



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**CONTRIBUCIÓN DE E13 Y K17 A LA ESTABILIDAD  
TERMODINÁMICA DEL DOMINIO VARIABLE  
RECOMBINANTE 6aJL2.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGO  
P R E S E N T A :**

**GERARDO VÁZQUEZ DEL ANGEL**



**DIRECTOR DE TESIS:  
DR. LUIS DEL POZO YAUNER**

**2010**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## **Agradecimientos.**

בְּרוּךְ שֵׁם יְהוָה

Baruch Hashem Adonai. Bendito sea el nombre del Señor.

Gracias al todo poderoso Adonai, por que el me hizo y para el soy, a Ruach Hakodesh por su consuelo y amor, a Yeshua Ha'Mashiach por su sacrificio por mi, y a mi hermana Hokhmah por revelarme tantas cosas ocultas.

A mis hijas Zoe, Heli y Mia, por que su existencia me dan fuerza para vivir cada día, y por que todo en la vida vale la pena cuando recuerdo que las tengo.

A mis padres Artemio y Rosa María, por los genes que me regalaron y la oportunidad que me dieron de vivir.

A mi tutor Luis del Pozo, por su amistad y las cosas que durante este tiempo me enseñó.

A todas las personas que de alguna o de otra manera me apoyaron en la realización de esta tesis.

**«El hombre encuentra a Dios detrás de cada puerta que la ciencia logra abrir.»  
Albert Einstein (1879-1955)**

## Índice.

1.Introducción.....	6
1.1 Composición general de los seres vivos. Las macromoléculas.....	7
1.2 La colección de proteínas de un organismo.....	9
1.3 Relación estructura-función en las proteínas.....	9
1.4 El plegamiento de las proteínas. Bases estructurales.....	10
1.5 Consideraciones cinéticas y termodinámicas del plegamiento.....	10
1.6 Maquinaria del plegamiento.....	13
1.7 Estructura de las proteínas.....	15
1.8 Los aminoácidos como bloques constituyentes de las proteínas.....	15
1.9 Niveles estructurales de las proteínas.....	16
1.10 Fuerzas e interacciones que estabilizan la estructura 3D de las proteínas.....	17
2.Antecedentes .....	18
2.1 Los enlaces salinos. Propiedades y contribución a la estabilidad de las proteínas.....	18
2.2 El caso de las proteínas de los organismos extremofilos.....	21
2.3 La agregación amiloide. Su relación con las enfermedades.....	22
2.4 La agregación amiloide de las cadenas ligeras como característica distintiva de la amiloidosis AL.....	23
2.5 El caso de la alta amiloidogenicidad de las cadenas ligeras $\lambda 6$ y la potencial contribución de las mutaciones somáticas.....	25
2.6 Las mutaciones de residuos iónicos que eliminan interacciones salinas. Posible contribución de las mutaciones en Glu13-Lys17 a la agregación amiloide $\lambda 6$ .....	26
3. Hipótesis.....	29

4. Objetivos.....	30
5. Reactivos y materiales.....	31
6. Resultados y Discusión.....	37
7. Conclusiones.....	50
8. Abreviaturas.....	51
9. Bibliografía.....	52

# CONTRIBUCIÓN DE E13 Y K17 A LA ESTABILIDAD TERMODINÁMICA DEL DOMINIO VARIABLE RECOMBINANTE 6aJL2.

## Resumen

Las proteínas, componentes fundamentales de los organismos vivos, están integradas por polímeros de aminoácidos. Estas moléculas en sí serían inútiles para los organismos si no adoptaran la forma específica que requieren para cumplir con su función. La información requerida para que las proteínas se plieguen correctamente reside en su secuencia de aminoácidos. La forma en como se pliegan sigue aun en discusión, sin embargo se conocen las fuerzas que las guían en este proceso, así como las que las mantienen en su estado natural plegado. Entre estas fuerzas se encuentran los enlaces salinos, originados por fuerzas electrostáticas entre algunos residuos cargados dentro de las proteínas; los puentes de hidrógeno y las interacciones de Van der Waals; estas fuerzas en la mayoría de los casos ayudan a la proteína a aumentar su estabilidad termodinámica.

Unas proteínas muy relevantes son las inmunoglobulinas o anticuerpos. Diversas investigaciones han revelado que estas proteínas sufren un proceso de hipermutación para poder cubrir una mayor cantidad de epítomos en los antígenos que reconocen. En las cadenas ligeras de los anticuerpos lambda se ha observado que las mutaciones en los residuos iónicos, que eliminan interacciones salinas entre los residuos Glu13-Lys17, pudieran contribuir a la agregación amiloide  $\lambda$ 6. Por lo anterior, en este trabajo se determinó la estabilidad termodinámica de la proteína nativa, de dos mutantes E13A y K17A, así como de la doble mutante E13A-K17A del dominio variable recombinante 6aJL2. Esto permitió determinar la contribución termodinámica del enlace salino que se establece entre estos dos residuos, observándose una gran relevancia en la estabilidad de la proteína. Aparentemente al suprimirse dicho puente la proteína se desestabiliza y muy probablemente esto lleve a la formación de fibras amiloides.

## **1.1 Composición general de los seres vivos. Las macromoléculas.**

Los seres vivos difieren significativamente de la materia inanimada en cuanto a su composición química, la cual se caracteriza por la abundancia de un grupo de sustancias de alto peso molecular y estructura polimérica denominadas macromoléculas. Este grupo lo componen los polisacáridos, las proteínas y los ácidos nucleicos, siendo su composición elemental C, N, H, O, P y S. El carácter polimérico indica que las macromoléculas están formadas mediante subunidades estructuralmente más sencillas denominadas monómeros, unidos entre sí mediante enlaces covalentes específicos de cada macromolécula. Los monómeros constituyentes de las proteínas son un grupo de veinte aminoácidos, estructuralmente muy diversos. Los nucleótidos son las unidades monoméricas de los ácidos nucleicos DNA y RNA y su diversidad estructural es menor, pues sólo hay cuatro diferentes para cada uno de ellos. Los polisacáridos, por otra parte, están formados por azúcares sencillos denominados monosacáridos.

Las características estructurales de las macromoléculas determinan la naturaleza de las funciones que éstas desempeñan. Los polisacáridos realizan funciones fundamentalmente estructurales y de almacenamiento de energía. Los ácidos nucleicos son los contenedores de la información que determina las características morfológicas, funcionales y adaptativas de los sistemas biológicos y además participan en la regulación de la expresión y la transferencia de esta información de una célula a su progeñe. Las proteínas convierten la información contenida en los ácidos nucleicos en acciones moleculares específicas. Esta clase de macromoléculas ejecutan y regulan la diversidad de funciones que dan soporte a la vida, como la catálisis enzimática, la actividad hormonal, funcionan como receptores y componentes de las vías de señalización que hacen posible el mantenimiento de la homeostasis celular y la interacción de las células con su entorno. También funcionan como transportadores transmembranales, acarreadores y almacenadores de moléculas de naturaleza diversa, tanto en la sangre y el fluido extracelular como en el citoplasma celular. Las proteínas nos defienden de la invasión de los agentes infecciosos, ya sea actuando como anticuerpos o como componentes del sistema del complemento. Modulan la expresión y la transferencia célula-célula de la información genética, funcionan como el elemento contráctil de los músculos, contribuyen al sostén y protección de las células y tejidos al formar parte del esqueleto y la sustancia extracelular, entre muchas otras funciones.

Como puede apreciarse, hay una correlación entre la diversidad de funciones que un tipo de macromolécula puede realizar y la diversidad de los monómeros que la constituyen. Esta correlación refleja la capacidad de las macromoléculas de contener mayor o menor información codificada en la

secuencia lineal de sus monómeros, lo cual sólo es posible si estos son diversos. En base a esta propiedad, las macromoléculas se dividen en informacionales y no informacionales. Las proteínas y los ácidos nucleicos pertenecen a la primera categoría. En los ácidos nucleicos, la información está codificada en la secuencia lineal de sus nucleótidos, específicamente en la sucesión de unidades denominadas codones, que están formadas por tres nucleótidos contiguos. Cada codón codifica para un único aminoácido, sin embargo, un mismo aminoácido puede ser codificado por más de un codón. Esto significa que el código de codones del DNA, o código genético, es “redundante” pero “no ambiguo”.

Según el dogma central de la biología<sup>[1]</sup>, la información contenida en la secuencia de codones de segmentos específicos del DNA denominados genes, fluye unidireccionalmente a través de varios procesos hasta ser traducida en la secuencia de aminoácidos de una proteína con propiedades de estructura y función específicas. En un primer paso, la secuencia de codones del gen es copiada en una molécula de RNA mensajero (RNAm) mediante el proceso de transcripción. El RNAm funciona como portador de la información codificada en el gen en su viaje hasta la maquinaria ribosomal, donde la secuencia de codones es traducida finalmente en la secuencia de aminoácidos de una proteína. En este proceso participan varios tipos de RNAs. Algunos, denominados RNA ribosomales, forman parte de la estructura de los ribosomas. Otra clase muy importante es el RNA de transferencia (RNAt), el cual funciona como “adaptador” en el proceso de decodificación de la información contenida en la secuencia de codones del RNAm en un nuevo tipo de código, el de la secuencia de aminoácidos de la proteína. Durante la traducción, cada codón del RNAm es reconocido por un triplete de bases del aminoacil-RNAt, denominado anti-codón, mediante unión por complementariedad. Cada aminoacil-RNAt está unido a la forma activa del aminoácido codificado por el codón del RNAm que él reconoce en el contexto del complejo ribosoma activo; así cada aminoácido es añadido a la cadena polipeptídica en síntesis, de acuerdo a la secuencia de codones del RNAm que está siendo traducido en el ribosoma<sup>[2]</sup>.

## **1.2 La colección de proteínas de un organismo.**

El término “proteoma” fue acuñado en 1995 por Marc Wilkins, un estudiante de doctorado del grupo del Dr. Keith Willians –Macquarie University en Sydney, New South Wales, Australia para describir a la colección completa de proteínas que representan el complemento del “genoma” de una célula u organismo<sup>[3, 4]</sup>. Este concepto ha sido aplicado a diferentes escalas en los sistemas biológicos. El proteoma celular es la totalidad de proteínas expresadas en una célula particular bajo condiciones

ambientales y de desarrollo específicos. El proteoma completo de un organismo puede ser conceptualizado como las proteínas de todas las variedades de proteomas de los tipos celulares que lo componen. El término también se ha aplicado para los compartimientos y organelos intracelulares. Por ejemplo, el proteoma mitocondrial de un tipo celular específico, el cual puede variar entre especies y aun entre individuos. El proteoma de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se compone de alrededor de 6000 proteínas diferentes, cada una expresada a diferente concentración, dependiendo de las condiciones de crecimiento, composición química del medio y ambiente físico. El proteoma de los humanos es de alrededor de 32,000 proteínas, cuya expresión tisular está sometida a una estrecha regulación por complejos mecanismos que modulan la expresión del genoma y que responden a las variaciones del medio externo e interno.

### **1.3 Relación estructura-función en las proteínas.**

Como se mencionó antes, las proteínas son las macromoléculas biológicas más versátiles en términos de las funciones que desempeñan<sup>[5]</sup>. Esta capacidad es soportada por su gran diversidad estructural. Hasta el presente, se han depositado más de 60,000 estructuras de proteínas en el *Protein Data Bank* (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>), las cuales se dividen en 1393 tipos diferentes de plegamientos, de acuerdo a los criterios de la web *Structural Classification of Protein* (SCOP) (<http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/>)[6]. El análisis comparativo de estas estructuras ha demostrado que un mismo tipo de plegamiento puede presentarse en proteínas con propiedades funcionales diferentes. Un ejemplo de esto es el motivo del plegamiento denominado barril  $\beta/\alpha$ , caracterizado inicialmente en las enzimas triosa fosfato isomerasas (TIM). Estas enzimas catalizan la isomerización reversible de las triosas fosfo-dihidroxiacetona (P-DHA) y 3 fosfo-gliceraldehido (3PG), metabolitos claves de la vía glucolítica. Ahora se sabe que muchas otras proteínas poseen este plegamiento. Si bien la mayoría de ellas son enzimas, sus propiedades catalíticas las diferencian radicalmente de las TIM. Otra clase de plegamiento frecuente entre las proteínas es el sándwich  $\beta$  de las inmunoglobulinas, el cual puede ser encontrado en anticuerpos, receptores de membrana para hormonas, factores de crecimiento, enzimas, proteínas de adhesión celular, lectinas, entre otros. Al respecto, se ha observado que un grupo de diez plegamientos, denominados super-plegamientos son muy frecuentes en las proteínas, presentándose en aproximadamente un tercio de las estructuras depositadas en el PDB <sup>[7, 8]</sup>.

#### **1.4 El plegamiento de las proteínas. Bases estructurales.**

Las proteínas son sintetizadas como cadenas lineales, sin embargo, deben adquirir su estructura tridimensional (3D) nativa antes de poder ejercer las funciones biológicas para las cuales han evolucionado. El estado nativo funcional es alcanzado a través del “plegamiento” el cual es un proceso de auto-ensamblado cooperativo en el que participan fuerzas de magnitud y naturaleza diversas. Las fuerzas que determinan el plegamiento resultan de las interacciones de las diversas partes de la proteína entre sí, y de estas con los componentes del solvente y/o el microambiente donde ocurre el plegamiento. Las fuerzas más débiles, pero a la vez las más numerosas y en consecuencia, las determinantes en la cinética de plegamiento, son las interacciones de van der Waals y las interacciones hidrofóbicas-hidrofílicas. A principios de los años sesenta del siglo pasado, a partir de una serie de experimentos realizados con la ribonucleasa del páncreas bovino<sup>[9]</sup> Anfinsen observó que la información requerida para que una proteína se pliegue correctamente, incluyendo el apareamiento justo de las cisteínas que forman sus enlaces disulfuro, reside en su secuencia de aminoácidos o estructura primaria, la cual es el elemento estructural fundamental y distintivo de cada proteína.

#### **1.5 Consideraciones cinéticas y termodinámicas del plegamiento.**

El plegamiento puede describirse, desde el punto de vista cinético, como la(s) vía(s) a través de la(s) cual(es) las moléculas de una proteína alcanzan el estado nativo funcional, el cual es generalmente compacto, topológicamente definido y estabilizado por un arreglo de interacciones relativamente constante y estable, determinado fundamentalmente por las cadenas laterales de sus aminoácidos. El punto de partida es una condición denominada “estado desplegado”, el cual es inactivo y caracterizado por una gran heterogeneidad conformacional, en él prevalecen los contactos efímeros entre las partes de la molécula y de éstas con el solvente. Esto último resulta en la ausencia de una topología única y estable de la cadena polipeptídica.

Debido a la amplia libertad conformacional de que gozan los residuos de aminoácidos en la cadena polipeptídica, el número de estados conformacionales distintos que pueden adoptar las moléculas de una proteína, incluyendo el nativo, es muy grande. En tal sentido, se ha calculado que el plegamiento de una cadena polipeptídica de 100 residuos de aminoácidos tardaría un tiempo astronómicamente prolongado si la adopción de su estado nativo dependiera de la búsqueda aleatoria del mismo entre todos los estados conformacionales accesibles<sup>[10]</sup>. Sin embargo, está comprobado que muchas proteínas pueden plegarse en un tiempo mucho más corto, del orden de microsegundos a minutos. Este hecho

llevó a la conclusión de que el plegamiento de las proteínas no es un proceso aleatorio. Los datos disponibles indican que este proceso se da a través de rutas discretas, definidas por estados conformacionales intermedios entre el estado desplegado y el nativo, denominados intermediarios del plegamiento. En la medida que el proceso de plegamiento avanza, la topología de la cadena polipeptídica y el arreglo de interacciones que caracteriza a las moléculas de la proteína se acercan más a los característicos de su estado nativo<sup>[11]</sup>.

Se han propuesto varios modelos que intentan explicar el mecanismo de plegamiento de las proteínas. Estos modelos se basan en datos experimentales y teóricos obtenidos del estudio del plegamiento de proteínas con características estructurales diversas. Los más aceptados son:

**-Nucleación-Crecimiento:** Este modelo propone que la estructura terciaria se propaga rápidamente de un núcleo inicial de la estructura secundaria local. Sin embargo un punto débil de este modelo es que predice la ausencia de intermediarios de plegamiento<sup>[12]</sup>.

