisis fue llevado a cabo para los dominios aislados C- y N-terminal de cada una de las proteínas. Para las tres cristalinas, tanto el dominio C-terminal como el dominio N-terminal fueron sensibles a la agregación inducida por cobre. En la **Figura 16** se muestra el resultado obtenido para los dominios aislados de H γ D, y un comportamiento similar se presentó para H γ C y H γ S.

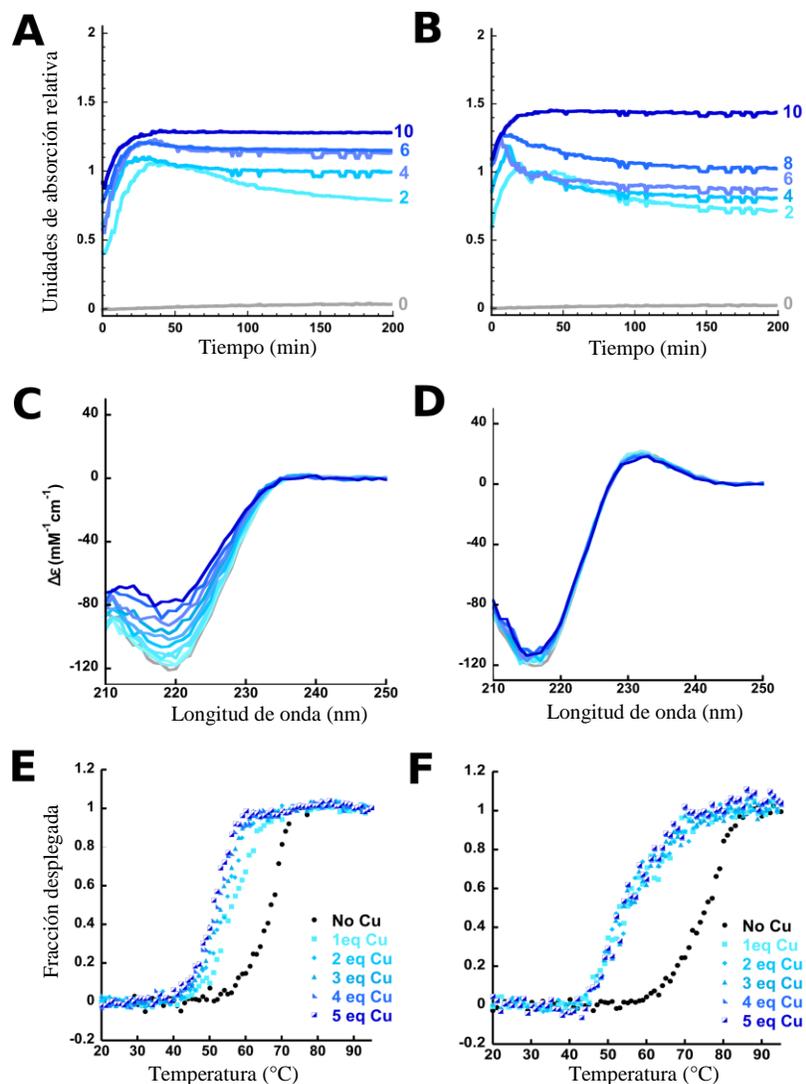


Figura 16. Efecto de los iones Cu^{2+} en la agregación, estructura y el desplegamiento térmico de los dominios aislados de la cristalina H γ D. Ensayos de turbidez de los dominios aislados N- (A) y C-terminal (B) de H γ D en ausencia o presencia de diferentes equivalentes de Cu^{2+} . Titulaciones de los dominios aislados N- (C) y C-terminal (D) de H γ D con diferentes equivalentes de cobre, medidas por DC. Desnaturalización térmica de los dominios aislados N- (E) y C-terminal (F) de H γ D en presencia de 0 a 5 equivalentes de Cu^{2+} , monitoreada por DC. Modificada de ref. 44.

Sorprendentemente, las titulaciones con diferentes equivalentes de cobre de los dominios separados (monitoreada por DC a 20 °C), mostró que únicamente los dominios N-terminal son susceptibles a la pérdida de estructura secundaria inducida por cobre, mientras que ningún efecto fue detectado para los dominios C-terminal (**Figura 16C y 16D**). Estos resultados sugieren que la interacción clave entre la proteína y los iones Cu^{2+} , la cual causa el desplegamiento de la estructura secundaria de las tres cristalinas, posiblemente se encuentre en el dominio N-terminal de la proteína.^{44,45}

El efecto de los iones cobre sobre la desnaturalización térmica de cada dominio aislado también fue analizada. Se observó que los iones Cu^{2+} afectan el proceso de desnaturalización de ambos dominios, y curiosamente para H γ D (**Figura 16E y 16F**) y H γ C el dominio C-terminal es el que presenta una mayor disminución en la T_m al agregar 3 equivalentes de Cu^{2+} , ~ 19 °C y ~ 20 °C para el dominio C-terminal de H γ D y H γ C, respectivamente. Mientras que para H γ S, el dominio N-terminal es el que presenta una mayor disminución en T_m , siendo de 66.35 °C en ausencia de cobre y de 35.22 °C con 3 equivalentes de cobre (**Tabla 2**).⁴⁴

Tabla 2. Valores de T_m en °C para los dominios aislados N- y C-terminal de H γ D, H γ C y H γ S en presencia de iones Cu^{2+} . Tomada de ref. **44**.

Equiv. Cu^{2+}	H γ D		H γ C		H γ S	
	N-terminal	C-terminal	N-terminal	C-terminal	N-terminal	C-terminal
0	66.46 ± 0.40	73.85 ± 0.40	72.14 ± 0.55	74.41 ± 0.15	66.35 ± 0.28	80.42 ± 1.00
1	56.47 ± 0.45	55.32 ± 0.17	62.95 ± 0.94	57.79 ± 1.30	34.96 ± 0.10	80.05 ± 1.30
2	54.34 ± 0.13	54.89 ± 0.07	59.40 ± 1.00	57.86 ± 1.20	34.61 ± 2.00	67.96 ± 0.95
3	53.07 ± 0.06	54.78 ± 0.11	56.04 ± 3.20	54.32 ± 1.00	35.22 ± 0.01	67.20 ± 0.72
4	51.98 ± 0.21	54.60 ± 0.03	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
5	51.07 ± 0.23	54.53 ± 0.25	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

Mediante el análisis anterior, concluyeron que uno de los mecanismos involucrados en la agregación de γ -cristalinas inducida por cobre es la pérdida de estructura secundaria en el dominio N-terminal, sin embargo, por medio de un análisis posterior, encontraron que existen otros mecanismos que también contribuyen a este fenómeno. Estos mecanismos son:

formación de puente metálico (*metal-bridging*, demostrado por experimentos de turbidez de las cristalinas en presencia de cobre y adicionando EDTA) y formación de puentes disulfuro (demostrado por SDS-PAGE y el uso del agente reductor β -mercaptoetanol). Con esto se concluyó que los tres mecanismos están presentes en la agregación inducida por cobre de las tres cristalinas, pero cada uno contribuye en diferente grado, siendo uno más importante que el otro dependiendo de la cristalina de la que se trate. ⁴⁴

Por otro lado, Vincent M. Monnier y colaboradores,⁴⁶ reportan el papel que juegan los residuos de cisteína en el proceso de agregación de H γ D inducida por iones Cu²⁺. Mediante la construcción de mutantes tipo CXA (donde X es el número de residuo), encontraron que la agregación inducida por Cu²⁺ se ve suprimida hasta un 50 y 80% para las mutantes C109A y C111A, respectivamente. A diferencia de ello, las otras mutantes (C19A, C33A y C42A) presentaron sensibilidad a la agregación inducida por Cu²⁺ en un grado similar al de la proteína silvestre (**Figura 17A y 17B**).

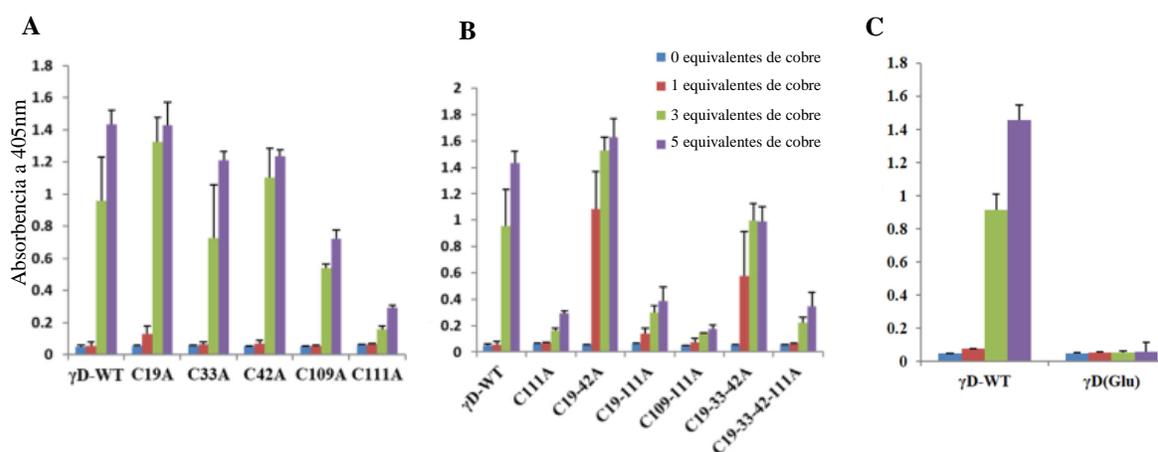


Figura 17. Importancia de los residuos de cisteína en la agregación de H γ D inducida por cobre. Sensibilidad a la agregación inducida por cobre de las diferentes mutantes simples (A) y múltiples (B) de residuos de cisteína de H γ D. (C) Efecto de los iones cobre en la agregación de la proteína H γ D con grupos glutatión. Modificadas de ref. 46.

En el mismo trabajo,⁴⁶ los autores reportan que la presencia de grupos glutatión en los residuos de cisteína abate el fenómeno de agregación de H γ D inducida por Cu²⁺, lo que revela la importancia de la formación de puentes disulfuro en el proceso de agregación inducida por Cu²⁺ (**Figura 17C**).

Al igual que el cobre, los iones Zn^{2+} inducen la agregación de H γ D, pero no de H γ C ni de H γ S. Sin embargo, la turbidez que genera la presencia de iones Zn^{2+} es mucho menor que en el caso de cobre, incluso hasta 10 equivalentes de Zn^{2+} (**Figura 18A**). Además, los agregados de H γ D en presencia de 4 equivalentes de Zn^{2+} , observados por microscopía electrónica, presentan un tamaño menor que los inducidos por Cu^{2+} (**Figura 18B**).^{45,47}

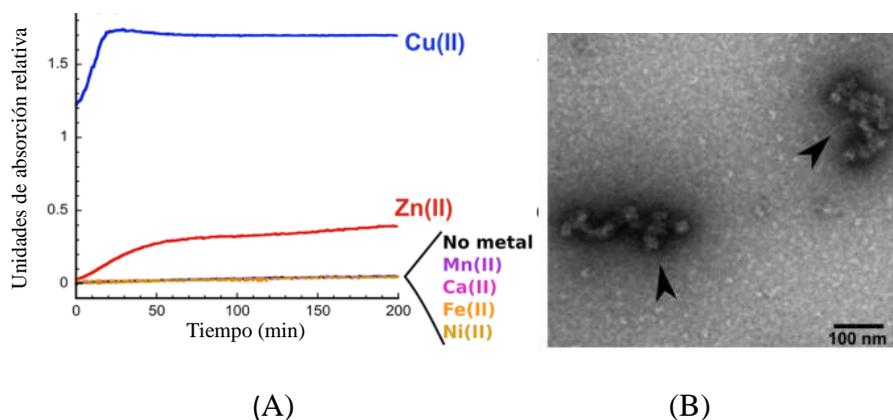


Figura 18. Efecto de agregación de γ -cristalinas inducida por zinc. Ensayos de turbidez de H γ D en ausencia y presencia de 10 equivalentes de iones divalentes (A) Imágenes de microscopía electrónica de los agregados inducidos por Zn^{2+} (B). Modificadas de ref. 45.

En comparación con los iones Cu^{2+} , la titulación con iones Zn^{2+} produjo un cambio mucho menos evidente en la señal de DC, ya que en presencia de 10 equivalentes de Zn^{2+} la pérdida de señal a 218 nm fue aproximadamente de sólo el 10% (**Figura 19A**). Conjuntamente, el proceso de desnaturalización térmica de H γ D no se ve afectado por la presencia de los iones Zn^{2+} (**Figura 19B**), confirmando que estos iones inducen la agregación de esta proteína, pero no el desplegamiento de su estructura secundaria.^{45,47}

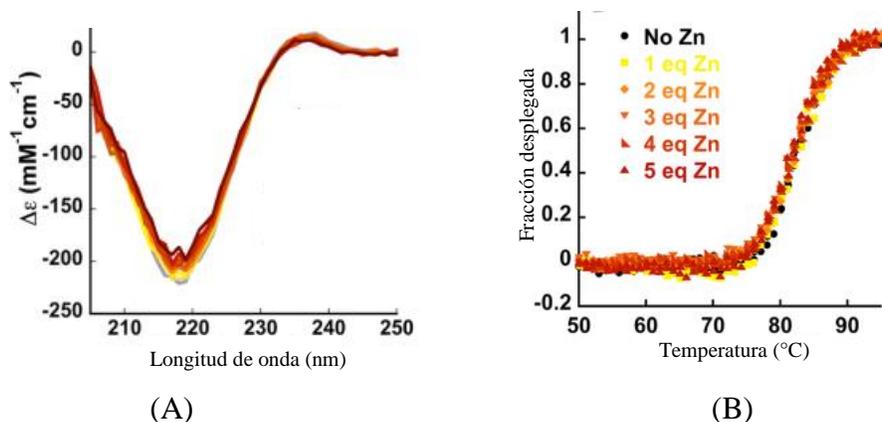


Figura 19. Efecto de los iones Zn^{2+} sobre la estructura y el desplegamiento térmico de HyD. Efecto de los iones zinc en el plegamiento (A) y la desnaturalización térmica (B) de HyD. Modificadas de ref. 45.

Estos resultados sugieren que la interacción y el (los) mecanismo(s) de inducción de agregación de HyD es (son) diferente(s) para Cu^{2+} y Zn^{2+} . En este sentido, recientemente el grupo del Dr. Carlos Amero reportó la cinética de agregación de HyD en presencia de cobre y zinc.⁴⁸ En dicho trabajo se analizó el comportamiento de las señales de turbidez de HyD a 37 °C en presencia de 1.5 equivalentes de metal durante 12 horas, en el caso de zinc se observa una señal que aumenta rápidamente, seguido de un descenso a tiempos prolongados (**Figura 20A**), resultado de la formación de complejos de alto peso molecular que precipitan. En cambio, el cobre presenta un comportamiento bifásico, con dos escenarios de incremento en la turbidez, lo que indica que al menos dos procesos están involucrados en la agregación (**Figura 20B**). Esto evidencia la diferencia en las vías de agregación de HyD inducida por Cu^{2+} y Zn^{2+} .

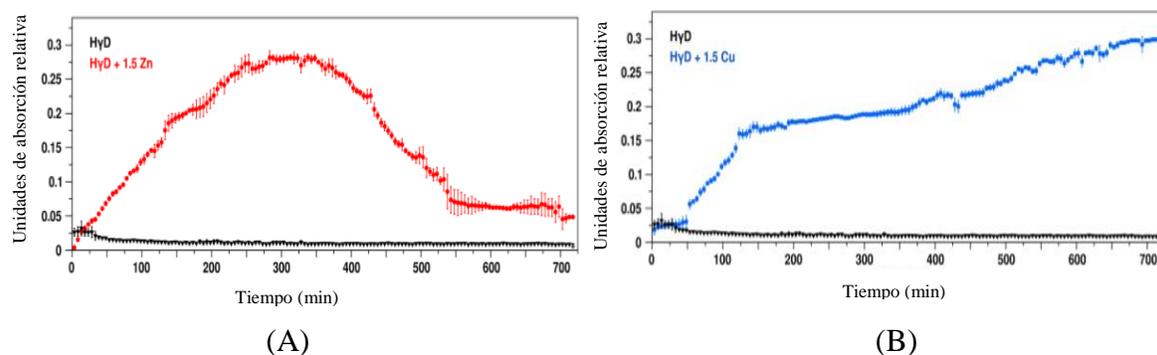


Figura 20. Ensayos de turbidez sobre el efecto de los iones zinc y cobre en la inducción de agregación de HyD a 37 °C, de manera dependiente del tiempo. Absorbencia a 405 nm (en función del tiempo) de HyD en ausencia de metal (triángulos negros) y en presencia de 1.5 equivalentes de Zn^{2+} (A, rojo) y Cu^{2+} (B, azul). Modificadas de ref. 48.

HyD 1 - - - - GKITL YEDRG FQGRH YE**C**S S D**H**PNL QPYLS 30
 (A) **HyC** 1 - - - - GKITF YEDRA FQGRS YE**T**T T D**C**PNL QPYFS 30
HyS 1 GSKTG TKITF YEDKN FQGRR YD**C**DC D**C**ADF HTYLS 35

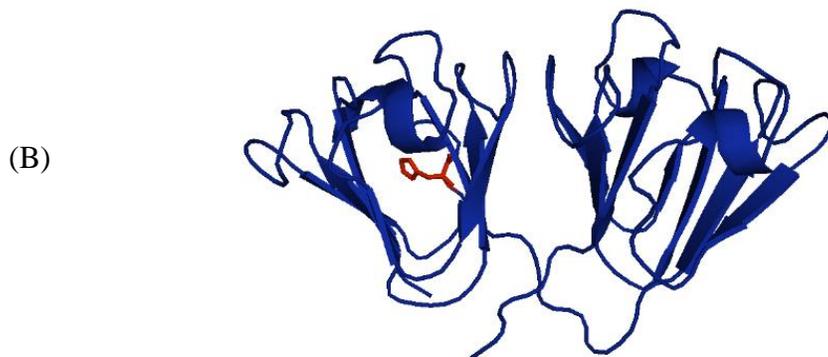


Figura 22. Residuo His22 en HyD. (A) Alineamiento de secuencias de los primeros 30 aminoácidos de las cristalinas HyC, HyD y HyS. Tomada de ref. 47. (B) Ubicación del residuo His22 en HyD, PDB ID: 1hk0.

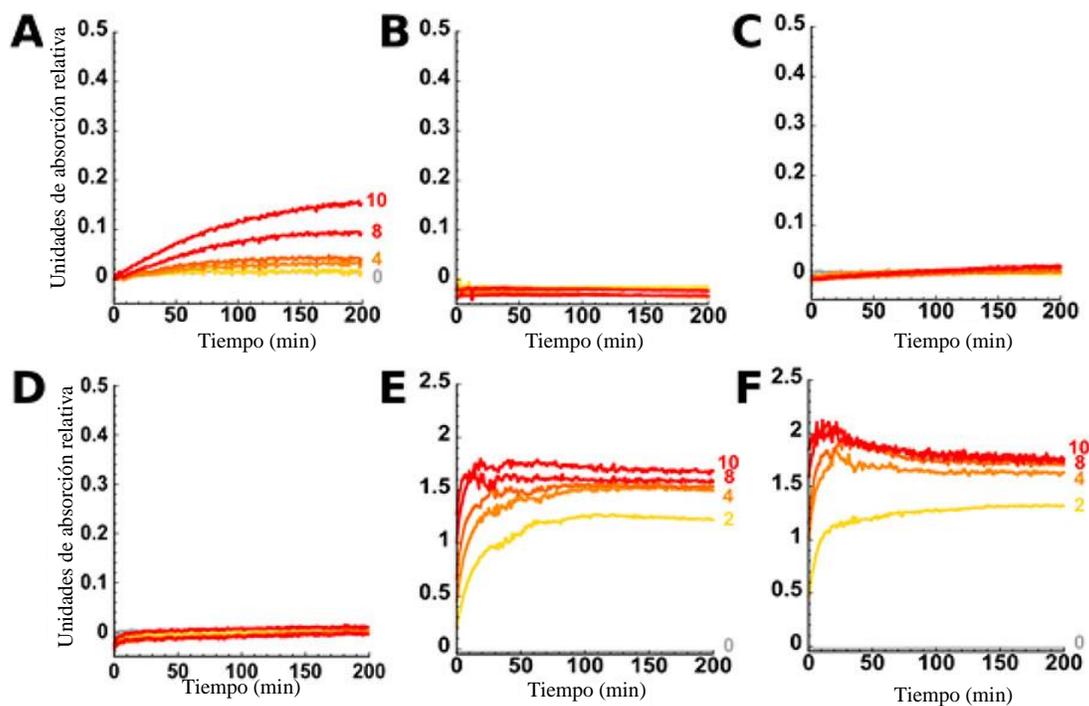


Figura 23. Importancia del residuo His22 en la agregación de HyD inducida por zinc. Ensayos de turbidez de (A) HyD, (B) HyC, (C) HyS, (D) HyD H22Q, (E) HyC C22H, y (F) HyS C26H, en ausencia o presencia de 2, 4, 6, 8, y 10 equivalentes de Zn²⁺ (amarillo a naranja). Modificada de ref. 47.

En otro trabajo (en 2018) del grupo de Quintanar L.⁴⁹ reportó el efecto de los iones metálicos pesados como Cd^{2+} , Pb^{2+} y Hg^{2+} en la estabilidad y agregación de las cristalinas $\text{H}\gamma\text{C}$, $\text{H}\gamma\text{D}$ y $\text{H}\gamma\text{S}$ (**Figura 24**). Mediante ensayos de turbidez, encontraron que los iones Cd^{2+} , Pb^{2+} no poseen un efecto evidente en ninguna de las tres cristalinas estudiadas, en cambio, los iones Hg^{2+} presentan un marcado efecto en la agregación de las cristalinas $\text{H}\gamma\text{C}$ y $\text{H}\gamma\text{S}$, pero no para la cristalina $\text{H}\gamma\text{D}$.⁴⁹

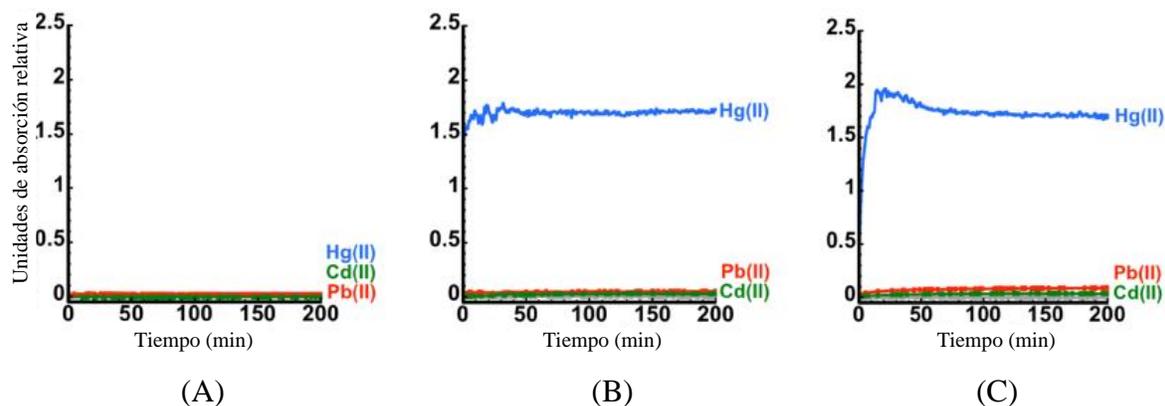


Figura 24. Efecto de los metales pesados en la inducción de agregación de γ -cristalinas. Ensayos de turbidez de (A) $\text{H}\gamma\text{D}$ (B) $\text{H}\gamma\text{C}$ y (C) $\text{H}\gamma\text{S}$ en ausencia y presencia de 6 equivalentes de iones Cd^{2+} , Pb^{2+} y Hg^{2+} . Modificada de ref. 49.

De este modo, analizaron el efecto de los iones Hg^{2+} sobre la estructura de $\text{H}\gamma\text{C}$ y $\text{H}\gamma\text{S}$. Para ambas proteínas, la presencia de mercurio disminuyó la intensidad de la señal de DC, de una manera dependiente de concentración (**Figura 25A y 25B**), lo que demostró que los iones Hg^{2+} alteran la estructura secundaria de $\text{H}\gamma\text{C}$ y $\text{H}\gamma\text{S}$, al promover el desplegamiento, y así causar el fenómeno de agregación. Asimismo, analizaron la estabilidad de las cristalinas $\text{H}\gamma\text{C}$ y $\text{H}\gamma\text{S}$ en presencia de diferentes equivalentes de Hg^{2+} , mediante desnaturalización térmica monitoreada por DC. Para $\text{H}\gamma\text{S}$ (**Figura 25D**), la T_m disminuyó gradualmente en presencia de diferentes equivalentes, hasta llegar a 48 °C con 10 equivalentes de Hg^{2+} . En contraste, la desnaturalización térmica de $\text{H}\gamma\text{C}$ (**Figura 25C**) presentó un comportamiento diferente; en presencia de 3 equivalentes de Hg^{2+} la T_m de $\text{H}\gamma\text{C}$ disminuyó de 80 a 43 °C, no obstante, al agregar un mayor número de equivalentes, sorprendentemente, la T_m volvió a aumentar, hasta llegar a un valor de ~ 59 °C en presencia de 10 equivalentes de Hg^{2+} .⁴⁹

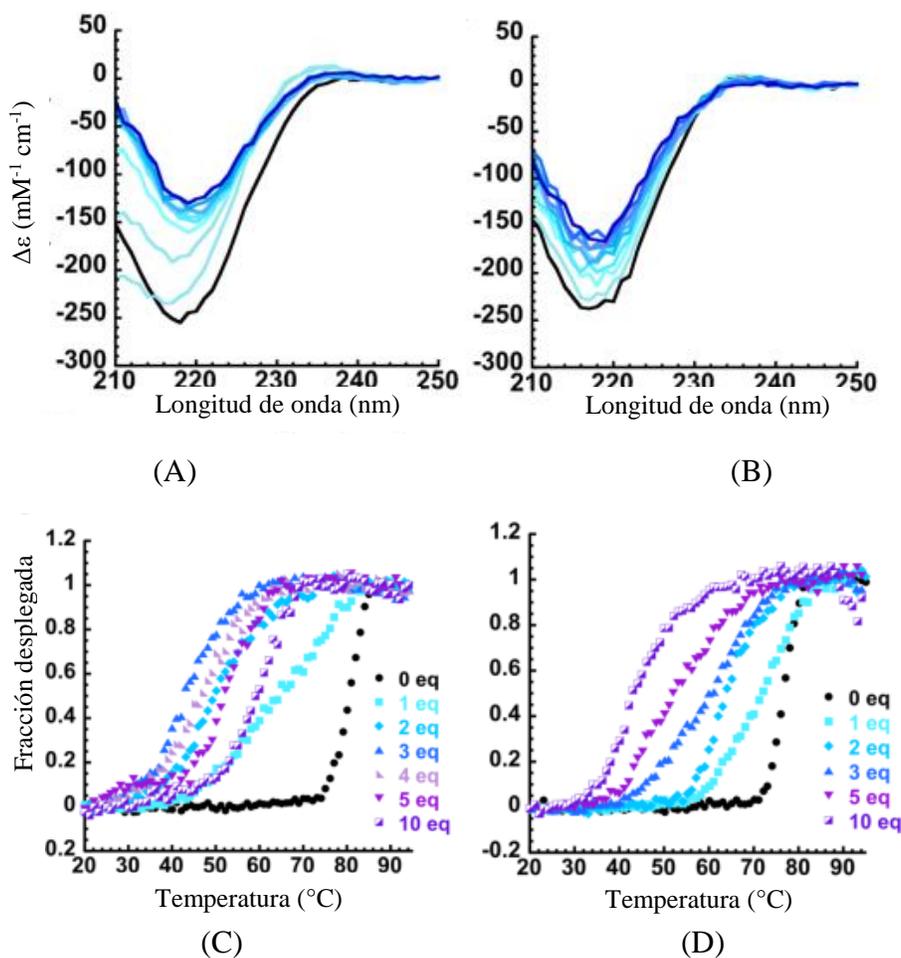


Figura 25. Efecto de los iones Hg^{2+} en la estructura y el desplegamiento térmico de $\text{H}\gamma\text{C}$ y $\text{H}\gamma\text{S}$. Espectro de DC y desnaturalización térmica de $\text{H}\gamma\text{C}$ (A y C, respectivamente) y $\text{H}\gamma\text{S}$ (B y D, respectivamente) en presencia de diferentes equivalentes de iones Hg^{2+} . Modificada de ref. 49.

Con base en toda esta información previa, en nuestro grupo de investigación se planteó determinar las características fisicoquímicas de la estabilidad de las tres γ -cristalinas de humano ($\text{H}\gamma\text{C}$, $\text{H}\gamma\text{D}$ y $\text{H}\gamma\text{S}$), mediante estudios de desnaturalización térmica por calorimetría diferencial de barrido (CDB) y el efecto de ciertos iones metálicos (Cu^{2+} , Zn^{2+} y Hg^{2+}) en dicha estabilidad. Aunado a esto, mediante calorimetría de titulación isotérmica (CTI) se planteó investigar sobre el mecanismo de interacción entre las tres proteínas y los iones metálicos, con el objetivo de comprender un poco más sobre el proceso de agregación de γ -cristalinas inducida por iones metálicos.

En este trabajo se describen los resultados obtenidos a partir del análisis mencionado, los cuales son presentados de manera seccional dependiendo del metal involucrado, iniciando con la información en ausencia de metal, seguido del cobre, zinc y mercurio.

3 Hipótesis y Objetivos

3.1 Hipótesis

La estabilidad cinética de las γ -cristalinas, determinada por CDB, será muy grande y congruente con el tiempo necesario para mantenerse en estado nativo durante toda la vida del organismo y la interacción con iones metálicos afectará dicha estabilidad al promover su agregación.

3.2 Objetivo general

Estudiar la estabilidad cinética de las cristalinas H γ C, H γ D y H γ S, en ausencia y presencia de iones metálicos Cu²⁺, Zn²⁺ y Hg²⁺, así como determinar las características termodinámicas de la unión de estos iones a dichas proteínas, y encontrar posibles explicaciones al mecanismo de unión y de agregación.

3.3 Objetivos específicos

- Determinar la estabilidad cinética de H γ C, H γ D y H γ S.
- Determinar el efecto de iones metálicos Cu²⁺, Zn²⁺ y Hg²⁺ sobre la estabilidad cinética de H γ C, H γ D y H γ S, y caracterizar su interacción.
- Determinar la estabilidad cinética de los dominios aislados C- y N-terminal de H γ D.
- Determinar el efecto de iones metálicos Cu²⁺, Zn²⁺ y Hg²⁺ sobre la estabilidad cinética de los dominios aislados C- y N-terminal de H γ D, y caracterizar su interacción.
- Evaluar el papel del residuo His22 de H γ D en la unión con iones metálicos Cu²⁺, Zn²⁺ y Hg²⁺, así como en su estabilidad cinética y el mecanismo de agregación.

4 Metodología

4.1 Expresión y purificación de las proteínas

Las proteínas recombinantes H γ C, H γ D y H γ S fueron expresadas y purificadas en el laboratorio de la Dra. Liliana Quintanar Vera, del Departamento de Química del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV). La expresión de las proteínas se llevó a cabo usando un plásmido pET16b (para H γ C y H γ D) y pET15b (para H γ S) en la cepa de *E. coli* BL21-RIL, y fueron purificadas por precipitación con sulfato de amonio seguida por cromatografía de exclusión por tamaño. Posteriormente las fracciones colectadas fueron analizadas por SDS-PAGE para verificar su pureza. La metodología completa utilizada se encuentra reportada.^{45,47,49}

La concentración de la proteína fue determinada con un espectrofotómetro Cary-50 (Varian), a 280 nm y determinada mediante la ley de Beer-Lambert:

$$A = \epsilon lc$$

Donde A es la absorbencia, ϵ es el coeficiente de extinción molar, l es el paso óptico (ancho de la celda utilizada) y c es la concentración de la muestra. Con los siguientes coeficientes de extinción molar: $\epsilon = 41 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ para H γ C, H γ D, H γ S y H γ D H22Q, y $\epsilon = 21.6$ y $20.6 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ para los dominios aislados C- y N-terminal de H γ D, respectivamente.

4.2 Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB)

Los experimentos de CDB (calorimetría diferencial de barrido) fueron realizados con un calorímetro capilar VP-DSC (Microcal, Malvern, U.K).

