

Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería

Idónea comunicación de resultados

**“Estudio sobre la inhibición de fibras amiloides y su
posible mecanismo de acción en lisozima humana”**

Presenta

Biól. Mol. Santos Arturo López Guzmán

Directores

Dr. Hugo Nájera Peña

Dr. Arturo Rojo Domínguez

Asesora

Dra. Roxana López Simeon

Laboratorio de Biofisiocoquímica

Ciudad de México, 28 de julio de 2020.



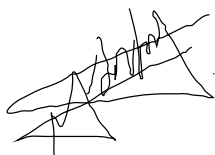
Esta idónea comunicación de resultados fue realizada dentro del Programa de Maestría del **Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería** de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería (DCNI) de la Universidad Autónoma Metropolitana- Unidad Cuajimalpa. El trabajo experimental y de cómputo, fue realizado de septiembre de 2018 a septiembre de 2020 en el laboratorio de Biofisiocoquímica de la DCNI. Durante este tiempo se contó con una beca otorgada por el **CONACYT**, sin la cual hubiese sido imposible lograr este trabajo.

DECLARACIÓN DE CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D. F. el día _1_ del mes _03_ del año _2021_, el que suscribe Santos Arturo López Guzmán alumno del Programa de Maestría, en Ciencias Naturales e Ingeniería de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Cuajimalpa, manifiesta que es autor intelectual de la presente idónea comunicación de resultados titulada; **“Estudio sobre la inhibición de fibras amiloides y su posible mecanismo de acción en lisozima humana”** realizada bajo la dirección de los doctores Arturo Rojo Domínguez y Hugo Nájera Peña cede los derechos de este trabajo a la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráfico o de datos del trabajo, sin el permiso expreso de los directores del trabajo como representantes de la UAM. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones: hnajerap@gmail.com y arturorojod@gmail.com.

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

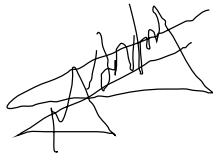


_____ Santos Arturo López Guzmán _____

Nombre y firma del alumno

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

“El que suscribe, (Santos Arturo López Guzmán), alumno del Programa de Maestría, en Ciencias Naturales e Ingeniería declara que los resultados reportados en esta idónea comunicación de resultados, son producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a su concepción y análisis. Así mismo, declaro que hasta donde es de mi conocimiento no contiene material previamente publicado o escrito por otras (s) persona (s) excepto donde se reconoce como tal a través de citas y que este fue usado con propósitos exclusivos de ilustración o comparación. En este sentido, afirmo que cualquier información sin citar a un tercero es de mi propia autoría. Declaro, finalmente, que la redacción de este trabajo es producto de mi propia labor con la dirección y apoyo de mi director y de mi comité tutorial, en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación y a la expresión escrita.”

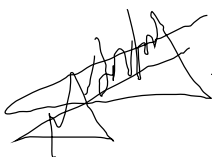


_____ Santos Arturo López Guzmán _____

Nombre y firma del alumno

DECLARACIÓN DE NO LUCRO:

El que suscribe, Santos Arturo López Guzmán alumno del Programa de Maestría, en Ciencias Naturales e Ingeniería, manifiesta su compromiso de no utilizar con fines de difusión, publicación, protección legal por cualquier medio, licenciamiento, venta, cesión de derechos parcial o total o de proporcionar ventajas comerciales o lucrativas a terceros, con respecto a los materiales, datos analíticos o información de toda índole, relacionada con las actividades e intercambios de información derivados de la relación de investigación académica y tecnológica desarrollada entre la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) y Santos Arturo López Guzmán.



_____ Santos Arturo López Guzmán _____

Nombre y firma del alumno

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa por brindarme toda mi formación académica y a CONACYT por el otorgamiento de una beca que me permitió llevar a cabo mis estudios y el proyecto aquí presentado.

Agradezco a mis directores Hugo Nájera y Arturo Rojo por brindarme el mejor asesoramiento, así como una gran dirección durante el proyecto y ayudarme a tener una formación profesional competente en diversas áreas.

A mi compañero Ricardo Cerón por los consejos y sugerencias que me facilitaron el trabajo de laboratorio y en el desarrollo de los experimentos realizados.

Gracias a mi familia quienes siempre me han apoyado en todas mis decisiones y que sin su apoyo no hubiera sido posible llevar a cabo esta meta.

Por último, a Dafne mi pareja quien me apoyo en todo momento y soportó mis frustraciones en el desarrollo de este proyecto.

Índice

Resumen	1
Introducción.....	2
Proteínas.....	2
Fibras amiloides.....	2
Formación de fibras amiloides	4
Justificación	7
Objetivo	8
Hipótesis	8
Materiales y métodos	9
Resultados y análisis.....	14
Formación de fibras amiloides	14
Inhibición de fibras amiloides por compuestos fenólicos	15
Estabilidad de lisozima.....	17
Desnaturalización por calor	17
Desnaturalización por urea.....	20
Calorimetría DSC.....	25
Simulación del desplegamiento de lisozima	27

Docking	29
Efecto de la L-tirosina en la simulación del desplegamiento	32
Ciclos vs energía	32
Ciclos vs radio de giro	34
Conclusiones	38
Perspectivas	39
Referencias	40

Resumen

Las proteínas son moléculas fundamentales para la vida, por lo cual su correcto funcionamiento es esencial. Una de las características más importantes para que esto se lleve a cabo es que tengan un plegamiento indicado. En algunas ocasiones esto no ocurre, lo que lleva a la producción de fibras amiloides, las cuales se han asociado o son responsables de causar diferentes enfermedades conocidas como amiloidosis. Una de las proteínas que causa este tipo de patología es la lisozima humana que se asocia con la amiloidosis sistémica hereditaria, pero a diferencia de otras ésta sirve como modelo de estudio debido a que se tiene un amplio conocimiento de dicha proteína en su estado nativo.

En este trabajo se estandarizó la formación *in vitro* de fibras amiloides de lisozima humana silvestre, para el estudio de la inhibición de la fibrillogénesis. La particularidad de esta estandarización es que se logró a temperatura y pH fisiológico, *i.e.* 7.44. Se demostró también que algunos compuestos fenólicos tuvieron un efecto inhibitorio en la formación de fibras. Los resultados obtenidos indican que entre los compuestos ensayados la L-tirosina es la de mayor poder inhibitorio. Con los resultados obtenidos se estudió el posible mecanismo de acción, mediante experimentos de laboratorio y computacionales, para elucidar detalles de la forma en que la L-tirosina inhibe la formación de fibras amiloides.

Introducción

Proteínas

Las proteínas son moléculas de suma importancia para que pueda haber vida, debido a que cumplen múltiples funciones. Para que una proteína pueda ser funcional debe de cumplir dos requisitos primordiales, encontrarse en el ambiente indicado y tener la estructura correcta, en otras palabras, que ésta tenga un plegamiento indicado para su funcionamiento. Para que no existan problemas las células desarrollaron diversos mecanismos que ayudan a las proteínas a tener el plegamiento correcto y se encargan de eliminar las que tienen una síntesis incorrecta o un mal plegamiento [1]. Cuando estos mecanismos no actúan de forma correcta se pueden formar agregados desordenados o puede ocurrir la formación de estructuras amiloides, estas últimas son estructuras muy estables que se pueden reconocer debido a que poseen propiedades específicas de tinción, presentan birrefringencia al color verde-manzana cuando son teñidas con rojo Congo y se pueden observar por microscopía de luz polarizada [2]. Son responsables de causar diferentes enfermedades colectivamente conocidas como amiloidosis. Actualmente se asocian estas fibras amiloides con enfermedades degenerativas del sistema nervioso central como son las neuropatías Alzheimer y Creutzfeldt-Jakob, éstas son neuropáticas. Hay otro tipo de amiloidosis las cuales son sistémicas, donde se forman depósitos de proteínas en el tejido, ligamentos y órganos como el corazón. Se han identificado más de 40 proteínas y péptidos (péptido β A, tau, α -sinucleína, hungtintina, amilina, β 2-microglobulina, lisozima, etc.) que forman agregados amiloides en humanos principalmente como depósitos extracelulares [3].

Fibras amiloides

Estas fibras son proteínas con un plegamiento incorrecto o no convencional que se caracteriza por tener una estructura β -cruzada, por lo cual suelen ser muy estables, debido a que este tipo de estructura posee la propiedad intrínseca de formar estructuras laminares extendidas [4]. Este tipo de estructura ocasiona que se formen

muchos puentes de hidrógeno que en forma individual son débiles, pero al estar en una gran cantidad confieren una alta estabilidad y rigidez a las fibras [5].

Otras características son: el incremento en la hidrofobicidad de la superficie, fluorescencia tras la adición de tioflavina T (ThT) y birrefringencia a color verde-manzana cuando son teñidas con rojo Congo [2].

Se ha propuesto que las fibras amiloides son rectas, no ramificadas con un diámetro igual o mayor a 100 Å y longitud indefinida, que están constituidas de 2 a 4 protofilamentos y cada uno de estos protofilamentos está compuesto por 4 hebras β separadas por ~ 10 Å [6][7]. La organización de las fibras se representa en la figura 1 donde se observa desde la fibra hasta la organización de las hebras β .

A pesar de que diferentes proteínas forman fibras amiloides no se ha encontrado una estructura o secuencia de aminoácidos que esté directamente relacionado con la formación de amiloides, debido a que las proteínas no tienen una característica en común que las relacione. Debido a esto se ha propuesto que la formación de fibras amiloides es una propiedad genérica que poseen algunas proteínas [8].

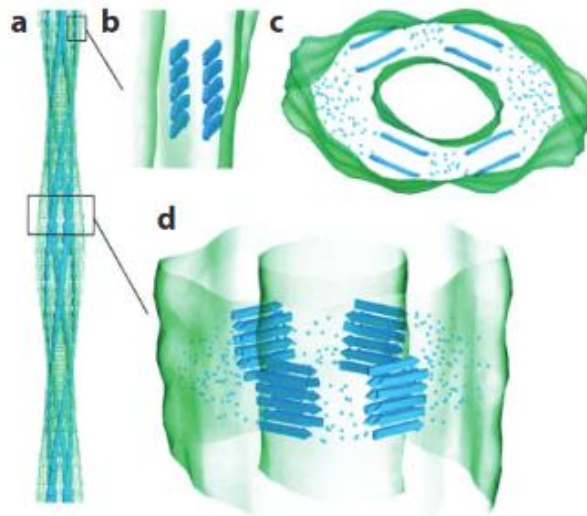


Figura 1. Modelo de una fibra amiloide donde se observa la posición de las hojas beta. (a) Sobrevista de una fibra amiloide compuesta por cuatro protofilamentos. (b) Vista lateral de un protofilamento. (c) Sección cruzada de la fibra. (d) Vista lateral de la fibra. [8].

Formación de fibras amiloides

El proceso por el cual las proteínas forman fibras amiloides aún no se conoce por completo. Mediante el uso de diversas técnicas como el seguimiento de la intensidad de fluorescencia de ThT se ha podido determinar que la cinética de este proceso está conformado por una fase de retraso (*lag*), sucedida por un crecimiento exponencial conocido como fase log y culmina con una fase de saturación. Debido a esto, se dice que la formación de fibras amiloides tiene características de un mecanismo de crecimiento de nucleación [9] (figura 2). En este tipo de proceso se requiere la formación de un núcleo crítico o semilla constituida por polímeros de tamaño n , que puedan servir de andamio a las moléculas subsecuentes. Este proceso depende de la formación de dicho núcleo, el tiempo que requiere para llevarse a cabo es mayor en esta fase que en las demás. Es decir, la intensidad de fluorescencia casi no va a aumentar debido a la nula o baja presencia de fibras. La fase exponencial se refiere a la formación de protofibrillas que toman como base los núcleos anteriormente formados, por lo que se aprecia un incremento rápido en la intensidad de fluorescencia. Esto se debe al mecanismo de unión de la ThT a las fibras amiloides que se explicará más adelante. Por último, la fase de saturación o estacionaria es donde se ha alcanzado el máximo en la formación de las fibras amiloides por lo que ya no hay un aumento en la intensidad de fluorescencia de el ThT.