**-Armazón (framework) o Difusión/Colisión:** Predice que las primeras estructuras en formarse son las secundarias, seguidas de un acoplamiento de unidades secundarias pre-formadas que dan paso al plegado nativo de la proteína<sup>[13, 14, 15]</sup>.

**-Colapso Hidrofóbico:** Propone que la interacción termodinámicamente no favorecida de las moléculas del solvente con las cadenas laterales de los residuos hidrofóbicos determina la tendencia súbita de la cadena polipeptídica a adquirir un estado tridimensional compacto, si bien no nativo, conocido como “glóbulo fundido”. Este estado se caracteriza por agrupar a los residuos hidrofóbicos en el interior de la estructura 3D, excluyéndolo del contacto con el solvente. Dado el carácter compacto, en este estado se dan favorablemente las interacciones entre las agrupaciones atómicas, reduciéndose así la búsqueda conformacional del estado nativo<sup>[16]</sup>.

**-Nucleación clásico:** Ciertos residuos se unen formando núcleos con estructuras secundarias que se propagan de manera consecutiva hacia la estructura terciaria.

**-Nucleación/Condensación:** Es una amalgama entre el modelo de colapso hidrofóbico y de nucleación clásico. En él se asume que se forma un núcleo difuso formado por las interacciones entre residuos cercanos, sobre el cual se produce el colapso hidrofóbico.

Las leyes de la termodinámica establecen que el plegamiento de una proteína debe conducir a un mínimo de energía libre. Es decir, la variación de energía libre a lo largo del proceso de plegamiento

debe ser negativa, siendo este mínimo el más estable o una forma muy estable a la cual se pueda llegar a través de una única vía cinética o un número finito de éstas. Este proceso se encuentra regido por el equilibrio entre dos energías, la entálpica -que se define como el calor desprendido o absorbido en una reacción a una presión constante, así como de la variación de energía del sistema- y la entrópica -definida como el grado de desorden que caracteriza al sistema (cadena polipeptídica y moléculas del solvente) en cada momento del proceso<sup>[17]</sup>.

La entalpía de plegamiento dependerá del balance de la energía de las interacciones proteína-proteína, agua-proteína y agua-agua. Cuando la energía incluida en estas interacciones es más negativa en el estado plegado que en el estado desplegado, se dice que el plegamiento es entálpicamente favorecido.

Debido al carácter polar de las moléculas de agua, estas interactúan favorablemente con las cadenas laterales de los residuos polares. En cambio, la ausencia de regiones con densidad de carga en los grupos apolares determina que las moléculas en la interfase con estos queden inmovilizadas en estructuras poliédricas altamente ordenadas. Como resultado, disminuye la entropía del solvente, lo cual no es favorable termodinámicamente. En etapas tempranas del plegamiento se propone que la molécula polipeptídica colapsa en una estructura compacta, en cuyo interior quedan recluidos una parte mayor de los residuos apolares, mientras otra fracción de estos se agrupan en la superficie molecular en forma de parches compactos. La adopción de una forma de plegamiento compacta restringe la libertad conformacional de la cadena polipeptídica, disminuyendo así su entropía. Sin embargo, ello también disminuye el área de interfase entre el solvente y los grupos apolares, lo cual libera a muchas moléculas de agua de las estructuras altamente ordenadas antes mencionadas, que ahora gozan de una amplia libertad de movimiento y de interacciones. El incremento de la entropía del solvente generalmente excede a la disminución de la entropía de la cadena polipeptídica, impulsando el plegamiento hacia el estado nativo. Esto se denomina “efecto hidrofóbico” y se presume que es una fuerza de contribución fundamental en el plegamiento de las proteínas.

Los cambios energéticos y en la entropía que sufre la cadena polipeptídica durante el plegamiento han sido representados gráficamente en forma de un mapa tridimensional en forma de embudo, conocido como “Entropy Funnel”. En esta forma de representación, el polipéptido sin estructura tridimensional nativa se encontraría frente a un embudo energético multidimensional que podría conducirlo, a través de múltiples rutas, a la estructura nativa. La parte amplia del “embudo” representa al ensamble de estados no nativos de alta entropía, estructuralmente muy heterogéneos, mientras que el punto inferior, en el fondo del embudo correspondería a la estructura nativa. En esta representación, los intermediarios en el plegamiento se apreciarían como valles locales, mientras que una estrechez significativa en la parte baja del embudo representaría el “molten globule”<sup>[18]</sup>, el cual ha sido descrito como un tipo de

intermediario entre la forma colapsada y la forma nativa<sup>[19]</sup>. En la medida que la cadena polipeptídica desciende por el paisaje energético, disminuye su entropía y su contenido de energía libre.

### **1.6 Maquinaria del plegamiento.**

Si bien las proteínas poseen en su estructura primaria toda la información necesaria para plegarse correctamente, en las condiciones intracelulares se hace necesaria la intervención de otros componentes de la maquinaria celular, para que el plegamiento sea exitoso y proceda sin riesgo para la célula.

La compleja maquinaria molecular que se ocupa de auxiliar a las proteínas de nueva síntesis en el plegamiento se denomina “*Protein Quality Control*” o PQC. Las proteínas que componen este sistema se distribuyen en todos los compartimientos celulares donde ocurre síntesis de proteína. El medio intracelular se caracteriza por la alta concentración de sus componentes. Esto determina un elevado riesgo de agregación para las proteínas de nueva síntesis durante el plegamiento, debido a la alta probabilidad de que se vean involucradas en interacciones inespecíficas con otros componentes del microambiente interno. Un papel de los componentes del PQC es evitar que tales interacciones inespecíficas, intermoleculares, se den, favoreciendo aquellas de tipo intramolecular que promueven la vía de plegamiento que conducen al estado nativo funcional.

El PQC no sólo se ocupa de auxiliar a las proteínas de nueva síntesis en el plegamiento correcto, adicionalmente elimina a todas aquellas que no logran plegarse correctamente, o a las que, habiendo alcanzado previamente el estado nativo funcional, lo han perdido irremediablemente por alteraciones de su estructura química y/o variaciones del microambiente donde desempeñan su función. Este sistema también participa en la eliminación o reciclamiento de las proteínas que ya cumplieron su función.

La función de cualquier proteína es una consecuencia de su estructura tridimensional nativa. Si esta no se alcanza, la proteína permanece inactiva, lo cual puede comprometer la viabilidad de un tipo celular específico o de todo el organismo, dependiendo de la trascendencia de la función deficitaria y de la capacidad de las células para compensarla mediante vías alternas. Por otra parte, las formas mal plegadas de las proteínas generalmente muestran tendencia a la agregación, otra vía por la cual proteínas que no logran alcanzar su estado nativo pueden afectar la fisiología celular. Se ha demostrado que los agregados proteicos, tanto intra como extracelulares, cuando no pueden ser eliminados eficientemente, alteran la arquitectura celular y de los tejidos, llevando a la disfunción y frecuentemente a la muerte celular.

Las chaperonas son el componente fundamental del sistema PQC. Estas proteínas altamente especializadas comprenden varias familias que están conservadas a lo largo de la evolución. Las chaperonas difieren en tamaño, distribución celular y función. En función del tipo de acción que desarrolla, se han dividido en tres clases: (1) Las chaperonas plegadoras se unen reversiblemente a las proteínas recién sintetizadas y promueven su plegamiento a través de un mecanismo dependiente de ATP. (2) Las chaperonas de unión o sujeción también se unen reversiblemente a las proteínas recién sintetizadas, pero no promueven su plegamiento. Se cree que su papel es el de impedir interacciones promiscuas entre las proteínas no plegadas con otros componentes celulares, lo cual evita que estas se agreguen antes de alcanzar su estado nativo. (3) Las chaperonas de desplegamiento, las cuales son capaces de desplegar proteínas mal plegadas e incluso, desintegrar agregados de proteínas.

Otro componente son las chaperoninas, las cuales son complejos proteicos oligoméricos con forma anillada, las cuales se encuentran divididas en dos subfamilias. El grupo I comprende el sistema GroEl-GroES y el grupo II las Termosomas.

En general, la forma de acción de las chaperonas es mediante la unión a las regiones hidrofóbicas expuestas al disolvente en la superficie celular de la molécula en plegamiento, regiones que caracterizan a los estados intermediarios del plegamiento o a las especies plegadas incorrectamente<sup>[20]</sup>.

### **1.7 Estructura de las proteínas.**

Las proteínas poseen una estructura tridimensional determinada por su secuencia amino-ácida, lo que le confiere sus propiedades fisicoquímicas y funcionales particulares.

### **1.8 Los aminoácidos como bloques constituyentes de las proteínas.**

Las proteínas están formadas por 20 aminoácidos diferentes,  $\alpha$ -aminoácidos ya que con excepción de la prolina todos poseen un grupo amino primario y un grupo ácido carboxílico como sustituyentes en el átomo de carbono  $\alpha$ .

Los aminoácidos proteicos son muy variados estructuralmente y también muestran una amplia diversidad respecto a sus propiedades físico-químicas, como potencial ácido-base, hidrofobicidad – hidrofiliidad, reactividad química y polaridad o tendencia a interactuar con el agua a pH biológico

(cercano a pH 7.0)<sup>[20]</sup> En función de estas propiedades, los aminoácidos de una proteína en conjunto le confieren a ésta ciertas propiedades fundamentales para su función.

### **1.9 Niveles estructurales de las proteínas.**

La estructura básica de una proteína es su estructura primaria, la cual se define como el orden o secuencia de los residuos de aminoácidos que la componen.

La cadena polipeptídica no es completamente flexible en todas direcciones, debido a que el enlace peptídico, el cual une a los residuos de aminoácidos, posee un 60% de características de doble enlace. Esto determina restricciones conformacionales que confieren a la molécula la tendencia a adoptar plegamientos regulares, es decir, que siguen un patrón direccional o periódico a lo largo de un eje. A las restricciones propias del enlace peptídico se suman otras determinadas por la naturaleza estructural y propiedades físico-químicas de los aminoácidos que componen a la proteína, efecto que está en función de la posición que ocupa cada uno en la cadena. Dependiendo de su secuencia, la cadena polipeptídica puede adoptar una combinación limitada de los ángulos  $\phi$  y  $\psi$  en cada unidad peptídica, lo que en última instancia va a determinar la topología de la cadena polipeptídica. Las combinaciones posibles de los ángulos  $\phi$  y  $\psi$  para los diferentes residuos, en función del contexto estructural, han sido representadas mediante un mapa o diagrama de Ramachandran<sup>[21]</sup>.

La estructura secundaria de las proteínas se define como el plegamiento periódico, a lo largo de un eje, que caracteriza a regiones discretas de la cadena polipeptídica. Las proteínas pueden exhibir múltiples tipos de estructura secundaria, dependiendo de la secuencia de aminoácidos. Estos ordenamientos periódicos son denominados hélice- $\alpha$ , hojas- $\beta$  y giros en U de la cadena polipeptídica, llamados giros  $\beta$ . Se ha estimado que el 60% de la cadena polipeptídica posee algún tipo de conformación secundaria. A su vez, elementos de estructura secundaria pueden combinarse para formar motivos estructurales o estructuras supersecundarias<sup>[22]</sup>.

Posteriormente, los elementos de la estructura secundaria se orientan en el espacio 3D en un arreglo topológico propio de cada proteína, lo que confiere a la molécula una forma o estructura compacta, definida como estructura terciaria. Esta estructura caracteriza a una proteína completamente plegada, si es monomérica y completamente funcional. La topografía de la superficie de una proteína plegada es

irregular, compleja y constituye la base estructural de la especificidad de las interacciones que puede desarrollar con otras moléculas<sup>[23, 24, 25, 26, 27]</sup>.

El nivel estructural más complejo de algunas proteínas es la estructura cuaternaria, la cual resulta de la asociación, basada en la complementariedad espacial y de cargas, de subunidades proteicas, o monómeros, para formar una estructura oligomérica funcional. La estructura cuaternaria puede resultar de la auto-asociación de dos a más cadenas polipeptídicas idénticas, codificadas por un mismo gen, dando lugar a un homopolímero. O, por el contrario, involucrar a cadenas polipeptídicas codificadas por genes diferentes, lo cual resulta en un heteropolímero. El número y tipos de subunidades que forman una estructura, aunado a sus posiciones relativas en ésta, constituyen la estructura cuaternaria de la proteína<sup>[20, 28, 29, 30]</sup>.

### **1.10 Fuerzas e interacciones que estabilizan la estructura 3D de las proteínas.**

En la estabilización de la estructura 3D de las proteínas interviene una gran variedad de fuerzas; enlaces disulfuro, puentes de hidrógeno, enlaces salinos, fuerzas de van der Waals e interacciones hidrofóbicas. Estas últimas a pesar de ser interacciones muy débiles, son las determinantes de la estabilidad de la proteína, debido a que son muy numerosas<sup>[31, 32]</sup>.

Entre las fuerzas débiles, las fuerzas de van der Waals son las interacciones más débiles, su existencia es casi siempre transitoria. Debido a la gran movilidad de los electrones dentro de las moléculas, estas pueden quedar cargadas por un instante hacia un extremo. En ese instante, la molécula adquiere el carácter de dipolo instantáneo. El efecto es mayor en los grupos más polarizados, que en las proteínas por lo general son los grupos metilo y metileno de las cadenas laterales de los residuos hidrofóbicos, tales como leucina y valina<sup>[33, 34]</sup>.

Las fuerzas de van de Waals dependen de la cercanía entre las agrupaciones atómicas, siendo mayor a una distancia de alrededor de 5 Å o menos. Para que dos regiones de una proteína puedan establecer suficientes contactos entre ellas, se requiere que sus geometrías sean complementarias, lo cual posibilita que numerosos átomos se acerquen a la distancia óptima de interacción.

El enlace disulfuro es un tipo de unión covalente que contribuye significativamente a estabilizar a las proteínas. Este enlace se debe a la reactividad del grupo sulfhídrico del aminoácido cisteína, que

mediante una oxidación forma un enlace entre los átomos de dos cisteínas. Los enlaces disulfuro contribuyen a definir la topología de la proteína al estabilizar asas o darle a la cadena una estructura determinada e inclusive, pueden unir péptidos independientes para formar oligómeros.

Los átomos de hidrógeno poseen un solo electrón en su capa de valencia, el cual ocupa un nivel muy cercano al núcleo. Cuando el hidrógeno se encuentra formando un enlace covalente con algún átomo electronegativo (O, N, S) su electrón es redistribuido hacia el lado electronegativo de la agrupación, creando un dipolo muy marcado. El Hidrógeno queda cargado positivamente debido a la “desnudez” parcial de su núcleo (protón), lo cual le hace susceptible de ser atraído por átomos vecinos que posean alguna carga negativa. Esta interacción de tipo electrostática, denominada “puente de H”, coloca a los átomos involucrados más cerca de lo que la suma de sus radios atómicos normalmente se los permitirían, a menos de 3.5 Å de distancia. El átomo electronegativo al cual está unido covalentemente el H se denomina “donador” y el elemento cargado negativamente que lo atrae se denomina “aceptor”<sup>[35, 36]</sup>.