La proteína fue utilizada a una concentración de 0.4 mg/mL, en el amortiguador MOPS (ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico, 20 mM) con NaCl (50 mM) a pH 7. Las proteínas H γ C, H γ D y H γ S, H γ D H22Q y los dominios aislados C- y N-terminal de H γ D fueron medidas a diferente velocidad de barrido, de 0.5 a 3 °C/min en ausencia o presencia

de iones metálicos. Para todas las proteínas, la irreversibilidad del proceso fue corroborada, es decir, se comprobó la ausencia de señal al recalentar la misma muestra después de volver a las condiciones iniciales de temperatura. Asimismo, para todas las muestras analizadas se observó una dependencia de la T_m con respecto a la velocidad de barrido utilizada (**Figura 26**), lo que indica que el proceso de desnaturalización de estas proteínas está bajo control cinético.

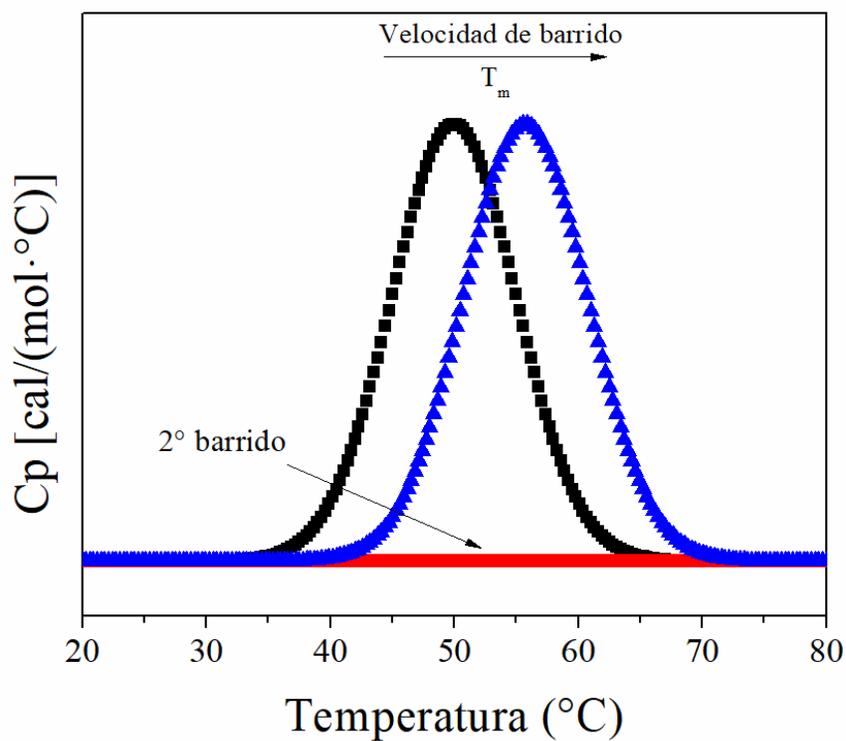


Figura 26. Termograma de CDB obtenido para proteínas irreversibles y la dependencia de la T_m con respecto a la velocidad de barrido.

De este modo, un modelo de dos estados irreversible fue aplicado para ajustar las trazas calorimétricas.⁵⁰ Para ello, primero se restó la línea base física (trazas amortiguador-amortiguador) de las endotermas de la muestra, y el modelo de dos estados irreversible fue aplicado a estas trazas, donde los parámetros a ajustar fueron la E_{act} , ΔH y T_m , así como los valores de la pendiente y ordenada al origen de las líneas base pre- y pos-transición. A partir de esto, se obtuvieron los valores de la estabilidad cinética (E_{act} , $t_{1/2}$ y T_m) de las proteínas en ausencia y presencia de metal; los gráficos obtenidos se muestran en Apéndice A.

Por otro lado, con fines de presentación gráfica, las trazas calorimétricas fueron procesadas independientemente, donde la línea base química fue restada (además de la línea base física), al unir las regiones de la proteína nativa con la desplegada, y el modelo fue aplicado de manera representativa (fines visuales); los gráficos se muestran en la sección de Resultados y Discusión.

4.2.1 Ajuste al modelo de dos estados irreversible

El modelo de dos estados irreversible asume que al aumentar la temperatura, la proteína nativa (N) sufre una transición conformacional hacia un estado final (F), el cual es incapaz de plegarse nuevamente. La conversión cinética entre estos dos estados ($N \rightarrow F$) es descrita por una constante de velocidad de primer orden (k), la cual se asume que varía con la temperatura de acuerdo con la ecuación de Arrhenius:

$$k = \exp\left[-\frac{E_{act}}{R}\left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_m}\right)\right]$$

Donde E_{act} es la energía de activación (energía entre el estado nativo y el estado de transición), R es la constante de los gases, y T_m es la temperatura que corresponde al máximo de la transición de desnaturalización y donde la k es igual a 1 min^{-1} .

Cada experimento individual de CDB fue ajustado a este modelo. A partir de ello, se construyó el gráfico de Arrhenius ($\ln k$ vs $1/T$, **Figura 27**), tomando valores de k donde se presenta la transición. De este modo, el valor de E_{act} fue obtenido a partir de la pendiente ($m = [E_{act}/R]$) del ajuste lineal de los datos obtenidos a diferente velocidad de barrido.

La extrapolación a 37°C permitió la estimación del tiempo de vida media de cada proteína a esta temperatura:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} = \frac{0.693}{k}$$

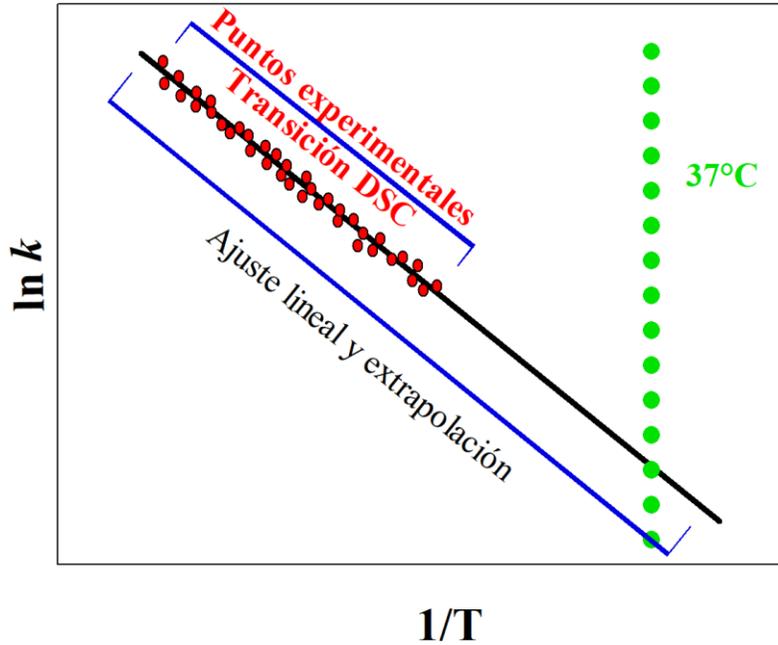


Figura 27. Gráfico de Arrhenius. Ajuste lineal de los puntos experimentales de CDB a diferente velocidad de barrido y su extrapolación a determinada temperatura (37 °C).

La capacidad calorífica aparente en el modelo de dos estados irreversible se da mediante: ⁵⁰⁻⁵²

$$C_p^{APP} = C_p^{PRE} + (C_p^{POST} - C_p^{PRE})(1 - \chi_N) - \Delta H \cdot \left(\frac{d\chi_N}{dT}\right)$$

Donde C_p^{PRE} y C_p^{POST} son las líneas base pre- y pos-transición, las cuales se toman como funciones lineales respecto a la temperatura, χ_N es la fracción mol del estado nativo y ΔH es la entalpía de desnaturalización, es decir, de la transición de $N \rightarrow F$. χ_N y $\frac{d\chi_N}{dT}$ siendo:

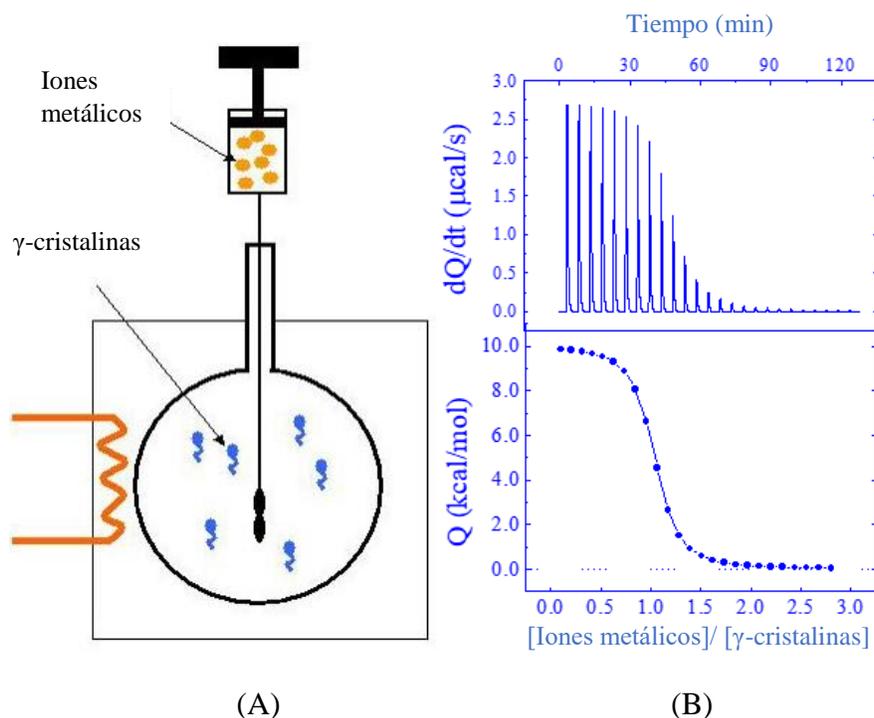
$$\chi_N = \exp \left[- \exp \left(\frac{E_{act} \cdot \Delta T}{R \cdot T_m^2} \right) \right]$$

$$\frac{d\chi_N}{dT} = - \frac{E_{act}}{R \cdot T_m^2} \cdot \exp \left(\frac{E_{act} \cdot \Delta T}{R \cdot T_m^2} \right) \cdot \exp \left[- \exp \left(\frac{E_{act} \cdot \Delta T}{R \cdot T_m^2} \right) \right]$$

Donde $\Delta T = T - T_m$.

4.3 Calorimetría de Titulación Isotérmica (CTI)

Los experimentos de CTI fueron realizados en un microcalorímetro VP-ITC (MicroCal, volumen de 1.42 mL en celda y de 300 μ L en jeringa), en el amortiguador MOPS 20 mM con NaCl 50 mM a pH 7, a 25 $^{\circ}$ C. La solución con proteína fue colocada en la celda a una concentración de 30 μ M (a menos que se especifique otro valor), mientras que en la jeringa se agregó la solución con CuSO₄, ZnSO₄ y HgCl₂ a una concentración de 500 μ M, 700 μ M y 1 mM, respectivamente (**Figura 28A**). Para cada ligando y/o concentración usada se realizó un experimento de titulación del ligando en ausencia de proteína para determinar el calor de dilución, valor que fue restado al experimento en presencia de la proteína. Para todas las mediciones, se realizaron 30 titulaciones de 10 μ L cada una, y el tiempo entre cada titulación fue ajustado dependiendo del sistema. En cada experimento la señal resultante se presenta como en la **Figura 28B** (panel superior), es decir se mide el calor absorbido o liberado en cada titulación respecto al tiempo; estos datos son integrados y se obtiene una curva de energía versus relación molar (panel inferior en la **Figura 28B**).



Mediante esta técnica se determinó la termodinámica de unión entre las cristalinas y los iones metálicos. Dado que se desconoce el modo mediante el cual interactúan, los datos se ajustaron a diversos modelos utilizando el software Affinimeter⁵³, estos modelos pertenecen a las dos principales familias de modelos de unión: equilibrio estequiométrico (ES) y de sitios independientes (SI). Brevemente, los modelos de equilibrio estequiométrico están basados en constantes de equilibrio estequiométrico (o macroscópicas), y son típicamente aplicadas a interacciones de estequiometría baja donde los diferentes sitios de unión pueden acoplarse unos a otros. Por otro lado, los modelos de sitios independientes están basados en constantes de equilibrio sitio específicas (o microscópicas), donde los diferentes sitios de unión no interactúan entre sí, aunque pueden ser agrupados en conjuntos de sitios que tengan valores de afinidad y entalpía de interacción idénticos entre las especies involucradas.⁵³

La elección del mejor modelo para cada sistema se realizó con base en los valores de χ^2 , valor que se encuentra determinado por la siguiente ecuación:

$$\chi^2 = \frac{1}{p} \sum_1^p \frac{(\Delta Q_i^{exp} - \Delta Q_i)^2}{\sigma_i^2}$$

Donde p es número total de puntos, ΔQ_i^{exp} y ΔQ_i es el calor liberado o absorbido por mol de ligando agregado durante la inyección i , a partir de la isoterma al equilibrio del experimento y del modelo aplicado, respectivamente, y σ_i es la incertidumbre en cada punto.

La incertidumbre corresponde a la suma de tres principales contribuciones: (i) debido al ruido en la señal, determinado como el producto de su desviación estándar en la región de la línea base multiplicado por la duración de la perturbación de la señal al inyectar; (ii) la aparición de valores atípicos en la región perturbada, que es evaluada como la diferencia entre el área obtenida por integración numérica del pico experimental y el área correspondiente a la integración de una función matemática ajustada al mismo dato; y (iii) la dispersión de puntos que constituyen la isoterma, estimada a partir de la diferencia entre la interpolación o extrapolación (de funciones polinómicas de primer y segundo orden) de grupos de tres o cuatro puntos secuenciales en la isoterma a la equilibrio. La incertidumbre

total es determinada como la raíz cuadrada de la suma de cuadrados de todas las contribuciones, lo que permite asignar incertidumbres a cada punto experimental.⁵³

A partir de la ecuación anterior, es claro que mientras más bajo sea el valor de χ^2 mejor es el ajuste realizado. De este modo, en el presente trabajo se muestran los resultados obtenidos con los modelos que mejor se ajustaron a los datos de cada sistema proteína/metal. Se reportan los valores obtenidos de: constante de asociación (K), la estequiometría (n), cambio en entalpía (ΔH), cambio en entropía ($-T\Delta S$) y el cambio en energía libre de Gibbs (ΔG), a partir de un ajuste global (con datos de al menos dos experimentos independientes) en el caso de los iones cobre y zinc, y a partir de ajustes individuales con los datos en presencia de mercurio (a excepción del sistema HγD/Hg²⁺, donde se ajustaron globalmente 4 experimentos independientes).

5 Resultados y Discusión

5.1 Estabilidad cinética de γ -cristalinas

5.1.1 Estabilidad cinética de cristalinas H γ C, H γ D y H γ S

Las cristalinas H γ C, H γ D y H γ S fueron desnaturalizadas térmicamente mediante calorimetría diferencial de barrido (CDB), en un intervalo de temperatura de 10 a 100 °C, en el amortiguador MOPS 20 mM con NaCl 50 mM a pH 7, a una concentración de 0.4 mg/mL (19.3 μ M). Las tres proteínas mostraron una sola transición al aumentar la temperatura, con valores de T_m de 83.7, 79.9 y 73.2 °C para H γ D, H γ C y H γ S (**Figura 29A**), respectivamente, lo que indica una alta estabilidad térmica y es congruente con lo reportado.^{11,44,45}

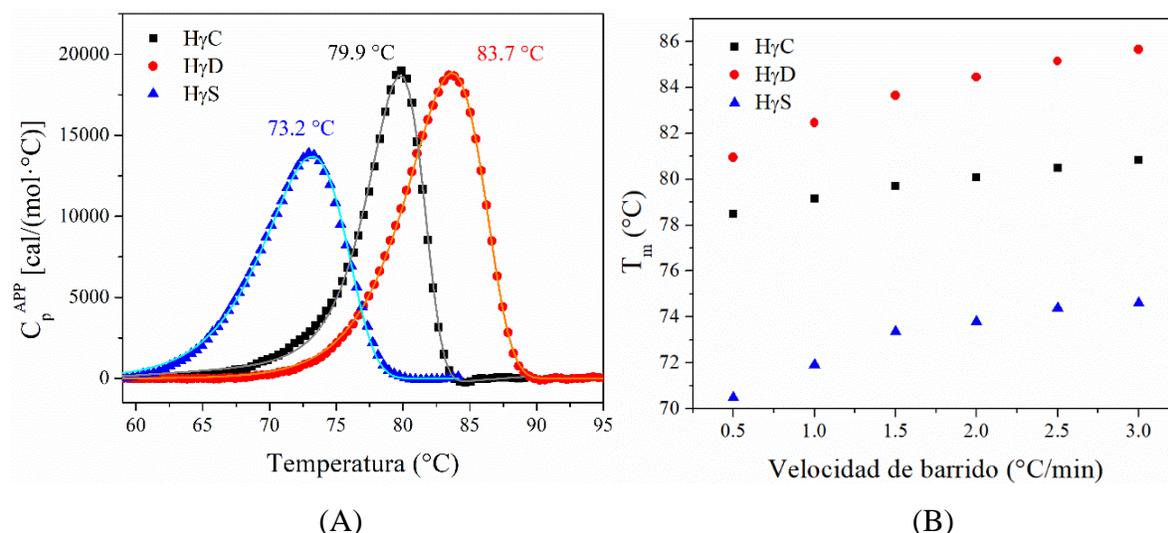


Figura 29. Desnaturalización térmica de H γ C, H γ D y H γ S por CDB. (A) Termogramas de CDB (1.5 °C/min) de H γ C, H γ D y H γ S y su ajuste representativo al modelo de dos estados irreversible. (B) Dependencia de la T_m de H γ C, H γ D y H γ S con respecto a la velocidad de barrido (0.5-3 K/min.).

Las trazas fueron totalmente irreversibles (ausencia de señal en el segundo experimento o barrido de la misma muestra) y presentaron una dependencia de la T_m con respecto a la velocidad de barrido (~ 5 °C, de 0.5 a 3 °C/min), lo que indica que el proceso

está bajo control cinético. La dependencia de la T_m con respecto a la velocidad de barrido se hace evidente en la **Figura 29B**. Para las tres proteínas el efecto es claro, sin embargo, para el caso de la H γ D y H γ S el corrimiento es mayor, con un aumento de ~ 5 °C (desde 0.5 °C/min a 3 °C/min), mientras que para H γ C la diferencia entre la velocidad más rápida y la más lenta es de ~ 3 °C.

Las trazas obtenidas fueron ajustadas a un modelo de dos estados irreversible: $N \xrightarrow{k} F$ (ver Metodología y Apéndice A),^{31, 50-52} donde N es el estado nativo, F es el estado final (estado incapaz de plegarse nuevamente después de la desnaturalización) y k es la constante de velocidad, la cual se asume es de primer orden y que varía con respecto a la temperatura de acuerdo a la ecuación de Arrhenius: $k = \exp\left[-\frac{E_{act}}{R}\left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_m}\right)\right]$.

El ajuste al modelo de dos estados irreversible fue realizado con base en lo detallado en el trabajo de Rodríguez-Larrea et al.⁵⁰ A partir de los datos de dicho ajuste se construyó el gráfico de Arrhenius para las tres proteínas (**Figura 30**), los cuales mostraron una excelente concordancia entre los datos a diferente velocidad de barrido para cada una de las tres cristalinas, con valores de coeficiente de determinación (R^2) de 0.9646, 0.9975 y 0.9907 para H γ C, H γ D y H γ S, respectivamente.

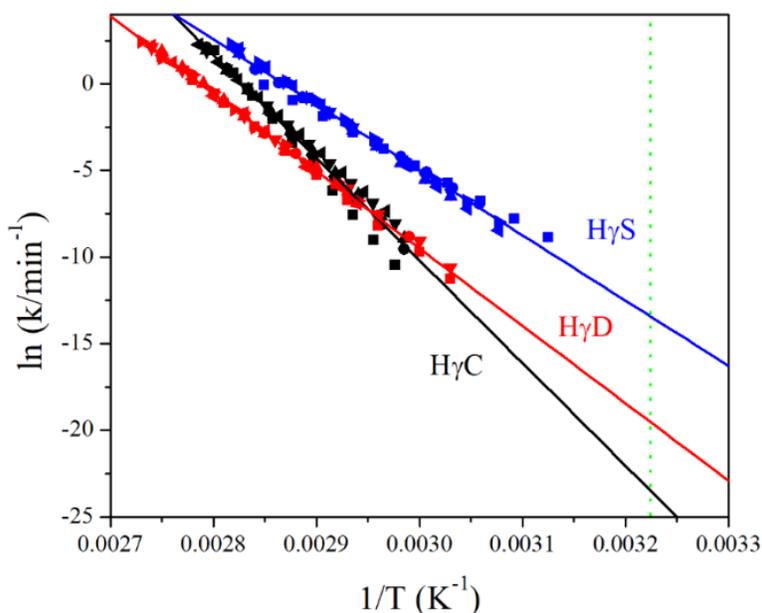


Figura 30. Gráfico de Arrhenius de γ -cristalinas. H γ C (negro), H γ D (rojo) y H γ S (azul), a partir de los datos del ajuste al modelo de dos estados irreversible de las trazas a diferentes velocidades de barrido: 0.5 (■), 1 (●), 1.5 (▲), 2 (▼), 2.5 (◄) y 3 (►) K/min. Los valores de R^2 fueron de 0.9646, 0.9975 y 0.9907 para H γ C, H γ D y H γ S, respectivamente.

Los valores de energía de activación (E_{act}) fueron obtenidos a partir de la pendiente ($m = -[E_{act}/R]$) del ajuste lineal de los gráficos de Arrhenius, siendo de 124.5 ± 3.9 kcal/mol para H γ C, 89.5 ± 0.4 kcal/mol para H γ D y 75.0 ± 1.0 kcal/mol para H γ S (**Tabla 3**).

Posteriormente, para su análisis, el ajuste lineal fue extrapolado hasta el valor equivalente a 37 °C (310.15 K), es decir, 0.003225 K^{-1} (línea punteada en el gráfico). De este modo, el valor de la constante de velocidad (k) a 37 °C (310.15 K) fue obtenida para H γ C, H γ D y H γ S, siendo de 1.74×10^{-11} , 2.97×10^{-9} , $1.47 \times 10^{-6} \text{ min}^{-1}$, respectivamente, y así el tiempo de vida media ($t_{1/2}$) fue calculado para cada proteína (a 37 °C) mediante la siguiente fórmula para una cinética de primer orden: $t_{1/2} = \ln 2/k = 0.693/k$; dando valores aproximados de 75 000, 450 y 1 años, para H γ C, H γ D y H γ S, respectivamente (**Tabla 3**). Esto es congruente con la estabilidad requerida para encontrarse en estado nativo durante toda la vida del individuo. Ya que H γ C y H γ D se expresan en etapas tempranas del desarrollo, y por ende se encuentran en la región nuclear del lente, es de esperar que estas dos proteínas posean un tiempo de vida media muy alto. Sin embargo, el valor obtenido para ambas proteínas es mucho mayor al esperado, en especial para H γ C. Aunque el ajuste de los datos de H γ C en el gráfico de Arrhenius no fue el mejor de las tres proteínas, las réplicas para H γ C (datos no mostrados) difirieron sólo en el número final obtenido, pero se mantuvo el orden de 10^4 años en su tiempo de vida media. Asimismo, los ajustes individuales de las trazas de H γ C se mantuvieron con valores del mismo orden, por lo que se puede afirmar que el tiempo de vida media de esta proteína (en estas condiciones) supera los mil años. Para el caso de la H γ D, su estabilidad cinética (y así su tiempo de vida media) fue corroborado en otro medio, en acetato de amonio 10 mM con NaCl a pH 6.6 (datos no mostrados), y se obtuvo un valor de energía de activación (E_{act}) de 84.4 ± 0.8 kcal/mol y un tiempo de vida media ≈ 160 años. Estos valores, son muy similares a los obtenidos en MOPS, ya que su E_{act} difiere en sólo 5 kcal/mol y su $t_{1/2}$ es del mismo orden de magnitud (10^2 años).

Por otro lado, los datos obtenidos a partir de las trazas calorimétricas de H γ S dieron un tiempo de vida media (a 37 °C) de tan solo un año (gran diferencia con las otras dos cristalinas), y esto es congruente con la expresión tardía en el desarrollo y con una ubicación en la corteza del lente, donde las células son más jóvenes que las nucleares y donde aún existe algo de síntesis proteica.

Aunque los valores de energía de activación para estas tres cristalinas nos son muy grandes (por ejemplo, TIM de *Trypanosoma cruzi* posee una energía de activación de 193.5 kcal/mol)⁵¹, las constantes de velocidad de desplegamiento para las tres proteínas son relativamente pequeñas a 37 °C (en especial para H γ C). Esto debido a que la constante de velocidad no sólo depende del valor de la energía de activación sino que también depende de la estabilidad térmica de las proteínas (T_m), y así de la temperatura a la cual se evalúe.

Como ejemplo tenemos dos casos (**Figura 31**), uno donde los valores de energía de activación son iguales pero la extrapolación a 37 °C da diferentes valores de k ; y el caso contrario cuando diferentes energías de activación dan el mismo valor de k en la extrapolación.

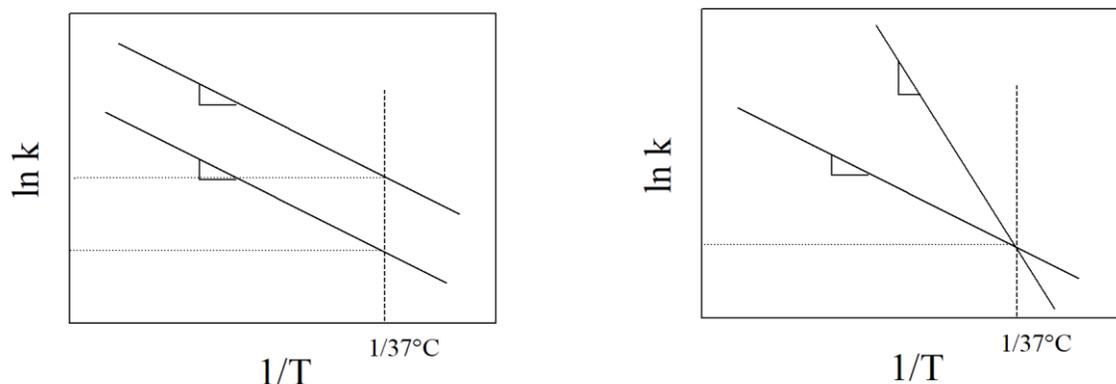


Figura 31. Ejemplos de la relación entre la energía de activación (E_{act}) y la constante de velocidad (k) a 37 °C.

El primer caso es representable en el gráfico de Arrhenius de las cristalinas H γ D y H γ S, donde a pesar de tener un valor relativamente cercano en energía de activación (89.5 y 75.0 kcal/mol, respectivamente, **Tabla 3**), su valor de k a 37 °C difiere por tres órdenes de magnitud (**Tabla 3**, **Figura 30**). Por el contrario, el segundo caso es ejemplificado comparando H γ C y H γ S, donde difieren en energía de activación por aproximadamente 50 kcal/mol (mostrado por diferente pendiente), pero a una temperatura dada, en este caso $\sim 0.0028 \text{ K}^{-1}$ ($\sim 84 \text{ °C}$, **Figura 30**) tendrán un valor igual donde las líneas rectas se crucen, y así su k (y su tiempo de vida media) será igual. Sin embargo, al extrapolarse a una temperatura de 37 °C los valores de k serán muy diferentes, y con ello su tiempo de vida media tendrá magnitudes demasiado distantes entre sí.

Estos resultados demuestran la alta estabilidad cinética que estas tres cristalinas tienen para permanecer en estado nativo durante toda la vida del organismo en ausencia de recambio. Sin embargo, durante el desarrollo del proyecto, un grupo de Estados Unidos publicó un artículo en el cual determinó la estabilidad cinética de H γ D y H γ S, y sus dominios aislados.³⁸ En dicho artículo, los autores reportan el tiempo de vida media para cada muestra, pero a diferencia de nuestro trabajo, ellos utilizaron desnaturalización química y la monitorearon por fluorescencia. Además, ellos asumen que el proceso de desnaturalización sigue un comportamiento de tres estados (a diferencia de nosotros donde todos los experimentos se ajustaron a un modelo de dos estados), y sus resultados fueron determinados a una temperatura de 18 °C, mientras que nuestros datos permitieron obtener valores a temperatura fisiológica de 37 °C. A pesar de las diferencias en los análisis de ambos trabajos, los valores muestran una tendencia similar, en especial para los valores de vida media de las proteínas completas. Para H γ S, mediante ambos enfoques se obtuvo un tiempo de vida media de aproximadamente 1 año, mientras que para H γ D el tiempo estimado fue mayor, siendo de aproximadamente 19 años lo reportado³⁸ y de ~ 450 años en nuestro trabajo por CDB.

Tabla 3. Valores obtenidos a partir de los gráficos de Arrhenius de H γ C, H γ D y H γ S. *Velocidad de barrido de 3 °C/min.

	E_{act} (kcal/mol)	k (min ⁻¹) 37 °C	$t_{1/2}$ (años) 37 °C	T_m (°C) *
HγC	124.5 ± 3.9	1.74 × 10 ⁻¹¹	≈ 75000	80.82
HγD	89.5 ± 0.4	2.97 × 10 ⁻⁹	≈ 450	85.65
HγS	75.0 ± 1.0	1.47 × 10 ⁻⁶	≈ 1	74.61

5.1.2 Estabilidad cinética de los dominios aislados C- y N-terminal de H γ D

La desnaturalización térmica de los dominios aislados C- y N-terminal de H γ D también fue analizada mediante CDB (**Figura 32A**). Del mismo modo que la proteína silvestre H γ D, los dominios presentaron un comportamiento monofásico (una sola transición), con valores de T_m en 73.5 y 60.3 °C (a 1.5 °C/min) para C- y N-terminal, respectivamente, lo que es congruente con reportes previos.⁴⁴ Aunado a esto, las trazas de los dominios aislados fueron irreversibles y el proceso presentó un control cinético, por lo que su estabilidad cinética fue determinada (**Figura 32B**). Para el dominio N-terminal, se obtuvo un valor de E_{act} de 61.4 ± 1.2 kcal/mol y un $t_{1/2}$ a 37 °C de sólo 2 días; mientras que para el dominio C-terminal la E_{act} fue de 97.8 ± 1.3 kcal/mol y su $t_{1/2}$ de aproximadamente 50 años. Lo que indica que el dominio N-terminal es el menos estable cinéticamente y esto es congruente con lo reportado.³⁸ Cabe destacar que a pesar de que el dominio C-terminal tiene un valor de E_{act} mayor que el de la proteína completa (89.5 ± 0.4 kcal/mol), posee un tiempo de vida media 10 veces menor (50 años H γ D-CT vs ~ 450 años H γ D). Esta comparación sugiere que no sólo el C-terminal sirve como estabilizador del N-terminal en la proteína silvestre, sino que hay reciprocidad entre dominios estabilizándose mutuamente.

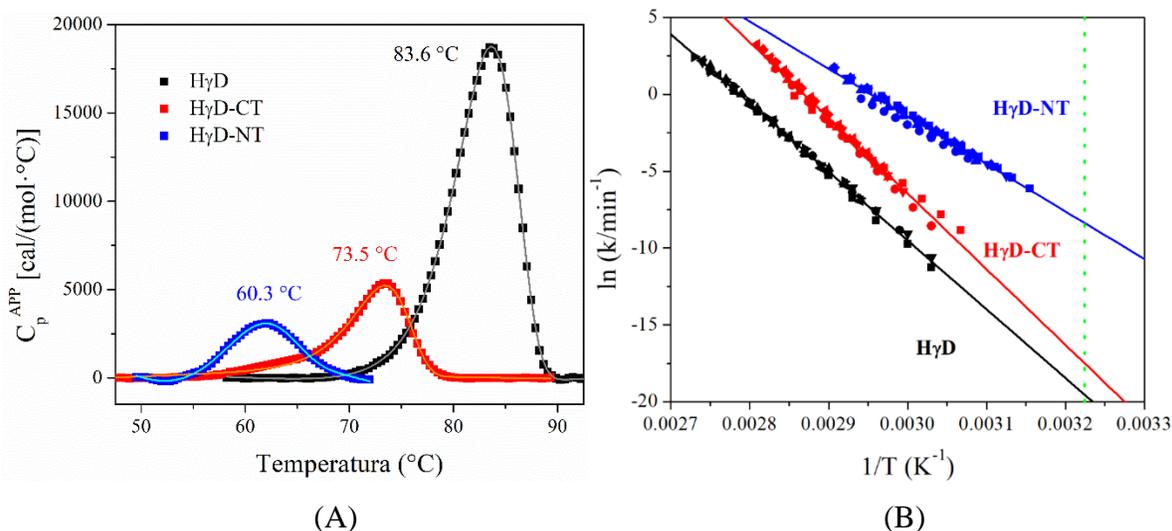


Figura 32. Estabilidad cinética de los dominios aislados N- y C-terminal de H γ D. (A) Termogramas de CDB (1.5 °C/min) de H γ D y sus dominios aislados C- y N-terminal, y su ajuste representativo al modelo de dos estados irreversible. (B) Gráfico de Arrhenius de H γ D (negro) y sus dominios aislados C-terminal (rojo) y N-terminal (azul), a partir de los datos del ajuste al modelo de dos estados irreversible de las trazas a diferentes velocidades de barrido: 0.5 (■), 1 (●), 1.5 (▲), 2 (▼), 2.5 (◄) y 3 (►) K/min. Los valores de R^2 fueron de 0.9975, 0.9897 y 0.9799 para H γ D, H γ D-CT y H γ D-NT, respectivamente.