Una característica muy importante de esta molécula es su capacidad de rotación como se observa en el esquema de la figura 3. La importancia de este movimiento radica cuando interacciona con las fibras. Por lo tanto, esta molécula cuando se une a fibras presenta fluorescencia, ocasionando que entre mayor sea la presencia de fibras mayor será la intensidad de la fluorescencia. [12].

El mecanismo por el cual se une el ThT a las fibras consiste en la intercalación de estas moléculas en los surcos o canales que se forman por la estructura común que tienen las fibras amiloides como se muestra en la figura 4. Al entrar en estos espacios, la molécula de tioflavina T pierde su capacidad de rotación, haciendo que se vuelva rígida lo que ocasiona que tenga la propiedad de fluorescer [13]. Este mecanismo explica por qué el ThT es tan usado para la detección de fibras y su especificidad por ellas.

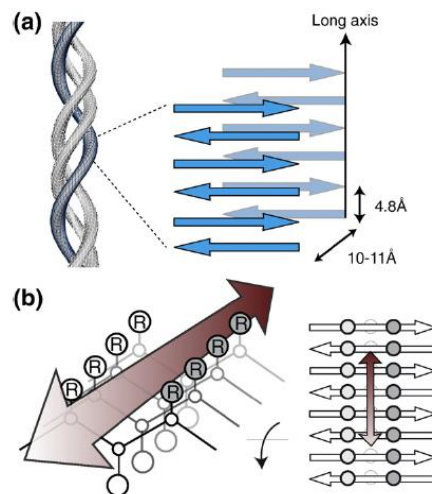


Figura 4. Estructura común de las fibras y canales en cuales interacción es ThT-Fibra. (a) Estructura beta cruzada de fibras amiloides que forma capas de láminas de hebras beta. (b) Canales o surcos en los cuales interacciona el ThT y que se forman por la estructura que toman las fibras [13].

Lisozima como modelo de estudio

La lisozima es una proteína ampliamente estudiada, en la actualidad es uno de los modelos más utilizados para estudios de plegamiento, catálisis enzimática y fibrillogénesis. Su estructura se reportó por primera vez en 1965, el reporte más reciente de alta resolución de su estructura se realizó en 2007 [14].

Esta proteína es considerada fibrilar debido a que ocasiona amiloidosis sistémica hereditaria cuando presenta mutaciones. Se han reportado dos mutaciones que son causantes de la formación de fibras amiloides, que son Asp67His e Ile56Thr. Estas mutaciones ocasionan que los residuos se desplacen de su posición original (de acuerdo al carbón alfa). Este desplazamiento es suficiente para que estas dos variantes de lisozima mutada causen amiloidosis [15].

Por lo anterior, la lisozima de humano es un buen modelo para estudiar la inhibición de la fibrillogénesis.

Justificación

En la actualidad las enfermedades amiloideas siguen sin tener una cura, por lo que el estudio de las proteínas que las causan es de suma importancia. El utilizar un modelo como la lisozima humana, que es una proteína de la cual se tiene mucha información y se puede forzar a formar fibras amiloides (sin necesidad de tener las mutaciones). Permite la opción de su estudio en laboratorio, para dilucidar el mecanismo de formación de fibras, así como averiguar un mecanismo de inhibición. Todo esto con el fin de aportar información para el posible desarrollo de una molécula capaz de casar la inhibición de las fibras amiloides.

Objetivos

General

Encontrar un compuesto que sea capaz de inhibir la formación de fibras amiloides y proponer el mecanismo de acción.

Particulares

Formar fibras amiloides de lisozima humana a temperatura y pH fisiológico.

Evaluar diferentes compuestos fenólicos, para obtener el mejor modelo de estudio de inhibición.

Mediante experimentos de laboratorio y computacionales proponer un mecanismo de acción para el compuesto inhibitorio.

Hipótesis

Si se forman fibras amiloides a pH fisiológico, es posible inhibir su formación con compuestos fenólicos y es posible dilucidar en qué parte del proceso se realiza esta interrupción o modificación.

Materiales y métodos

Materiales

La lisozima liofilizada de humano, la tioflavina T (ThT), los compuestos fenólicos: 6-p-toluidino, pirocatecol, L-tirosina, crisina, quercetina, así como el fosfato de potasio dibásico KH_2PO_4 , se adquirieron de Sigma-Aldrich Company. La urea fue comprada a Merck, en todos los experimentos se empleó agua inyectable de la marca Pisa.

Los experimentos computacionales se llevaron a cabo en los programas Molecular Operating Environment (MOE) versión 2007, y Visual Molecular Dynamics (VMD) versión 1.9.3. Las gráficas, así como los ajustes se realizaron con el programa de graficación y análisis Origin 2016.

Metodología

La tioflavina T se preparó en una solución madre (10 mM), de ésta se tomó una alícuota para que en todos los experimentos la concentración final fuera de 0.066 mM.

El buffer utilizado para todos los experimentos fue de fosfatos de potasio a pH 7.44 a una concentración 20 mM.

Los compuestos fenólicos se prepararon en una solución madre de 2.5 mM con agua inyectable a excepción de la crisina que se preparó con etanol puro. La concentración final de los compuestos varió según el experimento realizado.

El compuesto urea se preparó una solución madre de 11 M con solución amortiguadora de fosfatos 20 mM pH 7.44, el pH se ajustó con hidróxido de sodio y se verificó con un potenciómetro. Para los experimentos realizados se utilizó a una concentración final de 6.4 a 6.9.

Se realizó una solución madre (50 mg/mL) de lisozima humana, en amortiguador de fosfatos 20 mM a un pH de 7.44, y de allí se tomaron alícuotas para lograr cada una de las concentraciones de los experimentos.

Formación de fibras amiloides a diferentes concentraciones

Se evaluaron por triplicado las siguientes concentraciones de lisozima: 2, 3.12, 6.35, 12.5, 25, 50 mg/mL. En una placa Costar de 96 pozos con tapa translúcida, se adicionó ThT suficiente para tener una concentración final de 66 μ M, en un volumen final de 300 μ L. La placa se selló con parafilm y se incubó a 37 °C durante al menos 48 horas en un lector de placas (Synergy H1 BioTek) en ausencia de agitación. Las lecturas de fluorescencia se realizaron desde la parte superior del pozo cada diez minutos empleando una longitud de onda de excitación y emisión de 450 y 490 nm, respectivamente. Con los datos obtenidos se graficó la intensidad de la fluorescencia en función del tiempo.

Inhibición

Los compuestos fenólicos se probaron en relación 1:1 molar con la lisozima, también se adicionó ThT a una concentración final de 66 μ M. Esto se realizó en placas de 96 pozos de 300 μ L con tapa translúcida, la cual se selló y se incubó a 37°C durante al menos 48 horas en un lector de placas (Synergy H1 BioTek) en ausencia de agitación. Las lecturas de fluorescencia se realizaron desde la parte superior del pozo cada diez minutos empleando una longitud de onda de excitación y emisión de 450 y 490 nm, respectivamente. Con los datos obtenidos se graficó la intensidad de fluorescencia en función del tiempo.

Desnaturalización con urea

Las cinéticas de desnaturalización de la lisozima (25 mg/mL) en presencia de urea (6.4 – 6.9 M), se realizaron en celdas de cuarzo con un 1 cm de paso de luz y con

agitación, los experimentos se siguieron en un espectrofluorómetro ChronosBH al determinar el cambio en la fluorescencia intrínseca utilizando una longitud de onda de 295 nm para la excitación y 334 nm para la emisión (máximo de la lisozima nativa), durante 2 horas. Con los datos obtenidos se graficó la intensidad de fluorescencia en función del tiempo.

Desnaturalización por temperatura

Se utilizó lisozima a una concentración final de 25 mg/mL y se siguió la fluorescencia intrínseca a una longitud de onda de 295 nm y 334 nm para la emisión (máximo de la lisozima nativa), la velocidad de calentamiento fue de 1 °/min, en el intervalo de 25-55 °C. Estos experimentos también se realizaron en un espectrofluorómetro ChronosBH

Calorimetría de barrido diferencial (DSC)

Para determinar si la L-tirosina tiene un efecto de estabilización en el proceso de desplegamiento se realizó la DSC. Para esto se utilizó lisozima a una concentración final de 0.4 mg/mL y L-tirosina a 0.75 mM, el experimento se realizó por triplicado, en un intervalo de temperaturas de 10 a 90°C, y a una velocidad de calentamiento de 1 °/min. Estos experimentos se llevaron a cabo en un microcalorímetro automatizado (MicroCal VP-Capillary DSC), el análisis de los datos y gráficos se realizó con el paquete MicroCalAnalysis perteneciente al programa Origin versión 7. Con este mismo paquete se probó el ajuste de un solo estado y el de más de dos estados.

Desnaturalización de lisozima por método computacional

Para simular la desnaturalización de la lisozima de humano se utilizó el archivo del Protein Data Bank (PDB) con código de identificación 3FE0. Ésta estructura se utilizó inicialmente como coordenadas de la lisozima humana, debido a que este

archivo contiene la lisozima nativa sin modificaciones y con deuterio. Se eliminó el deuterio para que no afectara los parámetros óptimos para ser utilizada en MOE. El campo de fuerza utilizado fue CHARMM27 para todos los experimentos computacionales. Para simular la desnaturalización de la lisozima se optó por un procedimiento nuevo, que consiste en la expansión de todos los átomos de 3FE0 en todas las direcciones, al multiplicar las coordenadas del sistema molecular por un factor mayor a 1. Esta estructura expandida es entonces sujeta a una minimización de energía, con la finalidad de restablecer los enlaces débiles de la estructura. Este proceso de expansión y minimización se repite por un número de ciclos deseados.

En este trabajo el factor de expansión fue de 1.085 a 1.105 y la minimización fue de 0.05 esto durante 100 ciclos, por cada simulación correspondiente a un factor de expansión por los 100 ciclos se le denominó corrida. Cada corrida fue por duplicado y en algunos casos triplicado.

Selección de ciclos

De cada corrida se seleccionó un ciclo para realizar el proceso de docking. El ciclo se seleccionó con base en el análisis de los parámetros de interés, es decir, al observar algún cambio en las diferentes características (energía, radio de giro, energía de solvatación y estructura secundaria) que se obtuvieron. El cambio que se buscó fue respecto al comportamiento en el curso de los ciclos, se buscaron ciclos en los que hubiera cambios abruptos, como lo es el cambio de pendiente en el comportamiento de las características en las corridas. La otra pauta es que el ciclo seleccionado esté presente en estos cambios en todas las características que se analizaron.

Análisis del cambio en la estructura secundaria

Para verificar los cambios que sufre la lisozima en la estructura secundaria a través de los ciclos de cada corrida. Se realizó un análisis que se llevó a cabo en el programa VMD, donde se utilizó cada una de las corridas obtenidas de la simulación de desnaturalización y con la función timeline se analizó el cambio de la estructura secundaria de la lisozima en todos los ciclos de la corrida.

Docking de L-tirosina sobre lisozima

Para simular el acoplamiento molecular de la lisozima con L-tirosina, el primer paso que se realizó fue crear el compuesto en el mismo programa (MOE) con la opción de builder, se le asignaron las cargas correctas y se minimizó. Para realizar un estudio apropiado se realizó una búsqueda sistemática con un gradiente de 0.01 de RMS y una distancia de 0.1 en la minimización, y se obtuvieron 10 confórmeros.

Para el docking se utilizó como receptor (lugar a donde se puede unir el compuesto) todos los átomos de la lisozima seleccionada. Para el ligando se utilizaron los 10 confórmeros de la L-tirosina. En el proceso de docking se seleccionó triangulo alfa como sitios de prueba el compuesto, como función de puntaje se utilizó London dG y como refinamiento el campo de fuerza (CHARMM27) y se obtuvieron 30 resultados de cada corrida de docking.