## ANTECEDENTES

### 2.1 Los enlaces salinos. Propiedades y contribución a la estabilidad de las proteínas.

En el intervalo de pH fisiológico (7.35 a 7.45), los aminoácidos ácidos (Glu y Asp) presentan carga negativa y los básicos (Lys y Arg) carga positiva. La presencia en las proteínas de agrupaciones atómicas con carga de signo contrario da lugar a interacciones electrostáticas entre las mismas, si éstas quedan suficientemente próximas espacialmente una vez que la molécula ha adoptado su estructura plegada. Este tipo de interacciones se denomina “enlace salino” pares iónicos, enlaces iónicos o puentes salinos. y se le confiere una contribución importante a la estabilidad termodinámica de las proteínas. Los aminoácidos cargados se localizan generalmente en la superficie de las proteínas, donde pueden interactuar favorablemente con el solvente acuoso. Las interacciones entre estos residuos y las moléculas del solvente contribuyen a la adecuada solvatación y la estabilidad de la estructura tridimensional de las proteínas. En ciertas proteínas, el plegamiento nativo determina que algunos aminoácidos cargados se orienten hacia el interior de la molécula. Como regla, estos residuos están involucrados en enlaces salinos, interacción en la cual la carga de cada residuos queda balanceada por la de signo opuesto de su compañero. Debido al ambiente generalmente apolar del interior de la molécula, la energía de los enlaces salinos internos suele ser alta, lo cual puede tener relevancia a nivel

estructural. La energía de estas interacciones se aproximan a los valores del enlace covalente (- 30 kJ/mol) y la distancia entre las agrupaciones se calcula en 2,8 Å de distancia<sup>[37]</sup>. Sin embargo, la formación de un enlace salino interno implica la desolvatación de ambos residuos iónicos previa su localización en el interior anhidro de la molécula. Esto impone una penalidad a la energía del plegamiento, equivalente a la energía de desolvatación. Por otra parte, los enlaces salinos entre residuos iónicos localizados en la superficie molecular expuesta al solvente no suelen ser de alta energía debido a la relativamente alta constante dieléctrica del agua.

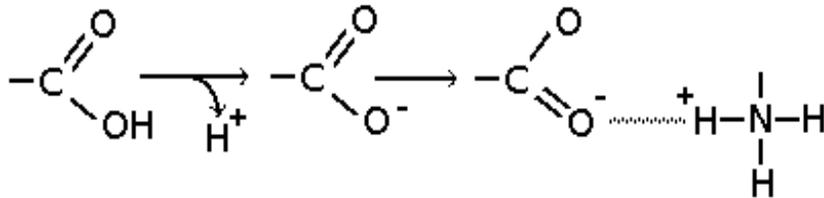


Fig 1 Enlace Salino.

Debido a que los enlaces iónicos se establecen entre grupos con carga, este tipo de interacciones está determinada por las leyes de la electrostática clásica. La ecuación fundamental de la electrostática nos dice que la magnitud de cada una de las fuerzas eléctricas con que interactúan dos cargas puntuales en reposo es directamente proporcional al producto de la magnitud de ambas cargas e inversamente proporcional al cuadrado de la distancia que las separa.

$$F \propto \frac{q_1 q_2}{Dr^2}$$

Para convertir esta relación en una igualdad, se introduce una constante de proporcionalidad ( $\kappa$ ), o constante de Coulomb. Donde  $k = 9,0 \times 10^9 \text{ Nm/C}^2$ . Si ambas cargas no están en el vacío, entonces hay que tener en cuenta la constante dieléctrica “D” del medio que las separa. El valor de D, el cual puede variar de 1 en el vacío, de 2 a 5 en el interior de la proteínas, de 2 a 20 en solventes orgánicos y 80 en H<sub>2</sub>O

$$F = k \frac{q_1 q_2}{Dr^2}$$

La fuerza de atracción es inversamente proporcional a la magnitud de las cargas  $q_1$  y  $q_2$  que poseen los

átomos que forman el enlace, la mediada de la constante  $D$  y la distancia  $r$  que existe entre estos átomos. En base a esto dependiendo del medio en el que se encuentre nuestra interacción, en una región expuesta al agua o en una posición interna la fuerza de atracción será diferente siendo mayor en las regiones menos expuestas al agua.

Los enlaces salinos poseen importantes funciones en la determinación de la estructura y la estabilidad termodinámica de las proteínas, una de estas funciones, por ejemplo, es la de contribuir a la estabilidad de los giros  $\beta$  y  $\gamma$ , a la cual también contribuyen residuos de prolina y/o Gly que ocupan posiciones claves en estos giros<sup>[38]</sup>.

La fuerza de interacción de los enlaces salinos está determinada por una serie de factores:

**(1) La geometría y la distancias entre los residuos que interactúan:** La orientación espacial de los residuos, uno respecto al otro, así como su localización en la proteína, es el determinante mayor de la energía involucrada en los enlaces<sup>[39]</sup>.

**(2) El grado de exposición al solvente:** Los enlaces salinos internos pueden presentar una fuerza de hasta 30 kJ/ mol, mientras que los enlaces en la superficie, expuestos al solvente, solo presentan una fuerza de 2 a 6 KJ/mol. Esto es debido a la solvatación que se produce sobre los residuos iónicos, donde el agua, al ser un solvente dipolar envuelve los residuos negativos mediante su parte positiva (hidrógeno) y los positivos mediante la parte negativa (oxígeno), neutralizando o disminuyendo la fuerza del enlace<sup>[40]</sup>.

**(3) Las interacciones con los residuos vecinos cargados.**

Algunos enlaces salinos forman los llamados enlaces salinos complejos, en los cuales un residuo cargado (residuo ancla) forma enlaces salinos con dos o más residuos simultáneamente<sup>[41, 42]</sup>.

Generalmente, la fuerza neta del enlace salino complejo es mayor que la suma de las energías de los pares individuales, aunque en algunas ocasiones puede llegar a ser antiooperativo<sup>[43]</sup>.

Sin embargo en ciertos organismos la contribución energética de los enlaces salinos complejos sugiere que contribuyen de forma importante a la estabilidad de las proteínas<sup>[43]</sup>.

Debido a que los aminoácidos iónicos suelen localizarse preferencialmente en la superficie de la proteína, la mayoría de los enlaces salinos se establecen también en esa zona de la molécula, convirtiéndose en un factor importante en el correcto plegamiento y las funciones de reconocimiento de las proteínas.

## **2.2 El caso de las proteínas de los organismos extremos.**

Cuando se caracterizaron las primeras enzimas de organismos termófilos, se observó que tenían un incremento en su estabilidad termodinámica con respecto a las proteínas homólogas de los organismos mesófilos. Una vez reportadas las primeras estructuras cristalográficas de proteínas de organismos termófilos, se pudo establecer una posible conexión entre sus características estructurales y su elevada termoestabilidad. Se observó que esta clase de proteínas suelen tener un mayor número de enlaces salinos, lo cual es, al menos, parte del origen de su alta estabilidad. Basado en sus estudios, Perutz postuló que existía una gran influencia de dichos efectos electrostáticos sobre la estructura, ensamblaje, hidratación de las proteínas y en el poder catalítico de las enzimas<sup>[44]</sup>.

Estudios posteriores, usando mutagénesis sitio-dirigida, han confirmado que existe un incremento en las interacciones electrostáticas favorables en las proteínas de organismos termófilos, comparadas con sus homólogos mesofílicos. A partir de estos hallazgos se ha deducido que las interacciones electrostáticas potencian o mejoran la termoestabilidad de las proteínas hipertermofílicas permitiéndoles funcionar a temperaturas más elevadas<sup>[45]</sup>.

## **2.3 La agregación amiloide. Su relación con las enfermedades.**

El estado nativo determina las propiedades de reconocimiento y solubilidad de las proteínas. Algunas poseen la capacidad de asociarse con otras moléculas para formar grandes complejos supramoleculares, cuyas funciones son vitales para la célula, como los ribosomas o los componentes del citoesqueleto. Debido al gran tamaño y a las propiedades hidrodinámicas de estos complejos, puede decirse que no están propiamente en solución. Otras proteínas, por el contrario, necesitan estar en solución para poder llevar a cabo las funciones para las cuales evolucionaron. En este caso, las propiedades de superficie de la molécula favorecen las interacciones con el solvente y evitan interacciones inespecíficas con otras moléculas que podrían conllevar la agregación por pérdida de la solubilidad. Las propiedades de reconocimiento y solubilidad de las proteínas pueden modificarse profundamente como consecuencia de cambios en su secuencia primaria, denominados mutaciones. Las mutaciones pueden desestabilizar la conformación nativa de la proteína, favoreciendo que sus moléculas adopten formas anormales de plegamiento que, además de no ser funcionales, pueden mostrar propensión a la agregación. La agregación de las proteínas también puede ocurrir como consecuencia de modificaciones en la composición y los parámetros físicos que caracterizan al microambiente donde se lleva a cabo su síntesis, desempeñan sus funciones o son recluidas durante su catabolismo<sup>[46, 47]</sup>. La agregación también

puede sobrevenir si el procesamiento proteolítico de la forma precursora de una proteína es perturbado por el efecto de factores externos, con la consiguiente acumulación de formas de estructura incorrecta que pueden exhibir mayor tendencia a la agregación. La agregación puede ser consecuencia de la depresión de las vías de catabolismo de una proteína en el curso de la insuficiencia funcional del órgano donde este proceso ocurre. Como resultado, la proteína no es eliminada adecuadamente y se acumula en los fluidos corporales. Esta última condición puede resultar en el incremento de la concentración de formas de plegamiento no nativo que normalmente pueden estar en equilibrio con la forma nativa de la proteína. Si las formas no nativa muestran tendencia a la agregación, pueden aparecer depósitos de estas proteínas, tanto dentro como fuera del compartimiento celular<sup>[48]</sup>.

Las proteínas pueden formar diferentes tipos de agregados, cuyo ordenamiento interno, morfología, localización celular y tisular, propiedades biológicas y/o citotoxicidad, pueden variar significativamente de un tipo a otro. Muchas enfermedades de los humanos están asociadas a la aparición de inclusiones intracelulares y/o depósitos extracelulares de agregados proteicos. Un grupo de estas enfermedades, denominadas genéricamente “amiloidosis”, se caracteriza por la deposición extracelular de agregados fibrilares compuestos de proteínas específicas. Notablemente, estos agregados poseen propiedades ultraestructurales y espectroscópicas similares. Al presente se han identificado alrededor de 25 proteínas y péptidos que forman depósitos amiloides en los humanos. Notablemente, estas difieren ampliamente en términos de su secuencia, tamaños y plegamiento<sup>[49, 59]</sup>.

#### **2.4 La agregación amiloide de las cadenas ligeras como característica distintiva de la amiloidosis AL.**

La amiloidosis AL es una gammapatía monoclonal caracterizada por la deposición extracelular de agregados fibrilares de naturaleza proteica, cuyas propiedades espectroscópicas, de tinción y ultraestructurales son propias del amiloide<sup>[51]</sup>. El componente principal de los depósitos en esta enfermedad son fragmentos de una cadena ligera monoclonal, que generalmente incluyen al dominio variable o a este más una porción del dominio constante. La amiloidosis AL se caracteriza por la expansión de un clon de células plasmáticas que usualmente coloniza la médula ósea en grado de ligero a moderado y que característicamente manifiesta alteraciones en la producción y secreción de anticuerpos. Los estudios clínicos indican que, además del anticuerpo específico completo, el clon amiloidogénico secreta abundantemente fragmentos del mismo, en particular a la cadena ligera en estado libre, es decir, no asociada a la correspondiente cadena pesada. Por causas aún no totalmente esclarecidas, en este grupo de pacientes ocurre la agregación amiloide de esta subunidad de los

anticuerpos. Sin embargo, en individuos de edad avanzada es relativamente frecuente detectar la presencia en el suero y/o la orina de una cadena ligera monoclonal secretada en estado libre, pero sólo una pequeña fracción de estos sufre de amiloidosis AL. Este hallazgo indica que no todas las cadenas ligeras monoclonales son amiloidogénicas y que la agregación es inducida por ciertas propiedades de la proteína y /o del microambiente tisular donde ocurre la agregación. Si bien se conoce poco acerca del mecanismo molecular de la agregación amiloide de las cadenas ligeras *in vivo*, se ha reproducido este proceso en condiciones *in vitro*, lo cual ha permitido estudiar extensamente las condiciones y factores que promueven la agregación. Numerosos estudios han demostrado que la estabilidad termodinámica de las cadenas ligeras correlaciona inversamente con su potencial amiloidogénico. Como regla, tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo*, las cadenas ligeras menos estables tienden a ser más amiloidogénicas que las más estables. Además, se ha demostrado que las condiciones de pH y/o temperatura extremas, las cuales desestabilizan el plegamiento de las cadenas ligeras, así como la presencia de agentes desnaturizantes químicos, como el cloruro de guanidina o la urea, promueven la agregación amiloide *in vitro* de estas proteínas. El análisis de la secuencia de decenas de cadenas ligeras amiloidogénicas ha demostrado que estas poseen numerosas mutaciones, muchas de las cuales afectan posiciones estructuralmente relevantes, lo cual, como se ha demostrado en estudios biofísicos, puede comprometer la estabilidad del estado nativo de la molécula y promover la amiloidogenicidad. La mayoría de los estudios apuntan a que la amiloidogénesis de las cadenas ligeras cursa a través de cambios conformacionales que conducen a las moléculas desde el estado soluble, nativo, a un estado agregado fibrilar, aún desconocido, pero que se cree que es diferente del nativo<sup>[50, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59]</sup>.

## **2.5 El caso de la alta amiloidogenicidad de las cadenas ligeras $\lambda 6$ y la potencial contribución de las mutaciones somáticas.**

Las cadenas ligeras se caracterizan por una gran diversidad de secuencia, la cual es más extensa en el dominio variable (VL) de la molécula. Esta variabilidad es producida por los mecanismo que generan la diversidad de los anticuerpos y tiene como fin permitir el reconocimiento de una variedad muy amplia de antígenos de estructura y orígenes diferentes<sup>[76]</sup>. A inicios de la década de los 90's del siglo pasado, se observó que las cadenas ligeras monoclonales aisladas de pacientes con amiloidosis AL producen depósitos en los ratones de laboratorio similares a los que causan en los pacientes de los cuales se derivaron. Se observó este comportamiento cuando se inyectó en el espacio intraperitoneal la

cadena ligera intacta o su dominio VL obtenido por proteólisis, pero no cuando se administró únicamente el dominio constante (CL).

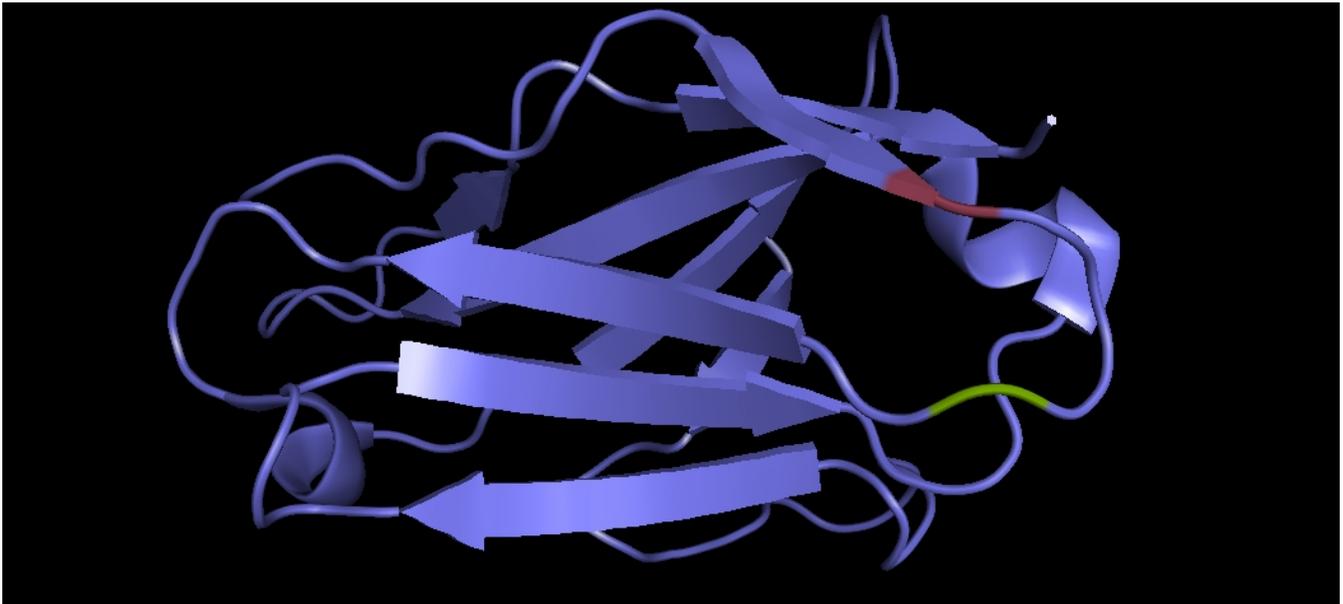


Fig 2 6aJL2

Estos experimentos llevaron a proponer que los determinantes del potencial amiloidogénico de las cadenas ligeras residen en su VL. Esta propuesta está en correspondencia con el predominio de fragmentos que incluyen a este dominio en los depósitos amiloides que aparecen en el curso de la amiloidosis AL. Estudios posteriores pusieron de evidencia que la mayoría de las cadenas ligeras amiloidogénicas derivan de un conjunto menor de segmentos de genes de dominio variable (VL), cuya frecuencia en la enfermedad es mayor de lo que podría esperarse, de acuerdo a su frecuencia en el repertorio policlonal de anticuerpos. De acuerdo con Del Pozo Yauner L (2008)<sup>[75]</sup> 477 cadenas ligeras  $\kappa$  y  $\lambda$  amiloidogénicas depositadas en la base AL-BASE (<http://pulm.bumc.bu.edu/aldb/home>) el 62% derivan de sólo seis segmentos de genes de VL. Estos segmentos son 1c ( $\lambda$ 1), 2a2 ( $\lambda$ 2), 3r ( $\lambda$ 3), 6a ( $\lambda$ 6) y el par de genes idénticos 08/018 ( $\kappa$ 1), lo cuales representan una fracción menor del repertorio humano de VL, el cual constan de  $\sim$ 70 elementos, ( $\sim$ 40 V $\kappa$  y  $\sim$ 30 V $\lambda$ ). En contraste, otros segmentos de genes, como 2d y 2e ( $\lambda$ 2), 3j, 3p, 3a, 3e, 3m y 2-19 ( $\lambda$ 3) no están representados en el AL-BASE. Todos los estudios indican que el segmento de gen 6a es el más asociado a la amiloidosis. Este segmento es el único miembro del subgrupo  $\lambda$ 6 y de él derivan 87 (24.5%) de las 354 cadenas ligeras amiloidogénicas  $\lambda$  depositadas en el AL-BASE. Globalmente, estas 87 proteínas representan casi 1/5 (18.2 %) del total de cadenas ligeras  $\kappa$  y  $\lambda$  amiloidogénicas (477) depositadas en esta base de secuencias. La alta amiloidogenicidad de las cadenas ligeras  $\lambda$ 6 es sugerida también por la observación