Comparado con lo reportado por Mills-Henry I. A. et al., los valores en tiempo de vida media para los dominios aislados de H γ D son similares para ambos casos.³⁸ El dominio C-terminal muestra un valor del orden de años (~ 15 por fluorescencia y ~ 50 por CDB), mientras que el dominio N-terminal posee un valor 3 horas a 18 °C (fluorescencia)³⁸ y de 2 días a 37 °C (CDB). A pesar las diferencias experimentales en ambos enfoques, los resultados son similares y se corrobora la mayor estabilidad cinética del dominio C-terminal. Además, en ambos casos se sugiere un papel estabilizador de la región inter-dominio, dada la menor estabilidad cinética ($t_{1/2}$) de los dominios aislados cuando se compara con la proteína completa.

5.1.3 Estabilidad cinética de la mutante H γ D H22Q

Se ha reportado que el residuo H22 de H γ D es el responsable de la agregación inducida por Zn²⁺ en esta proteína, ya que la mutante H γ D H22Q no presenta turbidez en presencia de iones Zn²⁺.⁴⁷ Además, es posible que este residuo también esté involucrado en la interacción con cobre. Por ello para determinar el efecto que produce esta mutación en la estabilidad cinética de H γ D se hicieron mediciones de CDB de esta mutante. Como se observa en la **Figura 33A**, la mutación H22Q afecta ligeramente a la traza de H γ D, ya que se observa un aumento de ~ 2 °C en su T_m , pero presenta un comportamiento similar a la proteína silvestre (H γ D WT, *wild type*). Del mismo modo que H γ D WT, la estabilidad cinética de la mutante H γ D H22Q fue determinada (irreversibilidad y control cinético en la desnaturalización).

El valor obtenido para la E_{act} de esta mutante fue idéntico al de la WT (**Figura 33B**), siendo de 89.6 ± 0.7 kcal/mol (H γ D WT de 89.5 ± 0.4 kcal/mol). Además, el tiempo de vida media estimado para la mutante fue cercano a la WT, con un valor de 740 años para la mutante y 444 años para la WT (**Tabla 4**). Esta desigualdad puede ser atribuida a la ligera diferencia (1.5 °C) entre ambos valores de T_m , 83.6 y 85.1 °C (a 1.5 °C/min) para la WT y mutante, respectivamente (**Figura 33A**).

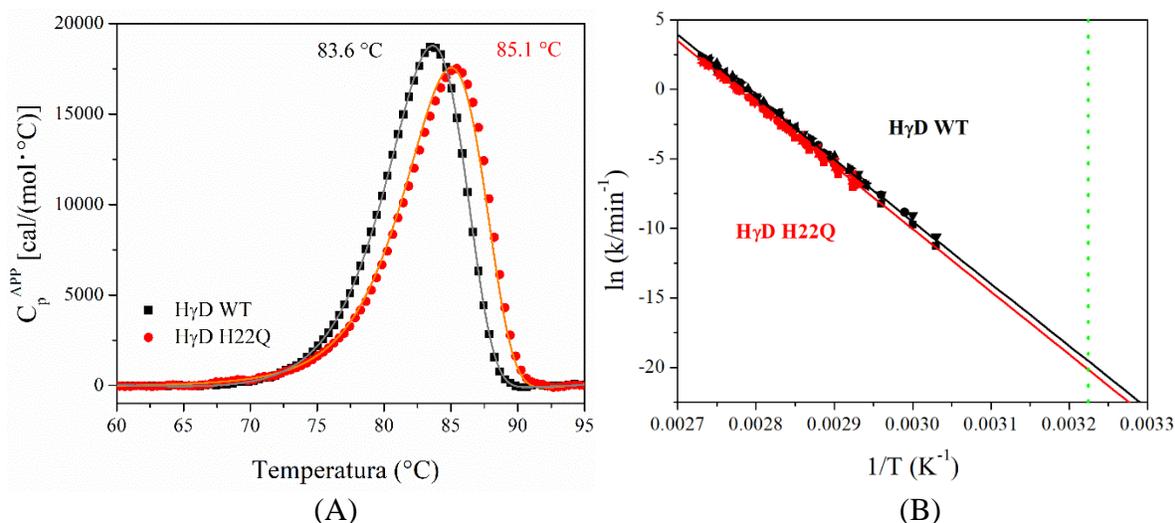


Figura 33. Estabilidad cinética de HyD WT y HyD H22Q. (A) Comparación de los termogramas de CDB (1.5 °C/min) de la cristalina HyD WT y de la mutante HyD H22Q, y su ajuste representativo al modelo de dos estados irreversible. (B) Gráfico de Arrhenius de HyD WT (negro) y HyD H22Q (rojo), a partir de los datos del ajuste al modelo de dos estados irreversible de las trazas a diferentes velocidades de barrido: 0.5 (■), 1 (●), 1.5 (▲), 2 (▼), 2.5 (◄) y 3 (►) K/min. Los valores de R^2 fueron de 0.9975 y 0.9967, para HyD WT y HyD H22Q, respectivamente.

Tabla 4. Valores obtenidos a partir de los gráficos de Arrhenius de HyC, HyS, HyD, HyD C-terminal (HyD-CT), HyD N-terminal (HyD-NT) y HyD H22Q. *Velocidad de barrido de 3 °C/min.

	E_{act} (kcal/mol)	k (min ⁻¹) 37 °C	$t_{1/2}$ (días) 37 °C	T_m (°C) *
HyC	124.5 ± 3.9	1.74 × 10 ⁻¹¹	2.8 × 10 ⁷	80.82
HyS	75.0 ± 1.0	1.47 × 10 ⁻⁶	3.3 × 10 ²	74.61
HyD	89.5 ± 0.4	2.97 × 10 ⁻⁹	1.6 × 10 ⁵	85.65
HyD-CT	97.8 ± 1.3	2.55 × 10 ⁻⁸	1.9 × 10 ⁴	75.39
HyD-NT	61.4 ± 1.2	2.33 × 10 ⁻⁴	2	63.74
HyD H22Q	89.6 ± 0.7	1.78 × 10 ⁻⁹	2.7 × 10 ⁵	86.91

5.2 Efecto de los iones Cu^{2+} sobre la estabilidad cinética de γ -cristalinas y su interacción

5.2.1 Efecto de los iones Cu^{2+} sobre la estabilidad cinética de H γ D y sus dominios aislados, y su interacción

En 2016, Quintanar L. et al. demostraron el fenómeno de agregación de H γ D inducida por cobre y zinc, el cual es un efecto dependiente de concentración y genera agregados del tipo no amiloide de alto peso molecular, y ocurre a través de diferentes mecanismos (ej. formación de puentes disulfuro, desplegamiento de estructura secundaria, desestabilización térmica, etc.).⁴⁵ Con el objetivo de comprender mejor este fenómeno se decidió analizar, por CDB, el proceso de desnaturalización térmica de H γ D en presencia de diferentes equivalentes de Cu^{2+} . Los resultados se observan en la **Figura 34A**, donde se puede ver claramente que la presencia de Cu^{2+} altera su comportamiento al producir la aparición de una nueva transición a menor temperatura, mientras que la señal correspondiente a la proteína silvestre disminuye hasta desaparecer completamente en presencia de 3 equivalentes de Cu^{2+} , donde sólo se observó la nueva transición a 71.9 °C. Esto contrasta con lo reportado por DC,⁴⁴ donde la presencia de cualquier número de equivalentes de cobre genera una sola transición. Sin embargo, esta diferencia es atribuible a que cada técnica mide diferentes propiedades del sistema. A pesar de ello, se mantiene una tendencia similar de disminución en la T_m al aumentar la concentración de cobre, siendo muy cercano cuando 3 equivalentes están presentes (concentración a la cual una sola transición es detectable por ambas técnicas) con un valor reportado de 75.5 °C por DC, mientras que por CDB se obtiene un valor de 73.4 °C (a la misma velocidad de barrido, 3 °C/min, ver **Tabla 5**). De este modo, se determinó la estabilidad cinética de H γ D en presencia de 3 equivalentes de Cu^{2+} , la cual fue mucho menor que en ausencia de este metal; ya que, aunque el valor de E_{act} sólo se redujo ~ 6.4 kcal/mol, su $t_{1/2}$ pasó de ~ 450 años a sólo ~ 1.5 años, lo que significa una disminución de poco más de 300 veces (**Tabla 5** y **Figura 34D**). Esto aunado a que su T_m decreció alrededor de 12 °C en presencia de 3 equivalentes de Cu^{2+} , como es evidente en la **Figura 34A**.

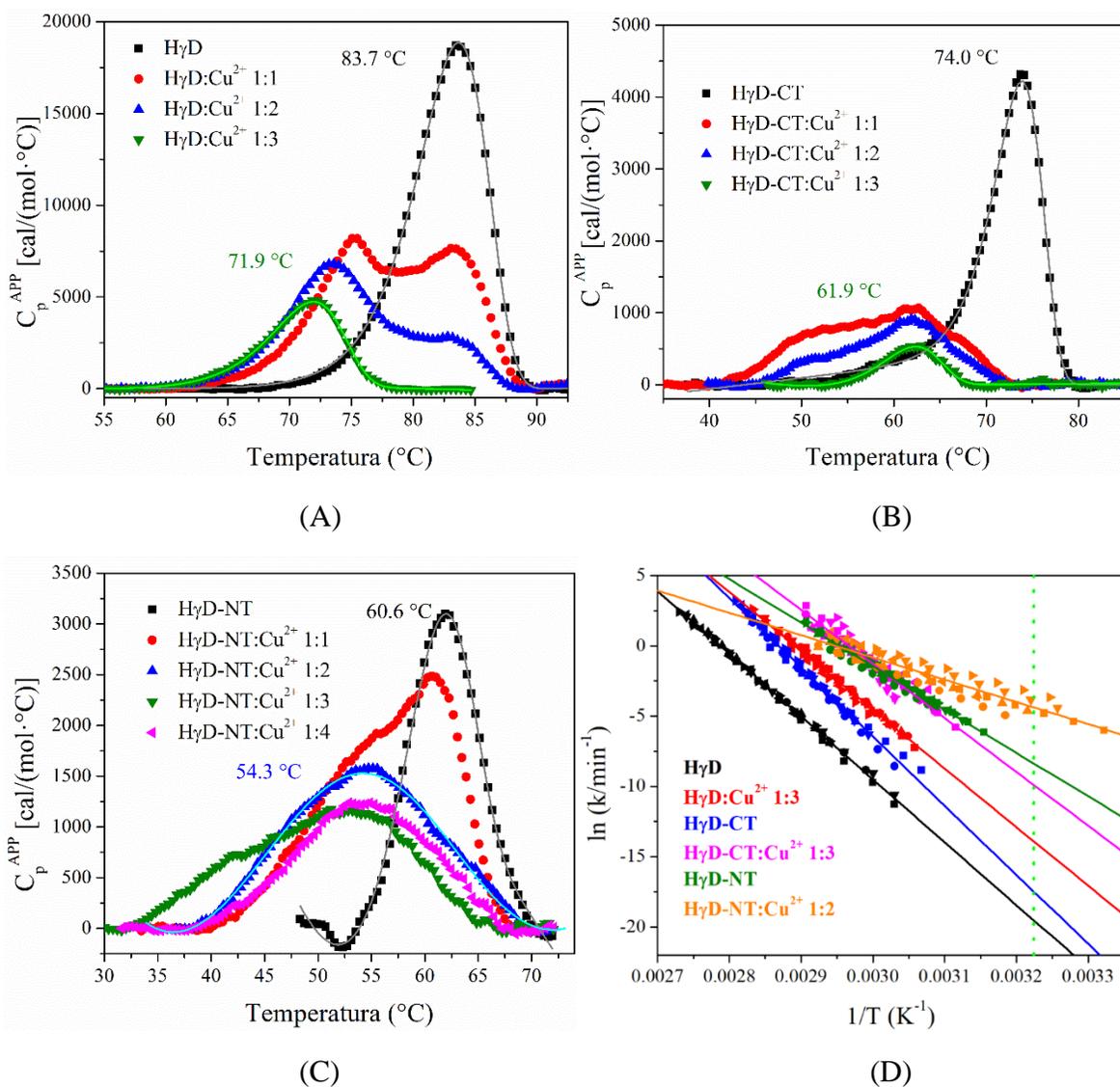


Figura 34. Estabilidad cinética de HyD y sus dominios aislados N- y C-terminal en presencia de cobre. Termogramas de CDB (1.5 °C/min) de HyD (A) y sus dominios aislados C- (B) y N-terminal (C) en presencia de diferentes equivalentes de cobre, con su ajuste representativo al modelo de dos estados irreversible. (D) Gráfico de Arrhenius de HyD y sus dominios aislados C- y N-terminal en ausencia (negro, azul y verde, respectivamente) y presencia de cobre (rojo, rosa y naranja, respectivamente), a partir de los datos del ajuste al modelo de dos estados irreversible de las trazas a diferentes velocidades de barrido: 0.5 (■), 1 (●), 1.5 (▲), 2 (▼), 2.5 (◄) y 3 (►) K/min. Los valores de R^2 fueron de 0.9975, 0.9897 y 0.9799 para HyD, HyD-CT y HyD-NT en ausencia de cobre, respectivamente, y de 0.9911, 0.9232 y 0.8707, para HyD, HyD-CT y HyD-NT en presencia de cobre, respectivamente.

El mismo análisis se llevó a cabo para los dominios aislados C-terminal y N-terminal de HyD; se realizaron mediciones de CDB de ambos dominios en presencia de diferentes equivalentes de Cu^{2+} (**Figura 34B y 34C**). El comportamiento de las trazas calorimétricas de los dominios aislados de HyD fue diferente al de la proteína completa. Para el caso del dominio C-terminal, en presencia de 1 equivalente de Cu^{2+} se observan tres transiciones aparentes (~ 50 , ~ 62 y ~ 67 °C), aunque ninguna parece corresponder a la transición del dominio sin metal (contrario a lo observado en la proteína completa HyD con 1 equivalente de Cu^{2+}), las cuales disminuyen en intensidad cuando 2 equivalentes de Cu^{2+} están presentes, mientras que en presencia de 3 equivalentes de Cu^{2+} se logra observar una sola transición a 61.9 °C (**Figura 34B**). Este valor es mayor al reportado por DC, donde la T_m disminuye hasta 54.8 °C en presencia de 3 equivalentes de cobre; curiosamente a esa temperatura es donde se observa otra transición por CDB en presencia de 1 y 2 equivalentes de cobre.⁴⁴ Una posible explicación a esta discrepancia puede ser la formación de dímeros (puente metálico), donde por DC al observar la estructura secundaria sólo se detecta la transición en ~ 55 °C, mientras que por CDB se detecta esta misma conformación a relaciones bajas de proteína-metal, pero la forma predominante a mayores concentraciones (3 equivalentes) es el dímero y sólo ésta se detecta. Esta hipótesis sería soportada con experimentos en presencia de EDTA, ya que se ha observado que el mecanismo de formación de puente metálico (*metal-bridging*) es uno de los (varios) involucrados en el fenómeno de agregación de cristalinas inducida por metales.⁴⁴

Por otro lado, el termograma del dominio N-terminal en presencia de 1 equivalente de Cu^{2+} presenta un máximo alrededor de los 60 °C (cercano a lo observado en ausencia de metal) y un hombro a menor temperatura (~ 55 °C), mientras que en presencia de 2 equivalentes de Cu^{2+} sólo la transición a menor temperatura es detectable. Sin embargo, en presencia de 3 equivalentes de Cu^{2+} la traza calorimétrica muestra un nuevo pico en aproximadamente 40 °C, el cual desaparece en presencia de más equivalentes de metal y regresa al comportamiento observado con 2 equivalentes de Cu^{2+} (**Figura 34C**). A diferencia de lo observado con el dominio C-terminal, en el caso de HyD-NT los valores en T_m detectados por CDB son muy similares a los de DC, ya que en presencia de 2 equivalentes se obtiene una T_m de 57.1 °C (**Tabla 5**) por CDB, mientras que DC da un valor de 54.3 °C a las mismas condiciones.⁴⁴

Tabla 5. Valores obtenidos a partir de los gráficos de Arrhenius de HyD y sus dominios aislados C- (HyD-CT) y N-terminal (HyD-NT) en ausencia y presencia de cobre. *Velocidad de barrido de 3 °C/min.

	E_{act} (kcal/mol)	$t_{1/2}$ (días) 37 °C	$\frac{t_{1/2} \text{ sin Cu}^{2+}}{t_{1/2} \text{ con Cu}^{2+}}$	T_m (°C) *	ΔT_m (°C) *
HyD	89.5 ± 0.4	1.6 × 10 ⁵		85.65	
HyD:Cu²⁺ 1:3	83.1 ± 1.0	5.3 × 10 ²	≈ 300	73.38	12.27
HyD-CT	97.8 ± 1.3	1.9 × 10 ⁴		75.39	
HyD-CT:Cu²⁺ 1:3	70.9 ± 2.0	5	≈ 3,800	63.58	11.81
HyD-NT	61.4 ± 1.2	2		63.74	
HyD-NT:Cu²⁺ 1:2	31.5 ± 1.6	0.04	≈ 50	57.08	6.66

Posteriormente, se determinó la estabilidad cinética de los dominios aislados en presencia de 3 y 2 equivalentes de Cu²⁺ para C- y N-terminal, respectivamente. El gráfico de Arrhenius obtenido para el dominio C-terminal en presencia de 3 equivalentes de Cu²⁺ dio un valor de E_{act} de 70.9 ± 2.0 kcal/mol y un $t_{1/2}$ (37 °C) de sólo 5 días, lo que implica una disminución de más de 25 kcal/mol en su energía de activación (E_{act}) y un dramático descenso en tiempo de vida media de casi 4,000 veces en presencia de Cu²⁺ (**Figura 34D** y **Tabla 5**). Por el contrario, la presencia de 2 equivalentes de Cu²⁺ en el dominio N-terminal reduce el tiempo de vida media sólo 50 veces (de 2 días a 1 hora), pero su E_{act} disminuyó hasta cerca de la mitad (**Figura 34D** y **Tabla 5**). Esto indica que a pesar de que el dominio N-terminal es el menos estable cinéticamente en condiciones nativas, es el que menor disminución en estabilidad muestra cuando iones Cu²⁺ están presentes, mientras que el dominio C-terminal es el que más se desestabiliza en presencia de Cu²⁺, incluso en mayor medida que la proteína completa. Además, la T_m del dominio N-terminal disminuyó menos de 7 °C, mientras que en el dominio C-terminal y en la proteína completa su valor de T_m disminuyó alrededor de 12 °C.

Por otro lado, mediante el uso de calorimetría de titulación isotérmica (CTI) se pretendió averiguar el modo de interacción entre HyD y los iones Cu²⁺. Debido a la complejidad del estudio de metales mediante CTI, se buscó el amortiguador que menor interacción mostrara con cobre, el cual fue MOPS (3-(N-morfolino) ácido propanosulfónico).

De igual modo se buscaron las condiciones adecuadas en concentración, tiempo y volumen de inyección para evitar la señal obtenida por el fenómeno de agregación.

Se realizaron mediciones de CTI de H γ D (30 μ M) con CuSO $_4$ (500 μ M), con 30 titulaciones de 10 μ L. Los datos de varios experimentos fueron procesados con el software Affinimeter⁵³ y diversos modelos de ajuste fueron aplicados. Para este sistema H γ D/Cu $^{2+}$ dos modelos ajustaron los datos de manera muy similar, uno de ellos fue de equilibrio estequiométrico $P + M \leftrightarrow PM + M \leftrightarrow PM_2$, donde P es la proteína y M es el metal; mientras que el otro modelo fue de sitios independientes con un solo conjunto de sitios, el cual dio una estequiometría (n) igual a 1.5 lo que indicaría que tres iones Cu $^{2+}$ interactúan con dos moléculas de H γ D (**Figura 35A**).

Las mismas condiciones en concentración se mantuvieron para el análisis de la interacción entre los dominios aislados C- y N-terminal con Cu $^{2+}$. Para el sistema H γ D-CT/Cu $^{2+}$ el mejor modelo que describió la interacción fue el de sitios independientes con un solo conjunto de sitios, con una $n = 0.5$, lo que indicaría que dos moléculas del dominio C-terminal interactúan con un ion Cu $^{2+}$ (**Figura 35A**). De manera similar, los resultados obtenidos para el sistema H γ D-NT/Cu $^{2+}$ sugieren que dos moléculas del dominio N-terminal interactúan con un ion Cu $^{2+}$, pero en este caso el modelo que ajustó mejor los datos fue de equilibrio estequiométrico $2P + M \leftrightarrow P_2M$ (**Figura 35A**). Cabe mencionar que en nuestro análisis sólo se muestran los mejores ajustes obtenidos, con el fin de obtener un acercamiento sobre el posible mecanismo de interacción (y así de agregación) de las γ -cristalinas con metales, ya que no se puede asegurar que los modelos sean correctos dado que faltaría corroborar estos datos mediante el uso de alguna otra técnica. En este sentido, el grupo de la Dra. Liliana Quintanar (de manera paralela) ha estudiado a H γ D en presencia de cobre mediante EPR (resonancia paramagnética de electrón) y XAS (espectroscopia de absorción de rayos X), lo que ha dado como resultado la presencia de dos señales de Cu $^{2+}$ y una de Cu $^+$ (comunicación personal y ref. 44), lo que sugiere que el modelo de sitios independientes con $n = 1.5$, al que se ajustaron los datos de CTI de H γ D/ Cu $^{2+}$, es el correcto. En contraste, los datos termodinámicos (ΔG , ΔH y $-T\Delta S$) obtenidos por CTI muestran que existe una mayor semejanza entre los valores del sistema H γ D/Cu $^{2+}$ adquiridos a partir del ajuste al modelo de equilibrio estequiométrico $P + M \leftrightarrow PM + M \leftrightarrow PM_2$ y los datos termodinámicos de las interacciones de cada dominio aislado con el metal (**Figura 35B**).

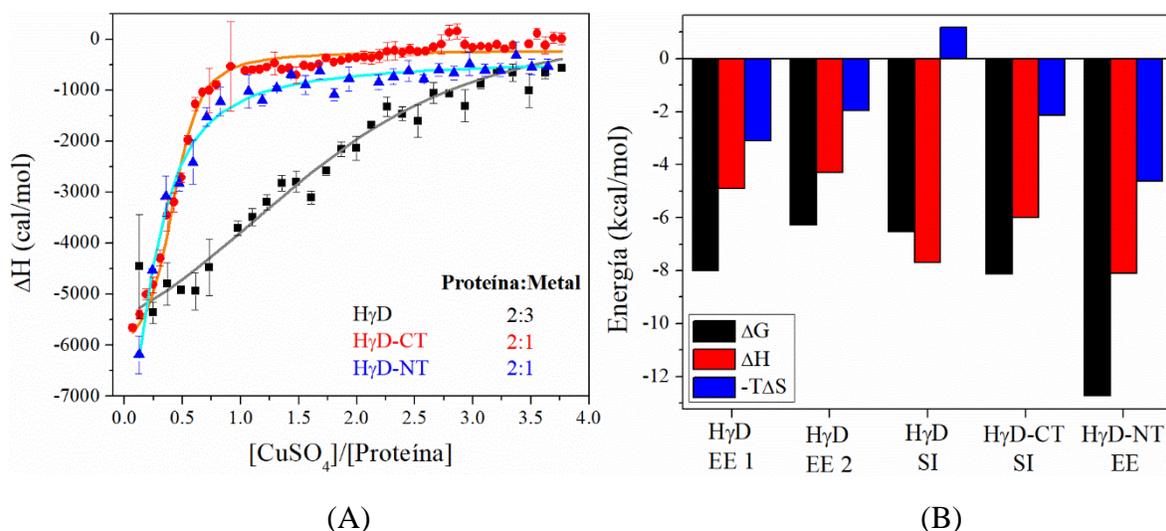


Figura 35. Interacción de HyD y sus dominios aislados con cobre. (A) Experimentos de CTI, y su correspondiente ajuste, de HyD (negro) y sus dominios aislados C- (rojo) y N-terminal (azul) con cobre. (B) Valores termodinámicos obtenidos de la interacción de HyD y sus dominios aislados con cobre, ver Tabla C2 en Apéndice C. EE, Equilibrio estequiométrico (1, reacción 1; 2, reacción 2); SI, Sitios independientes.

Así, los resultados globales obtenidos por CTI (HyD y sus dominios aislados con Cu^{2+}) nos plantean dos posibles escenarios en la interacción de HyD con cobre: en primer lugar está la posibilidad de que HyD interactúe con 3 iones Cu^{2+} , donde cada dominio une a un ion y otro ion (quizá) se une en la región inter-dominio de la proteína completa; y por otro lado, es probable que HyD interactúe sólo con dos iones cobre, uno en cada dominio.

De este modo, sabiendo que al menos dos iones Cu^{2+} interactúan con HyD y con lo observado en CDB, podemos especular que, a pesar de que el dominio C-terminal es el más sensible a la desestabilización inducida por Cu^{2+} , en la proteína completa el dominio N-terminal es el que más sufre desestabilización dada su mayor afinidad por este metal (K en **Tabla 6**), ya que para el dominio N-terminal su constante de asociación es del orden de 10^9 , mientras que para el dominio C-terminal es de apenas 10^5 M^{-1} .

Tabla 6. Resultados obtenidos a partir del ajuste de los experimentos de CTI de HyD y sus dominios aislados HyD-CT y HyD-NT con cobre.

Sistema	Modelo (Proteína:Metal)	K (M^{-1})	ΔH (cal/mol)
HyD/ Cu^{2+}	Sitios independientes ($n = 1.5$) 2:3	$6.0 \pm 0.4 \times 10^4$	$-7.7 \pm 0.3 \times 10^3$
HyD-CT/ Cu^{2+}	Sitios independientes ($n = 0.5$) 2:1	$9.3 \pm 0.3 \times 10^5$	$-6.0 \pm 0.04 \times 10^3$
HyD-NT/ Cu^{2+}	$2P + M \leftrightarrow P_2M$ 2:1	$2.1 \pm 0.1 \times 10^9$	$-8.1 \pm 0.2 \times 10^3$

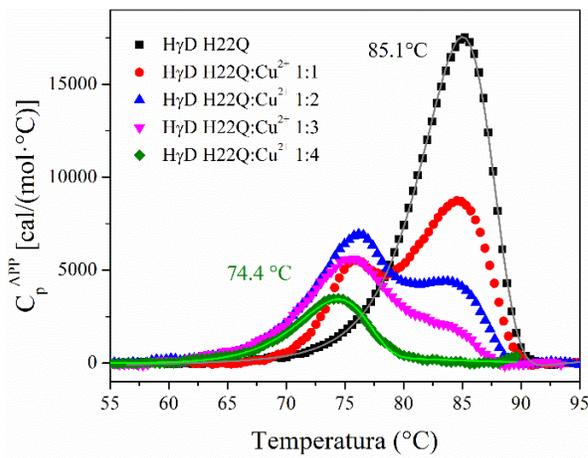
5.2.2 Efecto de los iones Cu^{2+} sobre la estabilidad cinética de HyD H22Q y su interacción

En 2018, Domínguez-Calva et al. demostraron que el residuo de histidina 22 en HyD es el principal responsable de la agregación inducida por iones Zn^{2+} .⁴⁷ Con base en lo anterior, se pretendió analizar si este residuo también juega un papel en la agregación de HyD inducida por Cu^{2+} , por ello se realizaron mediciones de CDB de la mutante HyD H22Q en presencia de diferentes equivalentes de Cu^{2+} (**Figura 36A**). A diferencia de lo observado con la proteína silvestre HyD, esta mutante muestra una mayor resistencia al efecto desestabilizador de iones Cu^{2+} , ya que en presencia de 3 equivalentes de Cu^{2+} la mutante sigue presentando la transición correspondiente a la conformación sin metal (**Figura 36B**).

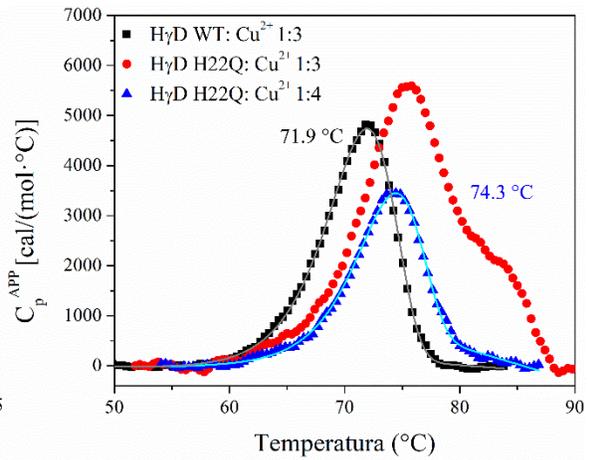
Sin embargo, al determinar la estabilidad cinética de la mutante HyD H22Q con 4 equivalentes de iones Cu^{2+} , se observó que es menos estable que la proteína silvestre en presencia de 3 equivalentes de Cu^{2+} , ya que el gráfico de Arrhenius (**Figura 36C**) dio una energía de activación (E_{act}) de 51.3 ± 1.8 kcal/mol y un $t_{1/2}$ (37 °C) de sólo 6 días (**Tabla 7**). Esto representa que, a pesar de que la mutante requiere de un mayor número de equivalentes de cobre para desestabilizarse, se llega a un estado que es cinéticamente menos estable que en la proteína silvestre. No obstante, las diferencias en T_m debido a la presencia de cobre son prácticamente iguales en la proteína silvestre y la mutante, ya que en ambas la T_m disminuye poco más de 12 °C en presencia de cobre, 3 y 4 equivalentes para WT y H22Q, respectivamente (**Tabla 7**).

Tabla 7. Valores obtenidos a partir de los gráficos de Arrhenius de HyD WT y HyD H22Q en ausencia y presencia de cobre. *Velocidad de barrido de 3 °C/min.

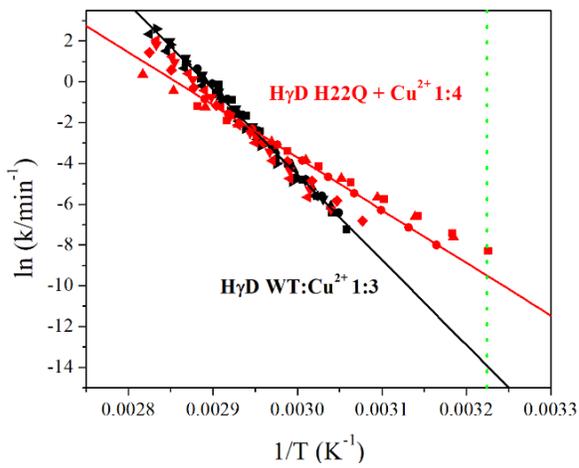
	E_{act} (kcal/mol)	$t_{1/2}$ (días) 37 °C	$\frac{t_{1/2} \text{ sin } \text{Cu}^{2+}}{t_{1/2} \text{ con } \text{Cu}^{2+}}$	T_m (°C) *	ΔT_m (°C) *
HyD WT	89.5 ± 0.4	1.6×10^5		85.65	
HyD WT:Cu²⁺ 1:3	83.1 ± 1.0	5.3×10^2	≈ 300	73.38	12.27
HyD H22Q	89.6 ± 0.7	2.7×10^5		86.91	
HyD H22Q:Cu²⁺ 1:3	51.3 ± 1.8	6	$\approx 45,000$	74.31	12.60



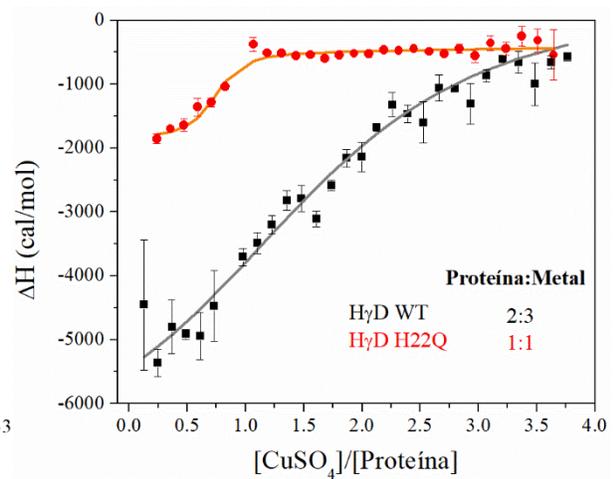
(A)



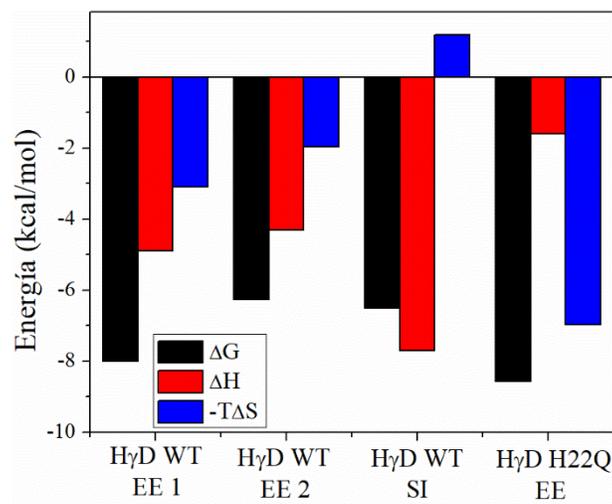
(B)



(C)



(D)



(E)

Figura 36. Estabilidad cinética de H γ D H22Q en presencia de cobre, y su interacción. (A) Termogramas de CDB (1.5 °C/min) de H γ D H22Q en presencia de diferentes equivalentes de cobre, con su ajuste representativo al modelo de dos estados irreversible. (B) Comparación de los termogramas de CDB de H γ D WT y H γ D H22Q en presencia de 3 y/o 4 equivalentes de cobre. (C) Gráfico de Arrhenius de H γ D WT y H γ D H22Q en presencia de 3 y 4 equivalentes de cobre, respectivamente, a partir de los datos del ajuste al modelo de dos estados irreversible de las trazas a diferentes velocidades de barrido: 0.5 (■), 1 (●), 1.5 (▲), 2 (▼), 2.5 (◄) y 3 (►) K/min. Los valores de R^2 fueron de 0.9911 y 0.9354 para H γ D WT:Cu $^{2+}$ y H γ D H22Q:Cu $^{2+}$, respectivamente. (D) Experimento de CTI del sistema H γ D H22Q/Cu $^{2+}$ (rojo), y su ajuste correspondiente, comparado con el sistema H γ D WT/Cu $^{2+}$ (negro). (E) Valores termodinámicos obtenidos de la interacción de H γ D WT y H γ D H22Q con cobre, ver Tabla C2 en Apéndice C. EE, Equilibrio estequiométrico (1, reacción 1; 2, reacción 2); SI, Sitios independientes.