Efecto de la L-tirosina en la simulación del desplegamiento de la lisozima

Para observar el efecto de la L-tirosina en la lisozima, se realizó una nueva corrida de desnaturalización (con los parámetros anteriormente descritos). Se utilizó como estructura inicial (lisozima y L-tirosina) el mejor resultado del docking. El efecto del compuesto se evaluó en la afectación de las características: energía y radio de giro conforme avanzan los ciclos. Se comparó con el resultado obtenido de su equivalente sin el compuesto (L-Tyr).

Resultados y discusión

La parte primordial de este trabajo fue establecer que la lisozima humana es capaz de formar fibras amiloides a pH fisiológico y que la formación estas se pueden inhibir. Por lo que se llevó a cabo experimentos para establecer las condiciones de estos fenómenos. Obteniendo como resultado la siguiente sección.

Formación de fibras amiloides

Los resultados obtenidos indican que solo con el aumento en la concentración de lisozima, una incubación a temperatura constante (37°C) durante al menos 24 horas y a pH fisiológico (7.44) es posible obtener fibras amiloides, esto es observado a partir del aumento en la intensidad de fluorescencia del ThT (molécula sonda que cumple la función de indicar la presencia de dichas fibras) así como por la formación de precipitados en las placas (12).

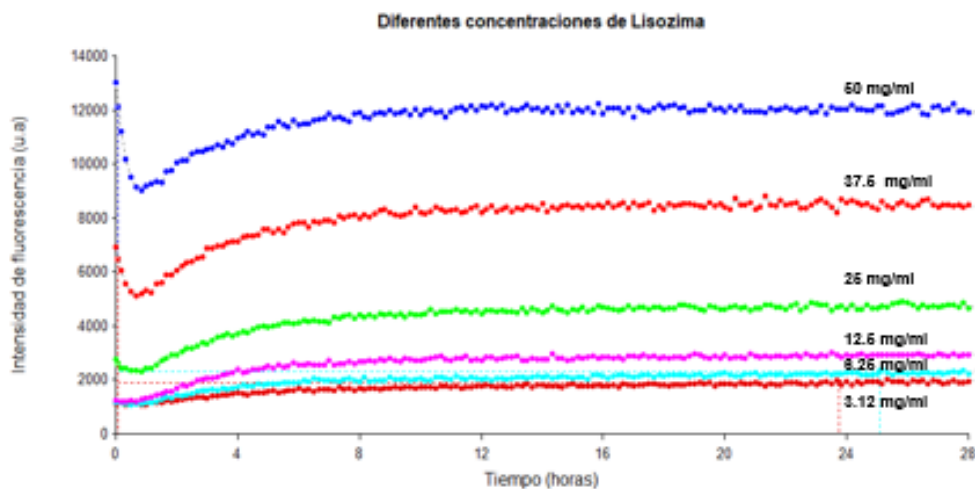


Figura 5. Formación de fibras amiloides a diferentes concentraciones de lisozima.

En la figura 5 se observa que hay un aumento en la intensidad de fluorescencia correspondiente al incremento en la concentración inicial de la lisozima, yendo desde 3.12 mg/mL (puntos rojos oscuros) hasta 50 mg/mL (puntos azules),

pasando de 1,700 cuentas hasta las 12,000 cuentas. Esto podría sugerir que es un proceso dependiente de concentración [16].

De estas concentraciones se seleccionó 25 mg/mL como la indicada para seguir con los experimentos, debido a que presenta un número de cuentas elevado y la concentración de la lisozima para preparar la solución no es muy alta (no es una solución saturada, ya que el límite de su solubilidad en agua es de 30 mg/mL). Esto ayuda a descartar que los precipitados sean por la concentración inicial de la lisozima y facilita su preparación.

Inhibición de fibras amiloides por compuestos fenólicos

Una vez establecidas las condiciones para la formación de las fibras amiloides, el siguiente paso fue probar si existe una inhibición de la fibrillogénesis ocasionada por la adición de compuestos fenólicos, que anteriormente se han reportado que tienen un efecto inhibitorio bajo diferentes condiciones tanto en lisozima de humano como huevo de pollo [17,18].

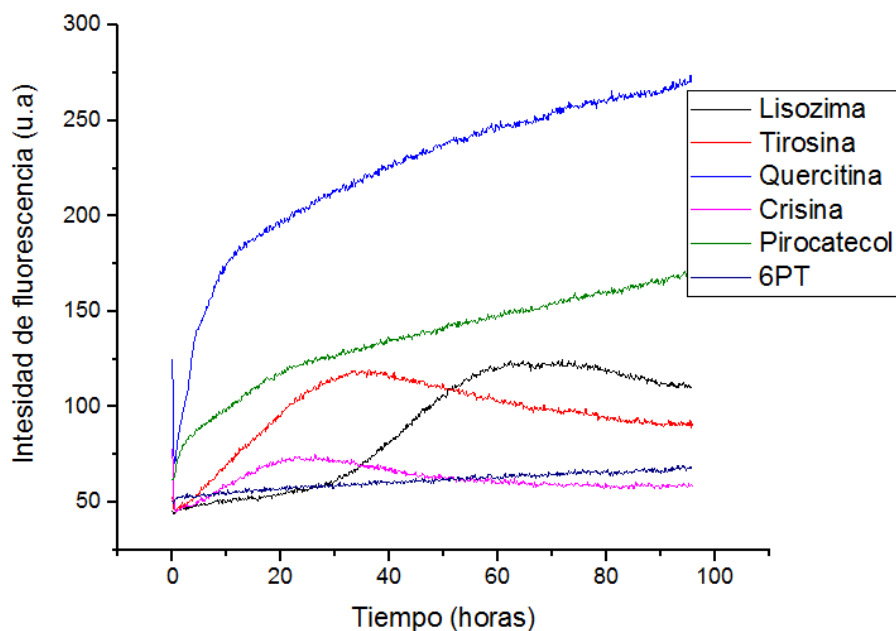


Figura 6. Efecto de los compuestos fenólicos en la formación de fibras amiloides de Lisozima, negro (Sin compuesto), rojo (L-tirosina), azul (quercitina), rosa (crisina), verde (pirocatecol) y azul marino (6-p-toluidino). Relación molar 1:1 (lisozima: compuesto).

Como resultado se obtuvo que no todos los compuestos fenólicos tienen el mismo efecto como se observa en la figura 6, algunos como la quercitina (línea azul) y el pirocatecol (línea verde) aumentan y aceleran la formación de fibras amiloides. Esto indicado por el aumento de la intensidad de fluorescencia del ThT, por encima de la intensidad mostrada por la lisozima sin compuesto (línea negra). Otros disminuyen o inhiben la formación de las fibras como la L-tirosina (línea roja), la crisina (línea rosa) y el 6PT (línea azul marino), esto se observa en la disminución de las cuentas y en la desaparición o disminución de la curva característica de la fibrillogénesis [19].

Los efectos ocasionados por los compuestos fenólicos (observados en la figura 6), pueden deberse a los anillos fenoles que estos compuestos tienen. La diferencia entre aumentar la formación o disminuirla está relacionada con las características de cada compuesto como lo son sus grupos funcionales o la cantidad de anillos fenoles como se ha reportado en algunos artículos [20,21], en otros trabajos se relaciona la actividad directamente con el número de grupos hidroxilo que contienen los compuestos [22], lo encontrado en este trabajo es que no existe una sola característica que defina el poder inhibitorio de los compuestos, ya que la variedad química de los compuestos utilizados no permiten dar una conclusión a esta pregunta.

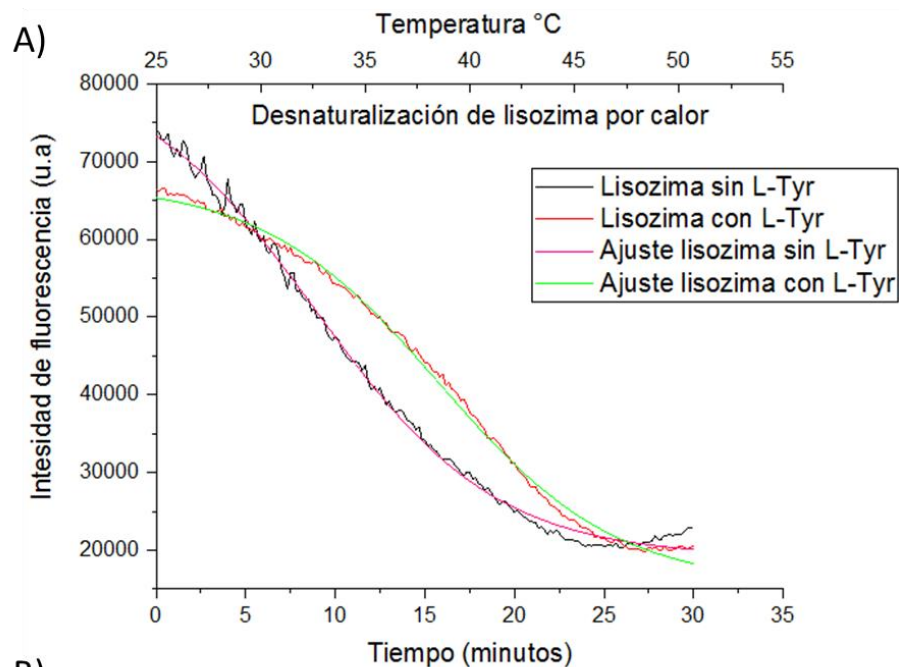
De los compuestos fenólicos con poder inhibitorio se eligió la L-tirosina para continuar con el presente trabajo, la crisina se descartó debido a que se disuelve en etanol y el incremento en la concentración de este alcohol causa un aumento en la formación de fibras. El 6PT no presentó repetibilidad en los diversos experimentos que se realizaron por lo que se descartó.

Estabilidad de lisozima

Una vez ya demostrado que se podían formar fibras amiloides a pH fisiológico y que se podía inhibir la formación de estas, mediante el uso de L-tyr. Se decidió probar si el compuesto tenía un efecto estabilizante en la proteína. Para esto se realizó una prueba de desnaturalización por calor. Utilizando la fluorescencia intrínseca de la lisozima, para seguir el fenómeno de interés. Los resultado se muestran a continuación

Desnaturalización por calor

Se realizaron pruebas de estabilidad de la lisozima en presencia y ausencia del compuesto L-tirosina, con la intención de probar si hay un efecto de estabilización causado por la L-tirosina en la lisozima plegada o en algún intermediario que tenga por efecto la inhibición en la formación de las fibras amiloides.



B)

Modelo	Boltzmann	
Ecuación	$y = A2 + (A1-A2)/(1 + \exp((x-x0)/dx))$	
Gráfica	Lisozima sin L-Tyr	Lisozima con L-Tyr
A1	82547.12 ± 1013.6	67347.77 ± 322.9
A2	19154.75 ± 264.52	15510.27 ± 384.0
x0	8.90 ± 0.17	15.81 ± 0.09
dx	5.04 ± 0.12	4.93 ± 0.10
R ²	0.99	0.99

Figura 7. Gráfica del proceso de desnaturalización por temperatura de la lisozima, seguido por la fluorescencia intrínseca. A) Gráfica del proceso y sus ajustes. B) Tabla con los parámetros obtenidos del ajuste Boltzmann.

Para este experimento se utilizó como método de detección de la fluorescencia intrínseca en lugar de la ThT debido a que el ThT solo sirve para detección de fibras amiloides. En estos experimentos se analiza la desnaturalización de la lisozima, por lo que se descarta el uso de ThT.

El primer agente de desnaturalización que se utilizó fue la temperatura. Como resultado del experimento se obtuvo la figura 7. Donde se observan los dos comportamientos obtenidos figura 7A, el de la lisozima sin L-Tyr (color negro) y la lisozima con L-Tyr (color rojo). Para poder analizar y comparar estos datos se realizó un ajuste con el modelo de Boltzmann, con la finalidad de comparar los parámetros, como el centro (x_0) y la constante de tiempo (dx) que se muestran en la tabla de la figura 7B. El ajuste obtuvo un coeficiente de determinación (r^2) de 0.996 para la lisozima sin L-Tyr y una $r^2= 0.997$ para la lisozima con L-Tyr, por lo que se considera que fue un buen ajuste.