de que, con la única excepción de la proteína JTO, todas las cadenas ligeras monoclonales pertenecientes a esta familia, que han sido identificadas en pacientes con mieloma múltiple, han estado implicadas en alguna forma de deposición amiloide<sup>[56]</sup>. Estos hallazgos condujeron a la hipótesis de que la alta amiloidogenicidad de las cadenas ligeras  $\lambda 6$  estaría determinada por la secuencia codificada en la línea germinal 6a, más que por el efecto de las mutaciones somáticas.

Para comprobar esta hipótesis, el Del Pozo Yauner y colaboradores<sup>[75]</sup> estudiaron las propiedades de estabilidad termodinámica y el potencial fibrilogénico de la proteína 6aJL2, la cual es un dominio variable recombinante que posee la secuencia de línea germinal de los segmentos 6a y JL2<sup>[75]</sup>. Este grupo de investigadores encontraron que, si bien 6aJL2 es capaz de formar agregados fibrilares amiloides en condiciones *in vitro* comparables a las fisiológicas, es una proteína más estable y menos fibrilogénica que JTO. Como se menciona arriba, esta es la única cadena ligera  $\lambda 6$  monoclonal cuya no amiloidogenicidad ha sido bien documentada. Este estudio sugiere que la alta amiloidogenicidad de las cadenas ligeras  $\lambda 6$  no puede ser explicada únicamente en base a las propiedades de la proteína codificada en la línea germinal 6a. Una contribución importante de las mutaciones somáticas parece ser necesaria. Para aproximar una respuesta a la interrogante sobre la contribución de las mutaciones somáticas, Del Pozo Yauner<sup>[75]</sup> estudió la frecuencia y distribución de las mutaciones somáticas en 123 secuencias  $\lambda 6$ , 40 de ellas de origen AL y el resto tomadas del repertorio policlonal. Entre otros hallazgos, se encontró que las cadenas ligeras  $\lambda 6$  se caracterizan por tener una frecuencia relativamente alta de mutaciones que afectan residuos iónicos potencialmente implicados en interacciones salinas<sup>[60, 61, 62, 63]</sup>.

## **2.5 Las mutaciones de residuos iónicos que eliminan interacciones salinas. Posible contribución de las mutaciones en Glu13-Lys17 a la agregación amiloide $\lambda 6$ .**

El  $V_L$  de las cadenas ligeras  $\lambda 6$  es único entre las proteínas  $\lambda$  por poseer cinco interacciones salinas potenciales, en las que estarían involucrados residuos codificados en la línea germinal 6a – a excepción de Lys103. En contraste con las cadenas ligeras  $\lambda 6$ , el número de interacciones salinas potenciales en el  $V_L$  de proteínas  $\lambda$  de los otros subgrupos, que involucran residuos de la línea germinal, varía de 1 a 3. Estas interacciones se proponen a partir del análisis de las estructuras resultas por técnicas de rayos X disponibles de varias cadenas ligeras  $\kappa$  y  $\lambda$ , incluyendo 6aJL2 y otras proteínas  $\lambda 6$ , en las cuales se observa que la posición de los residuos de carga opuesta implicados parece compatible con la

interacción. Sin embargo, en este trabajo se usan los términos “interacciones potenciales” para referirnos a la mayoría de los enlaces salinos de línea germinal porque, con la única excepción de la interacción Arg61-Asp82, muy conservada en todos los  $V_L \kappa$  y  $\lambda$ , ninguna otra de las interacciones propuestas ha sido bien caracterizada en términos de su energía.

En el estudio de referencia se encontró que, en 41 (33%) de las 123 secuencias  $\lambda 6$  uno de los residuos que participa en las interacciones salinas potenciales antes descritas ha sido sustituido por otro no cargado, por lo que no puede involucrarse en este tipo de interacción. Una de las cinco interacciones salinas potencial del  $V_L \lambda 6$  es la que se propone entre los residuos Glu13 y Lys17. Esta interacción, que no está presente en otras proteínas  $\lambda$ , parece contribuir a estabilizar el segmento en asa que conecta las hebras  $\beta A$  y  $B$ , motivo estructural en el que probablemente también participan los residuos Pro15 y Gly16. En relación a esta interacción, se observó que en 13 de las 123 secuencias (10.5%), 3 de ellas AL, la interacción E13-K17 está suprimida por mutación; siendo la más frecuente Glu13Gly (8 de 13 mutaciones). Un dato interesante de este estudio es que, si bien se observaron mutaciones por sustitución de Lys17 –por Gly, Thr, Gln y Glu- estas sólo se encontraron en secuencias obtenidas del repertorio policlonal. Es decir, en el 100% de las 49 secuencias de cadenas ligeras  $\lambda 6$  AL estudiadas la Lys17 estaba conservada, siendo la mutación Glu13Lys la única observada en este grupo con la propiedad de eliminar la interacción Glu13-Lys17.



Fig 3 Enlace salino E13 - K17

Estudios recientemente publicados sugieren que el reordenamiento estructural del segmento N-terminal es un paso clave del mecanismo de agregación amiloide de las cadenas ligeras. Esto sugiere de las mutaciones que eliminan la interacción salina entre Glu13 y Lys17, la cual implica al N-terminal, pudieran ser importantes en el mecanismo de agregación amiloide de las cadenas  $\lambda$ 6. Al desestabilizar el segmento N-terminal, estas mutaciones promoverían los cambios conformacionales que llevan a la agregación fibrilar. Un paso previo para probar esta hipótesis es determinar el valor energético de la interacción entre Glu13 y Lys17. En este trabajo de tesis se usa la estrategia de mutagénesis sitio-específica, mediante la cual se introdujeron mutaciones sencillas y una doble en la proteína 6aJL2 , mediante un ciclo de doble mutante, se demostró la existencia de la interacción entre ambos residuos y se determinó la energía implicada en esta misma<sup>[64, 65, 66, 67]</sup>.

## **HIPÓTESIS**

Los residuos Glu13 y Lys17 contribuyen a la estabilidad termodinámica de la proteína 6aJL2 por medio de la interacción electrostática que se establece entre ambos en el estado nativo de la proteína. En consecuencia, la sustitución de uno de estos residuos, o ambos, por residuos no iónicos, disminuye la estabilidad termodinámica de 6aJL2.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la contribución de la interacción entre los residuos Lys17 y Glu13 a la estabilidad termodinámica de la proteína 6aJL2.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1.- Producir mutantes sencillas y una doble mutante de la proteína 6aJL2 por sustitución de los residuos Glu13 y Lys17.
- 2.- Determinar la estabilidad termodinámica, mediante desnaturalización con cloruro de guanidina, de las mutantes producidas.

## REACTIVOS Y MATERIALES

El cloruro de guanidina (GdnHCl) ultrapuro se obtuvo de Invitrogen. Triptona y extracto de levadura, ambos de calidad para biología molecular, fueron proveídos por Sigma, extracto de levadura de Sigma probado para biología molecular. El agua consumida en la preparación de las soluciones fue de calidad Milli Q y se obtuvo de las facilidades del INMEGEN. La enzima DNA polimerasa empleada en los experimentos de PCR fue la Taq Polimerasa Gold, de Roche, proveedor del cual se obtuvieron también las soluciones amortiguadoras y sustratos usados en estos experimentos. proporcionado por el fabricante de la enzima, Agarosa ultrapura de Invitrogen, Acrilamida Ultrapura de Amresco, Bisacrilamida grado biología molecular de Promega, Sulfato de Amonio grado biología molecular de Promega, Para la preparación de soluciones amortiguadoras de fosfato salino pH 7.4 se usó el producto Bufer Fosfato Salino (PBS) Dulbecco's Gibco de Invitrogen Corporation. Dodecilsulfato sódico (SDS) de Research Organics, Azida de Sodio con una pureza mínima de 99.5% de Sigma, Trizma con pureza en titulación de 99.9% de Sigma Ultra, Cloruro de Sodio (NaCl) grado biología molecular de Sigma, Fosfato de Sodio Dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) con pureza en ensayo por acidimetría de 100.2% de J.T. Baker, Fosfato de Sodio Monobásico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) J.T. Baker, Azul de bromofenol uso R&D de Sigma – Aldrich, Persulfato de Amonio  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  de grado ultrapuro de USB corporation, Sacarosa grado II de Sigma, Isopropil- $\beta$ -D-tio-galactósido (IPTG) de Promega.

### **Producción de las construcciones de las mutantes de 6aJL2.**

La proteína modelo 6aJL2 es un dominio variable ( $V_L$ ) con la secuencia lambda 6 de línea germinal. Esta proteína se compone de 111 residuos de aminoácidos y su masa molecular teórica es 11,952 kDa. La secuencia de 6aJL2 es la codificada en los segmentos de genes *6a* y *jl2*<sup>[77, 78]</sup>. El segmento de gen *6a* codifica los primeros 98 residuos de 6aJL2 - posiciones 1-95 acorde a la numeración de Kabat- y *jl2* codifica los últimos 12 residuos - posiciones 96-107. Entre la posición 95 y 96 se sitúa un residuo de His, al cual se le asigna la posición 95a<sup>[79, 80, 81, 82]</sup>. El codón CAT que codifica a este residuo resulta de la fusión de la secuencia de los segmentos *6a* y *jl2* en el orden en que se mencionan y como están disponibles en la base de secuencias VBASE (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk>). El fragmento de DNA que codifica a 6aJL2 fue sintetizado por PCR recursivo<sup>(83)</sup> y clonado en el vector pET27b+, resultando en la construcción pET27b-6a*jl2*. Esto fue realizado con anterioridad a este trabajo y se describe en detalle en la referencia<sup>[84]</sup>. A partir de la construcción pET27b-6a*jl2* y mediante reacciones de PCR mutagénico se sintetizaron fragmentos de DNA que codifican las proteínas mutantes 6aJL2-K17Q, 6aJL2-K17T, 6aJL2-K17E, 6aJL2-K17G, 6aJL2-K17A, 6aJL2-E13A y 6aJL2-E13A-K17A. Se utilizó

una estrategia de dos pasos, debido fundamentalmente a que las posiciones blanco de la mutagénesis se localizan cercanas al extremo N-terminal de la proteína. En una primera reacción de PCR se produjo un fragmento de DNA que codifica la secuencia de 6aJL2 desde Met3 hasta Leu107, con el cambio deseado ya incluido. En este primer paso se usó el oligonucleótido mutagénico específico como cebador directo y el oligonucleótido 6a-NotI-TAA como cebador reverso. Como se menciona antes, en estas reacciones de PCR se usó la construcción pET27b-6ajl2 como templado. El producto del primer PCR fue usado como templado en una segunda reacción, en la que se generó un producto cuya secuencia de nucleótidos codifica la secuencia completa de la 6aJL2 con el cambio puntual elegido, más los sitios de corte para las enzimas de restricción *SfiI* (5') y *NotI* (3'). En estas reacciones se usó como cebador directo al oligonucleótido 6a-SfiI y como cebador reverso al oligonucleótido 6a-NotI. Todos los oligonucleótidos usados en este trabajo fueron obtenidos de Invitrogen y sus secuencias se muestran en la tabla 1.

Oligos mutagénicos *
<b>Oligo 6a-E13G (50 bases):</b>
5' → ATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTCG <b>GGT</b> TCTCCGGGGAAGACGGTAAC Traducción del oligo 6a-E13G: MLTQPHSVS <b>G</b> SPGKTV
<b>Oligo 6a-E13A (50 bases):</b>
5' → ATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTCG <b>GCT</b> TCTCCGGGGAAGACGGTAAC Traducción del oligo 6a-E13A: MLTQPHSVS <b>A</b> SPGKTV
<b>Oligo 6a-K17Q (60 bases):</b>
5' → ATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTCGGAGTCTCCGGGG <b>CAG</b> ACGGTAACCATCTCCTGC Traducción del oligo 6a-K17Q: MLTQPHSVSESPG <b>Q</b> TVTISC
<b>Oligo 6a-K17E (60 bases):</b>
5' → ATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTCGGAGTCTCCGGGG <b>GAG</b> ACGGTAACCATCTCCTGC Traducción del oligo 6a-K17E: MLTQPHSVSESPG <b>E</b> TVTISC
<b>Oligo 6a-K17G (60 bases):</b>
5' → ATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTCGGAGTCTCCGGGG <b>GGC</b> ACGGTAACCATCTCCTGC Traducción del oligo 6a-K17E: MLTQPHSVSESPG <b>G</b> TVTISC
<b>Oligo 6a-K17T (60 bases):</b>
5' → ATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTCGGAGTCTCCGGGG <b>ACG</b> ACGGTAACCATCTCCTGC Traducción del oligo 6a-K17T: MLTQPHSVSESPG <b>T</b> TVTISC
<b>Oligo 6a-K17A (60 bases):</b>
5' → ATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTCGGAGTCTCCGGGG <b>GCT</b> ACGGTAACCATCTCCTGC Traducción del oligo 6a-K17A: MLTQPHSVSESPG <b>A</b> TVTISC
<b>Oligo 6a-E13AK17A (50 bases):</b>
5' → ATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTCG <b>GCT</b> TCTCCGGGG <b>GCA</b> ACGGTAAC Traducción del oligo 6a-E13AK17A: MLTQPHSVS <b>A</b> SPG <b>A</b> TVT

Tabla 1 Oligonucleótidos mutagénicos.

El producto del segundo PCR fue purificado mediante el procedimiento *QIAquick PCR purification kit*. Posteriormente, se digirieron con las enzimas de restricción *SfiI* y *NotI*, usando los reactivos, soluciones y condiciones sugeridas por el fabricante<sup>[68]</sup>.