Para continuar con el análisis del papel que juega el residuo His22 en la agregación de H γ D inducida por cobre, se realizaron mediciones de CTI de la mutante H γ D H22Q con CuSO $_4$ (**Figura 36D**), donde el modelo que mejor se ajustó a los datos representa una interacción simple, es decir, un monómero de H γ D H22Q interacciona con un ion de Cu $^{2+}$. Este resultado sugiere que el residuo His22 en la proteína silvestres interactúa directamente con un ion Cu $^{2+}$ (y quizá participe de manera indirecta con la unión de otro Cu $^{2+}$, el cual se especula se une a la región inter-dominio). También se observó que la interacción entre H γ D H22Q y cobre está bajo control entrópico (**Figura 36E**), lo que posiblemente involucre un reacomodo en la estructura de la proteína que produce una mayor desestabilización en la mutante (como lo indican los resultados de CDB), pero que la ausencia de un sitio de unión provoque que se necesite de una mayor concentración de cobre para alcanzar el estado final.

Además, el valor obtenido de la constante de unión entre la mutante y el cobre es muy cercano al observado con el sistema H γ D-CT/Cu $^{2+}$ (9.3×10^5 versus 1.9×10^6 M $^{-1}$ para el dominio C-terminal y la mutante, respectivamente, **Tabla 6 y 8**), lo que sugiere que la señal detectada en ambos sistemas representa la unión del Cu $^{2+}$ en el mismo sitio. A pesar de que en el dominio se indica la unión de dos macromoléculas, mientras que en la mutante es sólo una, puede deberse a la naturaleza de cada sistema, ya que en la mutante la presencia del dominio N-terminal puede alterar dicha unión.

Tabla 8. Resultados obtenidos a partir del ajuste de los experimentos de CTI de H γ D WT y H γ D H22Q con cobre.

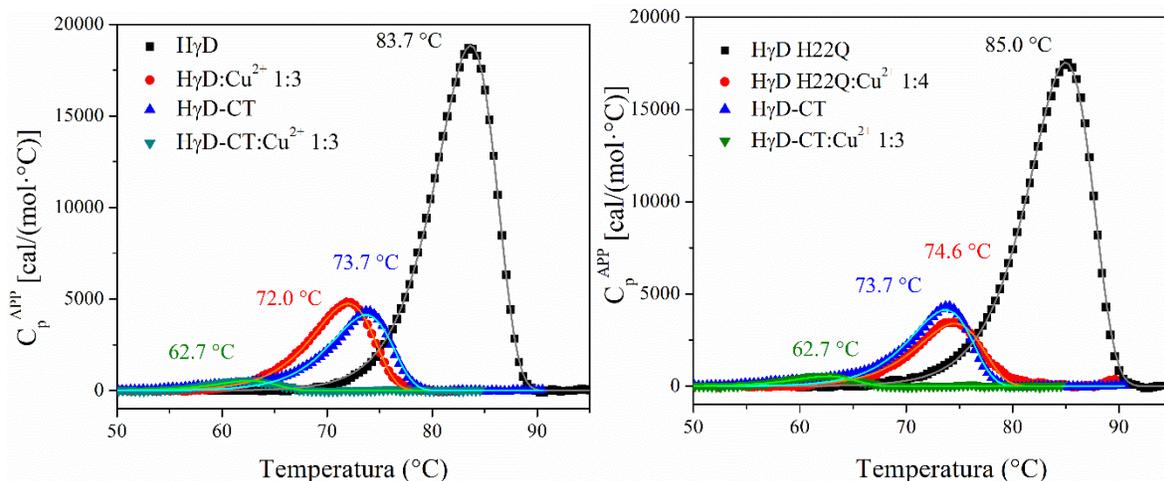
Sistema	Modelo (Proteína:Metal)	K (M $^{-1}$)	ΔH (cal/mol)
H γ D WT/Cu $^{2+}$	Sitios independientes ($n = 1.5$) 2:3	$6.0 \pm 0.4 \times 10^4$	$-7.7 \pm 0.3 \times 10^3$
H γ D H22Q/Cu $^{2+}$	$P + M \leftrightarrow PM$ 1:1	$1.9 \pm 0.4 \times 10^6$	$-1.6 \pm 0.1 \times 10^3$

5.2.3 Mecanismo de agregación de HγD inducida por Cu²⁺

Los resultados anteriores demostraron el efecto de los iones Cu²⁺ sobre la estabilidad cinética de la proteína HγD y sus dominios aislados, y el papel que lleva a cabo el residuo His22 en la interacción con dicho metal.

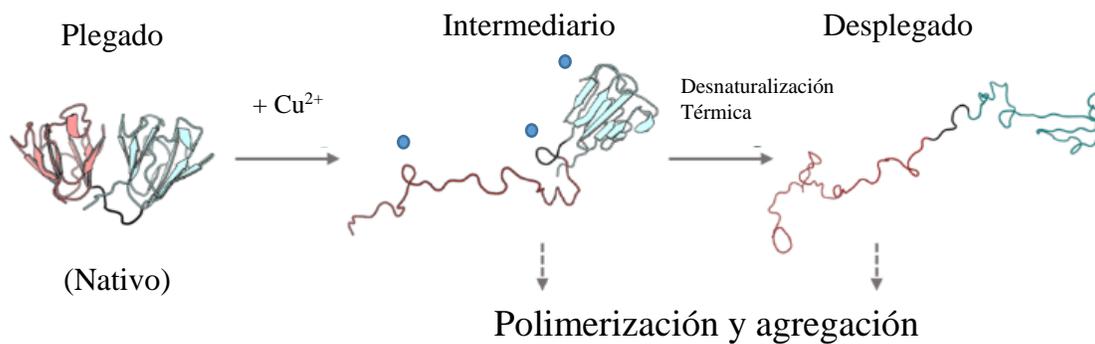
Aunado a esto, se identificó una gran similitud en lo obtenido por CDB entre la traza calorimétrica de HγD con 3 equivalentes de Cu²⁺ y el termograma del dominio aislado C-terminal en ausencia de metal (**Figura 37A**). Esto sugiere que la presencia de 3 equivalentes de Cu²⁺ en HγD genera un intermediario parcialmente desplegado, es decir, el cobre promueve el desplegamiento del dominio N-terminal mientras que el dominio C-terminal permanece en estado nativo (**Figura 37C**).

De igual modo, esta característica fue observada en el experimento de CDB de HγD H22Q en presencia de 4 equivalentes de iones Cu²⁺. Pero en este caso, el resultado fue prácticamente idéntico a lo obtenido con el dominio aislado C-terminal en ausencia de cobre (**Figura 37B**). La diferencia en T_m fue menor a 1 °C, y tanto la forma como la intensidad de la señal fueron casi idénticas, así como su estabilidad cinética ($t_{1/2}$ de 5 y 6 días para HγD H22Q con 4 equivalentes de cobre y el dominio C-terminal sin metal, respectivamente). Además, considerando los datos obtenidos de CTI, donde se obtuvieron resultados semejantes entre estas dos muestras, podemos deducir que el mecanismo de agregación de HγD involucra un intermediario parcialmente plegado, y que el residuo His22 no participa en dicho mecanismo, pero sí interacciona con cobre y contribuye a la desestabilización de HγD.



(A)

(B)



(C)

Figura 37. El mecanismo de agregación de H γ D inducida por cobre involucra una especie parcialmente plegada. (A) Termogramas de CDB de H γ D y su dominio aislado C-terminal en ausencia y presencia de 3 equivalentes de cobre. (B) Termogramas de CDB de H γ D H22Q y el dominio aislado C-terminal en ausencia y presencia de 4 y 3 equivalentes de cobre, respectivamente. (C) Posible mecanismo de agregación de H γ D inducida por cobre a través de la presencia de intermediarios parcialmente plegados, modificada de ref. 54.

5.2.4 Efecto de los iones Cu^{2+} sobre la estabilidad cinética de H γ C y H γ S, y su interacción

Del mismo modo que con H γ D, se determinó el efecto de los iones Cu^{2+} sobre la estabilidad de las cristalinas H γ C y H γ S. Para ello se realizaron mediciones de CDB de H γ C y H γ S en presencia de diferentes equivalentes de cobre. En presencia de 1 equivalente de cobre, H γ C presenta dos transiciones, una correspondiente a la proteína nativa, y una a menor temperatura alrededor de 68 °C, en cambio, en presencia de 2 equivalentes se observan 3 posibles transiciones, mientras que con 3 equivalentes sólo se detecta una, la cual fue intensificada en presencia de 4 equivalentes de cobre (**Figura 38A**). Por otro lado, la presencia de iones Cu^{2+} afectó totalmente el proceso de desnaturalización de H γ S, incluso en presencia de un solo equivalente de cobre. Sin embargo, no fue hasta que se agregaron 4 equivalentes de cobre donde se pudo observar sólo una transición bien definida (**Figura 38B**).

En ambos casos (al igual que con H γ D) los valores de T_m obtenidos por CDB en presencia de 4 equivalentes de cobre son muy similares a los obtenidos por DC⁴⁴ (**Figura 38C**). Para H γ C, la T_m detectada por DC fue de 66.1 °C, mientras que por CDB el valor llegó a 62.5. A su vez, los valores de T_m de H γ S en presencia de 4 equivalentes de cobre difirieron en menos de 1 °C, siendo 66.4 °C por DC vs 67.3 °C por CDB. Asimismo, el comportamiento observado por ambas técnicas fue muy parecido para cada una de las estas dos cristalinas, con una señal bifásica para H γ C con 1 y 2 equivalentes de iones Cu^{2+} , y H γ S presentando una sola transición (aparentemente) a cualquier concentración de cobre.⁴⁴

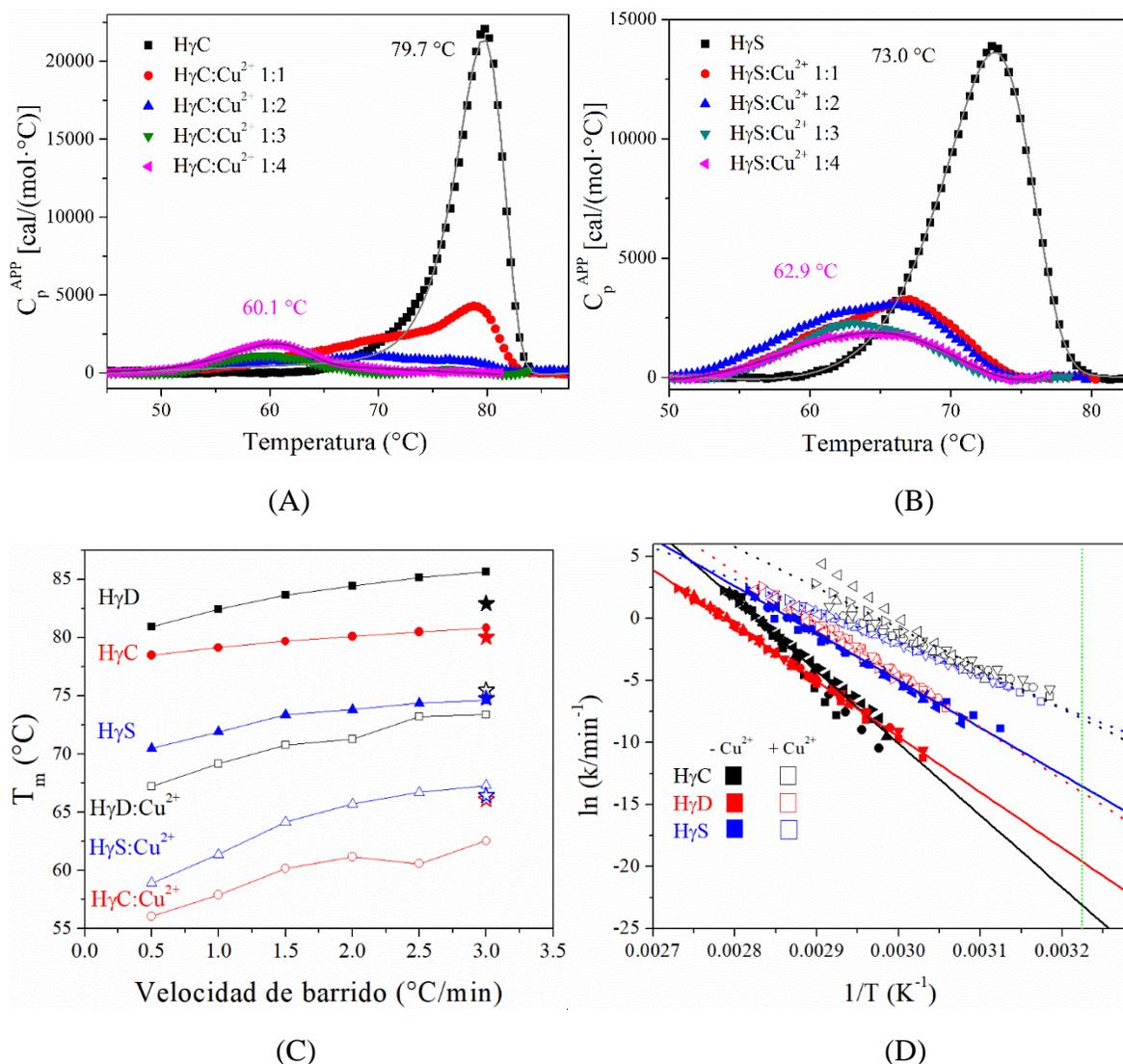


Figura 38. Estabilidad cinética de γ -cristalinas en presencia de cobre. Termogramas de CDB (1.5 °C/min) de H γ C (A) y H γ S (B) en presencia de diferentes equivalentes de cobre, con su ajuste representativo al modelo de dos estados irreversible. (C) Dependencia de la T_m de H γ C (círculo rojo), H γ D (cuadrado negro) y H γ S (triángulo azul) con respecto a la velocidad de barrido, en ausencia (símbolos llenos, ●■▲) y presencia (símbolos vacíos, ○□△) de cobre. Como referencia se muestra el valor obtenido por DC (ref. 45), graficado como símbolo de estrella. (D) Gráfico de Arrhenius de H γ C (negro), H γ D (rojo) y H γ S (azul) en ausencia (símbolos llenos) y presencia (símbolos vacíos) de cobre, a partir de los datos del ajuste al modelo de dos estados irreversible de las trazas a diferentes velocidades de barrido: 0.5 (■), 1 (●), 1.5 (▲), 2 (▼), 2.5 (◄) y 3 (►) K/min. Los valores de R^2 en ausencia de cobre fueron de 0.9646, 0.9975 y 0.9907 para H γ C, H γ D y H γ S, respectivamente, y en presencia de cobre de 0.9156, 0.9911 y 0.9943 para H γ C, H γ D y H γ S, respectivamente.

Posteriormente se determinó la estabilidad cinética de H γ C y H γ S en presencia de 4 equivalentes de cobre. El gráfico de Arrhenius obtenido fue comparado con lo recabado anteriormente para H γ D y con los datos en ausencia de metal (**Figura 38D**). H γ D y H γ S muestran una reducción similar en su tiempo de vida media a 37 °C, de aproximadamente 300 veces, mientras que esta reducción es acentuada en la estabilidad referida a H γ C, donde el tiempo de vida media pasa de miles de años (≈ 75000 años) a tan sólo un día (**Figura 38D** y **Tabla 9**); lo que es preciso y coherente con su mayor sensibilidad a la agregación inducida por Cu²⁺. De igual modo, en las tres cristalinas se observa una disminución en energía de activación (E_{act}) siendo más claro en el caso de H γ C con una disminución de casi el 50 %. Asimismo, el valor de T_m se vio afectado debido a la presencia de iones cobre (**Figura 38C** y **Tabla 9**), siendo mayor la reducción para H γ C (~ 18 °C), seguido de H γ D (~ 12 °C) y finalmente H γ S (~ 7 °C). En conclusión, los iones Cu²⁺ disminuyen la estabilidad cinética de las tres cristalinas, aunque en diferente magnitud.

Tabla 9. Valores obtenidos a partir de los gráficos de Arrhenius de H γ C, H γ D y H γ S en ausencia y presencia de cobre. *Velocidad de barrido de 3 °C/min.

	E_{act} (kcal/mol)	$t_{1/2}$ (días) 37 °C	$\frac{t_{1/2} \text{ sin Cu}^{2+}}{t_{1/2} \text{ con Cu}^{2+}}$	T_m (°C) *	ΔT_m (°C) *
HγC	124.5 \pm 3.9	2.8 $\times 10^7$	$\approx 21,000,000$	80.82	18.28
HγC:Cu²⁺ 1:4	62.7 \pm 2.5	1.3		62.54	
HγD	89.5 \pm 0.4	1.6 $\times 10^5$	≈ 300	85.65	12.27
HγD:Cu²⁺ 1:3	83.1 \pm 1.0	5.3 $\times 10^2$		73.38	
HγS	75.0 \pm 1.0	3.3 $\times 10^2$	≈ 300	74.61	7.31
HγS:Cu²⁺ 1:4	51.4 \pm 0.5	1.1		67.30	

Por otro lado, se analizó la interacción de H γ C y H γ S con cobre mediante experimentos de CTI. Para ambos casos la señal fue muy débil (similar al sistema H γ D/Cu²⁺), siendo incluso de menor intensidad para H γ C. El mejor modelo que describió los datos de H γ C fue de equilibrio estequiométrico de interacción simple, donde una molécula de H γ C interacciona con un ion Cu²⁺ (**Figura 39A**), sin embargo, la poca intensidad de las señales generó una gran dispersión de los datos, por lo que el error es mucho más grande que en los

demás sistemas y así el ajuste puede ser erróneo. Para H γ S la interacción es mejor descrita por un modelo estequiométrico en el cual dos macromoléculas de H γ S se unen a un ion de Cu $^{2+}$, donde ambas macromoléculas se unen de manera directa y con la misma afinidad (**Figura 39A** y **Tabla 10**). Además, es claro que, a diferencia de lo observado con H γ D donde la interacción estaba controlada entálpicamente, en el caso de H γ C y H γ S la interacción con cobre está bajo un control entrópico (**Figura 39B**), ya que al unirse los iones cobre la entropía del sistema aumenta ($-T\Delta S$, negativo). Esto sugiere que existe una mayor pérdida estructural al unirse el metal a estas cristalinas, y es posible que este desplegamiento parcial conlleve al estado final de agregación.

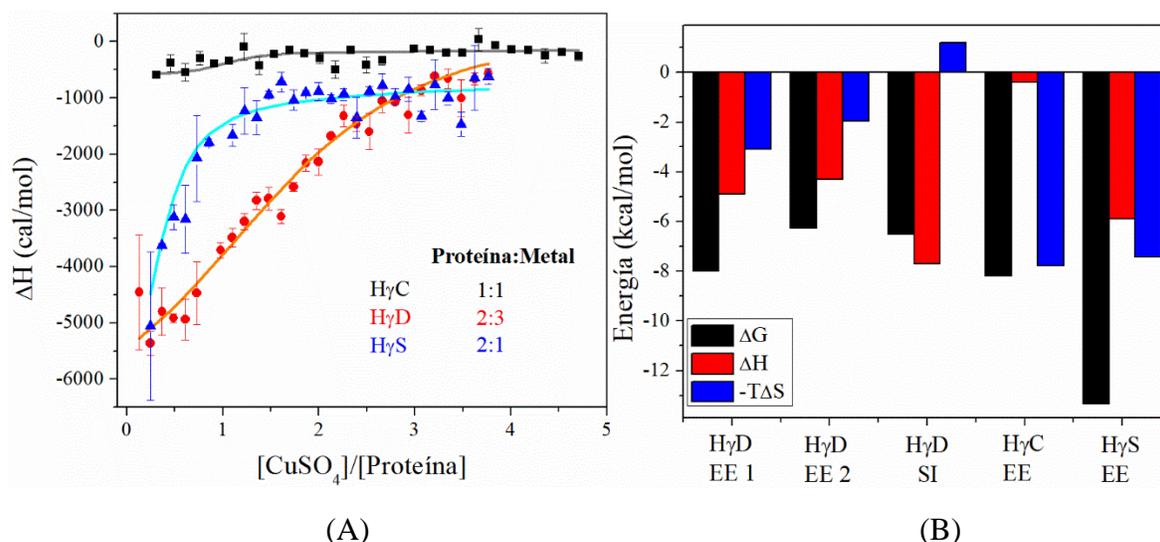


Figura 39. Interacción de γ -cristalinas con cobre. (A) Experimentos de CTI, y su correspondiente ajuste de H γ C (negro), H γ D (rojo) y H γ S (azul) con cobre. (B) Valores termodinámicos obtenidos de la interacción de γ -cristalinas con cobre, ver Tabla C2 en Apéndice C. EE, Equilibrio estequiométrico (1, reacción 1; 2, reacción 2); SI, Sitios independientes.

Al comparar los resultados de CTI de estos dos sistemas H γ C/ Cu $^{2+}$ y H γ S/ Cu $^{2+}$, con los resultados previos de H γ D (sus dominios aislados y la mutante H22Q) obtenemos datos interesantes. El primero de ellos es que las tres cristalinas interaccionan de manera distinta con iones Cu $^{2+}$, a pesar de que las tres sufren del fenómeno de inducción de agregación por dicho metal. En segundo lugar se observa una gran similitud entre los datos obtenidos con la mutante H22Q de H γ D y la cristalina H γ C, en ambos conjuntos de datos de CTI con cobre el mejor modelo que describe la unión es el de interacción simple 1:1, y el valor de la constante

de unión es casi idéntico (1.9×10^6 y $1.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ para H γ D H22Q/ Cu^{2+} y H γ C/ Cu^{2+} , respectivamente), lo que sugiere que la principal diferencia en entre ambas cristalinas y el grado de inducción de agregación es la presencia del residuo His22 en H γ D. Esto es congruente con la previa conclusión de que la unión de Cu^{2+} a la mutante H22Q y al dominio C-terminal es muy parecida en términos de afinidad, a pesar de que en el dominio la unión sea diferente (la naturaleza de estar aislado puede alterar la forma en la que une cobre). Además, los datos de CDB sobre la estabilidad cinética de H γ D H22Q, el dominio C-terminal de H γ D y H γ C dan valores de tiempo de vida media del orden de días (5, 6 y 1.5 días; respectivamente), lo que indicaría que el cobre genera la misma desestabilización en las tres muestras, aunque quizá por mecanismos distintos (diferencias en E_{act} y T_m). Y finalmente tenemos a H γ S, que en presencia de Cu^{2+} presenta un valor de tiempo de vida media (37 °C) idéntico al de H γ C (~ 1 día), aunque los datos de CTI demuestran una cercanía con lo determinado para el dominio N-terminal de H γ D, ya que es el mismo modelo que describe la unión con cobre para ambos sistemas y los valores de K y ΔH son cercanos entre sí. Sin embargo, éstas son posibles explicaciones en cuanto al mecanismo de agregación de H γ C, H γ D y H γ S inducida por cobre, lo cual necesita ser verificado por un análisis más profundo mediante experimentación con los dominios aislados de H γ C y H γ S, y diversas mutantes tales como H γ D-NT H22Q, que servirá para evaluar el papel del residuo de His22 en el dominio aislado N-terminal de H γ D en la interacción con iones metálicos, y las mutantes H γ S C26H y H γ C C22H, donde se adicionará un residuo de histidina en la posición análoga a H γ D en las cristalinas H γ S y H γ C, que proporcionará información sobre el papel específico que juega este residuo en la inducción de agregación de γ -cristalinas.

Tabla 10. Resultados obtenidos a partir del ajuste de los experimentos de CTI de H γ C y H γ S con cobre.

Sistema	Modelo (Proteína:Metal)	K (M^{-1})	ΔH (cal/mol)
H γ C/ Cu^{2+}	$P + M \leftrightarrow PM$ 1:1	$1.0 \pm 0.1 \times 10^6$	$-4.0 \pm 0.2 \times 10^2$
H γ D/ Cu^{2+}	Sitios independientes ($n = 1.5$) 2:3	$6.0 \pm 0.4 \times 10^4$	$-7.7 \pm 0.3 \times 10^3$
H γ S/ Cu^{2+}	$P + M \leftrightarrow P_2M$ 2:1	$5.9 \pm 0.7 \times 10^9$	$-5.9 \pm 0.1 \times 10^3$

Recientemente (Junio 2020), el grupo de Rachel W. Martin⁵⁵ reportó que H γ S posee un papel relevante como antioxidante en el lente. En dicho trabajo, los autores reportan que existen dos sitios de unión en H γ S para Cu²⁺, donde uno de estos sitios corresponde a una región rica en cisteína (*cysteine loop*), responsable de la capacidad amortiguadora contra la agregación causada por daño oxidativo.⁵⁵ Mediante CTI determinaron la presencia de estos dos sitios de unión de cobre, lo que contrasta con nuestro resultado, donde encontramos que los datos se ajustan mejor a un modelo de interacción simple 1:1. Sin embargo, al comparar ambos gráficos de CTI (**Figura 39** y **Figura 40**), es posible que en nuestro análisis no se haya llegado a saturar el sistema, ya que ellos reportan el segundo sitio a una relación molar superior a 4, valor que fue el máximo en nuestro experimento. Por esto, será necesario corroborar la información utilizando una relación molar mayor (6) para buscar la presencia de esa nueva señal.

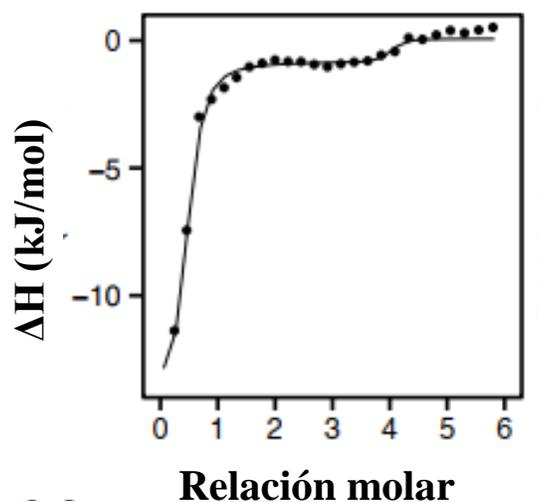


Figura 40. Interacción de H γ S con cobre reportada. Dos sitios de unión a Cu²⁺ fueron propuestos para H γ S. Modificada de ref. 55.

5.3 Efecto de los iones Zn^{2+} sobre la estabilidad cinética de γ -cristalinas y su interacción

5.3.1 Efecto de los iones Zn^{2+} sobre la estabilidad cinética de HyD y sus dominios aislados, y su interacción

En 2016, el grupo de Quintanar L.⁴⁵ demostró el efecto de agregación de cristalinas inducida por iones Cu^{2+} y Zn^{2+} . Sin embargo, el mecanismo es diferente dependiendo de la proteína y el metal involucrado. En el caso de Zn^{2+} , sólo induce la agregación de la cristalina HyD, y el efecto es menor que lo observado con Cu^{2+} ; además los iones zinc no afectan su estructura ni el proceso de desnaturalización térmica. Con base en esto, mediante mediciones de CDB, se buscó determinar si los iones zinc alteran la estabilidad de la cristalina HyD (**Figura 41A**) y de sus dominios aislados N- y C-terminal (**Figura 41B**).

Para las tres muestras los termogramas permanecieron prácticamente sin cambio alguno en presencia de hasta 5 equivalentes de metal. No obstante, en presencia de 10 equivalentes de Zn^{2+} se observó una disminución en la intensidad de la señal, la cual fue atribuida al fenómeno de agregación que disminuye la cantidad de proteína disponible para ser detectada. Con estos resultados comprobamos que los iones Zn^{2+} no afectan el proceso de desnaturalización de la proteína y, así, no desestabilizan a HyD ni a sus dominios aislados.

Por otro lado, se investigó sobre el mecanismo de unión de Zn^{2+} a HyD mediante experimentos de CTI. Para ello se mantuvieron las mismas condiciones utilizadas con cobre, y sólo la concentración de la sal utilizada ($ZnSO_4$) fue aumentada a 700 μM para obtener mejores resultados.

A diferencia de lo observado con Cu^{2+} , donde no se observó interacción entre el amortiguador y el metal, en el caso de los iones Zn^{2+} sí se detectó una interacción entre este metal y MOPS. Por ello, inicialmente, los datos del experimento en ausencia de proteína fueron ajustados, y se determinó que la unión entre zinc y el amortiguador es una interacción simple 1:1 (**Figura 41C**). Los valores obtenidos para el sistema MOPS/ Zn^{2+} fueron incluidos en el ajuste de los datos con proteína, es decir, se tomó en consideración la contribución a la isoterma de la unión del metal tanto a la proteína como a las moléculas del amortiguador.