Para analizar si hubo una diferencia real entre los dos comportamientos es necesario comparar los parámetros obtenidos de los ajustes realizados. Los parámetros por considerar son dx que se refiere a la constante de tiempo y x_0 que es el punto medio (referente a concentración) o centro [23]. Al comparar los valores de dx se puede apreciar que son casi iguales. Lisozima sin L-Tyr tiene una $x_0=5.04$ y lisozima con L-Tyr $x_0=4.93$, lo que se interpreta como el tiempo en que la proteína pasa del estado nativo al desnaturalizado es el mismo en los dos casos; al ser una cinética de desnaturalización esta constante de tiempo puede ser asumida como una constante de velocidad. Por lo que se puede decir que la n no afecta la velocidad de este proceso. Al analizar el valor de x_0 se puede observar que para la lisozima sin L-Tyr se encuentra a los 9 minutos y para la lisozima con L-Tyr se encuentra a

los 16 minutos. Lo que se interpreta como que a los 9 minutos sin L-Tyr solo se detecta la mitad de la fluorescencia intrínseca del proceso de desnaturalización, mientras que con L-Tyr esto ocurre a los 16 minutos.

Lo descrito significa que el proceso de desnaturalización de lisozima por calor no se ve afectado en su velocidad por la presencia de L-Tyr, pero este proceso no es igual en los dos casos, mientras en el primer escenario (lisozima sin L-Tyr) el inicio es más rápido ($x_0=9$) y después se va alentando, el segundo escenario (lisozima con L-Tyr) es lo contrario, el comienzo es más lento ($x_0=16$) después es más rápido. Esto se observa en la gráfica de la figura 7.

Modelo	Boltzmann	
Ecuación	$y = A2 + (A1-A2)/(1 + \exp((x-x_0)/dx))$	
Gráfica	Lisozima sin L-Tyr	Lisozima con L-Tyr
A1	82547.15 ± 1013.63	67347.53 ± 322.99
A2	19154.67 ± 264.53	15510.46 ± 384.00
x_0	33.90 ± 0.17	40.81 ± 0.09
dx	5.04 ± 0.12	4.93 ± 0.10
R^2	0.99	0.99

Tabla 1. Recuadro de los parámetros obtenidos del ajuste de Boltzmann, respecto a la temperatura.

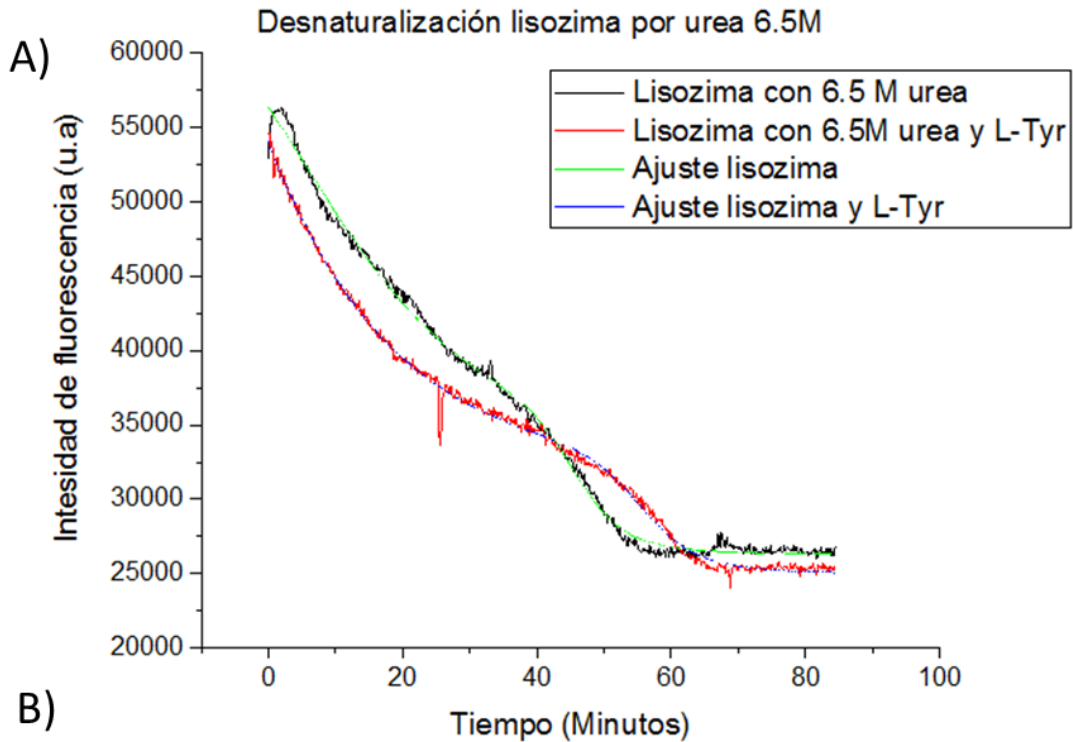
Se realizó otro ajuste para conocer el comportamiento del ajuste anterior, cuando se hace respecto a la temperatura y no al tiempo. Lo obtenido de dicho proceso se muestra en la tabla 1. El resultado indica que hay una diferencia en el valor de x_0 la cual ahora está en función de la temperatura. De esto se obtiene que la lisozima sin L-Tyr alcanza la mitad de la fluorescencia registrada a una temperatura de 33°C, mientras que con L-Tyr este registro se alcanza a los 40°C. Esto significa que se alcanzan la mitad de la concentración de especies que presentan esta fluorescencia intrínseca a mayor temperatura, cuando está presente la L-Tyr, lo que da indicios de que dicho compuesto tiene un efecto que estabiliza el proceso de estudio. Estas

temperaturas no son necesariamente iguales a las que se pueden obtener por calorimetría diferencial de barrido, ya que se siguen diferentes fenómenos por lo tanto no son comparativas, esto se discutirá más adelante en la sección de DSC.

Para darle una interpretación biológica a los resultados obtenidos, es necesario observar la figura 7A donde se aprecia una diferencia notable en la gráfica entre la lisozima con L-Tyr y sin L-Tyr cuando vemos los puntos que representan x_0 , tanto cuando se ve observa por temperatura o tiempo. Esta diferencia indica que hay un efecto del compuesto analizado sobre la lisozima en estos puntos. Esta diferencia en la fluorescencia al seguir un proceso de desnaturalización se ha interpretado como una diferencia en el proceso de desplegamiento [24] [25]. Teniendo esto en cuenta esto se puede inferir que la L-Tyr afecta este proceso, pero no el tiempo en el que éste se lleva a cabo.

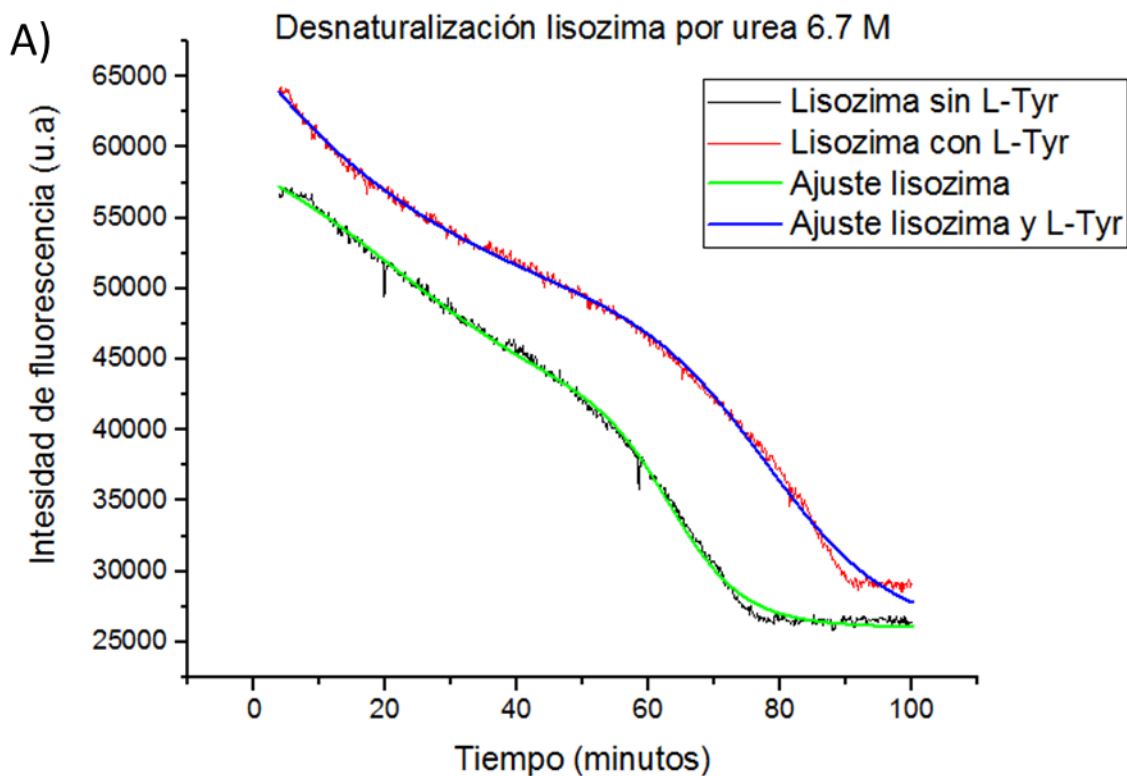
Desnaturalización por urea

Para estudiar el efecto protector de la L-tirosina, se decidió realizar otra prueba de desnaturalización, en esta ocasión por un agente químico, para observar si se presentaba y mantenía el mismo comportamiento. Por lo que se probó el efecto de la L-Tyr en la desnaturalización de la lisozima por el agente desnaturalizante urea. Se realizó con concentraciones que van de 6.4 M a 6.9 M y el proceso se siguió por fluorescencia intrínseca, con un longitud de onda de 295 nm para realizar la excitación y 334 nm para obtener la máxima emisión.



Modelo	BiDoseResp	
Ecuación	$y = A1 + (A2 - A1) \left[\frac{p}{1 + 10^{(LOGx01-x)h1}} + \frac{1-p}{1 + 10^{(LOGx02-x)h2}} \right]$	
Gráfica	Lisozima con 6.5 M urea	Lisozima con 6.5M urea y L-Tyr
A1	26235.78 ± 78.68	24874.59 ± 101.82
A2	70192.52 ± 2739.35	339261.90 ± 465653.09
LOGx01	5.40 ± 1.58	-45.09342 ± 32.73
LOGx02	45.57 ± 0.16	55.46 ± 0.16
h1	-0.03 ± 0.002	-0.02 ± 0.002
h2	-0.12 ± 0.008	-0.10 ± 0.006
p	0.80 ± 0.02	0.97 ± 0.03
R ²	0.99	0.99

Figura 8. Gráficas obtenidas de la desnaturalización de lisozima por urea a 6.7 M. A) Gráfica del proceso y sus ajustes. B) Tabla con los parámetros obtenidos del ajuste realizado.



B)

Modelo	BiDoseResp	
Ecuación	$y = A1 + (A2 - A1) \left[\frac{p}{1 + 10^{(\text{LOG}x01 - x)h1}} + \frac{1 - p}{1 + 10^{(\text{LOG}x02 - x)h2}} \right]$	
Gráfica	Lisozima sin L-Tyr	Lisozima con L-Tyr
A1	25960.23 ± 86.03	25112.75 ± 738.20
A2	62295.94 ± 1046.53	891963.72 ± 158598
LOGx01	21.08 ± 0.74	-117.93 ± 659.44
LOGx02	63.45 ± 0.15	78.31 ± 0.22
h1	-0.02 ± 0.002	-0.013 ± 0.006
h2	-0.08 ± 0.003	-0.04 ± 0.002
p	0.59 ± 0.03	0.97 ± 0.44
R ²	0.99	0.99

Figura 9. Gráficas obtenida de la desnaturalización de lisozima por urea a 6.7 M. A) Gráfica del proceso y sus ajustes. B) Tabla con los parámetros obtenidos del ajuste realizado.

Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 8 y 9, donde se muestran las gráficas y las tablas obtenidas del ajuste realizado al comportamiento de la lisozima en presencia de 6.5 y 6.7 M de urea, así como en ausencia y presencia de L-Tyr. El

ajuste que se realizó fue el de BiDoseResp con la finalidad de poder analizar los comportamientos obtenidos, ya que este tipo de ajuste permite obtener las pendientes del proceso que al ser cinético son de mucho interés [26].

Los resultados obtenidos indican que el ajuste utilizado fue bueno, ya que se obtuvo en todos una $r^2 > 0.997$ (Fig. 8B y 9B). En este ajuste la pendiente está dada por el valor de h y el valor del punto medio (referente a concentración) o centro está dada por LOGx .

Cuando la concentración de urea es de 6.5 M (figura 8) la lisozima sin L-Tyr, tiene una primera pendiente (h_1) de -0.035 ± 0.002 , una segunda (h_2) de -0.125 ± 0.008 y un valor de $\text{LOGx} = 45$ (punto medio). Cuando se encuentra presente la L-Tyr la primera pendiente es de -0.0247 ± 0.002 , la segunda pendiente de -0.109 ± 0.006 y un valor de $\text{LOGx} = 55$ esto se observa en la figura 8B. En cambio, cuando la urea tiene una concentración de 6.7M (Fig. 9) la lisozima sin L-Tyr tiene una primera pendiente de -0.029 ± 0.002 , una segunda de -0.080 ± 0.003 y un valor de $\text{LOGx} = 63$. Por otro lado, cuando está presente la L-Tyr la primera pendiente es de -0.013 ± 0.006 , la segunda de -0.047 ± 0.002 y un valor de $\text{LOGx} = 78$ (datos extraídos de la tabla de la figura 9B).

Al analizar los datos obtenidos de las dos condiciones. En el caso que la urea tiene una concentración de 6.5 M, se puede apreciar que las dos pendientes son mayores cuando no hay presencia de L-Tyr que cuando está presente, esto indica que el proceso es más lento, la diferencia en los valores es baja (entre las pendientes con y en ausencia de L-Tyr). En cambio, el valor de LOGx indica que el proceso es diferente ya que en ausencia de L-Tyr se llega a los 45 minutos a este parámetro, mientras que la presencia de L-Tyr ocasiona que sea a los 55 minutos que se alcanza, este parámetro indica la concentración media (es decir que en presencia del compuesto tarda 10 minutos más en llegar a la mitad de la concentración de especies).

Cuando la concentración de urea es de 6.7 M (Fig. 9), ocurre exactamente lo mismo que cuando la concentración es de 6.5 M (Fig. 8). Las pendientes en presencia de L-Tyr son menores a las que se presentan cuando hay una ausencia de L-Tyr en el experimento y el valor de LOGx02 es notablemente mayor cuando se ve involucrado la L-Tyr en los experimentos.

Comparando estos resultados se puede apreciar que la L-Tyr tiene un efecto en el proceso de desplegamiento por urea, primero haciendo este proceso más lento (diferentes pendientes) y el más notable es que aumenta el tiempo requerido para llegar a la mitad de la fluorescencia de la segunda etapa. Una de las interpretaciones es que esto sucede debido a que la L-Tyr estabiliza alguna estructura intermediaria en el proceso de desplegamiento que sufre la lisozima.

Al analizar los resultados obtenidos de la desnaturalización por un agente químico (urea) y calor, se puede observar e interpretar que la L-Tyr tiene un efecto en el proceso estudiado, se propone que es de estabilizador. Debido a que en ambos escenarios se observa que hay una diferencia en los tiempos analizados. Siendo mayores los obtenidos en presencia de la L-Tyr y esto se observa en sus gráficas correspondientes. Esto es más evidente cuando se observa el punto que hace referencia a la concentración media. Esta diferencia es interpretada como una diferencia en el proceso del desplegamiento, debido a que se está siguiendo la fluorescencia intrínseca de la proteína y por las longitudes de onda utilizadas, solo se observa al triptófano. Por lo que una interferencia en la fluorescencia registrada causada por la propia capacidad de la L-tyr de fluorescer queda descartada, pues la longitud de onda utilizada no excita al compuesto [27][28]. Esto nos lleva a concluir que el fenómeno observado se debe a la presencia de la L-Tyr y al ser un aumento en los tiempos y no una disminución se asocia con una estabilización del proceso.

Calorimetría DSC

Para determinar si existe un cambio evidente en la lisozima por la L-Tyr se realizó la calorimetría diferencial de barrido, donde se busca definir si el compuesto adicionado es capaz de modificar la T_m de la proteína y/o su capacidad calorífica (C_p). Lo que da evidencia si es que hay algún efecto en la lisozima provocado por la ausencia o presencia de la L-Tyr.

Los resultados obtenidos (figura 10) de las dos condiciones en las que se realizó el experimento fueron los siguientes: una T_m de 69.5 para la lisozima en ausencia de L-Tyr y en presencia de L-Tyr este valor es de 69.6, en cuanto al C_p se encontró que en ausencia del compuesto este es de 10,000 cal/mol/°C y cuando se adiciona la L-Tyr es de 12,000 cal/mol/°C. En lo referente al ajuste para dilucidar los estados, se encontró que el modelo de dos estados no es óptimo para ninguna de las condiciones, lo que significa que no es un proceso simple donde solo se pasa de nativa (N) a desnaturalizada (D). El modelo de más de dos estados funciona bien para la lisozima sin L-Tyr, esto indica que el proceso de estudio presenta algún intermediario estable termodinámicamente, esto se atribuye a que ciertas regiones de la proteína se desnaturalizan independientemente unas de las otras, es decir la cooperatividad es baja. Para la lisozima con L-Tyr no funciona ninguno de los dos modelos, por lo que se propuso encontrar cual es el indicado, a la fecha de este trabajo no sea encontrado por lo que queda a un próximo desarrollo.

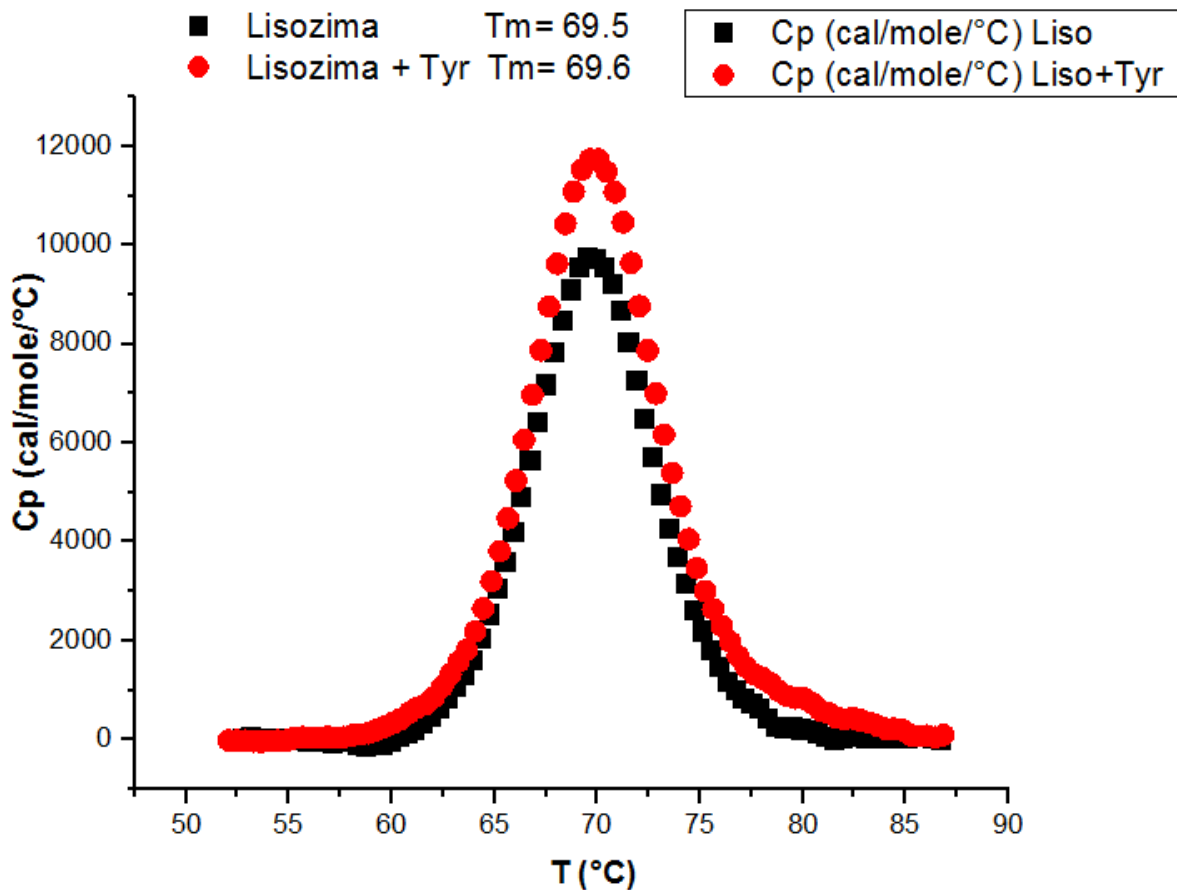


Figura 10. Grafica del DSC. Lisozima con L-Tyr (puntos rojos), lisozima sin L-Tyr (puntos negros).

Para analizar los datos obtenidos del experimento es necesario comparar los resultados, donde vemos que la T_m en ambos casos es muy similar, variando solo en 0.1, lo que nos indica que en las dos condiciones no hay una diferencia significativa en este parámetro, por lo que la L-Tyr no tiene ningún efecto en este apartado. En cambio, cuando se revisa el C_p de las T_m , se aprecia que hay una diferencia de 2,000 cal/mol/°C a favor de la lisozima con L-Tyr. Esto se interpreta como un aumento considerable en la C_p , que significa que cuando la L-Tyr está presente se necesita una mayor energía para hacer que aumente un grado la temperatura lo que habla acerca del aumento de estabilidad de la proteína [29] [30]. Los resultados de la DSC indican un aumento considerable la capacidad calorífica de la lisozima cuando está presente la L-Tyr, esto sumando a los resultados anteriores de las desnaturalizaciones seguidas por fluorescencia intrínseca indica

que existe una estabilización de la proteína por el compuesto [31][28]. Después de estas evidencias surge la pregunta ¿en qué parte del proceso se estabiliza la lisozima y dónde ocurre esta estabilización? Por lo que se busca resolver esta duda mediante el uso de la bioinformática como ya se ha realizado en otros estudios [32] y que se presenta en siguiente sección.

Simulación del despliegamiento de la lisozima

En lo referente a la simulación, se realizaron simulaciones con un factor de expansión de 0.85 hasta 1.105, las cuales se analizaron como se describió en la metodología. De este proceso se obtuvieron diferentes ciclos que presentaron las mejores características descritas en metodología, como se observa en la tabla 2.

Corrida	Ciclos de interés
1.095a	40
1.095b	25-35
1.095c	25-27
1.1a	18-26
1.1b	7-10
1.105	4-6

Tabla 2. Ciclos de interés correspondientes a cada simulación.

En la tabla 2 se muestran los diferentes ciclos seleccionados de cada corrida, donde se aprecia que en algunos casos a pesar de ser corridas con el mismo factor de expansión no son exactamente los mismos ciclos seleccionados. Esto se debe a que el proceso al ser repetido no arroja necesariamente los mismos resultados, pero si se mantiene el comportamiento general. Por lo que los ciclos no son tan lejanos entre sí. Otra cosa que se observa es que a medida que aumenta el factor de expansión el ciclo de interés es más cercano al inicial, esto se explica debido a que

el incremento que parece ser poco tiene un gran efecto a la hora de expandir las coordenadas, que es suficiente para causar que la proteína se despliegue más rápidamente, o sea, ocurren cambios abruptos en los primeros ciclos de la simulación.