Los productos de PCR digeridos con ambas enzimas fueron nuevamente purificados mediante el procedimiento mencionado y cuantificados mediante la medición de  $A_{260}$ . Se realizaron reacciones de ligación de los productos de PCR doble digeridos en el vector pSyn1, usando la enzima DNA ligasa T7 (NEBiolab) y los reactivos y condiciones suministrados por el fabricante. Con el producto de las reacciones de ligación se transformaron células *E. coli* DH5 $\alpha$ , para lo cual se usó el procedimiento *Rapid DNA Ligation and Transformation kit*, de Fermentas. Las células transformadas se seleccionaron en medio de cultivo LB sólido adicionado con ampicilina 100  $\mu\text{g/ml}$ . Los cultivos fueron incubados toda la noche a 37 °C. Se tomaron células de algunas de las colonias crecidas en los medios de selección y se cultivaron en medio LB líquido suplementado con ampicilina 200  $\mu\text{g/ml}$ . De cada cultivo bacteriano se extrajo el DNA plasmídico mediante el procedimiento Wizard plus Minipreps DNA purification system de Promega. El DNA plasmídico purificado fue cuantificado mediante medición de  $A_{230\text{nm}}$  y se secuenció el inserto recombinante determinado mediante el método de Sanger, o método del terminador de la reacción de polimerización de la cadena de DNA de Sanger o *Dideoxynucleotide triphosphate terminator method* por electroforesis capilar (50 cm) en el secuenciador 3730XL de Applied Biosystems<sup>[69]</sup>.

### **Expresión y purificación de las proteínas recombinantes.**

Las células *E. coli* BL21(DE3) transformadas con las construcciones de interés (los plásmidos pSyn1-6aJL2-K17Q, -K17T, -K17E, -K17G, -K17A, -E13A y -E13A-K17A) fueron cultivadas en medio 2xYT a 37°C conteniendo 200  $\mu\text{g/ml}$  de ampicilina. Cuando el cultivo alcanzó una  $A_{600\text{nm}}$  en el intervalo 1.2-1.4 se indujo la expresión de la proteína recombinante mediante la adición de Isopropyl  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) (Promega, Madison, WI) hasta alcanzar la concentración de 1mM. Se continuó la incubación a 20 °C y con agitación constante de 100 rpm por toda la noche (~18 horas).

El vector pSyn1 codifica la secuencia del péptido señal (*pelB*) en el lado 5' del sitio de clonación<sup>[68]</sup>. Una vez ligado el producto de PCR, la secuencia del *pelB* queda fusionada al extremo 5' del inserto recombinante. Como consecuencia, las proteínas expresadas a partir de estas construcciones poseen este péptido fusionado a su extremo N-terminal. La presencia del péptido señal *pelB* unido al producto de la expresión determina que sea exportada al periplasma bacteriano, de donde es necesario

recuperarla mediante el procedimiento de extracción descrito a continuación.

Las proteínas mutantes fueron expresadas bajo el control del promotor *Lac*. Transformadas con los plásmidos pSyn1-6aJL2-K17Q, -K17T, -K17E, -K17G, -K17A, -E13A, -E13G y -E13A-K17A.

La biomasa de 0.5 L de cultivo fue recuperada mediante centrifugación a 7,000 rpm por 15 minutos a 4 °C. El paquete celular se resuspendió en 50 ml de solución de sacarosa al 20%(w/v) adicionada con 1mM de EDTA, 20mM Tris-HCl, pH 8.0, la cual fue enfriada previamente a 4 °C. La suspensión celular se incubó en hielo por 20-30 minutos con agitación ocasional. Las células fueron sedimentadas por centrifugación a 7,000 rpm por 15 min a 4°C. Se desechó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en 50 ml de agua milli Q enfriada a 4°C. La suspensión celular se incubó como se describe anteriormente y seguidamente se centrifugó a 7000 rpm durante 20 min a 4°C. El sobrenadante conteniendo la fracción periplásmica<sup>[70]</sup> se transfirió a un vaso de precipitado, teniendo cuidado de no arrastrar parte del sedimento. Esta solución fue adicionada con sulfato de amonio sólido hasta alcanzar 75% de saturación. Se dejó reposar toda la noche a 4°C y se centrifugó a 7000 rpm por 30 min para precipitar la fracción de proteínas insolubilizada por la adición de la sal. Las proteínas sedimentadas se resolubilizaron en bufer PBS y cuando fue necesario concentraron mediante ultrafiltración por centrifugación a 3800 g en un dispositivo concentrador amicon ultra de Millipore con membrana de porosidad de 10 kDa. La proteína recombinante se purificó mediante cromatografía líquida en una columna de filtración molecular semipreparativa Superdex S75. Se usó PBS como amortiguador de corrida. El flujo fue de 1 ml/min. La elusión de las diferentes fracciones proteicas se registró mediante  $A_{280}$ . Se mezclaron las fracciones de interés y se analizó la composición de la solución resultante mediante electroforesis en gel de poliacrilamida T= 15% en sistema discontinuo, en condiciones desnaturalizantes (SDS) reductoras ( $\beta$ -mercapto etanol).

### **Desnaturalización al equilibrio de las proteínas lambda 6 mediante GdnHCl.**

Para los estudios de desnaturalización se incubó la proteína a 50  $\mu$ g/ml (4.1 $\mu$ M) en solución de fosfato de sodio 20 mM, pH 7.5., en concentraciones crecientes (0 – 3M) del agente desnaturalizante GdnHCl. Las soluciones se incubaron a 25°C por 2-12 horas. Concluída la incubación, a cada muestra se le registró el espectro de emisión de fluorescencia en el intervalo de 300 a 400nm, excitando a 290nm, la anchura de la ranura en la excitación y emisión fue de 1mm. Los espectros de fluorescencia fueron registrados en un espectrofluorometro modelo ISS-PC1.

Los datos de la desnaturalización por GdnHCl fueron analizados de acuerdo a un modelo de dos estados. La constante de equilibrio fue obtenida mediante la formula  $K = (y_n - y)/(y - y_d)$ , donde  $y$  es la mediada de la intensidad de la fluorescencia,  $y_n$  es la intensidad de la fluorescencia de la proteína en la región de pretransición, y  $y_d$  es la intensidad de fluorescencia de la proteína totalmente desplegada, a altas concentraciones de GdnHCl.

Las alteraciones conformaciones inducidas por el GdnHCl fueron reversibles. Infiriéndose este punto mediante la recuperación total de la fluorescencia al diluir el desnaturalizante.

El cambio de energía libre del desplegamiento ( $\Delta G$ ) en la región de transición fue calculado mediante la ecuación.

$$\Delta G = -RT \ln K$$

La inducción de la desnaturalización por GdnHCl fue analizada con el método de extrapolación lineal<sup>[71]</sup>.

$$\Delta G = \Delta G_{H_2O} + m[GdnHCl],$$

Donde el  $\Delta G_{H_2O}$  es el  $\Delta G$  en ausencia de desnaturalizante y  $m$  es  $\delta\Delta G/\delta[GdnHCl]$ , el cambio de energía libre por mol de desnaturalizante.  $C_m$ , la concentración del desnaturalizante en la que  $\Delta G = 0$ , fue calculada a partir de  $C_m = -\Delta G_{H_2O}/m$ .

#### Ciclo de Doble Mutante (DMC).

Para estimar la fuerza de la interacción de los residuos E13-K17 en la proteína 6aJL2 se usó el método de doble mutante. Para ello, se produjeron mutantes sencillas de ambos residuos por alanina (6a-E13A y 6a-K17A) y una doble mutante por el mismo residuo (6a-E13A-K17A). A partir de los datos de  $\Delta G$  de desplegamiento de estas mutantes, se estimó la fuerza de la interacción E13-K17, mediante la ecuación siguiente:

$$\Delta G_{+/-} \longleftrightarrow \Delta G_{0/-}$$

$$\Delta G_{+/0} \longleftrightarrow \Delta G_{0/0}$$

$$\Delta G (\text{DMC}) = \Delta G_{+/-} + \Delta G_{0/0} - \Delta G_{+/0} - \Delta G_{0/-}$$

Donde  $\Delta G_{+/-}$  es el  $\Delta G$  de la proteína nativa,  $\Delta G_{+/0}$  y  $\Delta G_{0/-}$  son el  $\Delta G$  de las mutantes sencillas 6a-E13A y 6a-K17A, respectivamente.  $\Delta G_{0/0}$  es el  $\Delta G$  de la doble mutante 6a-E13A-K17A<sup>[72]</sup>.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### Origen de las mutantes de 6aJL2 estudiadas.

En este trabajo se produjeron y caracterizaron mutantes sencillas de 6aJL2 por sustitución de los residuos Glu13 (por Gly y Ala) y Lys17 (Thr, Gln, Glu, Gly y Gly).

	5	15	25	35	45	55
6aJL2	NFMLTQPHSV	SESPGKTVTI	SCTRSSGSIA	SNYVQWYQQR	PGSSPTTVIY	EDNQRP SGVP
6aJL2-E13A	.....	.A.....	.....	.....	.....	.....
6aJL2-E13G	.....	.G.....	.....	.....	.....	.....
6aJL2-K17A	.....	.....A.....	.....	.....	.....	.....
6aJL2-K17G	.....	.....G.....	.....	.....	.....	.....
6aJL2-K17T	.....	.....T.....	.....	.....	.....	.....
6aJL2-K17Q	.....	.....Q.....	.....	.....	.....	.....
6aJL2-K17E	.....	.....E.....	.....	.....	.....	.....
6aJL2-E13A -K17A	.....	.A.A.....	.....	.....	.....	.....

	65	75	85	95	105
6aJL2	DRFSGSIDSS	SNSASLITISG	LKTEDEADYY	CQSYDSSNHV	VFGGGTKLTV L
6aJL2-E13A	.....	.....	.....	.....	.....
6aJL2-E13G	.....	.....	.....	.....	.....
6aJL2-K17A	.....	.....	.....	.....	.....
6aJL2-K17G	.....	.....	.....	.....	.....
6aJL2-K17T	.....	.....	.....	.....	.....
6aJL2-K17Q	.....	.....	.....	.....	.....
6aJL2-K17E	.....	.....	.....	.....	.....
6aJL2-E13A -K17A	.....	.....	.....	.....	.....

Tabla 2 Secuencias de las proteínas mutantes 6aJL2

Estas mutaciones se seleccionaron en base al estudio previamente realizado por del Pozo-Yauner, L. y col, en el que se analizó la frecuencia y distribución de las mutaciones somáticas en 123 secuencias de cadenas ligeras  $\lambda$ 6, 49 de ellas de origen AL. En el estudio referido se identificaron mutaciones que afectan residuos potencialmente involucrados en interacciones salinas. Una de estas interacciones es la que involucra a E13 y K17, la cual probablemente contribuye a estabilizar un giro  $\beta$  de tipo II que conecta las hebras  $\beta$  A y B<sup>[73]</sup>. Este enlace potencial solo es posible encontrarlo en las cadenas ligeras  $\lambda$ 6. Se identificaron nueve secuencias con mutaciones en Glu13, en ocho de ellas por Gly y en una por Ala. La mutación Glu13Gly se observó en 3 de las 49 cadenas ligeras amiloidogénicas (6.1 %) y en cinco de las 74 secuencias originadas del repertorio policlonal (6.7 %). Como se aprecia, en ambas categorías, la frecuencia de esta mutación fue similar. En relación a Lys17, se detectaron ocho secuencias con mutaciones en este residuo, notablemente todas de origen policlonal. En tres de ellas la sustitución fue por Gln, en dos por Glu y Gly, respectivamente y en una por Thr. La mutación K17A no

fue observada en este estudio, no obstante fue producida, junto a la doble mutante 6a-E13A-K17A, con el objetivo de calcular la energía de interacción Glu13-Lys17, acorde al método denominado “ciclo de doble mutante”.

### **Expresión y purificación de las proteínas recombinantes en el sistema pSyn1-BL21(DE3).**

Estructuralmente, la proteína 6aJL2 es un dominio  $V_L$  y su plegamiento es un sándwich formado por dos hojas  $\beta$ , de cuatro y cinco hebras respectivamente, que se adosan una a otra a través de una interfase apolar. La estabilidad del sándwich  $\beta$  depende significativamente del enlace disulfuro intra-dominio entre los residuos Cys23-Cys88, unión muy conservada en las cadenas ligeras. Debido a las características estructurales de 6aJL2, se decidió usar el vector pSyn1 para la producción de las construcciones de sus mutantes. Este vector posee, por diseño, un segmento que codifica para el péptido señal PelB, el cual se extiende desde el codón de inicio de la traducción (ATG) hasta la región que codifica la secuencia Pro-Ala-Met-Ala (PAMA). A continuación de este segmento, se localiza la región de clonación, la cual posee sitios de corte para varias enzimas de restricción. Así, una vez que es clonado un producto de PCR en este vector, el extremo 5' del mismo queda fusionado a la secuencia que codifica para el péptido PelB. La fusión del segmento peptídico PelB al N-terminal de la proteína recombinante determina que esta sea exportada al periplasma de la célula bacteriana, de donde es necesario recuperarla. Debido al ambiente oxidante que caracteriza a este compartimiento, la formación de los enlaces disulfuro se favorece, lo cual promueve el correcto plegamiento de las proteínas, que como 6aJL2, dependen de esta unión para su estabilidad. Es importante hacer notar que el péptido señal PelB es eliminado por corte proteolítico por la peptidasa señal específica durante el paso de la proteína recombinante del citoplasma al espacio periplásmico. La secuencia PAMA antes mencionada es la señal que reconocen este grupo de peptidasas para realizar la escisión. En este trabajo se comprobó, mediante el análisis de masas de las proteínas mutantes purificadas, que la eliminación proteolítica del péptido PelB tuvo una eficiencia del 100 %.

Entre el sitio de clonación y los dos codones de terminación de la traducción (TAA), el vector pSyn1 posee una región que codifica para un fragmento de la proteína c-myc y a continuación a un trecho que codifica para seis His (poli-His). Estas secuencias facilitan la inmuno-detección del producto recombinante –mediante anticuerpos anti c-myc- y su purificación mediante cromatografía de afinidad en columnas de Ni – que unen al poli-His. Sin embargo, un segmento no natural fusionado a la proteína recombinante puede modificar sus propiedades de plegamiento y/o termodinámicas. Para evitar esta

posibilidad y teniendo en cuenta la disponibilidad de un método de purificación para la proteína 6aJL2 que no requiere del poli-H, en todas las construcciones producidas en este trabajo, se introdujo un codón de terminación TAA a continuación del codón que codifica el residuo C-terminal de la proteína recombinante. Esta estrategia evitó que las proteínas mutantes de 6aJL2 se expresaran con extendidos en su extremo C-terminal, como se comprobó tanto mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes reductoras, como por análisis de espectrometría de masas.

La cepa de *E. coli* BL21(DE3) ha sido modificada específicamente para la expresión de proteínas recombinantes mediante el sistema pET de Novagen, que se basa en la RNA polimerasa del fago T7. Si bien las construcciones derivadas del vector pSyn1 no permiten aprovechar las ventajas de BL21(DE3) asociadas al sistema pET, la experiencia previa nos indica que es una cepa muy adecuada para la expresión de las cadenas ligeras de inmunoglobulinas. Una característica ventajosa de esta cepa, que puede explicar los resultados observados en estudios anteriores, es ser deficiente en proteasas específicas, como la ompT, lo cual resulta en una mayor recuperación del producto recombinante.

En los ensayos de expresión se observó cierta dependencia de la cuantía de la proteína recombinante producida con respecto a su estabilidad termodinámica. Esta relación ha sido reportada en estudios previos y se explica por la mayor tendencia de las proteínas recombinantes cuya estabilidad es baja a agregarse como cuerpos de inclusión en el citoplasma y/o en el espacio periplásmico de la bacteria. Estos agregados se forman fundamentalmente a partir de especies no plegadas o plegadas incorrectamente, las cuales tienden a abundar cuando la temperatura del cultivo se acerca a la  $T_m$  de la proteína recombinante. Para evitar este inconveniente, en este trabajo se estableció en 20 °C la temperatura a la cual se realizó la inducción de la expresión con IPTG. Mediante esta estrategia se logró incrementar la cantidad expresada de las mutantes menos estables 6a-K17T y 6a-K17Q. Si bien no se determinó la  $T_m$  de estas proteínas, el valor de  $\Delta G_{\text{desp}}$  y  $C_m$  de las mismas sugiere que es inferior al reportado previamente para la silvestre ( $T_m=49.9$  °C).

En resumen, los resultados de este trabajo indican que la combinación del vector pSyn1 y la cepa BL21(DE3) de *E. coli* permiten la expresión eficiente de fragmentos de inmunoglobulinas, como el dominio variable de las cadenas ligeras  $\lambda 6$ .