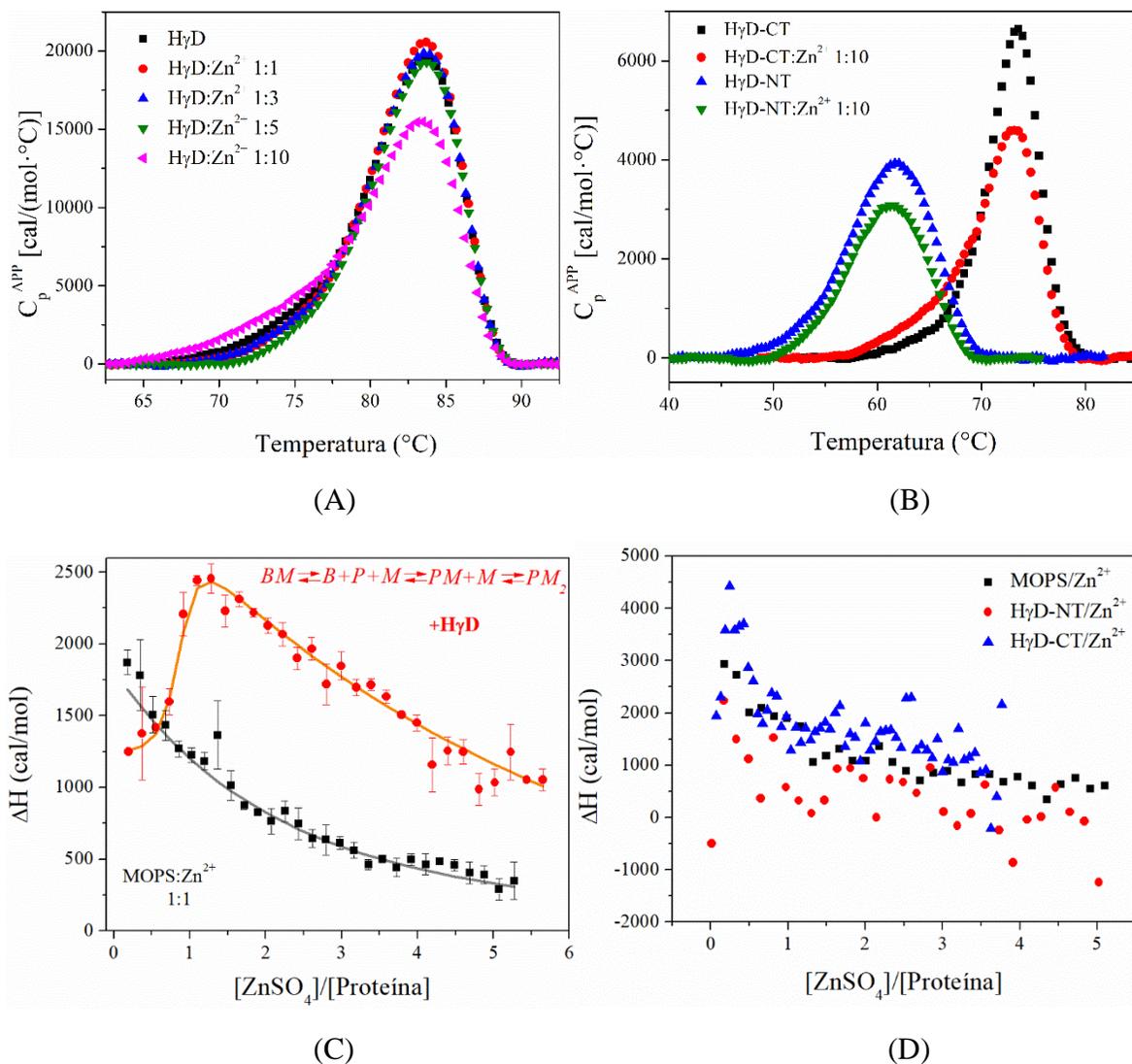


Figura 41. Estabilidad cinética de HyD y sus dominios aislados N- y C-terminal en presencia de zinc, y su interacción. Termogramas de CDB (1.5 °C/min) de HyD (A) y sus dominios aislados C- y N-terminal (B) en ausencia y presencia de zinc. (C) Experimento de CTI de HyD con Zn²⁺ (rojo), y su correspondiente ajuste, comparado con la interacción de Zn²⁺ con MOPS (negro). (D) Experimentos de CTI de los dominios aislados de HyD con zinc comparados con el experimento de Zn²⁺-MOPS.

Para H γ D, el mejor modelo que describió los datos fue de equilibrio estequiométrico donde dos iones Zn²⁺ interactúan de manera secuencial con una molécula de H γ D (**Figura 41C**). En comparación con lo detectado con cobre, la interacción de H γ D con zinc difiere no sólo en la estequiometría, sino que también la señal observada es de signo contrario, es decir, la unión de H γ D a iones Cu²⁺ es un proceso exotérmico, mientras que la interacción con iones Zn²⁺ presenta un comportamiento endotérmico (**Tabla 6 y 11**). Claramente esto comprueba que el mecanismo de unión a H γ D, y así el de inducción de agregación, es diferente entre ambos metales.

A pesar de lo sucedido con H γ D, los resultados de los dominios aislados no presentaron una unión clara, ya que la señal detectada fue muy cercana a lo observado en ausencia de proteína (**Figura 41D**), por lo que esto sugiere que no hay unión específica con los dominios por separado. Sin embargo, esto también puede deberse a que el medio y/o las condiciones utilizadas no fueron las adecuadas para este metal, por lo que será necesario analizar estos sistemas en otras condiciones, por ejemplo un amortiguador diferente donde se compruebe la nula interacción con zinc.

Tabla 11. . Resultados obtenidos a partir del ajuste de los experimentos de CTI de MOPS y H γ D con zinc.

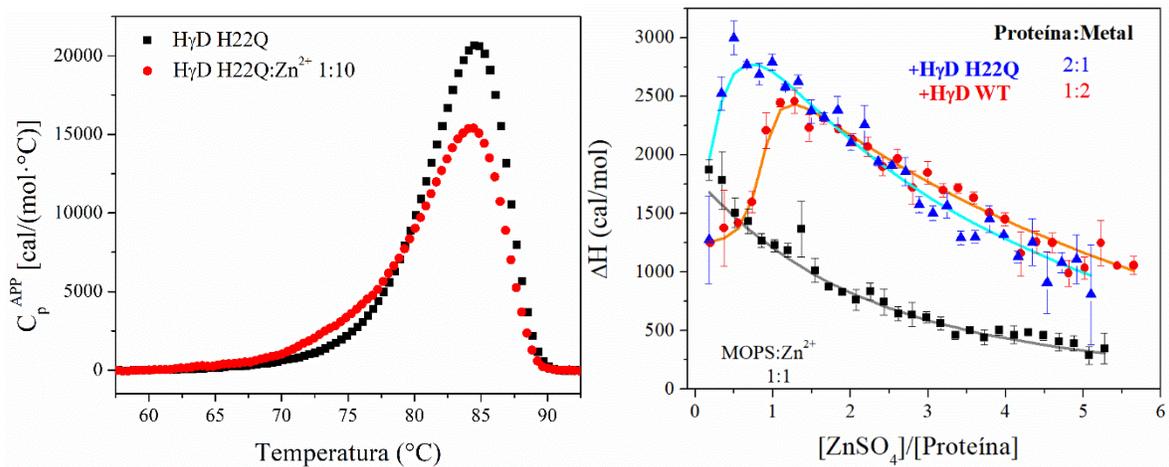
Sistema	Modelo (Proteína:Metal)	K (M ⁻¹)	ΔH (cal/mol)
MOPS/Zn ²⁺	$B + M \leftrightarrow BM$ 1:1	$1.03 \pm 0.02 \times 10^4$	$7.45 \pm 0.06 \times 10^3$
H γ D/Zn ²⁺	$BM \leftrightarrow B + P + M \leftrightarrow PM + M \leftrightarrow PM_2$ 1:2	$4.6 \pm 0.4 \times 10^8$	$8.7 \pm 0.01 \times 10^3$
		$6.6 \pm 0.7 \times 10^5$	$5.1 \pm 0.1 \times 10^4$

5.3.2 Efecto de los iones Zn^{2+} sobre la estabilidad cinética de H γ D H22Q y su interacción

Se ha reportado que el residuo His22 es el principal responsable del efecto de agregación de H γ D inducida por Zn^{2+} .⁴⁷ Además, en secciones anteriores hemos demostrado que también juega un papel muy importante en la desestabilización, interacción y agregación inducida por Cu^{2+} . Por ello se decidió analizar, por CDB, el comportamiento de la mutante H22Q de H γ D en presencia de iones Zn^{2+} . Contrario a lo esperado, se siguió observando una disminución en la intensidad de la señal en presencia de 10 equivalentes de zinc, lo que sugiere que esta mutante sigue presentando agregación. Este resultado plantearía la idea que el residuo His22 en H γ D no es el único responsable en la agregación inducida por Zn^{2+} (**Figura 42A**).

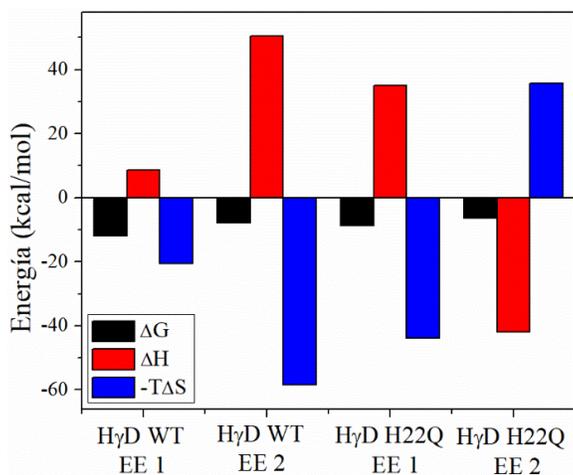
Por otro lado, mediante mediciones de CTI del sistema H γ D H22Q/ Zn^{2+} , se encontró una clara diferencia respecto al resultado de la proteína silvestre (**Figura 42B**). Para la mutante, el mejor modelo que describe los datos es donde dos moléculas de H γ D H22Q se unen a un ion Zn^{2+} de manera secuencial (**Tabla 12**). En ambos casos (WT y mutante) se observó que la interacción con iones zinc está bajo control entrópico (**Figura 42C**), y este aumento en entropía puede estar producido por la ruptura de la interacción entre el metal y el amortiguador, ya que es necesaria para que el zinc pueda unirse a la proteína. La segunda reacción en la mutante corresponde a la unión de la segunda molécula de H γ D H22Q al complejo H γ D H22Q/ Zn^{2+} por lo que esta interacción está controlada entálpicamente y conlleva a una disminución en la entropía.

En conjunto, la información obtenida por CDB y CTI demuestra que el residuo His22 juega un papel muy importante en la interacción con zinc, y así de la inducción de la agregación de H γ D, pero que no es el único residuo involucrado en la unión (y muy probablemente en la agregación) de H γ D con zinc. Además, considerando el resultado con los dominios aislados y Zn^{2+} , es posible que el otro residuo o residuos involucrados se encuentren en cualquiera de los dos dominios o quizás esté en la región inter-dominio.



(A)

(B)



(C)

Figura 42. Estabilidad cinética de HγD H22Q en presencia de zinc, y su interacción. (A) Termogramas de CDB (1.5 °C/min) de HγD H22Q en ausencia y presencia de 10 equivalentes de zinc. (B) Experimento de CTI de HγD H22Q con Zn²⁺ (azul), y su correspondiente ajuste, comparado con los sistemas HγD WT/Zn²⁺ (rojo) y Zn²⁺/MOPS (negro). (C) Valores termodinámicos obtenidos de la interacción de HγD WT y HγD H22Q con zinc, ver Tabla C2 en Apéndice C. EE, Equilibrio estequiométrico (1, reacción 1; 2, reacción 2)

Tabla 12. Resultados obtenidos a partir del ajuste de los experimentos de CTI de HγD WT y HγD H22Q con zinc.

Sistema	Modelo (Proteína:Metal)	K (M ⁻¹)	ΔH (cal/mol)
HγD WT/Zn ²⁺	$BM \leftrightarrow B + P + M \leftrightarrow PM + M \leftrightarrow PM_2$	$4.6 \pm 0.4 \times 10^8$	$8.7 \pm 0.01 \times 10^3$
	1:2	$6.6 \pm 0.7 \times 10^5$	$5.1 \pm 0.1 \times 10^4$
HγD H22Q/Zn ²⁺	$BM \leftrightarrow B + P + M \leftrightarrow PM + P \leftrightarrow P_2M$	$2.6 \pm 0.1 \times 10^6$	$3.5 \pm 0.1 \times 10^4$
	2:1	$4.4 \pm 0.6 \times 10^4$	$-4.2 \pm 0.2 \times 10^4$

5.3.3 Efecto de los iones Zn^{2+} sobre la estabilidad cinética de H γ C y H γ S, y su interacción

Dado que se ha reportado que los iones Zn^{2+} sólo inducen la agregación de H γ D,⁴⁵ se decidió corroborar que no existiera efecto en las otras dos cristalinas H γ C y H γ S. Para ambas muestras los termogramas de CDB fueron idénticos en presencia de hasta 10 equivalentes de Zn^{2+} (**Figura 43A**). Esto corrobora que prácticamente no hay efecto de desestabilización y/o agregación en H γ C y H γ S en presencia de Zn^{2+} .

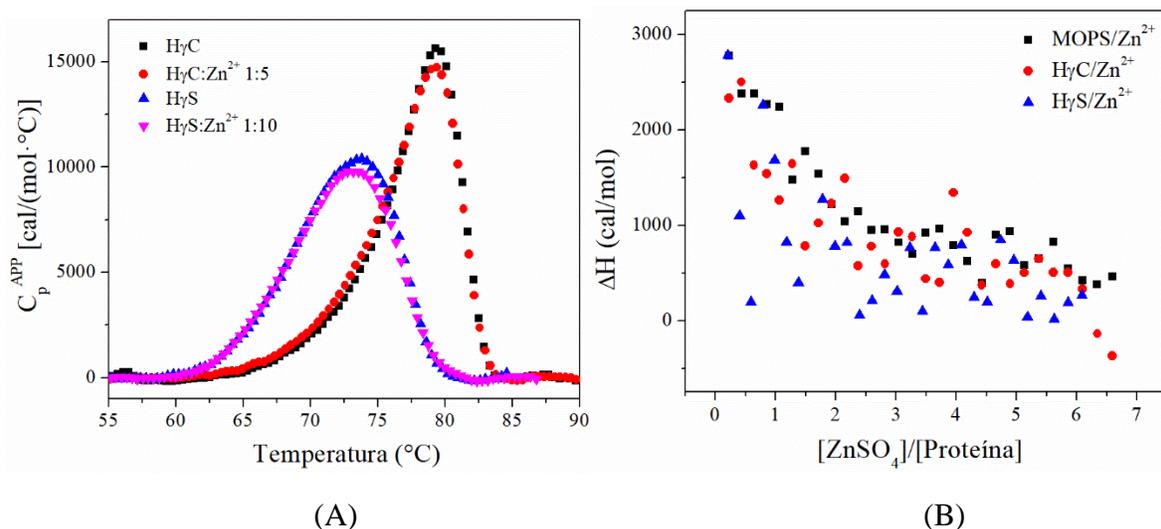


Figura 43. Estabilidad cinética de H γ C y H γ S en presencia de zinc, y su interacción. (A) Termogramas de CDB (1.5 °C/min) de H γ C (negro y rojo) y H γ S (azul y rosa) en ausencia y presencia de zinc. (B) Experimentos de CTI de H γ C (rojo) y H γ S (azul) con zinc comparados con el experimento de Zn²⁺-MOPS (negro).

Asimismo, los resultados de CTI para ambas cristalinas, sugieren que no hay interacción específica entre estas proteínas y zinc (**Figura 43B**). Sin embargo, no se puede descartar completamente que exista algún tipo de interacción entre H γ C y H γ S con Zn^{2+} , ya que puede ser que las condiciones no sean las adecuadas para estos sistemas, o que simplemente la unión sea débil o inespecífica y que no pueda ser detectado por esta técnica.

5.4 Efecto de los iones Hg^{2+} sobre la estabilidad cinética de γ -cristalinas y su interacción

5.4.1 Efecto de los iones Hg^{2+} sobre la estabilidad cinética de $\text{H}\gamma\text{D}$ y sus dominios aislados, y su interacción

Los iones zinc y cobre se encuentran normalmente en el organismo para el correcto funcionamiento celular, pero un aumento en la concentración genera efectos adversos y puede provocar el desplegamiento y la agregación de proteínas (entre otros efectos), como lo observado en las γ -cristalinas. Sin embargo, no sólo estos metales producen alteraciones en la estructura de las proteínas, ya que se ha reportado que la presencia de metales pesados puede generar el desplegamiento y la agregación de las γ -cristalinas. Se ha comprobado que los iones Hg^{2+} inducen la agregación de $\text{H}\gamma\text{C}$ y $\text{H}\gamma\text{S}$, y no de $\text{H}\gamma\text{D}$,⁴⁹ a diferencia de lo observado con iones Zn^{2+} .

Con base en lo reportado, se decidió determinar si los iones Hg^{2+} afectan el proceso de desnaturalización térmica de $\text{H}\gamma\text{D}$, y así su estructura y estabilidad cinética, a pesar de que no induce la agregación de esta cristalina. Para ello, se realizaron mediciones de CDB de $\text{H}\gamma\text{D}$ en presencia de diferentes equivalentes de mercurio (**Figura 44A**) y, contrario a lo esperado, este metal altera completamente los termogramas. En presencia de 1 equivalente de Hg^{2+} la transición correspondiente a la proteína nativa disminuyó en intensidad, mientras que un nuevo pico fue observado en aproximadamente 73 °C, el cual fue aumentando en intensidad a mayor concentración del metal, hasta que en presencia de 3 equivalentes de Hg^{2+} sólo se detecta esta nueva transición. Conforme se fue adicionando un mayor número de equivalentes de Hg^{2+} (4 y 10) el termograma resultante sufrió otras alteraciones en su forma y su T_m (**Figura 44A**). De este modo, se determinó la estabilidad cinética de $\text{H}\gamma\text{D}$ en presencia de Hg^{2+} en las condiciones donde una sola transición (diferente a la nativa) es observable, es decir, con 3 equivalentes de mercurio.

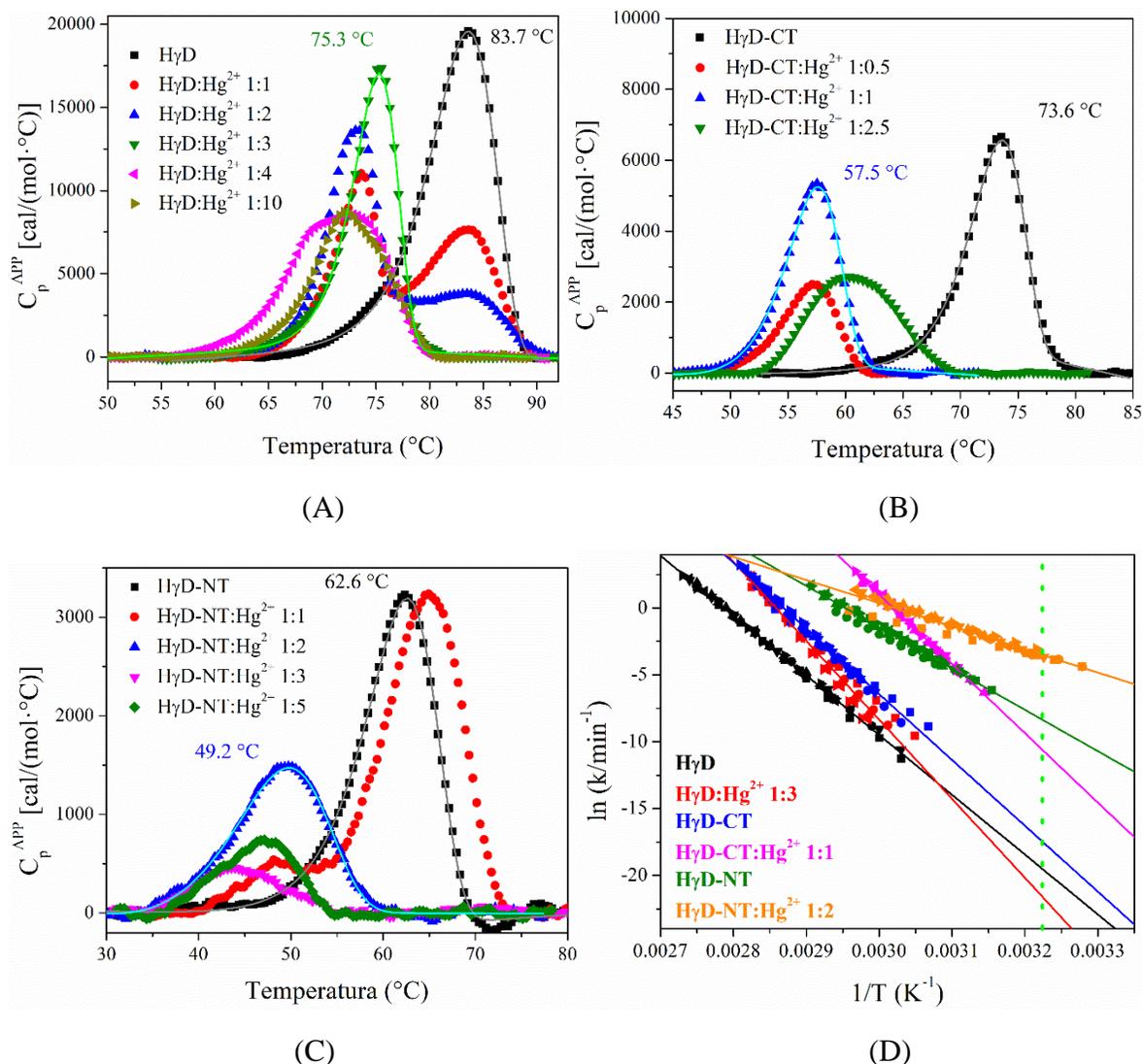


Figura 44. Estabilidad cinética de H7D y sus dominios aislados N- y C-terminal en presencia de mercurio. Termogramas de CDB (1.5 °C/min) de H7D (A) y sus dominios aislados C- (B) y N-terminal (C) en presencia de diferentes equivalentes de mercurio, con su ajuste representativo al modelo de dos estados irreversible. (D) Gráfico de Arrhenius de H7D y sus dominios aislados C- y N-terminal en ausencia (negro, azul y verde, respectivamente) y presencia de mercurio (rojo, rosa y naranja, respectivamente), a partir de los datos del ajuste al modelo de dos estados irreversible de las trazas a diferentes velocidades de barrido: 0.5 (■), 1 (●), 1.5 (▲), 2 (▼), 2.5 (◄) y 3 (►) K/min. Los valores de R^2 fueron de 0.9975, 0.9897 y 0.9799 para H7D, H7D-CT y H7D-NT en ausencia de mercurio, respectivamente, y de 0.9740, 0.9950 y 0.9354 para H7D, H7D-CT y H7D-NT en presencia de mercurio, respectivamente.

De manera sorprendente la estabilidad cinética de HyD en presencia de 3 equivalentes de Hg^{2+} fue mayor que en ausencia de metal, ya que el tiempo de vida media estimada a 37 °C fue un orden de magnitud mayor, pasando de ~ 450 años hasta más de ~ 3,000 años; de igual modo la E_{act} se vio incrementada para esta nueva transición, con un aumento de 28 kcal/mol (**Tabla 13** y **Figura 44D**). Esto a pesar de existir una disminución en la T_m , valor que generalmente es considerado como parámetro de estabilidad, lo que nos demuestra que la aplicación de dicho término no siempre es el mejor (o al menos no el único) al comparar la estabilidad de dos proteínas.

Dado el inesperado resultado de la estabilización cinética de HyD inducida por Hg^{2+} se decidió averiguar un poco sobre el posible mecanismo de dicha estabilización, para ello, mediante CDB, se analizaron sus dominios aislados C- (**Figura 44B**) y N-terminal (**Figura 44C**) en presencia de diferentes equivalentes de Hg^{2+} . El dominio C-terminal se vio ampliamente afectado por la presencia de un menor número de equivalentes que en la proteína completa HyD. En presencia de 0.5 equivalentes de Hg^{2+} la transición correspondiente al dominio sin metal desapareció completamente, y una nueva transición fue detectada en ~ 57 °C, la cual incrementó en intensidad en presencia de 1 equivalente de Hg^{2+} (**Figura 44B**). Para el caso del dominio N-terminal el comportamiento fue distinto, ya que en presencia de 1 equivalente de Hg^{2+} el termograma fue semejante al de la muestra sin metal, sólo fue observado un corrimiento (~ 3 °C) de la T_m hacia mayor temperatura, y la aparición de un pequeño pico alrededor de 50 °C. Esta nueva transición fue la única detectable en presencia de 2 equivalentes de Hg^{2+} , ya que la señal correspondiente al dominio sin metal desapareció completamente (**Figura 44C**). Al agregar un mayor número de equivalentes de Hg^{2+} el termograma sufrió alteraciones que modificaban el comportamiento de las trazas de ambos dominios, pero dado que 1 y 2 equivalentes de este metal (para C- y N-terminal, respectivamente) es la concentración a la cual se observa una sólo transición diferente a la nativa, se mantuvieron estas condiciones para determinar la estabilidad cinética de los dominios aislados en presencia de Hg^{2+} . El grafico de Arrhenius resultante fue comparado con los datos en ausencia de metal para ambos dominios y para la proteína completa (**Figura 44D**).

A diferencia de lo ocurrido con la proteína completa HyD, donde los iones Hg^{2+} estabilizaron cinéticamente a esta proteína, los dominios aislados sufrieron una

desestabilización debido a la presencia de mercurio. Como se mencionó anteriormente, el dominio C-terminal es el que menor número de equivalentes necesita para la modificación de su comportamiento en CDB, aunado a esto, su tiempo de vida media (a 37 °C) en presencia de 1 equivalente de Hg^{2+} fue de sólo 20 días, esto a pesar de que su energía de activación (E_{act}) aumentó ligeramente (**Tabla 13**). Esta diferencia, respecto a la proteína completa, puede deberse a un efecto antagónico entre un aumento en la energía de activación (E_{act}) y una mayor disminución de la T_m (~ 17 °C), por lo que en este sistema, muy probablemente, la disminución en la temperatura de transición impacte más en la estabilidad que el ligero incremento en el valor de E_{act} .

Por otro lado, el dominio N-terminal sufrió una clara desestabilización debido a la presencia de 2 equivalentes de Hg^{2+} , ya que todos sus parámetros de estabilidad (E_{act} , $t_{1/2}$ y T_m) disminuyeron de manera considerable. Sin embargo, esta reducción, respecto a las muestras sin metal, fue menor que en el dominio C-terminal, ya que el tiempo de vida media del dominio N-terminal disminuyó ~ 100 veces, comparado a casi $\sim 1,000$ veces para el C-terminal, asimismo el ΔT_m del dominio N-terminal en ausencia y presencia de 2 equivalentes de Hg^{2+} fue menor, siendo de ~ 12 °C (**Tabla 13**).

Tabla 13. Valores obtenidos a partir de los gráficos de Arrhenius de H γ D y sus dominios aislados C- (H γ D-CT) y N-terminal (H γ D-NT) en ausencia y presencia de mercurio. *Velocidad de barrido de 3 °C/min.

	E_{act} (kcal/mol)	$t_{1/2}$ (días) 37 °C	$\frac{t_{1/2} \text{ sin Hg}^{2+}}{t_{1/2} \text{ con Hg}^{2+}}$	T_m (°C) *	ΔT_m (°C) *
HγD	89.5 \pm 0.4	1.6 $\times 10^5$	≈ 0.13	85.65	8.10
HγD:Hg$^{2+}$ 1:3	117.5 \pm 2.5	1.2 $\times 10^6$			
HγD-CT	97.8 \pm 1.3	1.9 $\times 10^4$	≈ 950	75.39	16.62
HγD-CT:Hg$^{2+}$ 1:1	103.0 \pm 1.2	20			
HγD-NT	61.4 \pm 1.2	2	≈ 100	63.74	11.92
HγD-NT:Hg$^{2+}$ 1:2	34.4 \pm 1.2	0.02			

Dados los resultados de CDB de H γ D y sus dominios aislados en presencia de Hg $^{2+}$, se llevó a cabo el análisis de la interacción cristalina-mercurio mediante CTI. De manera similar al cobre, la sal de mercurio (HgCl $_2$) mostró nula interacción con el amortiguador MOPS, contrario a lo observado con zinc. Se mantuvo la concentración de proteína utilizada previamente (30 μ M), y la concentración de HgCl $_2$ fue ajustada a 1 mM. Cabe destacar que las señales obtenidas en CTI con mercurio fueron demasiado intensas, comparadas a lo visto con zinc y cobre (ver Apéndice A), en consecuencia los datos presentaron un comportamiento más claro. Para el sistema H γ D/ Hg $^{2+}$ el mejor modelo que describe esta interacción es uno de sitios independientes con $n = 2.5$, donde 5 iones Hg $^{2+}$ interaccionan con 2 moléculas de H γ D (**Figura 45**). A su vez, los datos para los dominios aislados dieron resultados semejantes entre sí, sugiriendo que ambos dominios unen 2 iones Hg $^{2+}$ pero de manera diferente, concretamente el dominio C-terminal une dos iones Hg $^{2+}$ con la misma afinidad (**Figura 45** y **Tabla 14**), mientras que el dominio N-terminal une dos iones Hg $^{2+}$ pero de manera secuencial y con distinta afinidad (**Figura 45** y **Tabla 14**).

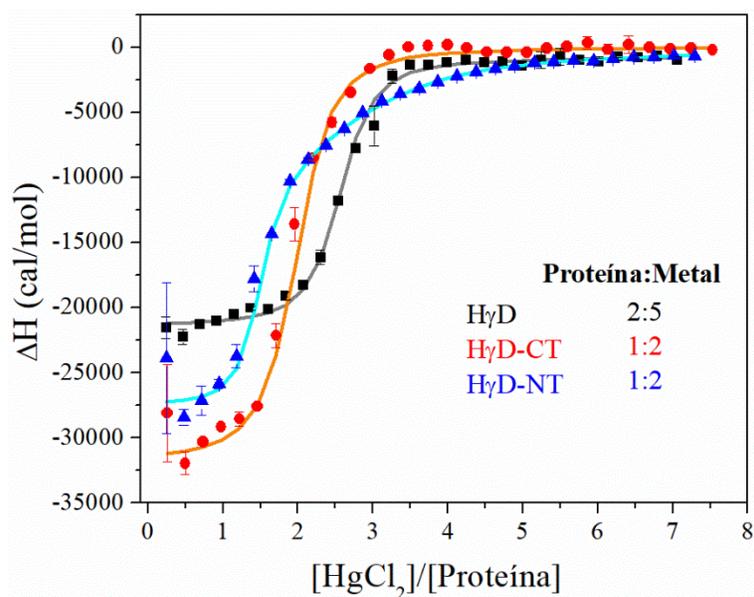


Figura 45. Interacción de H γ D y sus dominios aislados N- y C-terminal con mercurio. Experimentos de CTI, y su correspondiente ajuste, de H γ D (negro) y sus dominios aislados C- (rojo) y N-terminal (azul) con mercurio.

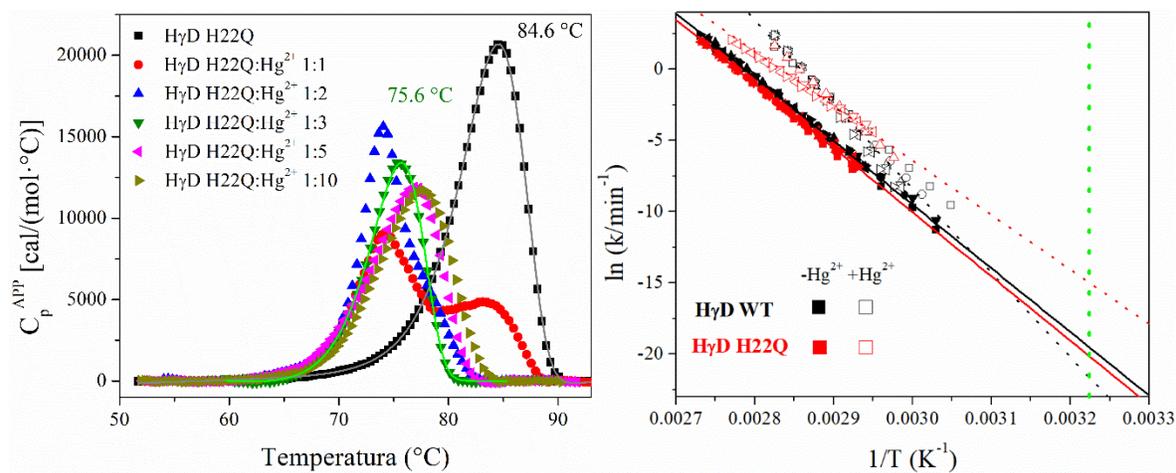
En conjunto, los resultados de CDB y CTI de H γ D en presencia de Hg²⁺ sugieren diferentes características, la primera de ellas es que la estabilización cinética observada en H γ D requiere la presencia de ambos dominios de la proteína, lo que podría indicar que la región inter-dominio es la responsable del fenómeno de estabilización inducida por mercurio. De la misma forma, los datos de CTI sugieren que de los 5 iones de Hg²⁺ involucrados en la unión con H γ D, 4 se unen con los dominios de manera independiente (2 en cada dominio), mientras que un ion Hg²⁺ (posiblemente) se una a la región inter-dominio. Sin embargo estas hipótesis requerirán ser verificadas por otros estudios más adelante.

Tabla 14. Resultados obtenidos a partir del ajuste de los experimentos de CTI de H γ D y sus dominios aislados H γ D-CT y H γ D-NT con mercurio.