La estructura obtenida de 3FEO correspondiente a una lisozima humana nativa (figura 11). Es una proteína de una sola cadena, la cual presenta una hoja beta compuesta de tres hebras (en color amarillo). También tiene dos dominios de hélices alfa, los cuales tiene un total de siete hélices (en color rojo).

En la figura 11 se observa la diferencia entre la lisozima normal obtenida de 3FEO (imagen de la izquierda) y una obtenida de una corrida donde ya pasaron 7 ciclos de expansión y minimización por un factor de 1.1. Al comparar a) y b) se puede observar que hay una apertura en la proteína, esto ejemplificado por la línea naranja presente en ambas imágenes, la cual permite observar el efecto de los ciclos sobre la proteína y cómo éste, va simulando el desplegamiento.

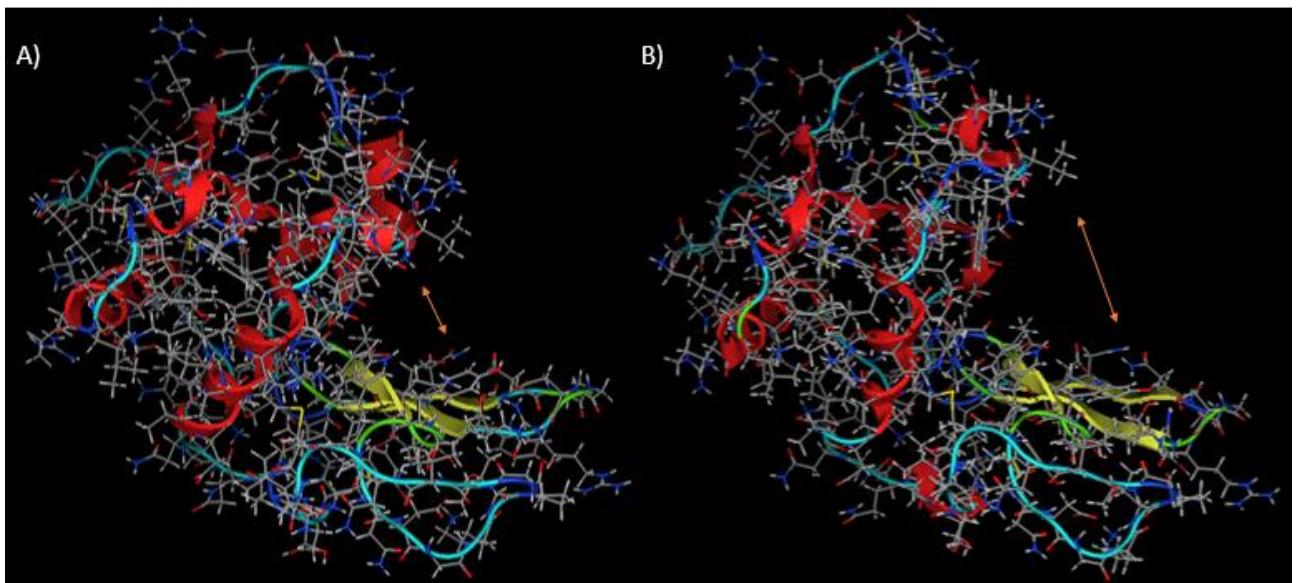


Figura 11. Diferencia entre la lisozima de inicio y la seleccionada de las corridas realizadas.

A) Lisozima obtenida de 3FEO B) Lisozima del ciclo 7 de la corrida 1.1B.

Al analizar esta comparación que ejemplifica todo el proceso realizado, se puede decir que la apertura de la proteína ocurre en el distanciamiento de la hoja beta y

un dominio de las hélices alfa y no entre los dominios de las hélices. Por lo que este resultado sugiere que la zona con interacciones más débiles y susceptibles a cambios es está.

Esta nueva metodología logra simular el desplegamiento en las primeras fases y muestra los diferentes caminos que este proceso puede tener, pues los ciclos van abriendo la proteína en los lugares con las interacciones más débiles y debido a que es secuencial se ve afectado ampliamente por el factor de expansión y se pueden obtener diferentes formas (ciclos) del desplegamiento en diferentes pasos que permiten un estudio más detallado.

Docking

El proceso de docking con la L-Tyr se realizó con la lisozima obtenida de 3FE0 y todos los ciclos de interés mostrados en la tabla 2, como se describe en la metodología.

De dicha metodología se obtuvo que el ciclo con mejores resultados (es decir las estructuras del docking con la mejor energía) es el correspondiente al número 7 de la corrida 1.1b, que se muestra en la figura 12 y tiene la unión de L-Tyr en dos sitios diferentes, así como su energía correspondiente.

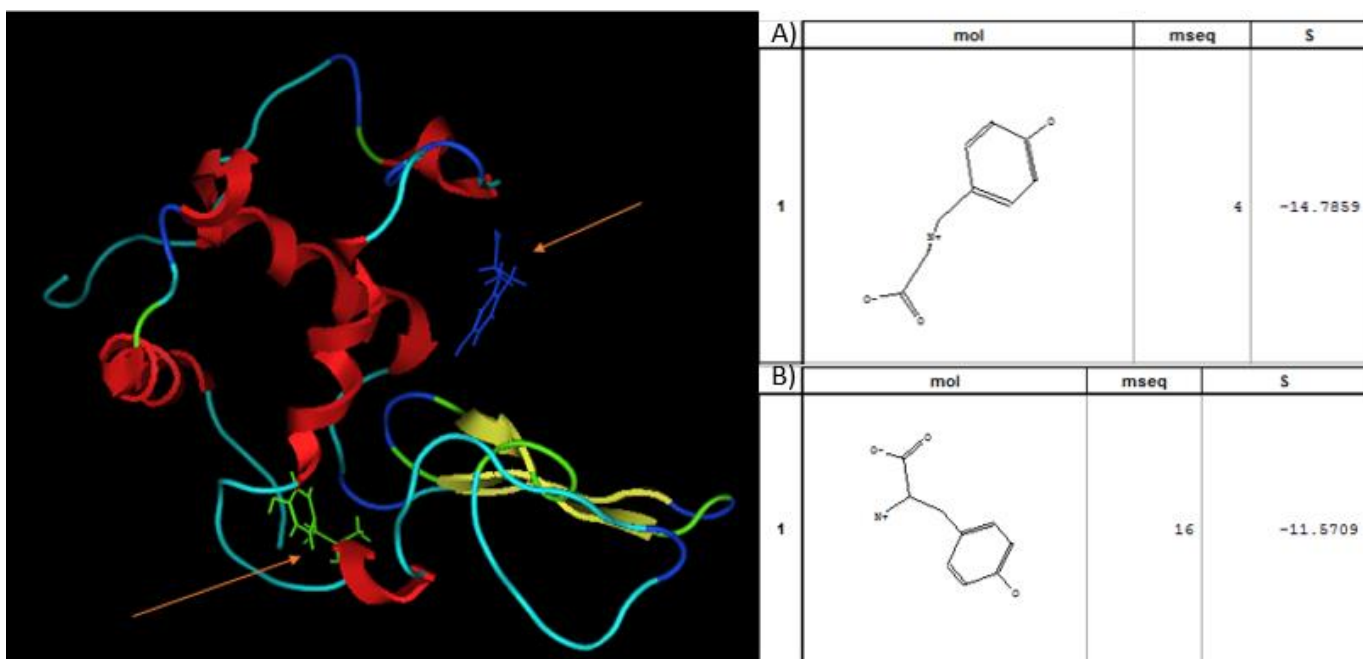


Figura 12. Estructura de la lisozima resultante del ciclo 7 de la corrida 1.1b con el docking correspondiente a las dos L-Tyr y los paneles de los resultados de éstas, (mol es la molécula, mseq es el número de confórmero y S la energía). A) L-tirosina correspondiente al mejor resultado en primer proceso de docking en color verde. B) L-tirosina correspondiente al mejor resultado del segundo proceso de docking en color azul.

En la figura 12 se observa el mejor resultado obtenido, debido a que es el que presenta las mejores energías de las diferentes poses de L-tirosina sobre el receptor (lisozima parcialmente desplegada). Se puede apreciar que la primera lisozima (en color verde) mostrada en el inciso A, obtuvo una energía de -14.7889 que fue la mejor de todos los ciclos que se sometieron al docking y corresponde al confórmero número 4 (mseq) de la L-Tyr. Esta tiene la particularidad de que se une a un sitio que normalmente no existe y solo se genera al sufrir el proceso de desplegamiento como se observa en la figura 13.

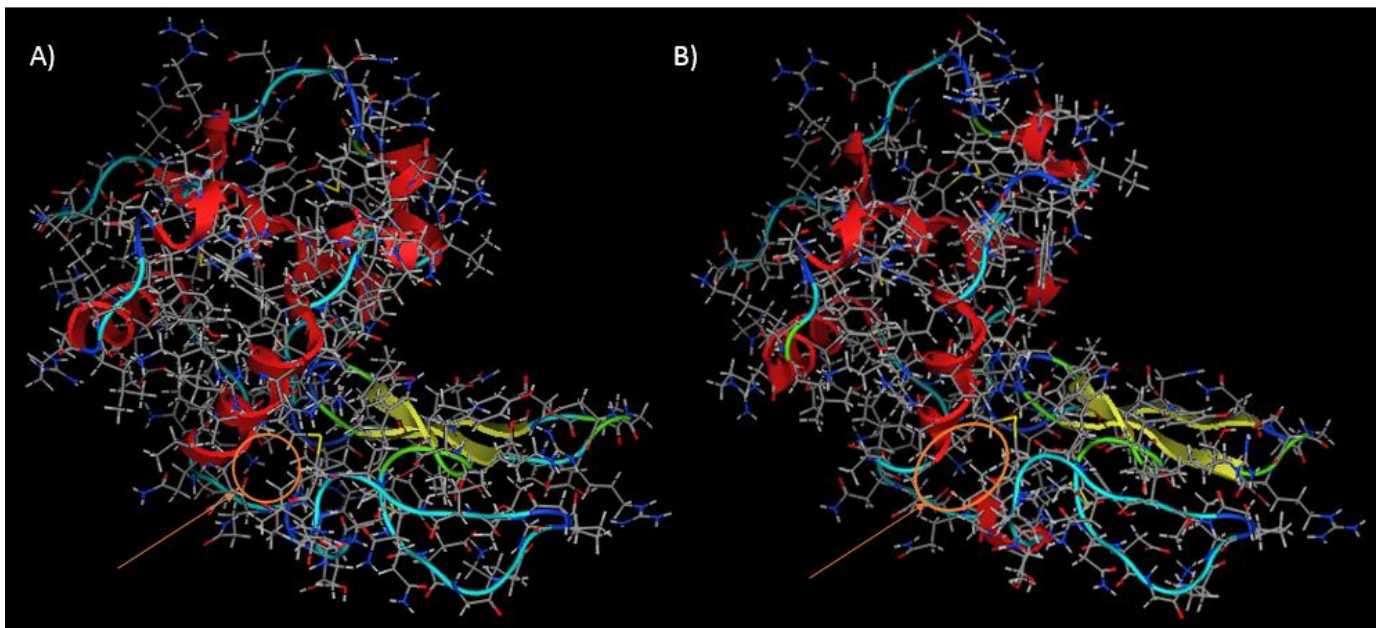


Figura 13. Generación de la concavidad que permite la unión de la L-Tyr señalada por la flecha y círculo naranja A) Lisozima sin modificaciones (3FEO), B) Lisozima del ciclo 7 de la corrida 1.1B.