### **Desnaturalización reversible de las mutantes de 6aJL2. Consideraciones generales.**

Como se aprecia en la figura 4, las curvas de desnaturalización al equilibrio de las mutantes de 6aJL2, seguida por la variación de la fluorescencia intrínseca, se caracterizan por una única transición

cooperativa. Estas curvas reflejan el incremento súbito de la fluorescencia de la solución experimental, una vez que se alcanzó una concentración de GdnHCl suficientemente alta como para provocar el desplegamiento de la proteína. El incremento de la fluorescencia intrínseca se asoció además al corrimiento del centro de masa de los espectros hacia el rojo.

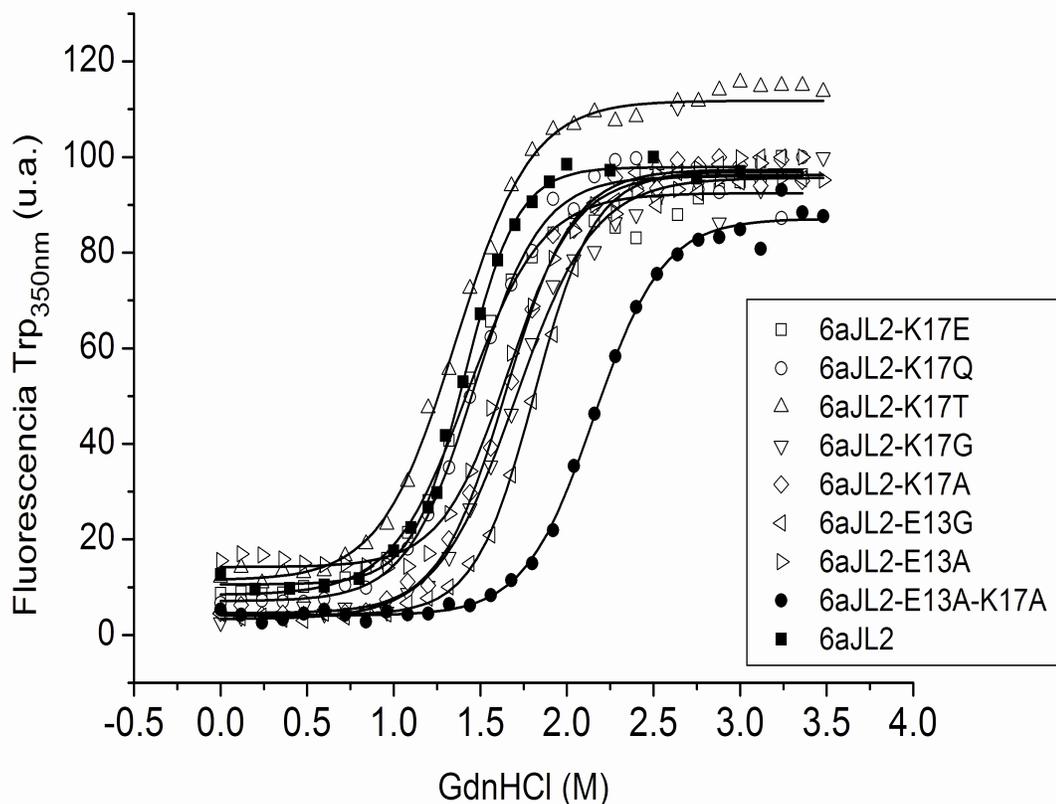


Fig 4. Curvas de desnaturalización al equilibrio de las mutantes de 6aJL2.

Este comportamiento está determinado por las propiedades estructurales de las proteínas estudiadas. Tanto la proteína 6aJL2 como sus mutantes poseen un único residuo de triptófano, el cual ocupa la posición 35. Este residuo, que está muy conservado en las cadenas ligeras de inmunoglobulinas, es el origen de la fluorescencia que emite la proteína 6aJL2 en solución, cuando es excitada a 290 nm. En la estructura cristalográfica de 6aJL2 se observa que el trp35 y el enlace disulfuro intra-dominio Cys23-Cys88 están muy próximos uno a otro, formando una agrupación compacta en el núcleo apolar del V<sub>L</sub> nativo. La consecuencia de esta cercanía es el apagamiento de la fluorescencia del trp35 por el enlace Cys23-Cys88. La eficiencia del apagamiento disminuye pronunciadamente con el aumento de la distancia entre el apagador y el fluoróforo. Ello determina que la fluorescencia del trp35 refleje

sensiblemente los cambios conformacionales que modifican la distancia entre este residuo y el enlace Cys23-Cys88. El incremento de la concentración del desnaturalizante GdnHCl por encima de cierto valor induce el desplegamiento cooperativo del V<sub>L</sub>, lo cual se asocia al distanciamiento del trp35 del enlace disulfuro, con el consecuente incremento de su fluorescencia. Una consecuencia adicional de la desnaturalización es el incremento de la exposición al solvente del trp35, lo cual explica el desplazamiento del centro de masa de los espectros hacia valores de longitud de onda mayores (corrimiento al rojo). Este desplazamiento se debe al incremento de la fracción de energía que el estado excitado del fluoroforo transfiere a las moléculas de agua que colisionan con él al estar en contacto con este solvente.

### Estimación de la contribución de la interacción salina entre E13 y K17 a la estabilidad de 6aJL2.

En este trabajo se demuestra que las mutaciones en E13 y/o K17 pueden modificar significativamente la estabilidad termodinámica de la proteína 6aJL2, lo cual indica que ambos residuos son estructuralmente relevantes. Sin embargo, el efecto termodinámico, expresado en el valor de  $\Delta G_{\text{desp}}$  y/o en el de  $C_m$ , dependió de la naturaleza estructural del residuo sustituto. Algunas mutaciones disminuyeron el valor de  $\Delta G_{\text{desp}}$ , como se observó en las sustituciones de Lys17 por Thr o Gln, cuyo costo fue de alrededor de 1 kcal/mol. En contraste, la mutación sencilla E13G y la doble mutación E13A-K17A incrementaron el  $\Delta G_{\text{desp}}$  en 1.5 y 1.9 kcal/mol, respectivamente. El incremento en el  $\Delta G_{\text{desp}}$  asociado a la mutación E13G contrastó con el efecto de la sustitución de K17 por Gly, que disminuyó su valor. Esto sugiere un papel estructuralmente diferente para los residuos E13 y K17 en la proteína silvestre.

Proteína	$\Delta G_{\text{desp}}$ (kcal/mol)	-m (kcal mol)	$C_m$ (M)	$\Delta\Delta G$
6aJL2 (Wild-Type)	5.1	3.6	1.41	-
6a-K17Q	4.1 ± 0.5	2.7 ± 0.3	1.51	-0.36
6a-K17T	4.0 ± 0.5	3.0 ± 0.3	1.32	0.32
6a-K17E	5.5 ± 0.7	4.0 ± 0.5	1.35	0.22s
6a-E13G	6.6 ± 0.7	3.6 ± 0.4	1.83	-1.51
6a-K17G	4.6 ± 0.9	2.7 ± 0.5	1.7	-1.04
6a-E13A-K17A	7.0 ± 0.8	3.3 ± 0.4	2.1	-2.48
6a-K17A	4.9 ± 0.4	3.0 ± 0.2	1.63	-0.79
6a-E13A	4.8 ± 0.42	3.0 ± 0.26	1.6	-0.68

Tabla 2. Parámetros termodinámicos de las proteínas  $\lambda 6$  mutantes.

Algunas mutaciones ejercieron un efecto opuesto sobre el  $\Delta G_{\text{desp}}$  con respecto a la  $C_m$ . Por ejemplo, la mutación K17G, que como se mencionó arriba disminuyó el valor de  $\Delta G_{\text{desp}}$ , incrementó el valor de la  $C_m$ . Si bien ambos parámetros,  $\Delta G_{\text{desp}}$  y  $C_m$ , reflejan la estabilidad termodinámica de una proteína, la describen desde perspectivas diferentes. El  $\Delta G_{\text{desp}}$  es el cambio de energía libre entre el estado nativo y el desplegado en ausencia de desnaturizante. Por otra parte, la  $C_m$  es la concentración de desnaturizante a la cual, en el equilibrio, la mitad de las moléculas poseen estructura nativa y la otra mitad está desplegada. El parámetro que relaciona al  $\Delta G_{\text{desp}}$  y a la  $C_m$  es  $-m$  ( $C_m = \Delta G_{\text{desp}}/m$ ). Este parámetro describe la dependencia entre el  $\Delta G$  y la variación de la concentración molar del desnaturizante. Es decir, describe cómo se modifica el equilibrio entre la forma nativa y la desplegada en función de la concentración de desnaturizante. Una disminución de  $|m|$  sin cambios en el  $\Delta G_{\text{desp}}$  como resultado de una mutación indica que la proteína mutante es más estable que la silvestre a concentraciones mayores del desnaturizante, si bien ambas son igual de estables a concentración cero del agente químico. Como se observa en la tabla 2, con la única excepción de la sustitución E13G, todas las mutaciones estudiadas modificaron claramente el valor de  $-m$  relativo a 6aJL2, lo cual sugiere que influyeron en el comportamiento de la proteína frente al desnaturizante. La mutación K17E incrementó  $-m$  pero también incrementó el  $\Delta G_{\text{desp}}$ , lo que indica que, si bien esta mutante es ligeramente más estable que la silvestre en ausencia de GdnHCl, alcanza el estado en el que el 50 % de sus moléculas está desplegadas a concentración menor del desnaturizante en  $C_m$ . En contraste, la sustituciones de K17 por Glu, Thr, Gly y Ala, así como la mutación E13A, decrecieron  $m$ . Se ha sugerido que cambios en el valor de  $m$  como consecuencia de una mutación pueden reflejar que la diferencia en el área expuesta al solvente entre la forma nativa y la desplegada no es igual en la mutante que en la silvestre. La mayoría de las mutaciones estudiadas aquí determinan la desaparición de una carga, (+) o (-), localizada en la superficie de la molécula nativa. En las mutaciones por Ala se introduce adicionalmente un residuo apolar. Probablemente estos cambios modifican las propiedades de solvatación de la forma nativa, influyendo a través de ello en el área que la molécula expone al solvente.

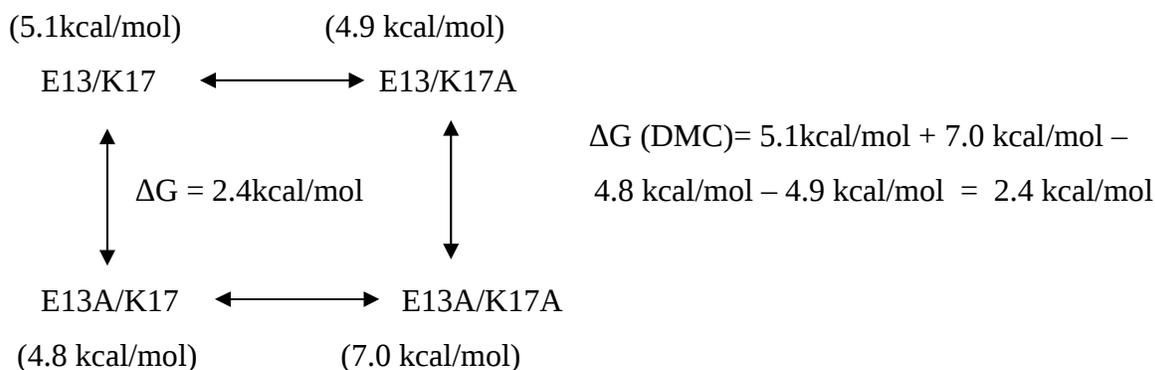


Figura 5. Ciclo de Doble mutante

Sin embargo, se ha sugerido que variaciones de  $-m$  también pueden reflejar la presencia de intermediarios en la vía de plegamiento-desplegamiento de la mutante, lo cual determinaría que el mecanismo es diferente al de dos estados.

Por otra parte, es importante tener en cuenta que, a diferencia de la  $C_m$ , la cual puede ser calculada directamente a partir de los datos experimentales, el  $\Delta G_{\text{desp}}$  es un parámetro estimado mediante el método de extrapolación lineal y depende de la exactitud del valor de  $m$ , cuyo cálculo es más susceptible al error experimental. Estos elementos han llevado a algunos autores a sugerir que la  $C_m$  es en general más confiable que el  $\Delta G_{\text{desp}}$  para comparar la estabilidad de una mutante con su silvestre.

En relación a este punto, es significativo que seis de las ocho mutaciones estudiadas en este trabajo poseen mayor  $C_m$  que 6aJL2. El cálculo del  $\Delta\Delta G_{\text{desp}}$  a partir de la  $C_m$  indica que estas mutantes son más estables que la silvestre. En el caso de las mutantes 6a-E13G y 6a-E13A-K17A, la ganancia en estabilidad es de 1.5 y 2.5 kcal/mol, lo cual es un incremento de entre 30% y 50% de la estabilidad de la silvestre, respectivamente. Estos datos estarían sugiriendo que la interacción E13-K17 más que estabilizar al dominio 6aJL2, lo desestabiliza. Este resultado parecería contradictorio, teniendo en cuenta que, en general, se asume que los enlaces salinos contribuyen a la estabilidad de las proteínas.

En este punto es importante tener en cuenta que la energía involucrada en las interacciones salinas varía considerablemente, dependiendo de factores como la distancia y orientación entre las agrupaciones iónicas involucradas, así como su grado de solvatación. También influye en la energía de la interacción otras interacciones que involucran a ambos residuos iónicos con otros grupos y/o redes de interacciones, las que pueden incrementar o disminuir la fuerza con la que ambos se atraen<sup>[39]</sup>. El efecto de estas variables determina que en algunos casos el aporte de una interacción salina a la estabilidad de la

proteína sea elevada, del orden de 2 kcal mol<sup>-1</sup> o mayor, mientras que en otros puede inclusive ejercer efecto de desestabilización. En general, se estima que los enlaces salinos aportan estabilidad en el orden de 1.5 a 3.5 kcal mol<sup>-1</sup>.

Varios estudios han abordado la contribución de las interacciones salinas a la estabilidad termodinámica y a las propiedades de agregación de las cadenas ligeras de inmunoglobulinas. En uno de ellos, realizado en los 90's por el grupo del Dr. Ronald Wetzel, se demostró que la mutación Arg61Ans –observada en la cadena ligera amiloidogénica  $\kappa$  BAN- disminuyó en 3.1 kcal/mol la estabilidad de la cadena ligera  $\kappa$ 1 no amiloidogénica Rei, tornándola proclive a la agregación fibrilar amiloide<sup>160</sup>. El efecto de esta mutación sobre la estabilidad termodinámica de Rei se explicó por la participación de este residuo en una interacción salina con Asp82, la cual está muy conservada en las cadenas ligeras, tanto  $\kappa$  como  $\lambda$ . Por ejemplo, en las 123 secuencias  $\lambda$ 6 estudiadas por del Pozo-Yauner, L y col no se constató ninguna mutación en ambas posiciones.

En otro estudio reciente, se estimó en 1.6 kcal mol<sup>-1</sup> el valor energético de la interacción salina entre los residuos mutantes Asp30a y Arg68 en la proteína de mieloma Jto<sup>166, 67</sup>. Notablemente, esta proteína es la única cadena ligera monoclonal  $\lambda$ 6 cuyo carácter no amiloidogénico ha sido bien documentado. En el estudio de referencia se propuso que la no amiloidogenicidad de esta proteína, muy inusual para esta familia, se debió, al menos en parte, a la estabilización inducida por la formación del enlace salino mencionado.

Debe hacerse notar que en ninguno de estos estudios, el valor energético estimado para la interacción salina fue realizado mediante el ciclo de doble mutante (CDM). Mediante esta aproximación en este trabajo se estimó en 2.4 kcal/mol la energía de la interacción entre E13 y K17 en 6aJL2. Este valor se sitúa en el intervalo reportado para las interacciones salinas, como se hace referencia arriba.

El CDM es la mejor opción disponible para estimar la energía con la que dos residuos de carga opuesta se atraen. La esencia de este método es, en un primer paso, medir los efectos observados en la estabilidad de la proteína por la sustitución por separado de cada uno de los residuos que forman el enlace salino y finalmente medir el efecto en la estabilidad por la sustitución simultánea de ambas posiciones.