Sistema	Modelo (Proteína:Metal)	K (M ⁻¹)	ΔH (cal/mol)
H γ D/Hg ²⁺	Sitios independientes ($n \approx 2.5$) 2:5	$1.6 \pm 0.04 \times 10^6$	$-2.0 \pm 0.003 \times 10^4$
H γ D-CT/Hg ²⁺	Sitios independientes ($n \approx 2$) 1:2	$1.2 \pm 0.1 \times 10^6$	$-3.2 \pm 0.04 \times 10^4$
H γ D-NT/Hg ²⁺	$P + M \leftrightarrow PM + M \leftrightarrow PM_2$	$6.6 \pm 1.1 \times 10^6$	$-2.8 \pm 0.07 \times 10^4$
	1:2	$6.2 \pm 1.5 \times 10^4$	$-1.4 \pm 0.1 \times 10^4$

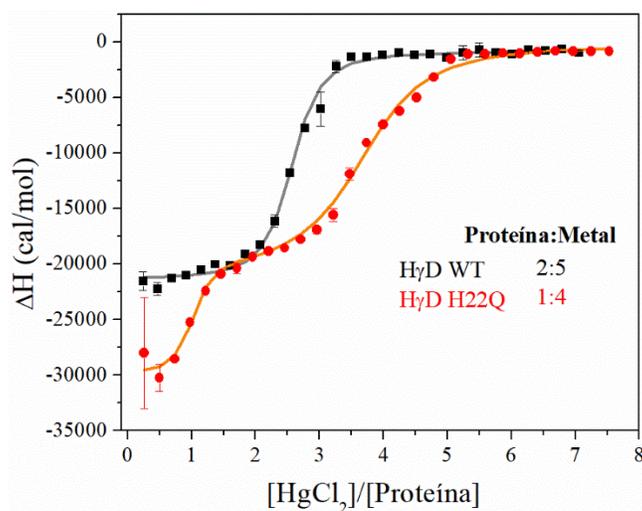
5.4.2 Efecto de los iones Hg²⁺ sobre la estabilidad cinética de H γ D H22Q y su interacción

En secciones anteriores hemos comprobado la importancia del residuo His22 de H γ D en la interacción con los metales cobre y zinc, y por ende en el mecanismo de inducción de agregación, en congruencia con los datos reportados.⁴⁷ Por esta razón se analizó si este residuo también juega un papel importante en la interacción de H γ D con Hg²⁺, y así en el fenómeno de estabilización cinética observado. Se hizo el mismo análisis que con la proteína silvestre, es decir, se realizaron mediciones de CDB de H γ D H22Q en presencia de diferentes equivalentes de Hg²⁺ (**Figura 46A**).



(A)

(B)



(C)

Figura 46. Estabilidad cinética de HyD H22Q en presencia de mercurio, y su interacción. (A) Termogramas de CDB (1.5 °C/min) de HyD H22Q en presencia de diferentes equivalentes de mercurio, con su ajuste representativo al modelo de dos estados irreversible. (B) Gráfico de Arrhenius de HyD WT (negro) y HyD H22Q (rojo) en ausencia (símbolos llenos) y en presencia de 3 equivalentes de mercurio (símbolos vacíos), a partir de los datos del ajuste al modelo de dos estados irreversible de las trazas a diferentes velocidades de barrido: 0.5 (■), 1 (●), 1.5 (▲), 2 (▼), 2.5 (◄) y 3 (►) K/min. Los valores de R^2 en ausencia de metal fueron de 0.9975 y 0.9967 para HyD WT y HyD H22Q, respectivamente, y de 0.9749 y 0.9598 para HyD WT:Hg²⁺ y HyD H22Q:Hg²⁺, respectivamente. (C) Experimento de CTI del sistema HyD H22Q/Hg²⁺ (rojo), y su ajuste correspondiente, en comparación con lo obtenido con HyD WT/Hg²⁺ (negro).

En presencia de 1 equivalente de Hg^{2+} una nueva transición apareció en aproximadamente 74 °C, mientras que la señal correspondiente a la proteína sin cobre disminuyó en intensidad. Por el contrario, en presencia de 2, 3, 5 y 10 equivalentes de Hg^{2+} una sola transición fue detectada, a una temperatura entre 74 y 78 °C. Debido a lo observado con la proteína H γ D silvestre en presencia de 3 equivalentes de Hg^{2+} , se mantuvieron estas condiciones para analizar el comportamiento de la mutante frente al mercurio, y su efecto en estabilidad cinética. Mientras que H γ D WT mostró un incremento en su estabilidad cinética debido a los iones Hg^{2+} , la mutante H22Q presentó una desestabilización bajo las mismas condiciones. La energía de activación (E_{act}) de H γ D H22Q con 3 equivalentes de Hg^{2+} disminuyó más de 13 kcal/mol, y su $t_{1/2}$ a 37 °C se redujo más de 150 veces, llegando a un valor de aproximadamente 5 años (**Figura 46B**). Sin embargo, esta mutante presentó un menor ΔT_m (~ 7 °C) debido a la presencia de mercurio con una T_m de 80.07 °C (3 K/min) versus la T_m de la proteína silvestre con mercurio de 77.55 °C bajo las mismas condiciones, lo que sugiere nuevamente que una T_m mayor no siempre indica que una proteína es más estable (al menos cinéticamente) que otra de menor T_m (**Tabla 15**).

Tabla 15. Valores obtenidos a partir de los gráficos de Arrhenius de H γ D WT y H γ D H22Q en ausencia y presencia de mercurio. *Velocidad de barrido de 3 °C/min

	E_{act} (kcal/mol)	$t_{1/2}$ (días) 37 °C	$\frac{t_{1/2} \text{ sin } \text{Hg}^{2+}}{t_{1/2} \text{ con } \text{Hg}^{2+}}$	T_m (°C) *	ΔT_m (°C) *
HγD WT	89.5 ± 0.4	1.6 × 10 ⁵	≈ 0.13	85.65	8.10
HγD WT:Hg²⁺ 1:3	117.5 ± 2.5	1.2 × 10 ⁶			
HγD H22Q	89.6 ± 0.7	2.7 × 10 ⁵	≈ 170	86.91	6.84
HγD H22Q:Hg²⁺ 1:3	76.1 ± 2.5	1.6 × 10 ³		80.07	

De igual modo, el resultado de CTI del sistema H γ D H22Q/ Hg^{2+} evidentemente fue diferente a lo presentado con la proteína silvestre (**Figura 46C**). En los datos de la mutante, se observan dos transiciones claras que, ajustadas a un modelo de sitios independiente con dos conjuntos de sitios, dan como resultado dos interacciones diferentes con mercurio. La primera interacción con una $n = 1$, y una afinidad mayor a la determinada para H γ D WT/ Hg^{2+} , mientras que la segunda interacción dio una $n = 3$ y un valor menor en su constante

de unión (**Tabla 16**). Esto indica que la mutante H γ D H22Q interacciona con 4 iones Hg²⁺, lo que sugiere que la His22 une un ion Hg²⁺ en la proteína silvestre H γ D.

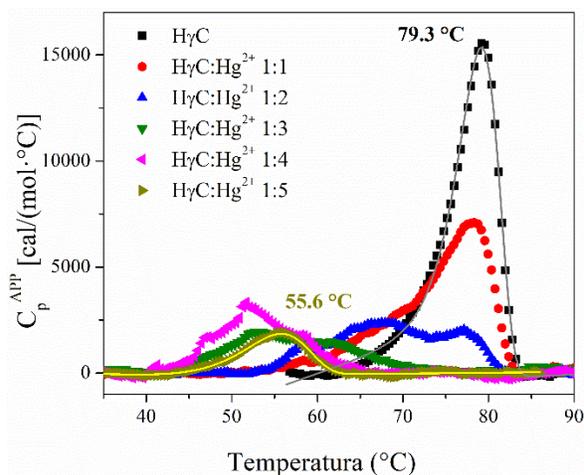
En conjunto, los resultados demuestran que el residuo His22 en H γ D juega un papel importante en el fenómeno de estabilización inducida por mercurio, y que interacciona de manera directa con uno de los 5 iones Hg²⁺ en H γ D.

Tabla 16. Resultados obtenidos a partir del ajuste de los experimentos de CTI de H γ D WT y H γ D H22Q con mercurio.

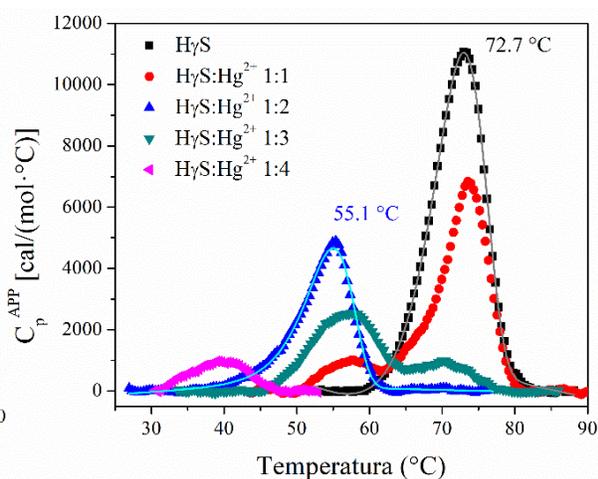
Sistema	Modelo (Proteína:Metal)	K (M ⁻¹)	ΔH (cal/mol)
H γ D WT/Hg ²⁺	Sitios independientes ($n \approx 2.5$) 2:5	$1.6 \pm 0.04 \times 10^6$	$-2.0 \pm 0.003 \times 10^4$
H γ D H22Q/Hg ²⁺	Sitios independientes	$4.2 \pm 0.5 \times 10^7$	$-3.0 \pm 0.02 \times 10^4$
	($n_1 = 1; n_2 = 3$) 1:4	$3.7 \pm 0.3 \times 10^5$	$-2.0 \pm 0.02 \times 10^4$

5.4.3 Efecto de los iones Hg²⁺ sobre la estabilidad cinética de H γ C y H γ S, y su interacción

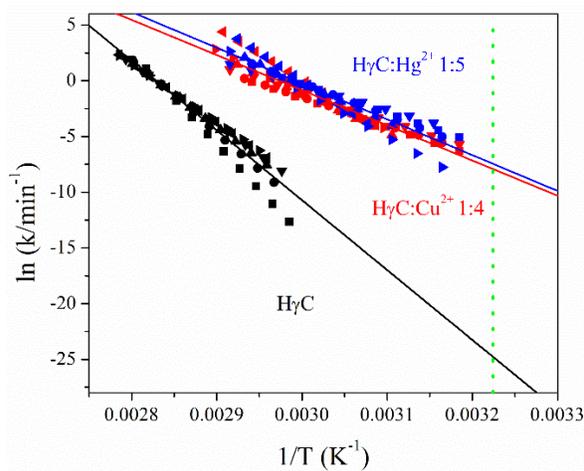
Como se mencionó anteriormente, los iones Hg²⁺ inducen la agregación de H γ C y H γ S, pero no de H γ D.⁴⁹ Sin embargo, hemos demostrado que los iones Hg²⁺ sí afectan a la proteína H γ D, pero produciendo una estabilización. De este modo, se buscó determinar el efecto de los iones Hg²⁺ en la estabilidad cinética de H γ C y H γ S. En ambos casos, la presencia de Hg²⁺ afectó el comportamiento de los termogramas de CDB (**Figura 47A y 47B**).



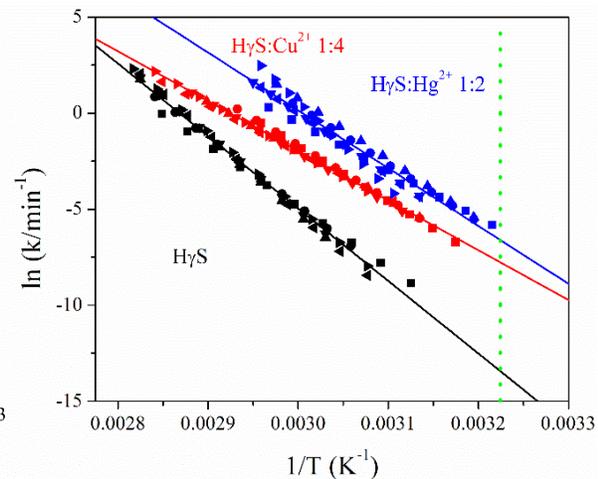
(A)



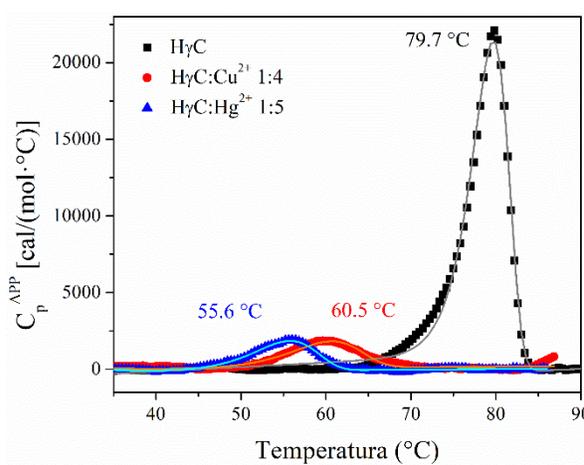
(B)



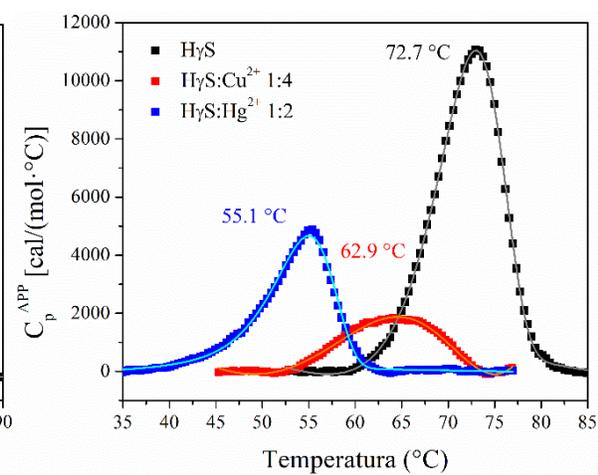
(C)



(D)



(E)



(F)

Figura 47. Estabilidad cinética de H γ C y H γ S en presencia de mercurio. Termogramas de CDB (1.5 °C/min) de H γ C (A) y H γ S (B) en presencia de diferentes equivalentes de mercurio, con su ajuste representativo al modelo de dos estados irreversible. Gráfico de Arrhenius de H γ C (C) y H γ S (D) en ausencia (negro) y presencia de mercurio (azul) y cobre (rojo), a partir de los datos del ajuste al modelo de dos estados irreversible de las trazas a diferentes velocidades de barrido: 0.5 (■), 1 (●), 1.5 (▲), 2 (▼), 2.5 (◄) y 3 (►) K/min. Los valores de R^2 fueron de 0.9646, 0.9156 y 0.8998 para H γ C en ausencia de metal, con cobre y con mercurio, respectivamente, y de 0.9907, 0.9943 y 0.9561 para H γ S en ausencia de metal, con cobre y con mercurio, respectivamente. Comparación de los termogramas de CDB (1.5 °C/min) de H γ C (E) y H γ S (F) obtenidos en presencia y ausencia de cobre y mercurio.

Para el caso de H γ C (**Figura 47A**), en presencia de 1 equivalente de Hg²⁺ la transición correspondiente a la proteína nativa disminuye en intensidad y un hombro aparece en aproximadamente 65 °C, mientras que al estar presentes 2 equivalentes de este metal el termograma muestra tres transiciones en ~ 59, ~ 65 y ~ 77 °C; en cambio, con 3 equivalentes de mercurio se observó una transición en aproximadamente 55 °C y un hombro en ~ 60 °C. Ahora bien, la adición de 4 equivalentes de iones Hg²⁺ provocó que la traza calorimétrica presentara un comportamiento extraño, con un máximo cerca de 50 °C pero sin una forma precisa. Finalmente, la presencia de 5 equivalentes de mercurio dio una señal clara, con una sola transición bien definida en 55.6 °C, donde se observa un corrimiento hacia mayor temperatura que en presencia de 4 equivalentes de Hg²⁺. Este comportamiento también fue observado mediante DC,⁴⁹ donde la T_m disminuye en presencia de 1 a 3 equivalentes de mercurio, y aumenta cuando 4 o más equivalentes de iones Hg²⁺ son adicionados.

Con los resultados obtenidos para H γ C en presencia de diferentes equivalentes de mercurio, se dispuso a determinar la estabilidad cinética de esta cristalina con 5 equivalentes de Hg²⁺. El valor de E_{act} obtenido para H γ C en estas condiciones fue de 63.8 ± 2.8 kcal/mol, mientras el $t_{1/2}$ a 37 °C fue de 0.8 días. Evidentemente, los iones mercurio disminuyen la estabilidad cinética de H γ C, pero curiosamente los valores son cercanos a los determinados para esta proteína cuando 4 equivalentes de cobre están presentes. El gráfico de Arrhenius obtenido en presencia de cobre y mercurio (4 y 5 equivalentes, respectivamente) son prácticamente iguales (**Figura 47C**), asimismo las trazas obtenidas son similares y con una diferencia en T_m menor de 5 °C (**Figura 47E**), por ende todos los datos obtenidos en estabilidad son muy parecidos, los cuales se muestran en la **Tabla 17**. En consecuencia, estos valores sugieren que la presencia tanto de 4 equivalentes de cobre como de 5 equivalentes de mercurio produce el mismo resultado final en H γ C, aunque probablemente los mecanismos

involucrados sean diferentes, ya que en concentraciones intermedias el comportamiento es totalmente distinto para cada metal.

Para el caso de H γ S, la presencia de 1 equivalente de Hg²⁺ disminuye ligeramente la intensidad de la transición correspondiente a la proteína nativa H γ S, y un pequeño pico aparece alrededor de 57 °C. Sin embargo, cuando 2 equivalentes de mercurio están presentes sólo una nueva transición es observada en 55.1 °C. No obstante, la presencia de 3 equivalentes de Hg²⁺ se asemeja más a lo detectado con 1 equivalente, con las mismas dos transiciones aunque de diferente intensidad relativa. Finalmente, al agregar 4 equivalentes de mercurio, una transición está presente en aproximadamente 40 °C (**Figura 47B**). De este modo, se determinó la estabilidad cinética de H γ S en presencia de 2 equivalentes de iones Hg²⁺ (ya que es la concentración mínima a la cual una nueva transición —diferente a la nativa— es detectada). El resultado obtenido demuestra que este metal disminuye la estabilidad cinética de H γ S; el valor de E_{act} disminuye más de 15 kcal/mol, mientras que su tiempo de vida media a 37 °C pasa de un año a ~ 10 horas. A diferencia de lo ocurrido con H γ C, donde al parecer el resultado final en presencia de Cu²⁺ y Hg²⁺ es el mismo, en H γ S es muy probable que esto no ocurra, ya que el gráfico de Arrhenius en presencia de ambos metales es diferente (**Figura 47D**); y a pesar de que obtengan valores relativamente cercanos en estabilidad cinética (**Tabla 17**), los termogramas obtenidos son muy diferentes entre sí (en comportamiento y en T_m , **Figura 47F**).

Tabla 17. Valores obtenidos a partir de los gráficos de Arrhenius de H γ C y H γ S, en ausencia y presencia de cobre y mercurio. *Velocidad de barrido de 3 °C/min.

	E_{act} (kcal/mol)	$t_{1/2}$ (días) 37 °C	$\frac{t_{1/2} \text{ sin } M^{2+}}{t_{1/2} \text{ con } M^{2+}}$	T_m (°C) *	ΔT_m (°C) *
HγC	124.5 ± 3.9	2.8 × 10 ⁷	-	80.82	-
HγC:Cu²⁺ 1:4	62.7 ± 2.5	1.3	≈ 21,000,000	62.54	18.28
HγC:Hg²⁺ 1:5	63.8 ± 2.8	0.8	≈ 35,000,000	58.64	22.18
HγS	75.0 ± 1.0	3.3 × 10 ²	-	74.61	-
HγS:Cu²⁺ 1:4	51.4 ± 0.5	1.1	≈ 300	67.30	7.31
HγS:Hg²⁺ 1:2	59.8 ± 1.7	0.4	≈ 800	59.57	15.04

Para finalizar, la interacción de H γ C y H γ S con Hg $^{2+}$ fue analizada por CTI. Congruente con lo observado en el sistema H γ D/Hg $^{2+}$, la señal con mercurio fue de mayor intensidad que con cobre y zinc (ver apéndice A). Para H γ C/Hg $^{2+}$, el modelo de sitios independiente con un solo conjunto de sitios dio el mejor ajuste para los datos de CTI de este sistema, dando una $n = 4$, lo que indica que cuatro iones Hg $^{2+}$ interaccionan con una molécula de H γ C, y todos con la misma afinidad y energía (**Figura 48** y **Tabla 18**). Este resultado es comparable con lo obtenido para la mutante H γ D H22Q, donde el mismo número de iones (4) de mercurio interaccionan con la proteína, pero en la mutante de H γ D existen dos diferentes tipos de interacción (3 iones se unen del mismo modo a la proteína mientras que 1 se une de manera distinta). Al comparar los datos, se observa que la constante de unión y la energía para la unión de 3 iones mercurio a H γ D H22Q es muy cercano a los valores para la unión de mercurio a H γ C, debido a que sus valores de K son del orden de $10^5 M^{-1}$ y su ΔH está en el intervalo de -1.5 y -2×10^4 cal/mol. No obstante, parece que el termograma de CTI de H γ C/Hg $^{2+}$ presenta un punto de inflexión a una relación molar de 1, por lo que será necesario determinar si otro tipo de interacción está presente en H γ C/Hg $^{2+}$ a esa relación molar (mediante un mayor número de titulación a relaciones molares bajas), y sea otro modelo el que mejor describa a este sistema.

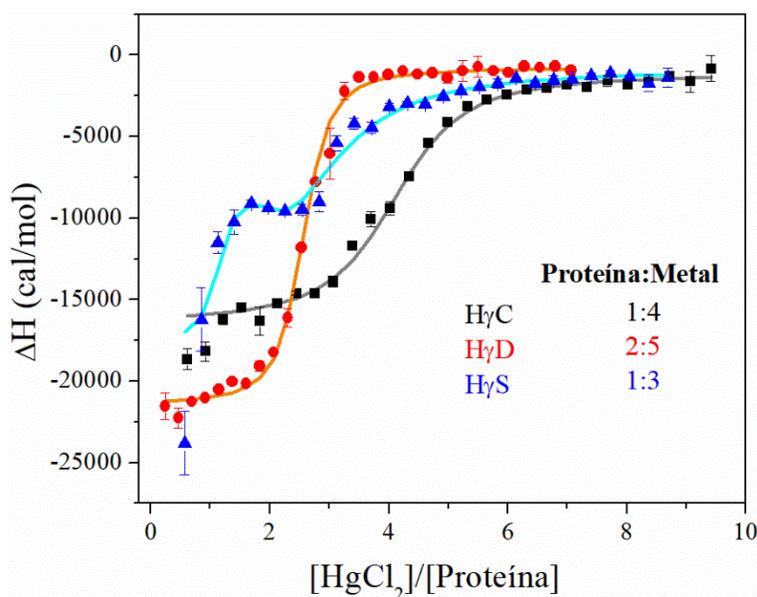


Figura 48. Interacción de γ -cristalinas con mercurio. Experimento de CTI del sistema H γ C/Hg $^{2+}$ (negro) y H γ S/Hg $^{2+}$ (azul), y su ajuste correspondiente, en comparación con lo obtenido con H γ D/Hg $^{2+}$ (rojo).

Por otro lado, la interacción de H γ S con Hg $^{2+}$ fue diferente a lo observado con las otras dos cristalinas, ya que el modelo que mejor describió los datos fue uno de equilibrio estequiométrico donde tres iones Hg $^{2+}$ interactúan con una molécula de H γ S, de manera secuencial (**Figura 48** y **Tabla 18**). Estos tres tipos de unión difieren en afinidad y energía, y sólo la unión del primer ion Hg $^{2+}$ es comparable con la unión del primer ion Hg $^{2+}$ en la mutante H γ D H22Q (K del orden 10^7 y ΔH del orden 10^4) pero no con H γ D ni H γ C.

Tabla 18. Resultados obtenidos a partir del ajuste de los experimentos de CTI de H γ C y H γ S con mercurio

Sistema	Modelo (Proteína:Metal)	K (M $^{-1}$)	ΔH (cal/mol)
H γ C/Hg $^{2+}$	Sitios independientes ($n \approx 4$) 1:4	$5.1 \pm 0.3 \times 10^5$	$-1.5 \pm 0.01 \times 10^4$
H γ S/Hg $^{2+}$		$2.1 \pm 0.5 \times 10^7$	$-1.3 \pm 0.02 \times 10^4$
	$P + M \leftrightarrow PM + M \leftrightarrow PM_2 + M \leftrightarrow PM_3$ 1:3	$1.3 \pm 0.6 \times 10^6$	$-6.4 \pm 0.3 \times 10^3$
		$9.4 \pm 6.0 \times 10^4$	$-1.6 \pm 0.03 \times 10^4$

Como se puede ver en la **Figura 49** las interacciones de mercurio con las cristalinas están controladas entálpicamente, pero interesantemente en casi todas las interacciones su entropía disminuye ($-T\Delta S$ positivo), lo que puede indicar que la unión de iones mercurio induce una compactación en la estructura de las cristalinas, pero que sólo produce estabilización cinética en la cristalina H γ D.

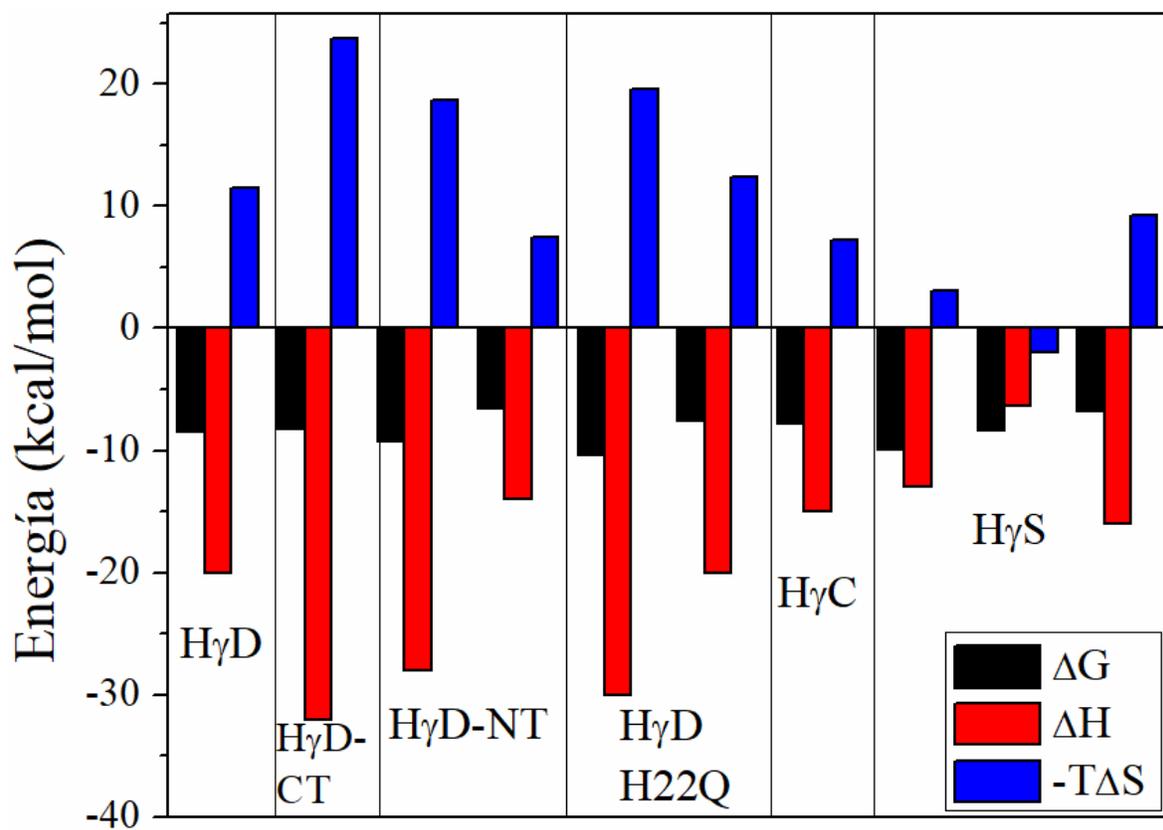


Figura 49. Valores termodinámicos obtenidos de la interacción de γ -cristalinas con mercurio. Ver Tabla C2 en Apéndice C.

6 Conclusiones y perspectivas

6.1 Conclusiones

En este trabajo se demostró la gran estabilidad cinética que poseen las tres γ -cristalinas del ser humano (H γ D, H γ C y H γ S), con valores congruentes para permanecer en estado nativo durante el tiempo necesario para cada una (tiempo de vida media, $t_{1/2}$, a 37 °C en la escala de años). Aunado a esto, la información obtenida con los dominios aislados de H γ D, sugiere que existe un fenómeno de estabilización recíproca entre ambos dominios.

Del mismo modo, se demostró el efecto de los iones Cu^{2+} , Zn^{2+} y Hg^{2+} en dicha estabilidad cinética, siendo el Cu^{2+} y Hg^{2+} los que alteran la estabilidad de las tres cristalinas, pero de diferente modo y en distinta magnitud, mientras que Zn^{2+} no la afecta. Específicamente, H γ C presentó un comportamiento muy similar tanto en presencia de Cu^{2+} como de Hg^{2+} , como se puede ver en la **Figura 50** (cuadrados, línea continua) los tres parámetros de estabilidad (E_{act} , T_m y $t_{1/2}$) para H γ C fueron casi idénticos en presencia de cobre y mercurio, lo que sugiere que la estructura de la proteína se encuentra en el mismo estado, y así el mecanismo de agregación para esta proteína puede ser el mismo con ambos metales. Una tendencia similar se observó para H γ S (**Figura 50**, triángulos, línea punteada), sin embargo, las diferencias en los valores son mayores entre cada metal, lo que sugiere que el mecanismo de agregación de H γ S posee algunas similitudes entre ambos metales. En contraste, H γ D presentó un comportamiento más complejo (**Figura 50**, círculos, línea discontinua), en presencia de cobre los tres parámetros de estabilidad disminuyeron, mientras que en presencia de mercurio únicamente la T_m mostró una disminución (en comparación con la T_m en ausencia de metal) a la vez que la E_{act} y el $t_{1/2}$ aumentaron significativamente, lo que indica que Hg^{2+} induce una estabilización cinética en H γ D.

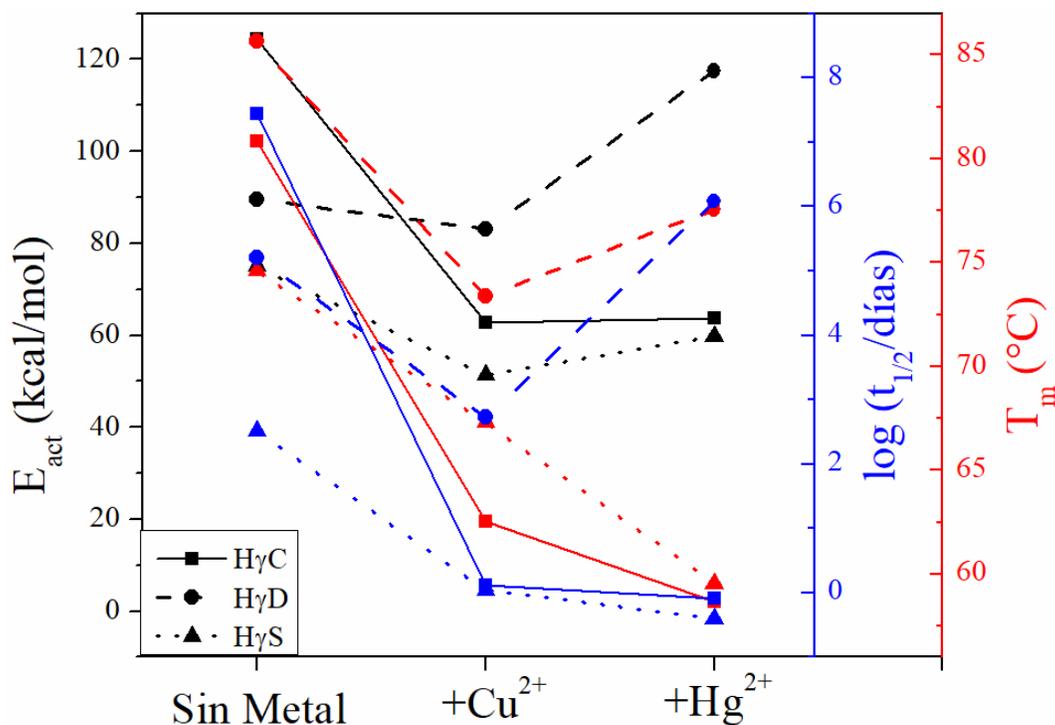


Figura 50. Estabilidad cinética de γ -cristalinas en ausencia y presencia de cobre y mercurio. H γ C (cuadrados, línea continua), H γ D (círculos, línea discontinua) y H γ S (triángulos, línea punteada).

Además, los resultados obtenidos con los dominios aislados N- y C-terminal de H γ D, sugieren que la presencia de un intermediario parcialmente plegado es una posible vía del mecanismo de agregación de H γ D inducida por cobre.

Por otro lado, la interacción evaluada mediante CTI mostró que la unión entre estas cristalinas y los tres iones metálicos es muy diferente, tanto en estequiometría, afinidad y energía, y así el mecanismo de desestabilización/estabilización y agregación difiere entre cada una. Para el caso de H γ C y H γ S, sólo fue posible observar interacción con iones Cu²⁺ y Hg²⁺ (**Figura 51**, panel de en medio e inferior, respectivamente) aunque con diferentes características fisicoquímicas.