En la figura 13 se observa que la lisozima original (3FEO) no presenta el sitio en el cual se une la L-Tyr, esto es denotado por el círculo y flecha naranja presente en A), donde se aprecia que el espacio es muy pequeño y la zona está compactada, lo que impide la entrada del compuesto. Al comparar esta zona con la marcada en B) se ve una diferencia notable en el espacio que se generó después de 7 ciclos de expansión con un factor de 1.1. Esta apertura de la zona es el que genera el sitio de unión para la L-Tyr y que a través del procedimiento de docking da el mejor resultado. Lo que significa que es necesario el desplegamiento de la proteína para generar un intermediario que sea capaz de tener este sitio de unión con la L-Tyr.

Por otro lado, la segunda L-Tyr (Fig. 12 A, en color azul), tiene una energía de -11.57 es el conformero número 16. El sitio donde se une es un lugar común (siempre se une ahí sin importar el conformero), el cual siempre está presente independientemente del estado de la lisozima y donde normalmente se une la L-Tyr y solo fluctúa la energía con la que lo hace.

Al comparar las energías de ambas L-Tyr se observa que la de la primera es más favorable, lo que indica que su unión a ese sitio se prioriza sobre el sitio de unión de la segunda L-Tyr. De este resultado también se deduce que este sitio solo puede ser ocupado por una molécula, debido que al agregar otra, esta cambia completamente de sitio, a uno mucho más genérico, es decir un lugar en la que la L-Tyr se une con menor energía. Lo que da indicios de la especificidad que tiene.

Dado que el resultado con mejores energías se obtuvo en una lisozima desplegada, se puede inferir que L-Tyr tiene una interacción mayor con la lisozima cuando ésta se encuentra en algún intermedio del desplegamiento, que por medio de este trabajo se propone que es el mostrado en la figura 12. A esta evidencia también se le suma que el mejor sitio de unión de la L-Tyr solo se genera cuando la lisozima se despliega. Lo que fortalece la idea de que la inhibición de las fibras amiloides se lleva a cabo por la estabilización del intermedio propuesto.

Efecto de la L-tirosina en la simulación del desplegamiento

Para comprobar que la L-Tyr tiene un efecto de estabilizador en la lisozima que impide que se despliegue y forme fibras amiloides, es necesario repetir el proceso de simulación de desplegamiento sobre la lisozima. Esto no se lleva a cabo en la lisozima inicial, sino en la que se propuso como un intermedio (figura 12), debido a que es donde la L-Tyr tiene una mayor interacción con la proteína.

Como se describe en la metodología se comparó como cambian ciertos parámetros a través de los ciclos entre la lisozima sin L-Tyr y con L-Tyr. Se utilizó el factor de expansión de 1.095. Los resultados se muestran a continuación.

Ciclos vs energía

El primer parámetro por comparar es como cambia la energía cuando van pasando los ciclos. Como se muestra en la figura 14 la energía de la lisozima inicial está en

un intervalo de -3400 a -3100 y la de la lisozima del ciclo 7 con las dos L-Tyr está entre -1680 y -1580.

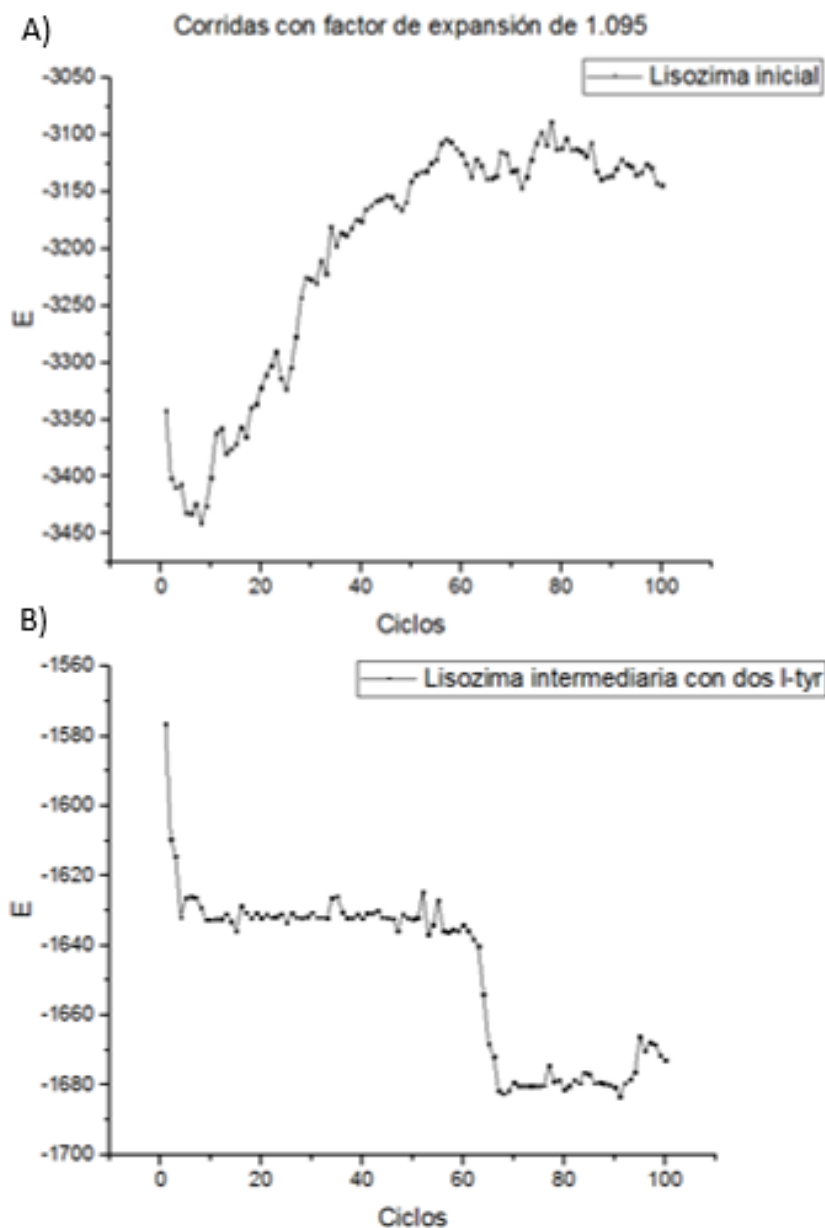


Figura 14. Comparación de los gráficos obtenidos de ciclos vs energía de las dos lisozimas sometidas a la simulación de desplegamiento. A) Gráfica correspondiente a la lisozima inicial (3FE0). B) Gráfica de la lisozima del ciclo 7 de la corrida 1.1b con la unión de las dos L-Tyr.

Como se observa en la figura 14 la escala de energía es diferente en las dos gráficas, esto se debe a que la del inciso A es de la lisozima inicial (ciclo 0), esto

quiere decir que es la que se obtiene del PBD y, por lo tanto, no ha sufrido ningún proceso, por lo que su energía será más negativa, pues se considera que está completamente plegada o nativa. Mientras que la del inciso B es una lisozima que ya sufrió 7 ciclos por un factor de 1.1 (correspondiente al ciclo 0) lo que da como resultado una proteína parcialmente desplegada como se muestra en la figura 11, por lo que es de esperar que su energía fuera diferente de la inicial.

Lo que aquí se analiza no es el intervalo de la energía en la que se encuentren, sino la variación de este parámetro y el comportamiento que esta tiene a lo largo de los 100 ciclos que conlleva la simulación de ciclos de compresión y expansión. Siguiendo esos puntos se puede observar que la variación en B es de 100 unidades y tiene una tendencia a ser más negativa, mientras que en A es de 300 unidades y tiene una tendencia a hacerse menos negativa. Esto significa que la lisozima parcialmente desplegada con dos L-Tyr es más resistente a los cambios ocasionados por el factor de expansión y tiende a hacerse más estable. Mientras que la lisozima inicial se ve más afectada por este proceso, ocasionando que la tendencia sea una pérdida de estabilidad mientras más avanzan los ciclos.

Debido a que la diferencia entre estos dos casos es la presencia de las dos moléculas de L-Tyr, se puede interpretar que la interacción de este compuesto con la lisozima parcialmente desplegada tiene un efecto estabilizador, pues impide que haya cambios abruptos y en cambio favorece la estabilidad del intermediario propuesto al aplicar el proceso de desplegamiento. Esta diferencia en la energía ya ha sido utilizada en para analizar el fenómeno del desplegamiento de las proteínas [33].

Ciclos vs radio de giro

El siguiente parámetro que se analizó fue el radio de giro (R_g), el cual se refiere al espacio que ocupa la proteína, entre más grande es el valor se considera que es mayor el estado de desplegamiento de la proteína [34]. Debido a que en este

proceso se abre, entonces ocupa un mayor espacio, lo que se ve reflejado en un aumento en el radio de giro.

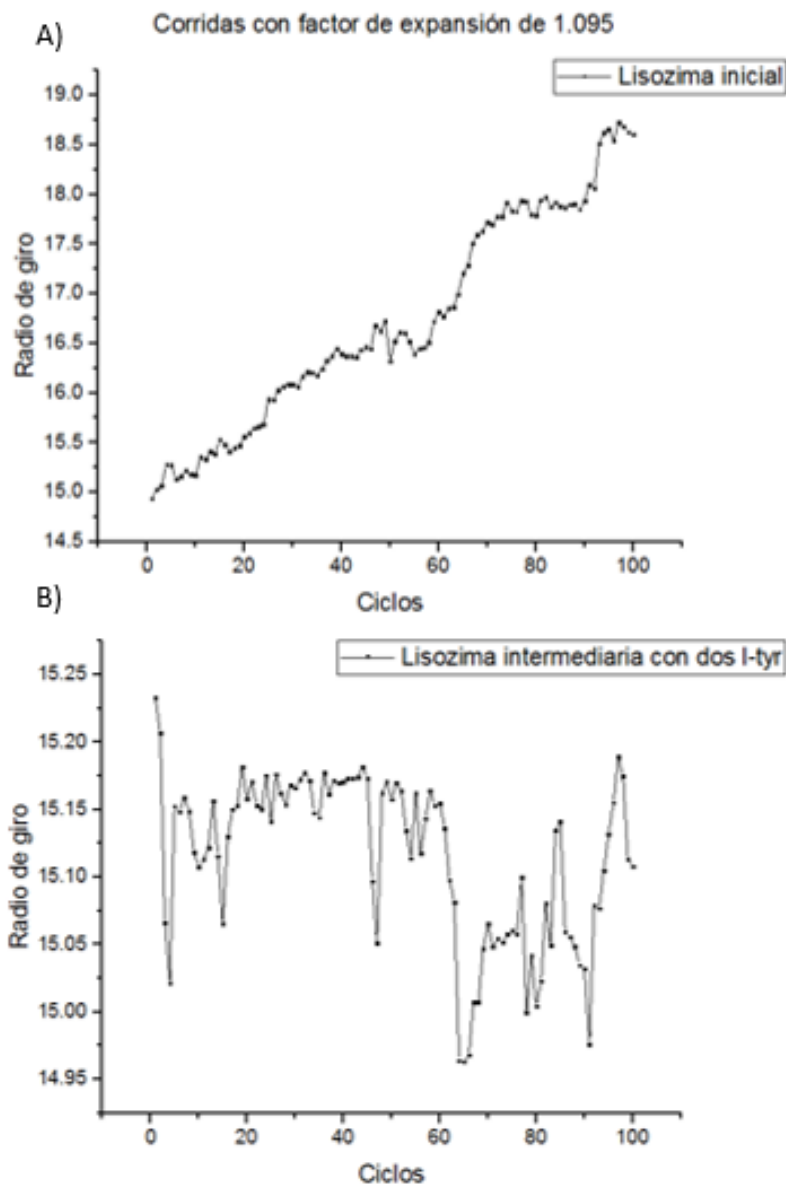


Figura 15. Comparación de los gráficos obtenidos de ciclos vs radio de giro de las dos lisozimas sometidas a la simulación de desplegamiento (factor de expansión 1.095). A) Gráfica correspondiente al cambio del radio de giro en los ciclos de lisozima inicial (3FEO). B) Gráfica de la lisozima del ciclo 7 de la corrida 1.1b con la unión de las dos L-Tyr.