Si los residuos implicados en el enlace no están interactuando entre sí, el efecto de una sustitución en cualquiera de estos residuos será independiente de la sustitución en la otra posición. Sin embargo, si estos se encuentran interactuando, el efecto de la sustitución de uno de ellos dependerá de la sustitución del otro residuo. Como se observa en la tabla 2, la sustitución de E13 o K17 por Ala producen mutantes

semejantes en términos de la estabilidad termodinámica calculada mediante desnaturalización con GdnHCl. En claro contraste, la doble mutante por Ala es mucho más estable que ambas. De hecho, el  $\Delta\Delta G$  calculado para la doble mutante en base a la  $C_m$  es 1 kcal/mol mayor que la suma de este parámetro de ambas mutantes sencillas. Esto sugiere que, además de interactuar a través de sus cargas opuestas ambos residuos lo hacen a través de contactos de otra naturaleza, algunos de los cuales pueden ser significativamente desestabilizantes para la proteína.

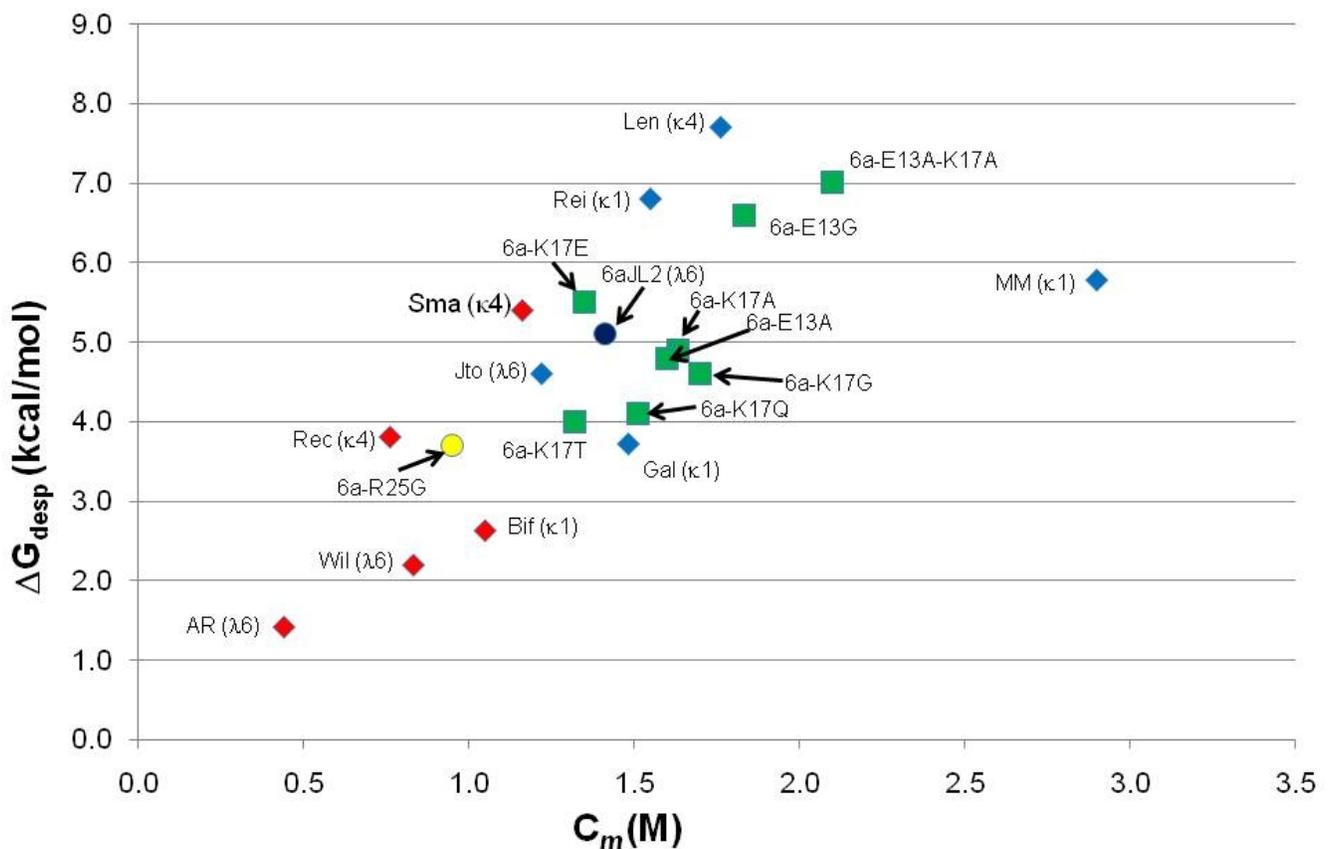
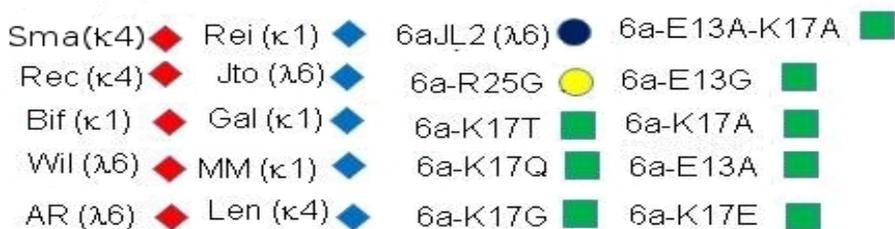


Figura 6.  $\Delta G$  de desplegamiento contra  $C_m$ (M) de diversas proteínas.



Como se deduce de este análisis, una ventaja fundamental de esta estrategia es que permite disminuir los errores en el cálculo de la energía de la interacción salina que introducen otros tipos de interacciones en que también pueden estar participando los residuos iónicos.

La validez del método de CDM está sujeto a dos suposiciones. La primera es que no hay diferencias estructurales amplias entre la proteína silvestre y sus mutantes. En el caso estudiado aquí y basado en estudios de mutagénesis previos<sup>174</sup> se podría asumir que las diferencias estructurales entre 6aJL2 y sus mutantes puntuales y doble son mínimas. En general, las sustituciones puntuales no ocasionan grandes perturbaciones estructurales, lo que implica que las contribuciones energéticas de estas perturbaciones estructurales sean canceladas en el CDM.

La segunda suposición es que para que el  $\Delta G$  en el (CDM) represente un valor absoluto no debe existir ninguna interacción entre los dos residuos sustitutos en la doble mutante. En este trabajo esta condición se logró mediante la sustitución por Ala en ambas posiciones, ya que este es un aminoácido sin carga y dado su pequeño volumen, ejerce escaso efecto de interferencia estérica.

### **Posible papel de la mutación E13G en la función de reconocimiento de las cadenas ligeras $\lambda 6$ .**

Uno de los hallazgos interesantes de este trabajo es el efecto estabilizante de las mutaciones de los residuos E13 y/o K17. Los resultados obtenidos indican que ambos residuos están involucrados en interacciones de naturaleza desfavorable cuyo valor energético superan los 2.4 kcal/mol calculados para la interacción electrostática entre ambos. Es bien sabido que el estado nativo de las proteínas es una entidad marginalmente estable, debido a que en él conviven numerosas interacciones favorables que son balanceadas en su mayor parte por interacciones desfavorables. La magnitud energética de ambas categorías es grande, si bien la pequeña diferencia a favor de las favorables es suficiente para mantener a la cadena plegada en su estado nativo funcional en las condiciones fisiológicas. Una interrogante salta a la vista: ¿Hay alguna relación entre la mutación E13G y el comportamiento altamente amiloidogénico de las proteínas  $\lambda 6$ ? La respuesta que parece más probable es que esta mutación, debido a su efecto estabilizante, debe disminuir significativamente la capacidad de las cadenas ligeras  $\lambda 6$  para agregarse en forma de amiloide. Como se muestra en la figura 6 (eje de coordenadas con las proteínas amiloides y no amiloides), la mutante 6a-E13G es comparable por su estabilidad a las proteínas no amiloidogénicas Rei ( $\kappa 1$ ) y Len ( $\kappa 4$ ). Estudios *in vitro* han demostrado que ambas proteínas, pueden formar agregados fibrilares similares al amiloide con una cinética muy lenta. Anticipamos que la cinética de fibrilogénesis

*in vitro* de la mutante 6a-E13G será significativamente más lenta que la de la silvestre. Un comportamiento similar debe exhibir la doble mutante 6a-E13A-K17A. ¿Cómo entender la presencia de la mutación E13G en las cadenas ligeras amiloidogénicas  $\lambda 6$ ? Estudios previos han demostrado que en las cadenas ligeras amiloidogénicas coexisten tanto mutaciones deletéreas como estabilizantes<sup>[55]</sup> Hay evidencias de que las cadenas ligeras amiloidogénicas resultan de clonas de células plasmáticas que sobrevivieron la fase de selección dependiente de antígeno. Durante esta fase, se acumulan mutaciones somáticas en la región variable de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo. Un posible resultado es el incremento de la afinidad del reconocimiento del anticuerpo por el antígeno que provocó la respuesta humoral. Un costo colateral es la desestabilización grave de la cadena ligera, lo cual podría impedir su expresión en la superficie celular como parte del anticuerpo-receptor. El resultado sería la eliminación de la clona, al no poder recibir el estímulo del antígeno, clave para su supervivencia. Se sabe que la maquinaria molecular que lleva a cabo la hipermutación somática es capaz de reconocer a ciertos codones, donde introduce cambios con más frecuencia que en otros. Se cree que estos codones, denominados sitios calientes, han sido incluidos en ciertas posiciones a través de un proceso de selección evolutiva. Sin embargo, en general, la naturaleza y distribución de los cambios no resulta de un proceso de “instrucción”, es más bien un proceso de “prueba y error”. Debido a que una fracción de las mutaciones somáticas pueden comprometer seriamente la estabilidad de la inmunoglobulina, es lógico suponer que las proteínas más estables pueden, en promedio, incorporar un número mayor de mutaciones somáticas, porque poseen más “recurso de estabilidad”. Una posible opción de rescate de las proteínas menos estables es la retención en su secuencia de puntos calientes, no situados en las asas de reconocimiento –para evitar efectos directos sobre el reconocimiento-, que pueden ser asiento de mutaciones estabilizantes. Estas mutaciones incrementarían el número de mutaciones somáticas –es decir, espacio de secuencia accesible- potencialmente beneficiosas para el reconocimiento que la proteína puede aceptar. Es posible sugerir que la mutación E13G juega la función antes descrita, debida a que es relativamente frecuente (~6 %), no está situada en CDRs y su efecto es significativamente estabilizante en el contexto de 6aJL2.

## Origen filogenético de la interacción E13-K17. ¿Una posible explicación para la amiloidogenicidad de $\lambda 6$ ?

Por otra parte, sólo el segmento de gen 6a humano codifica para E13 y K17. El gen ortólogo en el chimpancés (*Pan troglodytes*) codifica Gln en lugar de Lys en la posición 17. Además, posee otros tres cambios, incluyendo Asn por Asp en la posición 31b. Estudios aún no publicados del Dr. L del Pozo Yauner indican que la región del CDR-1 puede ser importante en el mecanismo molecular de agregación amiloide de las cadenas ligeras  $\lambda 6$ . En particular, se ha demostrado que mutaciones por Asp, incluyendo en la posición 31b, pueden atenuar la tendencia de estas proteínas para formar fibras amiloides. Por otra parte, el macaco Rhesus (*Macaca mulatta*) codifica Gly13 y Gln17, es decir, no posee ninguno de los dos residuos, lo cual indica que los residuos E13 y K17 son de incorporación reciente en la evolución del segmento del gen 6a. Acorde a los resultados aportados por este estudio, no puede descartarse que las cadenas ligeras  $\lambda 6$  en ambas especies de primates sean menos amiloidogénicas que las homólogas del humano. Para dar respuesta a esta interrogante, se necesita estudiar las propiedades termodinámicas y el potencial fibrilogénico *in vitro* de proteínas de otras especies homólogas a 6aJL2.

Tabla 3 Comparación de secuencias de 6aJL2 en diversas especies.

	5	15	25	35	45	55	65	75	85	95
6a-Humano	NFMLTQPHSV	SESPGKIVTI	SCTRSSGSIA	SNYVQWYQQR	PGSSPTTVIY	EDNQRPSGVP	DRFSGSIDSS	SNSASLTISG	LKTEDEADYY	CQS-YDSSN-
Pan trogl	.....	Q.....	.....	D.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Pan trogl	.....	Q.....	.....	D.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Macaca mul	EVVF.....	G...Q...	.....D	E.....	NA.....	K.....	.....	.....	.....	.....
Macaca mul	EVVF.....	G...Q...	.....D	E.....	.....	K.....	.....	.....	.....	.....
Equus cab	EVV...R...	L.QKA.M	.....N.G	S...Y...	.....	A...M...	D.DE.L...	G.....	A.YP.L...	QP.....N
Mus muscul	Q.V...S...	T.L.S...KL	..K..T.N.G	N...N...	Y M.R...NM	G.D...T.S	.....	F...NN	VQA.....	..S.D--
Mus muscul	Q.V...S...	T.L.S...KL	..K..T.N.G	N...H...	Y M.R...NM	D..K...S	.....	F...NN	VQA.....	..S.GV-
Rattus norv	Q.V...N...	TNL.S...KL	..K..T.N.G	N...N...	H E.R...M	R.DK..D...	.....	R...L...	NN VQ.....	F...S.GI-
Rattus norv	Q.V...N...	TNL.S...KL	..K..T.N.G	N...N...	H E.R...M	R.DK..D...	.....	R...L...	NN VQ.....	F...S.GI-
Rattus norv	Q.T...K...	G.LRS.I...	P.E...D.G	DS...S...	H L.RP.IN...	A.D...E.S	.....	.....	TN .QMD...	F...NI-
Rattus norv	Q.V...N...	TNL.S...KL	..K..T.N.G	N...N...	H E.R...M	R.DK..D...	.....	R...L...	NN VQ.....	F...S.GIN
Trichosurus	K.V...A...	G.L.QS.M	.....N.G	Y.S...H	Q.Q.KLI...	WSK...I.E	.....	K.T.A...	S...QA.....	L...SY
Trichosurus	Q.V...A...	G.L.QS...	.....N.G	D...H	Q.QA.KLI...	SYSNH...I.E	.....	K.T.A...	QA.....	A.YK.SY
Trichosurus	Q.V...A...	G.L.QS...	.....N.G	G.N...H	Q.QA.RLI...	SYSNH...I.E	.....	K.T.A...	QA...A...	A.YKTAY
Trichosurus	K.V...A...	G.L.QS.M	.....N.G	Y.S...H	Q.Q.KLI...	WSK...I.E	.....	K.T.A...	S...QA.....	L...SY
Ambystoma m	QYL...S.E	IP.A.EP.KL	.....R	GHS.S...	ITA.KIL...	DFIN.VEIL	P.....	T.TA	T.T.Y...T	VQP..D.A...L.F.YA--

## ABREVIATURAS

3PG:	3 fosfo-gliceraldehido.
AA:	Amiloidosis secundaria
AL:	Amiloide de Cadena Ligeras
ATP:	Adenosin Trifosfato.
CDR S:	Regiones Determinantes de Complementareidad.
C <sub>L</sub> :	Dominio constante.
DMC:	Doble Mutant Cicle (Ciclo de Doble Mutante).
EDTA:	Ácido Etilendiaminotetraacético.
GdnHCl:	Cloruro de Guanidina.
IPTG:	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside.
JL:	Segmento de unión.
LC:	Cadena Ligera.
PCR.	Reacción en Cadena de la Polimerasa.
PDB:	<i>Protein Data Bank.</i>
PBS:	<i>Bufer Fosfato Salino.</i>
P-DHA:	Triosas fosfo-dihidroxiacetona.
PQC:	<i>Protein Quality Control.</i>
SDS:	Dodecilsulfato sódico.
SCOP:	<i>Structural Cassification of Protein.</i>
TIM:	<i>Triosa fosfato isomerasas.</i>
V <sub>L</sub> :	Dominio variable.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] Francis Crick (1978) Central Dogma of molecular biology. *Nature*. Vol 227. august 8, 1970.
- [2] Alberts B , Bray D , Lewis J , Raff M , Roberts K , Watson J D . (2002). *Molecular Biology of the Cell*. 4<sup>a</sup>. ed. Omega. Barcelona.
- [3] Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, Yan JX, Gooley AA, Wilkins MR, Duncan MW, Harris R, Williams KL, Humphery-Smith I. (1995). Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* 1995;16(7):1090-1094.
- [4] Kahn P. From genome to proteome: looking at a cell's proteins. (1995). *Science*. 1995 Oct 20;270(5235):369-70.
- [5] Harvey Lodish, Arnold Berk, Lawrence Zipursky, Paul Matsudaira, David Baltimore, and James Darnell. (2000). *Molecular Cell Biology*, 4th edition Ed Panamericana.
- [6] Murzin A. G., Brenner S. E., Hubbard T., Chothia C. (1995). SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *J. Mol. Biol.* 247, 536-540.
- [7] Rao S, Rossmann M (1973) Comparison of super-secondary structures in proteins *J Mol Biol.* Vol. 76. 241–56.
- [8] Bryan AW Jr, Menke M, Cowen LJ, Lindquist SL, Berger B. (2009) BETASCAN: probable beta-amyloids identified by pairwise probabilistic analysis. *PLoS Comput Biol* 5(3): e1000333. doi:10.1371/journal.pcbi.1000333.
- [9] C. B. Anfinsen, E. Haber, M. Sela, F. H. White, Jr. (1961). The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1961 September; 47(9): 1309–1314.
- [10] Robert Zwanzig, Attila Szabo, Biman Bagchi. (1992). Levinthal's paradox. *Biophysics*. Vol. 89, pp. 20-22.
- [11] Levinthal, C. Are There Pathways for Protein Folding?. (1968). *Journal de Chimie Physique*, 1968, 65 no 1, p. 44.
- [12] Wetlaufer, D.B. (1973) Nucleation, rapid folding, and globular intrachain regions in proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 70, 697–701.
- [13] Ptitsyn, O.B. (1987) Protein folding: hypotheses and experiments. *J. Protein Chem.* 6, 273–293
- [14] Ptitsyn, O.B. Rashin, A.A. (1975) A model of myoglobin selforganization. *Biophys. Chem.* 3, 1–20.
- [15] Kim, P.S. Baldwin, R.L. (1990) Intermediates in the folding reactions of small proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 59, 631–660.