Asimismo, el estudio de los dominios aislados N- y C-terminal de H γ D, permitió una explicación más detallada sobre cómo pueden estar interaccionando los iones metálicos con esta proteína, donde un Cu²⁺ se une a cada dominio y posiblemente un Cu²⁺ interaccione con la región inter-dominio (**Figura 51**, panel superior izquierdo), a su vez, la unión de los dos iones Zn²⁺ requiere la presencia de ambos dominios ya que de manera aislada no se observa una interacción clara (**Figura 51**, panel superior central), y finalmente cada dominio une dos de los cinco iones Hg²⁺ que se unen a H γ D (**Figura 51**, panel superior derecho).

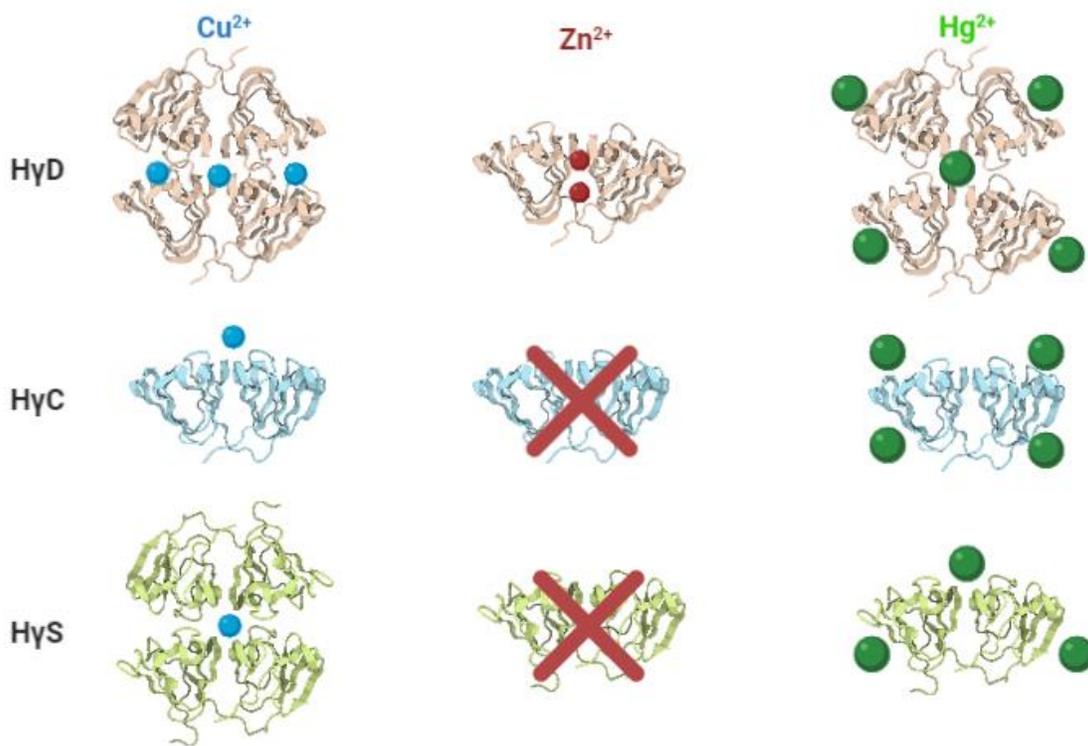


Figura 51. Interacción de γ -cristalinas con iones metálicos.

De igual modo, el análisis llevado a cabo con mutante HyD H22Q, evidencio de manera precisa la importancia del residuo His22 en la interacción con Cu²⁺, Zn²⁺ y Hg²⁺, y así de los mecanismos de agregación y estabilización/desestabilización inducida por estos iones metálicos (Figura 52).

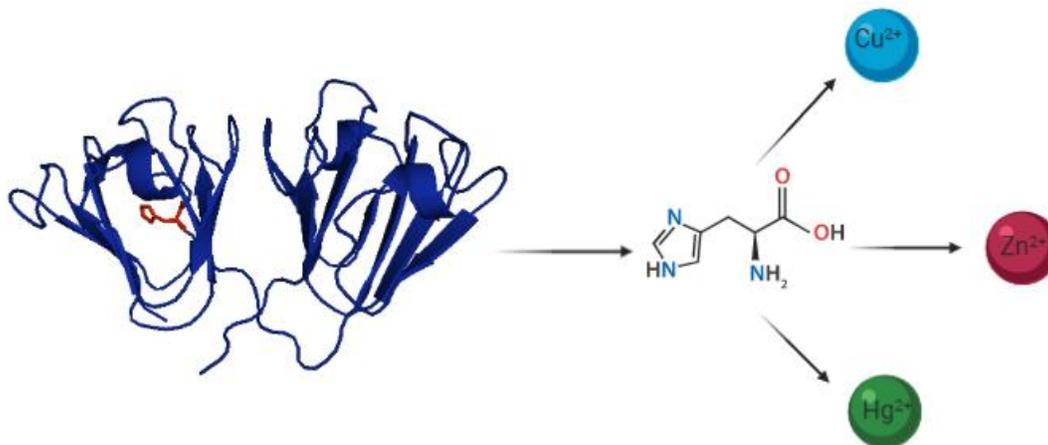


Figura 52. Papel del residuo His22 de HyD en la interacción con iones metálicos implicados en agregación.

Los resultados, en conjunto, aportan importantes hallazgos en el campo de la química bio-inorgánica, específicamente en cómo es que ocurre la agregación de las tres γ -cristalinas de humano inducida por metal, y así comprender la relación entre el desarrollo de cataratas y la presencia/desregulación de estos metales.

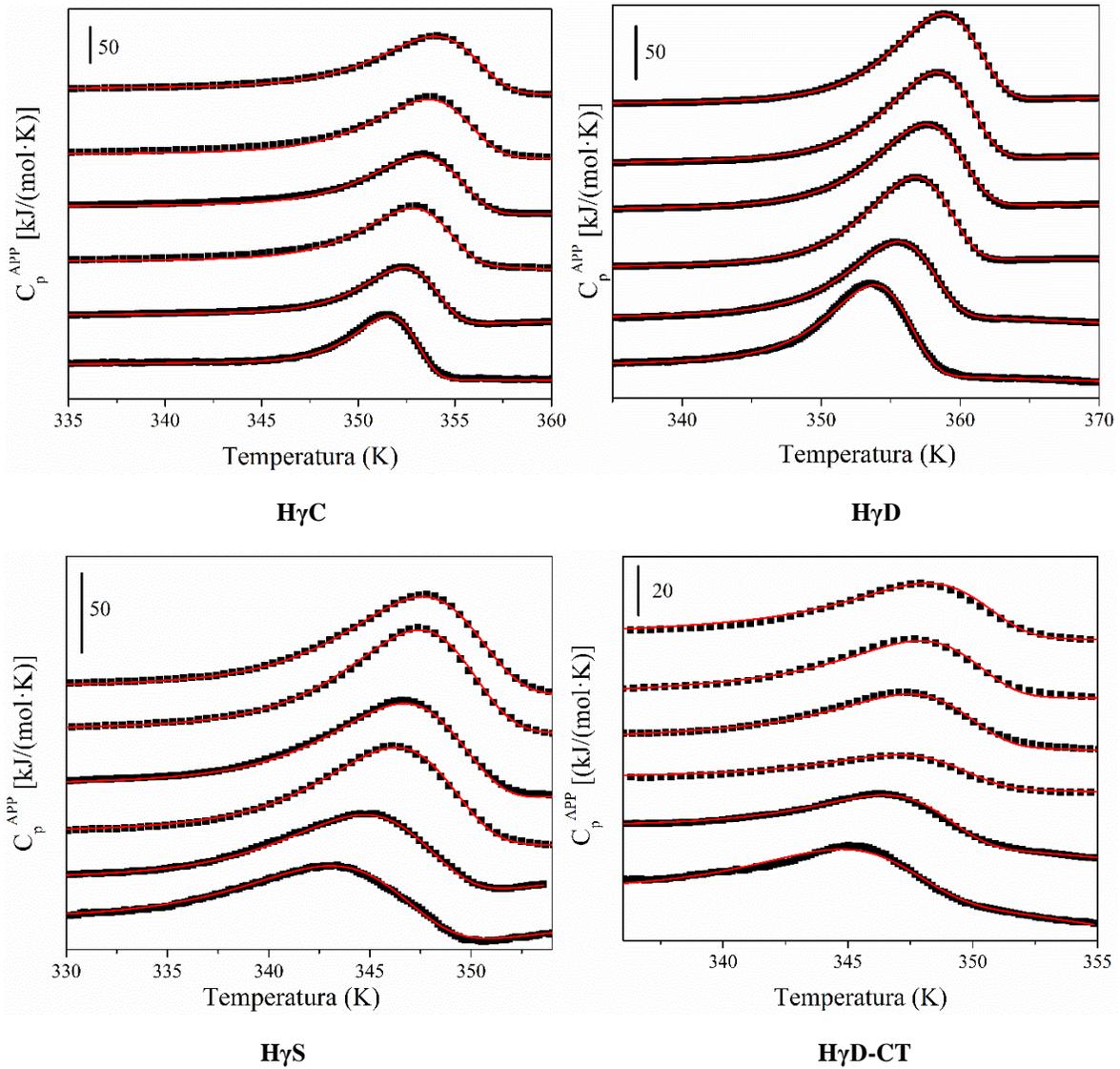
6.2 Perspectivas

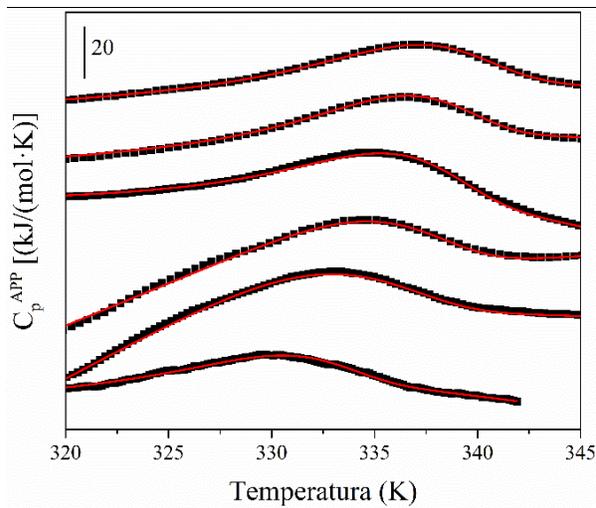
Con los resultados obtenidos en este trabajo, lo que resta por hacer, para comprender el mecanismo de agregación de estas tres cristalinas inducida por cobre, zinc y mercurio, es completar el análisis calorimétrico (CDB y CTI) de los dominios aislados de las cristalinas H γ C y H γ S, así como llevar a cabo el estudio de diferentes mutantes de las tres cristalinas donde se cambien los posibles residuos que se encuentren involucrados en la unión con metales. Además, los resultados obtenidos por el grupo de la Dra. Liliana Quintanar determinados por EPR (Resonancia Paramagnética de electrón), XAS (Espectroscopia de absorción de rayos X) y DC (dicroísmo circular), en conjunto con nuestro datos obtenidos por calorimetría (CDB y CTI) servirán para llevar a cabo una discusión generalizada de este fenómeno de agregación de γ -cristalinas inducida por metal, y proponer una explicación general, y bien sustentada, sobre el mecanismo subyacente, y así determinar las posibles vías de estudio, en un futuro, de este problema.

7 Apéndices

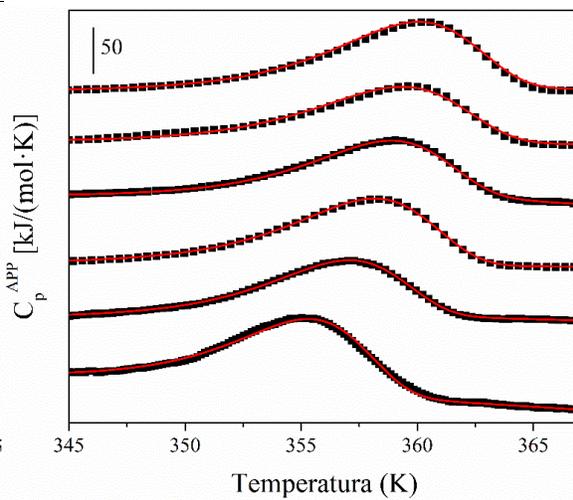
Apéndice A. Figuras Suplementarias

Ajuste al modelo de dos estados irreversible de los termogramas de CDB de las γ -cristalinas



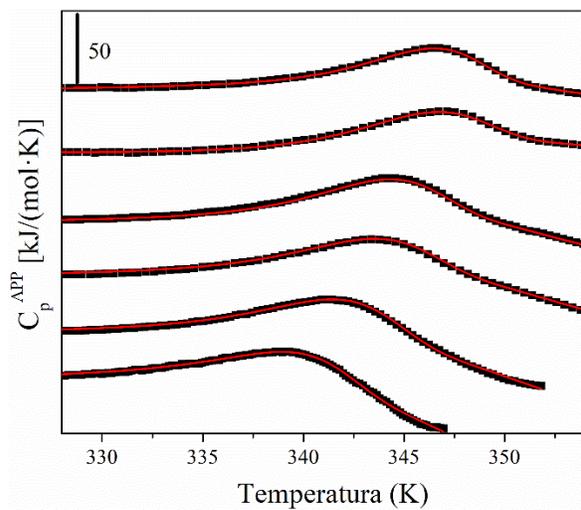


HyD-NT

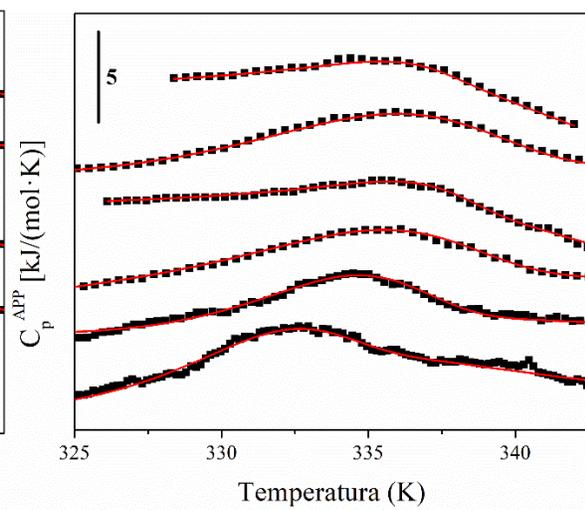


HyD H22Q

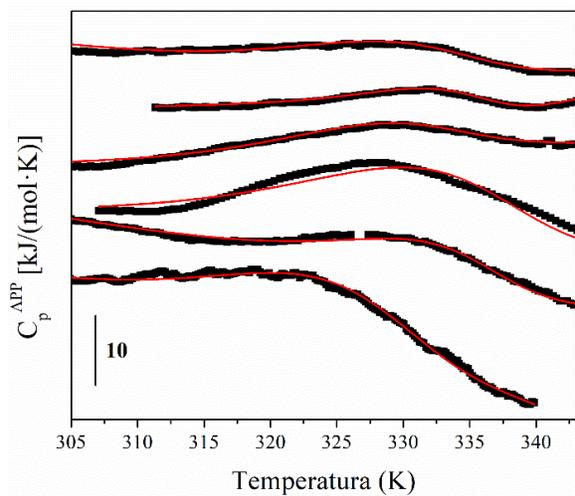
Ajuste al modelo de dos estados irreversible de los termogramas de CDB de las γ -cristalinas en presencia de cobre



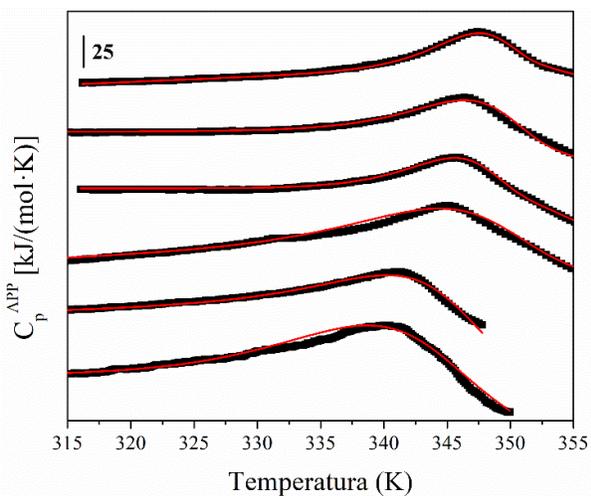
HyD con 3 Eq. de Cu^{2+}



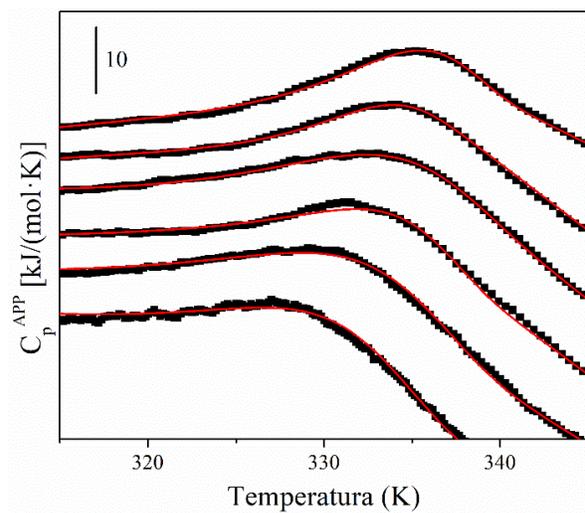
HyD-CT con 3 Eq. de Cu^{2+}



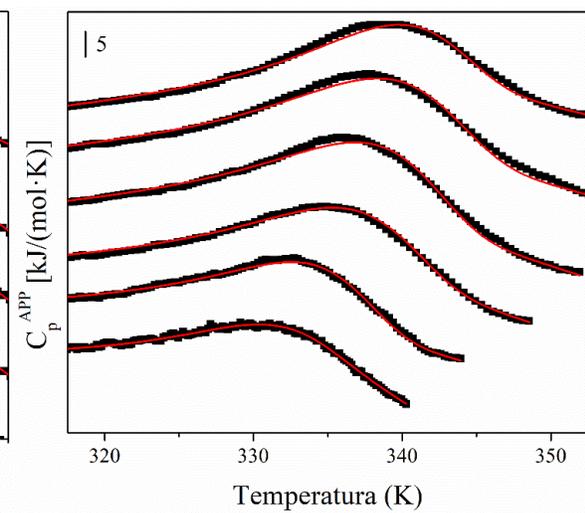
HyD-NT con 2 Eq. de Cu^{2+}



HyD H22Q con 4 Eq. de Cu^{2+}

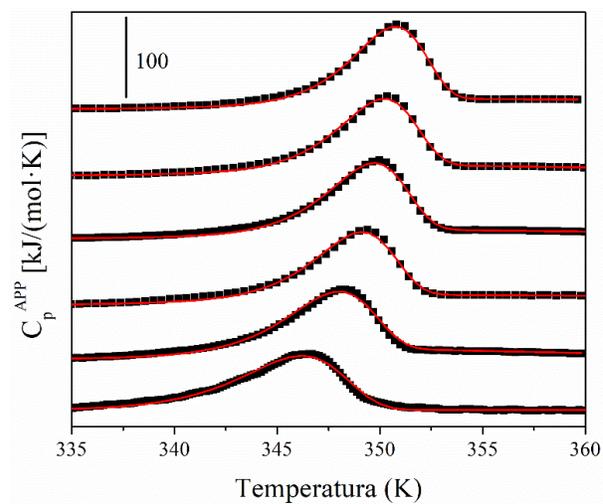


HyC con 4 Eq. de Cu^{2+}

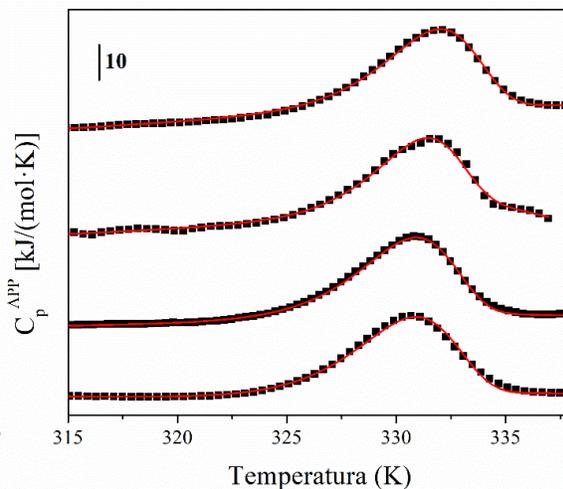


HyS con 4 Eq. de Cu^{2+}

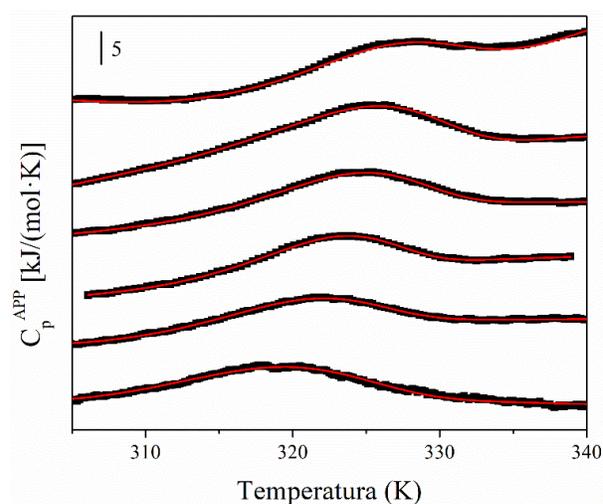
Ajuste al modelo de dos estados irreversible de los termogramas de CDB de las γ -cristalinas en presencia de mercurio



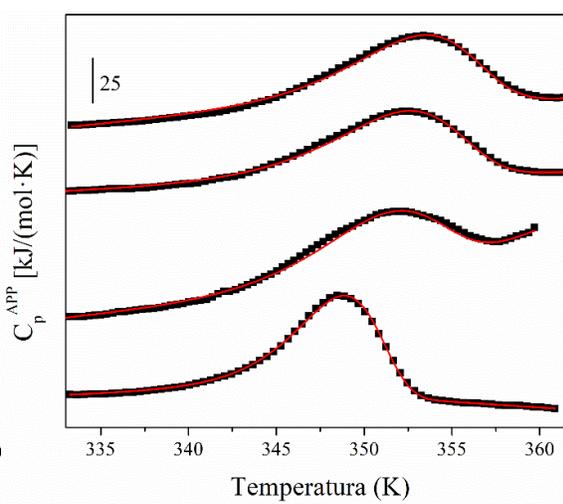
HyD con 3 Eq. de Hg^{2+}



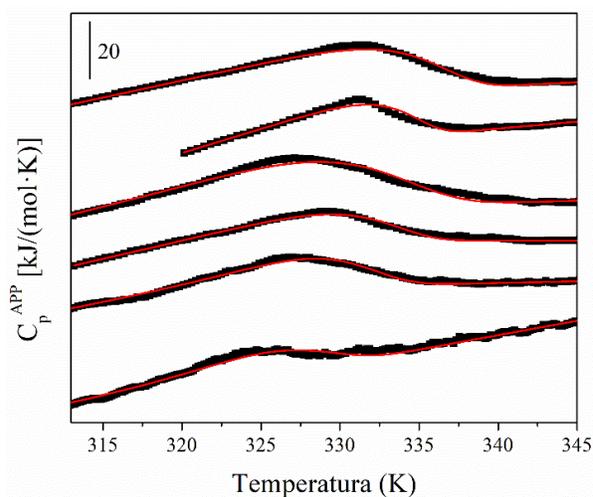
HyD-CT con 1 Eq. de Hg^{2+}



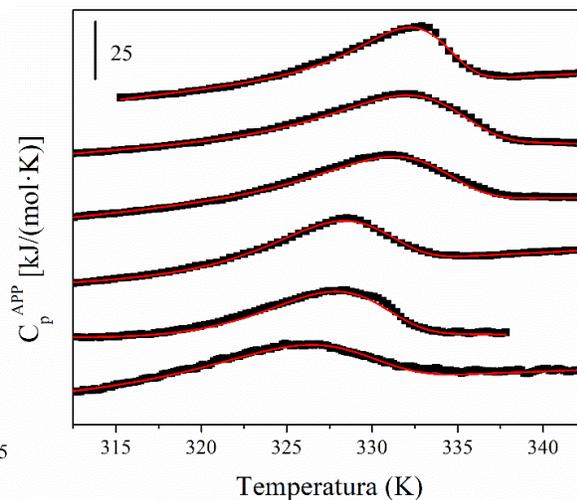
HyD-NT con 2 Eq. de Hg^{2+}



HyD H22Q con 3 Eq. de Hg^{2+}

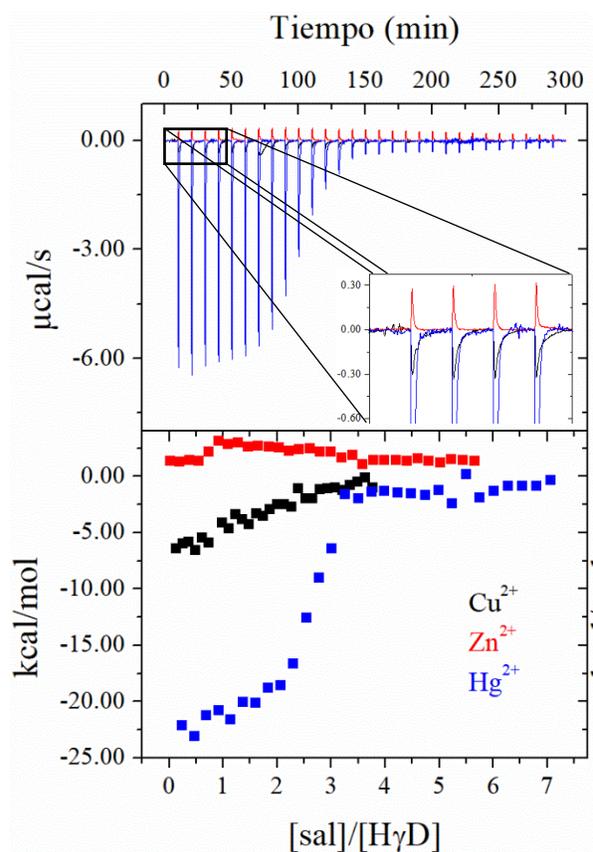


HyC con 5 Eq. de Hg²⁺

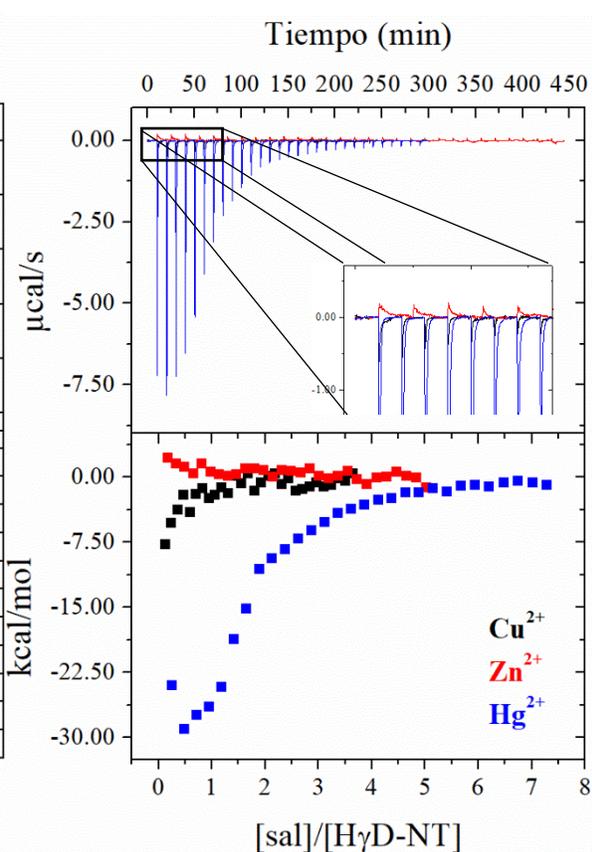


HyS con 2 Eq. de Hg²⁺

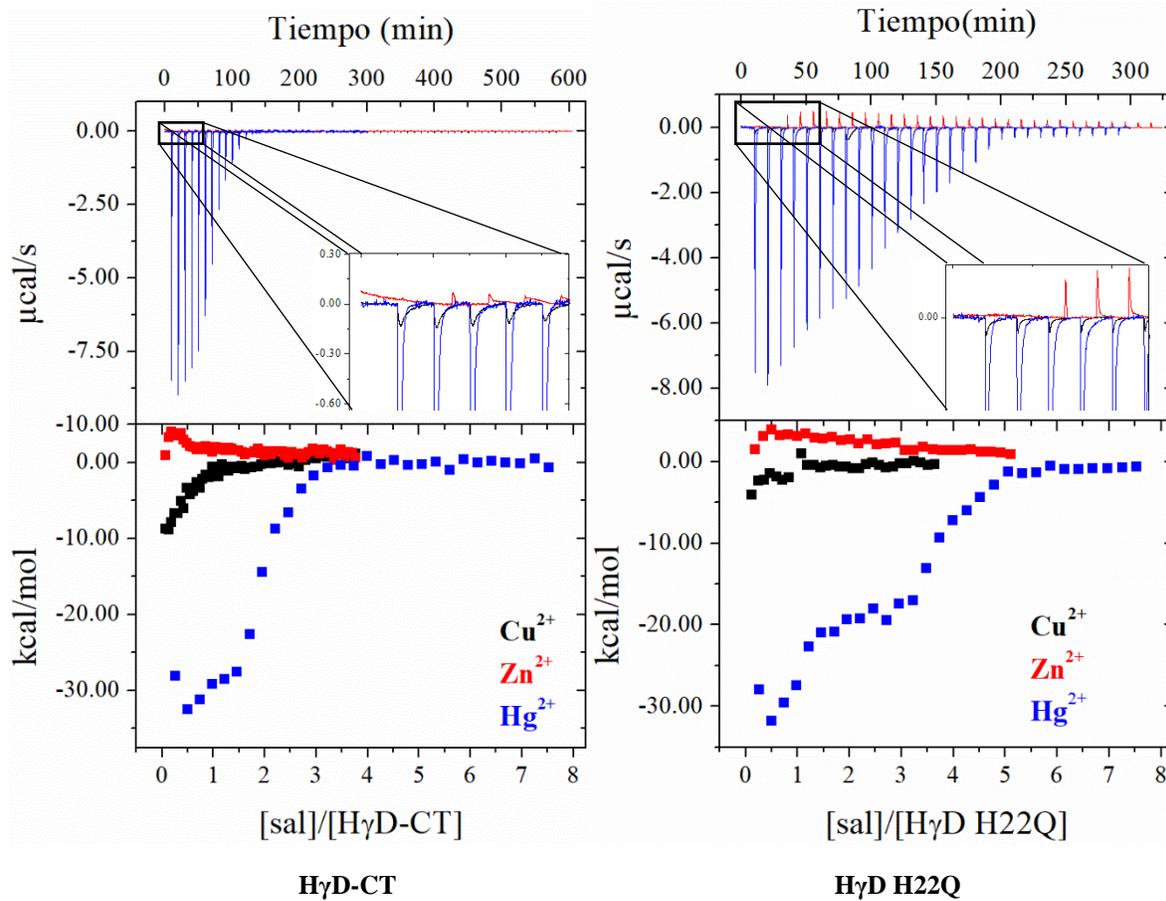
Experimentos de CTI de γ -cristalinas con iones metálicos

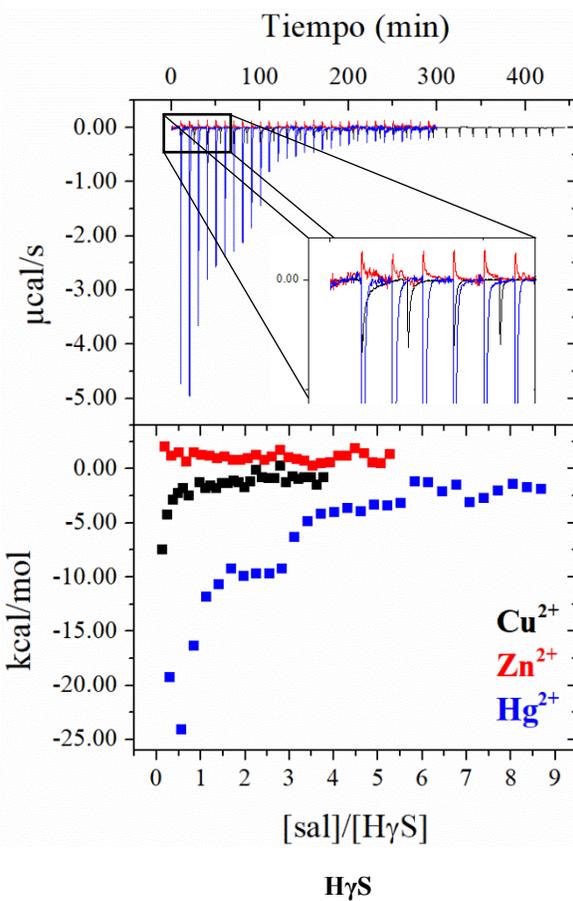
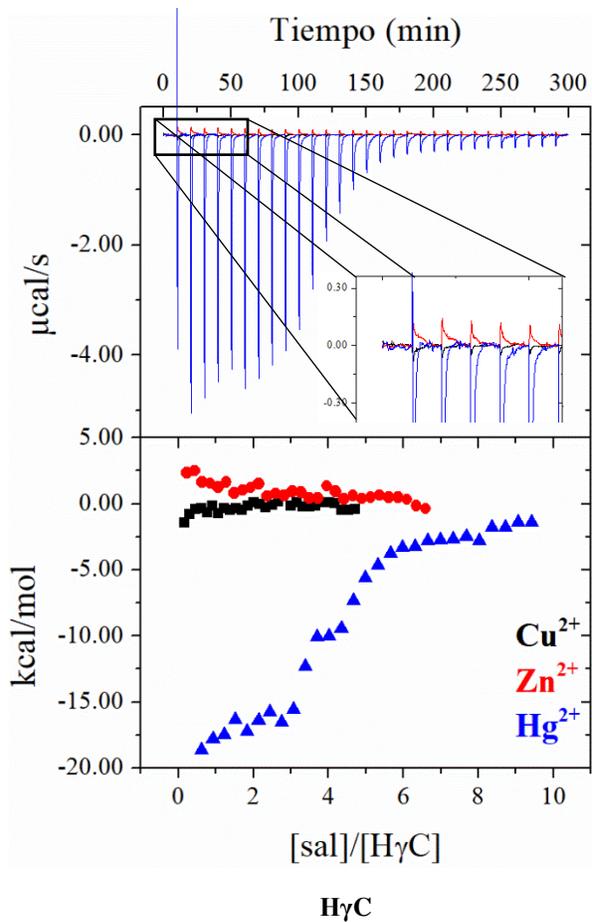


HyD



HyD-NT

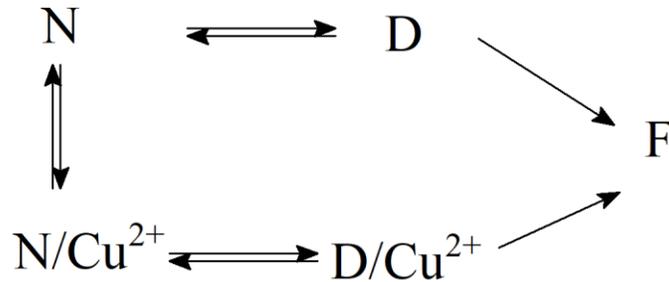




Apéndice B. Ajuste al modelo doble de dos estados irreversible

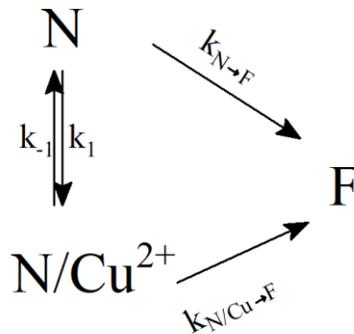
Para el caso de las trazas de H₇D en presencia de equivalentes de cobre donde se observan dos transiciones, el modelo de dos estados irreversible no puede ser aplicado, sino que deben considerarse ambas contribuciones de las dos especies presentes en la muestra.