De este parámetro se obtuvieron las gráficas mostradas en la figura 15. La figura A corresponde a la corrida de la lisozima inicial, aquí se obtuvo que el radio de giro

aumento de 15 a 19 Å y tiene una tendencia de seguir aumentando. Esto significa que hubo una variación de 4 unidades en toda la corrida.

La figura B corresponde a la corrida de la lisozima del ciclo 7 de la corrida 1.1b y que tiene las dos L-Tyr como se muestra en la figura 12. Después de someterla al proceso de desnaturalización se obtuvo que la variación en el radio de giro fue de 0.30 Å pasando por 15.25 como máximo y 14.95 como mínimo. No presenta una tendencia a aumentar o disminuir, se puede decir que se mantiene muy cercano al valor inicial. Lo que da indica que la presencia de la L-Tyr le brinda resistencia a la lisozima.

Al comparar los datos obtenidos de ambas gráficas se observa que el valor inicial es diferente en ambos casos, como en el parámetro anterior (energía), a que en la figura 15B los datos representados son de una lisozima que ya está parcialmente desplegada mientras que la 15A es de la lisozima nativa, por lo que es congruente que el radio de giro inicial de 15B sea mayor al de 15A. Con respecto a la variación, se aprecia que es bastante mayor en la corrida de la lisozima inicial (Fig. 15A) lo que indica que el proceso de desplegamiento se está llevando a cabo de manera mucho más eficaz, que en el otro escenario donde la variación es tan baja que prácticamente no ocurre este fenómeno (Fig. 15B). Esto se puede interpretar como que hay una mejor estabilidad en esta, que en la original, que causa que el factor utilizado no logre desplegar la proteína. Dado que la diferencia entre las dos corridas radica en la ausencia o presencia de la L-Tyr, se infiere que la estabilización del intermediario es ocasionada por el compuesto presente L-Tyr (Fig. 15B).

Después de comparar los resultados de ambas corridas en los parámetros de mayor importancia (energía y radio de giro), se observa que en ambos casos la corrida correspondiente a la lisozima con L-Tyr presenta una menor afectación por el proceso de desplegamiento. Esto apoya la idea de que la L-Tyr tiene un efecto estabilizador en la proteína cuando esta se une a un intermediario del desplegamiento de la lisozima.

El resultado y análisis del proceso arroja que la L-Tyr podría tener un efecto positivo sobre la lisozima. Si se toman en cuenta los resultados obtenidos por los experimentos de laboratorio realizados (las pruebas de estabilidad de la lisozima), se refuerza la idea que se propone sobre la L-Tyr como una molécula estabilizadora de una estructura intermediaria de la lisozima que se presenta en el proceso de desplegamiento.

Mediante este trabajo se propone que la inhibición de la formación de fibras amiloides de lisozima a pH fisiológico. Se lleva a cabo en la estructura intermediaria donde ocurre la interacción entre la lisozima y la L-Tyr (figura 12). Debido a que los resultados tanto bioinformáticos como experimentales sugieren que cuando la L-Tyr está presente, la lisozima tiene una mayor resistencia a la desnaturalización, ya sea por el proceso simulado virtualmente, o en los experimentos realizados en el laboratorio por diferentes agentes desnaturalizantes. Esto es de vital importancia, pues al evitar o dificultar que el proceso de desnaturalización se lleve a cabo, se evita que la proteína cambie su estructura y tome la conformación de beta cruzada, dando como resultado la inhibición de la fibrillogénesis

Conclusiones

En el estudio que se realizó, se estableció la formación de fibras amiloides de lisozima humana en condiciones fisiológicas. Esto se logró a una concentración de 25 mg/mL de lisozima, en buffer de fosfatos 20 mM de potasio a pH de 7.44, con un periodo de incubación de 24 horas a 37°C. Este logro demuestra que es posible llevar a cabo la fibrillogénesis de lisozima en el pH que ocurre realmente esta patología en un estudio de laboratorio. Se probaron diferentes compuestos fenólicos, que tuvieron diferentes efectos de todos estos el compuesto que mostró la mejor actividad inhibitoria fue la L-tirosina. Debido a la intensidad de fluorescencia que mostró y las condiciones de este trabajo. También se seleccionó debido a que es una biomolécula que no es tóxica y es fácil de obtener.

Los datos obtenidos experimentalmente y por simulación son congruentes y complementarios, proporcionando un panorama amplio del proceso que está ocurriendo. Ambos procesos sugieren que la unión de la L-Tyr a la lisozima ocurre en un intermediario que se forma a la hora de desplegarse la lisozima. Esto da como resultado una inhibición de la fibrillogénesis. Esta unión parece ser que tiene un efecto de estabilización en la lisozima, pero hacen falta más estudios para confirmar esta idea. Por lo que se toma como un posible mecanismo de acción del compuesto. Para la finalidad de este trabajo tiene una gran importancia, debido a que propone una nueva idea de como se podría evitar la formación de fibras amiloides.

Perspectivas

Para obtener la información faltante del DSC es necesario el desarrollo de un ajuste matemático que permita definir el número de estados del proceso y a su vez permite entender mejor el mecanismo. En cuanto a evidencia que afirme que existe una inhibición hace falta realizar una microscopia de fuerza atómica, que es la forma de comprobar que no hay fibras amiloides al adicionar L-Tyr.

También hace falta realizar un análisis de las interacciones que se forman entre la L-Tyr y la lisozima en las dos posiciones que se une el compuesto. Así como las interacciones que cambian o se pierden en la proteína presencia del compuesto. Esto mediante el uso de bioinformática.

Para comprobar lo expuesto en este trabajo hace falta encontrar el intermediario que se propuso, existen diversas técnicas que podrían dar indicios de que este existe y es estable, pero la prueba irrefutable es realizar la cristalización de este intermediario.

Referencias

1. Lodish H. *Biología celular y molecular*. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2016.
2. Dobson C. The structural basis of protein folding and its links with human disease. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*. 2001;356(1406):133-145.
3. Ghiso J, Frangione B. Amyloidosis and Alzheimer's disease. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2002;54(12):1539-1551.
4. Pauling L, Corey R. Configurations of Polypeptide Chains with Favored Orientations Around Single Bonds: Two New Pleated Sheets. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1951;37(11):729-740.
5. Knowles T, Fitzpatrick A, Meehan S, Mott H, Vendruscolo M, Dobson C et al. Role of Intermolecular Forces in Defining Material Properties of Protein Nanofibrils. *Science*. 2007;318(5858):1900-1903.
6. Shirahama, T, et al., Fibrillar assemblage of variable segments of immunoglobulin light chains: an electron microscopic study. *Journal of Immunology*, 1973. 110(1): 21-30.
7. Antzutkin, O.N, et al., Multiple quantum solid-state NMR indicates a parallel, not antiparallel, organization of beta-sheets in Alzheimer's beta-amyloid fibrils. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000. 97(24): 3045-50.
8. Robinson C. Dobson C, 1949–2019: Mentor, Friend, Scientist Extraordinaire. *Annual Review of Biochemistry*. 2020;89(1):1-19.
9. Morris A, Watzky M, Finke R. Protein aggregation kinetics, mechanism, and curve-fitting: A review of the literature. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 2009;1794(3):375-397.
10. Gillam, J.E. C.E. MacPhee, Modelling amyloid fibril formation kinetics: mechanisms of nucleation and growth. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 2013. 25(37): p. 373101.
11. Bondos S. Methods for Measuring Protein Aggregation. *Current Analytical Chemistry*. 2006;2(2):157-170.
12. Biancalana M, Koide S. Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 2010;1804(7):1405-1412.

13. Biancalana M, Koide S. Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 2010;1804(7):1405-1412.
14. Durek T, Torbeev V, Kent S. Convergent chemical synthesis and high-resolution x-ray structure of human lysozyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(12):4846-4851.
15. Booth D, Sunde M, Bellotti V, Robinson C, Hutchinson W, Fraser P, et al. Instability, unfolding and aggregation of human lysozyme variants underlying amyloid fibrillogenesis. *Nature*. 1997;385(6619):787-793.
16. Chiti F, Dobson C. Protein Misfolding, Amyloid Formation, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade. *Annual Review of Biochemistry*. 2017;86(1):27-68.
17. Olivares Gonzales I. Caracterización e inhibición de la formación de amiloides de la lisozima de humano [Lic. Químico Farmacéutico Biotecnólogo]. Universidad del valle de México; 2015.
18. Cerón Cardelas R. Inhibición de amiloides de lisozima [Posgrado en Ciencias Naturales e Ingeniería.]. Universidad Autónoma Metropolitana; 2016.
19. Krebs M, Bromley E, Donald A. The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: localization and implications. *Journal of Structural Biology*. 2005;149(1):30-37.
20. Porat Y, Abramowitz A, Gazit E. Inhibition of Amyloid Fibril Formation by Polyphenols: Structural Similarity and Aromatic Interactions as a Common Inhibition Mechanism. *Chemical Biology Drug Design*. 2006;67(1):27-37.
21. Akaishi T, Morimoto T, Shibao M, Watanabe S, Sakai-Kato K, Utsunomiya-Tate N, et al. Structural requirements for the flavonoid fisetin in inhibiting fibril formation of amyloid β protein. *Neuroscience Letters*. 2008;444(3):280-285.
22. Ono K, Yoshiike Y, Takashima A, Hasegawa K, Naiki H, Yamada M. Potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects of polyphenols in vitro: implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*. 2003;87(1):172-181.
23. Help Online - Origin Help - Boltzmann [Internet]. Originlab.com. 2020 [cited 9 July 2020]. Available from: <https://www.originlab.com/doc/Origin-Help/Boltzmann-FitFunc>

24. Zheng L, Brennan J. Measurement of intrinsic fluorescence to probe the conformational flexibility and thermodynamic stability of a single tryptophan protein entrapped in a sol–gel derived glass matrix. *The Analyst*. 1998;123(8):1735-1744.
25. Yamamoto T, Fukui N, Hori A, Matsui Y. Circular dichroism and fluorescence spectroscopy studies of the effect of cyclodextrins on the thermal stability of chicken egg white lysozyme in aqueous solution. *Journal of Molecular Structure*. 2006;782(1):60-66.
26. Help Online - Origin Help - BiDoseResp [Internet]. Originlab.com. 2020 [cited 9 July 2020]. Available from: <https://www.originlab.com/doc/Origin-Help/BiDoseResp-FitFunc>
27. Zheng L, Brennan J. Measurement of intrinsic fluorescence to probe the conformational flexibility and thermodynamic stability of a single tryptophan protein entrapped in a sol–gel derived glass matrix. *The Analyst*. 1998;123(8):1735-1744.
28. Kar K, Kishore N. Enhancement of thermal stability and inhibition of protein aggregation by osmolytic effect of hydroxyproline. *Biopolymers*. 2007;87(5-6):339-351.
29. Back J, Oakenfull D, Smith M. Increased thermal stability of proteins in the presence of sugars and polyols. *Biochemistry*. 1979;18(23):5191-5196.
30. Santoro M, Liu Y, Khan S, Hou L, Bolen D. Increased thermal stability of proteins in the presence of naturally occurring osmolytes. *Biochemistry*. 1992;31(23):5278-5283.
31. Fukuda M, Kameoka D, Torizawa T, Saitoh S, Yasutake M, Imaeda Y, et al. Thermodynamic and Fluorescence Analyses to Determine Mechanisms of IgG1 Stabilization and Destabilization by Arginine. *Pharmaceutical Research*. 2013;31(4):992-1001.
32. Bennion B, Daggett V. The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003;100(9):5142-5147.
33. Sarupria S, Ghosh T, García A, Garde S. Studying pressure denaturation of a protein by molecular dynamics simulations. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 2010.
34. Batas B, Jones H, Chaudhuri J. Studies of the hydrodynamic volume changes that occur during refolding of lysozyme using size–exclusion chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1997;766(1-2):109-119.