- [16] Schellman, J.A. (1955) Stability of hydrogen bonded peptide structures in aqueous solution. *Compt. Rend. Lab. Carlsberg. Ser. Chim.* 29, 230–259
- [17] Theodore L. Brown, H. Eugene LeMay, Jr. Bruce E. Bursten, (2003). *Chemistry The Central Science Ninth Edition*. Prentice Hall Upper Saddle River, New Jersey. 07458.
- [18] Wolynes PG, Onuchic JN, Thirumalai D. Navigating the folding routes. (1995). *Science*. 1995. 267;1619-20.
- [19] Ken A. Dill and Hue Sun Chan.(1997). From Levinthal to pathways to funnels. *Nature structural biology*, vol 4, 1997.
- [20] Voet, D. and Voet, J.G.: *Biochemistry* 2nd ed. (Wiley, New York, 1995), p 215.
- [21] Ramachandran, G. N. and Sasisekharan, V.,*Adv. Protein chem.* 23, 326 (1968).
- [22] Walther, D. et al.: Principles of helix-helix packing in proteins: the helical lattice superposition model. *J. Mol. Biol.* 1996, 255:536–553.
- [23] Barlow, D.J. and Thornton, J.M.: Helix geometry in proteins. *J. Mol. Biol.* 1988, 201:601–619.
- [24] Eilers, M. et al.: Internal packing of helical membrane proteins. *Proc.Natl Acad. Sci. USA* 2000, 97:5796–5801.
- [25] Lesk, A.M. Chothia, C.: Solvent accessibility, protein surfaces and protein folding. *Biophys. J.* 1980, 32:35–47.
- [26] Richards, F.M. Richmond,T.: Solvents, interfaces and protein structure.*Ciba. Found. Symp.* 1997, 60:23–45.
- [27] Rose, G.D. Roy, S.:Hydrophobic basis of packing in globular proteins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1980, 77:4643–4647.
- [28] Gonzalez, L. Jr et al.: Buried polar residues and structural specificity in the GCN4 leucine zipper. *Nat. Struct. Biol.* 1996, 3:1011–1018.
- [29] Myers, J.K. and Oas, T.G.: Reinterpretation of GCN4-p1 folding kinetics: partial helix formation precedes dimerization in coiled coil folding. *J. Mol. Biol.* 1999, 289:205–209.
- [30] Zielenkiewicz, P. and Rabczenko, A.: Methods of molecular modelling of protein-protein interactions. *Biophys.Chem.* 1988, 29:219–224.
- [31] Tanford, C. (1962) Contribution of hydrophobic interactions to the stability of globular confirmation of proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 84, 4240–4241
- [32] Baldwin, R.L. (1989) How does protein folding get started? *Trends Biochem. Sci.* 14, 291–294.
- [33] Bosshard, H.R. et al.: Energetics of coiled coil folding: the nature of the transition state. *Biochemistry* 2001, 40:3544–3552.
- [34] Creighton, T.E.: *Proteins: Structure and Molecular Properties* 2nd ed. (Freeman, New York, 1993),

233–236.

- [35] Perham, R.N.: Self-assembly of biological macromolecules. *Philos.Trans. R. Soc. Lond. B.* 1975, 272:123–136.
- [36] Jones, S. and Thornton, J.M.: Principles of protein interactions. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1996, 93:13–20.
- [37] Brandon, C. & Tooze, J. (1999). *Introduction to Protein Structure*. 2nd ed. New York: Garland Publishing, Inc.
- [38] Rose, G. D., Gierasch, L. M. & Smith, J. A. (1985). Turns in Peptides and Proteins. *Advan. Protein Chem.* 37,1-97.
- [39] Makhatadze GI, Loladze VV, Ermolenko DN, Chen X, Thomas ST. *J Mol Biol.* Contribution of surface salt bridges to protein stability: guidelines for protein engineering. (2003) Apr 11;327(5):1135-48.
- [40] Amnon Horovitz, Luis Serrano, Boaz Avron, Mark Bycroft and Alan R. Fersht (1990). Strength and Co-operativity of Contributions of Surface Salt Bridges to Protein Stability *J. Mol. Biol.* (1990) 216, 1031-1044.
- [41] Musafia, B., Buchner, V., and Arad, D. (1995). Complex salt bridges in proteins: Statistical analysis of structure and function. *J. Mol. Biol.* 254: 761–770.
- [42] Kumar, S. and Nussinov, R. 2002. Close-range electrostatic interactions in proteins. *ChemBioChem* 3: 604–617.
- [43] Gvritishvili AG, Gribenko AV, Makhatadze. GI. (2008). Cooperativity of complex salt bridges *Protein Sci.* 2008 1285-90.
- [44] Perutz, M.F. (1978). Electrostatic effects in protein. *Science*, 201, 1187-1191.
- [45] A. Karshikoff, R. Ladenstein, *Trends in Biochemical Sciences* 26 (2001) 550–556.
- [46] R. S. Harrison · P. C. Sharpe · Y. Singh · D. P. Fairlie (2007). Amyloid peptides and proteins in review *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 159:1 –77
- [47] C. P. J. Maury (2008). The emerging concept of functional amyloid. *Journal of Internal Medicine*.
- [48] Fändrich, M. (2007). On the structural definition of amyloid fibrils and other polypeptide aggregates. *Cell. Mol. Life Sci.* 64, 2066–2078.
- [49] David Eisenberg (2003) The discovery of the  $\alpha$ -helix and  $\beta$ -sheet, the principal structural features of proteins. Howard Hughes Medical Institute and University of California–Department of Energy Institute of Genomics and Proteomics, University of California, Los Angeles, CA 90095-1570
- [50] Jean D.Sipe and Alan S. Cohen (2000): History of the Amyloid Fibril. *Journal of Structural Biology* 130, 88-98

- [51] MSoetekouw R, Bruijin JA, Hogewind BL, Bieger R. (1998). A 66 year old woman with nephrotic syndrome and IgM monoclonal gammopathy. *Ann Hematol* 76: 227-30.
- [52] O. Bestard Matamoros (2008). Systemic AA amyloidosis induced by benign neoplasms. *Nefrología* 2008; 28 (1) 93-98.
- [53] Glenner, G. G., Harbaugh, J., Ohms, J. I., Harada, M., Cuatrecasas, P. (1970) An amyloid protein: the amino-terminal variable fragment of an immunoglobulin light chain. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 41: 1287-1289.
- [54] Obici, L., Perfetti, V., Palladini, G., Morati, R., Merlini, G. (2005) Clinical aspects of systemic amyloid diseases. *Biochim Biophys Acta* 1753, 11-22.
- [55] Hurle, M. R., Helms, L. R., Li, L., Chan, W., Wetzel R. (1994) A role for destabilizing amino acid replacements in light chain amyloidosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, 5446-5450.
- [56] Wetzel, R. (1997) Domain stability in immunoglobulin light chain deposition disorders. *Adv. Prot. Chem.* 50, 182-242.
- [57] Raffin, R. M., Dieckman, L. J., Szpunar, M., Wunschl, C., Pokkuluri, P. R., Daves, P., Stevens, P. W., Cai, X., Schiffer, M., Stevens, F. J. (1999) Physicochemical consequences of amino acid variations that contribute to fibril formation by immunoglobulin light chain. *Prot. Sci.* 6, 509-517.
- [58] Kim, Y., Wall, J. S., Meyer, J., Murphy, C., Randolph, T. W., Manning, M. C., Solomon, A., Carpenter, J. F. (2000) Thermodynamic modulation of light chain amyloid fibril formation. *J. Biol. Chem.* 275, 1570-1574.
- [59] Walls, J., Schell, M, Murphy, C., Hrcic, R., Stevens, F. J., Solomon, A. (1999) Thermodynamic instability of human  $\lambda$  light chain: correlation with fibrillogenicity. *Biochemistry* 38, 14101-14108.
- [60] Helms, L. R., Wetzel, R. (1996) Specificity of Abnormal Assembly in Immunoglobulin Light Chain Deposition Disease and Amyloidosis. *J. Mol. Biol.* 257, 77-86.
- [61] Solomon, A., Frangione, B., Franklin, E. C. (1982) Preferential association of the V $\lambda$ VI subgroup of human light chains. *UIT Amyloidosis AL. J. Clin. Invest.* 70, 453-460.
- [62] Abraham, R.S., Geyer, S. M., Price-Troska, T. L., Allmer, C., Kyle, R. A., Gerzt, M.A., Fonseca, R. (2003) Immunoglobulin light chain variable (V) region genes influence clinical presentation and outcome in light chain-associated amyloidosis (AL). *Blood* 101, 3801-3808. Ignatovich, O., Tomlinson, I. M., Jones.
- [63] P. T., Winter, G. (1997) The creation of diversity in the human immunoglobulin V $\lambda$  repertoire. *J. Mol. Biol.* 268, 69-77.
- [64] Ch'ang, L-Y., Yen, C-P., Besl, L., Schell, M., Solomon, A. (1994) Identification and

characterization of a functional human Ig V $\lambda$ VI germline gene. *Mol. Immunol.* 31, 531-536.

[65] Pokkuluri P. R., Solomon, A., Weiss, D. T., Stevens, F. J. Schiffer, M. (1999) Tertiary Structure Of Human  $\lambda$ 6 Light Chains. *Amyloid: Int. J. Exp. Clin. Invest.* 6, 165-171.

[66] Dealwis, C., Wall, J. (2004) Towards understanding the structure-function relationship of human amyloid disease. *Curr Drug Targets* 5, 159-171.

[67] Wall, J.S., Gupta, V., Wilkerson, M., Schell, M., Loris, R., Adams, P., Solomon, A., Stevens, F., Dealwis, C. (2004) Structural basis of light chain amyloidogenicity: comparison of the thermodynamic properties, fibrillogenic potential and tertiary structural features of four V $\lambda$ 6 proteins. *J. Mol. Recognit.* 17, 323-331.

[68] Schier R, Marks JD, Wolf EJ, Apell G, Wong C, McCartney JE, Bookman MA, Huston JS, Houston LL, Weiner LM. In vitro and in vivo characterization of a human anti-c-erbB-2 single-chain Fv isolated from a filamentous phage antibody library. *Immunotechnology.* 1995;1:73–81.

[69] Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74:5463–5467.

[70] Stevens, P. W., Raffin, R., Hanson, D. K., Deng, Y-L., Berrios-Hammond, M., Westholm, F., Murphy, C., Eulitz, M., Wetzell, R., Solomon, A., Schiffer, M., Stevens, F. J. (1995) Recombinant immunoglobulin variable domains generated from synthetic genes provide a system for *in vitro* characterization of light-chain amyloid proteins. *Protein Sci.* 4, 421-432.

[71] Santoro MM, Bolen DW. Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. I. Unfolding of phenyl-methanesulfonyl a-chymotrypsin using different denaturants. *Biochemistry* 1988;27:8063–8074.

[72] George I. Makhatadze, Vakhtang V. Loladze, Dmitri N. Ermolenko, XiaoFen Chen and Susan T. Thomas. (2003). Contribution of Surface Salt Bridges to Protein Stability: Guidelines for Protein Engineering. *J. Mol. Biol.* 327, 1135–1148.

[73] E. Gail Hutchinson, Janet M. Thornton. (1994). A revised set of potentials for  $\alpha$  and  $\beta$  turn formation in proteins. *Protein Science.* 3:2207-2216.

[74] Alejandra Hernández-Santoyo, Luis del Pozo Yauner, Deyanira Fuentes-Silva, Ernesto Ortiz, Enrique Rudiño-Piñera, Rosana Sánchez-López, Eduardo Horjales, Baltazar Becerril and Adela Rodríguez-Romero.(2010). A Single Mutation at the Sheet Switch Region Results in Conformational Changes Favoring  $\lambda$ 6Light-Chain Fibrillogenesis. *J. Mol. Biol.* (2010) 396, 280–292.

[75] Del Pozo Yauner Luis.(2008). Influencia de la línea germinal 6a en la tendencia de las cadenas ligeras  $\lambda$ 6 a la agregación amiloide. (Tesis de Doctorado – UNAM)

[76] Sinha, N., Li, Y., Lipschultz, C. A., Smith-Gill, S. J. (2007) Understanding antibody-antigen

associations by molecular dynamics simulations: detection of important intra- and inter-molecular salt bridges. *Cell Biochem Biophys.* 47, 361-375.

**[77]** Solomon, A. (1985) Light chains of immunoglobulins: Structural-genetic correlates. *Blood* 68, 603-610.

**[78]** Pilström, L. (2002) The mysterious immunoglobulin light chain. *Dev. Comp. Immunol.* 26, 207-215.

**[79]** Amzel, L. M., Poljak, R. J. (1979) Three-dimensional structure of immunoglobulins. *Ann Rev Biochem* 48, 961-997.

**[80]** Davies, D. R., Chacko, S. (1993) Antibody structure. *Acc. Chem. Res.* 26, 421-427.

**[81]** Solomon, A., Weiss, D. T. (1995) Structural and functional properties of human  $\lambda$ -light-chain variable-region subgroup. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 2, 387-394.

**[82]** Williams, S. C., Fripiat, J., Tomlinson, I. M., Ignatovich, O., Lefranc, M., Winter, G. (1996) Sequence and evolution of the human germline V $\lambda$  repertoire. *J. Mol. Biol.*, 264:220-232.

**[83]** Prodromou C, Pearl LH. Recursive PCR: a novel technique for total gene synthesis. *Protein Eng* 1992;5:827–829.

**[84]** Del Pozo Yauner L, Ortiz E, Sánchez R, Sánchez-López R, Güereca L, Murphy CL, Allen A, Wall JS, Fernández-Velasco DA, Solomon A, Becerril B. (2008). Influence of the germline sequence on the thermodynamic stability and fibrillogenicity of human lambda 6 light chains. 2008 Aug;72(2):684-92.)