Tomando como base el modelo de Lumry-Eyring, el modelo que mejor describe estas trazas es:



Donde N , D corresponden a los estados nativo y desplegado, respectivamente, de la proteína sin Cu^{2+} (transición con T_m mayor), mientras que N/Cu^{2+} y D/Cu^{2+} representan los estados nativos y desplegado, respectivamente, de la proteína con Cu^{2+} (transición de menor T_m).

Dado que las trazas calorimétricas presentan dos transiciones, la k_{-1} (conversión entre $N/\text{Cu}^{2+} \rightarrow N$) no es lo suficientemente grande como para que ocurra una conversión entre especies en la escala de tiempo en la que ocurre la medición. Y asumiendo que el estado final es el mismo para ambas especies (agregación), se puede aplicar un ajuste a un modelo doble de dos estados irreversible:



La capacidad calorífica aparente en este modelo se da mediante:

$$C_p^{APP} = C_p^{PRE} + (C_p^{POST} - C_p^{PRE})(1 - \chi_N) - \Delta H_N \left(\frac{d\chi_N}{dT} \right)$$

$$\chi_N = \chi_A + \chi_B$$

$$\chi_A = \exp \left[- \exp \left(\frac{E_{act1} \cdot \Delta T}{R \cdot T_{m1}^2} \right) \right]$$

$$\chi_B = \exp \left[- \exp \left(\frac{E_{act2} \cdot \Delta T}{R \cdot T_{m2}^2} \right) \right]$$

$$\Delta H_N \left(\frac{d\chi_N}{dT} \right) = \Delta H_A \left(\frac{d\chi_A}{dT} \right) + \Delta H_B \left(\frac{d\chi_B}{dT} \right)$$

$$\frac{d\chi_A}{dT} = - \frac{E_{act1}}{R \cdot T_{m1}^2} \cdot \exp \left(\frac{E_{act1} \cdot \Delta T}{R \cdot T_{m1}^2} \right) \cdot \exp \left[- \exp \left(\frac{E_{act1} \cdot \Delta T}{R \cdot T_{m1}^2} \right) \right]$$

$$\frac{d\chi_B}{dT} = - \frac{E_{act2}}{R \cdot T_{m2}^2} \cdot \exp \left(\frac{E_{act2} \cdot \Delta T}{R \cdot T_{m2}^2} \right) \cdot \exp \left[- \exp \left(\frac{E_{act2} \cdot \Delta T}{R \cdot T_{m2}^2} \right) \right]$$

Donde C_p^{PRE} y C_p^{POST} son las líneas base pre y post transición, las cuales se toman como funciones lineales respecto a la temperatura, χ_N es la fracción mol del estado nativo considerando ambas contribución de la proteína sin (χ_A) y con Cu^{2+} (χ_B), ΔH_N es la entalpía de desnaturalización del estado nativo ΔH_A (transición de $N \rightarrow F$) y ΔH_B (transición de $N/\text{Cu}^{2+} \rightarrow F$). E_{act1} es la energía de activación entre el estado nativo y el estado de transición para la proteína sin Cu^{2+} , siendo $\Delta T = T - T_{m1}$. Mientras que E_{act2} es la energía de activación entre el estado nativo con Cu^{2+} y el estado de transición de esta especie, siendo $\Delta T = T - T_{m2}$.

Como se muestra en la **Figura B1** el ajuste de las trazas de HγD en presencia de 0.5, 1 y 2 equivalentes se ajustan muy bien a este nuevo modelo doble desarrollado. De igual modo, los valores obtenidos de E_{act} y T_m (datos no mostrados) fueron congruentes con lo observado en los ajuste al modelo de dos estados irreversible que fueron aplicados a los termogramas donde una sola transición fue observada (en ausencia y presencia de 3 equivalentes de cobre). Sin embargo, será necesario validar completamente este modelo en otras condiciones.

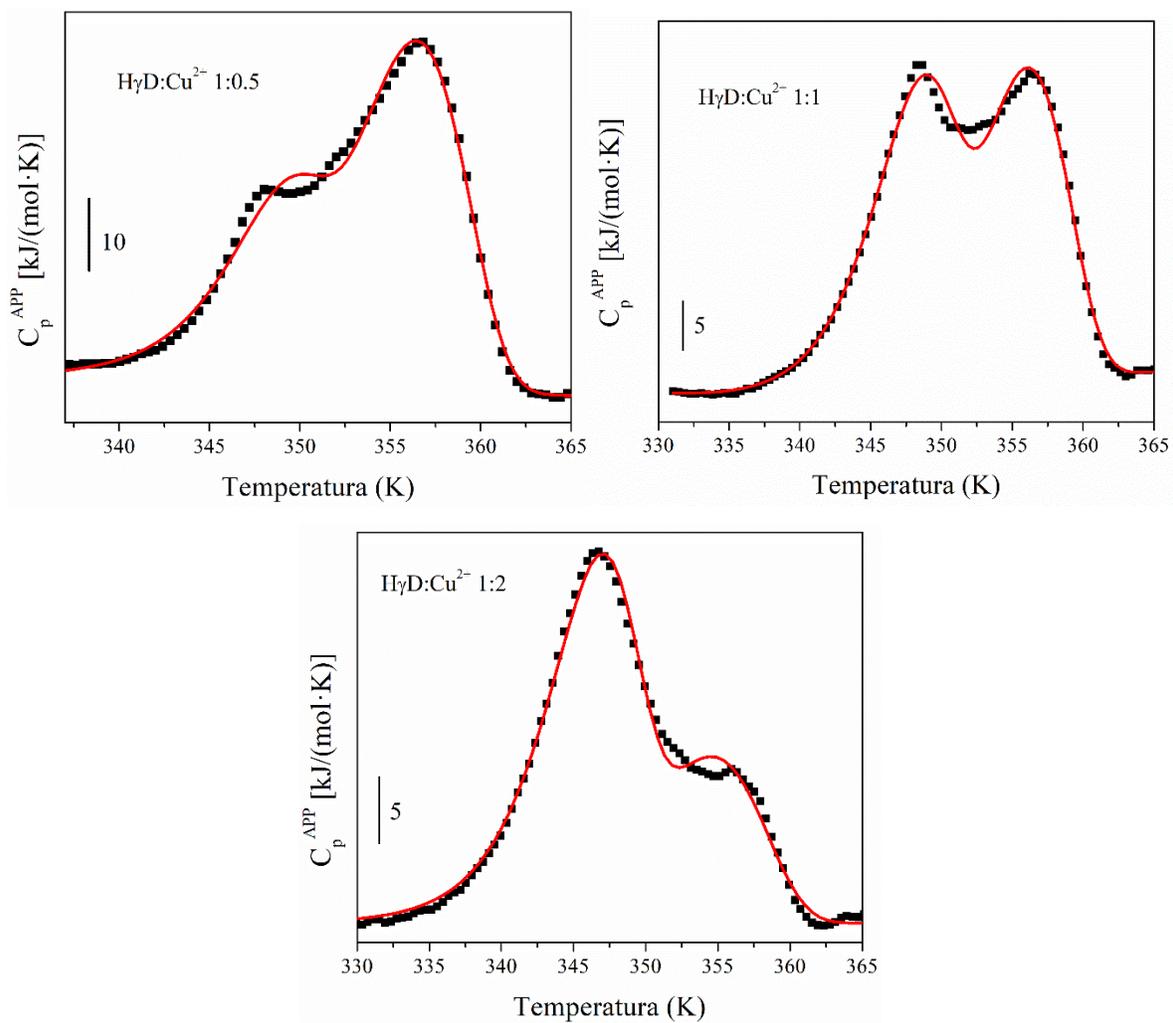


Figura B 1. Ajuste al modelo doble de dos estados irreversible de las trazas calorimétricas de CDB de HyD en presencia de 0.5, 1 y 2 equivalentes de cobre a una velocidad de barrido de 1.5 K/min.

Apéndice C. Tablas de resultados obtenidos por CDB y CTI

Tabla C 1. Estabilidad cinética para HyD, HyD-CT, HyD-NT, HyC, HyS y HyD H22Q en presencia y ausencia de iones metálicos. *Velocidad de barrido de 3 °C/min.

	E_{act} (kJ/mol)	E_{act} (kcal/mol)	$\ln(k/\text{min}^{-1})$ 37 °C	k (min ⁻¹) 37 °C	$t_{1/2}$ (días) 37 °C	$t_{1/2}$ (años) 37 °C	T_m (°C) *
HyD	374.4 ± 1.6	89.5 ± 0.4	-19.63	2.97 × 10 ⁻⁹	1.6 × 10 ⁵	443.66	85.65
HyD:Cu²⁺ 1:3	347.5 ± 4.3	83.1 ± 1.0	-13.91	9.09 × 10 ⁻⁷	5.3 × 10 ²	1.45	73.38
HyD:Zn²⁺	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto
HyD:Hg²⁺ 1:3	491.6 ± 10.5	117.5 ± 2.5	-21.62	4.09 × 10 ⁻¹⁰	1.2 × 10 ⁶	3224.35	77.55
HyD-CT	409.2 ± 5.4	97.8 ± 1.3	-17.48	2.55 × 10 ⁻⁸	1.9 × 10 ⁴	51.67	75.39
HyD-CT:Cu²⁺ 1:3	296.8 ± 8.5	70.9 ± 2.0	-9.24	9.70 × 10 ⁻⁵	5	0.01	63.58
HyD-CT:Zn²⁺	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto
HyD-CT:Hg²⁺ 1:1	431.1 ± 5.0	103.0 ± 1.2	-10.62	2.43 × 10 ⁻⁵	20	0.05	58.77
HyD-NT	256.9 ± 4.8	61.4 ± 1.2	-8.37	2.33 × 10 ⁻⁴	2	0.01	63.74
HyD-NT:Cu²⁺ 1:2	131.7 ± 6.6	31.5 ± 1.6	-4.37	1.27 × 10 ⁻²	0.04	0	57.08
HyD-NT:Zn²⁺	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto
HyD-NT:Hg²⁺ 1:2	144.0 ± 4.9	34.4 ± 1.2	-3.51	2.98 × 10 ⁻²	0.02	0	51.82

Continuación Tabla C1.

	E_{act} (kJ/mol)	E_{act} (kcal/mol)	$\ln(k/\text{min}^{-1})$ 37 °C	k (min ⁻¹) 37 °C	$t_{1/2}$ (días) 37 °C	$t_{1/2}$ (años) 37 °C	T_m (°C) *
HγC	521 ± 16.3	124.5 ± 3.9	-24.77	1.74 × 10 ⁻¹¹	2.8 × 10 ⁷	75681.98	80.82
HγC:Cu²⁺ 1:4	262.2 ± 10.4	62.7 ± 2.5	-7.92	3.63 × 10 ⁻⁴	1.3	0	62.54
HγC:Zn²⁺	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto
HγC:Hg²⁺ 1:5	266.8 ± 11.6	63.8 ± 2.8	-7.45	5.80 × 10 ⁻⁴	0.8	0	58.64
HγS	313.6 ± 4.0	75.0 ± 1.0	-13.43	1.47 × 10 ⁻⁶	3.3 × 10 ²	0.9	74.61
HγS:Cu²⁺ 1:4	215.1 ± 2.1	51.4 ± 0.5	-7.77	4.29 × 10 ⁻⁴	1.1		67.30
HγS:Zn²⁺	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto
HγS:Hg²⁺ 1:2	250.2 ± 7.0	59.8 ± 1.7	-6.61	1.35 × 10 ⁻³	0.4	0	59.57
HγD H22Q	374.8 ± 2.8	89.6 ± 0.7	-20.15	1.78 × 10 ⁻⁹	2.7 × 10 ⁵	740.29	86.91
HγD H22Q:Cu²⁺ 1:4	214.6 ± 7.3	51.3 ± 1.8	-9.50	7.48 × 10 ⁻⁵	6	0.02	74.31
HγD H22Q:Zn²⁺	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto
HγD H22Q:Hg²⁺ 1:3	318.4 ± 10.4	76.1 ± 2.5	-14.98	3.12 × 10 ⁻⁷	1.6 × 10 ³	4.23	80.07

Tabla C 2. Interacción entre H γ D, H γ D-CT, H γ D-NT, H γ C, H γ S y H γ D H22Q con iones metálicos a 25 °C.

Sistema	Modelo (Proteína:Metal)	K (M ⁻¹)	ΔH (kcal /mol)	ΔG (kcal/mol)	$-T\Delta S$ (kcal/mol)	χ^2	Número de Experimentos
H γ D/Cu ²⁺	FS-M ₁ A ₁ -M ₁ A ₂ 1:2	7.4 ± 1.3 × 10 ⁵ 3.9 ± 1.1 × 10 ⁴	-4.9 ± 0.1 -4.3 ± 0.2	-8.0 -6.3	-3.1 -2.0	4.8	4
	Sitios independientes ($n = 1.5$) 2:3	6.0 ± 0.4 × 10 ⁴	-7.7 ± 0.3	-6.5	1.2	3.3	4
H γ D-CT/Cu ²⁺	Sitios independientes ($n = 0.5$) 2:1	9.3 ± 0.3 × 10 ⁵	-6.0 ± 0.04	-8.1	-2.1	12.3	3
H γ D-NT/Cu ²⁺	FS-M ₂ A ₁ 2:1	2.1 ± 0.1 × 10 ⁹	-8.1 ± 0.2	-12.7	-4.6	2.2	2
H γ D H22Q/ Cu ²⁺	FS-M ₁ A ₁ 1:1	1.9 ± 0.4 × 10 ⁶	-1.6 ± 0.1	-8.6	-7.0	4.6	2
H γ C/Cu ²⁺	FS-M ₁ A ₁ 1:1	1.0 ± 0.1 × 10 ⁶	-0.4 ± 0.02	-8.2	-7.8	3.7	2
H γ S/Cu ²⁺	FS-M ₂ A ₁ 2:1	5.9 ± 0.7 × 10 ⁹	-5.9 ± 0.1	-13.3	-7.4	3.5	2
MOPS/Zn ²⁺	FS-M ₁ A ₁ 1:1	1.03 ± 0.02 × 10 ⁴	7.45 ± 0.06	-5.5	-12.9	2.1	2
H γ D/Zn ²⁺	AB-FS-M ₁ A ₁ -M ₁ A ₂ 1:2	4.6 ± 0.4 × 10 ⁸ 6.6 ± 0.7 × 10 ⁵	8.7 ± 0.01 50.5 ± 0.5	-11.8 -7.9	-20.5 -58.4	1.6	2
H γ D-CT/Zn ²⁺	No interacción	-	-	-	-	-	2

Continuación Tabla C2.

Sistema	Modelo (Proteína:Metal)	K (M^{-1})	ΔH (kcal/mol)	ΔG (kcal/mol)	$-T\Delta S$ (kcal/mol)	χ^2	Número de Experimentos
H γ D-NT/Zn $^{2+}$	No interacción	-	-	-	-	-	2
H γ D H22Q/ Zn $^{2+}$	AB-FS-M $_1$ A $_1$ -M $_2$ A $_1$ 2:1	$2.6 \pm 0.1 \times 10^6$ $4.4 \pm 0.6 \times 10^4$	35.0 ± 1.0 -42.0 ± 2.0	-8.8 -6.3	-43.8 35.7	1.8	1
H γ C/Zn $^{2+}$	No interacción	-	-	-	-	-	2
H γ S/Zn $^{2+}$	No interacción	-	-	-	-	-	2
H γ D/Hg $^{2+}$	Sitios independientes ($n \approx 2.5$) 2:5	$1.6 \pm 0.04 \times 10^6$	-20.0 ± 0.03	-8.5	11.5	14.3	4
H γ D-CT/Hg $^{2+}$	Sitios independientes ($n \approx 2$) 1:2	$1.2 \pm 0.1 \times 10^6$	-32.0 ± 0.4	-8.3	23.7	11.8	1
H γ D-NT/Hg $^{2+}$	FS-M $_1$ A $_1$ -M $_1$ A $_2$ 1:2	$6.6 \pm 1.1 \times 10^6$ $6.2 \pm 1.5 \times 10^4$	-28.0 ± 0.7 -14.0 ± 1.0	-9.3 -6.5	18.7 7.5	3.7	1
H γ D H22Q/Hg $^{2+}$	Sitios independientes ($n = 1, 3$) 1:4	$4.2 \pm 0.5 \times 10^7$ $3.7 \pm 0.3 \times 10^5$	-30.0 ± 0.2 -20.0 ± 0.2	-10.4 -7.6	19.6 12.4	16.7	1
H γ C/Hg $^{2+}$	Sitios independientes ($n \approx 4$) 1:4	$5.1 \pm 0.3 \times 10^5$	-15.0 ± 0.1	-7.8	7.2	4.0	1
H γ S/Hg $^{2+}$	FS-M $_1$ A $_1$ -M $_1$ A $_2$ -M $_1$ A $_3$ 1:3	$2.1 \pm 0.5 \times 10^7$ $1.3 \pm 0.6 \times 10^6$ $9.4 \pm 6.0 \times 10^4$	-13.0 ± 0.2 -6.4 ± 0.3 -16.0 ± 0.3	-10.0 -8.3 -6.8	3.0 -1.9 9.2	4.7	2

8 Referencias

- [1] Fernando, Q. G. (1987). *Anatomía Humana. Vol. III*. Porrúa.
- [2] Frost, L. S., Mitchell, C. H. y Boesze-Battaglia, K. (2014). Autophagy in the eye: implications for ocular cell health. *Experimental Eye Research*, 124, 56-66.
- [3] Bloemendal, H., de Jong, W., Jaenicke, R., Lubsen, N. H., Slingsby, C. y Tardieu, A. (2004). Ageing and vision: structure, stability and function of lens crystallins. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 86(3), 407-485.
- [4] Morishita, H. y Mizushima, N. (2016). Autophagy in the lens. *Experimental Eye Research*, 144, 22-28.
- [5] Andley, U. P. (2007). Crystallins in the eye: function and pathology. *Progress in Retinal and Eye Research*, 26(1), 78-98.
- [6] Lampi, K. J., Ma, Z., Hanson, S. R., Azuma, M., Shih, M., Shearer, T. R., Smith, D.L., Smith, S.B. y David, L. L. (1998). Age-related changes in human lens crystallins identified by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Experimental Eye Research*, 67(1), 31-43.
- [7] Ray, N. J., Hall, D. y Carver, J. A. (2016). Deamidation of N76 in human γ S-crystallin promotes dimer formation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1860(1), 315-324.
- [8] Hanson, S. R., Hasan, A., Smith, D. L. y Smith, J. B. (2000). The major in vivo modifications of the human water-insoluble lens crystallins are disulfide bonds, deamidation, methionine oxidation and backbone cleavage. *Experimental Eye Research*, 71(2), 195-207.
- [9] Ma, Z., Hanson, S. R., Lampi, K. J., David, L. L., Smith, D. L. y Smith, J. B. (1998). Age-related changes in human lens crystallins identified by HPLC and mass spectrometry. *Experimental Eye Research*, 67(1), 21-30.
- [10] Wilmarth, P. A., Tanner, S., Dasari, S., Nagalla, S. R., Riviere, M. A., Bafna, V., Pevzner, P.A. y David, L. L. (2006). Age-related changes in human crystallins determined from comparative analysis of post-translational modifications in young and aged lens: does deamidation contribute to crystallin insolubility? *Journal of Proteome Research*, 5(10), 2554-2566.
- [11] Mills, I. A., Flaugh, S. L., Kosinski-Collins, M. S. y King, J. A. (2007). Folding and stability of the isolated Greek key domains of the long-lived human lens proteins γ D-crystallin and γ S-crystallin. *Protein Science*, 16(11), 2427-2444.
- [12] Francis, P. J., Berry, V., Moore, A. T. y Bhattacharya, S. (1999). Lens biology: development and human cataractogenesis. *Trends in Genetics*, 15(5), 191-196.
- [13] Haslbeck, M., Peschek, J., Buchner, J. y Weinkauff, S. (2016). Structure and function of α -crystallins: traversing from in vitro to in vivo. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1860(1), 149-166.
- [14] Slingsby, C., Norledge, B., Simpson, A., Bateman, O. A., Wright, G., Driessen, H. P. C., Lindley, P. F., Moss, D. S. y Bax, B. (1997). X-ray diffraction and structure of crystallins. *Progress in Retinal and Eye Research*, 16(1), 3-29
- [15] Vendra, V. P. R., Khan, I., Chandani, S., Muniyandi, A. y Balasubramanian, D. (2016). Gamma crystallins of the human eye lens. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1860(1), 333-343.

- [16] Kuriyan, J., Konforti, B. y Wemmer, D. (2012). *The molecules of life: Physical and chemical principles*. Garland Science.
- [17] Serebryany, E. y King, J. A. (2014). The $\beta\gamma$ -crystallins: native state stability and pathways to aggregation. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 115(1), 32-41.
- [18] Lubsen, N. H., Aarts, H. J. M. y Schoenmakers, J. G. G. (1988). The evolution of lenticular proteins: the β -and γ -crystallin super gene family. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 51(1), 47-76.
- [19] Mills-Henry, I. A. R. (2007). *Stability, unfolding, and aggregation of the gamma D and gamma S human eye lens crystallins* (Tesis doctoral, Massachusetts Institute of Technology).
- [20] Purkiss, A. G., Bateman, O. A., Goodfellow, J. M., Lubsen, N. H. y Slingsby, C. (2002). The X-ray crystal structure of human γ S-crystallin C-terminal domain. *Journal of Biological Chemistry*, 277(6), 4199-4205.
- [21] Wang, X., Garcia, C. M., Shui, Y. B. y Beebe, D. C. (2004). Expression and regulation of α -, β -, and γ -crystallins in mammalian lens epithelial cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 45(10), 3608-3619.
- [22] Flaugh, S. L., Mills, I. A. y King, J. (2006). Glutamine deamidation destabilizes human γ D-crystallin and lowers the kinetic barrier to unfolding. *Journal of Biological Chemistry*, 281(41), 30782-30793.
- [23] Anfinsen, C. B., Haber, E., Sela, M. y White, F. H. (1961). The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 47(9), 1309-1314.
- [24] Levinthal, C. (1968). Are there pathways for protein folding? *Journal de Chimie Physique*, 65, 44-45.
- [25] Israelachvili, J. N. (2011). *Intermolecular and surface forces*. Academic press.
- [26] Anslyn E. V. y Dougherty D. A (2006). *Modern Physical Organic Chemistry*. University Science Books.
- [27] Romero-Romero, S., Fernández-Velasco, D. A. y Costas, M. (2018). Estabilidad termodinámica de proteínas. *Educación Química*, 29(3), 3-17.
- [28] Fersht, A. (1999). *Structure and mechanism in protein science: a guide to enzyme catalysis and protein folding*. Macmillan.
- [29] Sanchez-Ruiz, J. M. (2010). Protein kinetic stability. *Biophysical Chemistry*, 148(1-3), 1-15.
- [30] Quezada, A. G., Díaz-Salazar, A. J., Cabrera, N., Pérez-Montfort, R., Piñeiro, Á. y Costas, M. (2017). Interplay between protein thermal flexibility and kinetic stability. *Structure*, 25(1), 167-179.
- [31] del Pino, I. M. P., Ibarra-Molero, B. y Sanchez-Ruiz, J. M. (2000). Lower kinetic limit to protein thermal stability: a proposal regarding protein stability in vivo and its relation with misfolding diseases. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 40(1), 58-70.
- [32] Rudolph, R., Siebendritt, R., Nessler, G., Sharma, A. K. y Jaenicke, R. (1990). Folding of an all-beta protein: independent domain folding in gamma II-crystallin from calf eye lens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(12), 4625-4629.
- [33] Flaugh, S. L., Kosinski-Collins, M. S. y King, J. (2005). Interdomain side-chain interactions in human γ D crystallin influencing folding and stability. *Protein Science*, 14(8), 2030-2043.

- [34] Kong, F. y King, J. (2011). Contributions of aromatic pairs to the folding and stability of long-lived human γ D-crystallin. *Protein Science*, 20(3), 513-528.
- [35] Kosinski-Collins, M. S., Flaugh, S. L. y King, J. (2004). Probing folding and fluorescence quenching in human γ D crystallin Greek key domains using triple tryptophan mutant proteins. *Protein Science*, 13(8), 2223-2235.
- [36] Kosinski-Collins, M. S. y King, J. (2003). In vitro unfolding, refolding, and polymerization of human γ D crystallin, a protein involved in cataract formation. *Protein Science*, 12(3), 480-490.
- [37] Sahin, E., Jordan, J. L., Spataro, M. L., Naranjo, A., Costanzo, J. A., Weiss IV, W. F. y Roberts, C. J. (2011). Computational design and biophysical characterization of aggregation-resistant point mutations for γ D crystallin illustrate a balance of conformational stability and intrinsic aggregation propensity. *Biochemistry*, 50(5), 628-639.
- [38] Mills-Henry, I. A., Thol, S. L., Kosinski-Collins, M. S., Serebryany, E. y King, J. A. (2019). Kinetic Stability of Long-Lived Human Lens γ -Crystallins and Their Isolated Double Greek Key Domains. *Biophysical Journal*, 117(2), 269-280.
- [39] Binolfi, A., Quintanar, L., Bertocini, C. W., Griesinger, C. y Fernández, C. O. (2012). Bioinorganic chemistry of copper coordination to alpha-synuclein: Relevance to Parkinson's disease. *Coordination Chemistry Reviews*, 256(19-20), 2188-2201.
- [40] Bush, A. I. (2003). The metallobiology of Alzheimer's disease. *Trends in Neurosciences*, 26(4), 207-214.
- [41] Faller, P., Hureau, C. y La Penna, G. (2014). Metal ions and intrinsically disordered proteins and peptides: from Cu/Zn amyloid- β to general principles. *Accounts of Chemical Research*, 47(8), 2252-2259.
- [42] Srivastava, V. K., Varshney, N. y Pandey, D. C. (1992). Role of trace elements in senile cataract. *Acta Ophthalmologica*, 70(6), 839-841.
- [43] Dawczynski, J., Blum, M., Winnefeld, K. y Strobel, J. (2002). Increased content of zinc and iron in human cataractous lenses. *Biological Trace Element Research*, 90(1-3), 15-23.
- [44] Domínguez-Calva, J. A., Martínez-Jurado, E., Palomino-Vizcaino, G., Serebryany, E., King, J. A. y Quintanar, L. (2020). Copper-induced aggregation of human lens γ -crystallins: Insights into the bioinorganic chemistry of cataracts disease. Manuscrito en preparación.
- [45] Quintanar, L., Domínguez-Calva, J. A., Serebryany, E., Rivillas-Acevedo, L., Haase-Pettingell, C., Amero, C. y King, J. A. (2016). Copper and zinc ions specifically promote nonamyloid aggregation of the highly stable human γ -D crystallin. *ACS Chemical Biology*, 11(1), 263-272.
- [46] Ramkumar, S., Fan, X., Wang, B., Yang, S. y Monnier, V. M. (2018). Reactive cysteine residues in the oxidative dimerization and Cu²⁺ induced aggregation of human γ D-crystallin: Implications for age-related cataract. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1864(11), 3595-3604.
- [47] Domínguez-Calva, J. A., Haase-Pettingell, C., Serebryany, E., King, J. A. y Quintanar, L. (2018). A Histidine Switch for Zn-Induced Aggregation of γ -Crystallins Reveals a Metal-Bridging Mechanism That Is Relevant to Cataract Disease. *Biochemistry*, 57(33), 4959-4962.

- [48] Fernández-Silva, A., French-Pacheco, L., Rivillas-Acevedo, L. y Amero, C. (2020). Aggregation pathways of human γ D crystallin induced by metal ions revealed by time dependent methods. *PeerJ*, 8, e9178.
- [49] Domínguez-Calva, J. A., Pérez-Vázquez, M. L., Serebryany, E., King, J. A. y Quintanar, L. (2018). Mercury-induced aggregation of human lens γ -crystallins reveals a potential role in cataract disease. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 23(7), 1105-1118.
- [50] Rodríguez-Larrea, D., Minning, S., Borchert, T. V. y Sanchez-Ruiz, J. M. (2006). Role of solvation barriers in protein kinetic stability. *Journal of Molecular Biology*, 360(3), 715-724.
- [51] Costas, M., Rodríguez-Larrea, D., De Maria, L., Borchert, T. V., Gómez-Puyou, A. y Sanchez-Ruiz, J. M. (2009). Between-species variation in the kinetic stability of TIM proteins linked to solvation-barrier free energies. *Journal of Molecular Biology*, 385(3), 924-937.
- [52] Sanchez-Ruiz, J. M. (1992). Theoretical analysis of Lumry-Eyring models in differential scanning calorimetry. *Biophysical Journal*, 61(4), 921-935.
- [53] Piñeiro, Á., Muñoz, E., Sabín, J., Costas, M., Bastos, M., Velázquez-Campoy, Garrido, P. F., Dumas, P., Ennifar, E., García-Río, L, Rial, J., Pérez, D., Fraga, P., Rodríguez, A. y Cotelo, C. (2019). AFFINImeter: A software to analyze molecular recognition processes from experimental data. *Analytical Biochemistry*, 577, 117-134.
- [54] Aguayo-Ortiz, R., González-Navejas, A., Palomino-Vizcaino, G., Rodríguez-Meza, O., Costas, M., Quintanar, L. y Dominguez, L. (2019). Thermodynamic stability of human γ D-crystallin mutants using alchemical free-energy calculations. *Journal of Physical Chemistry B*, 123 (27), 5671-5677.
- [55] Roskamp, K. W., Azim, S., Kassier, G., Norton-Baker, B., Sprague-Piercy, M. A., Miller, R. D. y Martin, R. W. (2020). Human γ S-crystallin copper binding helps buffer against aggregation caused by oxidative damage. *Biochemistry*.